Eradizierung von Krebsstammzellen mittels eines EpCAM/CD3-bispezifischen Antikörpers

Dissertation der

Fakultät für Biologie der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Ines Herrmann

aus Berlin

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen August 2007 und Juli 2010 unter der Anleitung von Prof. Dr. Patrick A. Baeuerle in der Firma Micromet AG, München, durchgeführt.

Dissertation eingereicht am:	30.11.2010
1. Gutachter	Prof. Dr. Thomas Cremer
2. Gutachter	PD Dr. Josef Mautner
Sondervotum	Prof. Dr. Patrick A. Baeuerle
Mündliche Prüfung am:	06.06.2011

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den 30.11.2010 _____

(Ines Herrmann)

1 Zusammenfassung

Krebsstammzellen (CSCs), auch bezeichnet als Tumor-initiierende Zellen (TICs), sind eine Subpopulation von Zellen innerhalb eines malignen Tumors, die über eine starke Karzinogenität und Selbsterneuerungspotential verfügen und gegenüber konventionellen Krebstherapien äußerst resistent sind. Sie stehen im Verdacht, sowohl für die Entstehung und Metastasierung von Tumoren als auch für das Wiederauftreten von Rezidiven verantwortlich zu sein. Daher ist ein gezieltes Vorgehen gegen diese Zellen eine vielversprechende Strategie für eine wirksame Behandlung von Krebserkrankungen.

Diese Arbeit befasst sich mit einem Antikörper-basierten Therapieansatz zur Eliminierung von Krebsstammzellen. Als Zielantigen wurde EpCAM verwendet, ein Transmembranmolekül, das durch Interaktion mit dem Wnt-Signalweg die Tumorprogression begünstigt und auf Krebsstammzellen verschiedener Tumore, insbesondere Kolonkarzinome, exprimiert ist.

Es konnte im Rahmen der Arbeit gezeigt werden, dass der gegen das humane EpCAM und CD3 gerichtete bispezifische Antikörper MT110 die Lyse EpCAM-positiver Tumor-initiierender Zellen durch T-Zellen vermitteln und somit ein Tumorwachstum verhindern kann.

Durch *in vitro*-Experimente wurde nachgewiesen, dass bereits 1 ng/ml (18 pM) MT110 in Gegenwart von peripheren humanen T-Zellen eine vollständige Eliminierung von kolorektalen TICs, isoliert aus humanem Tumorgewebe und HT-29 Xenografttumorgewebe, vermitteln kann. Im Xenograftmodell mit NOD/SCID-Mäusen konnte MT110 selbst bei einer Injektion der 5000-fachen Menge der minimal-tumorigenen Anzahl von TICs das Tumorwachstum vollständig verhindern. 94 % der Tiere, die mit einer Tagesdosis von 50 µg/kg und 500 µg/kg MT110 behandelt wurden, zeigten während der Beobachtungszeit von maximal 246 Tagen keine Tumorneubildung. Selbst bei etablierten Tumoren, die durch TICs verursacht wurden, führte die Behandlung mit 2,5 mg/kg MT110 pro Tag zu einer vollständigen Remission. Eine effektive MT110-vermittelte Lyse konnte auch für TICs von Tumorgewebe der Leber und der Brust nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass MT110 ein

erfolgversprechendes Mittel für die CSC-gerichtete Behandlung solider Tumore, insbesondere des Gastrointestinaltraktes, ist.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Bedeutung von EpCAM in Krebsstammzellen analysiert. Durch eine dauerhafte Reduzierung der EpCAM-Expression in kolorektalen TICs konnte dessen direkter Einfluss auf die Proliferation, Tumorigenität und Migration nachgewiesen werden. Zudem war es durch die EpCAM-Inhibierung erstmals möglich zu zeigen, dass EpCAM durch die Regulation des Transkriptionsfaktors SLUG und der mesenchymalen Marker Vimentin und Fibronektin wie auch des Zelladhäsionsmarkers E-Cadherin mit der epithelial-mesenchymalen Transformation (EMT) in Zusammenhang steht.

Diese Resultate beweisen erstmalig die essentielle Rolle von EpCAM in Krebsstammzellen und dessen direkter Einfluss auf die Karzinogenese und Metastasenbildung.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung 1

2 Einleitung 7

2.1 Inzidenz von Krebserkrankungen 7
2.2 Kolorektales Karzinom 7
2.2.1 Selbsterneuerung und Karzinogenese der Darmmukosa 7
2.2.2 Bisherige Therapieansätze und deren Effektivität 9
2.3 Krebsstammzellhypothese 10
2.4 Isolierung von CSCs aus soliden Tumoren 12
2.5 Angewandte CSC-Marker beim kolorektalen Karzinom 14
2.6 EMT-assoziierte migrierende Krebsstammzellen 14
2.7 Das humane epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM 17
2.7.1 Allgemeine Fakten 17
2.7.2 EpCAM in gesunden Geweben 18
2.7.3 Die EpCAM-Expression in Karzinomen 18
2.7.4 EpCAM als onkogenes Signaltransduktionsmolekül 19
2.7.5 Gegen EpCAM gerichtete Immuntherapie 21
2.8 Charakteristika des BiTE-Antikörpers MT110 22
2.9 Zielsetzung der Arbeit 25

3 Material 26

3.1 Geräte 26
3.2 Verbrauchsmaterialien 27
3.3 Kits 28
3.4 Puffer und Lösungen 28
3.5 Reagenzien und Zusätze für die Zellkultur 29
3.6 Antibiotika 29
3.7 Zellkulturmedien 30
3.8 Eukaryotische Organismen 31

3.8.1 Zellen aus Patientenmaterial 31
3.8.2 Zelllinien 31
3.8.3 NOD/SCID-Mäuse 31
3.9 Reagenzien für molekularbiologische Methoden 32
3.9.1 Enzyme und andere Reagenzien 32
3.9.2 DNA-Marker und Ladepuffer 32
3.10 Oligonukleotide 32
3.11 Antikörper 34
3.12 Chemikalien und Substanzgemische 36
3.13 Computersoftware und Datenbanken 36

4 Methoden 37

4.1 Zellbiologische Methoden 37
4.1.1 Zellkulturführung 37
4.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl 37
4.1.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) 38
4.1.4 Bestimmung der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH)-Aktivität 38
4.1.5 Sphärenbildungsversuche 39
4.1.6 Isolierung von PBMCs aus Humanblut 39
4.1.7 Stimulierung von PBMCs und Isolierung von $CD8^+$ T-Zellen 40
4.1.8 Zytotoxizitätsexperimente und Soft Agarose-Experimente 41
4.1.9 Zytotoxizitätsexperimente mittels radioaktiven Chroms 41
4.1.10 shRNA-Experimente 42
4.1.11 Bestimmung der Migrationsfähigkeit 43
4.2 Mausmodelle und *in vivo*-Arbeit 44
4.2.1 Tierhaltung 44
4.2.2 Applikationstechniken 44
4.2.3 Tumormodelle 45
4.2.4 Transplantation von kolorektalen TICs oder Soft Agar-Kolonien 46
4.2.5 Aufbereitung von Xenografttumoren 47
4.2.6 Isolation von $CD44^{hoch}$-Xenograftzellen mit Magnetpartikeln 48
4.2.7 Isolierung von TICs aus humanen kolorektalen Tumorproben 49
4.3 Molekularbiologische Methoden 50

4.3.1 Semiquantitative RT-PCR 50
4.3.2 Genomische DNA-Sequenzierung 51
4.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) 51
4.3.4 Western Blot 52

5 Ergebnisse 53

5.1 Isolierung von hochtumorigenen Zellen aus Xenografts mittels CD44-Selektion 53
5.2 Charakterisierung der selektierten HT-29-Xenograftzellen 55
5.3 Modell zur *in vitro*-Eliminierung von CSCs durch MT110 60
5.4 Effiziente Eliminierung von $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$-Zellen aus HT-29-Xenografttumoren durch MT110 62
5.5 Charakterisierung der primären kolorektalen TICs 64
5.5.1 Mutationsanalyse der Gene *KRAS* und *PIK3CA* 71
5.6 Hohe Wirksamkeit von MT110 gegen TICs *in vitro* 72
5.7 Langzeitbeobachtung zur Koloniebildung 77
5.8 Metastasierungspotential der Soft Agar-Kolonien 78
5.9 Aktivität von MT110 gegen kolorektale TICs im Mausmodell 81
5.10 Nachweis von CSC-Eigenschaften bei TICs aus Brust und Leber 84
5.11 Hohe Wirksamkeit von MT110 gegen TICs aus Brust und Leber 86
5.12 Inhibierung der EpCAM-Expression in kolorektalen TICs 88
5.12.1 Generierung EpCAM-reprimierter TICs mittels shRNAs 88
5.12.2 Inhibierung von EpCAM hat Einfluss auf die Morphologie von TICs 91
5.12.3 Verminderte Proliferation durch EpCAM-Repression in TICs *in vitro* 92
5.12.4 Abnahme der Tumorigenität bei EpCAM-inhibierten TICs *in vivo* 93
5.12.5 Einfluss der EpCAM-Reduktion auf die Migrationsfähigkeit in TICs 96

6 Diskussion 98

6.1 Charakterisierung von Tumor-initiierenden Zellen 98
6.2 EpCAM als geeignetes Zielantigen für eine Immuntherapie gegen Tumor-initiierende Zellen 100
6.3 Überlistung der Schutzmechanismen von Krebsstammzellen 102
6.4 Das therapeutische Fenster einer anti-EpCAM Therapie 104
6.5 EpCAM-Inhibierung in kolorektalen Tumor-initiierenden Zellen 106

Inhaltsverzeichnis

7 Abkürzungsverzeichnis 112

8 Literaturverzeichnis 114

Danksagung 122

Publikationen 123

Lebenslauf 124

2 Einleitung

2.1 Inzidenz von Krebserkrankungen

Krebserkrankungen stehen nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen an zweiter Stelle der häufigsten Todesursachen in Deutschland und sind im Begriff deren Häufigkeit zu übertreffen. Während sich die Sterblichkeit bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen erheblich verringert hat, ist sie für Krebserkrankungen nur leicht zurückgegangen. Jährlich erkranken ca. 400 000 Deutsche neu an Krebs (GEKID 2006). Zu den häufigsten Krebs-Erkrankungen gehören das Mammakarzinom bei der Frau und das Prostatakarzinom beim Mann, gefolgt vom kolorektalen Karzinom und Lungenkarzinom.

2.2 Kolorektales Karzinom

Als kolorektales Karzinom bezeichnet man bösartige Neubildungen des Dickdarms, Mastdarms und des Darmausgangs. Es ist die zweithäufigste Krebserkrankung sowie die zweithäufigste Krebstodesursache in Deutschland [1]. Jährlich werden ca. 66 000 Neuerkrankungen diagnostiziert und das Risiko an Darmkrebs zu erkranken liegt bei 6 %. Besonders Menschen über 50 Jahre sind davon betroffen: Männer erkranken durchschnittlich mit 69, Frauen mit 75 Jahren. Seit 1980 ist die Mortalitätsrate zwar gesunken, aber die Inzidenz der Darmkrebserkrankungen hat zugenommen und ist in den letzten zehn Jahren nahezu unverändert. Die häufigsten Risikofaktoren für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms sind Alter, Übergewicht, Bewegungsmangel, falsche Ernährung, Alkohol- und Tabak-Konsum. Bei jedem zehnten Darmkrebs-patienten spielen genetische Faktoren eine Rolle. Die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) gilt als obligate Präkanzerose und ist wie das hereditäre nichtpolypöse Kolonkarzinom (HNPCC) autosomal-dominant vererbbar [2].

2.2.1 Selbsterneuerung und Karzinogenese der Darmmukosa

Intestinale Stammzellen generieren $>10^{10}$ neue Zellen am Tag, die in Richtung Oberfläche der Darmkrypten wandern und dann abgestoßen werden [3]. Damit erneuert sich die Mukosa schneller als jedes andere humane Gewebe. Im Kolorektum

persistieren die Stammzellen auf dem Grund von Krypten, aus denen sich verschiedene Zelltypen abspalten. Durch die sogenannte asymmetrische Zellteilung wird das Fortbestehen dieser Stammzellen gewährleistet. Die abgespaltenen Tochterzellen differenzieren zu spezialisierten Zellen, wie Paneth-Zellen, Enterozyten, Becherzellen und enteroendokrinen Zellen.

Man geht heute davon aus, dass die Transformation einer normalen Zelle in eine maligne Tumorzelle, die sogenannte Karzinogenese, nicht aufgrund einer einzigen Fehlregulation stattfindet, sondern aufgrund eines mehrstufigen Prozesses. Da in der Darmmukosa bei der asymmetrischen Teilung die Stammzelle über längere Zeiträume bestehen bleibt, während die differenzierten Tochterzellen eine Lebenszeit von weniger als eine Woche aufweisen, können sich bei diesen Stammzellen Mutationen oder chromosomale Aberrationen akkumulieren, was zur erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Fehlregulierung und schließlich Zellentartung führt [4].

Der genaue Mechanismus der Karzinogenese ist bis heute nicht geklärt. Es wird vermutet, dass sechs essentielle Veränderungen in der Zelle stattfinden müssen, die kollektiv zu einem malignen Wachstum führen: Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumsinhibitorischen Signalen, Immunität gegen Apoptose, unkontrolliertes Zellwachstum, verstärkte Angiogenese, Gewebeinfiltration und Metastasierung [5]. Gene, die bei diesen Prozessen eine Rolle spielen, nennt man Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene. Kommt es zu einer Mutation eines der Allele eines Proto-Onkogens, führt das zu einer erhöhten Aktivität des Genproduktes; eine erhöhte Zellteilungsrate ist die Folge. Als Beispiel sei hier das *KRAS*-Gen genannt; einzelne Punktmutationen in diesem Gen führen zu einem ständigen wachstumstimulierenden Signal [6]. Tumorsuppressorgene sind Gene, die wichtig für die Zellzykluskontrolle, die genetische Stabilität oder die Apoptose sind, wie zum Beispiel das p53-Gen [7]. Finden Mutationen auf beiden Allelen statt, so führt das zu einem Funktionsverlust des Gens.

In kolorektalen Neoplasien sind meist Gene des AKT/PKB-, Wnt- und/oder BMP-Signalwegs betroffen [8]. Zum Beispiel verursachen *loss of function*-Mutationen im Adenomatösen Polyposis Coli (*APC*)-Gen, das für ein Schlüsselprotein im Wnt-Signalweg codiert, eine familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) [9]. Bei einer FAP liegt im angeborenen Zustand schon ein mutiertes Allel des *APC*-Gens vor, wobei die zweite

Mutation im Laufe des Lebens neu erworben wird. Dadurch ist das Tumorsuppressorprotein APC nicht mehr in der Lage, das im Wnt-Signalweg als Regulatorprotein agierende β-Catenin im Zytosol zu binden und für den Abbau bereitzustellen. ß-Catenin kann dann in den Zellkern translozieren und zusammen mit den Transkriptionsfaktoren TCF/LEF die Expression von Zielgenen, die für Zellwachstumsprozesse wichtig sind, aktivieren [10]. Auch das KRAS-Protein als wichtiges Signalmolekül in Wachstums- und Differenzierungs-Prozessen kann durch eine vorliegende Dysregulation zum FAP-Syndrom beitragen [11].

2.2.2 Bisherige Therapieansätze und deren Effektivität

In der Regel werden eine operative Resektion des mit Krebs befallenen Darmabschnittes und die Entfernung der umliegenden Lymphknoten angestrebt. Je nach Stadium der Tumorerkrankung kommen Zytostatika und Strahlentherapie zum Einsatz. Bei der Chemotherapie werden Medikamente wie 5-Fluoruracil, Folinsäure und Oxaliplatin in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt, deren Wirkungen unspezifisch und toxisch sind, da sie das Zellwachstum und die Zellteilung sowohl bei den Tumorzellen als auch bei gesunden Zellen hemmen. Diese Therapien sind darauf ausgerichtet, die Haupttumormasse zu reduzieren. Bei Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung bzw. Auftreten von Metastasen wächst der Tumor häufig erneut und führt zu einem Rezidiv. Ein Grund könnte sein, dass Krebsstammzellen (CSCs) bzw. Tumor-initiierende Zellen (TICs) gegenüber diesen Chemotherapeutika äußerst resistent sind. CSCs zeichnen sich gegenüber den anderen Tumorzellen unter anderem durch besondere DNA-Reparaturfähigkeiten und Expression von bestimmten Efflux-transportern aus, so dass sie sich gegen die Zytostatikatherapien schützen können und nach Behandlungsende für einen Rückfall der Erkrankung verantwortlich sind. Auf diese Schutzmechanismen der CSCs wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen.

Abb. 1 soll verdeutlichen, dass herkömmliche Krebstherapien anfänglich die Tumormasse zum Schrumpfen bringen und daher eine Heilung vortäuschen, aber die eigentlichen Tumor-induzierenden Zellen nicht getroffen werden. Nach der Behandlung kommt es dann häufig zu einer erneuten Tumorausbildung. Daher ist es notwendig, eine

auf CSCs ausgerichtete Therapie zu entwickeln, um eine nachhaltige Heilung zu erreichen.

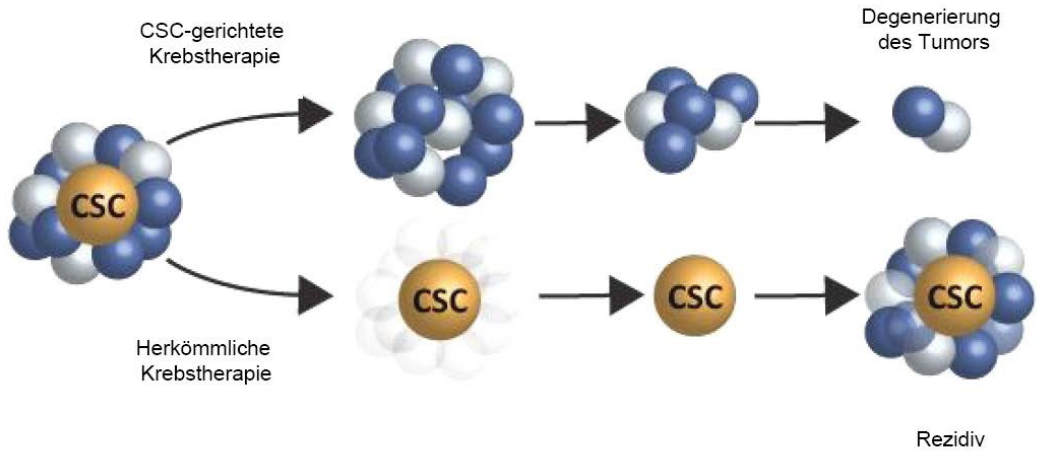

Abb. 1 Unterschied zwischen konventioneller Krebstherapie und CSC-gerichteter Krebstherapie. Gezeigt ist, wie eine herkömmliche Krebstherapie die Gesamttumormasse zum Schwinden bringt. Krebsstammzellen überleben durch ihre Schutzmechanismen jedoch meist die Behandlung und sind für die Bildung von Rezidiven verantwortlich. Zum Vergleich wird eine gezielte Therapie gegen Krebsstammzellen dargestellt, bei der es zu einer vollständigen Degenerierung des Tumors kommt. Eine Rezidivbildung wird so vermieden.

2.3 Krebsstammzellhypothese

Zwei mögliche konkurrierende Hypothesen, die klonale Selektionshypothese und die Krebsstammzellhypothese, versuchen die Entstehung von Tumoren zu erklären. Bei der ersten wird davon ausgegangen, dass jede Tumorzelle die Fähigkeit zur Tumorbildung hat. Die Tumorzellen sind in ihrem tumorigenen Potential ähnlich. Es gibt jedoch immer mehr schlüssige Hinweise auf die Existenz von Krebsstammzellen [12-14]. Die Krebsstammzellhypothese besagt, dass es eine kleine Population innerhalb der gesamten Tumorzellmasse gibt, die für die Entstehung des Tumors und Bildung von Metastasen verantwortlich ist. Wegen der daraus resultierenden im Tumor vorliegenden Heterogenität ist oft von einer hierarchischen Organisation die Rede, bei der die Krebsstammzellen die Spitze dieser Hierarchie bilden [15].

Den ersten Beweis für die Existenz von Krebsstammzellen gab es bereits vor mehr als zehn Jahren für die akute myeloische Leukämie. Eine kleine Subpopulation von $CD34^+/CD38^-$-Zellen, die 0,01 %-1 % der Gesamtpopulation ausmachte, konnte in

immunsupprimierten Mäusen Leukämien ausbilden, während andere Zellpopulationen, wie $CD34^+/CD38^+$-Zellen nicht dazu imstande waren. Die $CD34^+/CD38^-$-Zellen wurden daher als *Cancer Stem Cells* (CSCs) bezeichnet [15]. Seither wurden putative CSCs von vielen Tumoren, wie der Brust [16], des Gehirns [17], des Kolons [14], der Pankreas [18], der Prostata [19], des Ovars [20], der Retina [21], der Lunge [19], des Kopfs und des Halses [22] isoliert.

Krebsstammzellen verfügen über folgende stammzellähnliche Eigenschaften: Sie haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und generieren ausdifferenzierte, spezialisierte Tumorzellen, die den Hauptteil des Tumors bilden [23]. Einer der gebräuchlichen Nachweise von CSCs ist die serielle Transplantation in Tiermodellen. In diesen Experimenten wird gezeigt, dass Krebsstammzellen die phänotypische Heterogenität des Primärtumors immer wieder herstellen können [24].

CSCs sind äußerst tumorigen, d.h. es wird nur eine geringe Anzahl von Zellen benötigt, um einen Tumor zu initiieren. Deshalb wurden in der Vergangenheit sehr oft Titrationsversuche in Xenograftmodellen zur Identifizierung der CSCs angewandt. Viele Forschungsgruppen konnten noch bei einer Mindestzahl von 100 isolierten Zellen eine Tumorbildung beobachten (Tab. 1). Eine weitere Eigenschaft der CSCs ist es, unter serumfreien Bedingungen anti-adhäsive multizelluläre Sphären zu bilden, was in der Literatur zur Identifizierung von Krebsstammzellen oft beschrieben wurde [12].

Gegenüber herkömmlichen Tumortherapien scheinen diese Zellen immun zu sein, da sie über gewisse Schutzmechanismen verfügen, wie beispielsweise effektive DNA-Reparaturmechanismen [25], eine langsame Teilungsrate oder auch eine erhöhte Expression von anti-apoptotisch wirkenden Proteinen wie Bcl-2 [26]. Die Expression bestimmter ABC-Transporter wurde ebenfalls mit der Chemoresistenz in Verbindung gebracht. Diese Transporter, die als Strukturelement eine ATP-bindende Kassette besitzen, sind besonders auf normalen Stammzellen aber auch auf CSCs überexprimiert und bieten Schutz gegen xenobiotische Substanzen, indem sie diese aus der Zelle wieder hinauspumpen. Neben anderen Transportern wurden ABCG2-Pumpen auf vielen Tumoren gefunden. $ABCG2^+$-Zellen sind in der FACS-Analyse mit dem $Hoechst_{33342}$-Farbstoff als Seitenpopulation sichtbar, weil sie den Farbstoff mithilfe des Transporters herauspumpen können [27]. Außerdem wurde beschrieben, dass CSCs metabolische Enzyme, wie die Aldehyd-Dehydrogenase ALDH1, exprimieren, welches im

Alkoholmetabolismus toxisches Acetaldehyd in nicht toxisches Acetat umwandelt. Dieses Enzym kann jedoch auch Chemotherapeutika, wie Cyclophosphamide und Cis-Platinverbindungen, metabolisieren [28].

2.4 Isolierung von CSCs aus soliden Tumoren

Eine Anzahl von Oberflächenantigenen hat sich bei der Isolierung von CSCs bewährt, wie beispielsweise CD133, CD44, CD24, EpCAM und die $Hoechst_{33342}$-Exklusion Seitenpopulation. Gegen diese Antigene gerichtete Antikörper werden von vielen Forschungsgruppen als Hilfsmittel für die immunomagnetische Separation mit Magnetpartikeln (siehe Kapitel 4.2.6) oder für die durchflusszytometrische Separation von CSCs eingesetzt.

Im Folgenden werden die Oberflächenmarker kurz beschrieben, die in der Fachliteratur für die Isolierung von CSCs vielfach erwähnt wurden.

CD44

CD44 ist ein hoch glykosyliertes Typ-I-Transmembranprotein mit einer Größe von 90 kDa. Es besitzt multiple Signalfunktionen durch seine Interaktion mit vielen Proteinen. CD44 ist beteiligt an der Zellproliferation, Matrix-Degradierung, Migration und Adhäsion. Aus diesem Grund scheint es bei der Tumorprogression und Metastasierung eine wichtige Funktion zu haben [29]. Es gibt eine Reihe von Isoformen von CD44, wobei die Variante CD44v6 Einfluss auf das Metastasierungspotential von Tumoren haben soll [30] und darüber hinaus als Marker für Metastasen beim Kolorektalkarzinom gilt [31].

CD133

CD133, auch bekannt als Prominin-1, ist ein transmembranes Glykoprotein, das auf humanen hämatopoetischen Stammzellen, neuronalen Stammzellen, endothelialen Progenitorzellen und anderen embryonalen Epithelien zu finden ist. Obwohl die biologische Funktion von CD133 noch unklar ist, wurde CD133 als Stammzellmarker für normales Gewebe (Knochenmark, Gehirn, Leber, Prostata, Haut, Niere) und malignes Gewebe (Kolon, Prostata, Leber, Pankreas, Lunge) identifiziert [32].

CD24

CD24 ist ein kleines vielfach glykosyliertes Zelloberflächenmolekül mit multiplen O- oder N-Glykosylierungsstellen. Es kann so ein Molekulargewicht von 30-70 kDa haben. Es wird in der B-Zellentwicklung und in der Embryogenese exprimiert und stellt ein potentielles Onkogen dar. CD24 wird in 90 % der kolorektalen Karzinome überexprimiert [33]. Aus Brust- und Pankreasgewebe isolierte Krebsstammzellen sind CD24-negativ [16, 18, 24]. In Kolonzelllinien hingegen wurden CD24-positive CSCs identifiziert [34].

Tab. 1 gibt abschließend einen Überblick über in der Literatur beschriebene Krebsstammzellmarker.

Tab. 1 Putative CSC-Marker und deren Kombinationen in soliden Tumoren (entnommen aus [35]). Übersicht der gebräuchlichen Zielantigene für die Isolierung von Krebsstammzellen.

CSC-Marker	Tumortyp	% CSC-Marker in Tumorzellen	Mindestzellzahl für Tumorbildung	Ref.
$CD44^+/CD24^{-/niedrig}$	Brust	11-35	200	[16]
$CD44^+$	Kopf und Hals Prostata	0,1-42 0,3-38	5 000 100	[22] [36]
$CD44^+/EpCAM^{hoch}$	Kolon	0,03-38	200	[13]
$CD44^+/CD24^-/EpCAM^+$	Pankreas	0,2-0,8	100	[18]
$ALDH1^+$	Brust	3-10	500	[37]
$CD133^+$	Gehirn Kolon Kopf und Hals Pankreas Lunge	6-29 1,8-25 0,8-4,2 1-3 0,32-22	100 200 1 000 500 10 000	[17] [12] [38] [39] [40]
Seitenpopulation	Prostata	0,05-0,2	100	[41]

2.5 Angewandte CSC-Marker beim kolorektalen Karzinom

Zwei Arbeitsgruppen verwendeten unabhängig voneinander CD133 als Selektionsmarker für kolorektale Krebsstammzellen. CD133 ist zwar auch auf normalem Darmepithel vorhanden, wird aber in malignem Gewebe 6-fach höher exprimiert [12]. O´Brien *et al.* separierten $CD133^-$- und $CD133^+$-Populationen von Patientenproben und injizierten sie in NOD/SCID-Mäuse [12]. Die niedrigste Dosis von $CD133^-$-Zellen, die einen Tumor initiieren konnten, lag bei $2{,}5x10^5$ Zellen, während 100 $CD133^+$-Zellen für eine Tumorbildung ausreichend waren. Ricci-Vitiani *et al.* zeigten, dass $CD133^+$-Zellen, die *in vitro* unter serumfreien Bedingungen in multizellulären Sphären heranwuchsen und sich bis zu einem Jahr kultivieren ließen, in NOD/SCID-Mäusen Tumore generierten, die phänotypisch dem Ursprungstumor sehr ähnlich waren. Sobald diese Zellen in serumhaltigem Medium ohne Wachstumsfaktoren wuchsen, verwandelten sie sich in adhärente, ausdifferenzierte und CD133 negative Zellen, die Differenzierungsmarker wie Zytokeratin 20 exprimierten [14].

Dalerba *et al.* zeigten, dass nur die Zellen aus kolorektalen Neoplasien Tumore bildeten, die positiv für EpCAM und CD44 waren. Es stellte sich heraus, dass diese Tumorzellen ebenfalls positiv für CD166 waren [13].

Einige Publikationen berichten auch von einer heterogenen Markerexpression innerhalb der Krebsstammzell-Population. In Glioblastomen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass $CD133^-$-Zellen eine ähnliche Tumorigenität wie $CD133^+$-Zellen in Mausmodellen zeigten [42].

2.6 EMT-assoziierte migrierende Krebsstammzellen

Es gibt Hinweise, dass es neben den lokal persistierenden Krebsstammzellen auch mobile oder migrierende Krebsstammzellen geben muss, die sich vom Primärtumor ablösen, durch den Blutkreislauf/Lymphkreislauf verbreiten, um in entfernten Geweben Metastasen zu bilden. In der Tat würde diese Hypothese erklären, dass die inhomogene Morphologie des primären Tumors mit der in sekundären Tumoren identisch ist, da die mobilen Krebsstammzellen ja die für die Heterogenität notwendigen verschieden spezialisierten Nachfolgerzellen generieren können. Durch ihre besonderen Verteidigungsstrategien geschützt, werden diese Zellen nach Beendigung der Therapie

auch für die Bildung von Rezidiven bzw. Metastasen verantwortlich gemacht [43]. Für die notwendige Mobilität dieser Krebsstammzellen werden in ausdifferenzierten Zellen längst stillgelegte Signalwege aktiviert, die während der Embryogenese eine Rolle spielen. Ein dafür verantwortlicher und mittlerweile namhafter Schlüsselmechanismus ist die epithelial-mesenchymale Transformation, kurz EMT genannt. Sie bewirkt durch Zerstörung der Zell-Zell-Kontakte, Aufhebung der Zellpolarität und Reorganisation des Zytoskeletts die Umwandlung der Zelle von einem epithelialen in einen mesenchymalen Phänotyp [44]. Zwei Signalwege, der TGF-β-Signalweg und der Wnt-Signalweg, spielen bei der EMT eine Rolle [45]. Eine Schlüsselrolle nimmt bei beiden Signalwegen der Transkriptionsfaktor TCF/LEF-1, ein Mitglied der HMG-Box DNA Bindeproteine, ein. Dieser Komplex kann zusammen mit β-Catenin wichtige Gene für den EMT-Prozess aktivieren oder inhibieren, wie zum Beispiel E-Cadherin [46]. Der Verlust von E-Cadherin, einem für die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten essentiellen Molekül, ist eine wichtige Voraussetzung für die Initiation der EMT [47]. Regulatoren wie TWIST, SNAIL1, SIP1 werden exprimiert und können unter anderem auch die Expression von E-Cadherin inhibieren [48]. Mesenchymale Marker wie Fibronektin, Vimentin und N-Cadherin werden im Gegensatz dazu während der EMT hochreguliert [49].

Durch den daraus resultierenden mesenchymalen Phänotyp kann sich die Krebsstammzelle vom Primärtumor lösen, in den Blutkreislauf invadieren und an einer anderen Stelle Tochtergeschwüre bilden (Abb. 2).

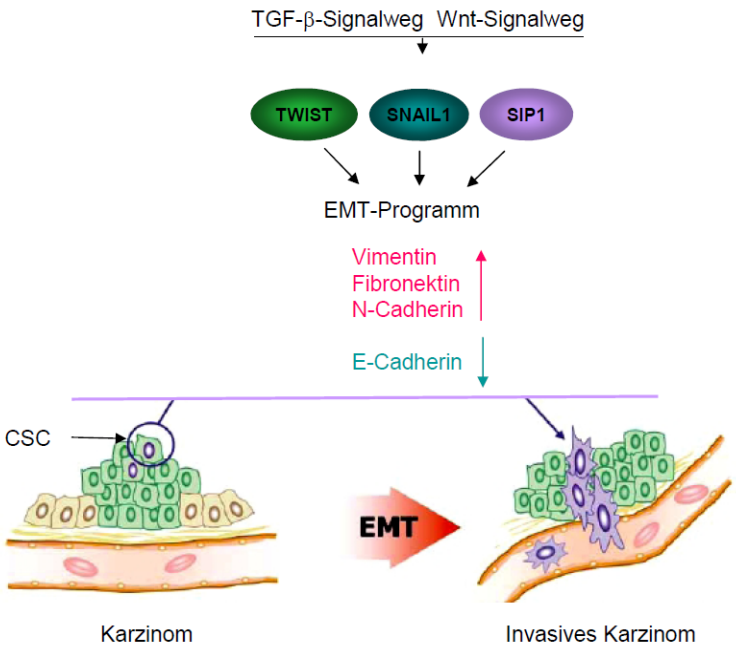

Abb. 2 Wichtige Regulatoren und Mediatoren in der epithelial-mesenchymalen Transformation.
Die epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) wird von verschiedenen Modulatoren des TGF-β-Signalwegs und des Wnt-Signalwegs sowie von Regulatoren wie TWIST, SNAILl, SIP1 beeinflusst, was zu Veränderungen des Genexpressionsprofils führt. Epitheliale Marker wie E-Cadherin werden reprimiert, während mesenchymale Marker, wie Fibronektin, Vimentin und N-Cadherin, überexprimiert werden. Daraus resultiert eine Umwandlung der Zelle von einem epithelialen in einen mesenchymalen Phänotyp. Die Zelle löst sich aus dem Zellverband des Primärtumors, invadiert in den Blutkreislauf und kann an einer anderen Stelle Tochtergeschwüre bilden.

Zwei Arbeitsgruppen lieferten neueste Beweise für die Hypothese der EMT-assoziierten migrierenden Krebsstammzellen. Mani *et al.* berichteten, dass aus Brustkrebs isolierte $CD44^{+}/CD24^{-}$-Tumorzellen mit Krebsstammzellcharakter EMT-assoziierte Marker exprimieren [50]. Hermann *et al.* zeigten, dass es in der invasiven Front von Pankreastumoren eine migrierende Subpopulation von $CD133^{+}/CXCR4^{+}$-Krebsstammzellen gibt, die essentiell für die Metastasierung von Pankreastumoren ist [39].

2.7 Das humane epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM

2.7.1 Allgemeine Fakten

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM ist nicht nur eines der zuerst entdeckten menschlichen Tumor-assoziierten Antigene, sondern auch Zielstruktur des ersten monoklonalen Antikörpers (muAb 17-1A, später bekannt als Panorex®), der in der Krebstherapie eingesetzt wurde [51].

EpCAM ist ein transmembranes Glykoprotein mit einem heterogenen Molekulargewicht von 35 bis 40 kDa, bedingt durch differentielle Glykosylierungen [52]. Es wurde mehrere Male unabhängig entdeckt und trägt daher auch verschiedene, meist nach monoklonalen Antikörpern benannte, Namen wie ESA, 17-1A, 323/A3, AUA1, CD326, GA733-2, KSA, KS1/4 oder TACST-1. Es wird von dem Gen GA733-2 kodiert [53] und ist auf Chromosom 2 (2p21) lokalisiert [54]. In höheren Vertebraten ist EpCAM relativ hoch konserviert (Maus/Mensch=82 % Homologie) [55], was auf eine wichtige Rolle von EpCAM hinweist. GA733-2 kodiert für ein 314 Aminosäuren langes Polypeptid, bestehend aus einer Signalsequenz (23 AS), einer extrazellulären Domäne (242 AS) bestehend aus zwei zysteinreichen EGF *(Epidermal growth factor)*-ähnlichen Domänen [56] mit drei N-Glykosylierungsstellen, einer einzigen Transmembrandomäne (23 AS) und einer kleinen intrazellulären Domäne (26 AS) [57]. Das zweite weiter vom N-Terminus entfernte EGF-ähnliche Motiv zeigt eine Homologie zu der Thyroglobulin-Typ-I Domäne [58].

EpCAM bildet homophile Zell-Zell-Interaktionen mittels der ersten N-terminalen EGF-ähnlichen Domäne aus. Balzar *et al.* postulierten, dass EpCAM auf der Oberfläche Tetramere bildet, die mit anderen EpCAM-Tetrameren auf der benachbarten Zelle eine Verbindung eingehen [59]. Die Tetramer-Bildung wird dabei durch die zweite EGF-ähnliche Domäne vermittelt. EpCAM ist auf der basolateralen Plasmamembran epithelialer Zellen lokalisiert. Die EpCAM vermittelte Zell-Zell-Adhäsion ist jedoch schwach im Vergleich zu anderen Adhäsionsmolekülen, wie bspw. Cadherinen [60]. Der intrazelluläre Teil von EpCAM ist mit dem Aktinzytoskelett verbunden [57].

2.7.2 EpCAM in gesunden Geweben

EpCAM wird im gesunden Gewebe an der basolateralen Membran von allen einfachen, Pseudo-Plattenepithelien und Übergangsepithelien exprimiert. Ausnahmen sind einige voll differenzierte epitheliale Zelltypen, wie Keratinozyten, Hepatozyten, kortikale Thymusepithelzellen, gastrische Parietalzellen und myoepitheliale Zellen. EpCAM wird nicht exprimiert auf mesodermalen oder neuralen Zellmembranen, Neuronen, Stromazellen, endothelialen Zellen oder Zellen lymphoiden Ursprungs [61].

Es gibt zwischen den einzelnen Geweben sehr hohe Expressionsunterschiede, wie z.B. im gastrointestinalen Trakt. Im Magenepithel ist die EpCAM-Expression nur sehr schwach, im Dünndarm etwas stärker und im Dickdarm sehr stark.

EpCAM scheint eine morphoregulatorische Rolle in der Embryogenese zu spielen, da es bereits in den ersten Entwicklungsstufen exprimiert wird [62]. Es ist in fötalen Lungen-, Leber-, Nieren- (proximale Tubuli), Pankreas-, Haut- und Keimzellen zu finden [57]. In den ersten Stufen der Morphogenese wird EpCAM von epithelialen Vorläuferzellen exprimiert. Im Verlauf der Entwicklung jedoch verlieren viele Gewebe ihre EpCAM-Expression, was z.B. bei der Hepatozytenentwicklung zu beobachten ist. In acht Wochen alten Embryos sind die Hepatozyten EpCAM-positiv und verlieren nach und nach ihr EpCAM bis auf die Gallengänge. Interessanterweise findet in entarteten Hepatozyten wieder eine *de novo*-Expression von EpCAM statt [63].

2.7.3 Die EpCAM-Expression in Karzinomen

EpCAM wird sehr oft in primären Tumoren und Metastasen der meisten humanen Adenokarzinome hochreguliert [64, 65] oder *de novo* exprimiert. In vielen humanen Neoplasien wie der Brust, Ovar, Pankreas, Gallenblase und Leber korreliert die Überexpression von EpCAM mit einer verminderten Überlebensrate der Patienten [66-70]. Andererseits gibt es Krebserkrankungen, wie einige Lungentumore, bei denen die EpCAM-Expression mit einer besseren Überlebensprognose korreliert [64].

In Brust-, Dünndarm-, Kolon-, Lungen- und Prostata-Krebs wurde eine sehr starke EpCAM-Expression gefunden [64], wogegen Tumore nicht-epithelialen Ursprungs in der Regel EpCAM-negativ sind. Aus diesen Befunden geht hervor, warum EpCAM als epithelialer Tumormarker und therapeutische Zielstruktur sehr attraktiv ist.

Darüber hinaus wurde EpCAM zur Isolierung von Krebsstammzellen aus diversen Tumoren erfolgreich eingesetzt [13, 18] und wird seit kurzem auch in der Fachliteratur als Krebsstammzellmarker beschrieben [71-73].

Des Weiteren konnte in mehreren Modellen bewiesen werden, dass EpCAM Einfluss auf die Proliferation, Migration und Metastasenbildung hat [74, 75]. In Patientengewebe von metastasierenden Brustkarzinomen wurde eine höhere EpCAM-Expression im Vergleich zu primären Brustkarzinomen gezeigt [76]. Ebenso wurde berichtet, dass eine Komplexbildung von EpCAM mit dem „Tight Junction"-Protein Claudin-7, CD44v6 und dem Tetraspanin CO-029 die Metastasenbildung in kolorektalen Krebszellen unterstützt und eine Koexpression mit einer Verkürzung der symptomfreien Zeit korreliert [77]. Auf der anderen Seite wird in einigen Publikationen der Verlust von EpCAM in Verbindung mit einer erhöhten Metastasierungsrate gebracht [78, 79].

In Anbetracht der dargestellten Ergebnisse lässt sich sagen, dass EpCAM eine bedeutende Rolle bei der Tumorgenese epithelialer Gewebe spielt.

2.7.4 EpCAM als onkogenes Signaltransduktionsmolekül

EpCAM kann durch regulierte Intramembranproteolyse gespalten werden und als Signaltransduktionsmolekül durch Aktivierung des Proto-Onkogens *MYC* und von Zyklinen direkt Einfluss auf die Karzinogenese nehmen [80, 81].

Die für die proteolytische Spaltung von EpCAM zuständigen Enzyme sind das Tumornekrosefaktor-α-konvertierende Enzym (TACE) für die Prozessierung der extrazellulären Domäne und γ-Sekretase für die intrazelluläre Domäne. Die freigesetzte intrazelluläre Domäne, kurz EpICD genannt, bindet an das Adapterprotein FHL2 und β-Catenin im Zytoplasma. Nach Translokation in den Nukleus bildet sich ein großer Komplex mit dem Transkriptionsfaktor TCF/LEF-1, der Gene aktiviert.

β-Catenin und TCF/LEF-1 sind Signalmoleküle des Wnt-Signalwegs, der maßgebend an dem Wachstum und dem Überleben von malignen und pluripotenten Stammzellen beteiligt ist. Dieser EpICD/FHL2/β-Catenin/TCF/LEF-1 Kernkomplex aktiviert unter anderem die Transkription von *MYC* (Abb. 3). Das Protein c-Myc des Proto-Onkogens *MYC* wird bei einer Vielzahl von Karzinomen überexprimiert und

spielt eine wesentliche Rolle in der Zellzyklus- und Wachstumsregulation. Des Weiteren wurde eine Anzahl von EpCAM-regulierten Zielgenen identifiziert, wie Zyklin A, Zyklin E [80, 81] sowie weitere an der Zellzyklusregulierung beteiligte Gene [82].

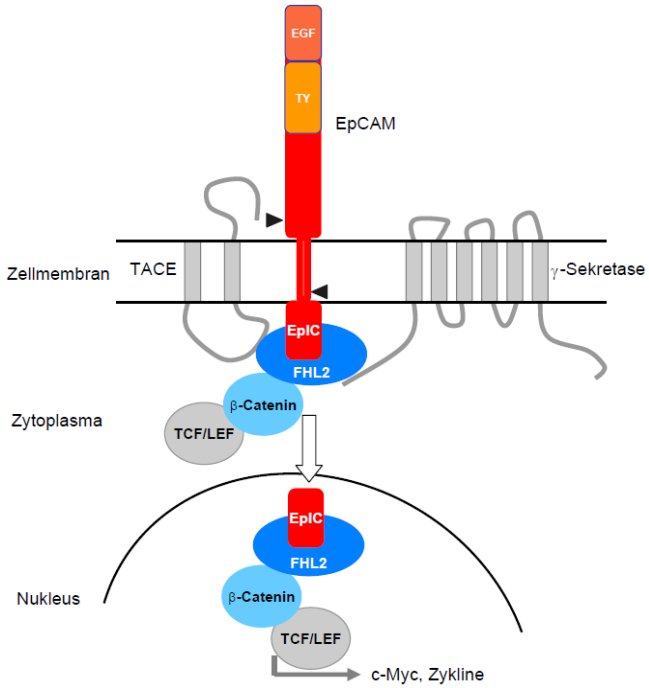

Abb. 3 Nukleäre Signalübermittlung von EpCAM.

EpCAM wird durch TACE und γ-Sekretase gespalten. Die intrazelluläre Domäne EpICD bildet einen Komplex mit FHL2 und β-Catenin und transloziert in den Kern, wo sie nach Bindung mit dem Transkriptionsfaktor TCF/LEF die Expression unter anderem von c-Myc und Zyklinen reguliert.

Außerdem konnte durch humane Patientenproben gezeigt werden, dass EpICD in den Nuklei von kolorektalen Karzinomen, nicht aber in normalen Geweben zu finden ist [80].

Weitere Hinweise auf die proliferationsfördernden Eigenschaften von EpCAM kommen von Litvinov *et al.*, die zeigen konnten, dass eine Überexpression von EpCAM zur Reduktion von E-Cadherin-vermittelten Adhäsionen und zum erhöhten Vorkommen an EpCAM-vermittelten interzellulären Verbindungen führt [60]. E-Cadherin ist über die zytoplasmatische Domäne mit α- und β-Catenin assoziiert, welche die Bindung an das Aktinzytoskelett vermitteln. Die Reduktion des Vorkommens der E-Cadherin-vermittelten Adhäsionen durch EpCAM hat keinen Einfluss auf die Gesamtmenge von

intrazellulärem E-Cadherin, vielmehr wird die Assoziation des Cadherin/Catenin-Komplexes mit dem Aktinzytoskelett gestört. Eine Reduktion der Menge an α-Catenin wurde beobachtet, während die Menge an β-Catenin konstant blieb. EpCAM-Mutanten mit einer fehlenden zytoplasmatischen Domäne zeigten keinen Effekt auf die Cadherin-vermittelte Adhäsion. Daher wurde vermutet, dass die intrazelluläre Domäne EpICD über die Bindung von α-Aktinin bei der Regulation der Cadherin-vermittelten Adhäsion eine Rolle spielt [83].

2.7.5 Gegen EpCAM gerichtete Immuntherapie

EpCAM wurde aufgrund seines hohen Vorkommens auf den meisten humanen Tumoren als Zielantigen für eine Reihe von Antikörper- und Vakzin-basierte Immuntherapien verwendet [65, 84]. Im Folgenden werden Beispiele von klinisch relevanten anti-EpCAM-Antikörpern genannt, die unter anderem darauf hinweisen sollen, wie schwer es ist, das therapeutische Fenster für EpCAM-spezifische Antikörper mit einer guten klinischen Aktivität und gleichzeitig guter Tolerabilität zu finden.

Einer der ersten anti-EpCAM Antikörper, die in der Krebstherapie eingesetzt wurden, ist 17-1A [85]. Dieser monoklonale Antikörper ist niedrig-affin und zeigte bei Patienten mit manifesten Kolorektalkarzinomen nur geringe Wirksamkeit. Eine post-operative Behandlung mit 17-1A führte jedoch bei Patienten zu einer signifikant verlängerten Überlebensrate [86]. 17-1A wurde unter dem Namen Panorex® im Jahre 1995 in Deutschland zugelassen. Da Panorex® eine schwache Affinität aufzeigt, sollten höher-affine Antikörper, wie GA733 und 323/A3, bessere therapeutische Ergebnisse erzielen. Allerdings kam es zu Nebenwirkungen und Schädigungen EpCAM-exprimierender gesunder Gewebe wie des Pankreas [87].

Removab® (Catumaxomab) ist ein Maus/Ratten-IgG-Antikörper einer neuen Generation mit trifunktionalem Wirkungsprinzip, der neben EpCAM an CD3 von T-Zellen und an den Fc-Teil akzessorischer Zellen (z.B. NK-Zellen) binden kann. Er ermöglicht eine Verlängerung des punktionsfreien Intervalls bei Ovarkarzinom-patientinnen mit maligner Aszitis. Bei der Behandlung mit Removab® treten sehr oft zytokinassoziierte Symptome wie Fieber, Übelkeit und Erbrechen auf (EMEA/H/C/000972).

Adecatumumab (MT201) ist ein monoklonaler, komplett humanisierter anti-EpCAM Antikörper mittlerer Bindungsstärke, der in der klinischen Phase II bei Patienten mit metastasierendem Brustkrebs bzw. Prostatakrebs untersucht wurde. Adecatumumab zeigte besonders bei Brusttumoren mit sehr hoher EpCAM-Expression eine signifikante Verlängerung des Zeitraumes bis zum Fortschreiten der Krankheit. Außerdem ist er im Patienten sehr gut verträglich. Nebenwirkungen wie beispielsweise Pankreatitis, die bei der Gabe hoch-affiner Antikörper (z.B. bei ING-1) auftreten können, waren nicht zu beobachten [88].

Im nächsten Abschnitt wird ein EpCAM-Antikörper der BiTE™ (*Bispecific T Cell Engager*)-Technologie ausführlich dargestellt.

2.8 Charakteristika des BiTE-Antikörpers MT110

Tumorzellen besitzen vielseitige Möglichkeiten, sich einer Erkennung des Immunsystems zu entziehen [89]. So können sie beispielsweise die körpereigene zelluläre Immunantwort durch Abgabe von Zytokinen, wie TGF-β, Interleukin (IL)-10, IL-4 [90-92] oder Granzym-Inhibitoren [93], oder pro-apoptotischen gegen T-Zellen gerichtete Liganden [94] unterdrücken. Ein häufiger und effektiver Schutzmechanismus von Tumorzellen ist die reduzierte Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Klasse-I-Molekülen [95] auf der Zelloberfläche, sodass die Zellen von dem adaptiven Immunsystem nicht erkannt und eliminiert werden können. Der Wirkungsmechanismus von bispezifischen Antikörperkonstrukten, wie dem BiTE-Antikörper MT110, funktioniert unabhängig von der herkömmlichen T-Zell-Aktivierung durch den Antigen-MHC-I-Komplex [96], über die direkte Ausbildung einer temporären zytolytischen Synapse zwischen Tumorzelle und T-Zelle. Daher spielen die Überlebensstragien der Tumorzellen durch eine veränderte MHC-I-Expression keine Rolle für eine erfolgreiche Eliminierung von Tumorzellen.

Die grundlegenden Eigenschaften der BiTE-Moleküle sollen anhand des in dieser Arbeit verwendeten Moleküls MT110 kurz dargestellt werden. MT110 besteht aus einer einzigen Polypeptidkette von ca. 55 kDa, die von zwei tandemartigen scFv-Domänen gebildet wird. Die N-terminale scFv-Domäne ist EpCAM-spezifisch, die C-terminale scFv-Domäne ist CD3ε-spezifisch. Kurze flexible Peptidlinker verbinden die

scFv-Domänen und erlauben eine freie Rotation der beiden scFv-Domänen. Eine optimale Interaktion der beiden Zielepitope auf T-Zelle und Tumorzelle wird somit gewährleistet [97] (Abb. 4 A).

MT110 bildet eine temporäre Verbindung zwischen Tumorzellen und zytotoxischen T-Zellen. Die Bindung induziert eine zytolytische Synapse zwischen T-Zelle und Tumorzelle ähnlich wie bei der natürlichen Immunantwort. Als Folge wird eine T-Zellantwort gegen die Tumorzelle ausgelöst, die ohne Kostimulation abläuft, wie sie bei der regulären T-Zellaktivierung notwendig ist [98]. Sekretorische Granula in der T-Zelle werden durch diese Aktivierung zur Synapse transportiert. Durch Degranulation werden daraus zytolytische Proteine wie Perforin und Granzym A und B freigesetzt. Die Außenmembran der Tumorzelle wird dabei vom insertierten Perforin durchlöchert, wobei die proteolytischen Enzyme Granzym A und B den apoptotischen Zelltod induzieren. Einmal aktivierte T-Zellen können seriell mehrere Targetzellen eliminieren [99]. Darüber hinaus kommt es zu einer Proliferation und Expansion der aktivierten T-Zellen, sodass für die Eliminierung von Tumorzellen letztlich eine Vielzahl von T-Zellen zum Einsatz kommen (Abb. 4 B).

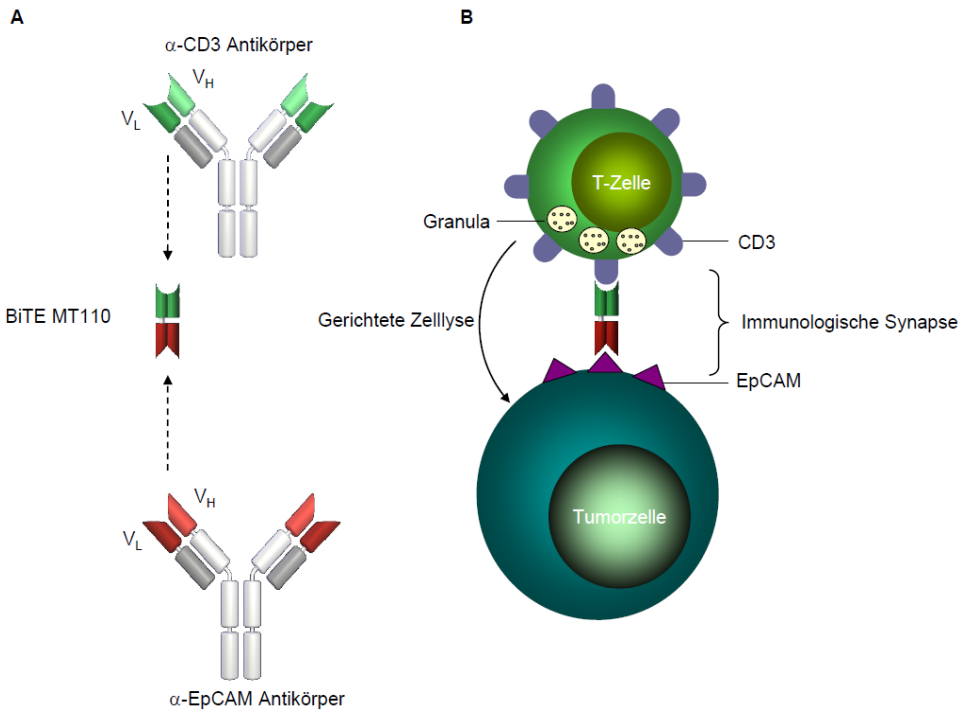

Abb. 4 Struktur und Wirkungsmechanismus von MT110.

(A) MT110 ist ein rekombinanter BiTE-Antikörper mit einer EpCAM-spezifischen und einer CD3ε-spezifischen scFv-Domäne. Er ist zusammengesetzt aus den variablen Regionen V_H und V_L von zwei konventionellen monoklonalen Antikörpern. (B) Durch die Bindung des BiTEs an das CD3-Antigen der zytotoxischen T-Zelle und EpCAM einer Tumorzelle wird eine funktionelle immunologische Synapse ausgebildet, die eine Granulasekretion von zytotoxischen Proteinen bewirkt. Die Tumorzelle wird in den apoptotischen Zelltod getrieben.

In Mausstudien zeigte der Maus-spezifische BiTE-Antikörper muS110, ein muEpCAM/muCD3-bispezifisches Pendant zum humanspezifischen MT110, gute Tolerabilität und sehr gute Antitumoraktivität [100]. Da muS110 und MT110 orthologe Epitope auf murinem und humanem EpCAM erkennen, erwartet man ähnliche therapeutische Ergebnisse für MT110, das zurzeit in einer klinischen Phase 1 zur Dosisfindung in Patienten mit Lungen- und Magen-Darm-Krebs getestet wird.

2.9 Zielsetzung der Arbeit

Tumor-initiierende Zellen (TICs) stehen im Verdacht, in kleiner Anzahl Tumorwachstum auszulösen und durch ihre Resistenzen gegenüber konventionellen Therapien mit genotoxischen und anti-proliferierenden Wirkstoffen für das Wiederauftreten von Metastasen und lokalen Tumoren und der damit verbundenen Mortalität verantwortlich zu sein.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb zu testen, ob der gegen das humane EpCAM und CD3 gerichtete bispezifische Antikörper MT110 Tumor-initiierende Zellen vollständig eliminieren kann und somit einen kurativen Ansatz in der Krebstherapie darstellen könnte. Für Zytotoxizitätsexperimente mit MT110 sollten kolorektale TICs isoliert und auf ihre Krebsstammzelleigenschaften hin charakterisiert werden. Dazu zählen unter anderem die Expression spezifischer Stammzellmarker, die Fähigkeit zu Selbsterneuerung und Differenzierung, ein hohes Proliferations- und Tumorigenitäts-potential sowie die Ausbildung von Sphären.

Für die Zytotoxizitätsexperimente sollte *in vitro* ein System etabliert werden, das es ermöglicht, eine vollständige Eliminierung von jeder einzelnen Tumor-initiierenden Zelle nachzuweisen. Durch Veränderungen einzelner Parameter (z.B. Zeit, Antikörper-Konzentration oder Effektor-zu-Target-Verhältnis) in den Experimenten, sollte die Effektivität der MT110-vermittelten Zelllyse genauer charakterisiert werden.

Anschließend sollte die Antitumoreffektivität von MT110 in unterschiedlichen Maus-Xenograftmodellen evaluiert werden, bei denen Tumore durch hohe Dosen von TICs ausgelöst werden.

Da die Bedeutung von EpCAM auf Tumor-initiierenden Zellen insbesondere in Verbindung mit deren Migrations- und Invasionseigenschaften noch nicht geklärt ist, sollten durch Inhibierung von EpCAM mittels RNA-Interferenz in kolorektalen TICs Gene identifiziert werden, die Aufschluss über die Rolle von EpCAM in der mit der Karzinogenese verbundenen Metastasierung geben können.

3 Material

3.1 Geräte

BioPhotometer	**Eppendorf**
CO_2-Inkubator Heracell 240	Kendro
DM-FZ 30eGLumix Digitalkamera	Panasonic
Elektrophoresekammern	Bio-Rad
ELISA-Leser	BioTek Instruments
FACS Calibur	Becton Dickinson
Fluoreszenzmikroskop	Nikon
Geldokumentationsgerät	Syngene
Gelgießstand	Bio-Rad
Gelkammern	Invitrogen
Gelnetzteil	Biorad
Kühlzentrifuge	Eppendorf
Kühlzentrifuge Rotina 460RS	Hettich
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss
Magnet zur Zellisolierung Dynal MPC-S	Invitrogen
Messschieber	Mitutoyo
Mikroinjektor	Eppendorf
Mini MACS Magnet	Miltenyi Biotec
PCR-Thermocycler	MJ Research
Rotiererspieß	Dynal
Sicherheitswerkbank Heraeus Herasafe HSP12	Kendro
Thermomixer/-block	Eppendorf
Waagen	Kern; Ohaus
Wasserbad	GFL
Wizard 300 Gammacounter	Perkin Elmer

3.2 Verbrauchsmaterialien

Acrylamid-Fertiggele NuPAGE 4-12 % Bis-Tris	Invitrogen
Einwegskalpelle, steril	Ratiomed
ELISA-Platten	Greiner
Eppendorf Caps 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
FACS-Röhrchen	Micronic
GC-Spritze, 500 µl	SGE
Gewebekulturplatten, 6-, 12-, 24-, 48-Kammer	Becton Dickinson
Gewebekulturplatten, 96-Kammer, F-, V-, U-Form	Greiner
Hybond-P PVDF Membran	GE Healthcare
Kapillarschlauch 0,75 mm	GE Healthcare
Kryoröhrchen	Nunc
Leucosep, 30 ml, steril	Greiner
MS-Säulen	Miltenyi Biotec
Neubauer-Zählkammer	Lo-Laboroptik
Omnican 0,3x12 mm 0,01-1 ml Spritzen	Braun
PCR Softstrips 0,2 ml	Biozym Scientific
Petrischalen, ø 8,5 cm	Greiner
Polystyrol Rundboden Röhrchen 5 ml	Becton Dickinson
Schwammkissen für Westernblot	Invitrogen
Sterican100 0,05x16 mm 25Gx5/8“ Nadeln	Braun
Sterilfilter 0,2 µm	PALL
Zellkulturflaschen	Greiner, Nunc
Zellkulturröhrchen 50 ml, 15 ml	Becton Dickinson
Zellsiebe 70 µm, 100 µm	Falcon

3.3 Kits

Aldefluor Kit	StemCell Technologies
Cancer Cell Isolation Kit	Panomics
CELLection Pan Mouse IgG Kit	Invitrogen
CytoSelect 24-Well Wound Healing Assay	CellBiolabs
Micro BCA Protein Assay Kit	Thermo
MISSION Lentiviral Transduction Particles	Sigma-Aldrich
Mouse Lineage Cell Depletion Kit	Miltenyi Biotec
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit	Sigma-Aldrich
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Transcriptor One-Step RT-PCR Kit	Roche

3.4 Puffer und Lösungen

1x PBS:	154 mM NaCl	pH 7,4
	8 mM Na_2HPO_4	
	2 mM KH_2PO_4	
1x TAE:	40 mM Tris-Base	pH 8,0
	40 mM Essigsäure	
	1 mM EDTA	
Erythrozyten-Lysepuffer:	8,29 g/l NH_4Cl (0,15 M)	pH 7,2-7,4
	1,00 g/l $KHCO_3$ (10 mM)	
	37,2 mg/l Na_2EDTA (0,1 mM)	

Sämtliche Chemikalien für die Herstellung von Puffern und Lösungen wurden in Analysequalität von Fluka, Merck, Sigma oder Roth bezogen.

3.5 Reagenzien und Zusätze für die Zellkultur

1x NEAA	Biochrom
2-Mercaptoethanol	Gibco
b-FGF	Sigma-Aldrich
DMSO	Sigma-Aldrich
EDTA	Biochrom
EGF	Sigma-Aldrich
FCS	Biochrom
Glucose	B. Braun
Heparin	Ratiopharm
HEPES	Biochrom
Insulin	Sigma-Aldrich
Kristallviolett	Sigma-Aldrich
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom
Na-Pyruvat	Biochrom
Na-Selenit	Sigma-Aldrich
PBS-DULBECCO 1x w/o Ca^{2+}, Mg^{2+}	Biochrom
Phenolrot	Biochrom
Progesteron	Sigma-Aldrich
Putrescin	Sigma-Aldrich
ReHum IL-2-Proleukin	Novartis
Transferrin	Sigma-Aldrich
Trypsin	Biochrom
ultrareines Wasser, steril	Biochrom

3.6 Antibiotika

Amphotericin B	Biochrom
Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml)	Biochrom
Puromycin	Sigma-Aldrich

3.7 Zellkulturmedien

CSC-Medium	Euro med-N Medium (Euroclone)	
	L-Glutamin	2 mM
	Glucose	0,6 %
	Penicillin/Streptomycin	50 µg/ml
	Amphotericin B	1,25 µg/ml
	Putrescin	9,6 µg/ml
	Progesteron	6,3 ng/ml
	Na-Selenit	5,2 ng/ml
	Insulin	0,025 mg/ml
	Transferrin	0,1 mg/ml
	EGF	20 ng/ml
	b-FGF	10 ng/ml
$RPMI^{+}$-Medium	RPMI 1640-Medium (Biochrom)	
	L-Glutamin	2 mM
	2-Mercaptoethanol	500 nM
	Penicillin/Streptomycin	100 U/ml/100 µg/ml
	Na-Pyruvat	1 mM
	NEAA (100x)	1x
	HEPES	10 mM
	FCS	10 %

3.8 Eukaryotische Organismen

3.8.1 Zellen aus Patientenmaterial

Primäre Tumor-initiierende Zellen (TICs)

Die Tumorzellpräparationen stammen aus Primärtumorbiopsien von therapierten Karzinompatienten. Das Tumorgewebe wurde mit dem Einverständnis der Patienten für die Isolierung von TICs nach Zustimmung der Ethikkommission (WIRB) durch die Firma Celprogen verwendet und der Micromet AG zur Verfügung gestellt. Inbegriffen sind primäre Tumor-initiierende Zellen aus den Geweben von Darm, Leber und Brust. Die Zellen wurden in serumfreiem CSC-Medium mit den in Kapitel 3.7 beschriebenen Zusätzen bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 kultiviert, wobei 20 ng/ml EGF und 10 ng/ml basales FGF vor jedem Gebrauch frisch dem Medium zugegeben wurden.

3.8.2 Zelllinien

HT-29

HT-29 ist eine Kolonkarzinomzelllinie, die 1964 aus einem gut differenzierten Adenokarzinom des Kolons einer 44-jährigen Frau etabliert wurde. Die Zellen zeigen ein adhärentes einschichtiges Wachstum und sind EpCAM positiv. Die Zelllinie wurde von der ATCC „American Type Culture Collection“ bezogen und in $RPMI^+$-Medium mit den in Kapitel 3.7 beschriebenen Zusätzen bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 kultiviert.

3.8.3 NOD/SCID-Mäuse

Die in den Versuchen eingesetzten Mäuse waren zu Versuchsbeginn zwischen 6 bis 12 Wochen alt und wurden von den Charles River Laboratorien (Sulzfeld, Deutschland) bezogen.

Der NOD/SCID (*Non Obese Diabetic Severe Combined Immunodeficiency*)-Mausstamm wird heutzutage sehr häufig für Xenotransplantationsexperimente eingesetzt, da das Anwachsen von Fremdgewebe in diesen Mäusen erleichtert ist. Durch die SCID-Mutation ist ihre T- und B-Zellentwicklung so beeinträchtigt, dass sie keine

funktionalen T- und B-Zellen mehr besitzen; durch die NOD-Mutation werden weniger NK-Zellen und kein Komplementsystem mehr gebildet.

3.9 Reagenzien für molekularbiologische Methoden

3.9.1 Enzyme und andere Reagenzien

dNTP Mix (2 mM)	Fermentas
Expand High Fidelity PCR System	Roche
Taq-DNA-Polymerase	Roche

3.9.2 DNA-Marker und Ladepuffer

6x Loading Dye	Fermentas
GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas
NuPAGE LDS Proben-Puffer (4x)	Invitrogen
Proteinmarker MultiMark	Invitrogen

3.10 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried, München) bezogen.

Primer für semiquantitative RT-PCR Analysen:

Name		**Sequenz 5'-3'**
ABCG2	FW	CTGAGATCCTGAGCCTTTGG
	RW	TGCCCATCACAACATCATCT
CD133	FW	CAGAGTACAACGCCAAACCA
	RW	AAATCACGATGAGGGTCAGC
CD166	FW	GCTAGTAACTGAGGACAACGTG
	RW	GAGCTTCTTATTCCTTCGGGCTG
CD44v6	FW	GACACATATTGCTTCAATGCTTCAGC
	RW	TACTAGGAGTTGCCTGGATGGTAG

E-Cadherin	FW	AGCCATGGGCCCTTGGAG
	RW	CCAGAGGCTCTGTCACCTTC
EpCAM	FW	ATGGCGCCCCCGCAGGTCCT
	RW	AATAACCACAACAATTCCA
Fibronektin	FW	CGAAATCACAGCCAGTAG
	RW	ATCACATCCACACGGTAG
GAPDH	FW	AATTTCATGGCACCGTCAAG
	RW	GCCTGCTTCACCACCTTCTT
NOTCH-1	FW	ATCGGGCACCTGAACGTGGCG
	RW	CACGTCTGCCTGGCTCGGCTC
OCT-4	FW	GTGGAGGAAGCTGCAAACAATGAAA
	RW	GACCGAGGAGTTACAGTGCAGTGAAG
SLUG	FW	AGCAGCTGCACTGCGATGCC
	RW	ACACAGCAGCCAGATTCCTC
ß-Catenin	FW	ACTGGCAGCAACAGTCTTACC
	RW	TTTGAAGGCAGTCTGTCGTAAT
Vimentin	FW	CAGCAATATGAAAGTGTGGCTGCC
	RW	GGAAGAGGCAGAGAAATCCTGCTC
β-Aktin	FW	CTACGTCGCCCTGGACTTCGAGC
	RW	GATGGAGCCGCCGATCCACACGG

Primer für die Mutationsanalyse:

Name		**Sequenz 5’-3’**
KRAS	FW	AGGCCTGCTGAAAATGACTGAATA
	RW	CTGTATCAAAGAATGGTCCTGCAC
PIK3CA	FW	GCTTTTTCTGTAAATCATCTGTG
	RW	CTGAGATGAGCCAAATTCAGT

3.11 Antikörper

Antigen	Wirt	Isotyp	Konjugat	Klon	Hersteller	Verdünnung (FACS)
anti-Human E-Cadherin	Maus	IgG2b	-	MB2	Santa Cruz	1:20
anti-Human CD4	Maus	IgG1κ	-	L200	BD	-
anti-Human ABCG2	Maus	IgG2b	PE	5D3	eBiocience	10 µg/ml
anti-Human CD133/2	Maus	IgG2b	PE	293C3	Miltenyi	10 µg/ml
anti-Human CD166	Maus	IgG1	ALEXA 647	3A6	Serotec	1:10
anti-Human CD24	Maus	IgG1	APC	SN3	Immunostep	20 µl/1x10^6 Zellen
anti-Human CD28	Maus	IgG1κ	-	L293	BD	-
anti-Maus CD29	Hamster	IgG1	PE-Cy7	HMb1-1	eBioscience	10 µg/ml
anti-Human CD44	Maus	IgG2a	-	156-3C11	Chemicon	-
anti-Human CD44R	Maus	IgG2a	PE	F10-44-2	Chemicon	10 µl/1x10^6 Zellen
anti-Human CD44v6	Maus	IgG1	-	VFF-7	abcam	1:100
anti-Maus CD45	Ratte	Rat IgG2b	PE-Cy5	30-F11	BD Pharmingen	10 µg/ml
anti-Human CD56	Maus	IgG1κ	-	B159	BD	-

anti-Human EpCAM	Maus	IgG1	ALEXA 488	5-10	Micromet AG	1:5
anti-Maus IgG	Ziege	IgG	PE	-	Jackson Immuno Research	1:200
anti-Human CD3	Maus	IgG2a	-	-	Jansson-Cilag	-

BiTEs

Alle BiTE-Antikörper wurden von der Abteilung „BiTE Research“ bei Micromet zur Verfügung gestellt.

Name	**Target**	**Klon Target**	**Spezifität**	**Klon CD3**	**Spezifität**
MT110	huEpCAM	5-10	Human	diL2K	Human
Mec14	Mecoprop	Mec14	Herbizid	diL2K	Human
MT110xKT3	huEpCAM	5-10	Human	KT3	Maus

MT110

MT110 wurde mithilfe rekombinanter DNA-Technologie unter Verwendung einer Antikörper-Gensequenz spezifisch für humanes EpCAM (Klon 5-10) und einer Antikörper-Gensequenz spezifisch für humanes CD3 (Klon diL2K) hergestellt [101]. Die Konstrukte wurden in den Expressionsvektor pEF-DHFR kloniert. Chinesische Hamster-Ovar-Zellen (CHO) wurden mit dem Vektorkonstrukt transfiziert und stabile Transfektanten selektiert. Das in den Überstand sezernierte BiTE-Protein wurde mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt.

3.12 Chemikalien und Substanzgemische

Agarose GTQ	Roth
BMA SeaPlaque Agarose	Biozym
Cultrex Basement Membrane Extract	R&D Systems
DTT 1M	Invitrogen
Ethidiumbromid-Lösung 0,09 %	AppliChem
Ficoll Separationsmedium	Biochrom
Heparin-Natrium 25.000	Ratiopharm
Leucosepflaschen	Greiner
Matrigel	BD Biosciences
Milchpulver	Fluka
Nucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roth
Propidiumjodid-Lösung	Sigma
SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate	Thermo

3.13 Computersoftware und Datenbanken

CBA Instrument Setup Template	Becton Dickinson
CellQuest	Becton Dickinson
Chromas	Technelysium
Grafiksoftware Lucia G4.60	Laboratory Imaging
NCBI BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST.cgi
NCBI OMIM	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM
Prism 4	GraphPad
Vector NTI	Infor Max

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Zellkulturführung

Alle Zelllinien und primären Tumor-initiierenden Zellen wurden in ihren jeweiligen Medien (Kapitel 3.8) im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Hatten die Zellen einen etwa 80 % konfluenten Zellrasen gebildet, wurden sie mit PBS gewaschen und mit 0,25 % Trypsin/0,05 % EDTA-Lösung vom Flaschenboden gelöst. Ein Teil der Zellen wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit frischem Medium versorgt.

Zum Einfrieren der Zellen wurden jeweils $1x10^6$ Zellen in 1 ml kaltem Einfriermedium (10 % DMSO + 90 % FCS) resuspendiert und in Kryoröhrchen (Nunc) bei -80°C eingefroren. Zur dauerhaften Einlagerung wurden die Zellen anschließend in einen Stickstofftank (-192°C) überführt. Zur Rekultivierung wurden die Zellen im Einfriermedium in 20 ml warmem Kulturmedium verdünnt und zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in Medium resuspendiert und kultiviert.

4.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Für die Bestimmung der Vitalität von Zelllinien und primären Tumorzellen wurden die Farbstoffe Trypanblau oder Eosinrot eingesetzt, die permeable Membranen toter Zellen durchdringen können. Tote Zellen wurden je nach Wahl des Farbstoffes blau oder rot angefärbt und bei der Zählung der lebenden Zellen ausgeschlossen. Einer Zellsuspension wurde hierzu eine kleine Probe entnommen und diese je nach Zelldichte mit der Farblösung 1:2 oder 1:10 verdünnt und anschließend auf ein Hämozytometer (Neubauer-Zählkammer; Tiefe: 0,1 mm, Kammerfaktor: 10^4) aufgetragen. Die Zellzahl pro ml wurde nach folgender Formel bestimmt:

Zellzahl/ml = (gezählte Zellen in 4 x 16 Quadraten)/4 x Verdünnungsfaktor x 10^4

4.1.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)-Analyse genannt, bietet die Möglichkeit, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Zellen quantitativ zu detektieren.

1-2x10^5 Tumorzellen wurden nach der Trypsinierung oder nach der Tumoraufbereitung (Kapitel 4.2.5) in FACS-Waschpuffer (1x PBS/2 % FCS) resuspendiert und in 96-Well-Platten übertragen. Nach der Zentrifugation (2 min, 1200 rpm, 4°C) wurde der Überstand ersetzt durch den ersten Antikörper oder den Detektionsantikörper, der in einer Konzentration von 5-10 µg/ml in FACS-Waschpuffer verdünnt worden war. Die Zellen wurden für 15-30 min bei 4°C mit dem Antikörper inkubiert, anschließend gewaschen, für die Untersuchung am Durchflusszytometer in je 150 µl FACS-Waschpuffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen übertragen. Falls der Antikörper nicht direkt konjugiert war, wurde nach der Inkubation des ersten Antikörpers mit 150 µl FACS-Waschpuffer gewaschen und anschließend der zweite Antikörper in FACS-Waschpuffer verdünnt auf die Zellen gegeben und für 15-30 min bei 4°C ein weiteres Mal inkubiert. Die Messung wurde mit einem FACScalibur-Gerät von Becton Dickinson durchgeführt.

4.1.4 Bestimmung der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH)-Aktivität

Die ALDH-Aktivität von CD44-selektierten Zellen aus HT-29-Xenografttumoren wurde mithilfe des Aldefluor-Reagenz (StemCell) entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt. Ein Aldefluor-Substrat wurde zu 1x0^6 Zellen in Aldefluor-Puffer gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das ungeladene Substrat (BAAA) dringt durch passive Diffusion in die Zellen ein und wird dort von der intrazellulären ALDH in einen negativ-geladenen detektierbaren grün-fluoreszierenden Farbstoff (BAA-) umgewandelt. Durch FACS-Analyse konnte somit die ALDH-Aktivität gemessen werden. Als Negativkontrolle wurde einem Aliquot der Aldefluor-gefärbten Zellen sofort nach Zugabe des Substrates der spezifische ALDH-Inhibitor Diethylaminobenzaldehyd (DEAB) hinzugegeben.

4.1.4.1 PKH26-Färbungsexperimente

PKH26 ist ein fluoreszenzmarkiertes, aliphatisches Molekül, das stabil in die Zellmembran integriert wird. Die Konzentration von PKH26 nimmt bei jeder Zellteilung ab, da der Farbstoff gleichermaßen auf die bei jeder Zellteilung entstehenden Tochterzellen weitergegeben wird. Die Anregungs- und Emissionsmaxima liegen bei 490 nm und 504 nm.

Die Färbung von kolorektalen TICs, die unter serumfreien Bedingungen (CSC-Medium) oder in Medium mit 10 % FCS ($RPMI^+$) kultiviert wurden, konnte mit dem *PKH26 Fluorescent Cell Linker Kit* (Sigma) durchgeführt werden. $1x10^7$ Zielzellen wurden in 500 µl Lösung C (Sigma) und 18 µl PKH26 Farbstoff (Sigma) resuspendiert und für 16 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1 ml FCS hinzugegeben um die Reaktion zu beenden. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und anschließend die Lebendzellzahl bestimmt. $5x10^4$ PKH26 gefärbte TICs wurden in 6-Well-Platten ausgesät und unter den gleichen Bedingungen (CSC-Medium/$RPMI^+$-Medium) kultiviert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde die Anzahl lebender Zellen bestimmt und die Fluoreszenz von PKH26 mittels der FACS-Analyse gemessen.

Für *in vivo*-Experimente wurden unter serumfreien Bedingungen gehaltene TICs mit PKH26 gefärbt und wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben s.c. in die Flanken von NOD/SCID-Mäusen inokuliert. Nach vier Wochen wurden die Tumore entfernt, dissoziiert (Kapitel 4.2.5) und die Fluoreszenz von PKH26 bestimmt.

4.1.5 Sphärenbildungsversuche

Subpopulationen von HT-29-Xenograft-Tumorzellen wurden in 96-Well-Platten (5000 Zellen/Well) in CSC-Medium kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage vorsichtig ausgewechselt. Nach 18 Tagen wurden die Sphären gezählt und fotografiert.

4.1.6 Isolierung von PBMCs aus Humanblut

Mithilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation wurden humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) aus heparinsiertem Humanblut gesunder Spender isoliert. Vorbereitend wurden 15 ml Ficoll-Separationsmedium in ein Leucosep-Röhrchen pipettiert und bei 1200 rpm für 30 sec unter die Separations-Fritte

zentrifugiert. Dann wurden die Röhrchen mit maximal 35 ml Humanblut überschichtet und bei RT und 2200 rpm für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Der dabei entstehende Dichtegradient ermöglichte die Auftrennung von Erythrozyten und Leukozyten. Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde das Serum über der sich gebildeten PBMC-Phase abgesaugt. Die Leukozyten wurden abgenommen und in einem 50 ml Zellkulturröhrchen mit kaltem 1x PBS/2 % FCS aufgefüllt, durch vorsichtiges Invertieren vermischt und für 6 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Die restlichen Erythrozyten wurden im PBMC-Pellet anschließend mithilfe eines Erythrozyten-Lysepuffers entfernt, indem das Pellet in 10 ml des hypertonischen Puffers resuspendiert und für maximal 10 min bei 37°C inkubiert wurde. Danach folgten zwei Waschschritte mit kaltem 1x PBS/2 % FCS.

Anschließend konnten die Zellen für Zytotoxizitätsexperimente oder für die Stimulierung und Isolierung von $CD8^+$ T-Zellen eingesetzt werden.

4.1.7 Stimulierung von PBMCs und Isolierung von $CD8^+$ T-Zellen

Für die Stimulierung von PBMCs wurden große Petrischalen (ø 8,5 cm) mit 1 µg/ml anti-humanem CD28- und CD3-Antikörper beschichtet und eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Das Antikörpergemisch wurde anschließend abgesaugt und die Petrischalen 1x mit PBS gespült. Die zuvor isolierten PBMCs wurden in 50 ml $RPMI^+$-Medium und darin resuspendiertem IL-2 (Endkonzentration 20 U/ml) gemischt und in die beschichteten Petrischalen pipettiert. Die PBMCs wurden 72 h im Brutschrank inkubiert.

Zur Aufreinigung der $CD8^+$ T-Zellen durch Depletion von $CD4^+$/$CD56^+$-PBMCs wurde das magnetische Zelltrennungssystem von Dynal verwendet. Das Prinzip wird in Kapitel 4.2.6 erörtert. $1x10^7$ PBMCs wurden in 500 µl kaltem PBS/2 % FCS, 0,5 mg/ml CD4-Antikörper und 1 mg/ml CD56-Antikörper resuspendiert. Der Ansatz wurde 30 min bei 4°C inkubiert, 2x mit PBS/2 % FCS gewaschen (1400 rpm, 5 min, 4°C) und in 400 µl PBS/2 % FCS (für $1x10^7$ PBMCs) aufgenommen.

Es wurden 70 µl Magnetpartikel (Invitrogen) (für $1x10^7$ PBMCs) zu den stimulierten PBMCs hinzugegeben und 30 min auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert.

Das Magnetpartikel-Zell-Gemisch wurde aufgefüllt mit 8 ml PBS/2 % FCS und im Reaktionsgefäß für 5 min ins Magnetfeld gestellt. Der Überstand wurde abpipettiert und auf Eis für die sich anschließenden Zytotoxizitätsreaktionen gelagert. Das Pelett wurde verworfen. Die Reinheit der selektierten $CD8^+$ T-Zellen wurde mittels der FACS-Analyse mit anti-humanem CD8- und CD3-Antikörper bestimmt.

4.1.8 Zytotoxizitätsexperimente und Soft Agarose-Experimente

Diese neue Kombination aus herkömmlichem Zytoxizitätsexperiment und Soft Agarose-Experiment als Ausleseverfahren wurde gewählt, um jede einzelne Zelle mit Tumorbildungsfähigkeit visualisieren zu können.

10 000 bis 20 000 Tumorzellen wurden mit unstimulierten PBMCs oder isolierten $CD8^+$ T-Zellen im Target-zu-Effektor-Verhältnis von 1:5-20:1 und unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen zwischen 0,01-200 ng/ml pro Well in 48-Well-Platten inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 20-120 h im Brutschrank erfolgte im Anschluss das Soft Agarose-Experiment. Dafür wurden adhärente Zellen des Reaktionsansatzes trypsiniert, zusammen mit dem Überstand in $RPMI^+$-Medium und 0,4 % Soft Agarose gemischt und auf eine bereits erstarrte Schicht aus 0,5 % Agarose/$RPMI^+$-Medium in 6-Well-Platten pipettiert. Nach 11-17 Tagen wurden die Kolonien (CFU) größer als 70 µm in einem zufällig gewählten Quadratzentimeter eines Wells im Mikroskop ausgezählt. Für die Fotografien wurden diese Soft Agar-Kolonien eine Stunde mit 0,05 % Kristallviolett gefärbt und mithilfe des Geldokumentations-gerätes (Syngene) aufgenommen.

4.1.9 Zytotoxizitätsexperimente mittels radioaktiven Chroms

Der standardisierte ^{51}Cr-Freisetzungsversuch unter Verwendung von mit radioaktivem ^{51}Cr beladenen Zielzellen dient akzessorisch dem in dieser Arbeit eingesetzten Zytotoxizitätsversuch in Kombination mit Soft Agarose-Experiment.

Die Zielzellen wurden mit ungefähr 7 MBq ^{51}Cr eine Stunde im Brutschrank markiert und darauf folgend 2x mit PBS gewaschen. Pro Ansatz wurden 1 000 Targetzellen mit zuvor isolierten $CD8^+$ T-Zellen in einem Effektor-zu-Target-Verhältnis von 10:1 in $RPMI^+$-Medium gemischt und in 100 µl Aliquots in 96-Well-Platten

pipettiert. Eine Verdünnungsreihe mit dem jeweiligen Antikörper wurde in $RPMI^+$-Medium angesetzt und je 100 µl zu dem Effektor-zu-Target-Gemisch pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 18 h bei 37°C, 5 % CO_2 wurde das durch lysierte Zielzellen freigesetzte Chrom im Überstand gemessen.

Mithilfe der Messwerte für die spontane Lyse (radioaktive Zielzellen ohne Effektoren) und für die maximale Lyse (radioaktive Zielzellen mit Triton-X100 behandelt) konnte mit den gemessenen Daten (n=3) die spezifische Effektor-abhängige Lyse der Zielzellen bestimmt werden. Die Messung der Chromaktivität im Überstand erfolgte mit dem Wizard 300 Gammazähler (Perkin Elmer) und die Daten wurden mit dem Programm Prism 4 ausgewertet (GraphPad).

4.1.10 shRNA-Experimente

Es wurden anti-EpCAM-shRNA (*short hairpin RNA*)-exprimierende lentivirale Partikel (Sigma) verwendet, um eine dauerhafte Repression von endogenem EpCAM in kolorektalen Tumor-initiierenden Zellen zu erzielen.

Zur engeren Auswahl standen drei unterschiedliche shRNA-Konstrukte, bezeichnet als shRNA1, shRNA2 und shRNA3, die in dieser Arbeit getestet wurden. Die Sequenzen der shRNAs sind:

Name	**Sequenz 5'-3'**
shRNA1	CCGGGCAAATGGACACAAATTACAACTCGAGTTGTAATTTGTG TCCATTTGCTTTTTG
shRNA2	CCGGGCCGTAAACTGCTTTGTGAATCTCGAGATTCACAAAGCA GTTTACGGCTTTTTG
shRNA3	CCGGGCTGGTTATTTCCAGAAAGAACTCGAGTTCTTTCTGGAAA TAACCAGCTTTTTG

Um EpCAM-reprimierte TICs zu generieren, wurden $1x10^5$ Zellen/Well in 24-Well-Platten gesät und über Nacht in CSC-Medium kultiviert. Unmittelbar vor der Transduktion der Zellen mit lentiviralen Partikeln wurde das alte Medium durch frisches Medium unter Zusatz von 8 µg/ml Polybrene ersetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert.

Die Transduktionseffizienz der TICs wurde in einem Vorversuch mit *TurboGFP Control Transduction Particles* (Sigma) getestet. Hierbei handelt es sich um lentivirale Partikel, die das grün-fluoreszierende Protein stabil in das Genom der Wirtzellen einbauen. Mit unterschiedlichen Konzentrationen an lentiviralen Partikeln, gemessen in MOI (*Multiplicity of Infection*) von 0,5, 1, 2 und 5, wurden die TICs transduziert und nach 48 h im Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregung von 470-490 nm und einer Emission von 500-530 nm die bestmögliche Fluoreszenzeffizienz bestimmt. Lentivirale Partikel wurden mit der so ermittelten effizientesten MOI von 5 in das Medium gegeben und die Platte leicht geschwenkt. Als Negativkontrolle wurden TICs mit *Non-Target shRNA Control Transduction Particles* transduziert. Dabei handelt es sich um shRNAs, die weder humane noch murine Gene beeinflussen. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurde der Überstand entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Nach weiteren 24 h wurde das Medium durch frisches Medium und 2 µg/ml Puromycin, für die Selektion von transduzierten Zellen, ausgetauscht. Nach zwei Passagen wurde die EpCAM-Repression der einzelnen Konstrukte mittels FACS-Analyse, RT-PCR und Western Blot untersucht.

4.1.11 Bestimmung der Migrationsfähigkeit

Zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit der mit EpCAM-shRNA transduzierten Zellen wurde ein Wundheilungsversuch (*Scratch-Assay*) durchgeführt. Ein Spalt wurde in einem konfluenten Zellmonolayer erzeugt und einwandernde Zellen mikroskopisch über einen Zeitraum beobachtet.

Es wurden $5x10^5$ transduzierte kolorektale TICs pro Well in 48-Well-Platten gesät. Um einen definierten Abstand des Spalts von 0,9 mm zu erlangen, wurde jedes Well zuvor mit einem Einlageteil aus dem *CytoSelect 24-Well Wound Healing Assay Kit* (CellBiolabs) versehen. Die Einlageteile wurden nach 24 h Inkubation bei 37°C entfernt und die Zellen mehrfach mit vorgewärmtem PBS gewaschen, bis sich die Ränder der entstandenen Furchen geglättet hatten. Zur Kontrastierung wurden die Zellen mit Kristallviolett 10 min lang angefärbt, 2x mit PBS gewaschen und fotografiert. Weitere ungefärbte Migrationsansätze wurden 48 h in CSC-Medium weiter inkubiert und anschließend nach dem gleichen Prozedere behandelt wie die Zellen zur Dokumentation des Ausgangszustandes.

4.2 Mausmodelle und *in vivo*-Arbeit

4.2.1 Tierhaltung

Alle Tierexperimente wurden nach Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und von der Regierung von Oberbayern (ID: 55.2-1-54-2531.2-12-09) genehmigt. Die Tiere wurden in einem auf Temperatur (25 ± 2ºC) und Feuchtigkeit (50 ± 5 %) kontrollierten Raum mit einem künstlich vorherrschenden 12 Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Sterile Nagerfutterpellets (Sniff, Soest) und autoklaviertes Wasser gab es für die Tiere *ad libitum*. Als Behausung dienten Standard Microloan Typ-II Käfige (Beech), die individuell ventiliert wurden, sodass eine spezifiziert pathogenfreie Umgebung für die Tiere gewährleistet war. Der Gesundheitsstatus wurde zweimal im Jahr nach Kriterien der FELASA kontrolliert. Alle neu gelieferten Tiere konnten sich mindestens sieben Tage an die Umgebung gewöhnen, bevor sie in die Experimente einbezogen wurden. Die Bemühungen hatten das Ziel, die Anzahl der Versuchstiere auf das unerlässliche Maß zu beschränken und deren Leiden weitestgehend zu reduzieren.

4.2.2 Applikationstechniken

In dieser Arbeit wurden zwei Applikationstechniken, die subkutane (s.c.) Applikation unter die Haut und die intravenöse (i.v.) Injektion in die Schwanzvene, verwendet.

Für die subkutane Applikation wurde die Maus fixiert, indem die Haut des Mausrückens mit Daumen und Zeigefinger fest gegriffen und der Schwanz zwischen Ringfinger und kleinem Finger geklemmt wurde. Dem immobilisierten Tier wurden Tumorzellen mit einem Volumen von 100-200 µl mittels einer Omnican Spritze (0,3x12 mm, 0,01-1 ml, Braun) unter die Haut der linken/rechten abdominalen Flanke appliziert.

Für die intravenöse Applikation wurden die Tiere in einem Plexiglaszylinder fixiert und der Mausschwanz mittels eines Durchlasses zum Experimentator hin durchgeschoben. Die Substanz wurde in einem Volumen von ungefähr 200 µl (10 µl Agenz pro Gramm Maus) innerhalb von 15 Sekunden mithilfe einer Omnican Insulinspritze (0,3x12 mm) in eine der zwei Lateralvenen der Schwanzvene appliziert.

4.2.3 Tumormodelle

4.2.3.1 Behandlung mit MT110 direkt nach Gabe der Tumorzellen

Pro Ansatz wurden $5x10^5$ TICs oder $5x10^4$ $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$ HT-29-Xenograftzellen mit frisch aufgereinigten PBMCs im Effektor-zu-Target-Verhältnis von 2:1 in PBS gemischt und mit einem Gesamtvolumen von 100 µl in die rechte Flanke einer NOD/SCID-Maus injiziert. Die Zellen wurden zuvor ohne Kanüle in die Spritze aufgezogen, um Zellschädigungen zu vermeiden und mit einer Sterican100-Kanüle (0,05x16 mm 25 Gx5/8, Braun) inokuliert. Nach zwei Stunden wurden den Mäusen i.v. verschiedene Konzentrationen von MT110 verdünnt in PBS oder nur PBS (Kontrolle) in einem Gesamtvolumen von ca. 200 µl (je nach Körpergewicht der Maus) in die Schwanzvene appliziert. Die Behandlung mit MT110 wurde um die gleiche Tageszeit in einem Zeitraum von elf Tagen wiederholt. Es wurden mindestens drei Tiere pro Kohorte eingesetzt.

Die Tumore wurden zu den angegebenen Tagen mit einem Messschieber in zwei Dimensionen (Länge und Breite) gemessen. Das Tumorvolumen wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Tumorvolumen}\left[\text{cm}^3\right] = \frac{\text{Breite}^2 \times \text{Länge}}{2}$$

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der Daten, wurde der gepaarte Student´sche t-Test mithilfe der Software Microsoft Excel durchgeführt.

4.2.3.2 Behandlung mit MT110 nach Etablierung eines Tumors

Bei diesem Mausmodell wurden drei Tage vor Behandlungsbeginn pro Ansatz $5x10^6$ kolorektale TICs mit PBMCs im Verhältnis 1:2 gemischt und in die rechte Flanke einer NOD/SCID-Maus appliziert. Nachdem messbare Tumore am Tag 3 sichtbar waren, wurde mit der Behandlung von MT110 begonnen, indem 14 Tage lang 2,5 mg/kg MT110 in PBS oder nur PBS als Kontrolle im Gesamtvolumen von 200 µl i.v. in die Mäuse injiziert wurden. Pro Kohorte wurden fünf Tiere eingesetzt. Die Erläuterung der Messung des Tumorvolumens erfolgte bereits in Kapitel 4.2.3.1.

4.2.3.3 Tötung und Organentnahme

Die Mäuse wurden durch die Inhalation von CO_2 mithilfe von Trockeneis getötet. Tumorgewebe, Thymus, mesenteriale Lymphknoten, zervikale Lymphknoten sowie inguinale Lymphknoten wurden den Mäusen steril entnommen und in PBS für weitere *ex vivo*-Analysen auf Eis gelagert. Für die Dokumentation wurden einige Gewebe mit einer Digitalkamera (Panasonic) fotografiert.

4.2.4 Transplantation von kolorektalen TICs oder Soft Agar-Kolonien

Primäre kolorektale Tumor-initiierende Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend in serumfreiem Medium mit Matrigel 1:3 gemischt. Die Zellen wurden nur verwendet, wenn der Anteil der Lebendzellen größer als 90 % war. Die Lösung wurde anschließend subkutan in die Flanken von NOD/SCID-Mäusen injiziert.

Für die Transplantation von Soft Agar-Kolonien wurden eine oder zehn Kolonien mit einem Durchmesser von mehr als 70 µm bis maximal 150 µm mittels eines umgebauten Mikromanipulators (Eppendorf) gepickt (Abb. 5) und in 10 µl RPMI-Tropfen freigelassen. Die Injektorhalterung mit der 0,5 mm (innerer Durchmesser) feinen Nanopipette am Ende war mit einem 0,75 mm dünnen Kapillarschlauch (GE Healthcare) verbunden, an dessen Ende sich eine 500 µl GC-Spritze (SGE) befand, mit der die in der Agarose befindlichen Kolonien angesaugt wurden. Die gepickten Kolonien in RPMI-Medium wurden anschließend mit einer Kanüle (0,9 mm x 70 mm, B. Braun) aufgenommen, ohne dass die Flüssigkeit in die Spritzenkammer aufgezogen wurde. Die Kolonien wurden anschließend in die Flanken von NOD/SCID-Mäusen inokuliert.

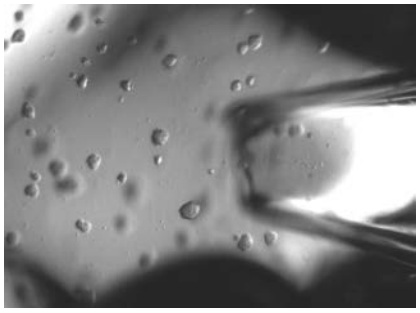

Abb. 5 Picken von Kolonien mit einem Mikromanipulator.

Die Tiere wurden einmal in der Woche auf Tumorbildung hin untersucht. Die Bestimmung des Tumorvolumens ist dem Kapitel 4.2.3.1 zu entnehmen.

Die Versuchstiere ohne sichtbares Tumorwachstum wurden 5-6 Monate nach Versuchsbeginn getötet. Die Peritonealhöhle der im Versuch eingesetzten Mäuse wurde nach Lymphknotenmetastasen im mesenterialen, zervikalen und inguinalen Bereich abgesucht. Vorhandene Metastasen wurden steril entnommen, dissoziiert (Kapitel 4.2.5) und mittels FACS-Analyse mit anti-Human CD24-, CD44-, EpCAM- und anti-Maus CD45-Antikörpern auf vorhandene metastasierte Tumorzellen untersucht.

4.2.5 Aufbereitung von Xenografttumoren

Nach der Entnahme der Xenografttumore aus NOD/SCID-Mäusen wurde das Tumormaterial in einer Petrischale mit vorgelegtem kaltem PBS von nekrotischem Gewebe befreit. Anschließend wurde es mit einem Skalpell zerkleinert und bei 1200 rpm abzentrifugiert.

Für die Dissoziation und Aufreinigung von Tumorzellen wurde der *Cancer Cell Isolation Kit* (Panomics) nach Herstellerangaben verwendet. Die Gewebestücke wurden mit einer Enzym-Lösung (Panomics) aufgenommen und ein bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Alle 15 min wurde die Gewebesuspension mit einer 10 ml Pipette zum Lösen des Zellverbundes auf- und abpipettiert. Die entstandene Einzelzellsuspension wurde unter Zuhilfenahme eines Spritzenstempels durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt und zweimal mit PBS gewaschen (800 rpm, 5 min, 4°C).

Um die Tumorzellen von den Nicht-Tumor-Zellen wie Lymphozyten oder nektrotischen Zellen zu trennen, wurde eine Purifikationslösung (Panomics) mit der Einzelzellsuspension überschichtet und 10-30 min aufrecht bei RT stehen gelassen. Die

lebenden Tumorzellen sedimentieren schneller als die toten Zellen und Zellen geringerer Dichte und lassen sich so vom Gefäßboden abpipettieren. Der Reinheitsgrad wird durch die Dauer der Sedimentation bestimmt. Nach einem finalen Waschschritt in PBS konnten die Zellen für die Selektion mit Magnetpartikeln eingesetzt werden.

4.2.6 Isolation von CD44^{hoch}-Xenograftzellen mit Magnetpartikeln

Zellen mit einem bestimmten Antigen können mithilfe von superparamagnetischen, antikörpergekoppelten Partikeln aus einer Zellkultur isoliert oder depletiert werden. Dabei heften sich die magnetischen Partikel an alle Zellen, die das Zielantigen auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese lassen sich anschließend mit einem Magneten von den restlichen Zellen trennen.

Um die humanen Tumorzellen von den Tumor-assoziierten mausspezifischen Zellen, wie T-Zellen, B-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und Erythrozyten sowie deren Vorläuferzellen, zu trennen, wurde das *Mouse Lineage Cell Depletion Kit* von MACS verwendet. Die für das MACS-System verwendeten Magnetpartikel (50 nm Partikeldurchmesser) sind mit verschiedenen Maus-spezifischen Antikörpern (CD5, CD45R (B220), CD11b, Gr-1 (Ly-6G/C), 7-4, und Ter-119) beschichtet. Während einer Inkubationszeit von 10 min bei 4°C wurden die Tumorzellen mit den Magnetpartikeln inkubiert und die mit Magnetpartikeln beladenen Zellen über eine Säule in einem Magneten geleitet. Die humanen Tumorzellen bleiben nicht in dem Magnetfeld der Säule haften und werden depletiert. Die Vorgehensweise dieses Magnetpartikel-Systems erfolgte nach Herstellerangaben von MACS.

Für die sich anschließende Selektion der humanen CD44^{hoch}-Zellen aus HT-29-Xenografttumoren wurde der *CELLection Pan Mouse IgG Kit* von Invitrogen verwendet. Bei diesem System werden Magnetpartikel mit 4,5 µm Durchmesser eingesetzt, die anti-Maus IgG-Antikörper auf ihrer Oberfläche tragen und somit an jeden beliebigen Antikörper mit einem murinen Fc-Fragment binden.

Die Magnetparikel wurden zunächst mit Maus-anti-Human CD44-Antikörper (Chemicon) markiert, wobei 1 µg Antikörper für 1×10^7 Magnetpartikel eingesetzt wurden. Nach Auswaschen des nicht gebundenen Antikörpers mit PBS/2 % FCS wurden die Zellen (maximal 2,5 x10^6 Targetzellen) mit den markierten Magnetpartikeln gemischt und 30 min bei 4°C inkubiert. Das Reaktionsgefäß mit dem Magnetpartikel-

Zell-Gemisch wurde an einen Magneten gehalten und der Überstand darauf von den an der Röhrchenwand haftenden Magnetpartikel-gebundenen Zellen abpipettiert und separat aufbewahrt. Um eine möglichst reine Fraktion von $CD44^{niedrig}$-Tumorzellen zu erhalten, wurde der Überstand mit den nicht gebundenen Tumorzellen nach der ersten magnetischen Isolierung noch einmal mit der gleichen Menge markierter Magnetpartikel inkubiert. Währenddessen wurden die gebundenen vorwiegend $CD44^{hoch}$-Tumorzellen 3x mit Puffer gewaschen. Zum Waschen wurde das Magnetpartikel-Zell-Gemisch mit dem hinzugegebenen Puffer auf- und abpipettiert und am Magneten von den nicht gebundenen Zellen getrennt. Da die Magnetpartikel über einen DNA-Linker an die Antikörper gekoppelt sind, wurden die Zellen mittels DNAse-Verdau für 15 min bei RT und darauffolgendem Auf- und Abpipettieren mithilfe einer 200 µl Pipette von den Magnetpartikeln getrennt. Die Vorgehensweise dieses verwendeten Magnetpartikel-Systems erfolgte nach Herstellerangaben. Für die sich anschließenden *in vivo*- und *in vitro*-Experimente wurde die Vitalität der Zellen mit einer Lebend-Tot-Färbung mittels Trypanblau bestimmt.

4.2.7 Isolierung von TICs aus humanen kolorektalen Tumorproben

Humane kolorektale Tumorproben wurden mit Einverständnis der Patienten als Ausgangsmaterial für die Anreicherung von TICs verwendet. Das Tumorgewebe wurde in serumhaltigem Medium (Cat.: M36112-39PS, Celprogen) auf Eis vom Krankenhaus zu Celprogen (San Pedro, Kalifornien) transportiert, wo die Tumordissoziation und Isolierung von TICs durchgeführt wurden.

Das Gewebe wurde zerkleinert und in 5 ml Collagenase A (0,2 mg/ml) und Trypsin (0,05 mg/ml) für 15 min bei 37°C dissoziiert. Die Zellsuspension wurde bei 800 rpm 7 min lang zentrifugiert und das Zellpelett mit serumhaltigem Medium (Cat.: M36112-39PS, Celprogen) gewaschen. Die Waschschritte wurden 3x wiederholt. Die Zellen wurden anschließend in 7 ml nichtdifferenzierendem Medium (Cat.: M36112-39US, Celprogen) in Kulturflaschen gegeben, die mit einer chemisch definierten Matrix beschichtet waren. Mithilfe dieser Beschichtung können $CD133^{+}$-Tumorzellen selektiert werden. Die Zellkultur wurde im Brutschrank inkubiert und alle 24 h das Medium erneuert. Nach 72 h wurden die adhärenten Zellen mittels FACS-Analyse untersucht. RT-PCR- und IHC-Analysen wurden mit den folgenden Markern zur Charakterisierung

der TICs durchgeführt: CD133, CD44, CD10, CD34, SSEA3/4, OCT4, Alkalische Phosphatase, ALDH, Telomerase, Sox 2, cKit und Lin 28.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Semiquantitative RT-PCR

Um Unterschiede der Expressionslevel auf RNA-Ebene festzustellen, wurden semiquantitative RT-PCRs durchgeführt.

Dafür wurde die Gesamt-RNA der Zellen mithilfe des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert und der RNA-Gehalt photometrisch bei 260 nm gegen H_2O als Leerwert bestimmt. Anschließend wurde die RNA mittels des *Transcriptor One-Step RT-PCR Kit* in DNA umgeschrieben. Die „One-Step“ RT-PCR ist eine Kombination aus Komponenten der reversen Transkription (RT) und Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die in einem Reaktionsgefäß abläuft.

Für die semiquantitative RT-PCR wurden je Ansatz 100 ng der Gesamt-RNA eingesetzt. Die Komponenten der RT-PCR-Reaktion wurden nach Herstellerangaben ausgewählt und zusammengemischt. Das folgende PCR-Cycler-Programm wurde verwendet:

1. Reverse Transkription 30 min, 45°C-50°C
1. Initiale Denaturierung 8 min, 94°C
2. Denaturierung 10 sec, 94°C
3. Primer-Anlagerung 30 sec, 50°C-55°C
4. DNA-Polymerisation 45 sec, 68°C, Zyklenzahl 25-35
5. Finale DNA-Polymerisation 7 min, 68°C

4.3.2 Genomische DNA-Sequenzierung

Genomische DNA wurde mithilfe des *DNeasy Blood and Tissue Kits* (Qiagen) aus den Zellen nach Herstellerangaben extrahiert.

Für die Mutationsanalyse (siehe Kapitel 5.5.1) wurden Exon 9 und Exon 20 des Gens *PIK3CA* und Exon 2 des Gens *KRAS* mit den in Kapitel 3.10 angegebenen Primern amplifiziert. Das folgende PCR-Cycler-Programm wurde verwendet:

1. Initiale Denaturierung 9 min, 94°C
2. Denaturierung 30 sec, 94°C
3. Primer-Anlagerung 30 sec, 50°C-55°C
4. DNA-Polymerisation 30 sec-1 min, 72°C, Zyklenzahl 40
5. Finale DNA-Polymerisation 4 min, 72°C

Die DNA-Proben wurden elektrophoretisch auf 1%igem Agarosegel getrennt, das gewünschte Fragment ausgeschnitten und mit dem *Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

Die Proben wurden zum Sequenzieren zu Sequiserve (Vaterstetten, Deutschland) geschickt und die DNA-Sequenzen mit Vektor NTI und Chromas ausgewertet.

4.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Transduzierte TICs wurden zentrifugiert und die Zellpellets in RIPA-Puffer ($1x10^6$/100 µl) aufgelöst. Die Überstände wurden nach einem Zentrifugationsschritt (12000 rpm, 1 min) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die sich anschließende Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde mithilfe des *Micro BCA Protein Assay Kits* (Thermo) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proben wurden mit dem beiliegenden BSA-Standard im ELISA-Gerät bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen und die Proteinkonzentrationen mithilfe des Standards berechnet. Es wurden gleiche Mengen an Gesamtprotein (50 µg) für die sich anschließende Gelelektrophorese verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem Bis-Tris-Gel 4-12 % (NuPage, Invitrogen) für 35 min bei 200 V. Als Laufpuffer diente NuPAGE MES SDS (Invitrogen) versetzt mit 10 % DTT (Invitrogen). Als Größenstandard wurde der Multimark Standard (Invitrogen) verwendet.

4.3.4 Western Blot

Die Proteine wurden auf eine zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-Membran (GE Healthcare) transferiert, nachdem sie mittels SDS-Page aufgetrennt worden waren. Dies erfolgte mit einer Nassblot-Elektrophorese-Apparatur (Bio-Rad) zwischen in Transferpuffer (10x 30 g Tris, 95 g Glycin, ad 1 l H_2O dest.) getränktem Whatman-Filterpapier (1 h, 10 min, 45 V) und Schwämmen. Anschließend wurde die Membran mit Methanol gespült und in Blocklösung (PBS/0,05 % Tween/3 % BSA) mit resuspendiertem Primärantikörper (1:1000) eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde 3x in PBS/0,05 % Tween je 5 min lang gewaschen. Die weitere Detektion der Proteine erfolgte mit einem anti-Maus Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Thermo) (1:1000 in PBS/0,05 % Tween und 5 % Milchpulver). Nach fünf weiteren Waschschritten in PBS/0,05 % Tween wurde das Peroxidase-Substrat (Thermo) für 3 min beigegeben. Anschließend wurde die Chemolumineszenz mittels eines Röntgenfilms in der Dunkelkammer (Kodak) detektiert.

5 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, das Wirkungspotential des bispezifischen Antikörperkonstrukts MT110 mittels der Rekrutierung von T-Zellen auf Krebsstammzellen zu untersuchen.

Als Quelle für Krebsstammzellen dienten primäre kolorektale Tumor-initiierende Zellen, die aus Tumorgewebe von Darmkrebspatienten isoliert wurden sowie eine Subpopulation von CD44-positiven kolorektalen Tumorzellen, die aus Maus-Xenografttumoren gewonnen wurden.

5.1 Isolierung von hochtumorigenen Zellen aus Xenografts mittels CD44-Selektion

Aufgrund der Beobachtung, dass Tumorzelllinien Subpopulationen von funktionalen Krebsstammzellen aufweisen [102] wurde die Kolontumorzelllinie HT-29 in dieser Arbeit zur Isolierung von Krebsstammzellen verwendet. Die Komplexität, die in einem Tumor vorherrscht, sollte dabei so realitätsnah wie möglich in einem Xenograftmodell simuliert werden. Dafür wurden in NOD/SCID-Mäusen durch HT-29-Tumorzellen verursachte Tumore induziert. Die Tumore wurden isoliert und anschließend dissoziiert. Um die Tumorzellen von nicht-tumorigenen und toten Zellen zu trennen, schloss sich dem Zellaufschluss ein zweistufiger Aufreinigungsprozess an (Kapitel 4.2.5 und 4.2.6), nach dessen Abschluss Verunreinigungen weitestgehend ausgeschlossen werden konnten. Zur Anreicherung von kolorektalen Krebsstammzellen aus HT-29-Xenograft-Tumorzellen wurde das transmembrane Glykoprotein CD44 verwendet, das mittlerweile ein etablierter CSC-Marker ist und zur Isolierung von Krebsstammzellen aus Geweben wie Brust [16], Blase [103], Kolon [13], Ovar [104], Pankreas [18] Verwendung findet. Mittels einer Magnetpartikelselektion unter Verwendung eines anti-humanen CD44-Antikörpers (Chemikon) wurden aus den angereicherten Tumorzellen $CD44^{hoch}$-Zellen und $CD44^{niedig}$-Zellen isoliert.

Abb. 6 zeigt das Resultat einer Selektion. Eine bis zu 85 %ige Anreicherung von CD44 hoch-positiven Zellen konnte mit der Magnetpartikelselektion erreicht werden. Die selektierte Zellfraktion wies eine erhöhte CD24- und EpCAM-Expression im

Vergleich zu der depletierten Population mit wenig exprimiertem CD44 auf, sodass die Fraktionen in $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}/EpCAM^{hoch}$ und $CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}/EpCAM^{niedrig}$ unterteilt werden konnten. Aus Gründen der Einfachheit wurden die Zellpopulationen in dieser Arbeit kurz $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$ und $CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}$ benannt. Die Reinheit der Tumorzellen wurde mithilfe von murinen CD45- und CD29-Antikörpern und die Vitalität mit einer Propidiumiodidfärbung kontrolliert. Die FACS-Daten in Abb. 6 B belegen, dass beide Fraktionen nach der Selektion keine Verunreinigungen durch Mauszellen aufwiesen und es sich vorwiegend um vitale Zellen handelte.

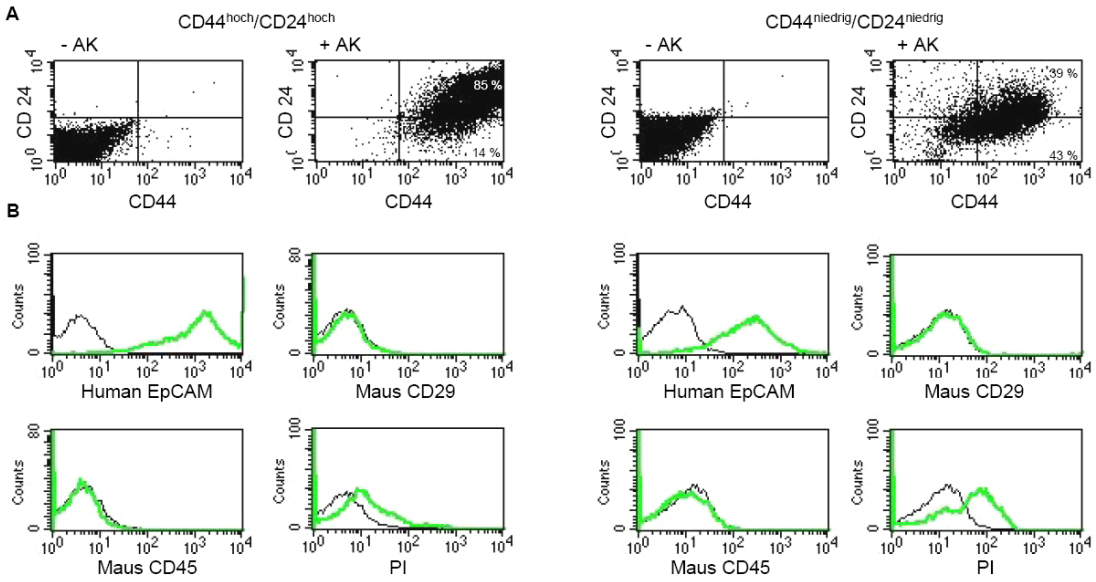

Abb. 6 Resultat der CD44-Magnetpartikelselektion der HT-29-Xenograft-Tumorzellen.

FACS-Analysen von humanen Tumorzellen isoliert aus Maus-Xenografts. Gezeigt sind (A) ihre CD44- und CD24-Expressionenslevel, (B) Expression von humanem EpCAM, murinem CD29 und CD45 und die Vitalität der beiden Subpopulationen durch Anwendung von Propidiumiodid. Die schwarze Linie stellt die Negativkontrolle (Zellen ohne Antikörper; -AK) dar; die grüne Linie zeigt die Zellen mit dem jeweiligen direkt konjugierten Antikörper (+AK). Die FACS-Daten sind repräsentative Abbildungen von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Beide Subpopulationen sollten nach der erfolgten Selektion auf Expressions-unterschiede bekannter CSC-Marker untersucht werden.

5.2 Charakterisierung der selektierten HT-29-Xenograftzellen

Eine weit verbreitete Methode zur Identifizierung von Krebsstammzellen basiert auf der enzymatischen Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH1), einem detoxifizierenden Enzym, das für die Oxidation von intrazellulären Aldehyden verantwortlich ist. Aus diesem Grunde wurde die ALDH1-Aktivität in dieser Arbeit zur Identifizierung von kolorektalen Krebsstammzellen bei den $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$-Zellen und $CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}$-Zellen untersucht.

Mithilfe des Aldefluor-Reagenz (Stemcell), das in den Zellen durch enzymatische Spaltung der ALDH1-Enzyme zu einem detektierbaren fluoreszierenden Farbstoff umgesetzt wird, konnte gezeigt werden, dass die $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$-Zellen eine erhöhte ALDH1-Aktivität aufwiesen (34,5 %) im Gegensatz zu den $CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}$-Zellen, die nur eine sehr geringe Fluoreszenz im Durchflusszytometer zeigten (2 %) (Abb. 7).

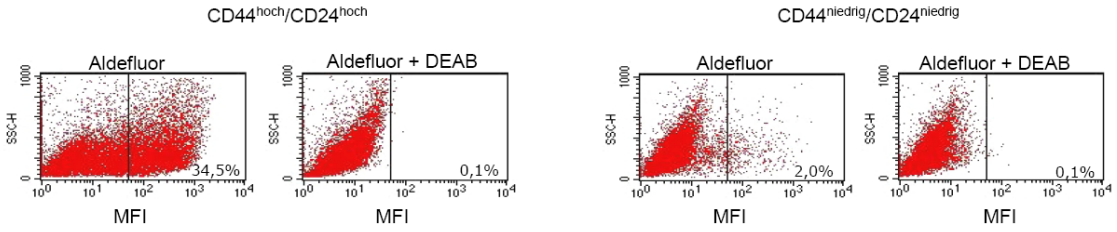

Abb. 7 Erhöhte ALDH-Aktivität von HT-29-Xenograftzellen mit $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$-Phänotyp.
FACS-Analysen der CD44-selektierten Zellen aus HT-29-Xenografttumoren. Die Expression von ALDH wurde mithilfe der Aldefluor-Methode mit und ohne ALDH-Inhibitor (DEAB) als Negativkontrolle analysiert (n=3).

Als weiteres Charakteristikum für Krebsstammzellen wurde die Eigenschaft beschrieben, dass sie unter serumfreien Bedingungen multizelluläre Sphären ausbilden können [105]. Somit wurde die Sphärenbildung der Subpopulationen $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$ und $CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}$ in serumfreiem mit EGF und FGF versetztem CSC-Medium (Kapitel 3.7) untersucht, das für die Kultivierung von kolorektalen Krebsstammzellen geeignet ist [14]. Wie in Abb. 8 veranschaulicht, zeigten $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$-Zellen (155 Sphären/Well) eine 30-fach höhere Tendenz,

Sphären unter serumfreien Bedingungen zu bilden, als $CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}$-Zellen (5 Sphären/Well).

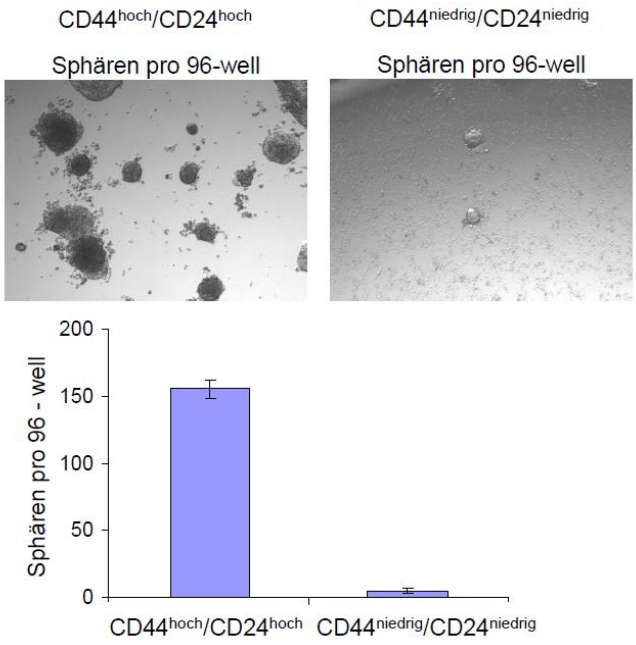

Abb. 8 Nur $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$-Zellen zeigen eine hohe Tendenz zur Bildung von Sphären.
Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von Sphären, die sich aus $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$- und $CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}$-Zellen in serumfreiem CSC-Medium gebildet haben. Die Sphären wurden nach 18 Tagen in 96-Well-Platten ausgezählt. Das Balkendiagramm zeigt die durchschnittliche Anzahl an Sphären +/- Standardabweichung (SD) aus Dreifachbestimmungen pro Well.

Als nächstes sollte die Tumorigenität von Krebsstammzellen *in vitro* mithilfe eines Koloniebildungsversuches validiert werden. Der Koloniebildungsversuch ist eine Technik, die eine Visualisierung einer einzelnen stark tumorigenen Zelle durch deren Fähigkeit zur Bildung einer Kolonie möglich macht.

Die Zellen wurden im Koloniebildungsversuch in 0,4 % Soft Agar in 6-Well-Platten eingebettet. Nach zwei Wochen wurden die aus einzelnen Zellen gewachsenen koloniebildenden Einheiten (CFU) ausgezählt. Wie in Abb. 9 zu sehen ist, zeigen $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$-Zellen eine 20-fach höhere Tendenz, Kolonien in Soft Agar zu bilden, als $CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}$-Zellen. Daraus folgt, dass $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$-Zellen eine höhere Proliferation aufweisen.

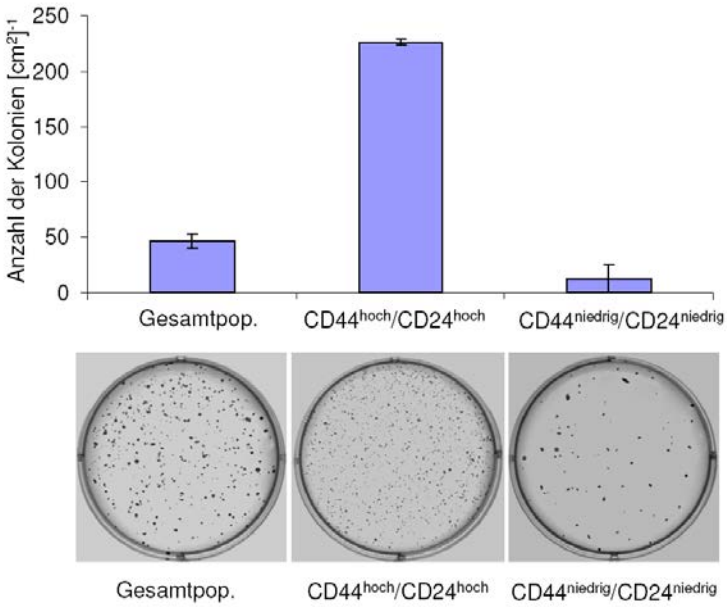

Abb. 9 CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Zellen zeigen ein erhöhtes Potential zur Bildung von Kolonien in Agar.
20 000 vitale CD44^{hoch}/CD24^{hoch}- und CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}-Zellen sowie Zellen der Gesamtpopulation wurden in Soft Agarose eingebettet. Die Kolonien wurden nach 18 Tagen mit Kristallviolett angefärbt und gezählt. Gezeigt ist die durchschnittliche Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) +/- SD pro cm^2 (n=3) und darunter repräsentative Fotografien von Kolonien in einem Well.

Bei der Beobachtung der in Soft Agarose gewachsenen Kolonien wurde festgestellt, dass die Kolonien sich nicht nur in ihrer Anzahl, sondern auch in ihrer Größe unterschieden, wenn sie in gleicher Dichte wuchsen (Abb. 10). Die Kolonien der CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Population verdoppelten ihre durchschnittliche Größe innerhalb von neun Tagen um das 2,1-fache, die Kolonien der CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}-Population hingegen nur um das 1,3-fache. In Abb. 10 ist das Wachstum jeweils einer repräsentativen Kolonie über neun Tage abgebildet. Daraus lässt sich ableiten, dass die CD44-selektierten Zellen eine erhöhte Teilungsrate aufweisen.

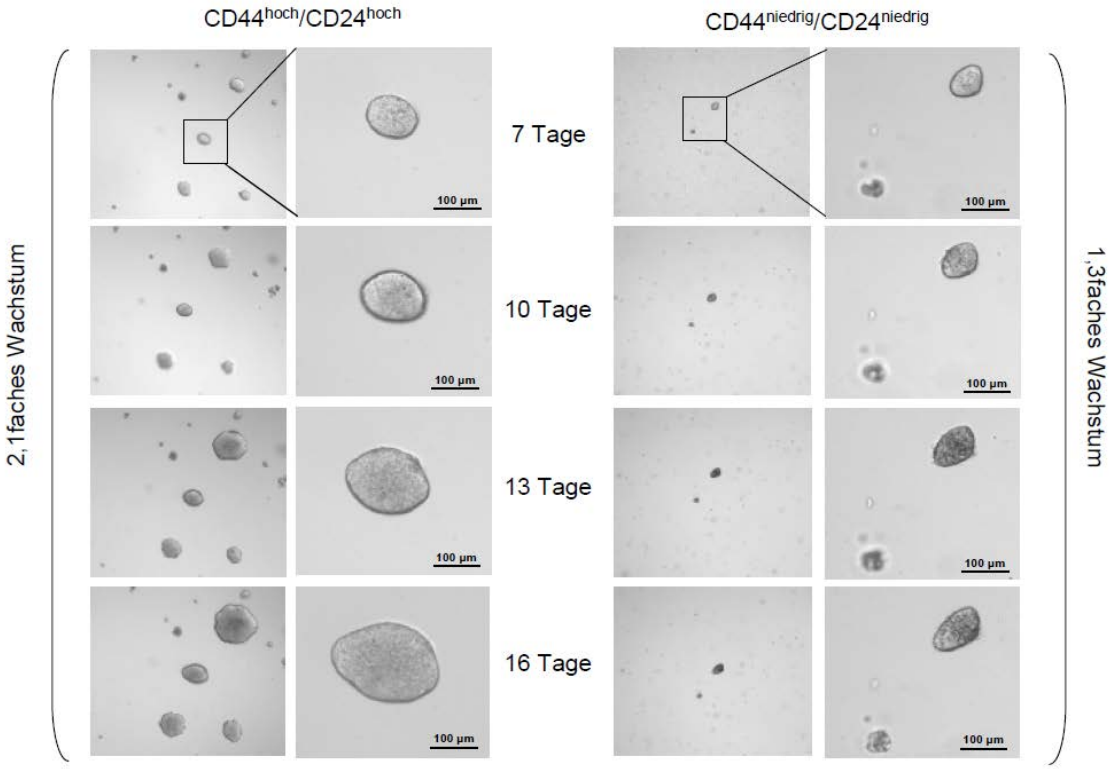

Abb. 10 Soft Agar-Kolonien mit CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Phänotyp zeigen ein erhöhtes Wachstum.
Das Wachstum je einer Kolonie der CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Zellen und CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}-Zellen nach Einbetten in Soft Agar wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mikroskopisch beobachtet. Dargestellt sind Bilder, die den Größendurchschnitt aller beobachteten Kolonien in einem Well darstellen.

Folgend wurden die unterschiedlichen tumorigenen Eigenschaften der drei Zellpopulationen (CD44^{hoch}/CD24^{hoch}, CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig} und unsortiert) *in vivo* untersucht. Die Zellen wurden in unterschiedlichen Titrationsstufen s.c. in NOD/SCID-Mäuse inokuliert und die Tiere ca. ein halbes Jahr lang auf Tumorbildungen untersucht.

Während mindestens 100 000 nichtselektierte Xenograft-Tumorzellen benötigt wurden, um Tumore in immundefizienten Mäusen zu verursachen (Tab. 2), waren bereits 10 CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Zellen und 100 CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}-Zellen für eine Tumorinduktion ausreichend.

Tab. 2 Tumorzellen mit CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Phänotyp zeigen eine sehr hohe Tumorigenität *in vivo*. Die zuvor selektierten Zellpopulationen oder unselektierten HT-29-Xenograft-Tumorzellen wurden in den jeweiligen Zellzahlen in NOD/SCID-Mäuse s.c. injiziert. Das Tumorwachstum wurde in regelmäßigen Abständen durch Messung des Tumorvolumens verfolgt.

Zellpopulation	Injizierte Zellzahl	Tumorinzidenz	Latenz (Tage)
HT-29 unsortiert	100	0/2	>180
	1 000	0/2	>180
	10 000	0/2	>180
	100 000	2/2	8
	1 000 000	2/2	4
HT-29 CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}	10	0/2	>180
	100	2/2	33
	1 000	2/2	33
HT-29 CD44^{hoch}/CD24^{hoch}	10	2/2	33
	100	2/2	33
	1 000	2/2	33

Die Resultate der bisherigen Versuche zeigen, dass die CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Zellen *in vitro* eine erhöhte Proliferationsrate und *in vivo* ein erhöhtes tumorigenes Potential aufweisen. Daher erschien die Untersuchung weiterer putativer Krebsstammzell-spezifischer Marker äußerst interessant. Die Expressionsunterschiede der untersuchten Marker von CD44^{hoch}/CD24^{hoch}- und CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}-Zellen wurden auf mRNA-Ebene mittels einer semiquantitativen RT-PCR überprüft.

Die Ergebnisse der RT-PCR in Abb. 11 zeigen eindeutig erhöhte mRNA-Level von EpCAM, β-Catenin, CD133, CD166, der CD44 Spleiß-Variante v6 und dem Transporter ABCG2 in den CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Zellen im Vergleich zu den CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}-Zellen, was mit der erhöhten Tumorigenität im Einklang steht.

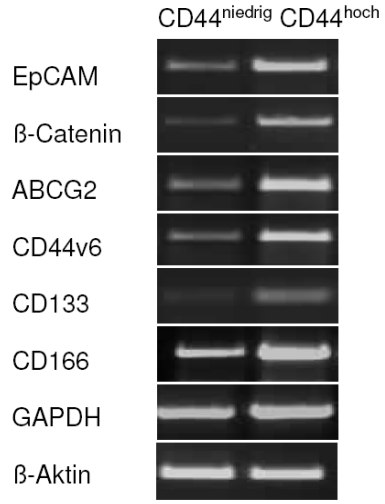

Abb. 11 CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Zellen weisen erhöhte mRNA-Level bekannter CSC-Marker auf.
Für die semiquantitative RT-PCR mit den Subpopulationen CD44^{hoch}/CD24^{hoch} und CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig} wurde die Gesamt-RNA isoliert und davon 100 ng RNA mit den entsprechenden Primern für eine semiquantitative „One-Step“ RT-PCR eingesetzt. In einer anschließenden Gelelektrophorese wurden die Unterschiede der mRNA-Expressionslevel visualisiert. Als Ladekontrolle dienten GAPDH und β-Aktin.

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die isolierten hoch-tumorigenen Zellen aus Xenografts mit dem CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Phänotyp ein passendes Modell für die Untersuchung der Biologie von kolorektalen Krebsstammzellen sind und zudem geeignete Zielzellen zur Untersuchung der Wirksamkeit von MT110 darstellen.

Im nächsten Kapitel folgt ein kurzer Abriss des in dieser Arbeit erstmalig eingesetzten *in vitro*-Versuchsmodells für die Eliminierung von Krebsstammzellen durch T-Zell-vermittelte Lyse mithilfe des bispezifischen Antikörpers MT110.

5.3 Modell zur *in vitro*-Eliminierung von CSCs durch MT110

Der Test zur *in vitro*-Eliminierung von CSCs durch MT110 verbindet ein Zytoxizitätsexperiment mit einem auf Soft Agarose basierenden Koloniebildungs-experiment als Ausleseverfahren, um jede einzelne Zelle mit Tumorbildungsfähigkeit zu visualisieren. Es ist wichtig, jede Zelle mit Krebsstammzelleigenschaften zu erfassen, da jede einzelne Krebsstammzelle das Potential hat, einen Tumor in seinem originalen Phänotyp wieder neu zu bilden, was kürzlich für kolorektale Krebsstammzellen [106] und für Melanom-Zellen [107] belegt wurde.

Um die Effektivität der MT110-vermittelten Zelllyse bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen mit Krebsstammzellcharakter zu untersuchen, wurden *in vitro*-Zytotoxizitätsversuche mit humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) als Quelle für T-Zellen durchgeführt. In Abb. 12 ist die Vorgehensweise schematisch dargestellt.

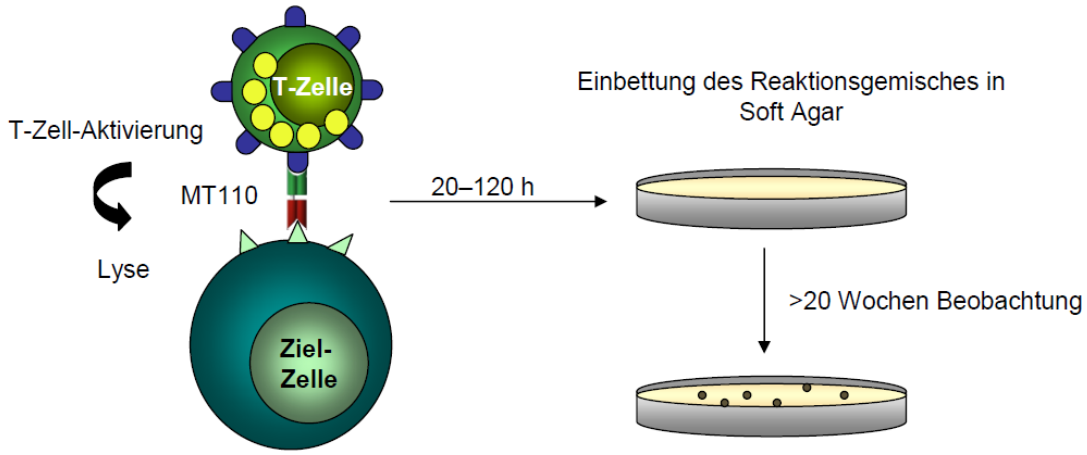

Abb. 12 Schema des Zytotoxizitätsversuchs in Verbindung mit einem auf Soft Agar basierenden Ausleseverfahren.

Durch die Inkubation (20-120 h) der Zielzellen mit den T-Zellen in Anwesenheit von MT110 findet die Zytotoxizitätsreaktion statt. Das Reaktionsgemisch wird in Soft Agar anschließend eingebettet und die Reaktion somit gestoppt. Nach mindestens zwei bis zu 20 Wochen werden die Kolonien (CFU) mikroskopisch ausgezählt.

Die Zielzellen wurden mit T-Zellen in Anwesenheit von MT110 gemischt und inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 20-120 h wurden die Zellkulturreaktions-ansätze in Soft Agar und RPMI^{+}-Medium vermengt und ausplattiert wodurch die Zytotoxizitätsreaktion durch Immobilisierung der T-Zellen beendet wird. Nach ca. zwei Wochen (Kapitel 4.1.8) bzw. für die Langzeitbeobachtungen nach bis zu fünf Monaten (Kapitel 5.7) wurde das Koloniewachstum auf den Platten mikroskopisch untersucht. Für die Auswertung wurden alle Kolonien in einem zufällig gewählten Bereich von 1 cm^2 eines Wells einer 6-Well-Platte ausgezählt; bei Platten ohne ersichtliches Koloniewachstum wurde die Gesamtfläche nach Kolonien abgesucht.

Auf diesem Weg konnten potentielle, die BiTE-Reaktion überlebende Tumorzellen durch die Bildung von Kolonien quantifiziert werden.

5.4 Effiziente Eliminierung von CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Zellen aus HT-29-Xenografttumoren durch MT110

CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Zellen wurden mit humanen PBMCs im Effektor-zu-Target (E:T)-Verhältnis 10:1 und in unterschiedlichen Konzentrationen von MT110 für 20 h inkubiert, in Soft Agar eingebettet und nach 14 Tagen die koloniebildenden Einheiten (CFU) gezählt. Die Zellen wurden im Kontrollansatz zur Bestimmung der spontanen Lyse ausschließlich mit PBMCs behandelt oder es wurden mit den PBMCs zusammen Kontroll-BiTEs hinzugegeben, die entweder nur eine human CD3-spezifische Bindestelle oder nur eine human EpCAM-spezifische Bindestelle besaßen. Die nicht spezifischen Bindestellen waren im ersten Fall gegen ein Herbizid namens Mecoprop (AK-Bezeichnung Mec14) oder im letzten Fall gegen das murine CD3 gerichtet und konnten somit keine T-Zell-vermittelte Lyse auslösen. In Abb. 13 A sind repräsentative Bilder des Koloniebildungsversuches zu sehen. In der Graphik darunter sind die durchschnittlichen Zahlen der koloniebildenden Einheiten (CFU) +/- SD pro cm^2 (n=3) dargestellt. Daraus geht hervor, dass 1 ng/ml (18 pM) und 100 ng/ml (1,8 nM) MT110 für eine effiziente Eliminierung von CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Zellen ausreichend waren. Eine MT110-Konzentration von 0,01 ng/ml, die Kontroll-BiTEs (100 ng/ml) oder PBMCs alleine zeigten keine Effekte auf die Koloniebildung.

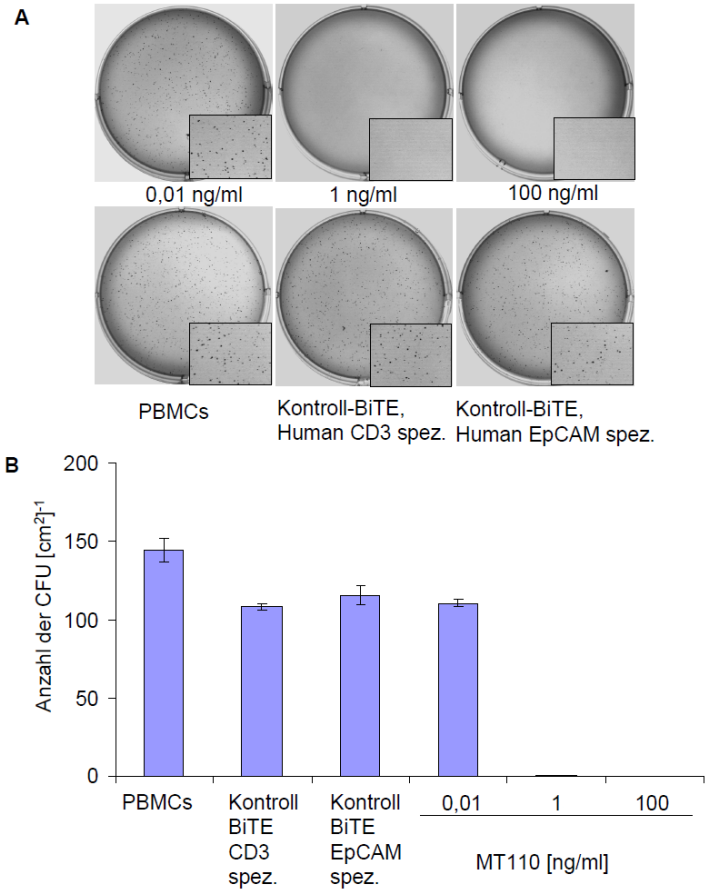

Abb. 13 Vollständige Eliminierung der CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Zellen durch MT110.

CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Zellen wurden mit humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) im E:T-Verhältnis 10:1 und den jeweiligen Antikörpern mit einer Konzentration von 100 ng/ml (wenn nicht anders angegeben) 20 h inkubiert. Es wurden drei Kontrollversuche mit den Tumorzellen durchgeführt: 1) ausschließlich PBMCs, 2) PBMCs und ein nur human CD3-spezifisches BiTE, 3) PBMCs und ein nur human EpCAM-spezifisches BiTE. Alle Zellen wurden in Soft Agar eingebettet und nach 14 Tagen die mit Kristallviolett gefärbten Kolonien fotografiert (A). (B) Angegeben ist die durchschnittliche Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) +/- SD pro cm^2 (n=3).

In einem ^{51}Cr-Freisetzungsversuch sollte einerseits das Ergebnis des vorigen Versuchs validiert werden und andererseits die Wirkung von MT110 auch auf die weniger tumorigenen CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}-Zellen und die Ausgangspopulation getestet werden (Abb. 14).

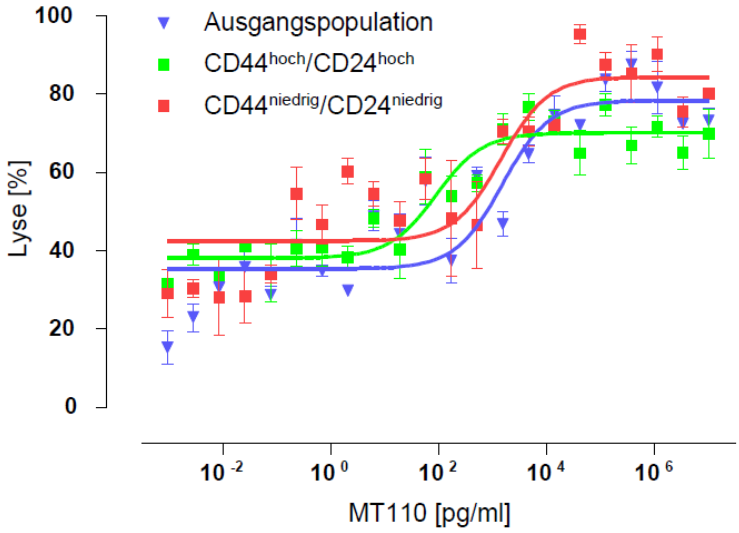

Abb. 14 Lyse der Xenograft-Subpopulationen und Ausgangszellen im ^{51}Cr-Freisetzungsversuch.
Ausgangszellen sowie selektierte CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Zellen bzw. CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}-Zellen aus einem HT-29-Xenografttumor wurden in standardisierten Zytotoxizitätsexperimenten unter Verwendung von radioaktivem Chrom analysiert. Angereicherte CD8^{+} T-Zellen wurden in einem Effektor-zu-Target-Verhältnis von 10:1 eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde 18 h inkubiert. Mithilfe der Messwerte für die spontane Lyse (radioaktive Zielzellen ohne Effektoren) und für die maximale Lyse (radioaktive Zielzellen mit Triton-X100 behandelt) wurde mit den gemessenen Daten (n=3) die spezifische Lyse [%] ± SD berechnet.

Die benötigte MT110-Konzentration für die halb-maximale Lyse (EC_{50}) der Ausgangspopulation betrug im Standard-Zytotoxizitätsversuch 1,9 +/- 0,6 ng/ml, für die CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Subpopulation betrug sie 0,05 +/- 0,05 ng/ml und für die CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}-Population 1,5 +/- 0,1 ng/ml. Damit konnte gezeigt werden, dass das BiTE-Molekül MT110 auch gegen die Ausganspopulation und die CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}-Population wirksam ist.

5.5 Charakterisierung der primären kolorektalen TICs

Primäre kolorektale Tumor-initiierende Zellen (TICs) stammen aus Tumorgewebe von Darmkrebspatienten, wurden durch CD133-Selektion aufgereinigt und unter CSC-Wachstumsbedingungen kultiviert (Kapitel 3.7). Um den Krebsstammzell-Phänotyp zu bestätigen, wurden TICs durch FACS-Färbungen auf die Expression von bekannten CSC-Oberflächenmarkern (siehe Kapitel 5.2), untersucht.

Die Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert und die Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Antikörper-gefärbten Zellen relativ zu den nicht gefärbten Zellen (Negativkontrolle) graphisch aufgetragen (Abb. 15).

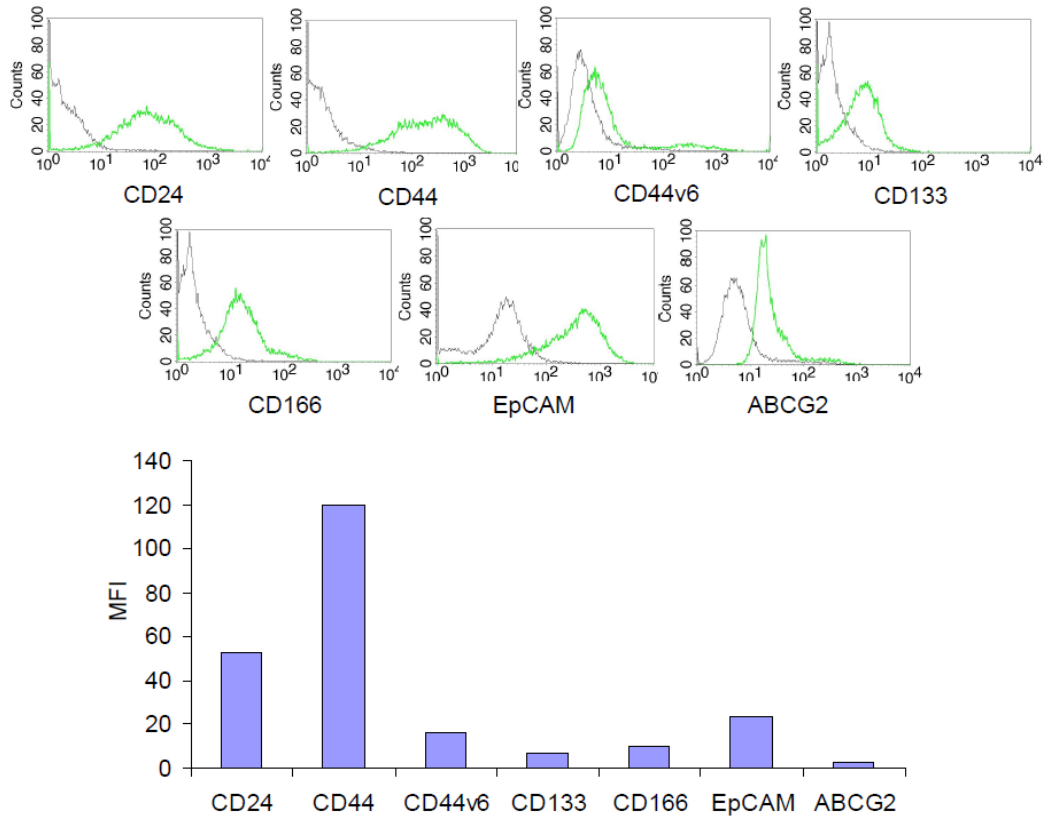

Abb. 15 Oberflächenexpression von putativen CSC-Markern bei primären kolorektalen TICs.
Dargestellt sind die Histogramme eines FACS-Experiments. Die schwarze Linie im Histogramm stellt die Negativkontrolle (Zellen ohne Antikörper) dar, die grüne Linie zeigt die Zellen mit dem jeweiligen direkt-konjugierten Antikörper. Darunter wird die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) relativ zur Negativkontrolle des FACS-Experiments gezeigt. Das Experiment wurde dreimal wiederholt.

Aus der FACS-Analyse geht hervor, dass es sich um $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}/EpCAM^{hoch}$-Zellen handelt, die in etwas geringeren Mengen auch CD133, CD166, die CD44 Spleißvariante v6 und den ABCG2-Transporter auf der Oberfläche exprimieren.

RT-PCR-Analysen verifizierten die Expression der Oberflächenantigene auf mRNA-Ebene. Außerdem wurden robuste RT-PCR-Signale für die Alkalische Phosphatase, CA199, Nestin, NOTCH-1, Oct-4, SSEA3/4 und Telomerase detektiert (Daten nicht gezeigt).

Im Folgenden werden weitere CSC-spezifische Merkmale der kolorektalen TICs gezeigt. Die Zellen zeigten die bereits in Kapitel 5.2 beschriebene für Krebsstammzellen typische Sphärenbildung in serumfreiem CSC-Medium (Abb. 16).

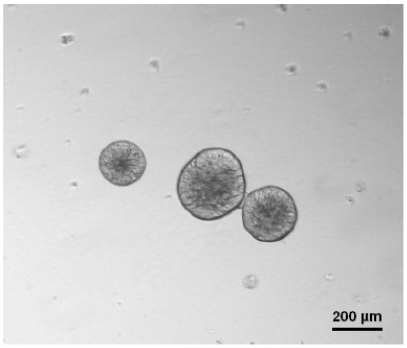

Abb. 16 Kolorektale TICs zeigen eine typische Sphärenbildung unter serumfreien Bedingungen.
Fotografie der von kolorektalen TICs gebildeten Sphären, die in serumfreiem mit EGF und FDF versetztem CSC-Medium kultiviert wurden.

Des Weiteren wurde die Tumorigenität dieser Zellen in einem Xenograftmodell untersucht, indem NOD/SCID-Mäusen s.c. verschiedene Titrationsstufen von 10 bis 100 000 Zellen injiziert und die Mäuse bis zu 180 Tagen regelmäßig nach Tumoren abgesucht wurden (Tab. 3). Daraus ergab sich, dass eine minimale Dosis von 100 TICs reichte, um einen Tumor mit einer Latenzzeit von 42-66 Tagen zu initiieren. Bei höheren inokulierten Zellzahlen zeigte sich wie erwartet eine kürzere Latenzzeit. Zehn TICs waren hingegen für ein Tumorwachstum während des Beobachtungszeitraums von 180 Tagen nicht ausreichend.

Tab. 3 Kolorektale TICs weisen eine erhöhte Tumorigenität *in vivo* auf.

NOD/SCID-Mäusen wurden s.c. kolorektale TICs in den angegebenen Zellzahlen injiziert. Das Tumorwachstum wurde in regelmäßigen Abständen durch Messung des Tumorvolumens verfolgt.

Injizierte Zellzahl TICs	Tumorinzidenz	Tumorbildung [%]	Latenz [Tage]
10	0/4	0	>180
100	4/4	100	42-66
1000	4/4	100	37-78
10 000	4/4	100	21-30
100 000	4/4	100	10-20
1 000 000	2/2	100	10-20

Alle oben beschriebenen Versuche mit kolorektalen TICs weisen darauf hin, dass es sich hierbei um stark tumorerzeugende Zellen mit phänotypischen und molekularen Eigenschaften von Krebsstammzellen handelt.

Anschließend wurde auf die entscheidenden Fähigkeiten der Differenzierung und Selbsterneuerung von Krebsstammzellen eingegangen, die TICs ebenfalls besitzen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Differenzierung bei TICs induziert werden kann, wenn diese in serumhaltigem Medium kultiviert werden [106]. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden kolorektale TICs unter differenzierenden Kulturbedingungen, in Anwesenheit von 10 % FCS ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren für mindestens zwei Monate gehalten. Eine erhöhte Expression des Differenzierungsmarkers E-Cadherin [108] bei der FACS-Analyse und morphologische Veränderungen (Abb. 17) zeigen die Fähigkeit der TICs zur Differenzierung. Die Zellen im serumhaltigen Medium nahmen einen mehr epithelialen Phänotyp an, verglichen mit Zellen in CSC-Medium. Die Zellen waren abgerundet und mosaikartig. Im CSC-Medium hingegen wiesen sie eine eher spindelähnliche ungeordnete Morphologie auf (Abb. 17 B).

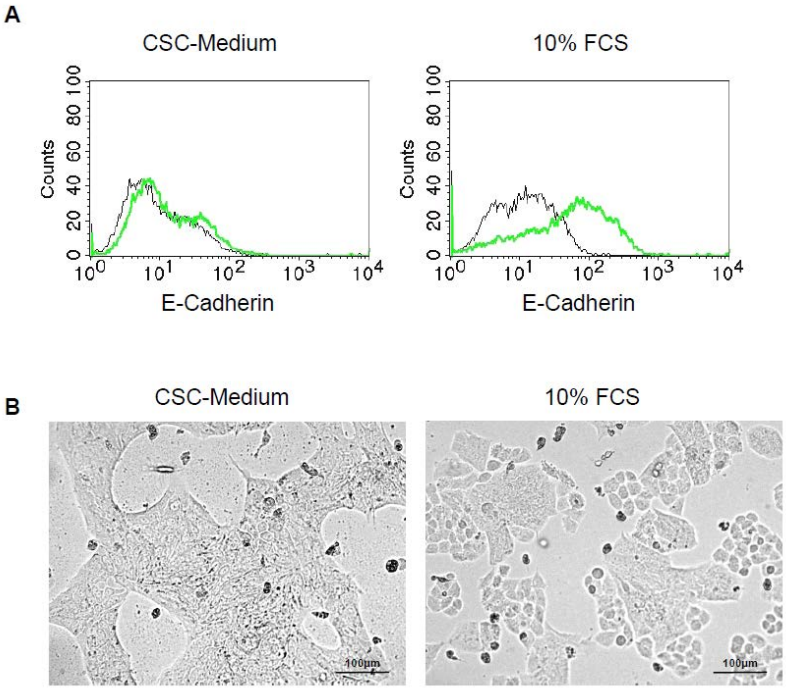

Abb. 17 Kolorektale TICs zeigen Differenzierungspotential *in vitro*.
Kolorektale TICs wurden unter nicht differenzierenden Bedingungen (CSC-Medium mit EGF/FGF) in Collagen I-beschichteten Zellkulturflaschen oder unter Differenzierungsbedingungen (RPMI mit 10 % FCS, ohne EGF/FGF) kultiviert. (A) Abgebildet sind FACS-Färbungen von E-Cadherin (grüne Linie) versus Kontrolle (schwarze Linie). (B) Fotografien von TICs unter den oben angegebenen Wachstumsbedingungen in 100-facher Vergrößerung.

Eine Methode zur Identifizierung von gesunden, aber auch malignen Stammzellen ist deren Markierung durch Langzeit-Farbstoffe wie PKH26/PKH67 [109]. Hierbei macht man sich das Selbsterneuerungspotential von Krebsstammzellen zu Nutze. Gemäß der Krebsstammzellhypothese erzeugen Krebsstammzellen durch wenige sog. asymmetrische Teilungen ohne Einbuße ihres Selbsterneuerungspotentials Progenitorzellen, die wiederum durch eine schnelle Teilungsrate den Hauptanteil der Tumormasse produzieren [110]. Krebsstammzellen behalten ihre Markierung daher länger bei, während die sich schnell teilenden Abkömmlinge den Farbstoff mit jeder Teilung immer mehr verlieren.

Für diesen Versuch wurden TICs, die unter serumfreien Bedingungen (CSC-Medium) oder im Medium mit 10 % FCS ($RPMI^{+}$-Medium) kultiviert wurden, mit dem

fluoreszenzmarkierten Molekül PKH26 gefärbt (Kapitel 4.1.4.1) und die Fluoreszenz mittels FACS-Analyse zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen.

Die Prozentzahl der $PKH26^+$-Zellen unter Differenzierungsbedingungen betrug nach 48 h 45 % und nach 96 h 11 %, während unter nicht differenzierenden Bedingungen der Anteil nach 96 h noch bei 40 % lag (Abb. 18 A).

Die in CSC-Medium in gleicher Anzahl ausgesäten Zellen zeigten zwar vergleichbare Endzellzahlen, wie die in $RPMI^+$-Medium gewachsenen TICs innerhalb der Beobachtungszeit, was durch eine Vitalitätsfärbung vor jeder FACS-Messung kontrolliert wurde, der Anteil an $PKH26^+$-Zellen lag jedoch eindeutig höher.

Da der Farbstoff gleichermaßen auf die bei jeder Zellteilung entstehenden Tochterzellen weitergegeben wird und somit die PKH26-Färbung abnimmt, kann man daraus schlussfolgern, dass der Großteil der unter Differenzierungsbedingungen gehaltenen Zellen sehr viele Teilungen durchlief und wie oben bereits beschrieben eindeutige Differenzierungseigenschaften aufzeigt.

Im CSC-Medium gab es andererseits Zellen, die sich wie stammzellähnliche Zellen verhielten und sich während dieser Zeit wenig geteilt haben und deshalb noch eine relativ intensive PKH26-Färbung aufwiesen. Andere Zellen müssen sich davon abgespalten haben, die durch ihre besonders hohe Teilungsrate für gleiche Zellzahlen wie bei den im Differenzierungsmedium gewachsenen Zellen sorgten. Ähnliche Beobachtungen wurden im darauffolgenden *in vivo*-Versuch gemacht (Abb. 18 B).

Da sich der PKH26-Farbstoff durch eine lange Halbwertzeit auch für die *in vivo*-Analytik eignet, wurde der Anteil der verbliebenen $PKH26^+$-Zellen in zwei etablierten Xenografttumoren untersucht. Zum Zeitpunkt der Analyse waren die Tumore bereits vier Wochen in den Flanken von NOD/SCID-Mäusen gewachsen und hatten Größen von 0,4 und 0,5 cm^3 erreicht.

Der Anteil der $PKH26^+$-Zellen in den Tumoren betrug 0,2 % und 0,5 % (Abb. 18 B). Dieses Ergebnis belegt eine Aufspaltung in eine kleine Minderheit von sich wenig teilenden Tumorzellen mit Selbsterneuerungspotential und in eine sich daraus entwickelte schnell teilende Mehrheit. Der Anteil der $PKH26^+$-Zellen mit 0,2 % und 0,5 % ist mit den Mengenangaben von Krebsstammzellpopulationen in humanen Tumorproben vergleichbar.

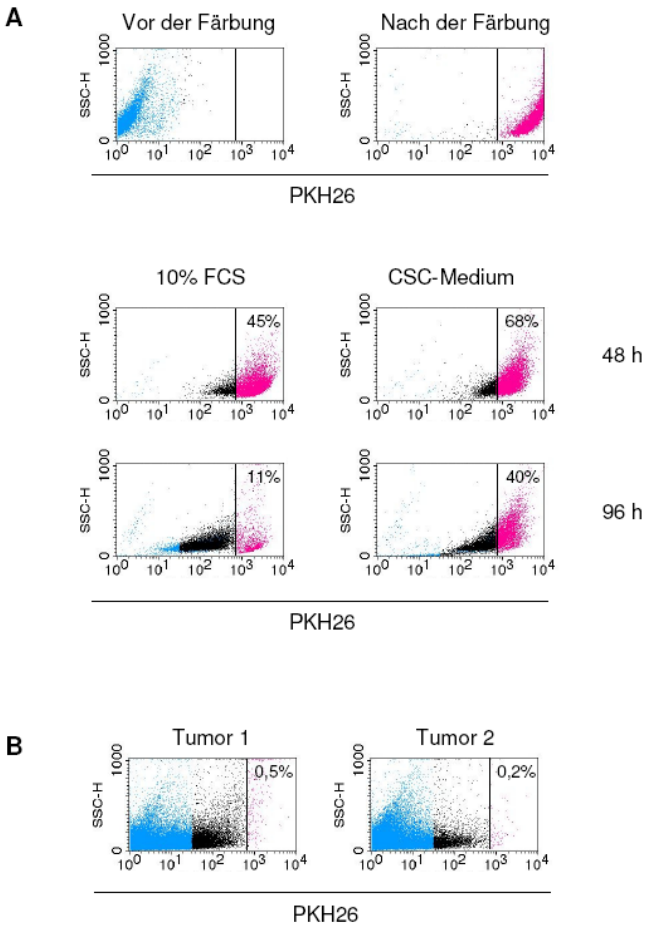

Abb. 18 Nachweis des Selbsterneuerungspotentials der kolorektalen TICs *in vitro* und *in vivo*.
(A) Unter serumfreien Bedingungen (CSC-Medium) und Differenzierungsbedingungen (RPMI$^+$-Medium) gewachsene TICs wurden mit PKH26 gefärbt und für 48 h und 96 h weiterkultiviert. Anschließend wurde die Verteilung der PKH26$^+$-Zellen mittels FACS analysiert. (B) PKH26 gefärbte TICs (gewachsen in CSC-Medium) wurden in NOD/SCID-Mäuse inokuliert und nach vier Wochen Tumorwachstum wurde der Anteil an PKH26$^+$-Zellen des dissoziierten Tumors mittels FACS bestimmt.

Zusammengefasst deuten die Expression eines spezifischen Sets an Markerproteinen, die hohe Tumorigenität *in vivo*, die Differenzierung in serumhaltigem Medium und in Xenografts, die Selbsterneuerungsfähigkeit und die Ausbildung von Sphären der in dieser Arbeit untersuchten kolorektalen TICs darauf hin, dass sich diese Zellen wie Krebsstammzellen verhalten und deshalb für die Untersuchung des therapeutischen Potentials von MT110 zur Beseitigung von Krebsstammzellen geeignet sind.

5.5.1 Mutationsanalyse der Gene *KRAS* und *PIK3CA*

Um die Frage zu beantworten, ob die untersuchten kolorektalen Tumor-initiierenden Zellen auch durch eine Antikörper-vermittelte Rezeptorblockade nach Vorbild der etablierten Darmkrebstherapie mit Cetuximab oder Panitumumab zu bekämpfen sind, wurde nach Genmutationen gesucht, die in der nachgeschalteten Signalkaskade des EGFR-Rezeptors eine Rolle spielen und die unabhängig von einer Rezeptoraktivierung zur Zellentartung führen können. Dazu wurde eine Sequenzanalyse für die Gene *KRAS* und *PIK3CA* durchgeführt. Frühere Studien lieferten Hinweise darauf, dass bei Vorliegen von Veränderungen im *KRAS*- und/oder im *PIK3CA*-Gen eine Anti-EGFR-Therapie, wie sie bei metastasierten Kolonkarzinomen eingesetzt wird, unwirksam ist [111, 112]. KRAS und PI3K regulieren Signalkaskaden unterhalb des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) und können durch eine Genmutation permanent aktiviert sein, auch wenn der EGFR-Rezeptor blockiert ist.

Da Mutationen in *KRAS* (40 %) und *PI3KCA* (20 %) bei Patienten mit Kolorektalkarzinom häufig auftreten, gewinnen alternative Therapien wie die Anti-EpCAM-Therapie an Bedeutung.

Abb. 19 veranschaulicht, dass Mutationen bei den kolorektalen TICs in *KRAS* (G13D) und in *PI3KCA* (E545K, E545T und D549N) zu erkennen sind (durch Pfeile gekennzeichnet), was bei den untersuchten kolorektalen TICs eine Resistenz gegenüber EGFR-gerichteten Antikörpern erwarten lässt.

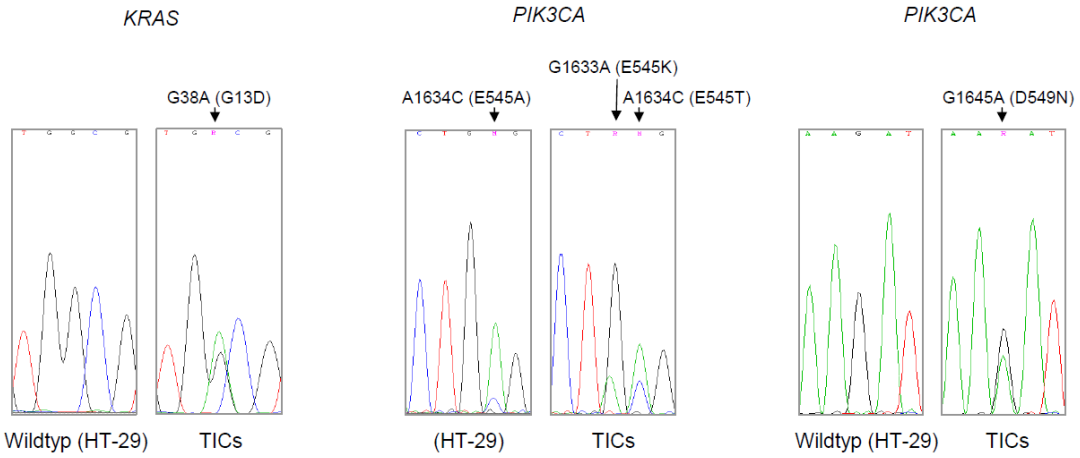

Abb. 19 Mutationen in den Genen *KRAS* und *PI3KCA* bei kolorektalen TICs.

Genomische DNA-Sequenzierung des Exons 9 von Gen *PIK3CA* und des Exons 2 von Gen *KRAS*. Gezeigt sind Ausschnitte der Chromatogramme (Chromas) von kolorektalen TICs und von der als Wildtyp dienenden Tumorzelllinie HT-29 (Ausnahme E545A Mutation).

5.6 Hohe Wirksamkeit von MT110 gegen TICs *in vitro*

Die Eliminierung von TICs durch das EpCAM-spezifische BiTE MT110 unter Verwendung von humanen PBMCs oder daraus selektierten $CD8^+$ T-Zellen wurde nach dem gleichen Versuchsschema wie für die $CD44^{hoch}$ HT-29-Xenograft-Tumorzellen mit dem in Kapitel 4.1.8 beschriebenen Zytotoxizitätsversuch in Kombination mit dem Koloniebildungsversuch untersucht.

Als erstes wurde die kleinstmögliche Konzentration von MT110 für eine vollständige Lyse von TICs bestimmt. Kolorektale TICs wurden mit humanen PBMCs im Effektor-zu-Target (E:T)-Verhältnis von 10:1 und unterschiedlichen Konzentrationen von MT110 für 20 h inkubiert, in Soft Agar eingebettet und nach elf Tagen die Kolonien gezählt. Es wurden parallel dazu drei Kontrollen mit den Tumorzellen durchgeführt, wie bereits in Kapitel 5.4 geschildert.

In Abb. 20 A sind repräsentative Fotografien des Koloniebildungsversuches zu sehen, in Abb. 20 B darunter sind die durchschnittlichen Zahlen der koloniebildenden Einheiten (CFU) +/- SD pro cm^2 (n=3) dargestellt. Eine deutliche Reduktion der Koloniebildung wurde bereits bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml MT110 erreicht. Zytotoxizitätsreaktionen mit 1, 10, 100 und 200 ng/ml verhinderten vollständig eine Kolonieformation im Sinne einer kompletten Eliminierung von TICs.

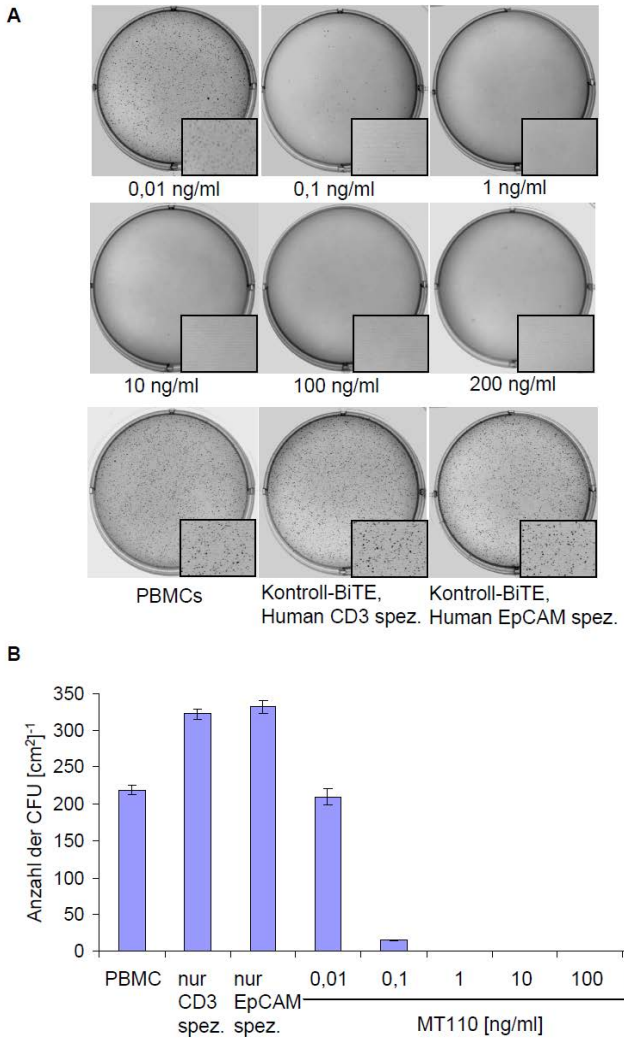

Abb. 20 Dosisabhängige Lyse der kolorektalen TICs durch MT110.

(A+B) 10 000 TICs wurden mit humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) im E:T-Verhältnis 10:1 und den jeweiligen Antikörpern mit einer Konzentration von 200 ng/ml (wenn nicht anders angegeben) 20 h inkubiert. Es wurden drei Kontrollversuche mit den Tumorzellen durchgeführt: 1) ausschließlich PBMCs, 2) PBMCs und ein nur human CD3-spezifisches BiTE, 3) PBMCs und ein nur human EpCAM-spezifisches BiTE. Alle Zellen wurden in Soft Agar eingebettet und nach elf Tagen die mit Kristallviolett gefärbten Kolonien fotografiert (A). (B) Angegeben ist die durchschnittliche Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) +/- SD pro cm^2 (n=3).

Die gerichtete Lyse der kolorektalen TICs mittels aktivierter T-Zellen durch MT110 wurde mit dem ^{51}Cr-Freisetzungsversuch überprüft. Das Ergebnis ist in Abb. 21 dargestellt und beschreibt einen sigmoidal verlaufenden dosisabhängigen Kurvenverlauf der spezifischen Lyse mit einer Maximallyse von 80-85 % innerhalb von 18 h. Die halb-

maximale Lyse (EC_{50}) lag bei 0,41 +/- 0,25 ng/ml MT110. Die Wirksamkeit von MT110 ließ sich auch mit diesem Versuch bestätigen.

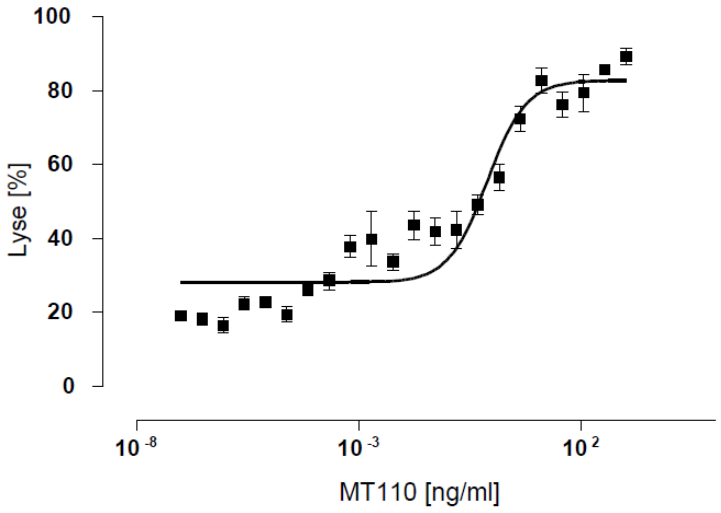

Abb. 21 Lyse der kolorektalen TICs im ^{51}Cr-Freisetzungs-Versuch.

Kolorektale TICs wurden in Zytotoxizitätsexperimenten unter Verwendung von radioaktivem Chrom analysiert. Angereicherte $CD8^+$ T-Zellen wurden in einem E:T-Verhältnis von 10:1 eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 18 h. Mithilfe der Messwerte für die spontane Lyse (radioaktive Zielzellen ohne Effektoren) und für die maximale Lyse (radioaktive Zielzellen mit Triton-X100 behandelt) wurde mit den gemessenen Daten (n=3) die spezifische Lyse [%] ± SD berechnet.

$CD8^+$ T-Zellen gelten als die Hauptvermittler für die BiTE-vermittelte Zelllyse. Im nächsten Experiment werden die aufgereinigten stimulierten $CD8^+$ T-Zellen mit den unstimulierten PBMCs als Effektorzellen verglichen, um die besten Konditionen für die Eliminierung von Krebsstammzellen zu bestimmen und darüber hinaus die Effektivität der $CD8^+$ T-Zellen auf Krebsstammzellen zu überprüfen.

Wie in Abb. 22 zu erkennen ist, gab es keinen Unterschied zwischen stimulierten isolierten $CD8^+$ T-Zellen und unstimulierten PBMCs. Gleiche Mengen an MT110 führten in beiden Fällen zu einer gleichen Anzahl an Kolonien, wobei bei einer MT110-Konzentration von 1 ng/ml kein Auswachsen von Kolonien mehr beobachtet wurde. Da die Menge an $CD8^+$ T-Zellen innerhalb der PBMCs nur 15-20 % beträgt liegt nahe, dass die Lyse von TICs mit MT110 nicht ausschließlich durch $CD8^+$ T-Zellen, sondern durch verschiedene T-Zellpopulationen vermittelt werden kann.

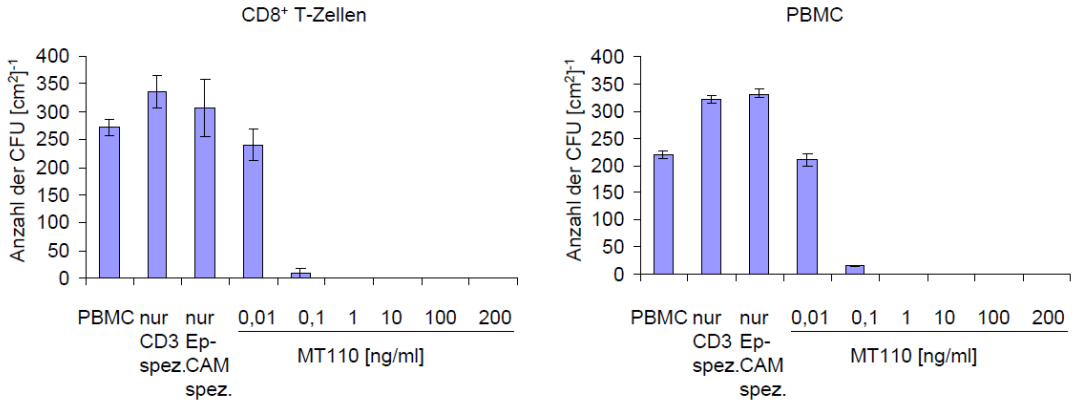

Abb. 22 Die Lyse von kolorektalen TICs mit MT110 ist nicht nur CD8$^+$ T-Zell-spezifisch.
Kolorektale TICs wurden mit unstimulierten humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) oder mit aufgereinigten stimulierten CD8$^+$ T-Zellen im E:T-Verhältnis von 10:1 und den angegebenen Antikörperkonzentrationen für 20 h inkubiert. Es wurden drei Kontrollversuche mit den Tumorzellen durchgeführt: 1) ausschließlich PBMCs, 2) PBMCs und ein human CD3-spezifisches BiTE (200 ng/ml) mit nicht-human spezifischer Targetseite, 3) PBMCs und ein nur human EpCAM-spezifisches BiTE (200 ng/ml). Alle Zellen wurden in Soft Agar eingebettet und nach elf Tagen die mit Kristallviolett gefärbten Kolonien fotografiert. Angegeben ist die durchschnittliche Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) +/- SD pro cm^2 (n=3).

Es wurde untersucht, ob die Effektivität der Lyse von TICs spenderabhängig ist und welchen Einfluss das Effektor-zu-Target-Verhältnis darauf hat. PBMCs wurden von zwei gesunden Spendern in unterschiedlichen E:T-Verhältnissen von 1:5, 1:1, 5:1 bis 10:1 mit 100 ng/ml MT110 für den Zytotoxizitätsversuch eingesetzt.

In Abb. 23 ist zu sehen, dass bei einer MT110-Konzentration von 10 ng/ml ein E:T-Verhältnis von 1:1 nach einer Inkubationszeit von 20 h nur eine partielle Reduktion der Kolonien ergab, aber E:T-Verhältnisse von 5:1 und 10:1 die Koloniebildung deutlich verringerten. Mit den PBMCs von Donor 1 wurden keine detektierbaren Kolonien nach 17 Tagen in Soft Agar gefunden; bei Donor 2 waren es drei Kolonien pro cm^2 nach 20 h. Es gab somit geringe Unterschiede zwischen den Spendern.

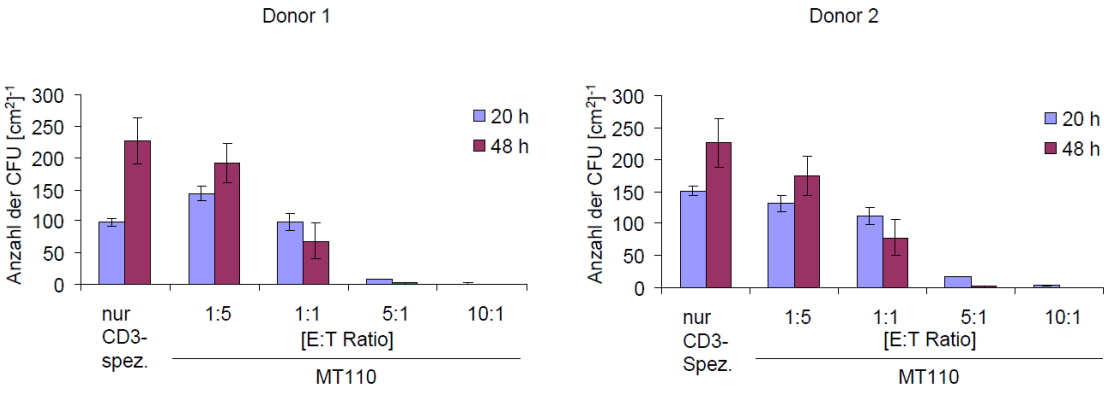

Abb. 23 Effektor-zu-Target-abhängige Lyse von kolorektalen TICs mit MT110.

10 000 TICs wurden in unterschiedlichen E:T-Verhältnissen mit humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von zwei unterschiedlichen Spendern (Donor 1, Donor 2) und 10 ng/ml MT110 oder CD3 spezifischem Kontroll-BiTE 20 h und 48 h inkubiert. Alle Zellen wurden in Soft Agar eingebettet und nach 16 Tagen die mit Kristallviolett gefärbten Kolonien fotografiert. Angegeben ist die durchschnittliche Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) +/- SD pro cm^2 (n=3).

In diesem Experiment lässt sich erkennen, dass der Zytotoxizitätsversuch zeitabhängig ist, da nach 48 h Einwirkzeit von MT110 die Anzahl der Kolonien im Vergleich zu 20 h abnahm. In der Beschreibung des nächsten Versuches soll darauf etwas genauer eingegangen werden.

Als nächstes wurde die Lyse in Abhängigkeit von der Zeit betrachtet. Bezogen auf eine Patientenstudie, können Faktoren wie Effektoren und BiTE-Titer nicht immer optimal sein, besonders dann, wenn das Immunsystem der Patienten eine Zeit lang durch Chemotherapien geschwächt wurde. In diesem Versuch soll gezeigt werden, dass es auch bei geringen E:T-Verhältnissen und geringen MT110-Konzentrationen über einen längeren Wirkungszeitraum als die herkömmlich gewählten 20 h ebenfalls zu einer vollständigen Eliminierung kolorektaler Tumor-initiierender Zellen kommt.

Für diesen Versuch (siehe Abb. 24) wurden ein E:T-Verhältnis von 1:1 und eine MT110-Konzentration von 10 ng/ml gewählt.

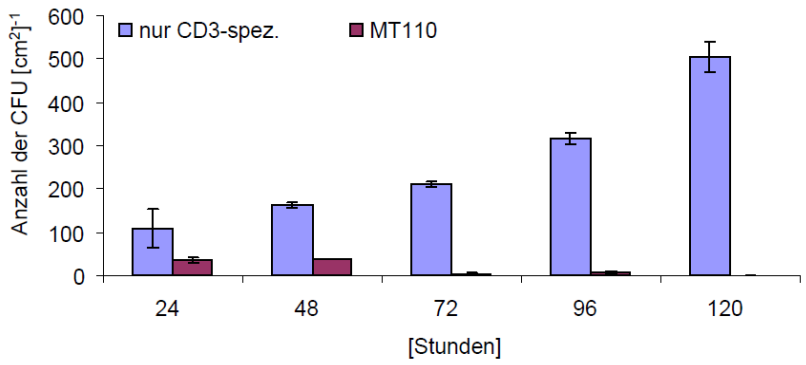

Abb. 24 Zeitabhängige Lyse von kolorektalen TICs mit MT110.

10 000 TICs wurden mit humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) im E:T-Verhältnis von 1:1 und 10 ng/ml MT110 oder nur human CD3-spezifischem Kontroll-BiTE zu den angegebenen Zeitpunkten inkubiert. Alle Zellen wurden in Soft Agar eingebettet und nach 16 Tagen die mit Kristallviolett gefärbten Kolonien fotografiert. Angegeben ist die durchschnittliche Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) +/- SD pro cm^2 (n=3).

Bei einer Inkubationszeit von 24 h wurden im Koloniebildungsversuch 35 Kolonien gezählt, was einem Drittel der Kolonien entspricht, die bei dem Kontrollansatz gezählt wurden. Nach einer längeren Wirkdauer von MT110 wurden nur noch 6 CFU/cm^2 nach 96 h und keine CFU/cm^2 nach 120 h detektiert. Unter Kontrollbedingungen nahm die Anzahl der Kolonien stetig zu. Das zeigt sehr anschaulich die Spezifität der T-Zell-gerichteten Lyse in Anwesenheit von MT110, da die TICs ohne MT110 in Anwesenheit der PBMCs proliferieren. Die Lyse der TICs ist demnach zeitabhängig und kann auch bei geringen MT110-Konzentrationen und kleiner Effektorzellzahl mit einer entsprechenden Wirkdauer zu einer vollständigen Eliminierung von TICs führen.

5.7 Langzeitbeobachtung zur Koloniebildung

Unter den Bedingungen, bei denen in den ersten drei Wochen keine Kolonien in Soft Agar nach erfolgtem Zytotoxitätsexperiment mit MT110 beobachtet wurden, musste sichergestellt werden, dass es keine Krebsstammzellen gibt, die sich in Ruhephase befinden und nach zwei Wochen im Koloniebildungsversuch nicht erfasst wurden.

Deshalb wurden koloniefreie Platten von beendeten Koloniebildungs-experimenten bis zu fünf Monate im Brutschrank weiterinkubiert und beobachtet. Um die Agarose vor einer Austrocknung zu schützen, wurden die Platten mit $RPMI^+$-

Medium überschichtet, was regelmäßig ausgetauscht wurde. In keinem einzigen Fall waren nach der langen Beobachtungszeit Koloniebildungen zu sehen. Nach drei und nach fünf Monaten wurden durch Einstechen einer mit TICs benetzten Pipettenspitze frische TICs in den bestehenden Agar transferiert, um die Koloniebildungsvoraussetzungen für eventuell noch alte im Agar lebende Krebsstammzellen zu testen. Abb. 25 zeigt eindeutige Koloniebildungen um den Einstechkanal herum, was belegt, dass die Bedingungen im Agar zur Ausbildung von Kolonien auch nach fünf Monaten noch ausreichend waren.

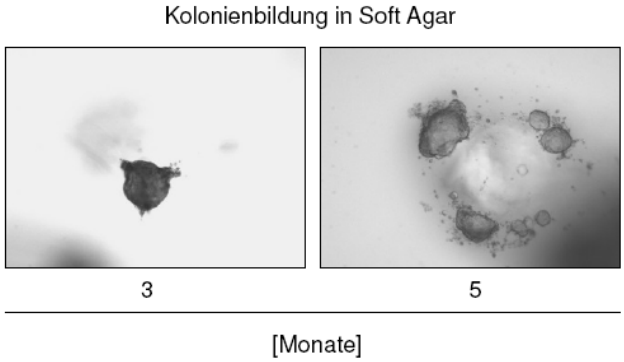

Abb. 25 Bedingungen in drei und fünf Monate altem Soft Agar ermöglichen neue Koloniebildung. Soft Agar-Platten, die nach drei bis fünf Monaten nach erfolgter Zytotoxizitätsreaktion mit MT110 und anschließendem Koloniebildungsversuch keine Kolonien aufwiesen, wurden erneut mit kolorektalen TICs angeimpft und das Koloniewachstum um die Einstichkanäle nach 14 Tagen fotografiert.

Dies bestätigt, dass in den Soft Agar-Ansätzen, bei denen keine Koloniebildungen beobachtet wurden, alle Tumor-initiierenden Zellen durch aktivierte T-Zellen eliminiert wurden.

5.8 Metastasierungspotential der Soft Agar-Kolonien

Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, ob die in Soft Agar gebildeten Kolonien tumorigene Krebsstammzellen beinhalten und das Auszählen von Kolonien ein valides Ausleseverfahren zur Detektion von Krebsstammzellen ist. Diese Frage sollte durch ein *in vivo*-Experiment geklärt werden. Mithilfe einer Nanopipette wurde eine Kolonie oder ein Mix aus zehn Kolonien mit einem durchschnittlichen

Durchmesser von 50-100 µm (eine Kolonie ≈ 200-300 Zellen) im Soft Agar gepickt und in die Flanken von NOD/SCID-Mäusen transplantiert.

Eine einzige Kolonie verursachte in 50 % der Fälle ein Tumorwachstum nach einer Latenzzeit von 24-60 Tagen; zehn Kolonien verursachten zu 33 % nach 52-59 Tagen Tumore in NOD/SCID-Mäusen (Tab. 4).

Tab. 4 In NOD/SCID-Mäuse implantierte Soft Agar-Kolonien verursachen Tumore und Metastasen.
Eine oder zehn aus Soft Agar gepickte Kolonien (ø 50-100µm) wurden s.c. in NOD/SCID-Mäuse implantiert. Die Mäuse wurden 120 Tage lang auf Tumorwachstum untersucht. Jedes der Mäuse wurde spätestens nach Ablauf der Beobachtungszeit auf Lymphknotenmetastasen abgesucht.

Injizierte Kolonien	Tumorinzidenz	Latenz [Tage]	Metastasen
Soft Agar	0/2	>100	0
1	3/6	24-60	2/6
10	2/6	53-59	1/6

Bei der post-mortem Untersuchung aller Mäuse konnten bei drei Tieren extrem vergrößerte Lymphknoten im mesenterialen, zervikalen und inguinalen Bereich beobachtet werden (Abb. 26 A).

FACS-Analysen von den Lymphknoten-Homogenisaten dieser vergrößerten Lymphknoten wiesen Zellen auf, die humanes CD24, CD44 und EpCAM exprimierten (Abb. 26 B). Die gleichen humanen Markerproteine wurden auf den Zellen exprimiert, die aus den subkutan gewachsenen Tumoren isoliert wurden.

Hiermit wurde bestätigt, dass die vom Koloniebildungsversuch stammenden Kolonien oder Zellen innerhalb der Kolonien Krebsstammzellcharakter zeigen, da eine Kolonie bereits ausreichte, um einen Tumor zu initiieren. Darüber hinaus wiesen die Kolonien oder Zellen innerhalb der Kolonien durch die Induktion von Metastasen einen äußerst infiltrierend-invasiven Charakter auf.

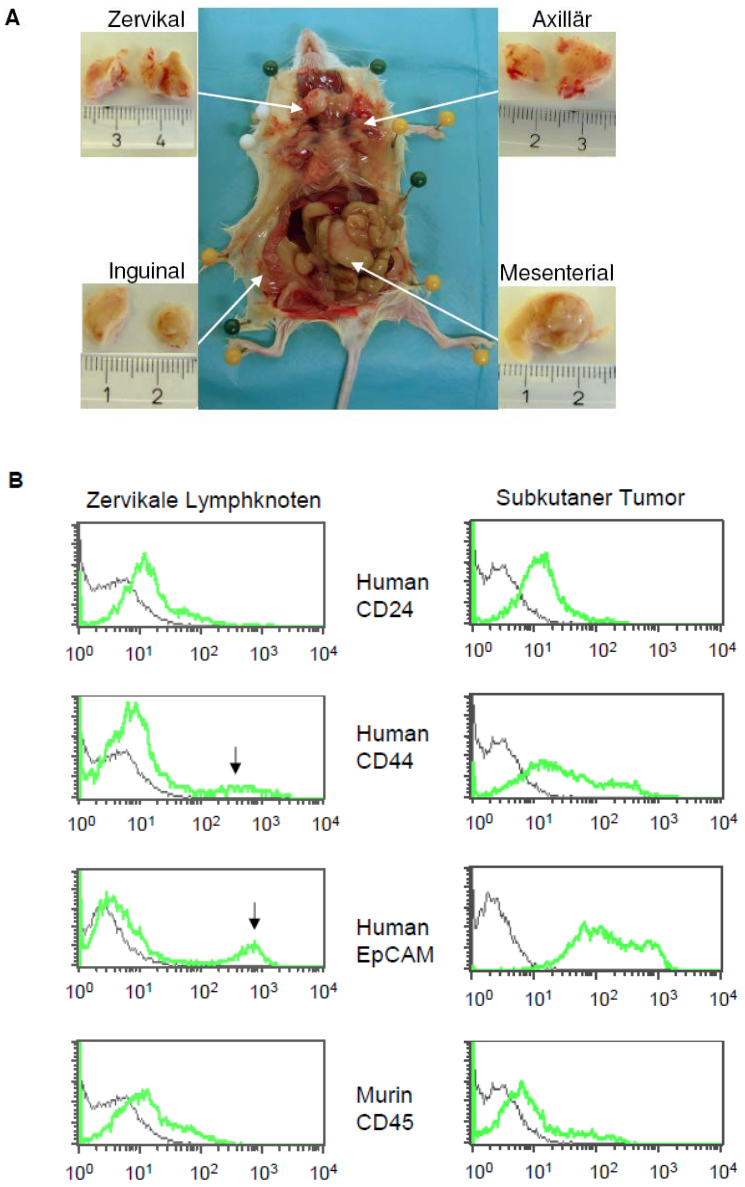

Abb. 26 Soft Agar-Kolonien aus TICs sind hochtumorigen und bilden Metastasen *in vivo*.

(A) Lymphknotenmetastasen im mesenterialen, zervikalen und inguinalen Bereich einer NOD/SCID-Maus, in die eine Soft Agar-Kolonie injiziert worden war. (B) Zellen der enzymatisch dissoziierten zervikalen Lymphknotenmetastasen und des s.c. gewachsenen Tumors wurden einer FACS-Analyse mit anti-humanen EpCAM-, CD44- und CD24-Antikörpern und anti-murinem CD45-Antikörper unterzogen. Die schwarzen Pfeile weisen auf eine Subpopulation von human EpCAM-exprimierenden und human CD44-exprimierenden Zellen in den zervikalen Lymphknotenmetastasen hin.

5.9 Aktivität von MT110 gegen kolorektale TICs im Mausmodell

Die vorigen Experimente zeigten, dass 100 TICs oder zehn $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$-Tumorzellen ausreichend sind, um in NOD/SCID-Mäusen Tumore nach einer Latenzzeit von 33-66 Tagen zu verursachen (Tab. 2**,** Tab. 3). Um die Effektivität von MT110 gegen TICs und $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$-Zellen *in vivo* zu testen, sollte nun eine 5000-fach höhere Dosis der minimal-tumorigenen Zellzahl eingesetzt werden.

In einem ersten *in vivo*-Versuch wurden TICs mit PBMCs gemischt und s.c. in die Flanken von NOD/SCID-Mäusen inokuliert und am gleichen Tag mit der Behandlung von MT110 oder PBS als Kontrolle begonnen. Als weitere Kontrolle wurden TICs ohne PBMCs inokuliert.

Wie in Abb. 27 A gezeigt, verursachten $0{,}5x10^6$ TICs nach 50 Tagen >0,6 cm^3 große Tumore. Die Präsenz von PBMCs in einem E:T-Verhältnis von 2:1 verzögerten das Tumorwachstum nicht wesentlich, verglichen mit der Kontrollgruppe ohne PBMCs. Dosen von 50 oder 500 µg/kg MT110, die den Mäusen i.v. für zwölf Tage verabreicht wurden, verhinderten die Tumorbildung vollständig für die gesamte Beobachtungszeit von 246 Tagen. Alle Mäuse überlebten die Inokulierung der hohen tumorigenen Zellanzahl (Abb. 27 B). Injizierte MT110-Konzentrationen von 5 µg/kg konnten das Tumorwachstum ebenfalls signifikant vermindern; 50 % der Mäuse überlebten und entwickelten keinen Tumor. Die restlichen Mäuse wurden zusammen mit den Mäusen der Kontrollgruppen aufgrund der Tumorlast getötet.

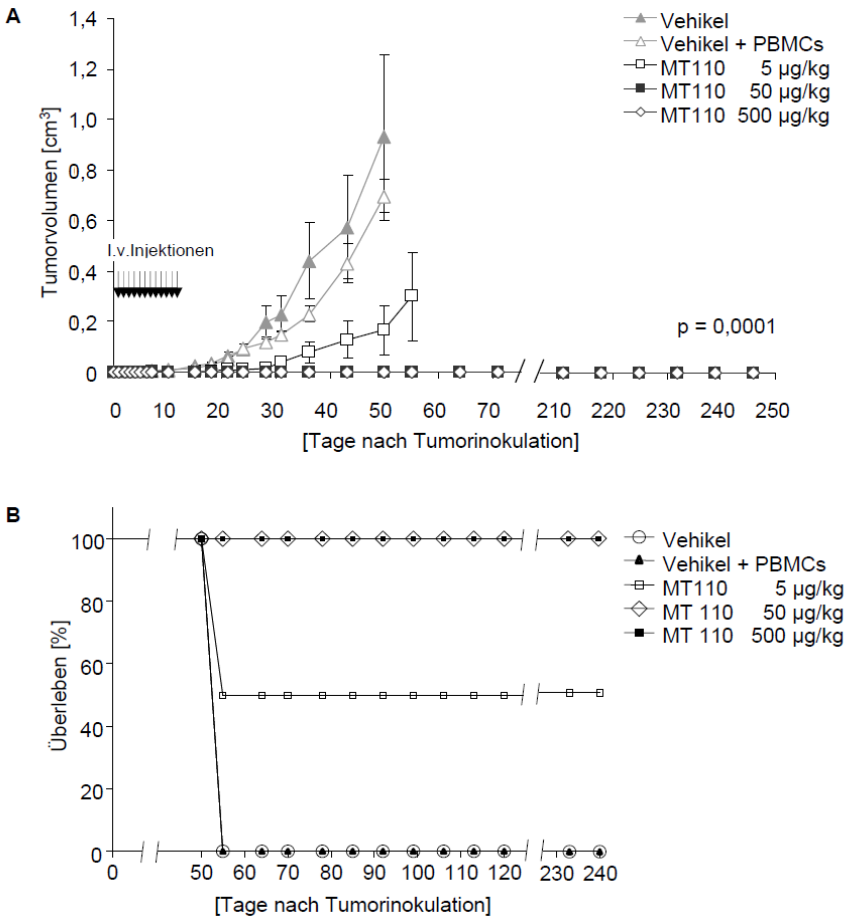

Abb. 27 MT110-aktivierte T-Zellen verhindern das Tumorwachstum von kolorektalen TICs *in vivo*. 500 000 TICs wurden zusammen mit 1 000 000 humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) s.c. in NOD/SCID-Mäuse injiziert und für zwölf Tage mit den angegebenen MT110-Konzentrationen oder PBS (Vehikel) behandelt. Einer Kontroll-Kohorte wurden ausschließlich TICs inokuliert und anschließend mit Vehikel behandelt. Angegeben sind die durchschnittlichen Tumorvolumina [cm^3] pro Kohorte (n=5). Der p-Wert wurde durch den gepaarten Student`schen t-Test bestimmt. Die graphischen Darstellungen zeigen (A) das Tumorvolumen in Abhängigkeit von der Zeit, (B) die überlebenden Mäuse (%) in Abhängigkeit von der Zeit.

In einem zweiten Experiment wurden ähnliche Resultate mit dem $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$ Tumor-Modell erreicht (Abb. 28). Wie in dem vorangegangenen Versuch wurden auch hier die 5000-fach höhere Dosis der minimal-tumorigenen Zellzahl zusammen mit PBMCs in einem E:T-Verhältnis von 2:1 in NOD/SCID-Mäuse injiziert und unmittelbar danach mit der Behandlung von MT110 oder PBS begonnen.

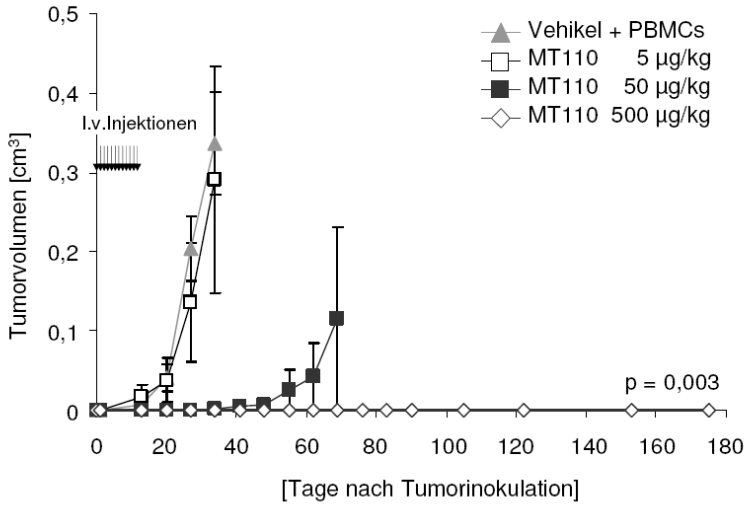

Abb. 28 MT110-aktivierte T-Zellen verhindern das Tumorwachstum von selektierten CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Xenograft-Tumorzellen *in vivo*.

Ein Mix aus 50 000 hoch tumorigenen CD44^{hoch}/CD24^{hoch}-Zellen aus HT-29-Xenografttumoren und 100 000 humanen PBMCs wurden in fünf NOD/SCID-Mäuse pro Kohorte inokuliert. Die Mäuse wurden anschließend zwölf Tage lang i.v. mit den angegebenen MT110-Konzentrationen oder PBS (Vehikel) behandelt. Angegeben sind die durchschnittlichen Tumorvolumina [cm³] pro Kohorte (n=5). Der p-Wert wurde durch den gepaarten Student`schen t-Test bestimmt.

Intravenöse Dosen von 500 µg/kg MT110, die den Mäusen zwölf Tage verabreicht wurden, verhinderten die Etablierung von Tumoren in fünf von fünf Mäusen für die gesamte Beobachtungszeit von 180 Tagen. Bei 50 µg/kg MT110 blieben vier von fünf Mäusen tumorfrei, bei 5 µg/kg MT110 war es eine von fünf Mäusen. Die extrem hohen Mengen an tumorigenen Zellen konnten auch in diesem Fall durch Behandlung mit MT110 eliminiert werden.

Mit dem darauffolgenden Mausmodell wurde untersucht, ob eine BiTE-Behandlung mit MT110 auch bei bereits gewachsenen Tumoren wirksam ist. Im Patienten führen Metastasen, die bei der mechanischen Entfernung des Primärtumors nicht berücksichtigt wurden, meist zu Rezidiven. Deshalb wurde den zusammen mit PBMCs inokulierten kolorektalen TICs vier Tage Zeit gegeben, kleine Tumore in NOD/SCID-Mäusen auszubilden. Am vierten Tag wurde mit der Behandlung von MT110 begonnen (Abb. 29). Bei einer MT110-Dosis von 2,5 mg/kg, die 14-tägig i.v. gegeben wurde, konnte in fünf von fünf Mäusen eine komplette Remission der Tumore bis zum Ende der Studie (30 Tage) beobachtet werden.

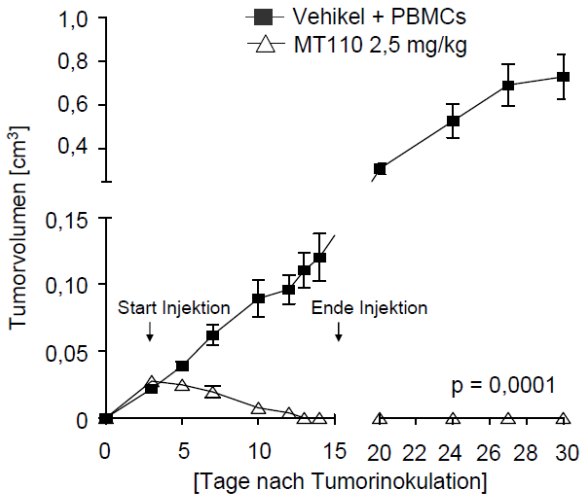

Abb. 29 Eliminierung von etablierten Tumoren durch Therapie mit MT110.

Eine Mischung von 5 000 000 primären kolorektalen TICs isoliert aus Patientenproben und 10 000 000 humanen PBMCs wurde in fünf NOD/SCID-Mäuse pro Kohorte inokuliert und eine Bildung von soliden Tumoren abgewartet. Nach vier Tagen wurden die Tiere i.v. 14-tägig mit 2,5 mg/kg MT110 oder PBS (Vehikel) behandelt. Angegeben sind die durchschnittlichen Tumorvolumina [cm^3] pro Kohorte (n=5). Der p-Wert wurde durch den gepaarten Student`schen t-Test bestimmt.

Bisher wurde die Wirksamkeit von MT110 ausschließlich bei kolorektalen Tumor-initiierenden Zellen gezeigt. Um den therapeutischen Nutzen des BiTE-Moleküls auch gegen solide Tumore anderer Gewebe zu untersuchen, wurden im nächsten Abschnitt dieser Arbeit Tumor-initiierende Zellen von Brust und Leber aus primären Tumorbiopsien charakterisiert und im *in vitro*-Zytotoxizitätsversuch in Kombination mit einem Koloniebildungsversuch (Kapitel 5.3) eingesetzt.

5.10 Nachweis von CSC-Eigenschaften bei TICs aus Brust und Leber

Die Expression von putativen CSC-Oberflächenmarkern wurde durch FACS-Färbungen analysiert. In Abb. 30 werden die Werte für die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) verschiedener Marker einer repräsentativen FACS-Analyse gezeigt.

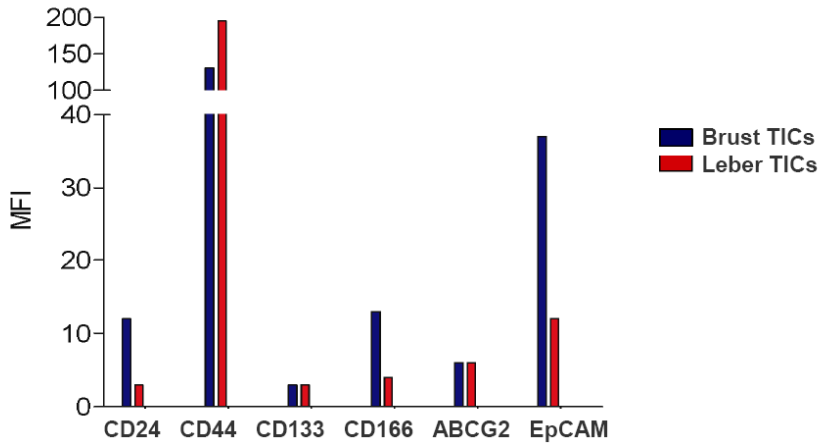

Abb. 30 Oberflächenexpression von CSC-Markern bei primären TICs aus Brust und Leber.

FACS-Analyse von CSC-Markern mit direkt konjugierten Antikörpern. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) relativ zur Negativkontrolle aus einem von insgesamt drei Experimenten wird gezeigt.

Auffällig ist die hohe CD44-Expression, ein Indiz dafür, dass das Oberflächenantigen CD44 auch für Krebsstammzellen, die aus Leber- und Brusttumoren stammen, als Isolierungsmarker geeignet ist. EpCAM fiel als zweithöchster Oberflächenmarker in der Serie der gewählten Marker auf. Die Expression von EpCAM bei den TICs aus Lebertumoren war um ein Drittel geringer als bei den TICs aus Brusttumoren.

Die Zellen wurden in serumfreiem CSC-Medium mit zugefügtem EGF und FGF gehalten und zeigten die in Kapitel 5.2 beschriebene für Krebsstammzellen typische Sphärenbildung (Abb. 31).

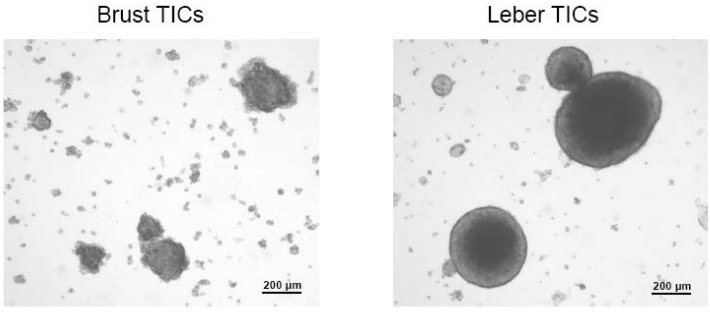

Abb. 31 TICs aus Brust und Leber zeigen eine typische Sphärenbildung unter serumfreien Bedingungen.

Fotografie der von TICs gebildeten Sphären, die im serumfreien mit EGF und FDF versetzten CSC-Medium kultiviert wurden.

Die Tumorigenität dieser Zellen wurde in einem Xenograftmodell untersucht, indem NOD/SCID-Mäusen s.c. verschiedene Titrationsstufen von 10 bis 10 000 Zellen inokuliert wurden und bis zu 180 Tagen regelmäßig nach Tumoren abgesucht wurden. Es reichte eine minimale Dosis von 100 TICs aus Brust und Leber, um einen Tumor mit einer Latenzzeit von 38-58 Tagen zu initiieren (Tab. 5).

Tab. 5 TICs aus Brust und Leber weisen eine erhöhte Tumorigenität *in vivo* auf.
Zur Bestimmung der kleinstmöglichen Anzahl an TICs der Brust und der Leber, die einen Tumor initiieren können, wurden die angegebenen Zellzahlen s.c. in NOD/SCID-Mäuse injiziert. Das Tumorwachstum wurde in regelmäßigen Abständen durch Messung des Tumorvolumens verfolgt.

Brust TICs

Injizierte Zellzahl	Tumorinzidenz	Latenz [Tage]
100	3/4	38
1 000	4/4	31
10 000	2/4	31

Leber TICs

Injizierte Zellzahl	Tumorinzidenz	Latenz [Tage]
100	4/4	37-58
1 000	4/4	30-44
10 000	2/2	30

Die von Brust- und Leberkarzinomen stammenden primären Tumor-initiierenden Zellen zeigen durch ihre Tumorigenität, Sphärenbildung und Expression von CSC-Markern Eigenschaften von Krebsstammzellen.

5.11 Hohe Wirksamkeit von MT110 gegen TICs aus Brust und Leber

Der Nachweis für die Wirksamkeit von MT110 gegen TICs von Brust- und Lebertumoren wurde mit der Kombination aus Zytotoxizitätsversuch Soft Agar-Koloniebildungsversuch (Kapitel 4.1.8) durchgeführt. Die TICs wurden mit PBMCs und 200 ng/ml MT110 oder Kontroll-BiTE 72 h inkubiert, danach in Soft Agar eingebettet und nach elf Tagen die entstandenen Kolonien gezählt. In Abb. 32 sind Bilder des Koloniebildungsversuches gezeigt, in der Graphik darunter sind die durchschnittlichen Zahlen der koloniebildenden Einheiten (CFU) +/- SD pro cm^2 (n=3) dargestellt.

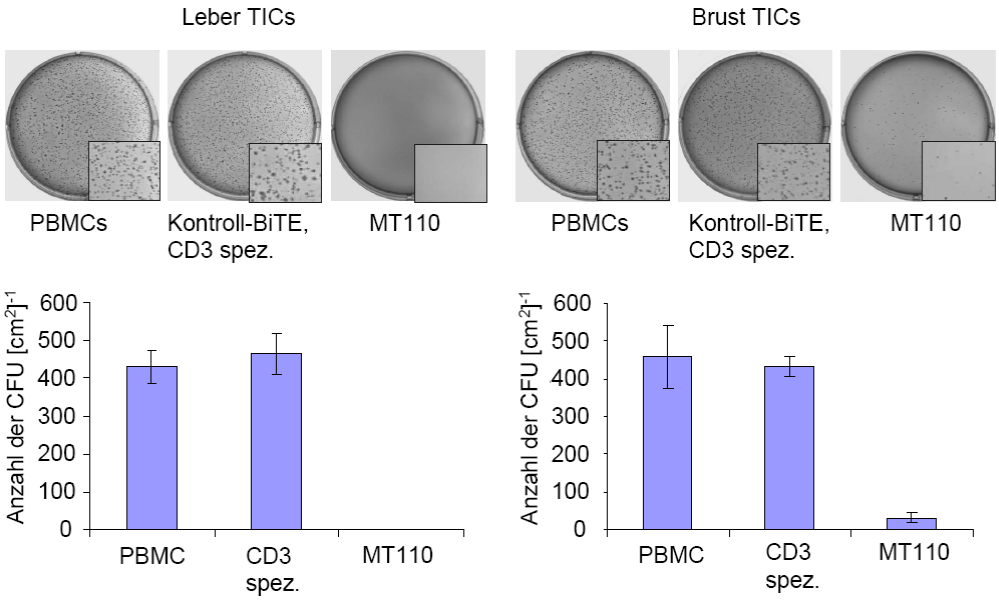

Abb. 32 Eliminierung von TICs aus Leber und Brust durch MT110-aktivierte T-Zellen.
Je 5 000 TICs wurden mit humanen $CD8^+$ T-Zellen im E:T-Verhältnis 10:1 (Brust TICs) und 20:1 (Leber TICs) und einer MT110-Konzentration von 200 ng/ml 72 h inkubiert. Es wurden zwei Kontrollversuche mit den Tumorzellen durchgeführt: 1) ausschließlich PBMCs, 2) PBMCs und ein nur human CD3-spezifisches Kontroll-BiTE. Alle Zellen wurden in Soft Agar eingebettet und nach elf Tagen die mit Kristallviolett gefärbten Kolonien fotografiert. Angegeben ist die durchschnittliche Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) +/- SD pro cm^2 (n=3).

Daraus geht hervor, dass die TICs aus Lebertumoren durch MT110 vollständig eliminiert wurden. PBMCs alleine (430 CFU/cm^2) oder das nur human CD3-spezifische Kontroll-BiTE (464 CFU/cm^2) zeigten keine Effekte auf die Koloniebildung.

Bei den TICs aus Brusttumoren wurden bei den Kontrollversuchen mit PBMCs alleine durchschnittlich 460 CFU/cm^2, mit dem Kontroll-BiTE durchschnittlich 432 CFU/cm^2 und nach MT110-Behandlung noch 30 CFU/cm^2gezählt. Trotz der nicht vollständigen Eliminierung dieser Zellen durch gegebenenfalls eine zu kurz gewählte Inkubationszeit konnte die Wirksamkeit von MT110 gegen TICs aus Mammakarzinomen nachgewiesen werden.

Mit diesem Versuch wurde die Effektivität von MT110 nicht nur für kolorektale, sondern auch Tumor-initiierende Zellen anderer Neoplasien gezeigt. Selbst TICs aus Leberkarzinomen, die eine verminderte EpCAM-Oberflächenexpression gegenüber

kolorektalen TICs oder TICs aus Mamakarzinomen zeigen, können vollständig eliminiert werden.

5.12 Inhibierung der EpCAM-Expression in kolorektalen TICs

Bisher wurde gezeigt, dass EpCAM als Zielantigen zur Eliminierung von Tumor-initiierenden Zellen des Darms, der Brust und der Leber mittels eines bispezifischen Antikörpers geeignet ist. Im zweiten Teil der Arbeit wurde nun die Bedeutung von EpCAM für Krebsstammzellen auf molekularer Ebene untersucht. Es wurde hierbei der Frage nachgegangen, welche Auswirkungen eine Inhibierung der EpCAM-Expression in kolorektalen Tumor-initiierenden Zellen zur Folge hat.

5.12.1 Generierung EpCAM-reprimierter TICs mittels shRNAs

Eine dauerhafte Repression von endogenem EpCAM in kolorektalen Tumor-initiierenden Zellen wurde durch shRNA über lentivirale Vektoren erreicht. Mithilfe dieses Systems wird eine Integration des shRNA-Konstruktes gegen humanes EpCAM in das Genom von sich teilenden und nicht teilenden Wirtszellen durch den lentiviralen Infektionsmechanismus gewährleistet. Neben der shRNA-Kassette wird das für die Puromycin N-Acetyl-Transferase codierende Gen als Selektionsmarker ins Wirtsgenom eingebaut. Die exprimierten, als Matrize dienenden shRNAs hybridisieren mit den endogenen Ziel-mRNAs, was zu einer Hemmung der Translation des Zielproteins führt.

Drei unterschiedliche shRNA-Konstrukte, bezeichnet als shRNA1, shRNA2 und shRNA3, wurden untersucht. Die shRNA1 bindet im kodierenden 3´UTR-Bereich, die shRNA2 in der kodierenden EGF-I Region im extrazellulären Teil und die shRNA3 zwischen zytoplasmatischer und transmembraner Region der EpCAM-mRNA. Neben der Transduktion der drei shRNA-Konstrukte wurde eine als Negativkontrolle dienende nonsense (*scrambled*) shRNA verwendet, die weder für ein humanes noch für ein murines Gen kodiert. Die Tumor-initiierenden Zellen wurden nach der Transduktion mit Puromycin behandelt, um transduzierte Zellen zu selektieren. Nach sieben Tagen und mindestens zwei Passagen wurde die Inhibierung der EpCAM-Expression mittels Western Blot, RT-PCR und FACS analysiert. In Abb. 33 sind Western Blot und RT-PCRs dargestellt.

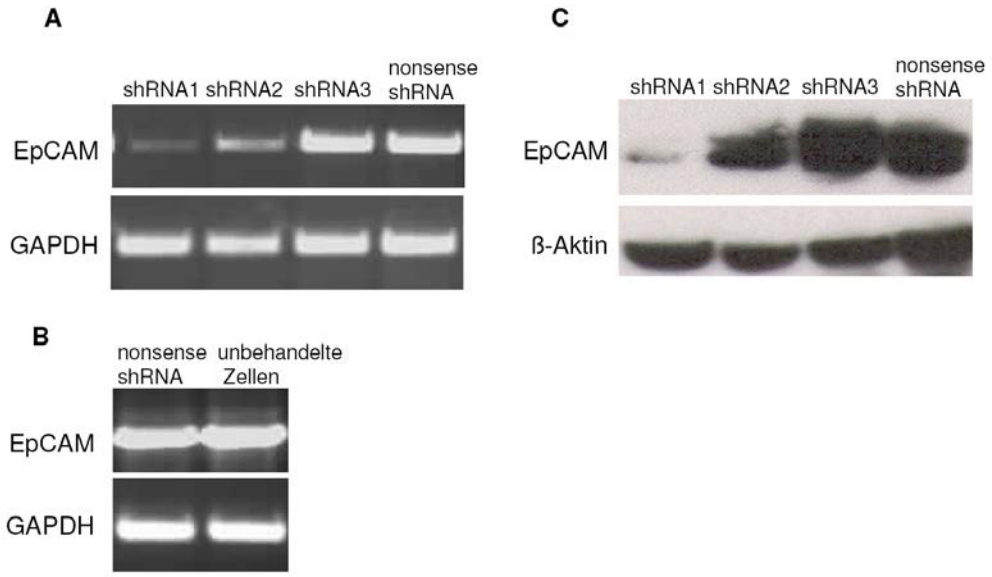

Abb. 33 EpCAM-Expression in shRNA-exprimierenden TICs.

Kolorektale TICs wurden mit lentiviralen Partikeln unterschiedlicher EpCAM-spezifischer shRNAs (shRNA1, shRNA2, shRNA3) und einer nonsense shRNA als Kontrolle transduziert und in CSC-Medium mit 2 µg/ml Puromycin kultiviert. (A+B) Gleiche Mengen an Gesamt-RNA wurden in einer semiquantitativen RT-PCR unter Verwendung von spezifischen EpCAM- und GAPDH-Primern eingesetzt und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Als Tauglichkeitskontrolle für die nonsense shRNA-transduzierten Zellen dienten unbehandelte Zellen. (C) Für den Western Blot wurden gleiche Gesamtproteinmengen eingesetzt. Gesamtzelllysate wurden elektrophoretisch in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. In Kombination mit spezifischen Antikörpern für EpCAM, ß-Aktin (Ladekontrolle) und einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper wurden die Proteinbanden gefärbt.

Das shRNA1-Konstrukt konnte auf mRNA-Ebene und Protein-Ebene die Expression von EpCAM am effektivsten inhibieren, was durch die relativ geringe Bandenintensität verglichen mit dem shRNA3-Konstrukt und der Kontrolle in Abb. 33 A+C erkennbar ist. Das shRNA2-Konstrukt zeigte eine weniger effiziente Repression als das shRNA1-Konstrukt; die shRNA3-Variante zeigte keinen Unterschied in der Repressionseffizienz zu der als Negativkontrolle dienenden nonsense shRNA. Als Kontrolle für die nonsense shRNA-exprimierenden Zellen wiederum dienten unbehandelte Zellen (Abb. 33 B). Die Ergebnisse des Western Blots und der RT-PCR belegen, dass sowohl die nonsense shRNA-exprimierenden Zellen als auch die shRNA3-exprimierenden Zellen gleiche EpCAM-Level im Vergleich zu den untransfizierten Zellen zeigten und somit als Negativkontrollen für die nächsten Experimente verwendet werden konnten.

Um den Beginn und die Stabilität der EpCAM-Repression in transduzierten TICs zu überprüfen, wurde mithilfe der FACS-Analyse zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h, 72 h und 336 h nach der Transduktion die EpCAM-Expression gemessen (Abb. 34).

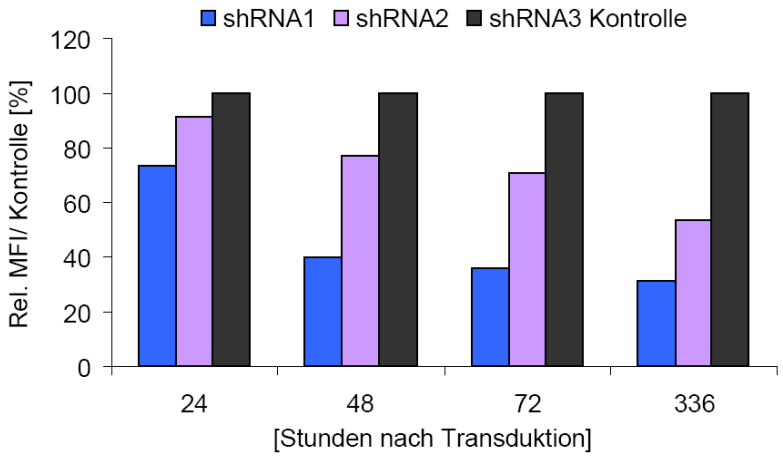

Abb. 34 Zeitverlauf der Repression von EpCAM nach der Transduktion.

100 000 kolorektale TICs wurden mit lentiviralen Partikeln unterschiedlicher EpCAM-spezifischer shRNAs (shRNA1, shRNA2 und shRNA3) mit einer MOI von 5 transduziert. Nach 72 h wurde dem Medium 2 µg/ml Puromycin zugesetzt. Zu den angegebenen Stunden nach der Transduktion wurde mittels FACS-Analyse die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) von EpCAM auf den unterschiedlich transduzierten TICs gemessen. Im Balkendiagramm sind die MFI-Werte relativ zur shRNA3-Kontrolle in Prozent angegeben.

Anhand der gemessenen Fluoreszenzintensität (MFI) war im Vergleich zur shRNA3-Kontrolle bereits nach 48 h eine relativ starke Repression des Zielgens in shRNA1- und shRNA2-transduzierten Zellen erkennbar. Die Stabilität der EpCAM-Inhibierung konnte auch noch nach 336 h beobachtet werden.

Die erreichte Effektivität der EpCAM-Repression mit den Konstrukten shRNA1 und shRNA2 ist in Abb. 35 dargestellt. Die FACS-Auswertung ergab eine bis zu 92 %ige Reduktion der Oberflächenmoleküle von EpCAM bei shRNA1 und eine bis zu 56 %ige Reduktion bei shRNA2 im Vergleich zur nonsense shRNA (Kontrolle).

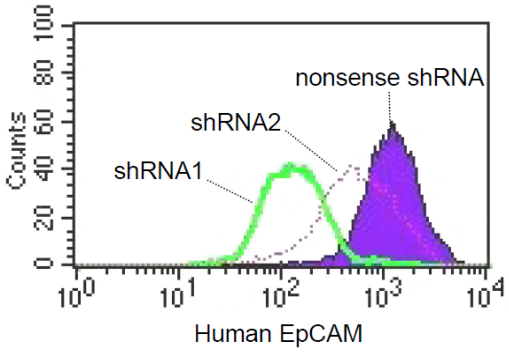

Abb. 35 Nachweis der reprimierten Oberflächenexpression von EpCAM nach Transduktion. Kolorektale TICs wurden mit zwei unterschiedlichen shRNA-Konstrukten (shRNA1, shRNA2) und einer nonsene shRNA (Kontrolle) mithilfe von lentiviralen Partikeln transduziert. Die Oberflächenexpression von EpCAM wurde am Tag 14 nach der Transkuktion mithilfe der FACS-Analyse bestimmt.

Anhand dieser Ergebnisse wurde die shRNA1 als Kandidat für die bestmögliche Repression von EpCAM ausgewählt. Damit waren die Voraussetzungen geschaffen, die Effekte einer EpCAM-Repression in kolorektalen Tumor-initiierenden Zellen zu untersuchen. Sie werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

5.12.2 Inhibierung von EpCAM hat Einfluss auf die Morphologie von TICs

Mit der Etablierung der stabilen EpCAM-reprimierten Transfektanten konnten erstmalig die direkten Effekte von EpCAM auf Morphologie und Wachstum kolorektaler Tumor-initiierender Zellen analysiert werden.

Die EpCAM-reprimierten Zellen zeigten unter gleichen Wachstumsbedingungen in serumfreiem CSC-Medium einen veränderten Phänotyp im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 36).

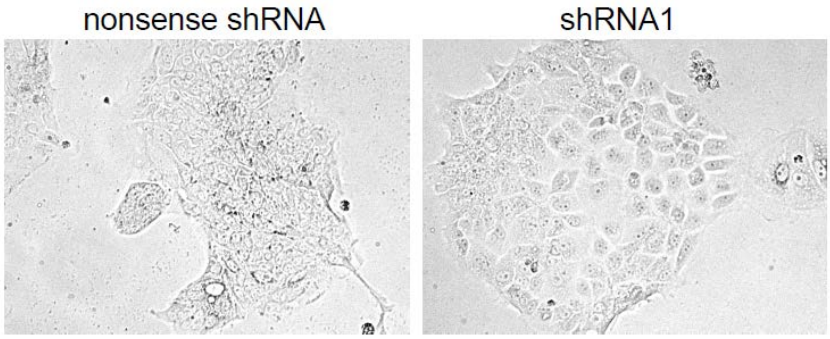

Abb. 36 Morphologische Veränderungen von EpCAM-reprimierten kolorektalen TICs.
shRNA1-exprimierende TICs und nonsense shRNA-exprimierende TICs (Kontrolle) wurden in gleicher Zelldichte unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Gezeigt sind repräsentative Bildausschnitte mit einer 100-fachen Vergrößerung.

Wie in der Abbildung erkennbar ist, waren die Zellen leicht vergrößert und bildeten gleichmäßig gemusterte, epithel-ähnliche Kolonien, während die Kolonien der Kontrollzellen ungeordnet waren und einen spindelförmigen Phänotyp zeigten.

5.12.3 Verminderte Proliferation durch EpCAM-Repression in TICs *in vitro*

Um herauszufinden, ob die Proliferation durch die EpCAM-Repression in kolorektalen Tumor-initiierenden Zellen beeinträchtigt ist, wurden Koloniebildungsversuche und Messungen der Zellteilungsrate durchgeführt. Die shRNA1-exprimierenden TICs und nonsense shRNA-exprimierenden TICs wurden für den Koloniebildungsversuch in Soft Agar in gleicher Anzahl eingebettet und nach zehn Tagen die koloniebildenden Einheiten (CFU) pro cm^2 ausgezählt (Abb. 37 A). In Abb. 37 B werden repräsentative Fotografien des Koloniebildungsversuches gezeigt. Für die Messungen der Zellteilungsrate wurden die verschieden transduzierten (shRNA1, nonsense shRNA) TICs in gleicher Zellzahl unter serumfreien Bedingungen fünf Tage kultiviert und die Zellzahl vitaler Zellen anschließend mittels Eosinrotausschluss bestimmt. In Abb. 37 C sind die Zellzahlen mit Standardabweichung (n=3) graphisch dargestellt.

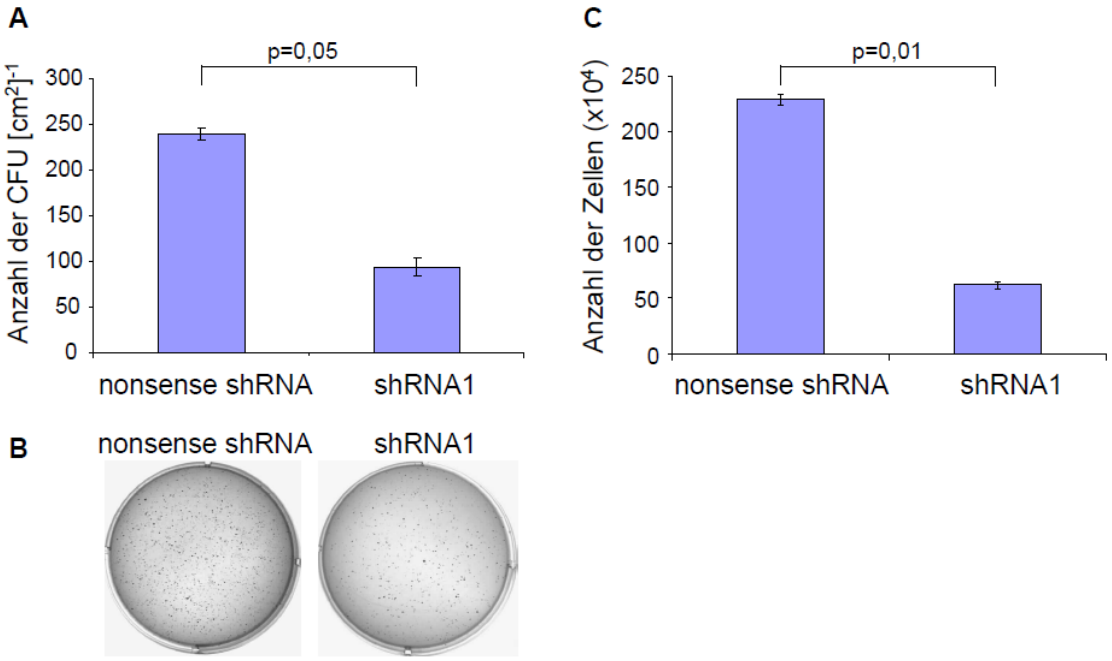

Abb. 37 Die EpCAM Inhibierung führt zu einer verminderten Proliferation.

(A+B) Soft Agar-Koloniewachstum von je 20 000 transduzierten TICs (shRNA1, nonsense shRNA) 10 Tage nach Einbettung in Soft Agar. Es wurde die Anzahl von Kolonien pro cm^2 eines Wells einer 6-Well-Platte gezählt. (A) Die Mittelwerte +/- Standardabweichung (n=3) sind im Balkendiagramm dargestellt. Der gepaarte Student´sche t-Test ergab p=0,05. (B) Fotografien von kristallviolett gefärbten Kolonien des Koloniebildungsversuches. (C) Für die Messung der Zellteilungsrate wurden je 60 000 der transduzierten Zellen in 6-Well-Platten fünf Tage lang kultiviert und anschließend die Lebendzellzahl bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und +/- Standardabweichung (n=3) im Balkendiagramm**.** Der gepaarte Student´sche t-Test ergab p=0,01.

Aus den Experimenten geht hervor, dass die mit shRNA1 transduzierten Zellen eine 2,5-fach verminderte Koloniebildung (94 CFU/cm^2) und ein 3,7-fach signifikant verminderte Zellzahl ($61x10^4$ Zellen/Well) im Vergleich zu nonsense shRNA-transduzierten Zellen (240 CFU/cm^2; $229x10^4$ Zellen/Well) zeigten.

5.12.4 Abnahme der Tumorigenität bei EpCAM-inhibierten TICs *in vivo*

Zur Untersuchung der Tumorigenität im Xenograftmodell wurden shEpCAM-exprimierende TICs (shRNA1) und nonsense shRNA-exprimierende TICs in je eine Flanke von NOD/SCID-Mäusen injiziert. Die Tumore wurden nach ca. 60 Tagen gemessen (Tab. 6) und zum optischen Größenvergleich herauspräpariert und fotografiert (Abb. 38).

Tab. 6 EpCAM-reprimierte TICs sind *in vivo* weniger tumorigen.

Auf eine Seite der Flanken von NOD/SCID-Mäusen wurden nonsense shRNA-exprimierende TICs (Kontrolle) und auf die andere Seite EpCAM-reprimierte TICs (shRNA1) mit gleicher Zellzahl inokuliert. Das Tumorwachstum wurde in regelmäßigen Abständen durch Messung des Tumorvolumens bis zu 116 Tage beobachtet.

Injizierte Zellzahl	Mausanzahl	Durchschnittliches Tumorvolumen [cm^3]	
		shRNA1	nonsense shRNA
500	3	-	0,5
1 000	3	0,1	0,8

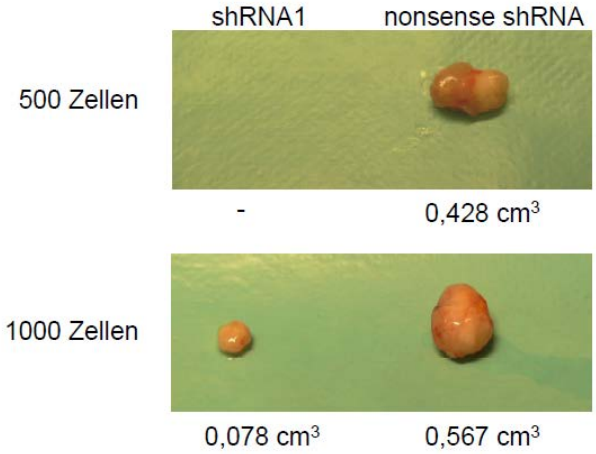

Abb. 38 EpCAM-reprimierte TICs sind *in vivo* weniger tumorigen.

Größenvergleich der herauspräparierten Tumore von inokulierten EpCAM-reprimierten TICs (shRNA1) und nonsense shRNA-exprimierende TICs aus je einer repräsentativen Maus.

Wie in Tab. 6 erkennbar ist, bildeten 1 000 nonsense shRNA-exprimierende Zellen 8-fach größere Tumore (0,5 cm^3) als 1 000 EpCAM-reprimierte Zellen (0,1 cm^3) in drei NOD/SCID-Mäusen. Mit 500 inokulierten EpCAM-reprimierten Zellen zeigten die Mäuse kein Tumorwachstum nach 116 Tagen, während hingegen 500 Kontrollzellen (nonsense shRNA) durchschnittlich 0,5 cm^3 große Tumore gebildet hatten.

Mit den aufgeführten Ergebnissen konnte demonstriert werden, dass EpCAM direkten Einfluss auf die Morphologie, Proliferation und Tumorprogression von

primären kolorektalen Tumor-initiierenden Zellen hat, was bisher nur für epitheliale Zellen gezeigt werden konnte.

Um die beobachteten Effekte auf molekularer Ebene zu verstehen, wurden im folgenden Versuch die mit der EpCAM-Regulierung assoziierten Gene untersucht. Besonderes Augenmerk wurde auf Gene gelegt, die im Zusammenhang mit der epithelial-mesenchymalen Transformation (EMT) stehen. Dieser Zelltransformations-prozess (Kapitel 2.6) verleiht Krebsstammzellen die notwendige Mobilität, um Metastasen zu bilden. In Kapitel 5.8 wurde bereits gezeigt, dass die kolorektalen TICs ebenfalls über invasive Eigenschaften verfügen, da bereits eine einzige Kolonie aus dem Soft Agar Lymphknotenmetastasen in NOD/SCID-Mäusen verursachen konnte.

Es wurden semiquantitative RT-PCRs mit EpCAM-reprimierten TICs (shRNA1, shRNA2) und nonsense shRNA-exprimierenden TICs vorgenommen, um Expressionsunterschiede der Gene auf mRNA-Ebene zu untersuchen, die durch die EpCAM-Inhibierung beeinflusst werden (Abb. 39). Vier wichtige EMT-assoziierte Gene wurden identifiziert: Vimentin, Fibronektin, SLUG und E-Cadherin.

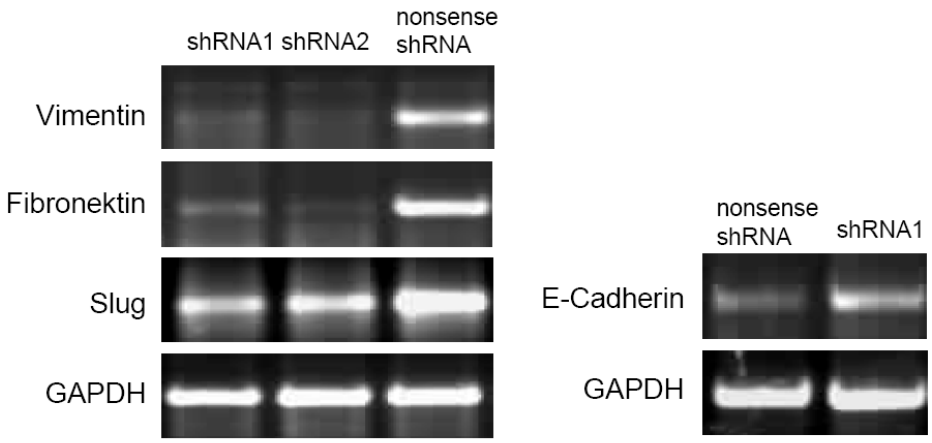

Abb. 39 Die EpCAM-Repression beeinflusst bekannte, an der EMT beteiligte Gene.

Für die semiquantitative RT-PCR mit stabilen shEpCAM-exprimierenden TICs wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Unterschiede der mRNA-Expressionslevel mittels einer semiquantitativen „One-Step“ RT-PCR und anschließender Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten.

Durch quantitative Analyse der PCR-Banden ist erkennbar, dass die mRNA-Level von den mesenchymalen Markern Fibronektin und Vimentin in EpCAM-reprimierten TICs sichtbar vermindert sind, während die mRNA-Menge an SLUG nur einen leichten Rückgang zeigt. Die mRNA-Menge an E-Cadherin nimmt hingegen zu. Aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass EpCAM Einfluss auf die epithelial-mesenchymale Transformation in kolorektalen TICs hat.

5.12.5 Einfluss der EpCAM-Reduktion auf die Migrationsfähigkeit in TICs

Metastasierende Tumorzellen besitzen Eigenschaften, die eine lokale Invasion, Intravasation, Extravasation und Proliferation an vom Primärtumor entfernten Orten möglich machen [113]. Daher liegt es nahe, dass mit der Verminderung der EMT-Marker, wie Fibronektin, Vimentin und SLUG, auch die Tumorzellmotilität beeinflusst wird.

Aus diesem Grund erfolgte die Analyse der Migrationsfähigkeit der Transduktanten mithilfe eines Wundheilungsversuches (*Scratch-Assay*), der ein Maß für die Motilität von Zellen unabhängig von einer extrazellulären Matrix ist.

EpCAM-reprimierte TICs (shRNA1) und nonsense shRNA-exprimierende TICs wurden über einen Zeitraum beobachtet, wie sie in eine erzeugte „Wunde“ in Form eines definierten Spalts von 900 µm einwandern.

In Abb. 40 sind Spalte in Zellmonolayern von shRNA1- und nonsense shRNA-Transduktanten dargestellt. Zu sehen sind die identischen Bildausschnitte zum Zeitpunkt 0 h und nach 48 h.

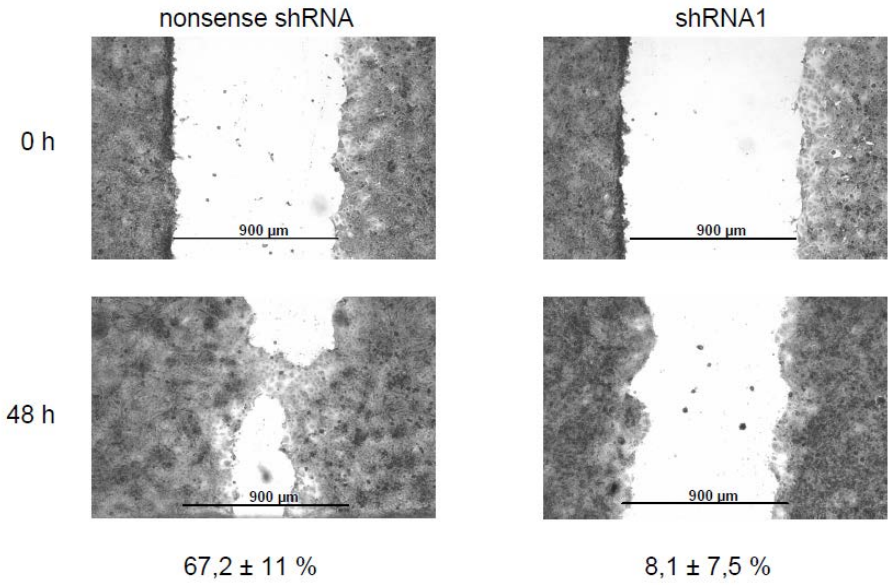

Abb. 40 Verminderte Spaltverringerung bei EpCAM-reprimierten TICs im Wundheilungsversuch. EpCAM-reprimierte TICs (shRNA1) und nonsense shRNA-exprimierende TICs (Kontrolle) wurden in 24-Well-Platten mit je einer Zellzahl von $1x10^6$ pro Well ausgesät. Ein definierter Spalt (900 µm) wurde durch den Einsatz eines Einlageteils (CellBiolabs) verursacht. Nach Herausnahme dieses Einsatzes wurden die Zellen 48 h inkubiert und mit Kristallviolett zur Kontrasterhöhung gefärbt. Die Bilder wurden bei einer 80-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Verringerung des Spaltes berechnet sich aus den gemessenen Spaltbreiten von vier festgelegten Bereichen zu den Zeitpunkten 0 h und 48 h. Die Spaltverringerung ist angegeben in % ± SD.

Die nonsense shRNA-exprimierenden TICs zeigten nach 48 h eine 67,2±11 %ige Spaltverringerung während bei den EpCAM-reprimierten TICs der Spalt um 8,1±7 % schmaler wurde.

Mit diesem Ergebnis lässt sich veranschaulichen, dass die Motilität in EpCAM-reprimierten TICs gestört ist, was wiederum zurückgeführt werden kann auf die durch EpCAM-Inhibierung verursachte Beeinträchtigung der mesenhymal-epithelialen Transformation.

6 Diskussion

6.1 Charakterisierung von Tumor-initiierenden Zellen

Ein Hoffnungsträger für eine langfristige Heilung von malignen Tumoren sind Therapien, die gezielt TICs eliminieren. So haben Lindhofer *et al.* publiziert, dass der Antikörper Catumaxomab (Removab®) Krebsstammzellen in der Bauchflüssigkeit von Patienten mit malignem Aszites effektiv eliminiert [114]. Catumaxomab ist ein trifunktionaler monoklonaler Ratte-Maus-Hybridantikörper, der an EpCAM-Antigen, an CD3-Antigen sowie an akzessorische Zellen binden kann. Bei 62 % der Patienten mit malignem Aszites wurden vor der Behandlung $CD133^+/EpCAM^+$-Zellen in der Bauchflüssigkeit diagnostiziert, die nach Abschluss der Therapie nicht mehr vorhanden waren. Ein Nachweis, dass es sich bei den $CD133^+/EpCAM^+$-Zellen tatsächlich um Krebsstammzellen handelt, steht jedoch aus. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit Wert darauf gelegt, die Krebsstammzellen oder Tumor-initiierenden Zellen umfänglich zu charakterisieren, die als Zielzellen für die Behandlung mit dem bispezifischen BiTE-Antikörper MT110 eingesetzt wurden.

Als Quelle für Krebsstammzellen wurden hier unter anderem selektierte $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$ HT-29-Xenograft-Tumorzellen verwendet. Tumorzelllinien können den Tumor nachbilden, aus dem sie ursprünglich isoliert wurden [115] und eine ähnliche morphologische Feinstruktur ausbilden, wie sie im Ursprungsgewebe vorlag [116]. Dies wird einer Subpopulation von Krebsstammzellen in den Zelllinien zugeschrieben [34, 102], die die Heterogenität des Urspungstumors in sich bergen. Yeung *et al.* konnten jüngst bestätigen, dass die Zelllinie HT-29 eine Krebsstammzell-population mit $CD44^+/CD24^+$-Phänotyp beinhaltet, die sich durch ihre hohe Proliferation *in vitro* und hohe Tumorigenität *in vivo* auszeichnet [34]. Während 200 $CD44^+/CD24^+$-Zellen in allen Mäusen zu großen Tumoren heranwuchsen, gab es von insgesamt vier Mäusen nur eine Maus, bei der $CD44^-/CD24^-$-Zellen einen Tumor verursachten.

In dieser Arbeit konnte bereits ein Tumorwachstum nach Inokulation von nur 10 $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$-Xenograft-Tumorzellen beobachtet werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die geringe tumorigene Zellanzahl durch die Xenograft-Passage

verursacht wird. Tumorzellen aus Xenografts können Unterschiede, wie z.B. in der Enzymaktivität, Tumorprogression und Metastasenbildung, im Vergleich zu Zellen aus der parentalen Tumorzelllinie aufweisen. Es wird spekuliert, dass dies durch die fremde Mikroumgebung in den Mäusen verursacht wird und zu einem bevorzugten Heranwachsen bestimmter Zellpopulationen führt. Da die Zellen aus dem Xenograft meist von einer höheren Tumorigenität im Vergleich zu den Zellen aus der Tumorzelllinie geprägt sind, liegt eine Anreicherung von Krebsstammzellen in Xenografts nahe [117].

Auffällig ist, dass der Unterschied der Tumorigenitätspotentiale zwischen der selektierten $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$-Subpopulation und der $CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}$-Subpopulation nur einen Faktor von 10 ergibt. Selbst ein durch 100 $CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}$-Tumorzellen hervorgerufenes Tumorwachstum kann nur von hochtumorigenen Zellen mit Krebsstammzellcharakter verursacht werden. Erklären lässt sich dies dadurch, dass die für die CD44-Selektion eingesetzte Ausgangspopulation durch einen vorangestellten Aufreinigungsschritt mithilfe einer Gradientensedimentation (*Cancer Cell Isolation Kit*) und durch Depletion muriner und nektrotischer Zellen (*Lineage Depletion Kit*) aus stark angereicherten Tumorzellen besteht. In vielen Publikationen werden die Krebsstammzellen ohne diesen Aufreinigungsschritt aus einer Mischung von Zellpopulationen mit unterschiedlichen tumorigenen oder nicht tumorigenen Eigenschaften isoliert, sodass die depletierten Zellen wenig tumorigen erscheinen.

Ein weiterer Grund ist eine Kontamination von $CD44^{hoch}$-Zellen in der $CD44^{niedrig}$-Fraktion durch die technische Limitierung der Anreicherungsprozedur. Bestätigt wird diese Annahme durch die FACS-Analysen der CD44/CD24-Doppelfärbung oder des Aldefluor-Tests, die zeigen, dass eine vollständige Trennung zwischen $CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}$-Population und $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$-Population nicht erreicht wurde. Geht man davon aus das 10 $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$-Zellen für eine Tumorbildung ausreichend sind und die Depletion der $CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}$-Population nur zu 80-90 % effektiv war, dann ist anzunehmen, dass 100 Zellen der $CD44^{niedrig}/CD24^{niedrig}$-Fraktion durch die daraus resultierende 10-20 %ige Kontamination einen Tumor initiieren können.

Als weitere Quelle für Krebsstammzellen wurden kolorektale Tumor-initiierende Zellen aus humanen Tumorbiopsien verwendet, die in serumfreiem Medium unter Zusatz von Wachstumsfaktoren über einen längeren Zeitraum kultiviert werden können. Diese Zellen zeichneten sich, wie auch die aus den Xenografts isolierten $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$-Zellen, durch eine starke Kolonieformation in Soft Agar-Experimenten, durch eine hohe Tumorigenität *in vivo*, durch eine multizelluläre Sphärenbildung *in vitro* und durch die Expression eines ganzen Panels an bekannten Krebsstammzellmarkern, wie unter anderem EpCAM, CD133, CD166, ABCG2, CD44v6 und CD44, aus. In den PKH26-Färbungsexperimenten zeigten die Zellen *in vivo* Selbsterneuerungsfähigkeiten durch Vorhandensein einer kleinen sich langsam teilenden Subpopulation an $PKH26^{+}$-Zellen innerhalb des Tumors; unter Differenzierungsbedingungen *in vitro* zeigten sie das Potential, eine Vielzahl an schnell teilenden differenzierenden Progenitorzellen mit epithelial-ähnlichem Phänotyp auszubilden.

6.2 EpCAM als geeignetes Zielantigen für eine Immuntherapie gegen Tumor-initiierende Zellen

In der vorliegenden Arbeit konnte die vollständige Eliminierung von $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$ Tumor-initiierenden Zellen aus HT-29-Xenograftgewebe einerseits und den aus humanen Tumorgeweben isolierten $CD133^{+}$ Tumor-initiierenden Zellen andererseits mittels des EpCAM/CD3-bispezifischen Antikörpers MT110 *in vitro* demonstriert werden.

Durch die Kombination aus herkömmlichem Zytoxizitätsexperiment und einem auf Soft-Agar basierenden Koloniebildungsexperiment als Ausleseverfahren konnte die Tumorbildungsfähigkeit einzelner Zellen visualisiert werden. Theoretisch hat bereits eine einzelne Krebsstammzelle das Potential, einen Tumor neu zu bilden, was jüngst für kolorektale CSCs [106] und für Melanom-Zellen [107] gezeigt werden konnte. Deshalb war es von entscheidender Bedeutung, dass jede Zelle mit Krebsstammzell-eigenschaften eliminiert werden kann. Dass Soft Agar-Kolonien tatsächlich das richtige Ausleseverfahren zur Erfassung einzelner Krebsstammzellen darstellen, wurde durch die Verpflanzung einer einzelnen Kolonie in NOD/SCID-Mäuse gezeigt. Tatsächlich initiierten 50 % der einzeln inokulierten Kolonien einen Tumor und zeigten darüber

hinaus durch Bildung von Lymphknotenmetastasen äußerst invasive Eigenschaften. Dies zeigt, dass sich das Auszählen der Kolonien als Mittel zur quantitativen Erfassung von Krebsstammzellen eignet.

Die vollständige Lyse der kolorektalen TICs wurde bereits mit 1 ng/ml (18 pM) MT110 erreicht. Durch eine längere Behandlung mit MT110 im Zytotoxizitäts-experiment konnten auch geringere Antikörperkonzentrationen und eine geringere Effektorzellanzahl zu einer vollständigen Lyse führen. Ein Grund ist, dass bei längeren Inkubationszeiten die T-Zellen proliferieren können und die zusätzlichen Zellen ebenfalls zur Eliminierung beitragen. Des Weiteren können die Effektorzellen in Anwesenheit von BiTEs auch mehrere Zielzellen nacheinander lysieren, was die Reaktion stark zeitabhängig macht. Hoffmann *et al.* konnten zeigen, dass eine T-Zelle im Beisein eines BiTE-Antikörpers (Blinatumomab) innerhalb von neun Stunden fünf Lymphomzellen nacheinander lysieren konnte bei einer Verweilzeit von 22-97 min pro Zielzelle [99].

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass isolierte und stimulierte $CD8^+$ T-Zellen und unstimulierte PBMCs gleich effektiv bei der Lyse von TICs waren. Unstimulierte PBMCs enthalten durchschnittlich 15-20 % $CD8^+$ T-Zellen. Da die Lyse mit PBMCs aber nicht fünfmal geringer ausfiel, legt nahe, dass weitere T-Zellpopulationen in den PBMCs ebenfalls an der MT110-vermittelten Lyse von Krebsstammzellen beteiligt sind. In einer *in vitro*-Zytotoxizitätsstudie wurde gezeigt, dass auch $CD4^+$ T-Zellen bei der Zelllyse mit MT110 mit einer verzögerten Kinetik im Vergleich zu $CD8^+$ T-Zellen eine Aktivität aufwiesen [101]. Während $CD8^+$ T-Zellen bereits nach 4 h und 8 h eine 5-10 %ige MT110-vermittelte Zelllyse verursachten, erreichten $CD4^+$ T-Zellen nach 21 h eine 20 %ige Zelllyse. Darüber hinaus zeigen neueste auf dem AACR Kongress 2009 vorgestellte Ergebnisse, dass γ/δ T-Zellen und NK-Zellen mit einer geringeren Potenz im Vergleich zu α/β $CD8^+$ T-Zellen ebenfalls Zielzellen MT110-vermittelt eliminieren können [118].

Im Xenograftmodell mit NOD/SCID-Mäusen konnte MT110 bei Injektion eines 5000-fachen der minimal-tumorigenen Anzahl von TICs ein Tumorwachstum vollständig verhindern. Mäuse, deren kolorektale TICs aus humanem Tumorgewebe zusammen mit PBMCs injiziert worden waren und eine Tagesdosis von 50 µg/kg und 500 µg/kg MT110

12-tägig erhalten hatten, zeigten während einer Beobachtungszeit von 246 Tagen keine Tumorbildung. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit $CD44^{hoch}/CD24^{hoch}$ Xenograft-Tumorzellen erzielt. In einem zweiten Mausmodell mit etablierten Tumoren, die durch TICs verursacht wurden, führte eine Behandlung mit 2,5 mg/kg/Tag MT110 bis zum Ende der Beobachtungszeit zu einer vollständigen Tumorremission.

Dieser besondere Wirkungsmechanismus von MT110 über die T-Zell-vermittelte Zelllyse scheint nicht nur gegen die Tumormasse solider Tumore gerichtet zu sein, sondern kann auch das Tumorwachstum der 5000-fachen Menge der minimal-tumorigenen Anzahl von TICs nachhaltig in Xenograftmodellen unterbinden. Diese vielversprechenden Ergebnisse verheißen ein gutes klinisches Potential für den zurzeit in der Dosisfindungsstudie eingesetzten Antikörper MT110. Die klinische Wirksamkeit dieses neuen therapeutischen Prinzips der BiTE-Moleküle wurde mit dem CD19/CD3-spezifischen Antikörper Blinatumomab bei der Behandlung von Lymphom-Patienten erfolgreich gezeigt. Bei rückfälligen Non-Hodgkin-Lymphompatienten führte eine Monotherapie zu einer partiellen oder vollständigen Therapieantwort [119].

6.3 Überlistung der Schutzmechanismen von Krebsstammzellen

Die kolorektalen TICs besitzen Mutationen in *KRAS*- und PI3-Kinase-Genen, sodass eine Behandlung mit anti-EGFR Antikörpern wie zum Beispiel Panitumumab oder Cetuximab [111, 120], die bei metastasierten Darmkarzinomen eingesetzt werden, wenig erfolgversprechend ist. Der Grund ist, dass KRAS und PIK3CA, die vom membranständigen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) gesteuert werden, bei einer Genmutation konstitutiv aktiviert sind, auch wenn der EGFR-Rezeptor durch die Antikörper blockiert wird. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Mutationen in den Signalproteinen des EGFR-Signalwegs die EpCAM-spezifische Zelllyse durch zytotoxische T-Zellen nicht zu beeinträchtigen scheinen. Die Anti-EGFR Antikörper Panitumumab und Cetuximab zielen darauf ab, durch Targetbindung eine Signalinhibierung zu verursachen. BiTE-Antikörper hingegen vermitteln den Kontakt zwischen Targetzelle und T-Zelle, welche nach Ausbildung einer immunologischen Synapse eine Targetzelllyse auslösen. Diese Art der Antikörpertherapie scheint für die Eliminierung von Krebsstammzellen sehr geeignet zu sein.

Zytotoxische T-Zellen sind die wirkungsvollsten Effektorzellen in der adaptiven Immunantwort und sind für die Eliminierung von virusinfizierten wie auch malignen Zellen zuständig [121]. Sie patrouillieren unentwegt durch den Körper auf der Suche nach Zielzellen, die Peptidantigene in Verbindung mit dem Histokompatibilitätskomplex (MHC-I) auf ihren Oberflächen präsentieren, die von T-Zell-Rezeptoren erkannt werden. Nach Antigenerkennung unter Mitwirkung von kostimulierenden Molekülen werden spezifische T-Zellklone gebildet. Wie wichtig T-Zellen als Teil der Immunabwehr gegen Krebs sind, zeigt, dass Patienten mit Organtransplantaten, die eine verminderte T-Zell-Funktion durch Immunsupressiva haben, ein 3-fach höheres Krebsrisiko aufweisen [122].

Krebsstammzellen können gezielt die Aktivierung und Proliferation spezifischer T-Zellklone durch verschiedene Wege inhibieren oder deren Apoptose auslösen [123]. So zeigten die Glioma-assoziierten Krebsstammzellen eine Repression kostimulativer Moleküle, wie CD40 und CD80, was zu einer T-Zell Anergie führen kann [124]. Zudem zwangen sie T-Zellen durch B7-H1-vermittelten Zell-Zell-Kontakt und Galectin-3 Sekretion in die Apoptose. Außerdem induzierten sie durch TGF-β Sezernierung die Umwandlung von $CD4^+$ T-Zellen in $CD4^+/CD25^+$ T-regulatorische (T_{reg}) Zellen [123]. T_{reg}-Zellen unterdrücken die Aktivierung des Immunsystems und verhindern durch Regulierung der Selbsttoleranz des Immunsystems die Entstehung von Autoimmunkrankheiten. Sie sind auch an der Limitierung der Immunantwort gegen Fremdantigene und körpereigene Tumorzellen beteiligt und unterstützen somit das Tumorwachstum. Dies ist bekannt durch Mausstudien, in denen die Depletion von T_{reg}-Zellen durch anti-CD25 Antikörper [125] oder durch Wirkstoffe wie Cyclophosphamid [126] zu einer Anti-Tumor-Antwort führte.

Diese Schutzmechanismen der Krebsstammzellen gegen spezifische T-Zellantworten können durch die Umgehung der herkömmlichen T-Zell-Aktivierung der BiTE-Moleküle umgangen werden. Außerdem konnte in Mausexperimenten mit dem mausspezifischen MT110-Surrogat muS110 gezeigt werden, dass es während der BiTE-Behandlung zwar zu einer Expansion von T_{reg}-Zellen kam, diese jedoch keinen Einfluss auf die muS110-vermittelte Lyse der $EpCAM^+$-Zielzellen hatten [100].

Die oben genannten Eigenschaften prädestinieren MT110 für eine gegen Krebsstammzellen gerichtete Immuntherapie. So könnte eine Kombinationstherapie von

MT110 mit einer Standard-Krebsbehandlung oder eine Anschlusstherapie mit MT110 eine Tumorbehandlung weiter optimieren. Während Zytostatika die schnell proliferierende große Tumormasse beseitigen, könnten therapieresistente Krebsstammzellen oder zirkulierende Tumorzellen durch eine Behandlung mit MT110 eliminiert werden. Das Risiko einer Neuerkrankung könnte somit deutlich vermindert werden.

6.4 Das therapeutische Fenster einer anti-EpCAM Therapie

Berechtigterweise stellt sich die Frage, welche Auswirkungen eine gegen EpCAM gerichtete Therapie auf gesunde Zellen und Stammzellen hat, die ebenfalls EpCAM exprimieren. In adulten Geweben ist EpCAM auf nahezu allen gesunden Epithelien exprimiert, mit Ausnahme der Zellen in der proliferierenden Basalzellschicht in Plattenepithelien [57, 127]. Außerdem wird EpCAM in embryonalen und adulten Stammzellen exprimiert, da es essentiell an Prozessen der Entwicklung und Morphogenese beteiligt ist [128, 129].

Studien haben gezeigt, dass EpCAM auf normalen Geweben mit anderen Proteinen, wie Tetraspanin CD9, Claudin-7 und CD44, auf der Zellmembran in cholesterinreichen Membranmikrodomänen einen Komplex bildet [130-132]. Außerdem sind normale epitheliale Zellen in eine extrazelluläre Matrix eingebettet und sind mit einer Basalmembran versehen, sodass diese in einem sehr engen Zellverband vorliegen. Der Zugang zu EpCAM durch Antikörper oder T-Zellen wird somit erschwert (Abb. 41).

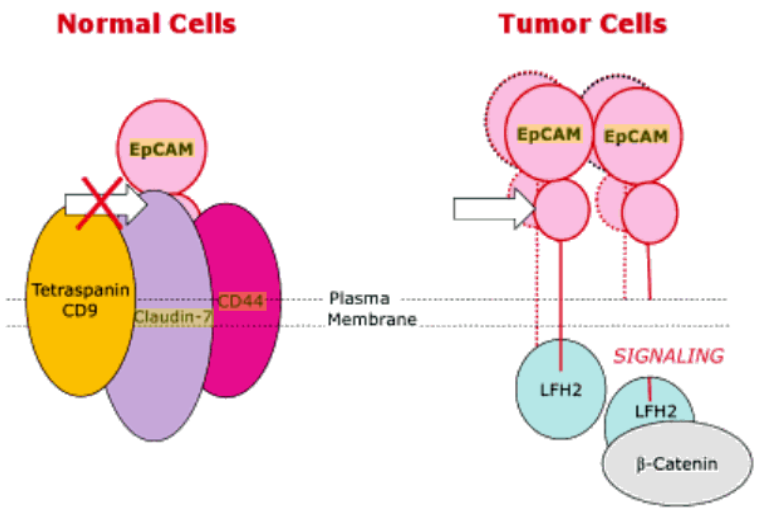

Abb. 41 Die Zugänglichkeit von EpCAM auf normalen und malignen Zellen, entnommen aus [133]. Auf normalen Zellen liegt EpCAM mit anderen Proteinpartnern, wie CD9, Claudin-7 und CD44, in einem festen Verbund. Der Pfeil deutet das Epitop an, das in dieser Konstellation nicht erreichbar ist. In Tumorzellen kann die Überexpression von EpCAM zu einer reduzierten Interaktion von EpCAM mit den Proteinpartnern führen und dadurch den Zugang zu bestimmten Epitopen von EpCAM für Anti-EpCAM Antikörper wie MT110 ermöglichen.

Während der Karzinogenese kann es zu einer Überexpression von EpCAM auf Tumorzellen führen. Bestimmte Epitope von EpCAM, die in normalen Zellen nicht erreichbar waren, können durch die Überexpression und die damit einhergehende verminderte Interaktion der Proteinpartner freigelegt werden. In Tumorgeweben führen von Tumorzellen sezernierte Proteasen, beispielsweise Metalloproteasen, zu einer Degradation der extrazellulären Matrix und zu einem Verlust von Tight Junctions, was die Erreichbarkeit von EpCAM auf Tumorzellen für das BiTE-Molekül und die T-Zellen weiter erhöht.

Amann *et al.* konnten zeigen, dass eine Behandlung mit dem muEpCAM/muCD3-bispezifischen Maus-Surrogat muS110 gesundes EpCAM-exprimierendes Gewebe nicht beschädigt, während hingegen EpCAM-positive Tumore gehemmt wurden [134]. Histopathologische Proben von Mäusen, die 35 Tage lang mit einer hohen Dosis von 100 µg/kg/Tag muS110 behandelt wurden, wiesen keine Läsionen in normalen EpCAM exprimierenden Geweben auf, was darauf hinweist, dass normales Gewebe für die muS110-aktivierten T-Zellen nicht erreichbar ist.

Vorrausetzung für diesen Vergleich ist, dass EpCAM auf murinen und humanen Geweben ähnlich exprimiert wird und muS110 und MT110 gleiche Bindungsaffinitäten zu ihren Bindungspartnern aufweisen. Das humane und das murine EpCAM zeigen eine hohe Homologie von 82 % [135] und weisen in der Tat zwischen humanen und murinen Geweben fast identische Expressionsmuster auf mit Ausnahme der Nebennieren und Hoden [136]. Eine Expression des murinen EpCAMs ist auch auf embryonalen Stammzellen gefunden worden [128], was eine gleiche funktionale Bedeutung von EpCAM für Maus und Menschen nahelegt. Die Antikörper muS110 und MT110 binden mit der gleichen Affinität an gleiche Subdomänen ihrer jeweiligen EpCAM-Moleküle, sodass anzunehmen ist, dass die Befunde in Mäusen bezüglich der Verträglichkeit von muS110 auf MT110 in Menschen übertragbar sind.

6.5 EpCAM-Inhibierung in kolorektalen Tumor-initiierenden Zellen

Bisher konnte noch keine Antwort auf die Frage gefunden werden, welchen Einfluss EpCAM auf die Migration und Invasion von Tumorzellen insbesondere der Krebsstammzellen hat. Durch Inhibierung von EpCAM mittels RNA-Interferenz in kolorektalen Tumor-initiierenden Zellen sollten die molekularen Zusammenhänge zwischen EpCAM und der Karzinogenese respektive des Metastasierungspotentials von Krebsstammzellen untersucht werden.

In der Fachliteratur sind zurzeit kontroverse Ergebnisse zum Thema EpCAM und Metastasenbildung zu finden. Einerseits wird von disseminierten Tumorzellen berichtet, die EpCAM überexprimieren, andererseits gibt es invasive Tumorzellen, die EpCAM herunterreguliert haben (Kapitel 2.7.3). Es gibt jedoch viele überzeugende Daten, die für die Annahme sprechen, dass die EpCAM-Expression mit der Metastasierungsrate korreliert. Zum Beispiel führte in Brustkrebszelllinien EpCAM-Inhibierung durch RNA-Interferenz zu einer Reduktion der Proliferation, Migration und Invasion [74]. Bestätigt wurde dies durch die Ergebnisse von Sankpal *et al.*, die im umgekehrten Sinne zeigten, dass das Tumorsuppressorprotein p53 die Expression von EpCAM inhibiert und somit auch die Invasion von Brustkrebszellen hemmt [137]. Bei der Untersuchung von 150 Lebertumorproben stellte sich heraus, dass die erhöhte EpCAM-Expression mit einer wesentlich kürzeren Überlebensrate korrelierte und

EpCAM$^+$-Zellen mit einer höheren Frequenz in die Pfortader einwanderten als EpCAM$^-$-Zellen. Zudem wurde festgestellt, dass EpCAM an der invasiven Außengrenze des Tumors überexprimiert war. In Xenograftmodellen konnten EpCAM$^+$-Zellen isoliert aus Lebertumorzelllinien sehr effizient das Wachstum von invasiven Tumoren initiieren, im Gegensatz zu Tumorzellen ohne EpCAM-Expression [138].

Nach heutigem Kenntnisstand wird für die Entstehung von Metastasen die epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) bei Tumorzellen insbesondere bei Krebsstammzellen verantwortlich gemacht, die der Schlüsselmechanismus für entscheidende zelluläre Veränderungen, wie zum Beispiel die Zerstörung der Zell-Zell-Kontakte, Aufhebung der Zellpolarität und Reorganisation des Zytoskeletts während der Invasion und Metastasierung von soliden Tumoren, ist [44].

Mit dem Wissen, dass Tumorzellen mit einer erhöhten EpCAM-Expression ein erhöhtes durch EMT hervorgerufenes Potential zur Metastasierung haben, stellt sich die Frage, ob EpCAM direkt oder indirekt in die EMT eingreift. Des Weiteren ist bekannt, dass es migrierende oder mobile Krebsstammzellen gibt, in denen EMT aktiviert ist, und die in entfernten Geweben Metastasen bilden können.

In der Tat würde die Hypothese der mobilen Krebsstammzellen erklären, warum die heterogene Morphologie des primären Tumors in den Sekundärtumoren wiederhergestellt wird und warum es in vielen Fällen nach einer Chemotherapie zu einer Remission der Krebserkrankung oder Metastasenbildung kommt [43]. Mani *et al.* berichteten zum Beispiel von CD44$^+$/CD24$^-$ Tumor-initiierenden Brustkrebszellen, die typische mit der EMT assoziierte Marker, wie unter anderem auch Vimentin, Fibronektin, TWIST, SNAIL1 und SLUG, im Vergleich zu CD44$^-$/CD24$^+$-Zellen überexprimierten und E-Cadherin reprimierten [50]. Hermann *et al.* zeigten, dass es in der invasiven Front von Pankreastumoren eine distinkte Population von CD133$^+$/CXCR4$^+$-Krebsstammzellen gibt, die essentiell für die Metastasenbildung sind [39]. Vor dem oben diskutierten Hintergrund stellt sich die Frage, ob EpCAM explizit in Krebsstammzellen Einfluss auf die EMT hat.

Mittels shRNA-exprimierender lentiviraler Partikel gegen humanes EpCAM wurden in dieser Arbeit Transduktanten hergestellt, die eine bis zu 92 %ige Reduktion der Oberflächenmoleküle von EpCAM aufwiesen. Diese zeichneten sich *in vitro* durch einen mehr epithelialen Phänotyp aus und zeigten eine verminderte Proliferation,

gemessen an ihrer 2,5-fach geringeren Kolonienanzahl im Soft Agar und 3,7-fach niedrigeren Zellzahl im Vergleich zu den nonsense shRNA-exprimierenden Zellen. In NOD/SCID-Mäusen konnten 500 der EpCAM-reprimierten Tumor-initiierenden Zellen keine Tumore mehr bilden; bei 1 000 dieser Zellen entstanden Tumore, die jedoch achtmal kleiner waren als die Tumore, die durch 1 000 nonsense shRNA-exprimierende Tumor-initiierende Zellen verursacht wurden.

Dieser Versuch zeigt, dass TICs mit einer verminderten EpCAM-Expression in ihrer Tumorprogression und in ihrer Tumorigenität eingeschränkt sind. Die Migrationsfähigkeit ist ebenfalls beeinträchtigt, was im Wundheilungsversuch gezeigt werden konnte.

All diese Ergebnisse zeigen, dass EpCAM maßgeblich an der Karzinogenese und Migrationsfähigkeit von Krebsstammzellen beteiligt ist und unterstreichen die Rolle von EpCAM als wichtigen Tumor- und Krebsstammzellmarker.

Auf der Suche nach EpCAM-assoziierten Genen konnte in dieser Arbeit erstmals auf mRNA-Ebene gezeigt werden, dass die EpCAM-Inhibierung durch die Herunterregulierung des EMT-Aktivators SLUG und der mesenchymalen Marker, wie Vimentin und Fibronektin, und durch die Hochregulierung von mit Adhärenz-Verbindungen assoziierten Genen, wie E-Cadherin mit der EMT in Zusammenhang steht. SLUG, auch bekannt als SNAI2, ist ein Mitglied der Superfamilie der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren und spielt eine wichtige Rolle in der Induktion des EMT bei der Embryogenese und der Tumorbildung, in dem es als Transkriptionsrepressor für Gene agiert, deren Moleküle an Zell-Zell-Adhäsionen beteiligt sind [139]. Viele an unterschiedlichen Signalwegen beteiligte Moleküle, wie EGF, FGF, Wnt, TGF-β, BMP, HIF, Notch, PTH, Integrine und SCF/c-Kit, können bei der Geninduktion der Slug-Familie beteiligt sein [140]. Doch besonders richtungsweisend für diese Arbeit ist die Beobachtung, dass SLUG durch TCF/LEF-1 und β-Catenin reguliert wird. Es wurden im SLUG-Gen sechs potentielle Konsensus-Bindestellen für den β-Catenin Komplex gefunden und in Immunoprezipitationsversuchen gezeigt, dass TCF/LEF-Faktoren für die Promotoraktivität des SLUG-Gens notwendig sind [140, 141].

Die intrazelluläre EpCAM-Domäne, die durch proteolytische Spaltung ins Zytosol freigesetzt wird, benötigt neben dem Adapterprotein FHL2 ebenfalls β-Catenin,

um im Kern an den Transkriptionsfaktor TCF/LEF binden zu können und die Transkription von c-Myc und Zytokinen in Gang zu setzen [80].

Es ist daher möglich, dass durch die gemeinsame Nutzung von β-Catenin und TCF/LEF bei einer Hochregulierung von EpCAM nicht nur die Expression der EpCAM-Zielgene, sondern auch die Expression von wichtigen EMT-Aktivatoren, wie beispielsweise SLUG, resultiert. Denn diese Annahme würde erklären, dass im umgekehrten Sinne durch EpCAM-Repression auch die Expression von EMT-Markern, wie z.B. SLUG, abnimmt, was in dieser Arbeit beobachtet wurde. Die Bereitstellung von freiem β-Catenin, das in den Nukleus transloziert, um dort den TCF/LEF-Faktor zu aktivieren, könnte durch EpCAM selbst erfolgen. EpCAM vermindert bei einer Überexpression die E-Cadherin-vermittelten Adhäsionen [60]. Da E-Cadherin intrazellular über seinen zytoplasmatischen Schwanz mit α- und β-Catenin assoziiert ist, werden Catenine bei einer EpCAM-Überexpression freigesetzt. Während die Menge an löslichem α-Catenin reduziert wird, bleibt die Menge an β-Catenin jedoch konstant [60]. Aus diesem Grund ist es ersichtlich, dass das freigesetzte β-Catenin im Zytosol akkumuliert und die Assoziation mit TCF/LEF-1 fördert, worauf der β-Catenin-TCF/LEF-1 Komplex in den Nukleus transloziert, um die Transkription von SLUG und anderen EMT-assoziierten Proteinen anzuschieben [142]. Gleiche Beobachtungen wurden gemacht, als die E-Cadherin-Interaktionen durch Einsatz von Antikörpern inhibiert wurden, was eine nukleäre Lokalisation von β-Catenin, Erhöhung der SLUG-Expression und Inhibierung von E-Cadherin zur Folge hatte [143].

SLUG wiederum bindet neben anderen Transkriptionsfaktoren wie SNAIL1 direkt an den E-Cadherin Promotor [139, 144] und inhibiert die Expression von E-Cadherin. Der Verlust von E-Cadherin führt dazu, dass noch eine größere Menge an β-Catenin in das Zytosol freigelassen wird, das vorher mit E-Cadherin und der Zytoplasmamembran vernetzt war [145]. Neben SLUG wird auch die Transkription der mesenchymalen Marker, wie dem intermediären Filament-Protein Vimentin und Fibronektin, durch das freigewordene zytosolische β-Catenin und TCF/LEF aktiviert [142, 146]. Der Verlust von E-Cadherin und die Expression von Vimentin und Fibronektin fördert letzten Endes das invasive und migratorische Verhalten von Tumorzellen.

In einem hypothetischen Modell (Abb. 42) soll die Verbindung zwischen der EpCAM-Signalkaskade und EMT-Initiation über β-Catenin erklärt werden.

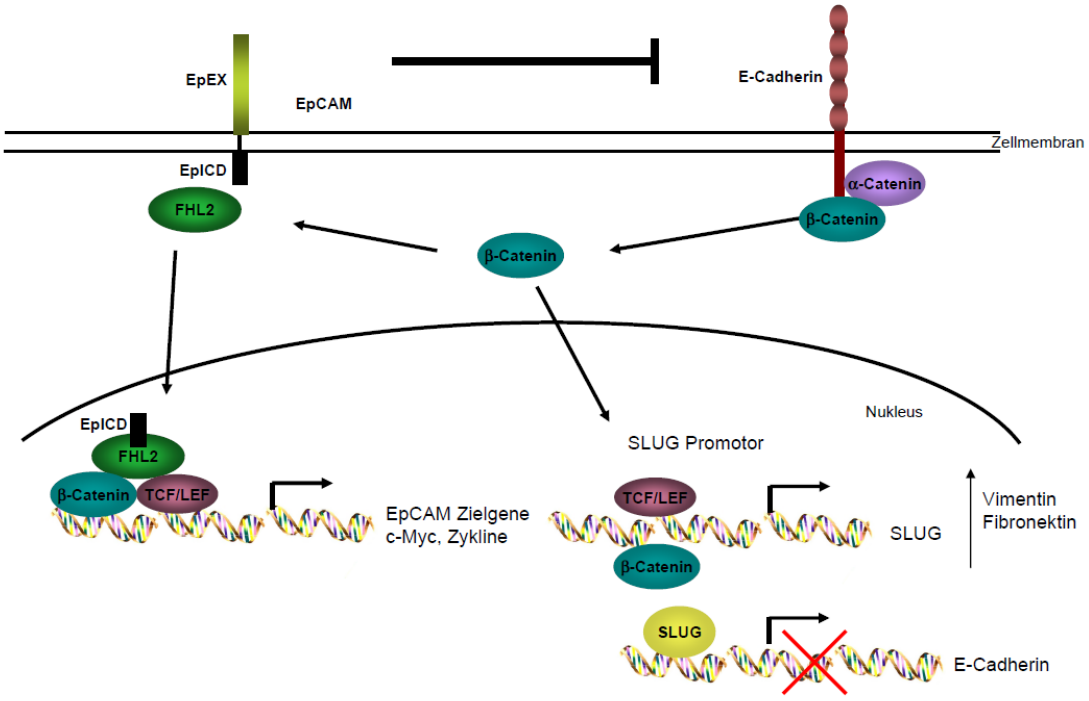

Abb. 42 Modell eines Zusammenhangs zwischen EpCAM-Expression und EMT-Initiation.
In kolorektalen Krebsstammzellen werden durch die Überexpression von EpCAM die E-Cadherin-vermittelten Zellkontakte gehemmt. Das ins Zytosol freigelassene β-Catenin akkumuliert und assoziiert mit der intrazellulären Domäne EpICD, FHL2 und TCF/LEF zu einem Transkriptionskomplex und aktiviert unter anderem die Transkription von c-Myc und Zyklinen. β-Catenin kann parallel dazu zusammen mit TCF/LEF die Transkription der EMT-Aktivatoren wie SLUG initiieren, SLUG wiederum hemmt die Transkription von E-Cadherin. Der Verlust von E-Cadherin führt zu einer weiteren Akkumulation von β-Catenin und Aktivierung weiterer EMT-assoziierter Gene, wie Vimentin und Fibronektin.

Anhand dieser aufgestellten Hypothese ist EpCAM durch die Verwendung von Signalmolekülen aus dem Wnt-Signalweg (FHL2, β-Catenin, TCF/LEF) nicht nur an der Karzinogenese von kolorektalen Krebsstammzellen beteiligt, sondern wirkt durch die Inhibierung von E-Cadherin-vermittelten Zellkontakten und Freisetzung von zytosolischem β-Catenin direkt bei der EMT-assoziierten Metastasenbildung mit. Der Zusammenhang zwischen β-Catenin und Metastasierung wird dadurch gestützt, dass

eine signifikante Korrelation zwischen zytoplasmatischer β-Catenin-Akkumulation und hämatogenen Metastasen in humanen kolorektalen Tumoren gefunden wurde [147].

Um diese aufgestellte Hypothese zu festigen, bedarf es jedoch noch weiterer Versuche. Es muss geklärt werden, ob EpCAM über den β-Catenin-TCF/LEF-1 Komplex direkten Einfluss auf die Transkription EMT-assoziierter Gene hat oder ob es sich hierbei um einen sekundären Effekt der EpCAM-Hemmung handelt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, ob eine Transkription von SLUG auch über EpICD/β-Catenin/LEF-1 Kernkomplexe induziert werden kann. In diesem Kontext aufschlussreich wäre die Antwort auf die Frage, ob die beobachteten Lymphknotenmetastasen in NOD/SCID-Mäusen, die nach der Verpflanzung von einer oder zehn Soft Agar-Kolonien aus kolorektalen Tumor-initiierenden Zellen zu beobachten waren, ebenfalls durch Kolonien aus EpCAM-reprimierten Tumor-initiierenden Zellen entstehen.

7 Abkürzungsverzeichnis

α	anti
AK	Antikörper
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
AS	Aminosäure
Bisacrylamid	N,N'-Methylen-Bisacrylamid
BiTE	Bispecific T Cell Engager
BSA	Bovines (Rinder) Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
CFU	koloniebildende Einheit
CSC	Krebsstammzelle
C-Terminus	Carboxyterminus
DMEM	DULBECCOs Modified EAGLE Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E:T	Effektor zu Target
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transformation
EpCAM	Epitheliales Zelladhesionsmolekül
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc	konstantes Fragment des Antikörpers
FCS	fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
HEPES	N'-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure
hu	human
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex

Abkürzungsverzeichnis

MOI	Multiplicity of Infection
mu	murin
N-Terminus	Aminoterminus
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s.c.	subkutan
scFv	Single-chain antibody Fragments variable
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
shRNA	Small Hairpin RNA
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF-β	Tumor Growth Factor β
TIC	Tumor-initiierende Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
V	Volt
V_H oder V_L	variable Domänen der schweren oder leichten Kette

Alle nicht in dieser Arbeit aufgeführten Einheiten sind SI- beziehungsweise erweiterte SI-Einheiten

8 Literaturverzeichnis

1. Zentrum für Krebsregisterdaten, R.-K.-I., *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland 1990-2010*. 2010.
2. Burt, R.W., J.A. DiSario, and L. Cannon-Albright, *Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk.* Annu Rev Med, 1995. **46**: p. 371-9.
3. Klonisch, T., et al., *Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications.* Trends Mol Med, 2008. **14**(10): p. 450-60.
4. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control.* Nat Med, 2004. **10**(8): p. 789-99.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
6. Malumbres, M. and M. Barbacid, *RAS oncogenes: the first 30 years.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 459-65.
7. Chen, P.L., et al., *Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene.* Science, 1990. **250**(4987): p. 1576-80.
8. Kosinski, C., et al., *Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(39): p. 15418-23.
9. Kinzler, K.W., et al., *Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21.* Science, 1991. **253**(5020): p. 661-5.
10. Markowitz, S.D. and M.M. Bertagnolli, *Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer.* N Engl J Med, 2009. **361**(25): p. 2449-60.
11. Janssen, K.P., et al., *Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice.* Gastroenterology, 2002. **123**(2): p. 492-504.
12. O'Brien, C.A., et al., *A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice.* Nature, 2007. **445**(7123): p. 106-10.
13. Dalerba, P., et al., *Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(24): p. 10158-63.
14. Ricci-Vitiani, L., et al., *Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells.* Nature, 2007. **445**(7123): p. 111-5.
15. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell.* Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
16. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
17. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells.* Nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
18. Li, C., et al., *Identification of pancreatic cancer stem cells.* Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 1030-7.
19. Ceder, J.A., et al., *The characterization of epithelial and stromal subsets of candidate stem/progenitor cells in the human adult prostate.* Eur Urol, 2008. **53**(3): p. 524-31.
20. Ferrandina, G., et al., *Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer.* Int J Gynecol Cancer, 2008. **18**(3): p. 506-14.

21. Seigel, G.M., et al., *Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma.* Mol Vis, 2005. **11**: p. 729-37.
22. Prince, M.E., et al., *Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 973-8.
23. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells.* Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
24. Al-Hajj, M. and M.F. Clarke, *Self-renewal and solid tumor stem cells.* Oncogene, 2004. **23**(43): p. 7274-82.
25. Eyler, C.E. and J.N. Rich, *Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis.* J Clin Oncol, 2008. **26**(17): p. 2839-45.
26. Domen, J., K.L. Gandy, and I.L. Weissman, *Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation.* Blood, 1998. **91**(7): p. 2272-82.
27. Kim, M., et al., *The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells.* Clin Cancer Res, 2002. **8**(1): p. 22-8.
28. Douville, J., R. Beaulieu, and D. Balicki, *ALDH1 as a Functional Marker of Cancer Stem and Progenitor Cells.* Stem Cells Dev, 2008.
29. Marhaba, R. and M. Zoller, *CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation.* J Mol Histol, 2004. **35**(3): p. 211-31.
30. Gunthert, U., et al., *A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells.* Cell, 1991. **65**(1): p. 13-24.
31. Wielenga, V.J., et al., *Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression.* Cancer Res, 1993. **53**(20): p. 4754-6.
32. Shmelkov, S.V., et al., *CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors.* J Clin Invest, 2008. **118**(6): p. 2111-20.
33. Sagiv, E., et al., *CD24 is a new oncogene, early at the multistep process of colorectal cancer carcinogenesis.* Gastroenterology, 2006. **131**(2): p. 630-9.
34. Yeung, T.M., et al., *Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines.* Proc Natl Acad Sci U S A. **107**(8): p. 3722-7.
35. Chen, Z.G., *The cancer stem cell concept in progression of head and neck cancer.* J Oncol, 2009. **2009**: p. 894064.
36. Patrawala, L., et al., *Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells.* Oncogene, 2006. **25**(12): p. 1696-708.
37. Ginestier, C., et al., *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome.* Cell Stem Cell, 2007. **1**(5): p. 555-67.
38. Chiou, S.H., et al., *Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma.* Clin Cancer Res, 2008. **14**(13): p. 4085-95.
39. Hermann, P.C., et al., *Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer.* Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 313-23.

40. Eramo, A., et al., *Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population.* Cell Death Differ, 2008. **15**(3): p. 504-14.
41. Patrawala, L., et al., *Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic.* Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6207-19.
42. Beier, D., et al., *CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles.* Cancer Res, 2007. **67**(9): p. 4010-5.
43. Brabletz, T., et al., *Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression.* Nat Rev Cancer, 2005. **5**(9): p. 744-9.
44. Christiansen, J.J. and A.K. Rajasekaran, *Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis.* Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8319-26.
45. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
46. Kim, K., Z. Lu, and E.D. Hay, *Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT.* Cell Biol Int, 2002. **26**(5): p. 463-76.
47. Peinado, H., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis.* Int J Dev Biol, 2004. **48**(5-6): p. 365-75.
48. Kang, Y. and J. Massague, *Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis.* Cell, 2004. **118**(3): p. 277-9.
49. Yang, J., et al., *Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis.* Cell, 2004. **117**(7): p. 927-39.
50. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells.* Cell, 2008. **133**(4): p. 704-15.
51. Sears, H.F., et al., *Effects of monoclonal antibody immunotherapy on patients with gastrointestinal adenocarcinoma.* J Biol Response Mod, 1984. **3**(2): p. 138-50.
52. Pauli, C., et al., *Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas.* Cancer Lett, 2003. **193**(1): p. 25-32.
53. Szala, S., et al., *Molecular cloning of cDNA for the carcinoma-associated antigen GA733-2.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(9): p. 3542-6.
54. Calabrese, G., et al., *Assignment of TACSTD1 (alias TROP1, M4S1) to human chromosome 2p21 and refinement of mapping of TACSTD2 (alias TROP2, M1S1) to human chromosome 1p32 by in situ hybridization.* Cytogenet Cell Genet, 2001. **92**(1-2): p. 164-5.
55. Linnenbach, A.J., et al., *Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(3): p. 1507-15.
56. Chong, J.M. and D.W. Speicher, *Determination of disulfide bond assignments and N-glycosylation sites of the human gastrointestinal carcinoma antigen GA733-2 (CO17-1A, EGP, KS1-4, KSA, and Ep-CAM).* J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5804-13.
57. Balzar, M., et al., *The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM).* J Mol Med, 1999. **77**(10): p. 699-712.

58. Lenarcic, B., et al., *Equistatin, a new inhibitor of cysteine proteinases from Actinia equina, is structurally related to thyroglobulin type-1 domain.* J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13899-903.
59. Balzar, M., et al., *Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(7): p. 2570-80.
60. Litvinov, S.V., et al., *Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins.* J Cell Biol, 1997. **139**(5): p. 1337-48.
61. Armstrong, A. and S.L. Eck, *EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen.* Cancer Biol Ther, 2003. **2**(4): p. 320-6.
62. Tarmann, T., et al., *Immunohistochemical detection of an epithelial membrane protein in rat embryos at different stages of development.* Acta Anat (Basel), 1990. **137**(2): p. 141-5.
63. Momburg, F., et al., *Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues.* Cancer Res, 1987. **47**(11): p. 2883-91.
64. Went, P., et al., *Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers.* Br J Cancer, 2006. **94**(1): p. 128-35.
65. Baeuerle, P.A. and O. Gires, *EpCAM (CD326) finding its role in cancer.* Br J Cancer, 2007. **96**(3): p. 417-23.
66. Yamashita, T., et al., *EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma.* Cancer Res, 2008. **68**(5): p. 1451-61.
67. Spizzo, G., et al., *Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer.* Gynecol Oncol, 2006. **103**(2): p. 483-8.
68. Prince, S., et al., *Expression of epithelial cell adhesion molecule in gallbladder carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables.* Am J Clin Pathol, 2008. **129**(3): p. 424-9.
69. Gastl, G., et al., *Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival.* Lancet, 2000. **356**(9246): p. 1981-2.
70. Fong, D., et al., *Ep-CAM expression in pancreatic and ampullary carcinomas: frequency and prognostic relevance.* J Clin Pathol, 2008. **61**(1): p. 31-5.
71. Munz, M., P.A. Baeuerle, and O. Gires, *The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling.* Cancer Res, 2009. **69**(14): p. 5627-9.
72. Gires, O., C.A. Klein, and P.A. Baeuerle, *On the abundance of EpCAM on cancer stem cells.* Nat Rev Cancer, 2009. **9**(2): p. 143; author reply 143.
73. Visvader, J.E. and G.J. Lindeman, *Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions.* Nat Rev Cancer, 2008. **8**(10): p. 755-68.
74. Osta, W.A., et al., *EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy.* Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5818-24.
75. Wurfel, J., et al., *Metastasis-association of the rat ortholog of the human epithelial glycoprotein antigen EGP314.* Oncogene, 1999. **18**(14): p. 2323-34.

76. Cimino, A., et al., *Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is overexpressed in breast cancer metastases.* Breast Cancer Res Treat, 2009.
77. Kuhn, S., et al., *A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression.* Mol Cancer Res, 2007. **5**(6): p. 553-67.
78. Rao, C.G., et al., *Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors.* Int J Oncol, 2005. **27**(1): p. 49-57.
79. Songun, I., et al., *Loss of Ep-CAM (CO17-1A) expression predicts survival in patients with gastric cancer.* Br J Cancer, 2005. **92**(9): p. 1767-72.
80. Maetzel, D., et al., *Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM.* Nat Cell Biol, 2009. **11**(2): p. 162-71.
81. Munz, M., et al., *The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation.* Oncogene, 2004. **23**(34): p. 5748-58.
82. Maaser, K. and J. Borlak, *A genome-wide expression analysis identifies a network of EpCAM-induced cell cycle regulators.* Br J Cancer, 2008. **99**(10): p. 1635-43.
83. Balzar, M., et al., *Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(8): p. 4833-43.
84. Chaudry, M.A., et al., *EpCAM an immunotherapeutic target for gastrointestinal malignancy: current experience and future challenges.* Br J Cancer, 2007. **96**(7): p. 1013-9.
85. Herlyn, M., et al., *Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(3): p. 1438-42.
86. Riethmuller, G., et al., *Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial.* J Clin Oncol, 1998. **16**(5): p. 1788-94.
87. Herlyn, D., et al., *Initial clinical evaluation of two murine IgG2a monoclonal antibodies for immunotherapy of gastrointestinal carcinoma.* Am J Clin Oncol, 1991. **14**(5): p. 371-8.
88. Naundorf, S., et al., *In vitro and in vivo activity of MT201, a fully human monoclonal antibody for pancarcinoma treatment.* Int J Cancer, 2002. **100**(1): p. 101-10.
89. Rabinovich, G.A., D. Gabrilovich, and E.M. Sotomayor, *Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells.* Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 267-96.
90. Huang, M., et al., *Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern.* Cancer Res, 1995. **55**(17): p. 3847-53.
91. Karcher, J., et al., *[Cytokine expression of transforming growth factor-beta2 and interleukin-10 in squamous cell carcinomas of the head and neck. Comparison of tissue expression and serum levels].* Hno, 1999. **47**(10): p. 879-84.
92. Thomas, D.A. and J. Massague, *TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance.* Cancer Cell, 2005. **8**(5): p. 369-80.
93. Bladergroen, B.A., et al., *Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin*

lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? Blood, 2002. **99**(1): p. 232-7.
94. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion.* Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
95. Cabrera, T., et al., *High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas.* Tissue Antigens, 1998. **52**(2): p. 114-23.
96. Brischwein, K., et al., *Strictly target cell-dependent activation of T cells by bispecific single-chain antibody constructs of the BiTE class.* J Immunother, 2007. **30**(8): p. 798-807.
97. Wolf, E., et al., *BiTEs: bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity.* Drug Discov Today, 2005. **10**(18): p. 1237-44.
98. Kufer, P., et al., *Minimal costimulatory requirements for T cell priming and TH1 differentiation: activation of naive human T lymphocytes by tumor cells armed with bifunctional antibody constructs.* Cancer Immun, 2001. **1**: p. 10.
99. Hoffmann, P., et al., *Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct.* Int J Cancer, 2005. **115**(1): p. 98-104.
100. Amann, M., et al., *Antitumor activity of an EpCAM/CD3-bispecific BiTE antibody during long-term treatment of mice in the absence of T-cell anergy and sustained cytokine release.* J Immunother, 2009. **32**(5): p. 452-64.
101. Brischwein, K., et al., *MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors.* Mol Immunol, 2006. **43**(8): p. 1129-43.
102. Charafe-Jauffret, E., et al., *Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature.* Cancer Res, 2009. **69**(4): p. 1302-13.
103. Chan, K.S., et al., *Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(33): p. 14016-21.
104. Zhang, S., et al., *Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors.* Cancer Res, 2008. **68**(11): p. 4311-20.
105. Todaro, M., et al., *Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4.* Cell Stem Cell, 2007. **1**(4): p. 389-402.
106. Vermeulen, L., et al., *Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13427-32.
107. Quintana, E., et al., *Efficient tumour formation by single human melanoma cells.* Nature, 2008. **456**(7222): p. 593-8.
108. Chen, H.C., et al., *Loss of E-cadherin expression correlates with poor differentiation and invasion into adjacent organs in gastric adenocarcinomas.* Cancer Lett, 2003. **201**(1): p. 97-106.
109. Kusumbe, A.P. and S.A. Bapat, *Cancer stem cells and aneuploid populations within developing tumors are the major determinants of tumor dormancy.* Cancer Res, 2009. **69**(24): p. 9245-53.
110. Fabian, A., et al., *Die hard: are cancer stem cells the Bruce Willises of tumor biology?* Cytometry A, 2009. **75**(1): p. 67-74.

111. Heinemann, V., et al., *Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR.* Cancer Treat Rev, 2009. **35**(3): p. 262-71.
112. Sartore-Bianchi, A., et al., *PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies.* Cancer Res, 2009. **69**(5): p. 1851-7.
113. Pantel, K. and R.H. Brakenhoff, *Dissecting the metastatic cascade.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(6): p. 448-56.
114. Lindhofer, H. *Elimination of cancer stem cells (CD133+/EpCAM+) from malignant ascites by the trifunctional antibody catumaxomab: Results from a pivotal phase II/III study*. in *ASCO Annual Meeting*. 2009.
115. Douglas, E.J., et al., *Array comparative genomic hybridization analysis of colorectal cancer cell lines and primary carcinomas.* Cancer Res, 2004. **64**(14): p. 4817-25.
116. Willson, J.K., et al., *Cell culture of human colon adenomas and carcinomas.* Cancer Res, 1987. **47**(10): p. 2704-13.
117. Jessani, N., et al., *Breast cancer cell lines grown in vivo: what goes in isn't always the same as what comes out.* Cell Cycle, 2005. **4**(2): p. 253-5.
118. Kischel, R. *Effector memory T cells make a major contribution to redirected target cell lysis by T cell-engaging BiTE antibody MT110*. in *AACR Meeting*. 2009. Denver.
119. Bargou, R., et al., *Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody.* Science, 2008. **321**(5891): p. 974-7.
120. Loupakis, F., et al., *PTEN Expression and KRAS Mutations on Primary Tumors and Metastases in the Prediction of Benefit From Cetuximab Plus Irinotecan for Patients With Metastatic Colorectal Cancer.* J Clin Oncol, 2009.
121. Boon, T., et al., *Tumor antigens recognized by T lymphocytes.* Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 337-65.
122. Vajdic, C.M. and M.T. van Leeuwen, *Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation.* Int J Cancer, 2009. **125**(8): p. 1747-54.
123. Wei, J., et al., *Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression.* Clin Cancer Res. **16**(2): p. 461-73.
124. Gomez, G.G. and C.A. Kruse, *Mechanisms of malignant glioma immune resistance and sources of immunosuppression.* Gene Ther Mol Biol, 2006. **10**(A): p. 133-146.
125. Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi, *Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity.* J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5211-8.
126. North, R.J., *Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells.* J Exp Med, 1982. **155**(4): p. 1063-74.
127. Litvinov, S.V., et al., *Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation.* Am J Pathol, 1996. **148**(3): p. 865-75.
128. Anderson, R., et al., *Expression of the homophilic adhesion molecule, Ep-CAM, in the mammalian germ line.* J Reprod Fertil, 1999. **116**(2): p. 379-84.
129. Trzpis, M., et al., *EpCAM in morphogenesis.* Front Biosci, 2008. **13**: p. 5050-5.

130. Le Naour, F., et al., *Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells.* Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(5): p. 845-57.
131. Schmidt, D.S., et al., *CD44 variant isoforms associate with tetraspanins and EpCAM.* Exp Cell Res, 2004. **297**(2): p. 329-47.
132. Ladwein, M., et al., *The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7.* Exp Cell Res, 2005. **309**(2): p. 345-57.
133. Olivier Gires, B.S., *Tumor-Associated Antigens*. 2009: Wiley-Blackwell.
134. Amann, M., et al., *Therapeutic window of an EpCAM/CD3-specific BiTE antibody in mice is determined by a subpopulation of EpCAM-expressing lymphocytes that is absent in humans.* Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(1): p. 95-109.
135. Bergsagel, P.L., et al., *A murine cDNA encodes a pan-epithelial glycoprotein that is also expressed on plasma cells.* J Immunol, 1992. **148**(2): p. 590-6.
136. Amann, M., et al., *Therapeutic window of MuS110, a single-chain antibody construct bispecific for murine EpCAM and murine CD3.* Cancer Res, 2008. **68**(1): p. 143-51.
137. Sankpal, N.V., et al., *Transcriptional repression of epithelial cell adhesion molecule contributes to p53 control of breast cancer invasion.* Cancer Res, 2009. **69**(3): p. 753-7.
138. Terris, B., C. Cavard, and C. Perret, *EpCAM, a new marker for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma.* J Hepatol. **52**(2): p. 280-1.
139. Hajra, K.M., D.Y. Chen, and E.R. Fearon, *The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer.* Cancer Res, 2002. **62**(6): p. 1613-8.
140. Lambertini, E., et al., *SLUG: a new target of lymphoid enhancer factor-1 in human osteoblasts.* BMC Mol Biol. **11**: p. 13.
141. Sakai, D., et al., *Regulation of Slug transcription in embryonic ectoderm by beta-catenin-Lef/Tcf and BMP-Smad signaling.* Dev Growth Differ, 2005. **47**(7): p. 471-82.
142. De Craene, B., F. van Roy, and G. Berx, *Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors.* Cell Signal, 2005. **17**(5): p. 535-47.
143. Conacci-Sorrell, M., et al., *Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK.* J Cell Biol, 2003. **163**(4): p. 847-57.
144. Castro Alves, C., et al., *Slug is overexpressed in gastric carcinomas and may act synergistically with SIP1 and Snail in the down-regulation of E-cadherin.* J Pathol, 2007. **211**(5): p. 507-15.
145. Schmalhofer, O., S. Brabletz, and T. Brabletz, *E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer.* Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(1-2): p. 151-66.
146. Gilles, C., et al., *Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells.* Cancer Res, 2003. **63**(10): p. 2658-64.
147. Maruyama, K., et al., *Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer.* Oncology, 2000. **59**(4): p. 302-9.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben:

Allen voran bedanke ich mich recht herzlich bei Prof. Dr. Thomas Cremer für die Übernahme des Erstgutachtens und Dr. Josef Mautner für die spontane Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke der Firma Micromet für die Vergabe des reizvollen und herausfordernden Themas. Prof. Dr. Patrick Beauerle danke ich insbesondere für seine fachliche Betreuung, seine Anregungen und tatkräftige Unterstützung bei der Ausarbeitung des Manuskripts.

Ein besonderes Dankeschön geht an Dr. Markus Münz für die großartige Betreuung über die drei Jahre. Er hat mir nicht nur mit Rat und Tat während der ganzen Zeit beigestanden, sondern hat mich auch in ergebnislosen Zeiten immer wieder aufgebaut. Einen besseren Betreuer hätte ich mir nicht vorstellen können. Vielen Dank!

Einen großen Dank auch an Dr. Tobias Raum, der mit richtungsweisenden Denkanstößen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ich bin sehr dankbar für die gründliche Korrektur der Doktorarbeit.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Alex Murr für die hilfreichen Tipps und Tricks im Labor, seine Geduld und die zahlreichen netten Gespräche. Es kam nie Langeweile auf.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Zimmerkollegen für das freundschaftliche und lustige Arbeitsklima im Büro und die vielen Kuchenpausen.

Bei allen anderen Mitarbeitern von Micromet möchte ich mich für die stete Hilfsbereitschaft bedanken. Ich freue mich mit so tollen Leuten zusammenzuarbeiten.

Bei Dennis möchte ich mich ganz besonders dafür bedanken, dass er mich zu jeder Zeit unterstützt und mir bei der Korrektur meiner Arbeit geholfen hat.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, ohne deren grenzenlose Unterstützung ein Studium und eine Doktorarbeit nie möglich gewesen wären.

Publikationen

Vera Kozjak-Pavlovic, Elke A. Dian-Lothrop, Michael Meinecke, Oliver Kepp, Katharina Ross, Krishnaraj Rajalingam, Anke Harsman, Eva Hauf, Volker Brinkmann, Dirk Gunther, Ines Herrmann, Robert Hurwitz, Joachim Rassow, Richard Wagner, Thomas Rudel, *Bacterial porin disrupts mitochondrial membrane potential and sensitizes host cells to apoptosis.* PLoS Pathog. **5**, e1000629 (2009).

Ralf Lutterbuese , Tobias Raum , Roman Kischel, Patrick Hoffmann, Susanne Mangold, Benno Rattel, Matthias Friedrich, Oliver Thomas, Grit Lorenczewski, Doris Rau, Evelyne Schaller, Ines Herrmann, Andreas Wolf , Thomas Urbig, Patrick A. Baeuerle and Peter Kufer, *T cell-engaging BiTE antibodies specific for EGFR potently eliminate KRAS- and BRAF-mutated colorectal cancer cells.* PNAS, **107** (28): p. 12605-12610 (2010).

Ines Herrmann, Patrick A. Baeuerle, Matthias Friedrich, Alexander Murr, Susanne Filusch, Dominik Rüttinger, Mariam W. Majdoub, Sherven Sharma, Peter Kufer, Tobias Raum, Markus Münz, *Highly efficient elimination of colorectal tumor-initiating cells by an EpCAM/CD3-bispecific antibody engaging human T cells.* PloS ONE, 5(10), e13474 (2010).

Poster: *Eradication of colon cancer stem cells by EpCAM/CD3-bispecific BiTE antibody MT110*
Ines Herrmann, Patrick A. Baeuerle, Matthias Friedrich, Alexander Murr, Susanne Filusch, Dominik Rüttinger, Peter Kufer, Tobias Raum, Markus Münz
"2nd Norwegian Cancer Symposium "Frontiers in Cancer Stem Cell Research: From basic science towards a cure". Dezember 2009, Oslo, Norwegen.

Lebenslauf

Persönlich Daten

Ines Herrmann
*09.01.1980 in Berlin
ledig
Schäftlarnstr. 66
81371 München

Ausbildung

1992 – 1999	**Schule** Wald-Oberschule (Gymnasium) in Berlin Abschluss: Abitur
1999 – 2001	**Berufsausbildung** Ausbildung zur C-BTA an der technischen Berufsfachschule Lette-Verein Berlin
2001 – 2002	Anstellung als C-BTA im Fachbereich Genetik, Humboldt-Universität Berlin
2002 – 2007	**Hochschulstudium** Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin Schwerpunkte: Genetik, Biochemie und Zellbiologie Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie; Thema: Funktion der Nukleotidbindung des PorB-Proteins von *Neisseria gonorrhoeae.*
8/2007 – 11/2010	**Promotion** Doktorarbeit bei Micromet AG in München Thema: Eradizierung von Krebsstammzellen mittels eines EpCAM/CD3-bispezifischen Antikörpers.