

Aus dem Bereich  
Klinische Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

## **IgA-Antikörper in der Tumorthherapie**

–

## **Funktionelle Evaluation polymerer Isoformen**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
**Doktors der Naturwissenschaften**

**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von  
Anabel Zwick  
geb. Kuhn

geboren am 08.09.1988 in Annweiler am Trifels

Die experimentellen Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden am Institut für Virologie des Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt.

Dekan der medizinischen Fakultät: Herr Prof. Dr. Michael Menger

Tag der Promotion: 08.07.2024

Gutachter: Herr Prof. Dr. Klaus Römer

Herr Prof. Dr. Robert Bals

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	VII
Summary .....	IX
1 Einleitung .....	1
1.1 Antikörper in der Tumorthherapie .....	1
1.2 Immunglobulin A.....	2
1.2.1 Aufbau und Struktur von IgA-Antikörpern .....	2
1.2.2 Fab-vermittelte IgA-Funktionen .....	4
1.2.3 Fc-Rezeptoren.....	5
1.2.4 Fc alpha Rezeptor I (FcαRI/CD89).....	6
1.2.5 Fc-vermittelte Wirkmechanismen der IgA-Antikörper .....	9
1.3 Neutrophile Granulozyten .....	10
1.4 Tumorassoziierte neutrophile Granulozyten.....	12
1.5 Optimierung der IgA-Antikörper für verbesserte biochemische und funktionelle Eigenschaften.....	15
1.6 Der EGF-Rezeptor.....	16
1.6.1 Struktur – Funktion – Regulation.....	16
1.6.2 Der EGF-Rezeptor in der Tumorthherapie.....	19
1.7 Humanes Papillomvirus .....	20
1.8 Kopf-Hals-Tumoren.....	21
1.9 Peniskarzinom.....	23
1.10 EMMPRIN (CD147).....	24
1.11 Ziele dieser Arbeit .....	25
2 Material und Methoden.....	27
2.1 Material.....	27
2.1.1 Ethische Vertretbarkeit.....	27
2.1.2 Zelllinien.....	27
2.1.3 Bakterien.....	28
2.1.4 Zellkulturmedien und Reagenzien.....	28
2.1.5 Antikörper.....	29
2.1.6 Fusionsproteine .....	31

---

2.1.7	Primer .....	32
2.1.8	Standard-Plasmide.....	32
2.1.9	Plasmide für die Antikörperproduktion.....	33
2.1.10	Lektine .....	33
2.1.11	Inhibitoren .....	33
2.1.12	Puffer und Lösungen.....	34
2.1.13	Reagenziensysteme .....	37
2.1.14	Chemikalien .....	38
2.1.15	Geräte .....	40
2.1.16	Gebrauchsmaterialien .....	41
2.1.17	Software.....	41
2.2	Methoden .....	43
2.2.1	Zellkultur.....	43
2.2.2	Isolation der Granulozyten aus Vollblut .....	44
2.2.3	Antikörperproduktion in ExpiCHO Zellen .....	44
2.2.4	Aufreinigung von Antikörpern mittels ahukappa-Matrix .....	45
2.2.5	Aufreinigung von Antikörpern mittels Profinity™ IMAC Resin.....	46
2.2.6	Analyse von Proteinen.....	46
2.2.7	Biochemische Charakterisierung der Antikörper .....	48
2.2.8	Lektin Blots .....	49
2.2.9	Calcein-Assay .....	50
2.2.10	Impedanz-Assay.....	51
2.2.11	Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies .....	51
2.2.12	Durchflusszytometrie.....	52
2.2.13	Internalisierungsassay .....	52
2.2.14	Wachstumsinhibition.....	53
2.2.15	Neutralrotfärbung.....	53
2.2.16	Quantitative real-time PCR.....	53
2.2.17	Immunfluoreszenz .....	55
2.2.18	Immunhistochemie.....	56
2.2.19	Statistische Auswertung .....	57

---

3	Ergebnisse .....	58
3.1	Etablierung eines impedanzbasierten Assays zur Bestimmung der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) .....	58
3.1.1	Freisetzungstests benötigen Zielzellen in Suspension.....	58
3.1.2	Die Impedanzmessung ermöglicht die Echtzeitmessung der IgA-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität.....	59
3.1.3	Funktionsanalysen der Granulozyten zeigen eine frühe Degranulierung .....	61
3.1.4	Trogoptose als Mechanismus der granulozytenvermittelten ADCC von adhären Ten Tumorzellen .....	61
3.1.5	Langzeitmessungen zeigten ein Auswachsen der Zielzellen .....	63
3.1.6	Erschöpfung der Granulozyten .....	65
3.2	Screening von Kopf-Hals-Tumorzellen mit der impedanzbasierten Methode .....	67
3.2.1	Zelllinienabhängige Kinetik der ADCC.....	67
3.2.2	EGFR-Oberflächenexpression und Proteinlevel korreliert mit der ADCC-Effektivität .	69
3.2.3	Screening der HNSCC-Zelllinien auf weitere ADCC-Effektivitätsmarker.....	71
3.3	Herstellung des IgA3.0-Dimers .....	74
3.3.1	Charakterisierung des IgA3.0-Dimers im Vergleich zu dem korrespondierenden Monomer sowie weiteren IgA-Dimeren .....	74
3.3.2	Lektinblots zeigten eine schwache Glykosylierung des IgA3.0-Dimers .....	77
3.4	Funktioneller Vergleich von IgA2.0 und IgA3.0.....	78
3.4.1	Fab-vermittelte Bindungs- und Funktionsanalyse .....	78
3.4.1	Fc-vermittelte Bindungs- und Funktionsanalyse .....	80
3.4.2	Vergleich der ADCC-Effektivität von IgA2.0 und IgA3.0 mit Kopf-Hals-Tumorzelllinien . .....	81
3.4.3	Bindung von IgA2.0 und IgA3.0 an Tumorzellen.....	84
3.5	Funktioneller Vergleich von IgA3.0 zu weiteren IgA-Dimeren.....	85
3.5.1	Fab-vermittelte Bindungs- und Funktionsanalyse der Dimere.....	85
3.5.1	Fc-vermittelte Bindungs- und Funktionsanalyse der Dimere .....	87
3.5.2	IgA3.0-Dimer mit verbesserter ADCC-Effektivität bei HPV <sup>+</sup> HNSCC .....	89
3.5.3	Die Dimere unterscheiden sich nicht in der Bindung an HNSCC .....	91
3.6	Einfluss löslicher und membranständiger Faktoren auf die Effektivität der ADCC .....	92

---

3.6.1	Lösliche Faktoren in den Überständen von A-431 und KYSE-30 Zellen verbessern die ADCC-Effektivität .....	92
3.6.2	Die Überstände der Tumorzelllinien modulieren die Oberflächenexpression der Granulozyten .....	93
3.6.3	Lösliches CD147 verbessert die IgA-abhängige ADCC .....	96
3.6.4	CD147 akkumulierte während der ADCC in der Kontaktzone zwischen Granulozyten und Zielzellen.....	98
3.6.5	Gewebemikroarrays zeigten eine gesteigerte CD147-Expression im Tumorgewebe von Peniskarzinompatienten.....	99
4	Diskussion.....	103
4.1	Der impedanzbasierte Assay ermöglicht die Echtzeitmessung der ADCC durch neutrophile Granulozyten an adhären wachsenden Tumorzellen.....	103
4.2	Screening von adhären wachsenden Kopf-Hals-Tumorzelllinien .....	107
4.3	Biochemische Charakterisierung und Funktionalität des dimeren IgA3.0.....	110
4.4	CD147 beeinflusst die Effektivität der ADCC <i>in vitro</i> und markiert Patienten mit HPV <sup>+</sup> metastasierendem Peniskarzinom <i>in vivo</i> .....	113
5	Verzeichnisse.....	116
5.1	Literaturverzeichnis .....	116
5.2	Abbildungsverzeichnis .....	140
5.3	Abkürzungsverzeichnis.....	141
6	Publikationen .....	144
6.1	Eigene Publikationen zu dieser Arbeit: .....	144
6.2	Eigene Publikationen aus anderen wissenschaftlichen Projekten (chronologisch):.....	144
7	Danksagung.....	146
8	Lebenslauf .....	147

## Zusammenfassung

Humane IgA-Antikörper aktivieren Granulozyten für die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) von Tumorzellen effektiver als die bisher in der Tumorthherapie zugelassenen Antikörper vom IgG-Isotyp. Durch Modifikationen der IgA-Antikörper konnte in vorangegangenen Studien eine Verbesserung biochemischer und funktioneller Eigenschaften erzielt werden und letztlich ein optimierter IgA2m(1)-Antikörper produziert werden, der eine signifikant verbesserte Pharmakokinetik und Therapieeffektivität *in vivo* aufwies. Dieser monomere, gegen den Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (EGFR) gerichtete und als IgA2.0 bezeichnete Antikörper war Ausgangspunkt dieser Arbeit.

Für die Analyse der IgA-abhängigen granulozytenvermittelten Zytotoxizität wurde zunächst eine markierungsfreie, impedanzbasierte Echtzeit-Messung an adhärent wachsenden Tumorzellen etabliert. Kurzzeitmessungen bestätigten die Ergebnisse aus bisherigen Freisetzungstests, bekräftigten die Korrelation der Effektivität mit der EGFR-Expression auf der Oberfläche der Zielzellen und unterstützten zudem Trogoptose als zugrundeliegenden Mechanismus der Zytotoxizität der Granulozyten gegenüber den Tumorzellen. Die neue Möglichkeit der Langzeitmessung ergab tumorzelllinienspezifische Kinetiken und ließ auf eine Erschöpfung der Granulozyten schließen, mit der Konsequenz eines Wiederauswachses der nicht vollständig abgetöteten Tumorzellen.

Der in dieser Arbeit hergestellte IgA-Antikörper mit der Bezeichnung IgA3.0, stellt eine Weiterentwicklung des IgA2.0 dar. Dabei zeigte IgA3.0 eine effektive Dimerisierung mittels der J-Chain und erwies sich durch die kovalente Verbindung der schweren und leichten Ketten als stabiler gegenüber dem IgA2-Wildtyp. Funktionelle Experimente konnten verbesserte Fab-vermittelte Funktionen, wie die Wachstumsinhibition von Tumorzellen, sowie eine verbesserte Fc $\alpha$ RI-Bindung im Vergleich zum IgA2.0 nachweisen. Entgegen früherer Studien, die eine Überlegenheit der dimeren gegenüber den jeweiligen monomeren IgA-Antikörpern zeigten, übertrug sich die verbesserte Rezeptorbindung des IgA3.0 nicht auf die Funktionalität im ADCC-Assay. Im impedanzbasierten ADCC-Assay wurde eine verminderte Effektivität im Vergleich zum IgA2.0 gegenüber den untersuchten HPV<sup>-</sup> Kopf-Hals-Tumorzelllinien beobachtet. Interessanterweise zeigte sich das optimierte Dimer bei den HPV<sup>+</sup> Kopf-Hals-Tumorzelllinien den anderen Dimeren überlegen und ähnlich effektiv wie das IgA2.0-Monomer. Der Überstand der HPV<sup>+</sup> Zelllinien enthielt signifikant mehr sCD147 (soluble, lösliches CD147) und induzierte deutlich geringere Mengen an mCD147 (membranständiges CD147) auf den Granulozyten. Die mCD147 Dichte auf den Granulozyten korreliert mit der ADCC-Effektivität und eignet sich als prädiktiver Marker für die IgA-abhängige ADCC. Die Zugabe von sCD147 steigerte die ADCC-Effektivität des IgA3.0 dosisabhängig. Die Färbung von Gewebemikroarrays von Peniskarzinompatienten, einer weiteren HPV-assozierten Tumorentität,

zeigte eine gesteigerte CD147-Expression im Tumorzentrum und identifizierte auf diese Weise im Zusammenhang mit myeloischem Infiltrat HPV<sup>+</sup> Patienten mit einem erhöhten Metastasierungspotential.

Die Anwendung der optimierten IgA-Antikörper im ADCC-Assay an adhären Ten Tumorzelllinien ergab, dass auch Tumorpatienten mit infiltrierenden Neutrophilen und einem Markerprofil, welches mit einer schlechten Prognose einhergeht (hohe EGFR-Expression, hohe CD147-Expression), in Zukunft vermutlich von einer IgA-Antikörperbasierten Immuntherapie profitieren könnten.

---

## Summary

### **IgA antibodies in tumorthrapy – functional evaluation of polymeric isoforms**

Human IgA antibodies engage granulocytes for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) of tumor cells more effectively than the antibodies of the IgG isotype so far approved for tumor therapy. In previous studies, engineering of the IgA antibodies has improved their biochemical and functional properties. This led to the development of an optimized IgA2m(1) antibody with significantly enhanced pharmacokinetics and therapeutic efficacy *in vivo*. This monomeric IgA targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR), designated IgA2.0, served as the starting point of this work.

A label-free, impedance-based real-time measurement for the analysis of IgA-dependent granulocyte-mediated cytotoxicity was established, that uses adherently growing tumor cells. Short-term measurements confirmed the results from previous release assays and reaffirmed the correlation of efficacy with EGFR surface expression on the target cells, while supporting trogoptosis as the underlying mechanism of granulocyte cytotoxicity towards tumor cells. The possibility of long-term measurement revealed tumor cell line-specific kinetics and suggested that granulocytes were exhausted, which resulted in the regrowth of tumor cells that had not been eliminated due to insufficient ADCC.

The IgA antibody produced in this work designated IgA3.0, represents a further development of IgA2.0. It showed effective dimerization utilizing the J-chain and proved to be more stable than the IgA2 wildtype due to the covalent connection of the heavy and light chains. Functional experiments demonstrated improved Fab-mediated functions, such as growth inhibition of tumor cells, and enhanced Fc $\alpha$ RI binding compared to IgA2.0. However, contrary to previous studies that demonstrated superiority of the dimeric variants compared to the respective monomeric IgA antibodies, the improved receptor binding of IgA3.0 did not translate into efficacy of the ADCC-assay. In impedance-based ADCC assays IgA3.0 showed reduced effectiveness against the investigated HPV<sup>+</sup> head and neck tumor cell lines compared to IgA2.0. Interestingly the optimized dimer outperformed the other dimers against the HPV<sup>+</sup> head and neck tumor cell lines and was found to be similarly effective as the IgA2.0 monomer. The supernatant of the HPV<sup>+</sup> cell lines contained significantly more sCD147 (soluble) and induced notably lower amounts of mCD147 (membranous) on the granulocytes. The mCD147 density on the granulocytes correlated with ADCC efficacy and is suitable as a predictive marker for IgA-dependent ADCC. Addition of sCD147 increased the ADCC efficacy of the IgA3.0 in a dose-dependent manner. Staining of tissue microarrays from penile cancer patients,

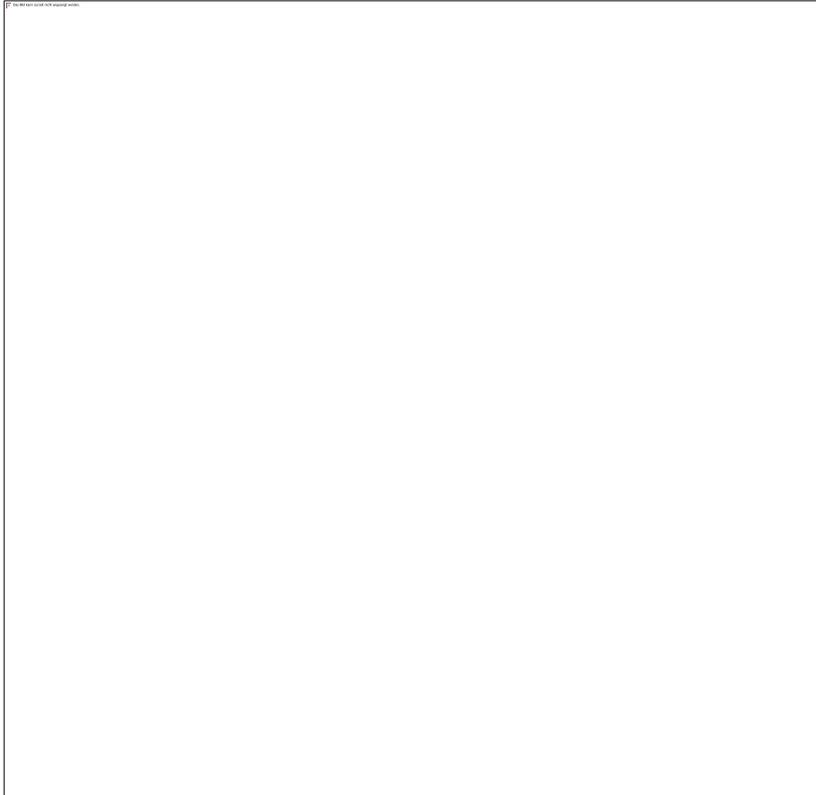
another HPV-associated tumor entity, revealed increased CD147 expression in the tumor center and marked, in association with myeloid infiltrate, HPV<sup>+</sup> patients with higher metastatic potential.

Using optimized IgA antibodies in the ADCC-assay on adherently growing tumor cell lines showed that tumor patients with infiltrating neutrophils and a marker profile associated with poor prognosis (high EGFR expression, high CD147 expression) could potentially benefit from IgA antibody-based immunotherapy in future.

# 1 Einleitung

## 1.1 Antikörper in der Tumorthherapie

Immunglobuline werden von B-Zellen - den antikörperproduzierenden Zellen des menschlichen Immunsystems - produziert und sind ein wichtiger Teil des Immunsystems zur Bekämpfung von Krankheitserregern. Neben der Erkennung, Bindung und Neutralisation von Pathogenen arbeiten sie mit dem angeborenen und erworbenen Immunsystem zusammen, um eine Reihe antimikrobieller Prozesse in Gang zu setzen. Antikörper sind aus zwei identischen leichten Ketten und zwei identischen schweren Ketten aufgebaut, letztere bestimmen durch ihren Isotyp die Zugehörigkeit in eine der fünf Antikörperklassen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM (Davies u. a. 1975). Seit 1997 Rituximab als erster Antikörper zur Therapie des Non-Hodgkin Lymphoms zugelassen wurde (Maloney u. a. 1997), spielen sie auch in der Krebstherapie eine stetig wachsende, wichtige Rolle. Bis März 2024 wurden in den USA und/oder Europa insgesamt 55 Antikörper zur Tumorthherapie zugelassen („Antibody Therapeutics Approved or in Regulatory Review in the EU or US“, o. J.), die gegen Antigene auf der Tumorzelle selbst gerichtet sind oder sogenannte Immun-Checkpoint-Proteine binden (Sharma u. a. 2023; Zinn u. a. 2023). Ihre Wirkung entfalten sie dabei durch direkte, aber auch indirekte Mechanismen (Abbildung 1). Zu den direkten Effekten zählen die Unterbrechung lebensnotwendiger Signalwege der Tumorzellen, zum Beispiel durch Blockade der Rezeptoren von Wachstumsfaktoren, oder die Induktion von pro-apoptischen und anti-proliferativen Signalen in den Tumorzellen (Mendelsohn und Baselga 2006; Li u. a. 2005; Dubois und Cohen 2009). Indirekt können Antikörper Effektorzellen für die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) oder antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose (ADCP) induzieren und die Komplementkaskade für die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) aktivieren (Kubota u. a. 2009). Durch den antikörperabhängigen Zelltod der Tumorzellen werden Tumorantigene freigesetzt, die in einem als Kreuzpräsentation beschriebenen Mechanismus von dendritischen Zellen aufgenommen und T-Zellen präsentiert werden können, die wiederum zur Tumorzelllyse beitragen (Dhodapkar u. a. 2002). Alle bislang in der onkologischen Therapie zugelassenen Antikörper gehören dem IgG-Isotyp an. Unter Anwendung von IgA-Immunglobulinen konnte *in vitro* ein Abtöten der Tumorzellen durch neutrophile Granulozyten beobachtet werden. Auch in *in vivo* Mausexperimenten konnte eine Tumorreduktion durch IgA-Antikörper erzielt werden, weshalb der IgA-Subtyp für die Krebstherapie in Zukunft eine interessante Alternative darstellen könnte (Dechant u. a. 2007; Lohse u. a. 2016; Breedveld und van Egmond 2019).



### **Abbildung 1. Wirkmechanismen von Antikörpern in der Tumorthherapie**

Antikörper, die Antigene auf der Tumorzelle erkennen, führen durch die Aktivierung von Effektorzellen zur antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) (1) oder induzieren die antikörperabhängige zelluläre Phagozytose (ADCP) (2). Sie aktivieren die Komplementkaskade für die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) (3), blockieren wichtige Signalwege (4) und führen durch die Bildung von Immunkomplexen über die verstärkte Tumorantigen-Kreuzpräsentation zur adaptiven Immunantwort (5) (Vukovic u. a. 2021).

## **1.2 Immunglobulin A**

### **1.2.1 Aufbau und Struktur von IgA-Antikörpern**

Das menschliche Immunsystem wendet viel Energie für die Produktion von IgA-Antikörpern auf: In einem durchschnittlichen Erwachsenen werden täglich ca. 60 mg IgA-Antikörper/Kilogramm Körpergewicht produziert. Das entspricht etwa 5 Gramm IgA und damit einer größeren Menge als alle übrigen Immunglobuline zusammengenommen (Conley und Delacroix 1987). IgA-Antikörper werden vor allem über die Schleimhäute sezerniert und bedecken damit eine ca. 400m<sup>2</sup> große Oberfläche des Körpers. Da die Schleimhäute in direktem Kontakt zur Umwelt stehen, spielen IgA-Antikörper eine wichtige Rolle in der ersten Abwehr von Erregern und Fremdstoffen aus der Umgebung (Childers u. a. 1989). Im Serum zirkulieren 2-3 mg/ml monomeres IgA, hauptsächlich vom Subtyp IgA1, während das sekretierte Immunglobulin als Dimer oder in Form von höheren Polymeren vermehrt aus dem IgA2-Subtyp besteht (Delacroix u. a. 1982). Die zwei im Menschen vorkommenden

Unterklassen IgA1 und IgA2 haben einen den anderen Immunglobulinen sehr ähnlichen Aufbau (Feinstein und Franklin 1966). Sie bestehen aus zwei identischen schweren Ketten (HC), die wiederum aus einer variablen Domäne (VH) und drei konstanten Domänen (CH) zusammengesetzt sind, und aus zwei identischen leichten Ketten (LC), die aus einer variablen Domäne (VH) und einer konstanten Domäne (CH) bestehen (Abbildung 2). Zwei Monomere bilden – verbunden durch die J-Chain – ein Dimer, welches bei der Sekretion über die Schleimhäute durch die sekretorische Komponente stabilisiert wird (Koshland 1975; Weicker und Underdown 1975). Das Hauptunterscheidungsmerkmal der beiden Unterklassen stellt die Gelenkregion zwischen der ersten und zweiten konstanten Domäne der schweren Kette dar. Während diese bei IgA1 besonders lang und flexibel ist, ist sie bei IgA2 deutlich kürzer (Frangione und Wolfenstein-Todel 1972). Die IgA1 Gelenkregion enthält im Gegensatz zu IgA2 eine prolin-, serin- und threoninreiche Aminosäuresequenz, an die drei bis sechs Oligosaccharide O-glykosidisch gebunden sind (Mattu u. a. 1998; Tarelli u. a. 2004). Allerdings sind die Gelenkregionen nicht – wie das bei anderen Antikörperklassen der Fall ist – über Disulfidbrücken verbunden, was einerseits zu einer unabhängigen Beweglichkeit der Fab-Arme führt, andererseits die Anfälligkeit gegenüber dem proteolytischen Abbau erhöht (Senior und Woof 2005). Für IgA2 sind zwei Allotypen IgA2m(1) und IgA2m(2) beschrieben, die sich geringfügig in den konstanten Domänen der schweren Kette unterscheiden. Dieser Unterschied führt dazu, dass die leichte und schwere Kette bei IgA2m(2), wie bei vielen Immunglobulinen üblich, durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Bei IgA2m(1) hingegen werden die leichten und schweren Ketten nur durch nichtkovalente Wechselwirkungen stabilisiert. N-terminal der Gelenkregion bilden die leichten Ketten (VL und CL) gepaart mit den variablen und ersten konstanten Domänen der schweren Ketten (VH und CH1) zwei identische Fab-Regionen, die die Antigenbindung vermitteln. Die variablen Domänen formen hierbei durch jeweils drei hypervariable Regionen das Paratop, die Antigen-Bindestelle. Die Fc-Region vermittelt die Effektor-Mechanismen und ist zusammengesetzt aus den jeweils gepaarten C-terminalen konstanten Domänen der schweren Ketten (CH2 und CH3). Wichtig für die Fähigkeit der Dimerisierung ist das 18 Aminosäuren lange C-terminale Tailpiece, welches über seine vorletzten Cysteinreste Disulfidbrücken mit der J-Chain ausbildet und damit zwei IgA-Monomere kovalent zu einem Dimer verbindet (Mestecky u. a. 1974). Neben der O-Glykosylierung in der Gelenkregion von IgA1 tragen weitere N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide maßgeblich zur Masse der IgA-Immunglobuline bei. Allen IgA gemein sind die an Asparagin 263 in der CH2-Domäne und an Asparagin 459 im Tailpiece gebundenen Zuckermoleküle. Bei IgA2 sind außerdem N-Glykosylierungen der CH1-Domäne an Asparagin 166 und der CH2 an Asparagin 337 beschrieben, während beim Allotyp IgA2m(2) eine weitere N-Glykosylierung am Asparagin 211 in der CH1-Domäne vorliegt (Tomana u. a. 1976).



**Abbildung 2. Schematische Darstellung der monomeren und dimeren IgA-Struktur**

Die konstanten Domänen der schweren Ketten sind in rot, die variablen Domänen in hellrot dargestellt, die konstanten und variablen Domänen der leichten Ketten entsprechend in blau und hellblau. Die J-Chain ist in Gelb abgebildet. Beim Dimer wurde zur besseren Übersicht auf das Einzeichnen der Glykosylierungen verzichtet.

### 1.2.2 Fab-vermittelte IgA-Funktionen

Die Affinität eines Antikörpers beschreibt die Bindungsstärke der nichtkovalenten Bindungen, die zwischen einem monovalenten Antigen und einer Antigenbindestelle, der Fab-Region des Antikörpers, ausgebildet werden können. Durch die Fähigkeit der Dimerisierung können IgA-Antikörper mit ihren vier Antigenbindestellen multivalent Antigene binden. Dies führt zu einer sehr hohen Bindungsstärke, der Avidität, die um ein Vielfaches größer ist als die Summe der Einzelbindungen. Durch die multivalenten Antigenbindestellen quervernetzen dimere IgA-Antikörper auf den Schleimhäuten eine Vielzahl eindringender Pathogene und bilden Aggregate, die nicht mehr über das Epithel in den Körper eindringen können (Tomasi 1970). Diese als Immunexklusion bezeichnete Funktion von sezerniertem IgA neutralisiert viele Krankheitserreger wie Viren, Bakterien und Protozoen an den Schleimhäuten durch Bindung und fängt sie ab (Williams und Gibbons 1972). Antigene, die durch die Epithelien hindurch in die *Lamina Propria* eingedrungen sind, können dort von dimerem IgA gebunden und auf dem gleichen, Fc-vermittelten Transzytose-Weg - der auch freie Antikörper über pIgR sezerniert - zurück an die Schleimhautoberfläche transportiert werden (Robinson u. a. 2001; A. Wright u. a. 2008). Bei diesem Transport der Antikörper wirken Fc- und Fab-vermittelte Funktionen zusammen, um intrazelluläre Viren zu neutralisieren und an der Replikation zu hindern (Mazanec u. a. 1992). IgA blockiert durch die Bindung an Toxine auch deren schädliche Funktion. Für das Abtöten von Pathogenen können IgA-Antikörper, denen im Gegensatz zu IgG-Antikörpern die Bindestelle für C1q fehlt, nicht über den klassischen Signalweg das

Komplementsystem aktivieren (Bogers u. a. 1991). Die Effektorfunktionen werden größtenteils über die Bindung der Fc-Region an den für IgA spezifischen Fc-Rezeptor Fc $\alpha$ RI vermittelt.

### 1.2.3 Fc-Rezeptoren

Jede Immunglobulin-Klasse besitzt spezifische Rezeptoren, die den jeweiligen Fc-Teil des Antikörpers erkennen und binden. Diese Fc-Rezeptoren kommen als Transmembranrezeptoren hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems vor und leiten die Signale der Antikörper an die Effektorzelle weiter. Dies führt zu einer ganzen Reihe unterschiedlicher Immunreaktionen, auf die im Kapitel 1.2.5 (Fc-vermittelte Wirkmechanismen der IgA-Antikörper genauer eingegangen wird. Im Menschen wird für IgA- und IgM-Antikörper jeweils ein spezifischer Fc-Rezeptor exprimiert: Fc $\alpha$ RI und Fc $\mu$ R (Maliszewski u. a. 1990; Ohno u. a. 1990). Des Weiteren gibt es zwei Rezeptoren, die sowohl IgA als auch IgM erkennen: Fc $\mu$ / $\alpha$ R und pIgR, wobei pIgR als Transportrezeptor von der basolateralen Seite zur apikalen Seite von Epithelzellen fungiert (Shibuya u. a. 2000; Mostov 1994). IgE wird ebenfalls von zwei Rezeptoren gebunden: Fc $\epsilon$ RI und Fc $\epsilon$ RII (Conrad u. a. 1991). Für die Bindung von IgG wurden bereits sechs klassische Fc-Rezeptoren im Menschen identifiziert: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIIA und Fc $\gamma$ RIIIB (Ravetch und Bolland 2001). Als weiterer Transport- und Recyclingrezeptor ist FcRn für den bidirektionalen Transport von IgG-Antikörpern durch vaskuläre Endothelzellen und intestinale Epithelzellen verantwortlich (Yoshida u. a. 2004). Er ermöglicht auch die Weitergabe mütterlicher IgGs über die Plazenta an den Fetus (Simister 2003). TRIM21 (Tripartite motif-containing protein 21) ist im Gegensatz zu allen zuvor beschriebenen Oberflächenrezeptoren ein intrazellulärer Fc-Rezeptor, der mit IgA, IgM und IgG interagieren kann und für die Degradation von gebundenen Viren über das Proteasom verantwortlich ist (McEwan u. a. 2013). Die Fc-Rezeptoren können in aktivierende und inhibierende Rezeptoren unterteilt werden, deren Signalweiterleitung abhängig von intrazellulären Motiven oder Bindungspartnern ist (Abbildung 3). Fc $\gamma$ RIIA und Fc $\gamma$ RIIC haben eine eigene intrazelluläre ITAM-Domäne (Immunoreceptor tyrosin-based activation motif), während Fc $\epsilon$ RI, Fc $\alpha$ RI, Fc $\gamma$ RI, und Fc $\gamma$ RIIIA mit dem dimeren Fc $\gamma$ R assoziiert sind, der eine ITAM-Domäne je Kette trägt (Reth 1989; Bruhns und Jönsson 2015). Der Fc $\gamma$ RIIB besitzt ein inhibitorisch wirkendes ITIM-Motiv (Immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif) in seiner zytoplasmatischen Domäne und fungiert als Gegenspieler und Kontrolleur der Aktivierung durch ITAMs (Daëron u. a. 1995). Darüber hinaus konnten, in Abhängigkeit vom Interaktionspartner, auch für ITAMs inhibitorische Signale nachgewiesen werden (P. M. Waterman und Cambier 2010), woraus sich für den Fc $\alpha$ RI eine Bifunktionalität ergibt.

**Abbildung 3. Humane Fc Rezeptoren**

Schematische Darstellung der humanen Fc-Rezeptoren mit Lokalisation in der Zellmembran und im Komplex mit ihren jeweiligen Untereinheiten zur Signalübertragung. Verändert nach (Bruhns und Jönsson 2015)

**1.2.4 Fc alpha Rezeptor I (Fc $\alpha$ RI/CD89)**

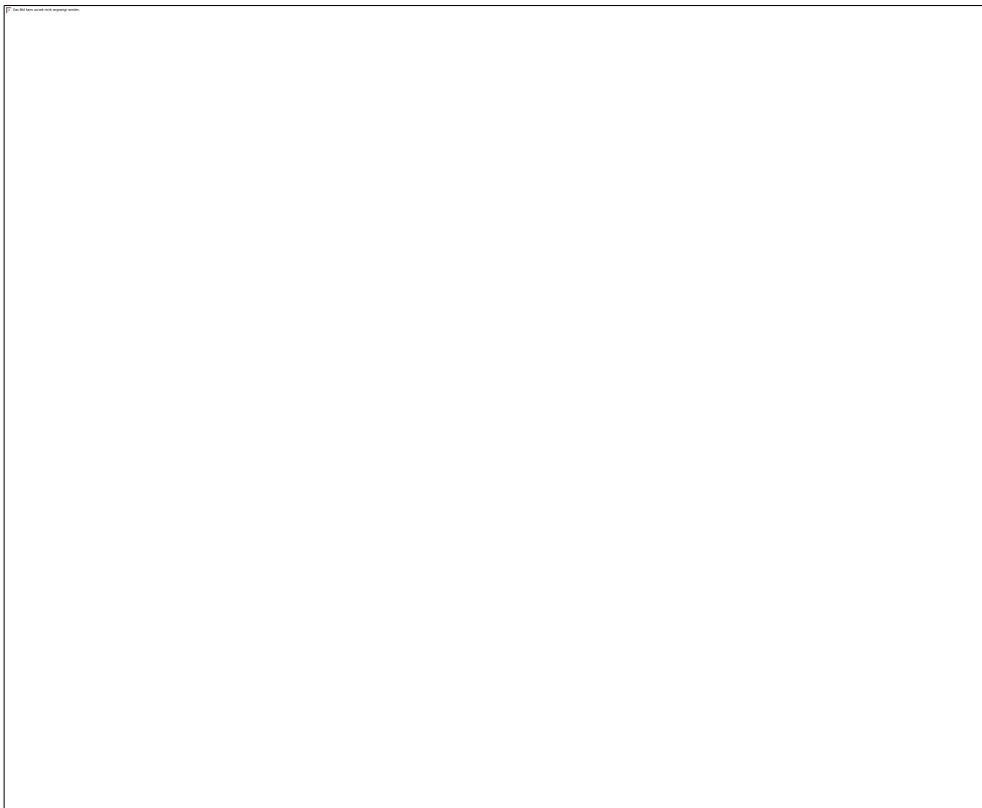
Der Fc $\alpha$ RI gehört zur Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie, weist allerdings nur eine Sequenzhomologie von etwa 20 % zu den anderen Fc-Rezeptoren auf (Maliszewski u. a. 1990). Als Transmembranprotein ist er auf der Oberfläche von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Monozyten, dendritischen Zellen, Kupfferzellen sowie Makrophagen der Tonsillen, der Milz und der Lunge exprimiert (Monteiro u. a. 1990; Geissmann u. a. 2001; van Egmond u. a. 2000). Das 30 kDa schwere Protein besteht aus zwei extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen (EC1 und EC2), einer Transmembrandomäne und einem kurzen intrazellulären Anteil, der selbst kein bekanntes Signalmotiv trägt, aber mit der Fc $\gamma$ R Kette assoziieren kann (Morton u. a. 1996). Diese intrazelluläre Domäne trägt jedoch entscheidend zu der als *inside-out* Signal beschriebenen Aktivierung des Fc $\alpha$ RI bei (Abbildung 4). Dabei spielt der Phosphorylierungsstatus von Serin 263 eine zentrale Rolle (Bracke u. a. 2001). Die Dephosphorylierung von S263 durch die Proteinphosphatase 2 (PP2A) (Bakema u. a. 2008) wird durch Zytokine wie Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor (GM-CSF), Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor (G-CSF) und Interleukin-8 (IL-8 oder CXCL8) in Neutrophilen sowie Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-5 (IL-5) in Eosinophilen stimuliert und führt zur Aktivierung des Fc $\alpha$ RI, ohne dabei die Rezeptorexpression zu verändern (Weisbart u. a. 1988). Unklar bleibt bisher, ob es durch die intrazelluläre Dephosphorylierung zu einer Konformationsänderung der extrazellulären Domäne kommt, welche die Affinität des Rezeptors gegenüber seinem Liganden erhöht, und wie diese Konformationsänderung nach außen übertragen wird. Eine wichtige Rolle scheinen hierbei auch Veränderungen im Aktinzytoskelett zu spielen, die die Rezeptormobilität und Clusterbildung begünstigen und somit die bivalente Bindung von einem Antikörper an zwei Rezeptoren unterstützen (Brandsma u. a. 2015).

**Abbildung 4. Inside-out Signal des Fc $\alpha$ RI**

Schematische Darstellung der Fc $\alpha$ RI Aktivierung durch Zytokine. Die Bindung der Zytokine an ihren Rezeptor hat die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) Aktivierung zur Folge, die wiederum über Proteinkinase C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3) hemmt. Zusammen mit der PP2A Aktivierung führt dies zur Dephosphorylierung des Serin 263 der intrazellulären Domäne des Fc $\alpha$ RI. Es kommt zur Aktivierung des Fc $\alpha$ RI, die zur Erhöhung der Mobilität des Rezeptors ( $M_f$  =mobile fraction) und einer Affinitätserhöhung führt. Letztere wird möglicherweise durch eine Konformationsänderung vermittelt (Dargestellt durch Doppelpfeil mit Fragezeichen). (ten Broeke u. a. 2019)

Die Bindung des Fc $\alpha$ RI an IgA wird durch die extrazelluläre Domäne EC1 vermittelt (Wines u. a. 1999). Diese erkennt die Bindungsstellen zwischen den konstanten Domänen C $\alpha$ 2 und C $\alpha$ 3 der schweren Kette, wobei ein IgA-Molekül an zwei Fc $\alpha$ RI-Moleküle bindet (Carayannopoulos u. a. 1996; Pleass u. a. 1999; Woof und Burton 2004). Monomere und dimere IgA1 sowie IgA2 binden mit einer mittleren Affinität an den Rezeptor, während Immunkomplexe, die aus fünf bis sechs IgA-Molekülen bestehen, eine optimale Bindungsbereitschaft an den Fc $\alpha$ RI aufweisen (Reterink u. a. 1997). Die sekretorische Komponente sezernierter dimerer oder polymerer IgAs verhindert durch Interaktion mit zwei der vier Fc $\alpha$ RI-Bindungsstellen die Bindung und damit Quervernetzung der Fc $\alpha$ RI fast vollständig (Herr u. a. 2003; Herr 2020). Durch die extrazelluläre Bindung von IgA an den Fc $\alpha$ RI kommt es zu einer intrazellulären Signalkaskade, die die Funktionen der Effektorzellen auslöst, das sogenannte *outside-in* Signal (Abbildung 5). Als Voraussetzung dafür gilt die Assoziation des Fc $\alpha$ RI mit der FcR $\gamma$ -Kette, die eine für die Signalinduktion notwendige ITAM-Domäne trägt (Morton u. a. 1995; Pfefferkorn und Yeaman 1994). Kommt es zu einer Quervernetzung zweier Fc $\alpha$ Rezeptoren durch IgA-Immunkomplexe, aggregiert die Tyrosinkinase LYN aus der Familie der SRC-Kinasen mit dem

Rezeptorkomplex und phosphoryliert die für die Aktivierung notwendigen Tyrosine der ITAM-Domäne (Gulle u. a. 1998). Durch die Phosphorylierung werden viele Signalmoleküle wie die Tyrosinkinase Spleen Tyrosin Kinase (SYK), Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), SHC Adapter Proteine, growth factor receptor bound protein 2 (GRB2) und B-Lymphozytenkinase (BLK) rekrutiert (Mark L. Lang u. a. 2002). Dabei spielt die Tyrosinkinase SYK eine zentrale Rolle in der Signalweiterleitung. Über SHC führt sie zur Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs (Park u. a. 1999), über PLC $\gamma$  wird die Proteinkinase C $\alpha$  aktiviert und SYK stimuliert auch den Phosphoinositide-3-Kinase (PI3-K)/AKT-Signalweg (Cantrell 2001). Sämtliche Signalwege nach der vollständigen Phosphorylierung der ITAM-Domäne resultieren in der Auslösung der Effektorzell-Funktionen, die zur Phagozytose, ADCC, Degranulation und der Freisetzung vieler Zytokine und Entzündungsmediatoren führen kann.



**Abbildung 5. *Outside-in* Signal des Fc $\alpha$ RI**

Dimere IgA oder IgA-Immunkomplexe führen durch ihre Bindung an den Fc $\alpha$ RI zur aktivierenden Signalweiterleitung. Die SRC Kinase LYN phosphoryliert die Tyrosine der ITAM-Domäne, die daraufhin als Andockstelle für weitere Signalmoleküle dient. Eine Schlüsselrolle in der Signalweiterleitung spielt SYK. Die Tyrosinkinase aktiviert (1) den PI3-K-Signalweg, (2) die PLC $\gamma$  und (3) über SHC die RAS GTPase. Daraus resultiert die Aktivierung zellulärer Funktionen mit pro-inflammatorischen Effekten. (Aleyd u. a. 2015)

Durch die Bindung von monomerem Serum IgA, das nicht durch Antigenbindung komplexiert wurde, mit niedriger Avidität an den Fc $\alpha$ RI kommt es nicht zur Quervernetzung zweier Rezeptoren, was nur zur teilweisen Phosphorylierung der ITAM-Domäne führt. Diese Monophosphorylierung leitet eine inhibitorische Wirkung über die Rekrutierung der Src homology 2 domain-containing Inositol-5-Phosphatase 1 (SHP1) ein (O'Neill u. a. 2011; Pasquier u. a. 2005). Dieser als ITAMi beschriebene

Signalweg verhindert die Aktivierung der zentralen SYK-Tyrosinkinase und wurde auch für die Fc $\gamma$ -Rezeptoren IIa und IIIa beschrieben (Nakamura u. a. 2002).

Durch die Bindung der IgA-Antikörper an den Fc $\alpha$ RI werden die Fc-vermittelten Wirkmechanismen, die in der Aktivierung der Effektorzell-Funktionen resultieren, ausgelöst.

### 1.2.5 Fc-vermittelte Wirkmechanismen der IgA-Antikörper

Die Fc-vermittelten Funktionen durch Bindung an den Fc $\alpha$ RI können von beiden Unterklassen IgA1 und IgA2 in ähnlich potenter Weise ausgelöst werden (Stewart und Kerr 1990). Je nach Struktur der IgA-Antikörper und Körperregion kommt es zu unterschiedlichen Effekten durch die Bindung an den Fc $\alpha$ RI. Monomeres und dimeres IgA, das unter physiologischen Bedingungen vorkommt, ist zur Aufrechterhaltung der Homöostase über den inhibitorischen ITAMi-Signalweg von zentraler Bedeutung. Dies zeigt sich bei Patienten mit Mangel an IgA, welche häufiger unter Autoimmunkrankheiten und Allergien leiden (Schaffer u. a. 1991).

Krankheitserreger, die in den Körper eindringen, werden durch IgA opsonisiert und führen zur Bindung der komplexierten IgA-Antikörper an den Fc $\alpha$ RI. Ausgelöst durch das aktivierende ITAM-Signal phagozytieren Granulozyten und Makrophagen daraufhin die IgA-Immunkomplexe, was über Veränderungen des Aktinzytoskeletts zum Einschluss der Krankheitserreger in das Phagosom führt (Greenberg und Grinstein 2002; Dale u. a. 2008). Es folgt eine intrazelluläre Kalziummobilisation, die den respiratorischen Burst – die Produktion und Freisetzung von Sauerstoffradikalen zur Elimination der phagozytierten Partikel – auslöst (M. L. Lang u. a. 1997). Gleichzeitig führt die Quervernetzung der Fc $\alpha$ RI auf der Oberfläche der Granulozyten zur Degranulation und Freisetzung des Chemokins Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), welches wiederum weitere Granulozyten anlockt und zu einer Verstärkung der Immunreaktion führt (van der Steen u. a. 2009). In der *Lamina Propria* des Intestinaltrakts ist die vorherrschende Zellpopulation, welche unter homöostatischen Bedingungen den Fc $\alpha$ RI exprimiert, CD103<sup>+</sup> dendritische Zellen (Geissmann u. a. 2001). Deren Aktivierung über IgA-Immunkomplexe im Zusammenspiel mit der Stimulation von Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) führt zur Aktivierung einer Entzündungsreaktion und induziert die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Interleukin-23 (IL-23). Diese wiederum induzieren die Rekrutierung von Granulozyten und Monozyten an den Ort der Entzündung (Hansen u. a. 2018). Monozyten und Makrophagen anderer Organe wie der Leber, der Haut und des Blutes können, neben der Phagozytose, ebenfalls durch Zytokine zu einer Entzündungsreaktion beitragen. Die Freisetzung dieser Mediatoren ist sehr zelltypspezifisch und führt beispielsweise in Kupffer-Zellen der Leber durch Bindung von Serum IgA-Immunkomplexen an den Fc $\alpha$ RI zur Induktion von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und Interleukin-6 (IL-6), während in zirkulierenden Monozyten zusätzlich die Produktion des anti-

inflammatorischen Zytokins Interleukin-10 (IL-10) gehemmt wird (Hansen u. a. 2017). Ein weiterer Mechanismus, der durch die Aktivierung des Fc $\alpha$ RI mittels Bindung des IgA-Fc Teils ausgelöst wird, ist die ADCC, die sowohl eine antibakterielle Funktion hat (Lowell u. a. 1980) als auch eine wichtige Rolle bei der Tumorzelllyse spielt (Di Carlo u. a. 2001; van Egmond u. a. 2001). Neutrophile Granulozyten können durch die Aktivierung des Fc $\alpha$ RI über IgA-Antikörper deutlich effizienter Tumorzellen abtöten als durch IgG-Antikörper (Brandsma u. a. 2019). In *in vitro* ADCC-Assays zeigte sich die IgA2 Unterklasse gegenüber IgA1 überlegen (Beyer u. a. 2009). Dass die Fc-vermittelten Funktionen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Krankheitserregern spielen, zeigt sich auch darin, dass einige Bakterien Strategien entwickelt haben, um die Immunantwort, ausgelöst durch die Bindung an den Fc $\alpha$ Rezeptor, zu umgehen. Hierzu exprimieren beispielsweise Streptokokken der Typen A und B sowie *Staphylococcus aureus* IgA-Bindeproteine, welche die Quervernetzung an den Fc $\alpha$ RI blockieren (Pleass u. a. 1999; Wines u. a. 2006). Eine ganze Reihe weiterer pathogener Bakterien sezernieren Proteasen, welche die Gelenkregion vor allem von IgA1 spalten können. Somit kann die durch den Fc-Teil vermittelte Immunantwort nicht einsetzen (Mistry und Stockley 2006). Neben ihrer wichtigen Funktion in der Bekämpfung mikrobieller Infektionen haben IgA-Antikörper und ihre vielfältigen Wirkmechanismen über Granulozyten in letzter Zeit eine erhöhte Aufmerksamkeit in der Tumorforschung erlangt.

### 1.3 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten stellen mit 50-70 % den größten Anteil an im Blut zirkulierenden Leukozyten dar. Da sie nur eine kurze Lebensdauer von wenigen Stunden bis maximal fünf Tagen haben, werden täglich im Knochenmark etwa 100 Milliarden neuer Granulozyten produziert (Dancey u. a. 1976; Pillay u. a. 2010). Die Aktivierung der Neutrophilen muss zur Aufrechterhaltung der Homöostase streng reguliert werden, da sie über vielfältige zytotoxische Mechanismen verfügen, welche potenziell auch zur Zerstörung gesunder Gewebe führen können. Deshalb befinden sich zirkulierende Granulozyten in einem Ruhezustand. Über den Mechanismus der transendothelialen Migration können die ausdifferenzierten zirkulierenden Granulozyten zum Ort der Entzündung rekrutiert werden (Ley u. a. 2007). Dabei kommt es zur Adhäsion der Neutrophilen an die entzündeten postkapillären Venolen und deren para- oder transzellulären Durchwanderung, die zu ersten Änderungen der enzymatischen und transkriptionellen Aktivität der Granulozyten beiträgt. Erst mit dem Eintritt der Granulozyten in das Gewebe kommt es durch pro-inflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-1 $\beta$ ), Chemokine (C5a, LTB<sub>4</sub>, N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin, Plättchenaktivierender Faktor) oder Toll-like-Rezeptoren-Agonisten (Lipopolysaccharid, Flagellin, Lipopeptide) zum „Priming“, einem „in Bereitschaft versetzen“ der Granulozyten. Dies führt zu

phänotypischen und funktionellen Veränderungen, welche wiederum eine verstärkte Reaktion auf weitere Stimuli auslösen (H. L. Wright u. a. 2013; El-Benna u. a. 2016; Miralda u. a. 2017). Als Reaktion auf eingedrungene Krankheitserreger können aktivierte Neutrophile diese durch Phagozytose aufnehmen, durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und der Degranulation abtöten sowie durch die Bildung von Netzwerken aus extrazellulären Fasern – Neutrophil Extracellular Traps (NETs) – unschädlich machen.

In erster Linie sind neutrophile Granulozyten spezialisiert auf die Phagozytose eindringender Pathogene. Dazu erkennen Oberflächenrezeptoren wie Toll-like Rezeptoren, Nod-like Rezeptoren und Dectin-1 die Krankheitserreger direkt oder Fc-Rezeptoren binden an mit Antikörpern opsonisierte Pathogene (Hayashi u. a. 2003; Ekman und Cardell 2010; Kennedy u. a. 2007). Innerhalb von nur 20 Sekunden können Neutrophile die erkannten Partikel umschließen und in das Phagosom aufnehmen (Segal u. a. 1980). Aktivierte Granulozyten produzieren große Mengen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) über den NADPH-Oxidase-Komplex, die zum einen extrazellulär in das Gewebe freigesetzt werden und zum anderen intrazellulär in das Phagosom abgegeben werden (Dupré-Crochet u. a. 2013). In ruhenden Zellen sind die Untereinheiten des NADPH-Oxidase-Komplexes zur Vermeidung einer spontanen Aktivierung auf unterschiedliche Zellkompartimente verteilt. Phagozytose oder Aktivierung der Neutrophilen führen zur Verschmelzung der spezifischen Granula mit dem Phagosom oder der Plasmamembran, so dass die Zusammensetzung der Untereinheiten und damit die Aktivierung des NADPH-Oxidase-Komplexes den oxidativen Burst, die Entstehung und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, auslöst (Johansson u. a. 1995; Karlsson und Dahlgren 2002). ROS führen zum Abtöten der Krankheitserreger, fördern zudem die Degranulation und stimulieren die Bildung und Freisetzung der NETs. Bei der Degranulation kommt es zur Freisetzung toxischer Mediatoren, die in vier unterschiedlichen Typen intrazellulär gespeicherter Granula vorliegen (Niels Borregaard und Cowland 1997; Lominadze u. a. 2005). Die primären, azurophilen Granula sind charakterisiert durch die Myeloperoxidase und enthalten zudem Proteasen, Elastase, Chatepsine und Defensine (Egesten u. a. 1994). Sie verschmelzen hauptsächlich intrazellulär mit dem Phagosom und führen dort zum Abtöten der aufgenommenen Mikroorganismen. Der hohe Lactoferrin-Gehalt und ihre Ausstattung mit weiteren antimikrobiellen Substanzen kennzeichnet die sekundären, spezifischen Granula, deren Hauptaufgabe die Bekämpfung phagozytierter und extrazellulärer Mikroorganismen ist (N. Borregaard 1997). Die tertiären Granula sind klein, leicht zu mobilisieren und werden deshalb frühzeitig exozytiert. Die vorwiegend enthaltene Gelatinase (Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9)) sowie weitere Matrix abbauende Enzyme und wichtige Oberflächenrezeptoren erleichtern die Migration der Neutrophilen ins Gewebe (Kjeldsen u. a. 1994). Der vierte Granulatyp wird als sekretorischer Vesikel bezeichnet und unterscheidet sich von den vorrausgegangen durch seine Bildung als endozytotische Vesikel, die Bestandteile von Plasma aufnehmen (N. Borregaard u. a.

1992). Sie dienen vor allem als Reservoir von Oberflächenrezeptoren wie  $\beta_2$ -Intergrine (Mac-1) und Komplement Rezeptor 1, die durch Exozytose in der Plasmamembran der Neutrophilen lokalisiert werden (Sengeløv u. a. 1993; 1994). Ein weiterer Mechanismus der neutrophilen Granulozyten auf die Aktivierung zu reagieren, ist die NETose. Sie ist eine Sonderform des Zelltodes, bei dem zuerst der Zellkern aufgelöst wird, anschließend rupturiert die Plasmamembran und das Chromatin, gemischt mit Zytoplasma und Granulainhalt, wird als Netz freigesetzt (Fuchs u. a. 2007). Pathogene, die von den Neutrophilen nicht phagozytiert werden können, werden von den Netzen immobilisiert und können so besser bekämpft werden (Branzk u. a. 2014).

#### **1.4 Tumorassoziierte neutrophile Granulozyten**

Tumorassoziierte neutrophile Granulozyten (TAN) sind ein wichtiger Bestandteil der Tumormikroumgebung, deren Rolle im Menschen je nach Tumorentität und Progression sehr unterschiedlich sein kann (Jaillon u. a. 2020). Die Infiltration Neutrophiler korreliert bei vielen soliden Tumoren – unter anderem beim Nierenzellkarzinom, beim Melanom, beim hepatozellulären Karzinom und bei Kopf-Hals-Tumoren – mit einer schlechten Prognose (Shen u. a. 2014; Jensen u. a. 2009; Ladányi 2015; Margetts u. a. 2018; Trellakis u. a. 2011).

Eine tumorfördernde Eigenschaft von TANs ist ihr Beitrag zur genetischen Instabilität: Zum einen durch die Freisetzung von ROS und den damit einhergehenden DNA-Schäden und Genmutationen, die zur malignen Transformation beim Lungenkrebs beitragen (Güngör u. a. 2010). Zum anderen können aktivierte Neutrophile proinflammatorische microRNAs freisetzen, die zur Akkumulation von DNA-Doppelstrangbrüchen führen (Butin-Israeli u. a. 2019). Des Weiteren stimulieren TANs, unter anderem durch die Sekretion von Prostaglandin E<sub>2</sub>, die Proliferation der Tumorzellen und fördern das Tumorwachstum, indem sie über MMP-9 und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) die Angiogenese aktivieren (Hattar u. a. 2014; Deryugina u. a. 2014). Ebenfalls über MMP-9 gemeinsam mit der neutrophilen Elastase tragen Neutrophile wesentlich zum Umbau und zur Degradation der extrazellulären Matrix bei und begünstigen damit die Migration, Invasion, Metastasierung und Aktivierung ruhender Tumorzellen (Liang und Ferrara 2016; Albregues u. a. 2018). Zirkulierende TANs unterstützen außerdem die metastasierenden Tumorzellen, indem sie diese in der Blutbahn begleiten und die Aktivierung von Leukozyten unterdrücken (Juechao Zhang u. a. 2016; Saini u. a. 2019)

Im Gegensatz dazu stehen die antitumorale Funktionen von Neutrophilen (Abbildung 6), die sowohl durch deren intrinsische Zytotoxizität als auch durch das Auslösen einer adaptiven Immunantwort vermittelt werden können.

**Abbildung 6. Antitumorale Aktivitäten neutrophiler Granulozyten**

(1) Intrinsische Zytotoxizität über den Todesrezeptorsignalweg, die durch Zytokine stimuliert wird. (2) Aktivierung durch die Interaktion zwischen Antikörper und Fc-Rezeptoren führt (2a) zur antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) oder (2b) zur antikörperabhängigen zellvermittelten Phagozytose (ADCP) über den Mechanismus der Trogozytose. (3) Auslösung der adaptiven Immunantwort durch direkte Stimulation der T-Zellen oder indirekt über antigenpräsentierende dendritische Zellen. Abbildung verändert nach: (Ustyanovska Avtenyuk u. a. 2020)

*In vitro* Experimente zeigen ein spezifisches Abtöten von Krebszelllinien durch Granulozyten von gesunden Spendern (Yan u. a. 2014), das durch „Priming“ mit GM-CSF gesteigert werden kann (Dissemond u. a. 2003). Die intrinsische Zytotoxizität konnte zumindest teilweise auf die Expression von Fas Ligand (FasL) und TNF-verwandter Apoptose induzierender Ligand (TRAIL) auf der Oberfläche der Granulozyten zurückgeführt sowie eine Korrelation zwischen der Stimulation mit TNF- $\alpha$  und der Zytotoxizität der Granulozyten dargestellt werden (B. Sun u. a. 2018; Koga u. a. 2004; Comen u. a. 2016). Die adaptive Immunantwort kann ausgelöst werden, indem antitumorale Neutrophile, die durch Interferon- $\gamma$  und GM-CSF zu antigenpräsentierenden Zellen reifen, T-Zellen durch die Kreuzpräsentation von Tumorantigenen stimulieren (Singhal u. a. 2016). Für das Kolonkarzinom, bei dem die Infiltration mit Neutrophilen im Gegensatz zu vielen anderen soliden Tumoren mit einer günstigen Prognose für den Patienten korreliert, konnte eine Ko-Lokalisation mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt werden (Governata u. a. 2017).

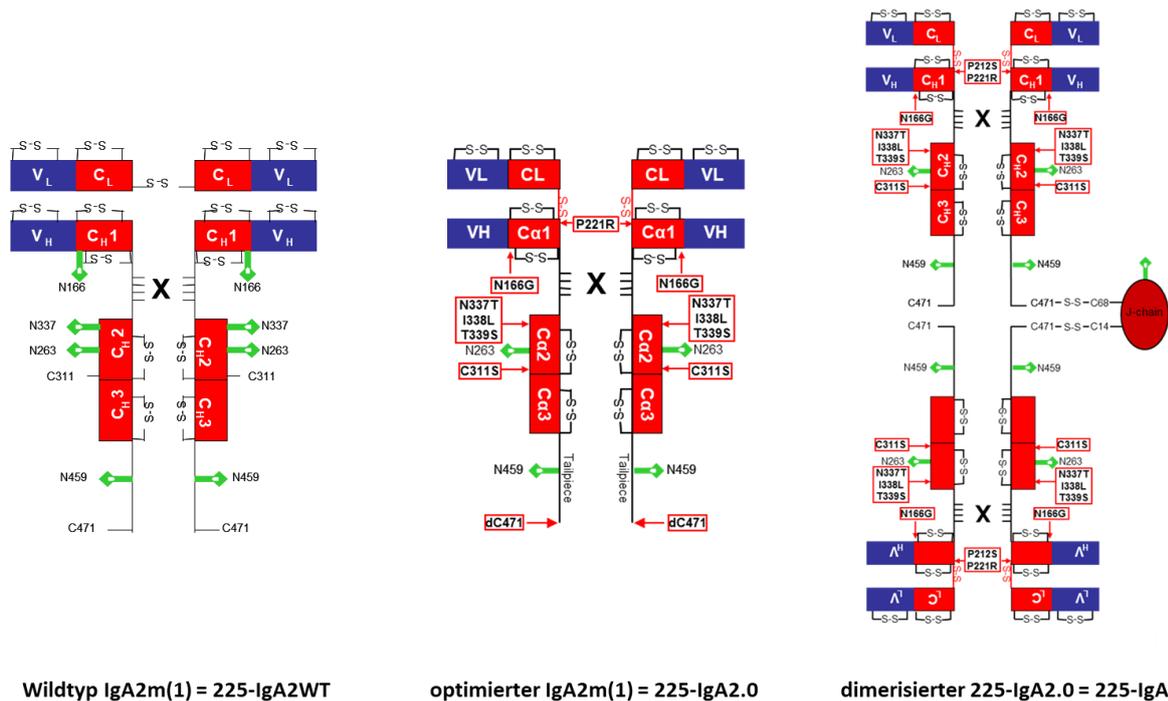
Die Zytotoxizität von Granulozyten gegenüber Tumorzellen kann durch den Einsatz therapeutischer Antikörper verstärkt werden. Die bereits zugelassenen therapeutischen Antikörper gehören der IgG-

Unterklasse an, die bei den Granulozyten sowohl an aktivierende Fc $\gamma$ -Rezeptoren (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIc, Fc $\gamma$ RIIIa) als auch an inhibitorische Fc $\gamma$ -Rezeptoren (Fc $\gamma$ RIIb und Fc $\gamma$ RIIIb) binden (Anderson u. a. 1990; Alevy u. a. 1993; Golay u. a. 2019). Dabei hat der im Ruhezustand stark exprimierte Decoy-Rezeptor Fc $\gamma$ RIIIb, der IgG-Antikörper bindet und keine intrazelluläre Signalweiterleitung auslöst, eine limitierende Funktion auf die Effizienz der Neutrophilen, Tumorzellen durch therapeutische Antikörper abzutöten. Für Cetuximab, ein IgG1-Antikörper, der bereits im klinischen Einsatz ist, konnte gezeigt werden, dass er Granulozyten für die ADCC aktivieren kann (Sumita Trivedi u. a. 2016). Bei der ADCC durch Granulozyten kommt es durch den oxidativen Burst zur ROS-Bildung sowie zur Sezernierung der Inhalte primärer, sekundärer und tertiärer Granula, um die Tumorzellen abzutöten. Dieser Mechanismus wird auch durch andere therapeutische IgG-Antikörper wie Rituximab, Trastuzumab, Panitumumab und Alemtuzumab, welche gegen unterschiedliche Oberflächenantigene auf verschiedenen Tumorzellentitäten gerichtet sind, genutzt (van der Kolk u. a. 2002; Treffers u. a. 2018; Wislez u. a. 2001; Y. Hu u. a. 2009). *In vitro* Assays belegen, dass Granulozyten, die durch Rituximab mit CD20<sup>+</sup> CLL-Zellen quervernetzt werden, die Tumorzellen durch antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose eliminieren (Golay u. a. 2013; Shibata-Koyama u. a. 2009). Neuere Studien zeigen, dass entgegen der vollständigen Phagozytose der Zielzellen nur Membranteile durch Trogozytose von den Granulozyten aufgenommen werden. Dabei wurde auch beobachtet, dass die Oberflächenexpression des Antigens stark mit der Effizienz der Trogozytose korreliert (Valgardsdottir u. a. 2017). Allerdings führt die Trogozytose zu einem Verlust des Antigens auf der Oberfläche der Zielzellen und trägt so möglicherweise zur Resistenz der Tumorzellen gegenüber der Antikörpertherapie bei (Rossi u. a. 2013; Strizova u. a. 2019). Der Mechanismus, der durch die Aufnahme vieler Membranteile der Zielzelle durch die Granulozyten zum Zelltod führt, wurde als Trogoptose beschrieben (Matlung u. a. 2018). Die Zytotoxizität durch Trogoptose basiert auf der Interaktion des Fc-Rezeptors mit den opsonisierenden Antikörpern und ist weder abhängig von der Freisetzung der intrazellulären Granula, noch von der Aktivität der NADPH-Oxidase (Treffers u. a. 2020). Eine Inhibition des CD47/SIRP $\alpha$ -Signalwegs, eines wichtigen immunregulatorischen Checkpunktes, verstärkt die antitumorale Aktivität neutrophiler Granulozyten (X. W. Zhao u. a. 2011; Treffers u. a. 2020). Dieses beschriebene antitumorale Potential von neutrophilen Granulozyten in der Bekämpfung von Tumorzellen könnte durch gezielten Einsatz von Immuntherapeutika in der Tumorthherapie in Zukunft deutlich besser genutzt werden.

## 1.5 Optimierung der IgA-Antikörper für verbesserte biochemische und funktionelle Eigenschaften

Valerius et al. zeigten bereits 1997, dass IgA-Antikörper über den Fc $\alpha$ RI neutrophile Granulozyten für das Abtöten von Tumorzellen aktivieren können (Valerius u. a. 1997). Erst 2013, nach der Entwicklung von Fc $\alpha$ RI transgenen Mäusen, konnte dann auch im Mausmodell die Relevanz von IgA-Antikörpern in der Tumorthherapie *in vivo* nachgewiesen werden (Boross u. a. 2013). Obwohl gezeigt werden konnte, dass neutrophile Granulozyten Tumorzellen deutlich besser abtöten, wenn sie über Fc $\alpha$ RI quervernetzt werden, gibt es bis heute keine klinischen Studien zu Tumorthapien mit IgA-Antikörpern (Brandsma u. a. 2019). Um IgA für die Behandlung von Tumoren einsetzen zu können, müssen mehrere Modifikationen vorgenommen werden, da sie schlecht produzierbar sind, zudem eine kurze Serumhalbwertszeit haben und heterogene Glykosylierungen aufweisen (van Tetering u. a. 2020). IgA-Antikörper vom Subtyp IgA1 sind entscheidend an der Entwicklung einer IgA-Nephropathie beteiligt, einer Erkrankung, bei der es zu Immunkomplexablagerungen in den Glomeruli der Niere kommt (Nihei u. a. 2023). Zudem zeigten sich IgA2-Antikörper überlegen gegenüber dem IgA1-Subtyp in der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten für die ADCC (Beyer u. a. 2009). Als vielversprechender Ausgangspunkt für das Engineering hat sich deshalb der IgA2m(1)-Subtyp angeboten. Zusätzlich zu den bereits zuvor genannten Vorteilen verfügt dieser, im Gegensatz zu IgA1, nicht über die verlängerte Gelenkregion, die anfällig gegenüber dem Abbau durch bakterielle Proteasen ist. Von *Clostridium sporogenes* ist allerdings eine Protease beschrieben, die auch den IgA2m(1)-Subtyp, nicht jedoch den IgA2m(2)-Subtyp spaltet (Fujiyama u. a. 1985). Durch das Einfügen der P221R Mutation in den IgA2m(1)-Subtyp, die eine kovalente Bindung zwischen der leichten und der schweren Kette ermöglicht, wird der Abbau durch *Clostridium sporogenes* verhindert. Zusätzlich kommt es durch die kovalente Verbindung zu einer deutlichen Stabilitätssteigerung, ohne die Funktionalität zu beeinträchtigen (Lohse u. a. 2012). Um ein Monomer zu erhalten, kann durch die Deletion des Cystein 471 und des Tyrosins 472 die Dimerisierung oder Komplexbildung durch Bindung an die J-Chain verhindert werden (Calero u. a. 1994). Dies führte jedoch sowohl bei IgA1 als auch IgA2-Wildtyp und IgA2-P221R mutierten Antikörpern zu einer verminderten Effizienz in funktionalen Assays im Vergleich zum jeweils äquimolar eingesetzten Dimer (Lohse u. a. 2011; Brunke u. a. 2013). Lohse et al. publizierten 2016 einen weiterentwickelten anti-EGFR IgA-Antikörper, der eine verbesserte Pharmakokinetik und therapeutische Effizienz *in vivo* aufweist (Lohse u. a. 2016). Hierzu wurde – neben der P221R-Mutation zur Stabilitätserhöhung und der Deletion C471 sowie der Deletion des Tyrosin 472 zur Verhinderung der Dimerisierung – durch den Austausch des Cystein 311 zu Serin eine weitere Mutation zur Verhinderung der Komplexbildung mit Serumproteinen eingeführt (Abbildung 7). Durch den Austausch der Aminosäuren an den

Positionen 166, 337, 338 und 339 in die jeweiligen Aminosäuren des IgA1-Subtyps wurde das Glykosylierungsprofil von acht auf vier N-Glykane reduziert. Der daraus resultierende Antikörper 225-IgA2m(1)-N166G-P221R-C331S-N337T-I338L-T339S-dC471-dY472 wird im Folgenden IgA2.0 genannt und dient dieser Arbeit als Ausgangspunkt. Durch Wiedereinführung des Tailpiece Cystein 471 und damit auch des Tyrosin 472 konnte das entsprechende Dimer, infolgedessen als IgA3.0 bezeichnet, produziert werden. Die variable Antigen-Bindedomäne wurde vom bereits zugelassenen IgG-Antikörper Cetuximab, der gegen den EGFR gerichtet ist, übernommen.



**Abbildung 7. IgA-Antikörper Engineering**

Schematische Darstellung des IgA2m(1) Antikörpers als (A) Wildtyp, (B) optimiertes Monomer und (C) optimiertes Dimer. Die eingefügten Mutationen zur Verbesserung der Stabilität und Pharmakokinetik sind durch rote Pfeile mit der jeweiligen veränderten Aminosäure gekennzeichnet. N-Glykosylierungen sind in Grün dargestellt.

**1.6 Der EGF-Rezeptor**

**1.6.1 Struktur – Funktion – Regulation**

Der EGF-Rezeptor (EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor) und dessen Ligand EGF (Epidermal Growth Factor) wurden in den 1980ern durch Stanley Cohen beschrieben, der 1986 für seine Arbeit an den Wachstumsfaktoren mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Der EGF-Rezeptor gehört – zusammen mit den drei weiteren Mitgliedern ErbB2 (HER2/NEU), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) –

zur HER/ErbB-Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen (Burgess 2008). Diese Transmembranrezeptoren sind aufgebaut aus den beiden extrazellulären homologen Domänen I und III, welche die Ligandenbindung vermitteln, und den beiden extrazellulären cysteinreichen Domänen II und IV. Intrazellulär bestehen sie aus einer Juxtamembranregion, einer Tyrosinkinasedomäne und einer C-terminalen regulatorischen Region (Ullrich u. a. 1984; Bajaj u. a. 1987; Ogiso u. a. 2002). Neben EGF selbst wurden sechs weitere aktivierende Liganden mit einer EGF-ähnlichen Domäne für den EGFR beschrieben, die alle als membrangebundene Vorläufer produziert werden und durch ADAM Proteasen in ihre aktive Form gespalten werden: Transforming growth factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), Betacellulin, heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), Amphiregulin, Epiregulin und Epigen (Harris u. a. 2003; Adrain und Freeman 2014). In Abwesenheit seiner Liganden liegt der Rezeptor hauptsächlich in seiner inaktiven Form als Monomer in der Plasmamembran vor. Dabei nimmt die extrazelluläre Region eine geschlossene, autoinhibitorische Konformation ein, bei der der Dimerisierungsarm von Domäne II intramolekular mit der Domäne IV interagiert (Ferguson u. a. 2003). Durch die Bindung der Liganden an die Domänen I und III kommt es zu einer starken Konformationsänderung, die den Dimerisierungsarm freilegt und zu einer Rezeptordimerisierung führt, die ausschließlich durch Rezeptor-Rezeptor-Kontakte und nicht durch den Liganden vermittelt wird (Burgess u. a. 2003). Der EGF-Rezeptor kann mit sich selbst ein Homodimer bilden, kommt aber auch als Heterodimer, gebunden an eines der drei anderen ErbB/HER-Familienmitglieder, vor.

Die Ligandenbindung und Dimerisierung führt zur allosterischen Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinasen (X. Zhang u. a. 2006): Durch die extrazelluläre Konformationsänderung und Dimerisierung nach der Ligandenbindung formen die intrazellulären Kinasen ein asymmetrisches Dimer, wodurch eine mehrstufige Autophosphorylierung induziert wird. Zur Stabilisierung des asymmetrischen Dimers ist die Juxtamembrandomäne erforderlich (Thiel und Carpenter 2007; Red Brewer u. a. 2009), die wiederum mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in der Plasmamembran interagiert und zu einem Clustering der Lipide um das Protein herum führt, welches die aktivierte Konformation der Kinase fördert (Abd Halim u. a. 2015). Die C-terminale Region hat mehrere Autophosphorylierungsstellen sowie eine autoinhibitorische Funktion auf die Tyrosinkinaseaktivität und verhindert im ligandenfreien Zustand die Bildung des asymmetrischen Dimers (Pines u. a. 2010; Kovacs u. a. 2015). Kommt es zur Aktivierung der Tyrosinkinase, werden die Tyrosine in der C-terminalen Domäne phosphoryliert und dienen als Erkennungsstellen für Bindeproteine mit entweder einer Src homology 2- oder einer Phosphotyrosin-binde-Domäne (Schlessinger und Lemmon 2003). Die Bindung des Adapterproteins GRB2 vermittelt die Aktivierung des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalwegs, der den Zellzyklus reguliert und damit die Zellproliferation vorantreibt (Lowenstein u. a. 1992). Die regulatorische Untereinheit p85 vermittelt die Bindung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die zur Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs führt, welcher

die Apoptose hemmt und das Überleben sichert. Viele verschiedene physiologische Effekte vermittelt der EGF-Rezeptor über die Signalkaskade der PLC $\gamma$  und der Proteinkinase C (PKC) (Margolis u. a. 1990). Die Serin-Threonin-Proteinkinase C führt über ihre vielzähligen Substrate zur Angiogenese, Migration, Adhäsion, gesteigerten Gentranskription sowie Gentranslation, Zellproliferation und Überleben (Oliva u. a. 2005). Unter Umgehung von RAS kann ebenfalls der RAF/MEK/ERK-Signalweg durch die PKC aktiviert und die Zellproliferation gesteigert werden (Basu und Sivaprasad 2007). Viele weitere Signalmoleküle binden an die phosphorylierte C-terminale Region des EGF-Rezeptors und steuern zelluläre Effekte sowie die Endozytose des Rezeptors. In Abwesenheit des Liganden ist der Rezeptor überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert. Dabei steht der niedrigen Endozytoserate ein Recycling des Rezeptors an die Oberfläche entgegen.

Zur Regulation der EGFR-Signaltransduktion kann nach der Aktivierung des Rezeptors die E3 Ubiquitin-Protein-Ligase CBL an den EGFR direkt oder über GRB2 binden und diesen mit Ubiquitin für den lysosomalen Abbau markieren (Levkowitz u. a. 1998; H. Waterman u. a. 2002). Die Internalisierung des Rezeptors erfolgt entweder über clathrinbeschichtete Vesikel (Clathrin mediated endocytosis CME) oder clathrinunabhängig (non-clathrin endocytosis NCE). EGFR-CME konnte bei allen Ligandenkonzentrationen gezeigt werden und ist abhängig von dem Adapterprotein 2, das bereits auf der Plasmamembran zur Clusterbildung des EGFR in clathrinbeschichteten Vertiefungen führt und damit die Rezeptoraktivierung erleichtert (Goh u. a. 2010; Jiang u. a. 2003; Aguet u. a. 2013; Kadlecova u. a. 2017). Wird der Rezeptor über clathrinvermittelte Endozytose aufgenommen, resultiert daraus häufig das Recycling des Rezeptors von den frühen Endosomen zurück an die Plasmamembran, wodurch auch bei limitierten Ligandenkonzentrationen die Signalweiterleitung über den EGFR aufrechterhalten bleibt (Sigismund u. a. 2008). Zusätzlich wird dabei durch den gerichteten Transport des Rezeptors an spezifische Plasmamembranregionen eine Polarisierung der Zelle, welche eine wichtige Rolle bei der Migration und Invasion spielt, aufrechterhalten oder neu erzielt (Bisi u. a. 2013; Sigismund u. a. 2012). Mechanismen für die clathrinunabhängige Endozytose werden erst bei hohen EGF Konzentrationen über 10 ng/ml aktiviert und schützen vor übermäßiger EGFR-Signalwegsaktivität, indem die Signalweiterleitung durch den lysosomalen Abbau des EGF-Rezeptors terminiert wird (Orth u. a. 2006; Caldieri u. a. 2017). EGFR-NCE kommt vor allem in spezifisch polarisierten Regionen der Zellmembran vor und wird mit der Migration in Verbindung gebracht (Boucrot u. a. 2015). Die endgültige Entscheidung über das Schicksal des Weitertransports des EGF-Rezeptors wird nach der Internalisierung in den frühen Endosomen getroffen und ist neben der Ligandenkonzentration und dem daraus resultierenden Ubiquitinierungsstatus auch abhängig von der Bindungsstärke des gebundenen Liganden (Villaseñor u. a. 2015). TGF- $\alpha$ , Epigen, Epiregulin und Amphiregulin beispielsweise lösen durch den leicht sauren pH-Wert im Endosom ihre Rezeptorbindung, weshalb die freien Rezeptoren oft zur Plasmamembran recycelt werden und die

Signaltransduktion aufrechterhalten bleibt. Komplexe mit EGF, Betacellulin und HB-EGF bleiben stabil und ubiquitiniert, weshalb sie häufiger durch lysosomalen Abbau degradiert werden (Roepstorff u. a. 2009). Das Verständnis für die Regulation der EGFR-Signaltransduktion durch Membrantransport spielt eine wichtige Rolle bei der zielgerichteten Tumorthherapie.

### **1.6.2 Der EGF-Rezeptor in der Tumorthherapie**

Der EGF-Rezeptor ist eines der am häufigsten (über-)exprimierten Membranproteine auf Tumorzellen. Durch genetische Veränderungen ist der EGFR-Signalweg bei vielen soliden Tumoren dauerhaft aktiv. Überexpression des Rezeptors, vermehrte auto- und parakrine Ligandenproduktion oder kinaseaktivierende Mutationen führen zur anhaltenden Signaltransduktion, die das Wachstum und Überleben der Tumorzellen anregt (Roskoski 2014; Sigismund u. a. 2018). Aus diesem Grund ist der EGF-Rezeptor ein vielversprechender Angriffspunkt in der zielgerichteten Tumorthherapie. Für die Therapie sind in der Europäischen Union bereits vier Generationen von Tyrosinkinase-Inhibitoren zugelassen, welche spezifisch die Kinaseaktivität blockieren. Außerdem finden bereits zwei monoklonale Antikörper praktische Anwendung: Cetuximab und Panitumumab. Cetuximab ist ein seit 2004 zugelassener, chimärer monoklonaler IgG1-Antikörper, der für die Behandlung des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms sowie von lokal fortgeschrittenen oder rezidivierenden und/oder metastasierenden Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Hals-Bereich zum Einsatz kommt (EMA 2018a). Panitumumab ist ein humaner monoklonaler IgG2-Antikörper, der für die Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms zugelassen wurde (EMA 2018b). Beide Antikörper wirken, indem sie – neben der Unterdrückung der Ligandenbindung und Dimerisierung – zur Endozytose und zum teilweisen Abbau des Rezeptors beitragen (L. Wu u. a. 2020; Desjarlais u. a. 2007; Van den Eynde u. a. 2011). Zusätzlich beeinflussen die Antikörper das Immunsystem durch die Vermittlung der ADCC mittels Bindung an Immunzellen sowie durch die Aktivierung des Komplementsystems für die CDC (Kurai u. a. 2007; S. Trivedi u. a. 2015). Allerdings zeigt sich, dass der Einsatz von monoklonalen Antikörpern durch angeborene und erworbene Resistenzen lediglich begrenzt effektiv ist und nur eine geringe Patientenzahl von der Therapie profitiert. Dabei wird vor allem das progressionsfreie Überleben, nicht aber das Gesamtüberleben verlängert (Wheeler u. a. 2010). Unter der Therapie entwickeln die meisten Patienten, die zu Beginn auf die Therapie angesprochen haben, innerhalb weniger Monate zahlreiche Resistenzmechanismen, welche die Wirkung der monoklonalen Antikörper verringern (Cunningham u. a. 2004; Bardelli und Siena 2010). Angeborene und erworbene Resistenzen betreffen häufig Veränderungen in den dem EGFR nachgeschalteten Signalwegen RAS/RAF/MEK/ERK und/oder PI3K/AKT/mTOR, die zur konstitutiv aktiven Signalweiterleitung führen (Roock u. a. 2010). Sekundäre Mutationen in der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors

verhindern außerdem die Bindung der therapeutischen Antikörper (Van Emburgh u. a. 2016). Auch das Tumormikromilieu kann maßgeblich zur Resistenzentwicklung beitragen, indem es beispielsweise durch die Anhäufung von Hyaluronsäure eine Barriere für die Antikörper und Effektorzellen aufbauen kann (Singha u. a. 2015). Inwiefern Virusinfektionen zur Resistenzentwicklung beitragen können, ist noch nicht abschließend geklärt. Cetuximab ist für die Behandlung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs zugelassen, eine Tumorentität, die häufig mit einer HPV-Infektion assoziiert ist. Obwohl der HPV-Status als prognostischer Marker herangezogen werden kann, konnte bisher kein Zusammenhang zwischen dem Therapieansprechen mit Cetuximab und dem HPV-Status des Tumors festgestellt werden (James A. Bonner u. a. 2017).

## 1.7 Humanes Papillomvirus

Die Familie der Papillomaviridae umfasst derzeit 227 bekannte humane Papillomviren (HPV) (Van Doorslaer u. a. 2017), deren zirkuläres doppelsträngiges DNA-Genom von einem unbehüllten Kapsid umgeben ist. Die humanen Papillomviren sind epitheliotrop und können über Mikroläsionen im Gewebe die Basalzellen von kutanen und mukosalen Epithelien infizieren. Während Infektionen mit Niedrigrisiko-HPV-Typen vorrangig zur Entstehung von gutartigen Warzen führen, begünstigt eine Infektion mit Hochrisiko-HPV-Typen (HR-HPV) wie HPV16 und HPV18 die maligne Transformation des Gewebes. Weltweit sind etwa 5,2 % aller Krebserkrankungen ursächlich auf die Infektion mit einem Hochrisiko-HPV zurückzuführen. Dabei werden nahezu alle Zervixkarzinome durch HPV verursacht. Auch bei Tumoren des Analbereiches, des Oropharynx, der Vagina und Vulva sowie des Penis wird in vielen Fällen ein Zusammenhang mit HPV angenommen. Nach einer mukosalen Infektion mit dem HR-HPV16 kommt es zu einer initialen Virusgenom-Amplifikation in den infizierten teilungsaktiven Basalzellen, welche eine persistierende Infektion sicherstellt (Doorbar 2012). Für die produktive Replikation der HPV16 Viren in den differenzierten Zellen der suprabasalen Zellschichten greift das Virus mit seinen viralen Onkoproteinen E6 und E7 direkt in den Zellzyklus sowie in die DNA-Replikation der Zelle ein. Dies treibt die Proliferation der Zelle voran und begünstigt dadurch die Tumorentstehung. Hierzu induziert E6 den proteasomalen Abbau des Tumorsuppressors p53, indem es die E3 Ubiquitinligase E6AP (E6 assoziiertes Protein) rekrutiert (Scheffner u. a. 1990; Huibregtse u. a. 1993), und verhindert damit den Zellzyklusarrest bei Zellschäden über p21. Das proapoptotische Protein BAK wird ebenfalls, induziert durch E6, E6AP abhängig abgebaut und verhindert so die Apoptose der infizierten Zelle (Thomas und Banks 1998). Zur Immortalisierung der infizierten Zelle stimuliert E6 außerdem die katalytische Untereinheit hTERT der Telomerase (Klingelutz u. a. 1996; Veldman u. a. 2001). Ein weiterer Schritt der malignen Transformation ist der Verlust der Zellpolarität. Hierzu bindet E6 an zelluläre Proteine mit PDZ-Domäne und verhindert damit die

Organisation von Proteinkomplexen, welche dem Erhalt und Aufbau der Zellpolarität dienen (Watson u. a. 2003). Das Onkoprotein E7 führt zur Entkopplung der Proliferation vom Differenzierungsstatus, so dass die differenzierten Epithelzellen wieder in den Zellzyklus eintreten und die DNA-Replikation zur Virusvermehrung vorangetrieben wird. Hierzu inaktiviert E7 den Tumorsuppressor Retinoblastom-Protein (pRb) durch proteasomalen Abbau und entlässt dadurch den Transkriptionsfaktor E2F aus dessen inhibierender Bindung (Scheffner u. a. 1992). E2F induziert die Transkription wichtiger Zellzyklusregulatoren, die den Eintritt in die Synthese-Phase stimulieren. Das Onkoprotein E5 trägt ebenfalls zur Proliferation der suprabasalen Zellschichten bei. Ein Mechanismus dabei ist die Verstärkung der Signaltransduktion über den EGF-Rezeptor (Pim u. a. 1992). Unter anderem durch Hemmung der endosomalen Azidifizierung kommt es zum verzögerten Abbau sowie zum Recycling aktivierter EGF-Rezeptoren und dadurch zur verlängerten Signalübertragung auch bei niedrigen Ligandenkonzentrationen (Straight u. a. 1995). Die HR-HPV Typen greifen also in vielfältiger Weise in den Stoffwechsel und die Signalübertragung der Zelle ein und können dadurch zur malignen Transformation des infizierten Gewebes führen.

## 1.8 Kopf-Hals-Tumoren

Zur Gruppe der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (Head and Neck squamous cell carcinoma (HNSCC)), die weltweit die sechsthäufigste Krebsart darstellt (GLOBOCAN 2020), zählen Mundhöhlenkarzinome sowie Pharynx- und Larynxkarzinome, die aus der Schleimhaut hervorgehen. Während die Tumore der Mundhöhle und des Larynx primär mit Rauchen und extensivem Alkoholabusus assoziiert sind (Hashibe u. a. 2009), gehen weltweit 52,9 % der Tumore des Oropharynx mit einer vorangegangenen Infektion mit den humanen Hochrisiko-Papillomviren, vor allem HPV16, einher (Stein u. a. 2015). Während der Tabakkonsum und damit auch die Prävalenz der hierdurch induzierten HNSCCs rückläufig ist, zeigt sich vor allem in westlichen Ländern ein Trend hin zu HPV-induzierten Tumoren mit einer HPV-Prävalenz von über 70 % (Mehanna u. a. 2013). HNSCCs sind durch genetische Instabilität gekennzeichnet. Multiple genetische Veränderungen durch Verlust oder Vermehrung chromosomaler Regionen führen zur Transformation von Schleimhautzellen in ein invasives Plattenepithelkarzinom. Dabei konnte gezeigt werden, dass in HPV-negativen Tumoren vor allem Tumorsuppressorgene, hauptsächlich *CDKN2A* und *TP53*, durch Mutation oder Deletion inaktiviert sind (Cancer Genome Atlas Network 2015). HPV-positive Tumoren unterscheiden sich von diesen dagegen deutlich im Mutationsstatus. Da die viralen Onkoproteine E6 und E7 die Funktion des Tumorsuppressors p53 und des Zellzyklusregulators pRb durch proteasomalen Abbau inaktivieren, kommt es seltener zu Veränderungen in den entsprechenden Genen (Hafkamp u. a. 2003). Zusätzlich ist in HPV-positiven Tumoren häufiger der PI3K-Signalweg, der zum Überleben, zum Wachstum, zur

Migration und zu einem veränderten Stoffwechsel der Zelle beiträgt, durch Mutationen und Amplifikationen aktiviert (Nichols u. a. 2013). Unabhängig vom HPV-Status ist in vielen Kopf-Hals-Tumoren der EGFR-Signalweg durch Mutation, Genamplifikation und/oder Überexpression des Rezeptors selbst sowie seiner Liganden aberrant aktiviert. Dies ist mit einer schlechteren Überlebensrate assoziiert (Grandis und Twardy 1993; Szabó u. a. 2011; Leemans u. a. 2011; Zhu u. a. 2013). Für die Therapie lokal begrenzter Tumoren wird klassisch die chirurgische Entfernung, Bestrahlung, Chemotherapie oder kombinierte Radiochemotherapie angewandt. Für rezidivierende und metastasierte Tumoren besteht zusätzlich die Möglichkeit einer Immuntherapie. Zurzeit zugelassen sind die Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab, humane beziehungsweise humanisierte IgG4 monoklonale Antikörper, die gegen den Immun-Checkpoint-Rezeptor PD-1 gerichtet sind (Burtness u. a. 2019). Zur Anwendung kommt auch Cetuximab, ein chimärer monoklonaler IgG1-Antikörper gegen den EGF-Rezeptor. Cetuximab ist in Kombination mit einer Strahlentherapie für lokal fortgeschrittene Tumore (J. A. Bonner u. a. 2000) und in Kombination mit einer platin-basierten Chemotherapie für rezidivierende und metastasierende Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Hals-Bereich zugelassen (Vermorken u. a. 2008). Trotz der hohen EGFR-Expression in den Kopf-Hals-Tumoren hat sich unter den EGFR-Inhibitoren bislang nur Cetuximab als effektiv in deren Therapie erwiesen, jedoch eignet sich die EGFR-Expression alleine nicht als prädiktiver Faktor für die Therapie (Bossi u. a. 2016). Eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression und dem Ansprechen auf Immuntherapie spielt auch das Tumormikromilieu, das in HNSCCs durch die Infiltration von myeloischen Zellen charakterisiert ist. Metaanalysen stellten einen Zusammenhang dar zwischen dem Verhältnis von Granulozyten zu Lymphozyten vor der Behandlung und dem Gesamtüberleben, dem krankheitsfreien Überleben und dem progressionsfreien Überleben (Yang u. a. 2019). Patienten mit vielen zirkulierenden und infiltrierenden neutrophilen Granulozyten haben ein erhöhtes Risiko für eine schlechte Prognose. Einige Studien konnten zeigen, dass das Immunzellinfiltrat durch Chemokine der Tumorzellen in tumorfördernde Granulozyten polarisiert wird (Trellakis u. a. 2011; Dumitru u. a. 2013; Galdiero u. a. 2013; Valero u. a. 2017). Tumorfördernde Granulozyten sind also zentral an der Metastasierung von HNSCC-Tumoren beteiligt (Busso-Lopes u. a. 2022) und stellen eine vielversprechende Zellpopulation dar, die mit IgA-Antikörpern für die zielgerichtete Immuntherapie nutzbar gemacht werden könnte.

## 1.9 Peniskarzinom

Das Peniskarzinom stellt eine weitere, wenn auch sehr seltene Tumorentität dar, die in etwa der Hälfte aller Fälle (50,8 % Prävalenz von HPV-DNA) mit einer Infektion mit einem humanen Hochrisiko-Papillomvirus assoziiert ist (Olesen u. a. 2019). Hierbei ist in HPV-positiven Tumoren zu 68,3 % das Hochrisiko-HPV16 nachgewiesen worden. Ein früher Schritt in der Krebsentstehung ist die Integration des HPV-Genoms in das Genom der infizierten Zelle. Dies führt zu unkontrolliertem Wachstum und fördert die Dedifferenzierung (Kidd u. a. 2017). Neben HPV scheinen auch die Rezeptoren der HER/ErbB-Familie eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese des Peniskarzinoms zu spielen (Stankiewicz u. a. 2011). Einige Studien zeigen eine starke Expression des EGF-Rezeptors und diskutieren ihn als potenzielles Target für eine zielgerichtete Therapie, welche für das Peniskarzinom bislang nicht existiert (Lavens u. a. 2010; Gou u. a. 2013; Chaux u. a. 2013; McDaniel u. a. 2015). Eine Phase-II-Studie mit Dacomitinib, einem Pan-HER-Tyrosinkinase-Inhibitor, zeigte sich als erfolgversprechender Ansatz bei regional fortgeschrittenem oder metastasiertem Plattenepithelkarzinom des Penis (Necchi u. a. 2018). Darüber hinaus gibt es Fallberichte über ein Ansprechen auf die Therapie mit EGFR-gerichteten Antikörpern Cetuximab und Panitumumab (J. Wu u. a. 2016; Necchi u. a. 2016). Zudem demonstrierte eine retrospektive Studie mit 17 Patienten, die mit Cetuximab oder mit Cetuximab in Kombination mit Chemotherapie behandelt wurden, eine partielle Rückbildung des Tumor bei 23,5 % der behandelten Patienten (Carthon u. a. 2014). Neuere Studien zeigten mittels Exom-Sequenzierung, dass das sehr seltene Plattenepithelkarzinom des Penis (PSCC) in seiner Mutationssignatur eine hohe Ähnlichkeit zum HNSCC und dem Ösophagus-Plattenepithelkarzinom (ESCC) aufweist (Chahoud u. a. 2021). Dieses Erkenntnis könnte genutzt werden, um vielversprechende Therapieansätze der häufiger vorkommenden HNSCC und ESCC in die Behandlung des PSCC einfließen zu lassen. Auch im Peniskarzinom haben das Tumormikromilieu sowie infiltrierende Immunzellen Einfluss auf die Tumorprogression und die Lymphknotenmetastasierung (Joshi u. a. 2022). Eigene Arbeiten der Forschungsgruppe konnten zeigen, dass *in vitro* neutrophile Granulozyten für die ADCC von Peniskarzinom-Zelllinien aktiviert werden können. Dies erfolgt Fc $\alpha$ RI-abhängig durch die Zugabe von IgA2-Antikörper, der gegen den EGFR gerichtet ist (Bernhard u. a. 2021). Zudem zeigen unsere Ergebnisse, dass das Tumormikromilieu HPV-positiver Peniskarzinome in seiner Zytokinzusammensetzung Neutrophile anlockt und das Potential besitzt, diese für den ADCC zu stimulieren. Die Immuntherapie mit IgA2-Antikörpern könnte also auch für das HPV-positive Peniskarzinom ein vielversprechender neuer Therapieansatz bedeuten.

## 1.10 EMMPRIN (CD147)

EMMPRIN rückte in den letzten Jahren sowohl als diagnostischer und prognostischer Marker vieler Tumorentitäten als auch als therapeutisches Target der zielgerichteten Therapie in den Fokus der Forschung. EMMPRIN oder auch CD147 ist ein Glykoprotein der Immunglobulin-Familie und wurde nach einer seiner Funktionen der Regulation von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) benannt (EMMPRIN = Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer) (Biswas u. a. 1995). Die Aktivierung der Metalloproteinasen ermöglicht der Tumorzelle den Abbau der umliegenden extrazellulären Matrix und stellt einen wichtigen Schritt bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen dar. Das Transmembranprotein wird von Epithelzellen sowie von neuronalen, lymphoiden und myeloiden Zellen exprimiert (Spring u. a. 1997). Es liegt – je nach Gewebe – in unterschiedlichen Glykoformen und vier alternativen Spleißvarianten vor, wobei Isoform 2 mit zwei extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen die dominierende ist (Liao u. a. 2011). Zwei membranständige CD147- (mCD147) Moleküle auf einer Zelle können miteinander interagieren, um ein *cis*-Homodimer zu bilden. Alternativ bilden zwei mCD147-Moleküle auf der Oberfläche benachbarter Zellen durch eine *trans*-Interaktion einen Komplex (Yu u. a. 2008). Sowohl die Glykosylierung als auch die Dimerisierung sind essentiell für die Induktion von MMPs (J. Sun und Hemler 2001; Cui u. a. 2012). Es wurde gezeigt, dass mCD147 die Expression und Aktivität von MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-9 in Tumorzellen selbst sowie in umliegenden Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen und Makrophagen erhöht (Nabeshima u. a. 1991; Kataoka u. a. 1993; Kanekura u. a. 2002; Y. Tang u. a. 2004). Zusätzlich kommt es durch die Interaktion von mCD147 mit Integrinen an Zell-Zell-Kontaktstellen zur weiteren lokalisierten Induktion und Aktivierung von MMPs (J. Tang u. a. 2008). CD147 verstärkt also den Abbau extrazellulärer Matrix über MMPs und damit die Invasivität und Metastasierung der Tumorzellen. Als weitere wichtige tumorfördernde Wirkung von mCD147 wurde die Unterstützung der aeroben Glykolyse beschrieben (Floch u. a. 2011). Dabei fungiert mCD147 als Chaperon für die Monocarboxylat-Transporter MCT-1 und MCT-4 (Kirk u. a. 2000). In dieser Rolle ist mCD147 essentiell für deren Membranlokalisierung sowie deren Funktion, Laktat über die Plasmamembran zu exportieren (Wilson u. a. 2005). Neben mCD147 kann das gesamte Protein auch mittels Mikrosiveln oder Exosomen als lösliches sCD147 sezerniert oder ein Fragment des Proteins von der Zelloberfläche abgespalten werden. Für letzteres wird entweder durch MMP-14 ein 22 kDa großes Fragment mit der N-Terminalen Ig-Domäne oder, beim sogenannten Shedding, durch ADAM-12 ein 48 kDa großes Protein mit beiden extrazellulären Ig-Domänen abgespalten (Egawa u. a. 2006; Albrechtsen u. a. 2019). Sowohl membranständiges als auch lösliches CD147 können die Migration und das Überleben der Tumorzellen fördern, indem sie über HIF-2 $\alpha$  (Hypoxie-induzierter Faktor), VEGFR-2 und VEGF die Angiogenese verstärken (Bougatef u. a. 2009). Des Weiteren regt sCD147

durch die autokrine Bindung an mCD147 die Proliferation der Zelle an. Die anschließende Internalisierung führt zu einer positiven Verstärkung der endogenen mCD147 Produktion und Expression auf der Oberfläche (Knutti u. a. 2015). CD147 unterstützt durch Interaktion mit den aufgeführten und einer Reihe weiterer Moleküle in vielfältiger Art und Weise die Tumorprogression, Invasion und Metastasierung. Aufgrund der Überexpression von CD147 auf der Oberfläche von mehr als 20 Tumorentitäten, die mit einer schlechten Prognose bezüglich Überleben und Progression verbunden ist, bietet sich CD147 als Zielstruktur der zielgerichteten Tumorthherapie an (Landras u. a. 2019; Barillari u. a. 2022). Einige gegen CD147 gerichtete Antikörper und auch sogenannte „small molecule“-Inhibitoren sind Gegenstand aktueller Forschung. Der monoklonale MEM/M6-Antikörper beispielsweise blockiert die Assoziation mit MCT-1 und damit den Laktattransport und führte in Kolonkarzinom-Zelllinien zum Zelltod (Baba u. a. 2008). In *in vivo* Mausexperimenten konnte der gegen CD147 gerichtete 161-Antikörper die MMP-9 und VEGF Produktion herabsetzen, die ADCC durch Makrophagen verbessern und somit die Tumorprogression inhibieren (Walter u. a. 2016; Hijaze u. a. 2021). Zur therapeutischen Anwendung im Menschen wurden bereits einige verschiedene Formate des anti-CD147/HAb18-Antikörpers entwickelt und als Konjugate mit zytotoxischen oder radioaktiven Medikamenten *in vivo* an Mäusen beziehungsweise in Phase I / II - Studien eingesetzt (Chen u. a. 2006; Huhe u. a. 2019). Der niedermolekulare Inhibitor AC-73 verhindert durch Bindung an die N-terminale Ig-Domäne die CD147-Dimerisierung und setzt in funktionellen Assays die Migration, Invasion und Metastasierung von Leberkarzinom-Zelllinien herab (Fu u. a. 2016). Zusammengefasst könnte CD147 in Zukunft nicht nur als prognostischer Marker, sondern auch als Targetmolekül in der zielgerichteten Tumorthherapie von Bedeutung sein.

### 1.11 Ziele dieser Arbeit

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die 2016 in Lohse et al. publizierte präklinische Studie zu einem funktionell und pharmakokinetisch verbesserten monomeren IgA<sub>2</sub>m(1)-Antikörper. Die Zielsetzung dieser Arbeit umfasste die Herstellung des korrespondierenden IgA-Dimers sowie dessen biochemische und funktionelle Charakterisierung. Für die Herstellung sollten zunächst Produktions- und Aufreinigungsmethoden etabliert werden, die ausreichend dimere Antikörpermengen zur Verfügung stellen. Nach der biochemischen Charakterisierung sollten anschließend vergleichend zum Monomer und weiteren IgA-Dimeren die Fab- und Fc-vermittelten Bindungs- und Funktionsanalysen durchgeführt werden. Für die Messung der ADCC-Effektivität sollte die impedanzbasierte Methode zur physiologischeren Messung der IgA-vermittelten ADCC durch Granulozyten verwendet werden. Zur Etablierung der Messung in Echtzeit, markierungsfrei und an soliden Tumorzelllinien in Adhärenz wurde zunächst mit dem vorhandenen IgA<sub>2</sub>.0-Monomer

gearbeitet. Anhand des hergestellten IgA3.0-Dimers und der etablierten impedanzbasierten ADCC Messung sollte der Einfluss von löslichen und membrangebunden Faktoren auf die Effektivität der ADCC in Kopf-Hals-Tumorzelllinien analysiert werden. Zudem sollte der Einfluss des HPV-Status der Zelllinien auf die Effektivität der ADCC vergleichend zu weiteren IgA-Dimeren dargestellt werden. Interessante Faktoren, die aus den zuvor durchgeführten Experimenten eine Korrelation zur ADCC-Effektivität aufwiesen, sollten daraufhin sowohl *in vitro* als auch durch Färbungen von Gewebemikroarrays *in vivo* näher untersucht werden. Daraus ergab sich die Analyse der Rolle von CD147 in der IgA-abhängigen ADCC an HNSCC-Zelllinien.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Ethische Vertretbarkeit

Die Versuche mit humanen Proben in dieser Arbeit wurden nach den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der Ethikkommission der Universität des Saarlandes genehmigt.

#### 2.1.2 Zelllinien

A-431	humanes Epidermoidkarzinom der Vulva (RRID:CVCL_0037)
CAL-33	humanes Plattenepithelkarzinom der Zunge (RRID:CVCL_1108)
FaDu	humanes Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx (RRID:CVCL_1218)
HN	Zelllinie stammt aus einer zervikalen Lymphknotenmetastase eines Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (RRID:CVCL_1283)
HSC-4	Zelllinie stammt aus einer zervikalen Lymphknotenmetastase eines Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Zunge (RRID:CVCL_1289)
KYSE-30	humanes Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (RRID:CVCL_1351)
SAS	humanes Plattenepithelkarzinom der Zunge (RRID:CVCL_1675)
SAT	humanes Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (RRID:CVCL_3160)
UM-SCC-1	humanes Plattenepithelkarzinom des Mundbodens (RRID:CVCL_7707)
UPCI-SCC-090	HPV16 <sup>+</sup> humanes Plattenepithelkarzinom der Zunge (RRID:CVCL_1899)
UPCI-SCC-154	HPV16 <sup>+</sup> humanes Plattenepithelkarzinom der Zunge (RRID:CVCL_2230)
BHK-CD89 <sup>+</sup>	Fibroblasten aus den Nierenzellen eines Babyhamsters stabil kotransfiziert mit Fc $\alpha$ RI/FcR $\gamma$
ExpiCHO-S <sup>TM</sup>	Suspensionszelllinie aus einem Subklon der CHO-Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters (RRID:CVCL_5J31)

HPK-1a *in vitro* transformierte HPV16-positive, nicht-maligne humane Vorhautkeratinozyten (RRID:CVCL\_D890)

Die HNSCC-Zelllinien wurden 2016 von Dr. Malte Kriegs (CAL-33, HSC-4, SAS und SAT; Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) und PD Dr. Maximilian Linxweiler (FaDu, HN, UM-SCC-1; Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde; Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie HPK1a wurde von Prof. Dr. Matthias Dürst (Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, FSU Jena) und die Zelllinie BHK CD89<sup>+</sup> von Thomas Valerius (Klinik für Innere Medizin II, Sektion für Stammzell- und Immuntherapie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie A-431 (ACC-91; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)) wurde in 2015 erworben und 2018 authentifiziert. KYSE-30 (ACC-351); UPCI-SCC-090 (ACC-670) und UPCI-SCC-154 (ACC-669) wurden vom DSMZ bezogen. ExpiCHO-S™ Zellen (Gibco™ A29127 Lot no. 2224826) wurden 2018 bei Thermo Fisher Scientific erworben.

### 2.1.3 Bakterien

Die chemisch kompetenten E.Coli (MACH1) wurden für die Vermehrung der Plasmide benutzt (One Shot Mach1 T1 Phage-Resistant Chemic Cat: C862003).

### 2.1.4 Zellkulturmedien und Reagenzien

Dulbecco' s Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (4,5 g/L) with L-Glutamine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ham' s F-12 Nutrient Mixture	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Opti-MEM Reduced Serum Medium, GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
TrypLE™ Express	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Penicillin / Streptomycin (Penicillin: 10 000 U/ml; Streptomycin: 10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat (100 mM)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Fötale Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56 °C	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	PAN Biotech, Aidenbach
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim
Geneticin (G-418)	Gibco
Methotrexat	Sigma Aldrich, Steinheim
ExpiCHO Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Luria-Bertani Broth, Miller	BD Bioscience, Heidelberg
Ampicilin	Ratiopharm GmbH, Ulm
Kanamycin	Sigma Aldrich, Steinheim

### **DMEM Vollmedium (D10<sup>++</sup>)**

500 ml DMEM wurden mit 10 % FKS, 1 mM Natriumpyruvat und 1 % Penicillin / Streptomycin versetzt.

### **RPMI Vollmedium (R10<sup>++</sup>)**

500 ml RPMI wurden mit 10 % FKS, 1 mM Natriumpyruvat und 1 % Penicillin / Streptomycin versetzt.

### **KYSE Medium**

250 ml RPMI wurden mit 250 ml Ham's F-12 vermischt und mit 1 mM Natriumpyruvat und 1 % Penicillin / Streptomycin versetzt.

### **Selektionsmedium für BHK CD89<sup>+</sup>**

Für 25 ml Medium wurde RPMI Vollmedium mit 10 µM Methotrexat und 1 mg/ml Geneticin versetzt.

### **Einfriermedium**

Zum Einfrieren aller Zelllinien wurde hitzeinaktiviertes FKS versetzt mit 10 % DMSO verwendet.

## **2.1.5 Antikörper**

### **2.1.5.1 Rekombinante Antikörper**

IgA2.0: 225-IgA2m(1)-N166G-P221R-C331S-N337T-I338LT339S- dC471-dY472

IgA1WT: Wildtyp 225-IgA1

IgA2WT: Wildtyp 225-IgA2m(1)

IgA2P221R: 225-IgA2m(1)-P221R

IgA3.0: 225-IgA2m(1)-N166G-P221R-C331S-N337T-I338L-T339S

Cetuximab: 225-IgG1

IgA-Isotyp: ChromPure human Serum IgA (Jackson)

### 2.1.5.2 Antikörper für die Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz

Antigenspezifität	Label / Klon	Spezies	Verdünnung	Hersteller	RRID
CD66b	BV-421	Mouse	1:10	Biolegend	AB_2888722
EGFR		mouse	1:10	BD Biosciences	AB_2096589
ICAM1	MEM-111	mouse	1:10	Thermo Fisher Scientific	AB_1072566
CD147	HIM6	mouse	1:10	Biolegend	AB_314586
CD11b	MEM-174	mouse	1:10	Sigma	
CD18	MEM-148	mouse	1:10	Sigma	
CD89	PerCP/Cy5.5	mouse	1:10	Biolegend	AB_2565474
EGF	Fluorescein			Thermo Fisher Scientific	E3478
IgG-BP (Bindeprotein)	PE	mouse	1:10	Santa Cruz	
Isotypkontrolle	PE	Mouse	1:10	BD Biosciences	AB_396091
Human kappa	FITC		1:10		
Annexin V	APC		5µl / test	BD Biosciences	AB_2868885
Anti-mouse	AlexaFluor488	goat	1:200	Thermo Fisher	

Anti-rabbit	AlexaFluor546	goat	1:200	Scientific Thermo Fisher Scientific
-------------	---------------	------	-------	---

### 2.1.5.3 Antikörper für Western Blot und Elisa

Antigenspezifität	Label	Spezies	Verdünnung	Hersteller	RRID
EGFR		mouse	1:2000	Biolegend	RRID:AB_2888722
Anti kappa		goat	1:1000	Abcam	
B-Aktin		mouse	1:5000	Sigma Aldrich	
Histidine Tag	POX	mouse	1:2000	BioRAD	MCA5995P
Human kappa-chain	POX	goat	1:2000	Sigma Aldrich	SAB3701414
Human-IgA $\alpha$ -kettenspezifisch	POX	goat	1:10000	Sigma Aldrich	A0259
Biotin	POX	Neutravidin	1:2000	Thermo Fisher Scientific	
Anti-mouse	POX	rabbit	1:2000	Sigma Aldrich	
Anti-rabbit	POX	mouse	1:2000	Sigma Aldrich	

### 2.1.6 Fusionsproteine

Name	Protein	Hersteller
CD147-Fc	Extrazelluläre Domäne von CD147 mit Fc-Region von humanem IgG1	Sino Biological, Eschborn
CD147-His	Extrazelluläre Domäne von CD147 mit Poly-Histidin-Tag	Sino Biological, Eschborn

### 2.1.7 Primer

Gen	Primersequenz (5'- 3')	Primersequenz (3'- 5')	Sonde	MgCl <sub>2</sub>
EGFR	GATCCAAGCTGTCCAATG	GACCAGATGATTTTGGTCAGTT	3	3 mM
ICAM1	AGCGTAGGGTAAGGTTCTTGC	CCTTCCTCACCGTGTACTGG	71	4 mM
ICAM2	GCAGGACAGATGTCACGAAC	CCCCGAAGATGTTGGAGAT	56	4 mM
ICAM4	TACCAGCTGCTCGACGTG	AAGTAGCCCACCGGGAAC	10	5 mM
ICAM5	CACTGTGGGCGTGGAATAC	TCAACGTGAAGTTTCCTCCTG	49	5 mM
GM-CSF	TCTCAGAAATGTTTGACCTCCA	GCCCTTGAGCTTGGTGAG	1	3 mM
TNF $\alpha$	CAGCCTCTTCTCCTTCTGAT	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA	29	5 mM
TGF $\beta$ 1	CAAAGACTTTTCCCAGACCT	GGTCTTGAATAGGGGATCTGTG	25	5 mM
LRIG1	ATTCCATCGCTCGCATTC	TTGTTGAAGGACAGGACCAA	19	4 mM
LRIG2	CAGCGGAATGGAATTAGCA	TCGTGTAAGGTTGTTGTGTCC	58	4 mM
LRIG3	ACAGCTGCACAGCTCAGAAC	CGCAAAAATGATGGTGTCTTCT	4	3 mM
RPL13a	AGCGGATGAACACCAACC	TTTGTGGGGCAGCATACTC	28	4 mM

### 2.1.8 Standard-Plasmide

Gen	Plasmid	Größe
EGFR	pUSEamp-EGFR	9662 bp
GM-CSF	pT7T3D-Pacl-huGMCSF	3678 bp
TNF $\alpha$	pCMV-SPORT6-huTNFalpha	6072 bp
TGF $\beta$ 1	pOTB7-huTGFbeta1	3595 bp
LRIG1	pCMV6-Entry-Lrig1	8094 bp
LRIG2	pCR4-TOPO-Lrig2	7660 bp
LRIG3	pCR4-TOPO-Lrig3	7750 bp
RPL13a	pCMV-SPORT6-huRPL13a	5059 bp

### 2.1.9 Plasmide für die Antikörperproduktion

IgA2.0	pcDNA3.1-225VH-IgA2.0-CH pcDNA3.1-225VL-hukappa
IgA3.0	pcDNA3.1-225VH-IgA3.0-CH pcDNA3.1-225VL-hukappa pIRESpuro3-J-chain-myc-His-Tag
IgA1WT	pEE14.4-225VH-hualpha1-CH pEE14.4-225VL-hukappa pIRESpuro3-J-chain-myc-His-Tag
IgA2WT	pEE14.4-225VH-hualpha2-CH pEE14.4-225VL-hukappa pIRESpuro3-J-chain-myc-His-Tag
IgA2P221R	pEE14.4-225VH-IgA2P221R-CH pEE14.4-225VL-hukappa pIRESpuro3-J-chain-myc-His-Tag

### 2.1.10 Lektine

Aleuria aurantia lectin	Vector Laboratories REF B-1395
Ricinus communis lectin A	Vector Laboratories REF B-1085
Griffonia simplicifolia lectin	Vector Laboratories REF B-1105-2
Sambucus nigra lectin	Vector Laboratories REF B-1305-2

### 2.1.11 Inhibitoren

Wortmannin	SelleckChem, Houston (USA)
Chloroquin	SelleckChem, Houston (USA)
CD89 (Klon: A59) RRID: AB_2561350	BioLegend

### 2.1.12 Puffer und Lösungen

#### Zellkultur

Trypanblaulösung	Trypanblau in PBS	0,5 %
10 x PBS pH 7.2	NaCl	80 g
	KCl	2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,4 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
	dH <sub>2</sub> O	auf 1 Liter

#### Durchflusszytometrie

FACS-Puffer	BSA in PBS	1 %
FACS-Fix	Paraformaldehyd in PBS	1 %

#### Proteinextraktion

RIPA-Puffer	RIPA-Puffer	10 ml
	cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette

#### Western Blot

10 x TBS pH 7.6	Tris	24,2 g
	NaCl	80 g
	dH <sub>2</sub> O	auf 1 Liter
TBS-T-Waschpuffer	10 x TBS	100 ml
	Tween 20	500 µl
	dH <sub>2</sub> O	auf 1 Liter
Anderson-Puffer	Tris	6 g

---

	Glycin	28,8 g
	10 % SDS	10 ml
	Methanol	200 ml
	dH <sub>2</sub> O	auf 1 Liter
5 x Lämmli-Puffer	1 M Tris pH 6.8	1,65 ml
	10 % SDS	3,438 ml
	Glycerol	2,5 ml
	Bromphenol Blau	0,62 ng
	dH <sub>2</sub> O	auf 10 ml
5x Lämmli-Puffer reduzierend	5 x Lämmli-Puffer	100 µl
	β-Mercaptoethanol	2,3 µl
Blockierlösung	Magermilchpulver	2 g
	BSA	3,2 g
	TBS-T-Waschpuffer	Auf 100 ml
<b><u>Immunfluoreszenz</u></b>		
Fixierlösung pH 7.4	PFA in PBS	4 %
	CaCl <sub>2</sub>	1,3 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Blockierlösung	BSA in PBS	2 %
	TritonX-100	0,1 %
DAPI	DAPI	1 µl
	Methanol	50 ml

**Antikörperaufreinigung**

Für anti-human-kappa Beads:

Elutionspuffer pH 3	Glycin	7,5 g
	dH <sub>2</sub> O	auf 1 l
Neutralisierungspuffer pH 8.9	Tris-Base	121,14 g
	dH <sub>2</sub> O	auf 1 l
Lagerungspuffer	Ethanol	20 %

Für His-Tag:

Bindungspuffer pH 8	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,9 g
	NaCl	17,5 g
	Imidazol	0,34 g
	dH <sub>2</sub> O	auf 1 l
Elutionspuffer pH 8	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,9 g
	NaCl	17,5 g
	Imidazol	34 g
	dH <sub>2</sub> O	auf 1 l

**Lektin-Blots**

Puffer A pH 8	Tris	6,07 g
	NaCl	5,26 g
	CaCl <sub>2</sub> Dihydrat	0,29 g
	BSA	50 g
	dH <sub>2</sub> O	auf 1 l

Puffer B pH 8	Tris	6,07 g
	NaCl	5,26 g
	CaCl <sub>2</sub> Dihydrat	0,29 g
	BSA	5 g
	Tween 20	400 µl
	dH <sub>2</sub> O	auf 1 l

### 2.1.13 Reagenziensysteme

#### Western Blot

NuPAGE™ 3 bis 8 % Tris-Acetat, Mini Protein Gel	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE™ Tris-Acetat-SDS-Laufpuffer (20x)	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE™ 4 bis 12 %, Bis-Tris, Mini Protein Gel	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE™ MOPS-SDS-Laufpuffer (20x)	Thermo Fisher Scientific
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific
Roti®-BlackP silver staining kit for Proteins	Carl Roth GmbH
Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific

#### Isoelektrische Fokussierung

Novex™ IEF Anode Buffer (50x)	Thermo Scientific™
Novex™ IEF Cathode Buffer (10x)	Thermo Scientific™
Novex™ IEF Sample Buffer (2x)	Thermo Scientific™

#### BCA-Assay

Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific REF 23227
-------------------------------	-----------------------------

#### Elisa

Human IL-8/CXCL8 DuoSet® ELISA	R&D SYSTEMS, Minneapolis, USA
RayBio® Human CD147 ELISA Kit	RayBiotech Cat#ELH-CD147

LTB4 Parameter Assay Kit R&D SYSTEMS, Minneapolis, USA

### **Plasmidpräparation**

NucleoBond® Xtra Maxi EF Macherey-Nagel, Düren

peqGOLD Plamid Miniprep VWR International, Darmstadt

### **RNA Isolierung**

Nucleospin™ RNA-Isolation-Kit Macherey-Nagel, Düren

### **qRTPCR**

FastStart™ Taq DNA Polymerase, dNT-Pack Roche, Mannheim

### **Antikörperaufreinigung**

CaptureSelect™ KappaXL Affinity Matrix Thermo Scientific™

Profinity™ IMAC Resin, Ni-charged BioRad

ExpiCHO™ Expression System Kit Thermo Fisher Scientific

### **Calcein-Assay**

Calcein-AM Thermo Fisher Scientific

### **ROS-Assay**

Diogenes Enhanced Superoxide Detection National diagnostics, Atlanta (USA)

## **2.1.14 Chemikalien**

2-Mercaptoethanol Sigma-Aldrich, Steinheim

Agarose Sigma-Aldrich, Steinheim

Bovines Serumalbumin (BSA) Sigma-Aldrich, Steinheim

Bromophenolblau Sigma-Aldrich, Steinheim

DAPI Sigma-Aldrich, Steinheim

Dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma-Aldrich, Steinheim

---

Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Dinatriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DPBS	Gibco, Karlsruhe
Essigsäure	VWR, Darmstadt
Ethanol, absolut	Roth, Karlsruhe
Ethanol, vergällt	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Gibco, Karlsruhe
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Serva, Heidelberg
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Methanol, absolut	Fisher Chemical, Schwerte
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Neutralrot	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
ProLong™ Diamond Antifade Mountant	Thermo Fisher Scientific
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt

---

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Appllichem, Darmstadt
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
VectaMount® Permanent Mounting Medium	Vector Laboratories
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Xylol	Fischar, Saarbrücken

### 2.1.15 Geräte

Azure Q500	Azure biosystems
Cell Drop BF	DeNovix
ChemiDoc XRS+	BioRAD, München
FACSCantoll	BD Biosciences, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop DMI6000 B	Leica, Wetzlar
LightCycler 480	Roche Diagnostics, Mannheim
NANODROP 2000c	peQLab Biotechnologie, Erlangen
VICTOR X4 <i>Multilabel Plate Reader</i>	Perkin-Elmer, Überlingen
Digitaler Heizblock	Thermo Fisher Scientific
Inkubator HeraCell 240i	Heraeus
Leica DMI1 inverted microscope	Leica, Wetzlar
Megafuge 1.0R	Heraeus
Megafuge 16R	Thermo Scientific™
Microcentrifuge 1-15PK	Heraeus™
Mini-blot-Module	ThermoFischer™
Mini Gel Tank	ThermoFischer™
pH-meter	INTEGRA Biosciences GmbH

Sonifier Sonorex Super RK103H	R. Langenbrinck GmbH,
xCELLigence RTCA (real-time cell analysis) SP (single plate) system	Agilent

### 2.1.16 Gebrauchsmaterialien

Poly-Prep® Chromatography Columns	BioRad
PVDF membrane Amersham™ Hybond™	GE Healthcare Life Sciences
VIVASPIN6 100,000 MWCO PES	SigmaAldrich
Stericup Quick Release Millipore Express Plus 0,22µm PES	Millipore, Burlington USA
Slide-A-Lyzer™ Dialysekassetten	Thermo Scientific™
Baffled Polycarbonate Erlenmeyer Flask with Vent Cap	Corning, Corning USA

Sonstige Plastikwaren wurden von Greiner Bio-One (Frickenhausen), Roche (Mannheim), Sarsted (Nümbrecht) und VWR (Darmstadt) bezogen.

### 2.1.17 Software

GraphPad Prism 8.0	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ	GraphPad Software, San Diego, USA
Leica Application Suite 3.6.0	Leica Microsystems, Wetzlar
Leica Application Suite X	Leica Microsystems, Wetzlar
LightCycler® 480 Software 1.5	Roche, Mannheim
MS Office 2019	Microsoft, Redmond, USA
NanoDrop 2000	ThermoScientific, Waltham, Massachusetts
WorkOut 2.5 Software	Dazdaq, Brighton, GB
XCELLigence RTCA Software	ACEA Bioscience, Inc./San Diego, USA

BD FACSDiva™

BD, Biosciences, Heidelberg

Zotero

Roy Rosenzweig Center for History and New  
Media; [www.zotero.org/download](http://www.zotero.org/download)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Kultivieren von Zellen

Die adhärennten Zelllinien wurden bei 37 °C im Brutschrank bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % in ihrem jeweiligen Kulturmedium kultiviert. Alle zwei bis drei Tage, wenn die Zellen 70-80 % konfluentes Wachstum erreicht hatten, wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Medium vollständig abgenommen und nach zweimaligem Waschen mit PBS die Zellen mit Trypsin im Brutschrank inkubiert, bis sie sich vom Flaschenboden ablösten. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert (300 x g, 5 Minuten). Erneut in frischem Medium aufgenommen, wurden die Zellen in gewünschter Dichte neu ausgesät.

Die Schüttelkulturen wurden bei 37 °C im Brutschrank bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 8 % kultiviert und bei 125 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Zur Subkultivierung wurden die Zellen gezählt und in gewünschter Zelldichte in frischem Medium aufgenommen.

Nach dem Auftauen und routinemäßig einmal monatlich wurden die Zelllinien in Kultur hinsichtlich einer Kontamination mit Mykoplasmen untersucht.

#### 2.2.1.2 Einfrieren von Zellen

Für die Stammhaltung der Zellkultur wurden von jeder Zelllinie einige Kryoröhrchen von frühen Zellpassagen eingefroren. Hierzu wurden  $3 \times 10^6$  Zellen in 1 ml FKS mit 10 % DMSO aufgenommen und zügig bei -80 °C in speziellen Gefrierbehältern (mit einer Kühlrate von -1 °C / Minute) weggefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -150 °C oder im flüssigen Stickstoff.

#### 2.2.1.3 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden in Kryoröhrchen aus dem Stickstoff zügig in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und direkt in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt und abzentrifugiert (300 x g, 5 Minuten, Raumtemperatur). Anschließend wurden die Zellen mit frischem Kulturmedium in die Zellkulturflasche gegeben.

### 2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Ermittlung der lebenden Zellen wurden 10  $\mu$ l Zellsuspension mit 10  $\mu$ l Trypanblau verdünnt und mittels einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Hierzu wurden die ungefärbten Zellen in den 4 großen Quadranten ermittelt und durch folgende Formel die Anzahl lebender Zellen bestimmt.

Zellen pro Milliliter = Mittelwert aus 4 Quadranten  $\times 2 \times 10^4$

Im Verlauf der Arbeit wurde auf das automatische Zellzählgerät Cell Drop BF (DeNovix) gewechselt, das ebenfalls die lebenden Zellen in der mit Trypanblau versetzten Zellsuspension bestimmt.

### 2.2.2 Isolation der Granulozyten aus Vollblut

Gesunden, freiwilligen Spendern wurde nach Aufklärung und Einwilligung bis zu 100 ml Blut in Natrium-Citrat Röhrchen entnommen. In ein 50 ml Röhrchen wurde 12,5 ml Pancoll (1,077 g/ml) vorgelegt und vorsichtig mit 25 ml 1:2 mit PBS verdünntem Blut überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 800 x g für 20 Minuten bei Raumtemperatur, wobei die Beschleunigung auf 7 und die Bremse auf 2 herunterreguliert wurden. Nach der Zentrifugation wurde die obere Plasmaschicht verworfen, der PBMC Ring abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Das Pellet mit den Granulozyten und Erythrozyten wurde ebenfalls in ein neues 50 ml Falcon pipettiert, um eine hypertone Erythrozytenlyse durchzuführen. Hierzu wurde das Pellet auf 45 ml mit kaltem destilliertem Wasser aufgefüllt und nach 30 Sekunden Inkubation die Salzkonzentration mit 5 ml 10x PBS ausgeglichen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 400 x g für 5 Minuten, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml PBS resuspendiert und bei Bedarf eine erneute Erythrozytenlyse durchgeführt. Nach erfolgreicher Erythrozytenlyse wurden die Granulozyten in RPMI Vollmedium aufgenommen und gezählt.

### 2.2.3 Antikörperproduktion in ExpiCHO Zellen

Das ExpiCHO-Expressions System wurde verwendet, um ExpiCHO-S Zellen in Schüttelkulturen mit sehr hoher Zelldichte in einem definierten Serum-freien Medium zu transfizieren. Die ExpiCHO Zellen sind für die Proteinexpression optimiert, so dass diese die durch die Plasmide eingebrachten Antikörper in großen Mengen produzieren.

Vor der Transfektion wurden die Zellen bei 37 °C und 8 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank auf einem Orbitalschüttler bei 120 rpm und einer Zelldichte zwischen 0.3 – 4 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml kultiviert. Am Tag der Transfektion wurden 1,5 x 10<sup>8</sup> Zellen in 25 ml Medium mit 30  $\mu$ g DNA mit ExpiFectamine CHO

Reagenz transfiziert. Für die Produktion monomerer Antikörper wurden 15 µg Plasmid DNA für die schwere Kette und 15 µg Plasmid DNA für die leichte Kette verwendet. Bei dimeren Antikörpern wurden die Mengen auf je 10 µg reduziert und weitere 10 µg Plasmid DNA, die für die J-Chain codiert, zugefügt. Für jeden Ansatz wurden 30 µg Plasmid DNA in 1 ml OptiPRO SFM verdünnt. In einem weiteren Röhrchen wurden 80 µl ExpiFectamine CHO Reagent in 920 µl OptiPRO SFM verdünnt. Beide Ansätze wurden zügig vereint und durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur für maximal 5 Minuten wurde der vollständige Transfektionsansatz langsam unter Schwenken der Kulturflasche zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 8 % CO<sub>2</sub> schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden 150 µl Expifectamine CHO Enhancer und 6 ml ExpiCHO Feed zugegeben. Die Kulturen wurden anschließend für 12 Tage bei 32 °C und 5 % CO<sub>2</sub> auf dem Orbitalschüttler bei 120 rpm kultiviert.

Für die Ernte der produzierten Antikörper wurden die Zellen bei 400 x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in neue Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert für 5000 x g 30 Minuten bei 4 °C. Der Überstand wurde dann mittels Stericup (Millipore) steril filtriert und kurzzeitig bis zur Aufreinigung bei 4 °C gelagert.

#### **2.2.4 Aufreinigung von Antikörpern mittels ahukappa-Matrix**

Zur Aufreinigung der Antikörper aus den Zellkulturüberständen wurde Capture Select KappaXL Affinity Matrix verwendet. Die Agarose Beads sind mit einem Liganden beschichtet, der humane Immunglobuline mit einer leichten κ-Kette, bindet. Die in Bindungspuffer gewaschenen Beads wurden zu den sterilen Überständen gegeben und über Nacht bei 4 °C unter langsamen Rühren inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Matrix durch Zentrifugation bei 400 x g für 10 Minuten bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in Bindungspuffer auf eine Poly-Prep Chromatographiesäule überführt und mit weiteren 5 ml Bindungspuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 10 ml Elutionspuffer, der Durchfluss wurde in einem Röhrchen mit vorgelegten 10 ml Neutralisierungspuffer aufgefangen. Die Matrix wurde mit Bindungspuffer reäquilibriert und in 20 % Ethanol bei 4 °C gelagert. Das Eluat wurde durch Zentrifugation bei 1000 x g in einem VivaSpin MWCO 100 Röhrchen aufkonzentriert und mit 1 x PBS gewaschen. Bei monomeren Antikörpern wurde nach diesem Schritt mittels Elisa und Messung am Nanodrop der Proteingehalt bestimmt und die Antikörper bei 4 °C in PBS gelagert. Zur Verbesserung der Dimer- zu Monomer-Ratio wurden für die Dimere weitere Schritte der Aufreinigung durchgeführt.

### 2.2.5 Aufreinigung von Antikörpern mittels Profinity™ IMAC Resin

Für die weitere Aufreinigung der Dimere wurde die Eigenschaft des His-Tags der J-Chain genutzt, an  $\text{Ni}^{2+}$  zu binden. Durch die Immobilisierte-Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) wurden Di- und Polymere mit J-Chain weiter aufgereinigt. Hierzu wurde der dimere Antikörper in eine Slide-A-Lyser Dialysekassette überführt und zwei Mal über Nacht gegen einen Überschuss (1:300) an Bindepuffer dialysiert. Die Beads wurden zwei Mal mit Bindepuffer gewaschen zu dem dialysierten Antikörper gegeben und über Nacht bei 4 °C unter langsamen Rühren inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads durch Zentrifugation bei 400 x g für 10 Minuten bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in Bindungspuffer auf eine Poly-Prep-Chromatographie-Säule überführt und mit weiteren 5 ml Bindungspuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 10 ml Elutionspuffer und das Eluat wurde durch Zentrifugation bei 1000 x g in einem speziellen VivaSpinMWCO100-Röhrchen aufkonzentriert. Der Antikörper wurde wiederum in einer Slide-A-Lyser Dialysekassette zwei Mal über Nacht in PBS dialysiert. Es erfolgte die Proteinbestimmung mittels Elisa und Nanodrop. Der Antikörper wurde in PBS bei 4 °C gelagert.

### 2.2.6 Analyse von Proteinen

#### 2.2.6.1 Bestimmung der Antikörperkonzentration mittels Elisa

Eine 96-Well Platte wurde mit 100 µl pro Well einer 1 µg/ml Antikörperlösung gegen die humane  $\kappa$ -Kette über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach zwei Waschschritten mit je 125 µl Waschpuffer wurden je 100 µl der Standardkurve und der Proben bzw. Zellkulturüberständen in die beschichteten Wells pipettiert. Die Platte wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Wiederum erfolgten zwei Waschschrritte mit 125 µl Waschpuffer. Der gebundene IgA-Antikörper wurde mittels eines an Peroxidase gekoppelten Antikörpers, der an humanes IgA bindet, detektiert. Durch die Zugabe des entsprechenden Substrates erfolgt eine enzymatische Reaktion, die zu einem Farbumschlag der Lösung führt. Dieser ist proportional zur Menge an Antikörper in der Probe und wurde durch die Messung der Absorption bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge bei 550 nm im Victor X4 Multilabel Plate Reader bestimmt. Anhand der Standardreihe konnte dann die Konzentration in der Probe berechnet werden.

### 2.2.6.2 Sandwich-ELISAs

Weitere Sandwich-ELISAs wurden als Kit-Systeme von verschiedenen Herstellern benutzt, um sezernierte Faktoren in Zellüberständen nachzuweisen:

Sezerniertes IL-8 in den Zellkulturüberständen wurde mittels Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA (R&D Systems) nachgewiesen.

Die Konzentration von Leukotriene B<sub>4</sub> in den ADCC-Überständen wurde mit dem R&D Systems Parameter LTB<sub>4</sub>-Kit nach Herstellerangaben bestimmt.

Um die Lactoferrinfreisetzung in den ADCC-Überständen zu quantifizieren, wurde das Human Lactoferrin SimpleStep ELISA Kit (abcam) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Messung der optischen Dichte erfolgte jeweils bei 450 nm (Referenzwellenlänge 550 nm) im Victor X4 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer).

### 2.2.6.3 Proteinextrakte

Für die Proteinextrakte wurden  $1,5 \times 10^6$  Zellen in 10 ml jeweiligem Kulturmedium in 10 cm Schalen ausgesät. Nach 24 Stunden wurden das Medium abgenommen (als Überstand bei -20 °C gelagert) und die Platten auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgelöst und gelöst in 5 ml PBS in 15 ml Röhrchen überführt. Nach der Zentrifugation für 5 Minuten bei 1600 rpm wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet in 100 µl RIPA-Puffer gelöst. Die Lyse erfolgte für 10 Minuten auf Eis, bevor die Zellen drei Mal für jeweils 5 Sekunden sonifiziert wurden und anschließend nochmals 30 Minuten auf Eis inkubierten. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 14000 x g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei -20 °C.

### 2.2.6.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung der Proteinkonzentration in den Proben erfolgte kolorimetrisch mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit, das nach den Herstellerangaben für Mikrotiterplatten durchgeführt wurde. Hierzu wurde eine Standardreihe aus Albumin vorbereitet und anschließend in Duplikaten 10 µl des Standards und der zu untersuchenden Probe in eine Mikrotiterplatte vorgelegt. Zu jedem Well wurden 200 µl des frisch angesetzten BCA-Reaktionsreagenz zugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde bei 550 nm im Victor X4 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer) gemessen.

### 2.2.6.5 SDS-Page

Für die Auftrennung der Proteinextrakte wurden vorgefertigte NuPAGE Bis-Tris Gele mit einem Polyacrylamid-Konzentrationsgradienten von 4-12 % verwendet. Als Marker wurden 7 µl des Spectra Multicolor High Range Protein Marker eingesetzt. Von den RIPA-Extrakten wurden 15 µg Protein mit reduzierendem Lämmli-Puffer versetzt, für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und abgekühlt auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in 1 x MOPS-Puffer für 2 Stunden bei 80 Volt konstant.

### 2.2.6.6 Western Blot

Anschließend wurden die Proteine mittels Nass-Blot-Verfahren auf eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran übertragen. Hierzu wurde das Mini Blot Module von Invitrogen verwendet und die Filter und Whatmann Filterpapiere mit Anderson-Transferpuffer getränkt. Der Transfer erfolgte bei 310 mA für eine Stunde und 45 Minuten. Dann wurden die unspezifischen Bindungen mit 3,2 % BSA und 2 % Magermilch in TBS für eine Stunde blockiert. Der primäre Antikörper wurde über Nacht bei 4 °C in der Blockierlösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal mit TBS-T für 10 Minuten gewaschen und anschließend in der Blockierlösung mit dem an Peroxidase gekoppelten Sekundärintikörper bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Membran erneut drei Mal mit TBS-T und ein Mal mit TBS für jeweils 10 Minuten gewaschen. Die Detektion erfolgte am Azure Q500 mit SuperSignal West Dura Extended Duration Substrat.

### 2.2.7 Biochemische Charakterisierung der Antikörper

Zur Visualisierung der produzierten Antikörper wurden 0,1 µg Antikörper unter denaturierenden, aber nicht-reduzierenden Bedingungen auf NuPAGE™ 3 bis 8 % Tris-Acetat-Gele aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei konstant 80 Volt für 2 Stunden in 1 x Tris-Acetat-SDS-Laufpuffer. Anschließend erfolgte die Silbernitratfärbung der Proteine im Gel mit dem ROTI® Black P Kit nach den Angaben des Herstellers. Fotos der gefärbten Gele wurden mit dem Azure Q500 aufgenommen.

Für die Darstellung des korrekten Zusammenbaus der Antikörper wurden 1 µg Antikörper mit Lämmli-Puffer mit und ohne β-Mercaptoethanol für reduzierende und nicht reduzierende Konditionen für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben auf NuPAGE™ 3 bis 8 % Tris-Acetat-Gele aufgetragen und in 1 x Tris-Acetat-SDS-Laufpuffer für 2 Stunden bei konstant 80 Volt laufen gelassen. Im Anschluss wurden die Proteine mittels Nass-Blot-Verfahren auf eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran, wie unter Western Blot beschrieben, übertragen. Die Membran wurde kurz in TBS gewaschen, dann wurden die unspezifischen Bindungen mit 3,2 % BSA

und 2 % Magermilch in TBS für eine Stunde blockiert. Anschließend wurden die an Peroxidase gekoppelten Antikörper, gerichtet gegen  $\alpha$ -Kette,  $\kappa$ -Kette oder His-Tag, für eine Stunde bei Raumtemperatur in 2 % BSA und 1 % Magermilch in TBS leicht schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Membran drei Mal mit TBS-T und ein Mal mit TBS für jeweils 10 Minuten gewaschen. Die Detektion erfolgte am Azure Q500 mit SuperSignal West Dura Extended Duration Substrat.

Für die isoelektrische Fokussierung, also die Bestimmung des isoelektrischen Punktes der rekombinant hergestellten Antikörper, wurden fertige pH 3-10 Gradientengele von Novex™ sowie die dazugehörigen IEF-Anodenpuffer, IEF-Kathodenpuffer und IEF-Probenpuffer nach Angaben des Herstellers benutzt. Im Anschluss wurden die Proteine durch Silbernitratfärbung mit dem ROTI® Black P Kit sichtbar gemacht und am Azure Q500 dokumentiert.

### 2.2.8 Lektin Blots

Um die Glykosylierung der Antikörper zu untersuchen, wurden Lektine verwendet, die spezifische Kohlenhydratstrukturen binden. Hierzu wurde je Ansatz 1  $\mu$ g des Antikörpers mit Lämmli-Puffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und auf NuPAGE™ 3 bis 8 % Tris-Acetat-Gele aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei konstant 80 Volt für 2 Stunden in 1 x Tris-Acetat-SDS-Laufpuffer. Der anschließende Transfer auf eine PVDF Membran wurde in Anderson-Puffer für eine Stunde und 45 Minuten bei 310 mA durchgeführt. Unspezifische Bindungen wurden über Nacht bei 37 °C in Puffer A blockiert. Die Inkubation der verwendeten Lektine

Aleuria aurantia lectin	12,5 $\mu$ l
Ricinus communis lectin A	8 $\mu$ l
Griffonia simplicifolia lectin	12,5 $\mu$ l
Sambucus nigra lectin	25 $\mu$ l

erfolgte in 25 ml Puffer A mit 0,1 % Tween20 für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach 3 Waschschritten für je 10 Minuten in Puffer B wurden die Membranen mit NeutrAvidin-HRP 1:2000 in Puffer A versetzt mit 0,05 % Tween20 für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 10 Waschschrritte für 10 Minuten in Puffer B durchgeführt, bevor die Detektion am Azure Q500 mit SuperSignal West Dura Extended Duration Substrat erfolgte.

### 2.2.9 Calcein-Assay

Beim Calceinfreisetzungstest werden zur Ermittlung der Zellviabilität die Zielzellen mit dem zellendurchlässigen nicht-fluoreszierenden Farbstoff Calcein-AM inkubiert. Lebende Zellen wandeln den Farbstoff intrazellulär in das zellenundurchlässige grün fluoreszierende Calcein um, dessen Freisetzung durch das Absterben der Zielzellen im Überstand gemessen wird.

Bei der Durchführung mit adhärenenten Zellen wurden  $2 \times 10^4$  Zielzellen in 150  $\mu\text{l}$  Kulturmedium in eine Flachboden 96-Well Platte ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. 24 Stunden später wird das Medium vollständig abgenommen und durch 50  $\mu\text{l}$  Kulturmedium mit 5  $\mu\text{M}$  Calcein-AM ersetzt. Nach der 30-minütigen Inkubation im Brutschrank wurde die Färbelösung vorsichtig abgenommen und zwei Mal mit 100  $\mu\text{l}$  Medium gewaschen, bevor 150  $\mu\text{l}$  frisches Medium zugegeben wurde. Die Zellen sind nun intrazellulär mit grün fluoreszierendem Calcein markiert.

Für die Durchführung in Suspension wurden  $1 \times 10^6$  Zielzellen in 1 ml Kulturmedium versetzt mit 5  $\mu\text{M}$  Calcein-AM aufgenommen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Brutschrank für 30 Minuten, anschließend wurden zwei Waschschrte mit je 10 ml Medium durchgeführt und der jeweilige Überstand nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1500 rpm verworfen. Die mit Calcein markierten Zellen wurden in gewünschter Konzentration in frischem Kulturmedium aufgenommen und in U-Boden 96-Well Platten pipettiert.

Im Anschluss an die Fluoreszenzmarkierung erfolgte die Behandlung mit Effektoren, Antikörper und Modulatoren für den Zytotoxizitäts-Assay. Als Kontrollen wurden für die spontane Freisetzung 6 Wells mit Kulturmedium behandelt und zu 6 Wells wurde PBS mit 0,1 % Triton-X 100 für die Bestimmung der maximalen Freisetzung zugegeben. Nach 4 Stunden wurden die 96-Well Platten bei 1500 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert, mit einer Mehrkanalpipette 100  $\mu\text{l}$  Überstand je Well in eine schwarze Flachboden 96-Well Platte überführt und die Fluoreszenz am Victor X4 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer) gemessen.

### 2.2.10 Impedanz-Assay

Bei der Impedanzmessung mit dem xCELLigence® Real Time Cell Analyser (Acea Biosciences) fließt ein sehr schwacher elektrischer Strom zwischen den Mikrogoldelektroden, die auf den Boden von speziellen 96-Well Platten (96-Well E-Plate®) aufgebracht sind. Zellen, die sich an die Mikrogoldelektroden anhaften, verändern den Stromfluss und somit die Impedanz. Die Veränderung der Impedanz wurde mit der xCELLigence® RTCA Software dokumentiert und als dimensionsloser Parameter Zellindex (CI) angegeben. Die Messung erfolgte in der für die Zellen optimalen Umgebung im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Vor jeder Messung wurde mit 50 µl Kulturmedium je Well eine Hintergrundmessung durchgeführt. Für die Zytotoxizitätsmessung wurden dann 2 x 10<sup>4</sup> Zielzellen in 100 µl Kulturmedium je Well ausgesät und für 24 Stunden bis zum Erreichen der Konfluenz alle 15 Minuten die Veränderung der Impedanz gemessen. Für die Behandlung wurde die Messung pausiert und die Platte unter die Sterilbank entnommen. Aufgereinigte Granulozyten, Antikörper, Fusionsproteine und Inhibitoren wurden, wie in den Experimenten beschrieben, zugegeben und die Messung fortgesetzt. Zunächst wurde in dem folgenden vierstündigen Messzeitraum die Impedanzänderung alle 5 Minuten aufgezeichnet, danach bis zum Ende der Messung alle 30 Minuten. Bei jedem Experiment wurden als Hintergrundkontrollen Wells lediglich mit Medium mitgeführt. Zur Lysekontrolle wurden Zellen mit 10 µl 1 % TritonX-100 behandelt.

### 2.2.11 Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies

Für die Messung der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (reaktive oxigen spezies ROS) durch die Granulozyten wurde das Diogenes Enhanced Superoxide Detection Kit (national diagnostics) verwendet. Diogenes emittiert Licht proportional zur Menge an freigesetztem Superoxid O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Die Emissionsstärke wurde mit einem Luminometer bestimmt. Für den Assay wurden in einer Flachboden 96-Well Platte 2 x 10<sup>5</sup> A431 ausgesät und konfluent anwachsen gelassen. 24 Stunden später wurden 10 µg/ml Antikörper und Granulozyten im Verhältnis 40:1 zugegeben. Das Endvolumen betrug 200 µl je Well. Nach jeweils 1, 2, 3 und 4 Stunden wurde die Superoxidfreisetzung gemessen. Hierzu wurden 100 µl Überstand in eine dunkle 96-Well Platte mit weißem Boden überführt und mit 50 µl frisch angesetztem Diogenes Reagenz versetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubation im Dunkeln wurde die Lumineszenz am Victor X4 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer) gemessen.

### 2.2.12 Durchflusszytometrie

Für die Bestimmung der Oberflächenexpression von Antigenen auf den Zellen und für die Bindungsanalysen der selbst produzierten Antikörper wurde die Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell sorting kurz: FACS) verwendet. Hierfür wurden je Well  $1,5 \times 10^5$  Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und in eine 96-Well Platte mit V-Boden pipettiert. Das Pelletieren erfolgte jeweils bei  $400 \times g$  für 4 Minuten, der Überstand wurde dann verworfen. Die Pellets wurden in  $10 \mu\text{l}$  Erstantikörper resuspendiert und für eine Stunde auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach 2 Waschschritten mit FACS-Puffer wurde das Pellet in  $10 \mu\text{l}$  Zweitantikörper aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Erneut wurden 2 Waschschrritte mit FACS-Puffer durchgeführt und die gefärbten Zellen anschließend gelöst in FACS-Fix in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgte am FACS Canto II mit der FACS Diva Software.

#### 2.2.12.1 Annexin V-Assay

Durch die Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) können durchflusszytometrisch lebende von apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden. Hierzu wurden die behandelten Granulozyten nach den angegebenen Zeitpunkten in ein Eppendorfggefäß überführt und mit FACS-Puffer gewaschen. Für die Oberflächenfärbung wurden die Zellen 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln mit CD66b - BV421 markiert und anschließend mit Annexin V-Bindepuffer gewaschen. Zu jeder Probe wurden  $100 \mu\text{l}$  Annexin V-Bindepuffer mit  $2 \mu\text{l}$  Annexin V - APC und  $0,5 \mu\text{l}$  Propidiumiodid versetzt zugeben und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Proben mit  $300 \mu\text{l}$  Annexin V-Bindepuffer in FACS-Röhrchen überführt und innerhalb einer Stunde am FACS Canto II gemessen.

#### 2.2.13 Internalisierungsassay

Für die Bestimmung der Aufnahme der Antikörper in die Zellen wurde ein Fusionsprotein, das aus einem an die humane leichte  $\kappa$ -Kette bindenden Antikörper-Fragment und einer verkürzten Form des Pseudomonas Exotoxin A zusammengesetzt ist, benutzt. Das Fusionsprotein bindet an die leichte  $\kappa$ -Kette des zu untersuchenden Antikörpers und wird bei dessen Aufnahme in die Zelle internalisiert. Intrazellulär wirkt das Pseudomonas Exotoxin A zytotoxisch und die Zelle stirbt ab. Die Internalisierung des Antikörpers ist damit proportional zu den abgestorbenen Zellen. Für den Assay wurden in eine 96-Well Platte  $2,5 \times 10^4$  A-431 pro Well ausgesät und mit  $62,5 \text{ nM}$  des zu untersuchenden Antikörpers behandelt. Zügig wurde eine Konzentrationsreihe von  $5 \mu\text{g/ml}$  bis

0,005 µg/ml des Fusionsproteins zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 72 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde zur Bestimmung der viablen Zellen eine Neutralrotfärbung durchgeführt.

#### **2.2.14 Wachstumsinhibition**

Für die Untersuchung der Wachstumsinhibition wurden in eine 96-Well Platte 3 x 10<sup>4</sup> HPK1a pro Well ausgesät. In Duplikaten wurde eine Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Antikörpers von 125 nM bis 0,06 nM zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 72 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde zur Bestimmung der viablen Zellen eine Neutralrotfärbung durchgeführt.

#### **2.2.15 Neutralrotfärbung**

Bei der Neutralrotfärbung werden lebende Zellen mit Neutralrot angefärbt und die Färbeintensität bestimmt. Hierzu wird der Überstand von den Zellen abgenommen und 100 µl der Neutralrotlösung (50 µg/ml in Kulturmedium) pro Well zugeben. Nach der zweistündigen Färbung im Brutschrank wurden das Neutralrot abgenommen und zwei Waschschrte mit jeweils 100 µl PBS durchgeführt. Anschließend wurde 100 µl frisch angesetzter Sörensencitratpuffer zugegeben und das Neutralrot unter Schütteln für 3 Minuten gelöst. Die Messung der Absorption erfolgte bei 550 nm (Referenzwellenlänge 405 nm) im Victor X4 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer).

#### **2.2.16 Quantitative real-time PCR**

##### **2.2.16.1 Isolation der mRNA**

Für die Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene wurden je Zelllinie 1 x 10<sup>6</sup> Zellen in 6 cm Schalen ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit PBS gewaschen und die mit Trypsin abgelösten Zellen pelletiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl RA1-Puffer aufgenommen und die RNA-Isolation mit dem Nucleo Spin RNA II Kit von Macherey Nagel nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA oder die Zellpellets in RA1-Puffer wurden bei -80 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Nanodrop.

### 2.2.16.2 Synthese der cDNA

Für das Umschreiben in cDNA wurde das SuperScriptII System von Invitrogen verwendet. Dazu wurden 1 µg RNA mit 1 µl 500 µM Random Hexamer Primer und 1 µl dNTP-Mix versetzt und mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf 15,4 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten bei 65 °C im Heizblock inkubiert, dann erfolgte die Zugabe von 4 µl 5x RT-Puffer, 0,5 µl RiboLock und 0,1 µl Maxima Reverse Transkriptase. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben für 30 Minuten bei 50 °C inkubiert, um abschließend die Reaktion bei 95 °C für 5 Minuten abzustoppen. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert und für die qRT-PCR wurde eine 1:10-Verdünnung in RNase-freiem Wasser eingesetzt.

### 2.2.16.3 Quantitative real-time PCR

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde die Menge des entstehenden PCR Produktes mittels an Fluorescein gekoppelter Sonden der *UniversalProbeLibrary* (Roche) detektiert. Für die PCR wurde ein Mastermix wie folgt hergestellt:

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3-5 mM
10xTaq-Puffer	2 µl
TE-SS (40 ng/µl)	1 µl
DMSO	1 µl
Tween20	1 µl
BSA (20 ng/µl)	0,5 µl
dNTP (10 mM)	0,4 µl
Sonde (1 µM)	0,8 µl
Primer forward (10 µM)	0,5 µl
Primer reverse (10 µM)	0,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
H <sub>2</sub> O	auf 15µl

In einer 96-Well Platte wurden 5 µl cDNA mit 15 µl Mastermix vermischt und anschließend im LightCycler®480 der Firma Roche mit folgendem PCR Programm analysiert:

Schritt	Funktion	Temperatur °C	Zeit	Zyklen
Aktivierung		95	10 Minuten	1
Touchdown	Denaturierung	95	5 Sekunden	10
	Annealing	65	5 Sekunden	
	Annealing	62	10 Sekunden	
Amplifikation	Denaturierung	94	15 Sekunden	45
	Annealing	55	30 Sekunden	
	Amplifikation	70	30 Sekunden	

### 2.2.17 Immunfluoreszenz

Zur Bestimmung der Lokalisation von CD147 wurde der ADCC-Assay auf Deckgläschen, die zuvor mit Lysin beschichtet wurden, durchgeführt. Hierzu wurden die sterilen Deckgläschen mit 50 µl einer 1 mg/ml Poly-Lysin-Lösung für 30 Minuten inkubiert, 3 Mal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und unter der Sterilbank getrocknet. Anschließend wurden A-431 Zellen darauf anwachsen gelassen und nach 24 Stunden mit 10 µg/ml IgA2.0-Antikörper und Granulozyten im Verhältnis 1:20 behandelt. Zusätzlich wurden auch Granulozyten alleine auf die Deckgläschen ausgesät. Nach 30-minütiger Inkubation wurde das Kulturmedium vollständig abgenommen und die Zellen für 20 Minuten mit eiskalter Fixierlösung fixiert. Danach wurde 2 Mal mit PBS-Glycin für 5 Minuten gewaschen. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS erfolgte die Permeabilisierung für 30 Minuten in PBS mit 0,1 % TritonX-100. Vor der Färbung wurden unspezifische Bindungen durch Inkubation für 30 Minuten in Blockierlösung gesättigt. Die Inkubation des Erstantikörper CD147, 1:500 verdünnt in Blockierlösung, wurde über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C durchgeführt. Es folgten 3 Waschschriffe mit Blockierlösung für je 5 Minuten, bevor der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper 1:2000 verdünnt für 45 Minuten in der feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert wurde. Anschließend wurde je 2 Mal mit PBS und Wasser gewaschen. Die Zellkerne wurden mit DAPI für 1 Minute gegengefärbt und wiederum 2 Mal mit Wasser gespült. Nach dem Eindecken mit ProLong™ Diamond Eindeckmittel wurden die Proben am Zeiss Mikroskop (LSM780) dokumentiert.

### 2.2.18 Immunhistochemie

3-5 µm Paraffinschnitte der Gewebemikroarrays (TMA – Tissue Micro Array) wurden immunhistochemisch auf CD147-Expression gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte über Nacht bei 37 °C im Brutraum erwärmt und anschließend für drei Mal 10 Minuten in Xylol entparaffiniert. Die Rehydrierung erfolgte in einer absteigenden Ethanolreihe:

Ethanol 99 %	2 Minuten
Ethanol 90 %	2 Minuten
Ethanol 80 %	2 Minuten
Ethanol 70 %	2 Minuten
Ethanol 50 %	2 Minuten
H <sub>2</sub> O	5 Minuten

Die Antigendemaskierung erfolgte in einer Küvette mit vorgeheiztem Citratpuffer pH 6 für 10 Minuten im kochenden Wasserbad. Nach dem Aufkochen wurde die Küvette mit offenem Deckel bei Raumtemperatur für 15 Minuten abkühlen gelassen. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde für 10 Minuten mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS pH 7,6 gehemmt. Nachfolgend wurden die Schnitte für 5 Minuten in TBS gewaschen und unspezifische Bindestellen mit 2,5 % Pferdeserum für 20 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Der Primärantikörper (CD147) wurde 1:2000 in 0,5 % BSA in TBS verdünnt und über Nacht bei 4 °C in der feuchten Kammer inkubiert.

Die Schnitte wurden für 5 Minuten in TBS gewaschen und dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer mit dem an Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper ImmPRESS HRP anti-mouse IgG inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in TBS erfolgte die Substratinkubation mit dem ImmPACT DAB Peroxidase Substat Kit für 3 Minuten bei Raumtemperatur. Die Färbung wurde durch Spülen in Leitungswasser abgestoppt. Für die Gegenfärbung wurden die Schnitte für 40 Sekunden in Hämatoxylin inkubiert und anschließend unter laufendem Leitungswasser für 20 Minuten gebläut.

Das Dehydrieren erfolgte in einer aufsteigenden Ethanolreihe:

Ethanol 50 %	5-6 mal Auf-und Abschwenken
Ethanol 70 %	5-6 mal Auf-und Abschwenken
Ethanol 80 %	5-6 mal Auf-und Abschwenken
Ethanol 90 %	5-6 mal Auf-und Abschwenken

---

Ethanol 99 %	2 Minuten
Xylol	Kurz eintauchen

Die Schnitte wurden je Objektträger mit 25 µl VectaMount® Permanent Mounting Medium und einem Deckglas eingedeckt. Zur Dokumentation wurden am Leica Mikroskop DMI 6000 B von jeder Gewebestanze Aufnahmen gemacht und zur späteren Zuordnung mit den Koordinaten XY abgespeichert.

### **2.2.19 Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mithilfe der Software GraphPad Prism 8.0 durchgeführt. Zur Berechnung wurden gepaarte und ungepaarte t-Tests, einfaktorielle Varianzanalysen, der Exakte Test nach Fisher sowie Tukey-Mehrfachvergleichstests und Pearson-Korrelationen verwendet. Signifikanzen sind in Graphen mit Sternchen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung eines impedanzbasierten Assays zur Bestimmung der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC)

#### 3.1.1 Freisetzungstests benötigen Zielzellen in Suspension

Bisher etablierte Methoden für die Messung der ADCC beruhen auf der Messung der Freisetzung von Substanzen, die zuvor in die Zielzelle eingebracht wurden. Hierfür werden radioaktives  $^{51}\text{Chrom}$  oder fluoreszenzbasierte Farbstoffe wie Calcein oder Carboxyfluoresceindiacetat-*N*-Succinimidylester (CFSE) in die Zelle eingebracht und deren Freisetzung nach der Behandlung gemessen.

In einem ersten Ansatz konnten durch den Calceinfreisetzungstest die Ergebnisse des radioaktiven Chromfreisetzungstests (Lohse u. a. 2016) bestätigt werden. Hierzu wurde die Epidermoid-Karzinom-Zelllinie A-431 mit  $10\ \mu\text{M}$  Calcein-AM markiert und anschließend mit  $10\ \mu\text{g/ml}$  225-IgA2.0-Antikörper und Granulozyten im Verhältnis 40:1 (Effektorzellen:Zielzellen) für 4 Stunden inkubiert. Es konnte  $36,3\ \% (\pm 6,4\ \%)$  spezifische Lyse der Zielzellen detektiert werden, die durch die Stimulation der Granulozyten mit  $25\ \text{nM}$  GM-CSF auf  $65,5\ \% (\pm 6,2\ \%)$  gesteigert werden konnte. Die Lyse der Zielzellen ist abhängig von der Interaktion mit dem  $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ , da durch die Zugabe von  $10\ \mu\text{g/ml}$  des blockierenden Antikörpers A59 der Effekt vollständig unterdrückt werden konnte (Abbildung 8A).



**Abbildung 8: Calceinfreisetzungstest benötigt Zielzellen in suspension**

A-431 Zielzellen  $5 \times 10^3$  in suspension (A) und  $2 \times 10^4$  adhärent (B) wurden mit Calcein-AM markiert. 4 Stunden nach der Behandlung mit  $10\ \mu\text{g/ml}$  IgA2.0-Antikörper und Granulozyten, mit und ohne GM-CSF Stimulation, im Verhältnis 40:1 (Effektorzellen:Zielzellen) wurde die Fluoreszenz im Überstand gemessen und die spezifische Calceinfreisetzung in Prozent berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten.

Um die Lyse der eigentlich adhären wachsenden Tumorzellen unter physiologischeren Bedingungen zu betrachten, wurden im nächsten Schritt die Zellen 24 Stunden vor der Behandlung ausgesät und adhären anwachsen gelassen. Dann wurden die Zellen mit Calcein-AM markiert und erneut mit Antikörper und Granulozyten behandelt. Nach 4 Stunden konnte keine vermehrte Freisetzung des Calceins durch die Behandlung mit 225-IgA2.0 gegenüber der Isotypkontrolle detektiert werden (Abbildung 8B). Die Fluoreszenz im Überstand nahm gegenüber den Kontrollen sogar ab, es wurde also weniger Calcein als die spontane Freisetzung gemessen. Daher kann der Calceinfreisetzungstest nicht zur Untersuchung der ADCC unter diesen physiologischeren Bedingungen für adhären wachsende Tumorzelllinien verwendet werden.

### **3.1.2 Die Impedanzmessung ermöglicht die Echtzeitmessung der IgA-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität**

Zur Etablierung des Impedanz-Assay wurde zunächst mittels einer Konzentrationsreihe die optimale Zelldichte identifiziert. Hierzu wurden unterschiedlich Zellzahlen der Zielzellen A-431 in spezielle E-plates, deren Boden mit Mikrogoldelektroden beschichtet ist, ausgesät. Durch das adhären Wachstum der Zellen auf den Elektroden kommt es zu einer Veränderung der Impedanz, die als dimensionsloser Parameter Zellindex (CI) angegeben wird. Bei einer Zellzahl von  $2 \times 10^4$  A-431 pro Well wurde nach 24 Stunden der maximale Zellindex, der konfluentes Zellwachstum indiziert, erreicht (Abbildung 9A). Im nächsten Schritt wurden die Tumorzellen mit dem EGFR-spezifischen 225-IgA2.0-Antikörper und Granulozyten von gesunden Spendern behandelt. Als Standardbedingungen für den Impedanz-Assay wurden 10  $\mu\text{g/ml}$  Antikörper, Granulozyten im Verhältnis 40:1 zu den Zielzellen und eine Stimulation mit 25 nM GM-CSF festgelegt, um anschließend die Effekte jeweils einer Variablen durch deren Titration beschreiben zu können. Der Zellindexwert wurde für den Zeitpunkt der Behandlung auf 1 normiert (nCI). Für die Vergleichbarkeit mit Freisetzungstests wurde die Abnahme des Zellindex im Verhältnis zur Isotypkontrolle – als  $\Delta\text{CI}$  zum Zeitpunkt 4 Stunden nach der Zugabe – berechnet. Die Echtzeitmessung zeigte eine schnelle Abnahme des Zellindex in der ersten Stunde nach der Behandlung, nach 2 Stunden sind bereits ein Großteil der Zielzellen abgelöst, das Maximum wird mit der Stimulation der Granulozyten mit GM-CSF nach 4 Stunden erreicht. Die Titration des Antikörpers von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  bis 20  $\mu\text{g/ml}$  ergab eine konzentrationsabhängige Zunahme des  $\Delta\text{CI}$ , wobei die Effektivität der ADCC mit Konzentrationen über 5  $\mu\text{g/ml}$  nur noch geringfügig gesteigert werden konnte, so dass vermutlich eine Sättigung der Rezeptoren bei hohen Antikörperkonzentrationen eintrat (Abbildung 9B). Die Zugabe der Granulozyten in aufsteigenden Verhältnissen zur Zielzelle führte zu einer stetigen Verbesserung der ADCC (Abbildung 9C). Die Stimulation der Granulozyten mit 25 nM GM-CSF führte nach 4 Stunden zu einem signifikant

gesteigerten  $\Delta CI$  gegenüber den gleichen Konditionen ohne Stimulation (Abbildung 9F). Die Titration von GM-CSF ergab, dass bei einem Messzeitraum über 4 Stunden die maximale Steigerung der ADCC bereits mit 10 nM erreicht wurde (Abbildung 9D). Das Ablösen der Zellen konnte durch die Zugabe von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  des Fc $\alpha$ RI-blockierenden Antikörpers A59 komplett verhindert werden (Abbildung 9E). Der Effekt (Abnahme des CI) beruht auf der Fc $\alpha$ RI-abhängigen Aktivierung der Granulozyten durch den EGFR-spezifischen IgA-Antikörper. Der Impedanz-Assay ermöglicht die Echtzeitmessung der IgA-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität an adhären wachsenden Zielzellen solider Tumore.

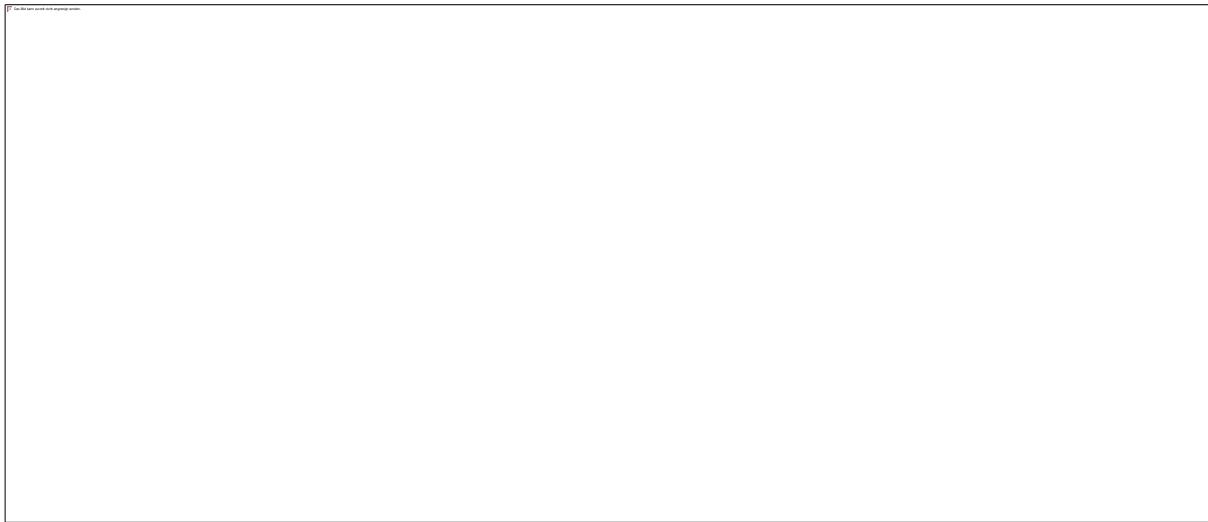


**Abbildung 9: Titrationen zur Etablierung der Impedanzmessung**

Wachstumskurve der A-431 Zielzellen mit den dargestellten Zellzahlen (A). Titration des Antikörpers (B), der Effektorzellen (C), von GM-CSF (D) mit den entsprechenden Dosis-Wirkungs-Kurven jeweils rechts daneben sowie die Zugabe des Fc $\alpha$ RI-blockierenden Antikörpers (E) unter den Standardbedingungen  $2 \times 10^5$  Zielzellen, Effektorzellen im Verhältnis 40:1 und 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Antikörper. Berechnung der jeweiligen Differenz zur Isotypkontrolle nach 4 Stunden als  $\Delta CI$  bezeichnet (F). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Zeitverläufe in Stunden von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten, jeweils durchgeführt in Triplikaten.

### 3.1.3 Funktionsanalysen der Granulozyten zeigen eine frühe Degranulierung

Die Aktivierung der Granulozyten durch die Quervernetzung über den EGFR-spezifischen IgA-Antikörper an die Zielzellen führte bereits nach einer Stunde zu einer signifikanten Freisetzung von Laktoferrin ( $c = 1483 \pm 65,8$  ng/ml;  $p = 0,0012$ ) in den Überstand (Abbildung 10A). Laktoferrin ist in den alpha Granula gespeichert und zeigt eine frühe Degranulierung der Granulozyten an (Heemskerck u. a. 2021). In Abbildung 10B ist die Messung des Superoxidanion ( $O_2^-$ ) mithilfe von Diogenes eine Stunde nach der Behandlung dargestellt. Die Aktivierung der Granulozyten durch Bindung an den IgA2.0 auf der Oberfläche der Zielzellen führte zum oxidativen Burst der Granulozyten mit der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies ( $p = 0,0297$ ).



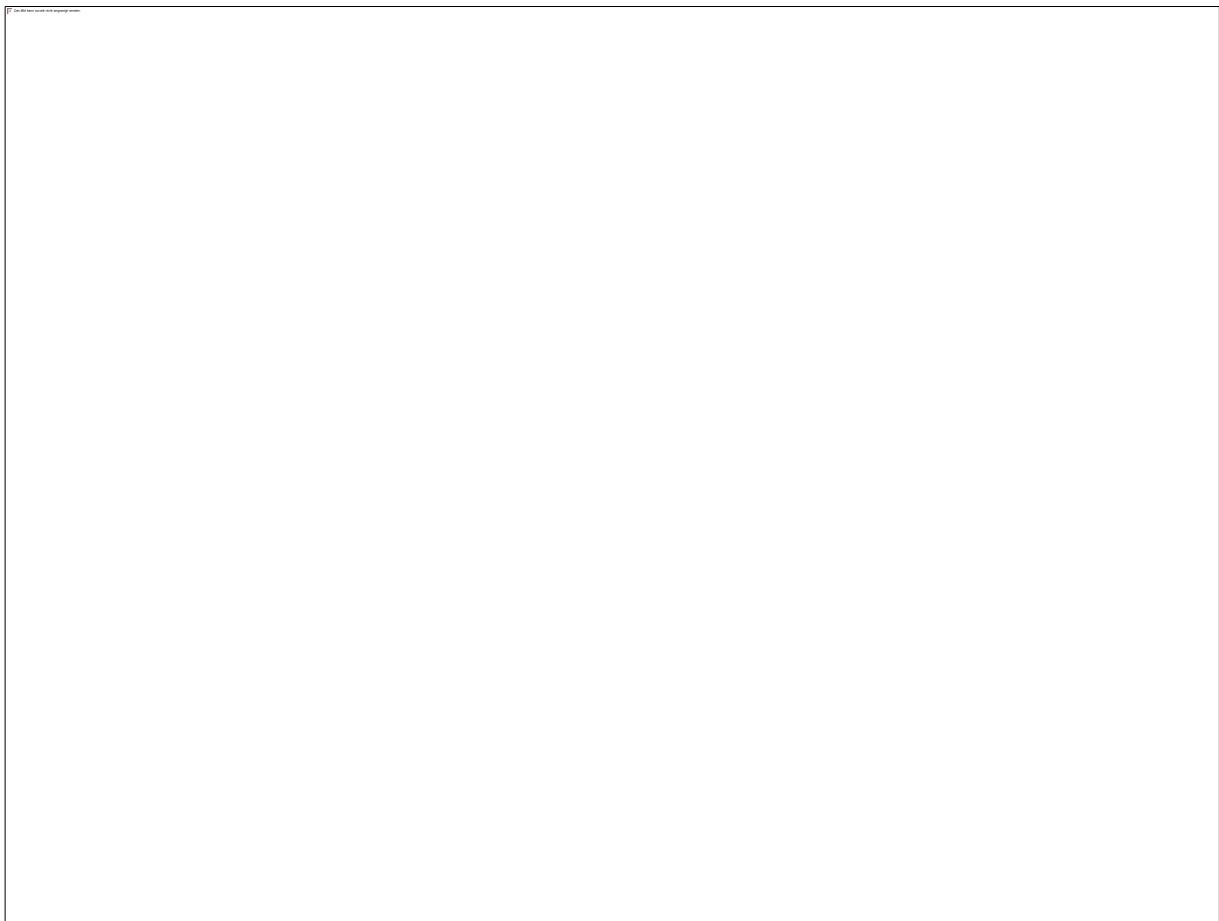
#### Abbildung 10: Funktionsanalyse der Granulozyten zeigt eine frühe Degranulierung

Detektion der Freisetzung von Laktoferrin (A) und Superoxidanion (B) in den Überstand eine Stunde nach Behandlung der A-431 und PMN mit IgA2.0 und Isotypkontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt jeweils in Tripikaten. \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ungepaarter t-Test.

### 3.1.4 Trogoptose als Mechanismus der granulozytenvermittelten ADCC von adhären Ten Tumorzellen

In der Literatur werden unterschiedliche Mechanismen aufgezeigt, wie die Granulozyten Tumorzellen abtöten können. Bakema et al beschrieben 2011, dass dem Zelltod der Zielzellen von Granulozyten, die über den  $Fc\alpha RI$  stimuliert werden, der Mechanismus der Autophagie zugrunde liegt (Bakema u. a. 2011). Chloroquin inhibiert den Zelltod durch Autophagie, indem es die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom verhindert. Sowohl die direkte Zugabe von  $100 \mu M$  Chloroquin als auch die Vorbehandlung der A-431 Zellen oder Granulozyten mit Chloroquin im Impedanz-Assay zeigten keinen Einfluss auf den Effekt der Granulozyten auf die Tumorzellen (Abbildung 11A-C).

2018 wurde durch Matlung et al. beschrieben, dass Granulozyten Tumorzellen durch Trogoptose abtöten können, ein Mechanismus, der unter anderem abhängig ist von der Aktivierung der PI3-Kinase in den Granulozyten (Matlung u. a. 2018). Durch die Zugabe von Wortmannin, einem Inhibitor der PI3-Kinase, in den Impedanz-Assay mit A-431 oder KYSE-30 Zielzellen konnte die ADCC durch die Granulozyten bei 100 nM vollständig unterdrückt werden (Abbildung 11D,G). Die Blockade der ADCC war auch zu beobachten, wenn nur die Granulozyten für 30 Minuten mit Wortmannin vorinkubiert und dann nach einem Waschschrift zu den Zielzellen gegeben wurden (Abbildung 11E,H). Die Vorinkubation der Zielzellen hingegen mit Wortmannin hatte keinen Effekt (Abbildung 11F,I). Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass Trogoptose der zugrundeliegende Mechanismus bei der Bekämpfung der Tumorzellen durch Granulozyten ist.



**Abbildung 11: Effekt von Chloroquin und Wortmannin auf die ADCC unterstützt Trogoptose als Mechanismus der ADCC**

Zu den ADCC Standardbedingungen wurden Chloroquin (**A**) und Wortmannin (**D,G**) zugefügt. Die Granulozyten oder die Zielzellen wurden für 30 Minuten mit Chloroquin (**B, C**) und Wortmannin (**E, F, H, I**) vorinkubiert, gewaschen und dann für den ADCC eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der Zeitverläufe in Stunden von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten, jeweils durchgeführt in Triplikaten.

### 3.1.5 Langzeitmessungen zeigten ein Auswachsen der Zielzellen

Verlaufsmessungen über 24 Stunden zeigten einen Wiederanstieg der Impedanz, der zwischen 4 und 6 Stunden nach Behandlung beginnt und vermutlich auf ein Wiederauwachsen der nicht vollständig abgetöteten Tumorzellen zurückzuführen ist (Abbildung 12A). Die Stimulation mit 25 nM GM-CSF verminderte das Auswachsen der Tumorzellen gegenüber den unstimulierten Granulozyten nach 24 Stunden ( $p = 0,0199$ ), konnte es aber nicht vollständig unterdrücken (Abbildung 12B). Western Blot Analysen der Überstände zeigten, dass die Menge an monomeren 225-IgA2.0-Antikörper nahezu konstant blieb (Abbildung 12C) und selbst nach 24 Std noch  $75,29\% \pm 6,63\%$  der Ausgangskonzentration vorhanden waren (Abbildung 12D). Daraufhin wurden die Granulozyten hinsichtlich Überleben und Funktion untersucht. Durchflusszytometrische Analysen der Granulozyten zeigten keine signifikante Abnahme der Annexin V/PI<sup>-</sup> CD66b<sup>+</sup> Fraktion, die die lebenden Granulozyten darstellt (Abbildung 12E). Im Gegenteil wurde das Überleben der Granulozyten durch die Zielzellen gefördert. Dies könnte an der Freisetzung von Zytokinen (unter anderem GM-CSF) liegen, die von den A-431 produziert werden (Abbildung 16A).

Zur Visualisierung wurden für 5 Stunden alle 5 Minuten Aufnahmen der lebenden Zellen während des ADCC mit dem ImageXpress Micro XLS Widefield High-Content Analysis System gefertigt (Abbildung 12F). Die Aufnahmen zeigten bereits 30 Minuten nach Zugabe von Antikörpern und Effektorzellen eine Gruppierung vieler Granulozyten um eine Tumorzelle herum. Allerdings nahm diese Anzahl an heterotypischen Aggregaten von  $50,3 \pm 5,5$  pro Aufnahme bereits nach 2 Stunden auf  $32,3 \pm 7,0$  Aggregate ab und nach 4 Stunden konnten nur noch  $9,0 \pm 4,0$  Aggregate ausgezählt werden. (Die Auszählung von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten wurde durchgeführt von Muriel Charlotte Hans geb. Bernhard.) Obwohl ausreichend Antikörper und lebende Granulozyten vorhanden waren, kam es zu keiner erneuten Bindung der Granulozyten an die Zielzellen.

**Abbildung 12: Langzeitmessungen zeigten ein Wiederauswachen der Zielzellen**

Impedanzmessung über 24 Stunden nach der Behandlung der A-431 Zielzellen mit Effektorzellen im Verhältnis 40:1 und 10 µg/ml IgA2.0-Antikörper ± 25 nM GM-CSF **(A)**. Vergleich des normalisierten Zellindex nach 4 und 24 Stunden mit und ohne GM-CSF Stimulation **(B)**. Repräsentativer Western Blot zum Nachweis der IgA α-Kette im ADCC-Überstand zu den angegebenen Zeitpunkten unter nicht-reduzierenden Bedingungen **(C)**. Berechnung der IgA2.0 Konzentration zu **(B)** aus drei unabhängigen Experimenten **(D)**. Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils an lebenden Annexin V<sup>-</sup> / PI<sup>-</sup> / CD66b<sup>+</sup> Granulozyten in Prozent **(E)**. Repräsentativer Ausschnitt nach 0; 0,5; 2 und 4 Stunden der Bildgebung lebender Zellen mit A-431 Zielzellen 1:20 zu PMN Effektorzellen mit IgA2.0 gegenüber Isotypkontrolle **(F)**. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler von n = 7 (A, B) und n = 3 (D-E) unabhängigen Experimenten, durchgeführt jeweils in Tripikaten. \*p<0,05 ungepaarter t-Test.

### 3.1.6 Erschöpfung der Granulozyten

In einem nächsten Schritt wurden im Impedanz-Assay nach 6 Stunden erneut Antikörper und frische Granulozyten zugegeben und das Auswachsen der Zielzellen dokumentiert (Abbildung 13A). Die initiale Zugabe von 225-IgA2.0-Antikörper und Granulozyten führte zu einer Abnahme der Impedanz nach 4 Stunden auf  $nCI = 0,10 \pm 0,03$ . Ohne erneute Zugabe von Granulozyten stieg der Zellindex durch das Auswachsen der Zielzellen nach 24 Stunden auf  $nCI = 0,60 \pm 0,09$  an, dies konnte auch durch frischen Antikörper nicht unterdrückt werden ( $nCI = 0,67 \pm 0,09$ ). Die Zugabe von frischen Granulozyten und Antikörper nach 6 Stunden konnte das Auswachsen der Zielzellen signifikant vermindern ( $nCI = 0,20 \pm 0,07$ ;  $p = 0,0075$ ). Eine zweite Behandlung mit Antikörper zu den frischen Granulozyten erwies sich hierfür als obsolet ( $nCI = 0,17 \pm 0,09$ ) (Abbildung 13B). Die Daten deuten auf eine Erschöpfung der Granulozyten nur wenige Stunden nach der aktivierenden Quervernetzung durch den 225-IgA2.0-Antikörper an die Zielzellen hin. Diese Hypothese konnte auch durch Verlaufsmessungen der ROS-Freisetzung unterstützt werden (Abbildung 13C). Die Maximale ROS-Produktion ist bereits nach einer Stunde erreicht ( $RLU = 1143,27 \pm 319,5$ ) und fällt nach 2 Stunden deutlich ab ( $RLU = 537,82 \pm 250,1$ ), liegt aber immer noch oberhalb dem Niveau der basalen Freisetzung durch den Isotyp-IgA-Antikörper ( $RLU = 128,32 \pm 39,5$ ). *In vivo* könnte durch die Rekrutierung neuer Granulozyten aus der Blutzirkulation das Problem erschöpfter Effektorzellen gelöst werden. Bereits in früheren Studien konnte eine spezifische Freisetzung von  $LTB_4$  durch die Aktivierung der Granulozyten mit IgA-Antikörpern gezeigt werden (van der Steen u. a. 2009). Diese Beobachtung konnte ich im adhärenen Versuchsansatz mit dem EGFR-spezifischen 225-IgA2.0 bestätigen (Abbildung 13D). Eine Stunde nach der Behandlung der A-431 mit PMN und IgA2.0 konnten im Mittel  $551,0 \pm 122,6$  pg des Chemokins im Überstand nachgewiesen werden ( $p = 0,0052$ ).  $LTB_4$  fördert das Einwandern frischer Granulozyten durch das Endothel in das Gewebe (Breedveld und van Egmond 2019) und kann somit zu einer positiven Feedbackschleife aus ADCC und der Rekrutierung neuer Granulozyten beitragen.

**Abbildung 13: Erschöpfung der Granulozyten**

Impedanzmessung über 24 Stunden nach der Behandlung der A-431 Zielzellen mit Effektorzellen im Verhältnis 40:1 und 10 µg/ml IgA2.0-Antikörper mit erneuter Zugabe von Antikörper und Granulozyten nach 6 Stunden **(A)**. Vergleich des normalisierten Zellindex nach 4 und 24 Stunden mit und ohne erneuter Zugabe von Antikörper und Granulozyten **(B)**. Detektion der Freisetzung von Superoxidanion in den Überstand 0; 1; 2 und 4 Stunden nach Behandlung der A-431 und PMN mit IgA2.0 und Isotyp Kontrolle **(C)**. Leukotrien B<sub>4</sub> im Überstand eine Stunde nach Behandlung der A-431 und PMN mit IgA2.0 und Isotyp Kontrolle **(D)**. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler von mindestens n = 3 (A, B) und n = 4 (C, D) unabhängigen Experimenten, durchgeführt jeweils in Tripikaten. ns = nicht signifikant; \*p<0,05; \*\*p<0,01 ungepaarter t-Test.

## 3.2 Screening von Kopf-Hals-Tumorzellen mit der impedanzbasierten Methode

### 3.2.1 Zelllinienabhängige Kinetik der ADCC

Für die Untersuchung der ADCC von adhärent wachsenden Tumorzellen wurden sieben Plattenepithelzellkarzinom-Zelllinien (CAL-33, FaDu, HN, HSC-4, SAS, SAT, UM-SCC-1) des Kopf-Hals-Bereichs ausgewählt. Die bereits beschriebene Zelllinie A-431 und die Plattenepithelzelllinie des Ösophagus KYSE-30 wurden aufgrund ihrer hohen EGF-Rezeptor-Expression als Kontrollzelllinien mitgeführt. Von den Zelllinien wurden  $2 \times 10^4$  Zellen 24 Stunden vor Antikörperzugabe (10 µg/ml) ausgesät und konfluent anwachsen gelassen. Granulozyten von gesunden Spendern wurden mit 25 nM GM-CSF stimuliert und im Verhältnis 40:1 von Effektoren zu Zielzellen zugegeben. Zur Vergleichbarkeit wurden die Zellindexwerte direkt vor der Behandlung auf 1 normiert (nCI) und die normierten Daten der Isotypkontrolle und 225-IgA2.0-Antikörper nach 4 Stunden als Balkendiagramm neben dem Verlauf der Impedanzkurven dargestellt. Zur Beschreibung der Kinetik wurde der Zeitpunkt der halbmaximalen Reduktion der Impedanz für jede Zelllinie berechnet (EC<sub>50</sub>-Zeit). Die beiden Kontrolllinien A-431 und KYSE-30 zeigten spezifisch für die Behandlung mit 225-IgA2.0 einen frühen starken Abfall des Zellindex (EC<sub>50</sub>-Zeit:  $44,4 \pm 10,8$  Minuten und  $40,1 \pm 5,9$  Minuten). Daraus resultierten ein fast vollständiges Ablösen der Zielzellen von den Elektroden (nCI 4 Stunden:  $0,11 \pm 0,04$  und  $0,09 \pm 0,03$  sowie  $p < 0,0001$  und  $p = 0,0003$  gegenüber der Isotypkontrolle) und ein nur minimales Wiederauswachsen der nicht abgetöteten Zellen im Verlauf von 24 Stunden (nCI 24 Stunden:  $0,16 \pm 0,06$  und  $0,38 \pm 0,21$ ) (Abbildung 14A,B). Bei der Zelllinie SAT (Mundhöhle) konnte ebenfalls eine starke, spezifisch durch den 225-IgA2.0 vermittelte Zytotoxizität der Granulozyten gegenüber den Tumorzellen beobachtet werden (nCI 4 Stunden:  $0,13 \pm 0,04$  gegenüber  $0,79 \pm 0,06$  der Isotypkontrolle  $p = 0,0001$ ), jedoch mit einem langsameren, flacheren Verlauf der Kurve (EC<sub>50</sub>-Zeit:  $72,0 \pm 14,4$  Minuten). Innerhalb des 24-stündigen Messzeitraums nach der Behandlung konnte kein signifikantes Auswachsen der Zellen gemessen werden (nCI 24 Stunden:  $0,10 \pm 0,03$ ) (Abbildung 14C). Vergleichbare Verläufe konnten auch für die Zelllinien UM-SCC-1 (Mundhöhle) und FaDu (Hypopharynx) beobachtet werden, wobei hier eine Sensitivität der Zelllinien gegenüber den GM-CSF stimulierten Granulozyten bereits ohne spezifischen Antikörper vorlag (Abbildung 14D,E). Diese kontinuierliche Abnahme des CI über den gesamten Messzeitraum nach Zugabe der Granulozyten konnte allerdings, spezifisch für den IgA2.0, beschleunigt und verstärkt werden (EC<sub>50</sub>-Zeit:  $47,1 \pm 19,7$  Minuten und  $51,2 \pm 8,4$  Minuten; nCI 4 Stunden: IgA2.0 =  $0,15 \pm 0,07$  gegenüber Isotyp =  $0,58 \pm 0,1$  ( $p = 0,0274$ ) und IgA2.0 =  $0,30 \pm 0,1$  gegenüber Isotyp =  $0,79 \pm 0,2$  ( $p = 0,0346$ )).

**Abbildung 14: ADCC Zelllinien**

$2 \times 10^4$  Zellen der angegebenen Tumorzelllinie wurden mit  $10 \mu\text{g/ml}$  IgA2.0-Antikörper, mit Effektorzellen im Verhältnis 40:1 und mit  $25 \text{ nM}$  GM-CSF behandelt und für weitere 24 Stunden die Impedanz gemessen (A-I). Der Zellindexwert zum Zeitpunkt der Zugabe, 24 Stunden nach dem Aussäen der Zielzellen, wurde auf 1 normiert. Neben dem Zeitverlauf der Impedanzmessung ist der normalisierte Zellindex nach 4 Stunden als Balkendiagramm gezeigt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt jeweils in Tripikaten. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns nicht signifikant; ungepaarter t-Test.

Während des 24-stündigen Messzeitraums nach der Behandlung konnte weder bei UM-SCC-1 noch bei FaDu ein Auswachsen der Zellen gemessen werden (nCI 24 Stunden:  $0,12 \pm 0,06$  und  $0,18 \pm 0,03$ ). Auch die Zelllinie CAL-33 (Zunge) zeigte eine spezifische Abnahme des Zellindex durch die Zugabe von IgA2.0 und stimulierten Granulozyten (nCI 4 Stunden: IgA2.0 =  $0,36 \pm 0,07$  gegenüber Isotyp =  $0,86 \pm 0,08$  ( $p = 0,0082$ )) mit der langsamsten Kinetik der untersuchten HNSCC Zelllinien ( $EC_{50}$ -Zeit:  $89,7 \pm 17,4$  Minuten) (Abbildung 14F). Jedoch kam es zum vollständigen Wiederauswachsen der nicht abgetöteten Tumorzellen bis zur Konfluenz 24 Stunden nach der Behandlung (nCI 24 Stunden:  $0,89 \pm 0,23$  gegenüber Zellen ohne Behandlung  $0,9 \pm 0,1$ ). Die Zelllinien SAS (Zunge), HSC-4 (Zunge) und HN (Mundhöhle) zeigten keine Sensitivität gegenüber den stimulierten Granulozyten und nur minimales Ansprechen auf die Behandlung mit IgA2.0 (Abbildung 14G-I). Unter diesen drei Zelllinien mit vergleichbarem Verlauf konnte bei HSC-4 eine minimale, aber zügige Abnahme des Zellindexwertes gemessen werden ( $EC_{50}$ -Zeit:  $42,2 \pm 10,7$  Minuten), der gegenüber der Isotypkontrolle nach 4 Stunden signifikant war (nCI 4 Stunden IgA2.0 =  $0,82 \pm 0,02$  gegenüber Isotyp =  $1,02 \pm 0,02$  ( $p = 0,0027$ )) (Abbildung 14G). Für SAS und HN konnte keine signifikante Reduktion der Impedanz spezifisch für den IgA2.0-Antikörper detektiert werden (nCI 4 Stunden: IgA2.0 =  $0,98 \pm 0,06$  gegenüber Isotyp =  $1,22 \pm 0,08$  ( $p = 0,0824$ ) und IgA2.0 =  $0,82 \pm 0,14$  gegenüber Isotyp =  $0,95 \pm 0,04$  ( $p = 0,3848$ )) (Abbildung 14H,I). Alle drei Zelllinien wuchsen vollständig wieder aus und erreichten 24 Stunden nach der Behandlung wieder Konfluenz auf dem Niveau der unbehandelten Zellen.

### **3.2.2 EGFR-Oberflächenexpression und Proteinlevel korreliert mit der ADCC-Effektivität**

Die Tumorzelllinien wurden hinsichtlich ihrer Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA-Ebene, des Gesamtproteinlevels und der Oberflächenexpression analysiert. Hierzu wurden die Zellen in ihrem jeweiligen Kulturmedium ausgesät und nach 24 Stunden bei einer Konfluenz von etwa 80 % geerntet. Anschließend wurden mRNA und Protein isoliert und mittels qRT-PCR und Western Blot jeweils die Expression des EGFR im Verhältnis zum Haushaltsgen RPL13a und der Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin ermittelt (Abbildung 15A-C). Für die Oberflächenexpression wurden die Zellen mit Antikörper spezifisch für den EGFR gefärbt und durchflusszytometrisch die Färbeintensität (MFI) bestimmt (Abbildung 15D). Aus den ADCC-Daten wurde der  $\Delta$ CI nach 4 Stunden als Differenz aus dem nCI der mit IgA2.0 und GM-CSF stimulierten Granulozyten behandelten Tumorzellen und dem nCI der entsprechenden IgA-Isotypkontrolle berechnet (Abbildung 15E). Der  $\Delta$ CI, als Marker für die ADCC-Effektivität, korrelierte positiv mit der Gesamtproteinmenge (Pearson-Korrelationskoeffizient  $r = 0,80$ ;  $p = 0,0102$ ) und der Oberflächenexpression ( $r = 0,79$ ;  $p = 0,0108$ ) des EGFR auf den Tumorzelllinien (Abbildung 15F). Damit einhergehend zeigten die drei Zelllinien mit der höchsten EGFR-Expression (A-431, KYSE-30

und SAT) eine starke und signifikante Reduktion der Impedanz im ADCC-Assay. Die Daten sind stimmig mit einer früheren Studie aus 2012 von Derer et al, die ebenfalls mittels Chromfreisetzungstests einen Zusammenhang zwischen der EGFR-Oberflächenexpression und der Effektivität von ADCC-Assays darstellen konnten (Derer u. a. 2012).



**Abbildung 15: Korrelation der EGFR-Expression mit  $\Delta CI$**

Aus den Tumorzelllinien wurde mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und dann mittels qRT-PCR die Expression von EGFR relativ zum Haushaltsgen RPL13a bestimmt **(A)**. Die Proteinlysate der Zelllinien wurden mittels Western Blot auf die Expression von EGFR untersucht, als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin detektiert. Repräsentativer Western Blot **(B)**. Darstellung des relativen EGFR Proteinlevels zur  $\beta$ -Aktin Ladekontrolle **(C)**. Die Oberflächenexpression von EGFR wurde durchflusszytometrisch bestimmt und als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt **(D)**. Aus den ADCC Daten der Zelllinien berechnete Differenz des Zellindex nach der Formel:  $\Delta CI = nCI$  4 Stunden (Behandlung mit IgA2.0) –  $nCI$  4 Stunden (Behandlung mit Isotypkontrolle) **(E)**. Korrelation der EGFR-Expression mit dem  $\Delta CI$  nach 4 Stunden, berechnet als Pearson-Korrelationskoeffizient  $r$ ; Signifikanzen dargestellt als  $*p < 0,05$  **(F)**. Dargestellt sind die Mittelwerte aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung, normalisiert auf den Mittelwert aller Zelllinien **(A, B, D)**

### 3.2.3 Screening der HNSCC-Zelllinien auf weitere ADCC-Effektivitätsmarker

Die Tumorzelllinien wurden hinsichtlich ihrer Expression weiterer Marker untersucht, die in Zusammenhang mit der Effektivität der ADCC gebracht werden könnten. Mittels qRT-PCR wurde jeweils die Expression der immunmodulatorischen Zytokine GM-CSF, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ 1 relativ zum Haushaltsgen RPL13a gemessen (Abbildung 16A-C). Auffällig hierbei ist die Zelllinie HSC-4, bei der von allen drei Zytokinen die stärksten Expressionslevel vorlagen, die allerdings nur ein minimales Ansprechen im Impedanz-Assay zeigte. Die Expression dieser Marker korrelierte nicht mit der ADCC-Effektivität 4 Stunden nach der Behandlung der untersuchten Tumorzelllinien (GM-CSF:  $r = -0,48$ ,  $p = 0,1955$ ; TNF- $\alpha$ :  $r = -0,3572$ ,  $p = 0,3453$ ; TNF- $\beta$ 1:  $r = -0,3352$ ,  $p = 0,3779$ ).

Interleukin-8 wirkt als Chemokin auf die Migration und Aktivierung der Granulozyten (Breedveld und van Egmond 2019). Das von den Tumorzellen sezernierte CXCL8 konnte im Überstand 24 Stunden nach dem Aussäen der Zelllinien mittels ELISA detektiert werden (Abbildung 16D). Die Zelllinien A-431 ( $160,5 \pm 30,4$  pg/ml), KYSE-30 ( $347,7 \pm 195,1$  pg/ml) und SAT ( $281,0 \pm 20,8$  pg/ml), die die stärksten EGFR-Expressionslevel aufwiesen und im Impedanz-Assay am besten ansprachen, sezernierten nur geringe Mengen CXCL8 im Vergleich zu HN ( $2520,4 \pm 258,3$  pg/ml), CAL33 ( $1367,5 \pm 523,9$  pg/ml) und UM-SCC ( $1744,5 \pm 681,4$  pg/ml), die allerdings ganz unterschiedliche Kinetiken im ADCC-Assay zeigten. Aus den Daten zu den neun untersuchten Zelllinien ergab sich bei der Pearson-Korrelation ein Koeffizient von  $r = -0,59$  ( $p = 0,09$ ), also ein Trend hin zu einem negativen Zusammenhang der CXCL8 Produktion mit der Effektivität der ADCC.

Der Mac-1 Rezeptor auf Neutrophilen, bestehend aus den beiden Integrinen CD11b (Integrin  $\alpha_M$ ) und CD18 (Integrin  $\beta_2$ ), wurde in der Literatur als essentiell für die Fc $\alpha$ RI-abhängige Aktivierung der Granulozyten für die ADCC beschrieben (van Spriel u. a. 2001; Matlung u. a. 2018). Die Tumorzelllinien wurden auf die Expression der Mac-1 Liganden ICAM-1, ICAM-2, ICAM-4 und ICAM-5 (*Intercellular adhesion molecule*) auf mRNA-Ebene durch qRT-PCR untersucht (Abbildung 16E-H). Zusätzlich wurde die Oberflächenexpression von ICAM-1 durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 16I). Das Vorhandensein von ICAM-Molekülen zeigte sich in diesem Model als nicht-prädiktiv für die Empfänglichkeit der Tumorzellen auf die Behandlung mit GM-CSF stimulierten Granulozyten und IgA2.0-Antikörper. Sowohl in KYSE-30 als auch in CAL-33 Zellen konnte keine der untersuchten Isoformen nachgewiesen werden, beide Zelllinien wiesen aber eine signifikante Reduktion des CI gegenüber der Isotypkontrolle nach 4 Stunden auf. Die Zelllinien HSC-4, mit hohen Expressionsleveln für ICAM-1 und ICAM-2, sowie HN, mit starker Expression aller untersuchten Isoformen, zeigten im Impedanz-Assay nur minimales Ansprechen auf die Behandlung. Für die Oberflächenexpression von ICAM-1 ergab die Korrelation mit dem  $\Delta$ CI nach 4 Stunden eine nicht signifikante Tendenz zu einem negativen Zusammenhang (Pearson  $r = -0,62$ ;  $p = 0,0777$ ).

Interessanterweise ergab sich eine signifikante, positive Korrelation der ICAM-1-Oberflächenexpression und der GM-CSF-Menge der Tumorzellen ( $r = 0,93$ ;  $p = 0,0002$ ).

Die Familie der leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains (LRIG) Proteine umfasst drei Transmembranproteine (LRIG1-3), die an der Regulation von Rezeptortyrosinkinasen wie dem EGFR beteiligt sind (Rafidi u. a. 2013). LRIG Proteine können bei unterschiedlichen Krebsarten als prognostischer Marker fungieren. So ist beschrieben, dass die Expression von LRIG1 bei Kopf-Hals-Tumoren mit einer guten Prognose assoziiert ist (Lindquist u. a. 2014). Die Expression von LRIG1 in den für den ADCC eingesetzten Tumorzelllinien wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf das Haushaltsgen RPL13a normiert (Abbildung 16J). Auffällig waren hierbei die Zelllinien HN und HSC-4, die vergleichbar zu den ICAM-Daten hohe Level an LRIG1-mRNA zeigten. Die Zelllinien mit geringer LRIG1-Expression (A-431, FaDu, KYSE-30 und UM-SCC-1) zeigten ein gutes Ansprechen auf die Behandlung mit stimulierten Granulozyten und IgA2.0-Antikörper mit einer starken Reduktion der Impedanz auf einen nCI-Wert  $< 0,3$  nach 4 Stunden Reaktionsdauer. Die Abwesenheit von LRIG1 verhinderte nicht das Ansprechen auf den ADCC, so dass Patienten mit schlechter Prognose von der Therapie mit EGFR-spezifischen IgA-Antikörpern profitieren könnten.

**Abbildung 16: Expressionsanalyse Tumorzelllinien**

Aus den Tumorzelllinien wurde mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und dann mittels qRT-PCR die Expression von GM-CSF **(A)**; TNF- $\alpha$  **(B)**; TGF- $\beta$ 1 **(C)**; ICAM-1 **(E)**; ICAM-2 **(F)**; ICAM-4 **(G)**; ICAM-5 **(H)** und LRIG1 **(J)** relativ zum Haushaltsgen RPL13a bestimmt. Aus den Überständen der Tumorzelllinien 24 Stunden nach dem aussäen wurde die Menge an freigesetztem CXCL8 durch einen Sandwich-ELISA ermittelt **(D)**. Die Oberflächenexpression von ICAM-1 wurde durchflusszytometrisch analysiert und als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) relativ zur Isotypkontrolle dargestellt **(I)**. Dargestellt sind die Daten als Box-Whisker-Plot mit allen Werten von Min bis Max aus n = 3 unabhängigen Experimenten **(A, B, C, E, F, G, H, I, J)**. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n = 3 unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung **(D)**.

### 3.3 Herstellung des IgA3.0-Dimers

#### 3.3.1 Charakterisierung des IgA3.0-Dimers im Vergleich zu dem korrespondierenden Monomer sowie weiteren IgA-Dimeren

Der bisher in dieser Arbeit für die ADCC-Assays verwendete IgA2.0-Antikörper wurde aus dem IgA2m(1)-Subtyp abgeleitet und durch Einfügen mehrerer Punktmutationen bezüglich biochemischer und pharmakokinetischer Eigenschaften sowie in seiner therapeutischen *in vivo* Effizienz optimiert (Lohse u. a. 2016). Unter anderem wurde dabei die Deletion C471 vorgenommen, die eine Dimerisierung des IgA2.0-Antikörpers verhindert. In früheren Studien zeigten sich jedoch die IgA-Dimere IgA1, IgA2WT und der optimierte IgA2m(1) mit der P221R Mutation zur kovalenten Verbindung der leichten und schweren Ketten (im Folgenden als IgA2P221R bezeichnet) in funktionalen Assays dem jeweiligen Monomer überlegen (Lohse u. a. 2011), so dass auch der optimierte IgA2.0 als Dimer produziert und im Rahmen dieser Arbeit getestet werden sollte. Durch Wiedereinführung des Tailpiece Cystein 471 (Klonierung des Vektors durch Manuel Linder) konnte das korrespondierende Dimer, hiernach IgA3.0 bezeichnet, hergestellt werden. Um ausreichende Antikörpermengen für funktionale Assays produzieren zu können, erwies sich letztlich das ExpiCHO-Expressionssystem mit einer Ausbeute von  $16,46 \pm 0,3 \mu\text{g}$  IgA3.0 pro ml Kulturvolumen als geeignet. Zur Verbesserung der Dimer zu Monomer Ratio wurde ein weiterer Aufreinigungsschritt, bei dem die nickelbindende Eigenschaft des His-Tag der J-Chain genutzt wurde, eingeführt. Zur Überprüfung des korrekten Zusammenbaus nach der Produktion wurden sowohl der monomere IgA2.0-Antikörper als auch die dimeren IgA1-, IgA2WT-, IgA2P221R- und IgA3.0-Antikörper unter nicht reduzierenden und reduzierenden Bedingungen auf ein Gel aufgetragen. Die Western Blots wurden mit an Peroxidase gekoppelten Antikörpern gegen die schwere  $\alpha$ -Kette, die leichte  $\kappa$ -Kette und die J-Chain inkubiert und im Folgenden mittels Chemilumineszenzsubstrat sowie dem Azure 600 Imaging System visualisiert (Abbildung 17A-C). Das IgA2.0-Monomer zeigte für die schwere Kette die erwarteten Banden bei etwa 150 kDa unter nicht reduzierenden und 50 kDa unter reduzierenden Bedingungen (Lohse u. a. 2016). Die  $\alpha$ -Ketten der Dimere laufen im Gel unter reduzierenden Bedingungen auf unterschiedlichen Höhen knapp oberhalb der 50 kDa Markerbande. Die verschiedenen Größen und Doppelbanden lassen auf unterschiedliche Glykosylierungen der schweren  $\alpha$ -Kette schließen (Abbildung 17A). Die leichte  $\kappa$ -Kette konnte für alle aufgetragenen reduzierten IgA-Antikörper auf der gleichen Höhe bei etwa 25 kDa detektiert werden (Abbildung 17B). Die etwa 15 kDa große J-Chain, die zwei Monomere zu einem Dimer verbindet, wurde bei allen Dimeren und nicht bei dem monomeren IgA2.0 nachgewiesen (Abbildung 17C). Für die Dimere konnten unter nicht reduzierenden Bedingungen Banden bei etwa 340 kDa detektiert werden. Beim IgA2WT-Dimer zeigte

sich durch ein geringeres Molekulargewicht gegenüber dem IgA1WT-Dimer und dem IgA2P221R-Dimer, dass die leichte  $\kappa$ -Kette nicht kovalent verbunden ist (Lohse u. a. 2012). Dass auch die IgA3.0-Dimerbande unter nicht reduzierenden Bedingungen etwas niedriger läuft, könnte mit dem Glykosylierungsstatus zusammenhängen. Banden oberhalb 340 kDa weisen auf höhere polymere Verbindungen hin, die vor allem beim IgA2P221R detektiert werden konnten (Lohse u. a. 2012). Das gleiche Bild ergibt sich auch unter denaturierenden, nicht reduzierenden Bedingungen mit anschließender Silbernitratfärbung (Abbildung 17D). Für das Monomer IgA2.0 wurde eine Bande bei 150 kDa, für die Dimere IgA1WT, IgA2P221R und IgA3.0 jeweils eine Bande bei 320 - 340 kDa sichtbar. Beim IgA2WT-Dimer konnte unter diesen Bedingungen die leichte Kette dissoziieren, so dass sich zwischen 200 und 300 kDa mehrere Banden aus unterschiedlich zusammengesetzten  $\alpha$ -Ketten-Komplexen sowie eine Bande bei 25 kDa für die  $\kappa$ -Kette ergeben. Oberhalb 340 kDa sind hier bei allen Dimeren polymere Aggregate zu sehen. Die unterschiedliche Glykosylierung der Antikörper führt zu einer Mikroheterogenität selbst innerhalb einer Herstellungscharge, die sich auch in unterschiedlichen isoelektrischen Punkten niederschlägt. Zu deren Analyse wurden die Antikörper unter nativen Bedingungen auf ein Gel mit einem pH-Gradienten von pH 3 bis pH 10 aufgetragen und nach der isoelektrischen Fokussierung mit Silbernitrat gefärbt (Abbildung 17E). Für IgA2.0, IgA2WT und IgA3.0 ergab sich die jeweils stärkste Bande bei pH 6,5, für IgA1 bei pH 7,2. Für IgA2P221R konnten zwei deutliche Banden bei pH 6,2 und pH 7,2 detektiert werden. Während das IgA1-Dimer noch eine weitere Bande bei pH 6,9 zeigte, traten bei den IgA2WT- und IgA3.0-Dimeren weitere schwache Banden bei pH 7,4 und pH 7,8 auf. Die Charakterisierung zeigte, dass der neu hergestellte IgA3.0-Antikörper nach der Aufreinigung überwiegend in dimerer Form vorliegt.

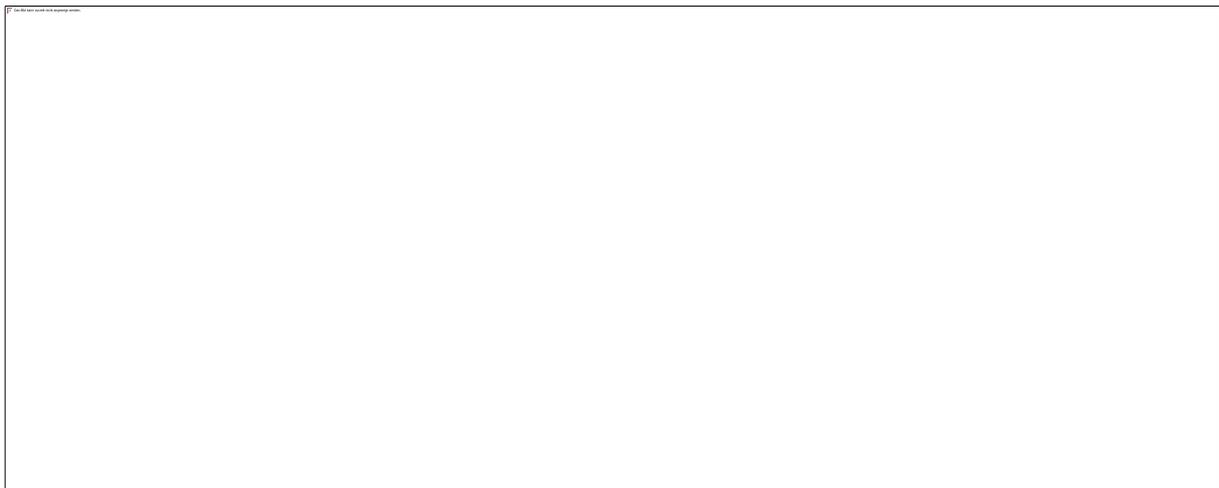


**Abbildung 17: Biochemische Charakterisierung der dimeren IgA-Antikörper**

Die produzierten IgA-Antikörper IgA2.0, IgA1, IgA2WT, IgA2P221R und IgA3.0 wurden gelelektrophoretisch unter denaturierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen (links) sowie unter reduzierenden Bedingungen (rechts) aufgetrennt und dann mittels Western Blot mit Antikörpern gegen die  $\alpha$ -Kette (**A**),  $\kappa$ -Kette (**B**) und J-Chain (**C**) der korrekte Zusammenbau visualisiert. Größe und Reinheit wurden durch Silbernitratfärbung der aufgereinigten Antikörper aufgetrennt unter denaturierenden nicht-reduzierenden Bedingungen bestimmt (**D**). Isoelektrische Fokussierung mit anschließender Silbernitratfärbung (**E**).

### 3.3.2 Lektinblots zeigten eine schwache Glykosylierung des IgA3.0-Dimers

Zur weiteren Charakterisierung der produzierten Antikörper wurde die Glykosylierung mittels Lektinen, die spezifisch an bestimmte Zuckerreste binden, detektiert. Für Ricinus Communis Agglutinin I (RCA I), das hauptsächlich Gal $\beta$ 1-4GlcNAc und weitere Gal $\beta$ 1 Oligosaccharide erkennt (A. M. Wu u. a. 2006), konnte eine starke Bande für das IgA2P221R-Dimer, eine schwächere Bande für IgA2WT-Dimer sowie durch lange Belichtung schwache Banden für die Dimere IgA1 und IgA3.0 (in Abbildung nicht gezeigt) detektiert werden (Abbildung 18A). Im Glykosylierungsprofil der Dimere IgA2WT und IgA2P221R konnte  $\alpha$ -Fucose mittels Aleuria Aurantia Lektin (AAL) nachgewiesen werden (Abbildung 18B). Große Mengen an terminalem  $\alpha$ -N-Acetylglucosamin ( $\alpha$ -GlcNAc) konnten durch das Lektin Griffonia Simplicifolia I (GSL I) beim IgA2WT-Dimer ermittelt werden (Abbildung 18C). In geringeren Mengen zeigten auch die anderen Dimere IgA1, IgA2P221R und IgA3.0 eine Glykosylierung mit  $\alpha$ -GlcNAc. Mit dem Sambucus Nigra Lektin (SNL) wurde die terminale Glykosylierung mit Sialinsäure, gebunden an Galactose oder N-Acetylglucosamin, in allen IgA-Dimeren nachgewiesen. Dabei zeigte das IgA2WT-Dimer die größte Menge (Abbildung 18D). Die starke Glykosylierung des IgA2WT- und IgA2P221R-Dimers erklärt die zuvor beschriebenen Unterschiede im Molekulargewicht der schweren Ketten. Bei dem monomeren IgA2.0 konnte keine Glykosylierung mit den für die benutzen Lektinen spezifischen Zuckern dokumentiert werden. Gleichmäßige Antikörpermengen wurden durch die Ladekontrolle mit Antikörper gegen die IgA  $\alpha$ -Kette gezeigt (Abbildung 18E).



#### Abbildung 18: Lektin Blots zeigen Glykosylierungsprofil der IgA-Antikörper

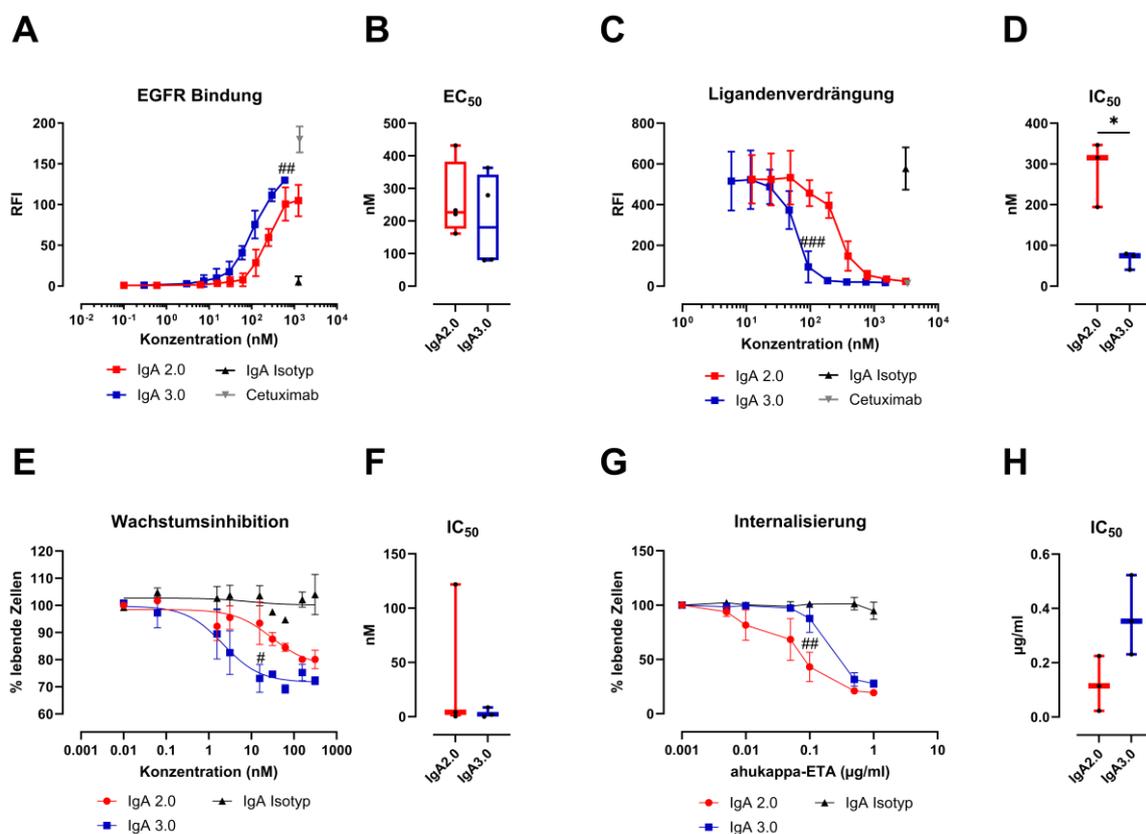
Die Glykosylierung der produzierten Antikörper IgA2.0, IgA1, IgA2WT, IgA2P221R und IgA3.0 wurde mittels Western Blot und biotinylierten Lektinen Ricinus Communis Agglutinin I (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) **(A)**, Aleuria Aurantia Lektin ( $\alpha$ -Fucose) **(B)**, Griffonia Simplicifolia I ( $\alpha$ -GlcNAc) **(C)** und Sambucus Nigra Lektin (terminale Sialylierung) **(D)** detektiert. Als Ladekontrolle wurde Antikörper gerichtet gegen die  $\alpha$ -Kette benutzt **(E)**.

## 3.4 Funktioneller Vergleich von IgA2.0 und IgA3.0

### 3.4.1 Fab-vermittelte Bindungs- und Funktionsanalyse

Nachdem durch die Visualisierung von einem korrekten Zusammenbau des IgA3.0-Dimers ausgegangen werden konnte, wurde die Funktionalität beginnend mit der Fab-vermittelten Rezeptorbindung im Vergleich zum korrespondierenden Monomer IgA2.0 analysiert. Zuerst wurde die Bindung an die stark EGFR-exprimierenden Zellen A-431 mittels indirekter Immunfluoreszenz durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 19A). Die Bindungskurven deuteten auf eine etwas verbesserte Avidität des IgA3.0-Dimers gegenüber dem IgA2.0-Monomer hin, die bei 200 µg/ml signifikant gesteigert war ( $p = 0,0095$ ). Die Berechnung des  $EC_{50}$ -Wertes ergab einen nicht signifikanten Unterschied von  $EC_{50}$  IgA3.0 =  $200,8 \pm 71,55$  nM zu  $EC_{50}$  IgA2.0 =  $261,6 \pm 58,83$  nM ( $p = 0,6463$ ) (Abbildung 19B). Der zugehörige IgG1-Antikörper Cetuximab zeigte jedoch eine höhere Avidität. Für den unspezifischen IgA2-Kontrollantikörper konnte keine Bindung an A-431 Zellen gemessen werden. Signifikant verbessert war die Effektivität des IgA3.0 gegenüber IgA2.0 in der Verdrängung des EGFR-Liganden EGF an A-431 Zellen mit 31,25 µg/ml Antikörper ( $p = 0,0007$ ) (Abbildung 19C). Die Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte (halbmaximale Inhibition) ergab für IgA3.0, dass eine Konzentration von  $64,74 \pm 12,4$  nM ausreicht, um die Hälfte des FITC-markierten EGF-Liganden von der Oberfläche der A-431 Zellen zu verdrängen, während für IgA2.0 signifikant mehr Antikörper benötigt wurde ( $IC_{50}$  IgA2.0 =  $285,2 \pm 46,39$  nM;  $p = 0,0101$ ) (Abbildung 19D). Im Gegensatz zur IgA-Isotypkontrolle, die keinen Einfluss auf die Bindung von EGF an A-431 Zellen hatte, erwies sich auch Cetuximab effektiv in der Verdrängung von EGF auf den A-431. Zur Untersuchung der Fab-vermittelten Effektorfunktionen wurden HPV-positive Vorhautkeratinozyten, HPK1A, für 72 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen der IgA-Antikörper behandelt und die Zellviabilität anhand von Neutralrotfärbungen ermittelt (Abbildung 19E). Im Vergleich zur unspezifischen Isotypkontrolle führte die Bindung der IgA2.0- und IgA3.0-Antikörper an den EGF-Rezeptor zu einer Wachstumsinhibition der HPK1A, die tendenziell durch IgA3.0 bereits bei einer niedrigeren Antikörperkonzentration als bei IgA2.0 einsetzte ( $IC_{50}$  IgA3.0 =  $3,495 \pm 2,6$  nM versus  $IC_{50}$  IgA2.0 =  $42,12 \pm 39,9$  nM;  $p = 0,3888$ ) (Abbildung 19F). Die Behandlung mit 15,625 nM Antikörper führte durch den dimeren IgA3.0-Antikörper zu einer signifikant verbesserten Wachstumsinhibition gegenüber dem äquimolar eingesetzten IgA2.0-Monomer (% lebende Zellen IgA3.0 =  $73,1 \pm 5,1$  vs. IgA2.0 =  $93,4 \pm 7,8$ ;  $p = 0,0219$ ). Die Internalisierung des EGFR-IgA-Komplexes wurde mit dem zelltoxischen  $\alpha$ -kappa-ETA' untersucht. Dabei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus einem Antikörperfragment, das spezifisch die humane leichte  $\kappa$ -Kette erkennt, und einer gekürzten Version des Pseudomonas Exotoxin A (Kellner u. a. 2011). A-431 Zellen wurden mit 5 µg/ml IgA-Antikörper

und  $\alpha$ -kappa-ETA' in aufsteigenden Konzentrationen von 0,001 bis 1  $\mu\text{g/ml}$  inkubiert und die Zellviabilität nach 24 Stunden mittels Neutralrotassay bestimmt (Abbildung 19G). Signifikant mehr lebende A-431 Zellen konnten bei 0,1  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -kappa-ETA' für den dimeren IgA3.0 bestimmt werden (% lebende Zellen IgA3.0 =  $87,7 \pm 12,8$  vs. IgA2.0 =  $43,1 \pm 13,5$ ;  $p = 0,0056$ ). Die Behandlung mit IgA3.0 zeigte erst bei einer höheren  $\alpha$ -kappa-ETA'-Konzentration Auswirkungen auf das Überleben der A-431 Zellen ( $\text{IC}_{50}$  IgA3.0 =  $0,369 \pm 0,08$   $\mu\text{g/ml}$  versus  $\text{IC}_{50}$  IgA2.0 =  $0,121 \pm 0,06$   $\mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,0732$ ) (Abbildung 19H), so dass von einer geringeren Internalisierung und einer längeren Oberflächenverweildauer des EGFR-IgA3.0-Komplexes im Gegensatz zum EGFR-IgA2.0-Komplex ausgegangen werden kann.



**Abbildung 19: Fab-vermittelte Rezeptorbindung und Funktionen des IgA3.0 im Vergleich zu IgA2.0**

Die Bindung der Antikörper an EGFR-exprimierende A-431 Zellen wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem FITC-gelabelten Antikörper, gerichtet gegen die humane leichte  $\kappa$ -Kette, detektiert (**A**) und die jeweiligen  $\text{EC}_{50}$ -Werte berechnet (**B**). Die Fähigkeit, die Bindung eines FITC-markierten EGF Liganden an A-431 Zellen zu unterdrücken, wurde durchflusszytometrisch analysiert (**C**) und die jeweiligen  $\text{IC}_{50}$ -Werte berechnet (**D**). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Fluoreszenzintensität relativ zur sekundären Antikörperkontrolle (RFI) von  $n = 4$  (**A**, **C**) und  $n = 3$  (**E**) unabhängigen Experimenten. Durch Neutralrotfärbung der lebenden Zellen wurde 72 Stunden nach der Antikörperbehandlung die Wachstumsinhibition an HPK1A Zellen (**E**) sowie die Antigeninternalisierung mittels  $\alpha$ -kappa-ETA' an A-431 Zellen bestimmt (**G**) und die jeweiligen  $\text{IC}_{50}$ -Werte berechnet (**F**, **H**). Dargestellt sind die normalisierten Mittelwerte mit Standardfehler der lebenden Zellen in Prozent von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten (**G**, **I**).  $\text{EC}_{50}$  und  $\text{IC}_{50}$ -Werte wurden aus den einzelnen Dosis-Wirkungs-Kurven berechnet und als Box-Whisker-Plot mit allen Werten von Min bis Max aus mindestens  $n = 3$  unabhängigen Experimenten dargestellt (**B**, **D**, **F**, **H**). \* $p < 0,05$ ; gepaarter t-Test und #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ ; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Korrektur.

### 3.4.1 Fc-vermittelte Bindungs- und Funktionsanalyse

Die Analyse der Fab-vermittelten Effekte ergab eine Überlegenheit des Dimers zu seinem korrespondierenden Monomer. Daraufhin wurden die Fc-vermittelte Bindung und deren Effektorfunktionen untersucht. Um die Bindung an den Fc $\alpha$ RI zu untersuchen, wurden BHK CD89<sup>+</sup> Zellen, die für Fc $\alpha$ RI/FcR $\gamma$ -Chain kotransfiziert sind, verwendet (Abbildung 20A). Das IgA3.0-Dimer ( $EC_{50} = 118,8 \pm 20,97$  nM) zeigte hierbei eine signifikant  $p = 0,0017$  verbesserte Bindung gegenüber dem IgA2.0-Monomer ( $EC_{50} = 447,0 \pm 57,23$  nM) (Abbildung 20B). Der stärkste Effekt konnte bei der Zugabe von 31,25  $\mu$ g/ml Antikörper beobachtet werden (RFI IgA3.0 =  $44,24 \pm 7,0$  vs. IgA2.0 =  $20,80 \pm 3,3$ ;  $p = 0,0002$ ). Die IgA-Isotypenkontrolle zeigte eine Bindung vergleichbar zum Monomer, Cetuximab hingegen kann als IgG-Antikörper nicht an die BHK CD89<sup>+</sup> binden. Zur Untersuchung der Effektivität des neu produzierten IgA3.0 im ADCC Impedanz-Assay wurden A-431 Zielzellen mit und ohne Granulozyten und 62,5 nM Isotyp-, IgA2.0- oder IgA3.0-Antikörper 24 Stunden nach dem Aussäen behandelt und die Veränderung der Impedanz über weitere 96 Stunden gemessen (Abbildung 20C). Zur Vergleichbarkeit wurden die Antikörper äquimolar eingesetzt, wobei 62,5 nM der Stoffmenge von 10  $\mu$ g/ml IgA2.0-Antikörper entspricht. Innerhalb der ersten 4 Stunden führte die Behandlung mit PMN und IgA3.0 zu einer signifikanten Reduktion der Impedanz gegenüber der Isotypkontrolle (nCI IgA3.0 = 0,354; nCI Isotyp = 0,960;  $p = 0,0013$ ) (Abbildung 20D). Verglichen zum IgA2.0-Monomer war der Effekt jedoch signifikant schwächer (nCI IgA2.0 = 0,178,  $p = 0,0273$ ). Im weiteren Verlauf der Messung zeigten zunächst beide IgA-Antikörper einen ähnlich starken Anstieg der Impedanz, also ein Auswachsen der Zielzellen, das beim Monomer durch den stärkeren initialen Effekt auf insgesamt niedrigerem Niveau verlief. Der Vergleich der normalisierten Zellindexwerte nach 12 Stunden zeigte trotz des erneuten Anwachsens der Zielzellen einen signifikanten Effekt des IgA3.0 gegenüber der Isotypkontrolle ( $p = 0,0207$ ), allerdings war der nCI gegenüber dem IgA2.0 immer noch signifikant erhöht (nCI IgA3.0 = 0,628; nCI IgA2.0 = 0,429;  $p = 0,0382$ ) (Abbildung 20E). Ab etwa 24 Stunden nach der Behandlung mit IgA2.0 und PMN stagnierte das Auswachsen der Zielzellen, während unter der Behandlung mit dem IgA3.0-Dimer und PMN ein erneuter stetiger Abfall der Impedanz beobachtet werden konnte. Dieses erneute Ablösen der Zielzellen führte sogar dazu, dass nach 95 Stunden der nCI des IgA3.0-Dimers gegenüber dem IgA2.0-Monomer signifikant reduziert war (nCI IgA3.0 = 0,323; nCI IgA2.0 = 0,545;  $p = 0,0030$ ) (Abbildung 20F). Ohne Granulozyten zeigte sich kein Effekt der Antikörper auf die A-431 Zellen. Für die Fc-vermittelten Effekte des neu produzierten IgA3.0 konnte eine bessere Bindung an den Fc $\alpha$ RI gemessen werden, die sich allerdings innerhalb der ersten 24 Stunden nicht auf die Effektivität der ADCC im Impedanz-Assay niederschlägt.



#### **Abbildung 20: Fc-vermittelte Rezeptorbindung und Funktionen des IgA3.0 im Vergleich zu IgA2.0**

Die Bindung der Antikörper an Fc $\alpha$ RI/Fc $\gamma$ -chain kotransfizierte BHK CD89<sup>+</sup> Zellen wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem FITC-gelabelten Antikörper, gerichtet gegen die humane leichte  $\kappa$ -Kette, detektiert (A) und die jeweiligen EC<sub>50</sub>-Werte berechnet (B). Impedanzmessung über 96 Stunden nach der Behandlung der A-431 Zielzellen mit Effektorzellen im Verhältnis 40:1 und 62,5 nM IgA2.0- oder IgA3.0-Antikörper (C). Vergleich des normalisierten Zellindex nach der Behandlung mit und ohne PMN und Isotyp- oder IgA2.0- oder IgA3.0-Antikörper 4 Stunden (D), 12 Stunden (E) und 95 Stunden (F) nach der Zugabe. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler von n = 6 unabhängigen Experimenten, durchgeführt jeweils in Tripikaten. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; gepaarter t-Test und # p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Korrektur.

#### **3.4.2 Vergleich der ADCC-Effektivität von IgA2.0 und IgA3.0 mit Kopf-Hals-Tumorzelllinien**

Für die vergleichende Untersuchung der ADCC-Effektivität von IgA2.0 und IgA3.0 wurden wiederum die sieben Plattenepithelzellkarziom-Zelllinien des Kopf-Hals-Bereichs und als Kontrollen die epidermoid Karzinom Zelllinie A-431 sowie die Plattenepithelzelllinie des Ösophagus KYSE-30 verwendet. 24 Stunden vor Antikörperzugabe (62,5 nM) wurden von den Zelllinien jeweils  $2 \times 10^4$  Zellen ausgesät und konfluent anwachsen gelassen. Granulozyten von gesunden Spendern wurden mit 25 nM GM-CSF stimuliert und im Verhältnis 40:1 Effektoren zu Zielzellen zugegeben. Zur

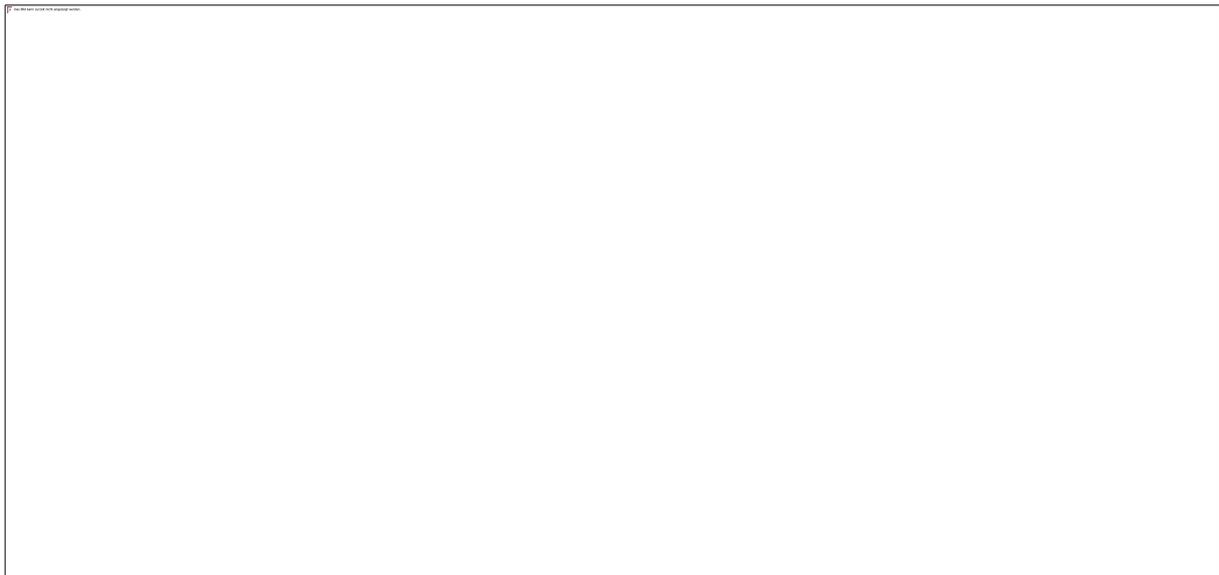
Vergleichbarkeit wurden die Zellindexwerte direkt vor der Behandlung auf 1 normiert (normalisierter Zellindex). Aus den normierten Daten wurde der nCI 2 Stunden nach der Behandlung mit stimulierten Granulozyten und Isotyp-, IgA2.0- und IgA3.0-Antikörper als Diagramm neben dem Verlauf der Impedanzkurven dargestellt und signifikante Unterschiede berechnet. Die beiden stark EGFR-exprimierenden Zelllinien A-431 und KYSE-30 zeigten ein sehr gutes Ansprechen auf die Behandlung mit IgA3.0 in den ersten 4 Stunden. Im Vergleich des IgA2.0-Monomer zum IgA3.0-Dimer zeigte sich durch die Stimulation der Granulozyten mit GM-CSF bei den A-431 Zellen ein identischer Verlauf der Impedanzmessung (Abbildung 21A). Nach einem vollständigen Ablösen der Zielzellen innerhalb der ersten beiden Stunden (nCI 2 h IgA2.0 =  $0,06 \pm 0,01$  vs. IgA3.0 =  $0,05 \pm 0,003$ ) kam es im Verlauf des 24-stündigen Messzeitraumes zu keinem erneuten Auswachsen der A-431 Zellen (nCI 24 h IgA2.0 =  $0,07 \pm 0,03$  vs. IgA3.0 =  $0,09 \pm 0,03$ ). Bei den KYSE-30 Zellen führte die Behandlung mit IgA3.0 und GM-CSF stimulierten Granulozyten ebenfalls zu einem frühen Abfall der Impedanz nach 2 Stunden auf nCI 2 h IgA3.0 =  $0,28 \pm 0,1$ , im Verlauf wuchsen allerdings die Zellen mit dimerem IgA3.0 vollständig auf das Niveau der Isotypenkontrolle wieder aus (Abbildung 21B). Dahingegen wies die Behandlung mit dem monomeren IgA2.0 gegenüber dem Dimer bereits nach 2 Stunden einen signifikant niedrigeren nCI =  $0,08 \pm 0,02$  ( $p = 0,0169$ ) auf, während nur minimales Wiederauswachsen der Zielzellen nach 24 Stunden zu beobachten war (nCI 24 h IgA2.0 =  $0,15 \pm 0,02$  vs. 3.0 =  $0,94 \pm 0,15$ ;  $p = 0,0024$ ). Der neu produzierte dimere IgA3.0 zeigte eine verringerte Effektivität der ADCC gegenüber seinem korrespondierenden Monomer bei den KYSE-30 Zellen. Die weitere Untersuchung der sieben Kopf-Hals-Tumorzelllinien ergab in keiner Zelllinie einen signifikanten Effekt des IgA3.0-Antikörpers auf das Ablösen der Zielzellen, der über die Behandlung mit Isotypenkontrolle und GM-CSF stimulierten Granulozyten hinaus ging (Abbildung 21C-I). Die signifikant effektive ADCC durch den IgA2.0 bei fünf HNSCC-Zelllinien konnte beim dimeren IgA3.0 nicht beobachtet werden.

**Abbildung 21: ADCC Zelllinien IgA2.0 versus IgA3.0**

$2 \times 10^4$  Zellen der angegebenen Tumorzelllinie wurden mit 62,5 nM IgA-Isotyp, IgA2.0- oder IgA3.0-Antikörper, mit Effektorzellen im Verhältnis 40:1 sowie mit 25 nM GM-CSF behandelt und für weitere 24 Stunden die Impedanz gemessen (**A-I**). Der Zellindexwert zum Zeitpunkt der Zugabe wurde auf 1 normiert. Neben dem Zeitverlauf der Impedanzmessung ist der nCi 2 Stunden nach der Behandlung abgebildet. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler von mindestens  $n = 3$  unabhängigen Experimenten, durchgeführt jeweils in Tripikaten. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns nicht signifikant; einfaktorische Varianzanalyse mit Tukey-Korrektur.

### 3.4.3 Bindung von IgA2.0 und IgA3.0 an Tumorzellen

Da die Kopf-Hals-Tumorzelllinien auf die Behandlung mit IgA3.0 nicht ansprachen, wurde im nächsten Schritt die Bindung des IgA3.0-Antikörpers an die Zellen analysiert. Dazu wurden die Zellen für eine Stunde mit 625 nM IgA2.0, IgA3.0 oder Cetuximab inkubiert, anschließend der gebundene Antikörper mit einem FITC-markierten Zweitantikörper, gerichtet gegen die humane  $\kappa$ -Kette, detektiert und im Durchflusszytometer die mittlere Fluoreszenzintensität gemessen (Abbildung 22). Für die Kontrollzelllinien A-431 und KYSE-30 mit sehr hoher EGFR-Expression zeigte sich die bereits in Abbildung 19 beschriebene verbesserte Avidität des IgA3.0-Dimers gegenüber dem IgA2.0-Monomer, wobei der korrespondierende IgG-Antikörper Cetuximab die stärkste Bindung aufwies. Alle untersuchten Kopf-Hals-Tumorzelllinien zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Bindung der benutzten EGFR-spezifischen IgA2- und IgG-Antikörper. In der Tendenz bindet der IgA3.0, entsprechend dem IgG-Antikörper Cetuximab, etwas besser an die Kopf-Hals-Tumorzelllinien als das IgA2.0-Monomer, so dass die verminderte ADCC-Effektivität des IgA3.0-Dimers nicht auf eine fehlende Bindung an die Zielzellen zurückgeführt werden konnte.



#### Abbildung 22: Bindungsanalyse Tumorzelllinien

Die Antikörper wurden hinsichtlich ihrer Bindung an die Tumorzelllinien untersucht. Dazu wurden die Zellen mit 625 nM des angegebenen Antikörpers inkubiert und der gebundene Antikörper mit einem FITC-markierten  $\alpha$ -human- $\kappa$ -chain Zweitantikörper detektiert. Die im Durchflusszytometer gemessene mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde als Box-Whisker-Plot mit allen Werten von Min bis Max aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten dargestellt.

### 3.5 Funktioneller Vergleich von IgA3.0 zu weiteren IgA-Dimeren

#### 3.5.1 Fab-vermittelte Bindungs- und Funktionsanalyse der Dimere

In früheren Studien zeigten sich die IgA-Dimere IgA1, IgA2WT und IgA2P221R in funktionalen Assays dem jeweiligen Monomer überlegen (Lohse u. a. 2011; 2012). Dies konnte für IgA3.0 verglichen mit IgA2.0 bisher nicht bestätigt werden. Da es sich beim IgA3.0-Antikörper um eine Weiterentwicklung der zuvor beschriebenen Dimere handelt, wurden im nächsten Schritt zunächst die Fab-vermittelten Effekte des IgA3.0-Dimers im Vergleich zum IgA1-, IgA2WT- und IgA2P221R-Dimer untersucht. Die Avidität der Bindung an den EGF-Rezeptor wurde durch die Bindung der Antikörper an A-431 Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz am Durchflusszytometer bestimmt. Die Rezeptorbindungskurven der untersuchten IgA2-Dimere zeigten eine Bindung der Antikörper mit vergleichbarer Avidität an die A-431 Zellen (Abbildung 23A). Während die Berechnung der halbmaximalen Bindung für das IgA1-Dimer einen signifikant höheren  $EC_{50}$ -Wert im Vergleich zu IgA3.0 ergab ( $EC_{50}$  IgA1 = 70,01;  $EC_{50}$  IgA3.0 = 63,82;  $p = 0,0048$ ) (Abbildung 23B), war allerdings auch die maximale Bindung des IgA1 gegenüber allen IgA2-Dimeren signifikant erhöht ( $p < 0,0001$ ). Um die Verdrängung des Liganden am EGF-Rezeptor zu analysieren, wurden A-431 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der angegebenen Antikörper und einem FITC-markierten EGF-Liganden simultan inkubiert. Bei der Messung der Menge des an der Oberfläche gebundenen Liganden am Durchflusszytometer zeigten sich keine Unterschiede der vier IgA-Dimere in ihrer Effektivität die Ligandenbindung zu inhibieren (Abbildung 23C,D). Zur Untersuchung der Fab-vermittelten Effektorfunktionen wurden HPK1A Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen der IgA-Antikörper behandelt und die Zellviabilität nach 72 Stunden anhand von Neutralrotfärbungen ermittelt (Abbildung 23E). Die Behandlung mit 312 nM IgA2P221R oder IgA3.0 führte, im Vergleich zur unspezifischen IgA2 Isotypkontrolle, in der Keratinozytenzelllinie zu einer signifikanten Wachstumsinhibition (IgA2P221R =  $15,70 \pm 2,1$  %;  $p = 0,0263$  und IgA3.0 =  $14,93 \pm 2,7$  %;  $p = 0,0389$ ) (Abbildung 23F). Bereits ab einer Antikörperkonzentration von 3,125 nM konnten für IgA3.0 und IgA2P2213 signifikante Effekte gegenüber der Isotypkontrolle beobachtet werden. Die IgA1- und IgA2WT-Dimere hatten in diesem Assay nur geringen Einfluss auf das Wachstum der HPK1A Zellen und zeigten auch bei der maximal verwendeten Antikörperdosis von 312 nM keinen signifikanten Unterschied zur Isotypkontrolle. Die Internalisierung der EGFR-IgA-Komplexe wurde mit dem zelltoxischen Fusionsprotein  $\alpha$ -kappa-ETA' an A-431 Zellen untersucht, die hierzu mit  $\alpha$ -kappa-ETA' in aufsteigenden Konzentrationen von 0,001 bis 1  $\mu$ g/ml inkubiert wurden. Die gleichzeitige Behandlung mit 31,25 nM des jeweiligen IgA-Antikörpers führte zu einer vergleichbaren Auswirkung auf die Zellviabilität, die nach 24 Stunden mittels Neutralrotassay bestimmt wurde (Abbildung 23G). Die

Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte ergab, dass bei IgA3.0 und IgA2P221R tendenziell mehr  $\alpha$ -kappa-ETA' gegenüber IgA1 und IgA2WT für den gleichen zytotoxischen Effekt benötigt wird ( $IC_{50}$  IgA3.0 =  $0,32 \pm 0,12$  nM;  $IC_{50}$  IgA2P221R =  $0,24 \pm 0,13$  nM;  $IC_{50}$  IgA1 =  $0,15 \pm 0,07$  nM;  $IC_{50}$  IgA2WT =  $0,16 \pm 0,07$  nM) (Abbildung 23H). Das bedeutet, dass EGFR-IgA-Komplexe mit den optimierten Antikörpern gegenüber den Wildtyp-Dimeren etwas weniger internalisiert werden.



#### Abbildung 23: Fab-vermittelte Rezeptorbindung und Funktionen der IgA-Dimere

Die Bindung der Antikörper an EGFR-exprimierende A-431 Zellen wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem FITC-markierten  $\alpha$ -human- $\kappa$ -chain Antikörper detektiert **(A)** und die jeweiligen  $EC_{50}$ -Werte berechnet **(B)**. Die Fähigkeit, die Bindung eines FITC-markierten EGF-Liganden an A-431 Zellen zu unterdrücken, wurde durchflusszytometrisch analysiert **(C)** und die jeweiligen  $IC_{50}$ -Werte berechnet **(D)**. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Fluoreszenzintensität relativ zur sekundären Antikörperkontrolle (RFI) von  $n = 3$  (A, C, E) unabhängigen Experimenten. Durch Neutralrotfärbung der lebenden Zellen wurde 72 Stunden nach der Antikörperbehandlung die Wachstumsinhibition an HPK1A Zellen bestimmt **(E)** und die maximale Wachstumsinhibition berechnet **(F)**. Durch Neutralrotfärbung der lebenden Zellen wurde 72 Stunden nach der Antikörperbehandlung die Antigeninternalisierung mittels  $\alpha$ -kappa-ETA' an A-431 Zellen bestimmt **(G)** und die jeweiligen  $IC_{50}$ -Werte berechnet **(H)**. Dargestellt sind die normalisierten Mittelwerte mit Standardfehler der lebenden Zellen in Prozent von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten (E, G).  $EC_{50}$ ,  $IC_{50}$  und Max. Werte wurden aus den einzelnen Dosis-Wirkungs-Kurven berechnet und als Box-Whisker-Plot mit allen Werten von Min bis Max aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten dargestellt (B, D, F, H). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; ungepaarter t-Test.

### 3.5.1 Fc-vermittelte Bindungs- und Funktionsanalyse der Dimere

Nach den Effekten, die durch die antigenbindenden Regionen ausgelöst werden, wurden als nächstes die Bindung und Effektorfunktionen analysiert, die durch die Fc-Region vermittelt werden. Die vier IgA-Dimere zeigten eine konzentrationsabhängige Bindung an BHK CD89<sup>+</sup> Zellen, die für Fc $\alpha$ RI/FcR $\gamma$ -Chain kotransfiziert sind (Abbildung 24A). Die Bindung des IgA3.0-Dimers an den Fc $\alpha$ RI war gegenüber den beiden anderen IgA2-Dimeren ab 250 nM signifikant erhöht (1250 nM: IgA2wt p = 0.0206 und IgA2P221R p = 0.0455; 625 nM: IgA2wt p = 0.0121 und IgA2P221R p = 0.0037; 250 nM: IgA2wt p = 0.0083 und IgA2P221R p = 0.0130). Durch den Vergleich der EC<sub>50</sub>-Werte ergaben sich keine signifikanten Unterschiede unter den getesteten IgA-Antikörpern (Abbildung 24B), tendenziell weist jedoch das IgA2P221R-Dimer eine verminderte Bindung an den Fc $\alpha$ RI auf (passend zu Lohse 2012). Um die ADCC-Effektivität der Dimere zu vergleichen, wurden A-431 und KYSE-30 Zellen im Impedanz-Assay verwendet (Abbildung 24C,D). Zur besseren Darstellung der Unterschiede wurden für die A-431 Zellen nur 6,25 nM des jeweiligen Antikörpers und Granulozyten im Verhältnis 40:1 eingesetzt. Für die ADCC der KYSE-30 Zellen wurde die gleiche Anzahl an Granulozyten, allerdings mit GM-CSF stimuliert, verwendet und die Antikörperkonzentration von 62,5 nM aus den vorherigen Experimenten beibehalten. Bei den A-431 Zielzellen konnte nach 4 Stunden für alle Dimere eine signifikante Reduktion des nCI gegenüber der Kontrolle gemessen werden (Abbildung 24E). Durch das Auswachsen der Zellen im Messzeitraum von 24 Stunden ergab sich nur für die IgA2WT- und IgA3.0-Dimere eine anhaltende signifikante Effektivität im ADCC-Assay (nCI IgA2WT = 0,338  $\pm$  0,2; p = 0,0030; nCI IgA3.0 = 0,385  $\pm$  0,1; p = 0,0051) (Abbildung 24F). Durch die Verwendung der KYSE-30 Zielzellen konnte die verbesserte Effektivität der IgA2WT und IgA3.0-Dimere nach 4 Stunden bestätigt werden (nCI IgA2WT = 0,41  $\pm$  0,1; p = 0,0172; nCI IgA3.0 = 0,49  $\pm$  0,1; p = 0,0343), jedoch kam es innerhalb der 24-stündigen Messdauer zu einem vollständigen Wiederauswachsen der Zielzellen auf das Niveau der Kontrolle (Abbildung 24G,H). Nach 4 Stunden zeigte sich in beiden Ansätzen eine signifikant niedrigere ADCC-Effektivität des IgA2P221R-Antikörpers verglichen zum IgA2WT (A-431: p = 0,0184; KYSE-30: p = 0,0320).

**Abbildung 24: Fc-vermittelte Rezeptorbindung und Funktionen der IgA-Dimere**

Die Bindung der Antikörper an Fc $\alpha$ RI/FcR $\gamma$ -chain kotransfizierte BHK CD89<sup>+</sup> Zellen wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem FITC-markierten  $\alpha$ -human- $\kappa$ -chain Antikörper detektiert **(A)** und die jeweiligen EC<sub>50</sub>-Werte berechnet **(B)**. 2 x 10<sup>4</sup> A-431 Zellen wurden mit 6,25 nM dimerem IgA-Antikörper sowie mit Effektorzellen im Verhältnis 40:1 behandelt und für weitere 24 Stunden die Impedanz gemessen **(C)**. 2 x 10<sup>4</sup> KYSE-30 Zellen wurden mit 62,5 nM dimerem IgA-Antikörper, mit Effektorzellen im Verhältnis 40:1 sowie mit 25 nM GM-CSF behandelt und für weitere 24 Stunden die Impedanz gemessen **(D)**. Der Zellindexwert zum Zeitpunkt der Zugabe wurde auf 1 normiert. Unterhalb des Zeitverlaufs der Impedanzmessung ist der nCI 4 Stunden **(E, G)** und 24 Stunden **(F, H)** nach der Behandlung als Box-Whisker-Plot mit allen Werten von Min bis Max abgebildet. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler von mindestens n = 3 unabhängigen Experimenten, durchgeführt jeweils in Tripikaten. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001; einfaktorische Varianzanalyse mit Tukey-Korrektur.

### 3.5.2 IgA3.0-Dimer mit verbesserter ADCC-Effektivität bei HPV<sup>+</sup> HNSCC

Für den weiteren Fc-vermittelten funktionellen Vergleich der Dimere auch gegenüber dem IgA2.0-Monomer wurden zwei HPV16-positive Kopf-Hals-Tumorzelllinien UPCI-SCC-090 (Zunge) und UPCI-SCC-154 (Zunge) und die korrespondierende HPV-negative Kontrollzelllinie UM-SCC-1 gewählt (Olthof u. a. 2015). Wie zuvor wurden  $2 \times 10^4$  Zielzellen für 24 Stunden anwachsen gelassen und mit 62,5 nM der angegebenen IgA-Antikörper und GM-CSF stimulierten Granulozyten im Verhältnis 40:1 behandelt. Der Zellindexwert wurde für den Zeitpunkt der Zugabe auf 1 normiert und für weitere 24 Stunden aufgezeichnet. Die HPV-negative Zelllinie UM-SCC-1 zeigte für keines der vier untersuchten Dimere eine signifikante Reduktion des normalisierten Zellindexwertes nach 4 Stunden. Im weiteren Messzeitraum kommt es zu einer langsamen, stetigen Abnahme des nCI, die allerdings auch für GM-CSF stimulierte Granulozyten mit der unspezifischen IgA2-Isotypkontrolle beobachtet werden konnte (Abbildung 25A,B). Ein deutliches, signifikantes Ablösen und kein Wiederauswachsen der UM-SCC-1 Zellen nach 24 Stunden konnte, wie bereits in Abbildung 21 beschrieben, durch das IgA2.0-Monomer erreicht werden (Abbildung 25C). Ein anderes Bild ergab sich für die beiden HPV16-positiven Plattenepithelkarzinom-Zelllinien: Hier erwies sich als einziges Dimer der IgA3.0-Antikörper im ADCC-Assay als effektiv (Abbildung 25D,G). Bei den UPCI-SCC-090 reduzierte die Behandlung mit IgA3.0 und GM-CSF stimulierten PMN nach 4 Stunden den nCI signifikant auf  $0,81 \pm 0,1$  gegenüber der Isotypkontrolle  $nCI = 1,17 \pm 0,1$  ( $p = 0,0103$ ) Abbildung 25H). Bei der Zelllinie UPCI-SCC-154 konnte, verglichen mit der Isotypkontrolle, ebenfalls eine signifikante Reduktion des nCI nach 4 Stunden durch den IgA3.0-Antikörper und GM-CSF stimulierten PMN beobachtet werden ( $nCI$  IgA3.0 =  $0,79 \pm 0,1$  versus  $nCI$  Isotyp =  $1,04 \pm 0,1$ ;  $p = 0,0439$ ) (Abbildung 25E). Damit ergab sich für das IgA3.0-Dimer bei den beiden HPV16-positiven Zelllinien eine vergleichbare Effizienz zum korrespondierenden Monomer IgA2.0, das ebenfalls ein spezifisches Ablösen der Zielzellen und kein erneutes Wiederauswachsen innerhalb des 24-stündigen Messzeitraumes bewirken konnte (Abbildung 25F,I). Bei allen untersuchten Antikörpern führte eine Behandlung 24 Stunden nach der Aussaat ohne Granulozyten zu keinem Effekt auf das Wachstum der Tumorzelllinien.

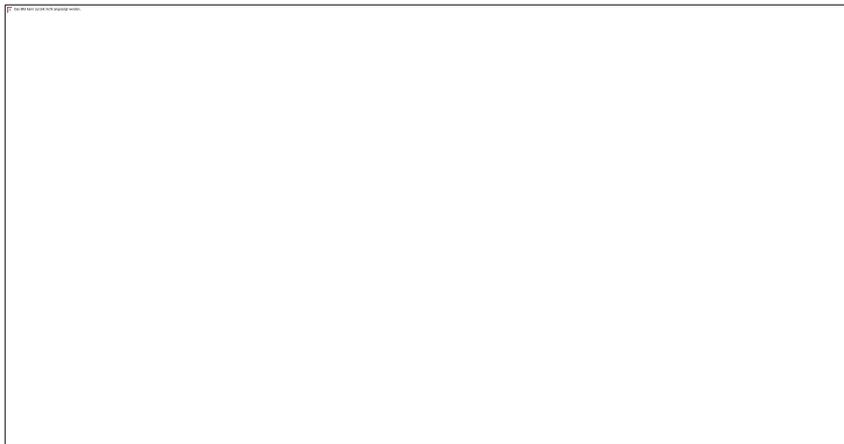


**Abbildung 25: Fc-vermittelte Effekte der IgA-Antikörper auf HPV16<sup>+</sup> HNSCC**

$2 \times 10^4$  Zellen der angegebenen Tumorzelllinie wurden mit 62,5 nM IgA-Isotyp, IgA1-Dimer, IgA2WT-Dimer, IgA2P221R-Dimer, IgA3.0-Dimer oder IgA2.0-Antikörper, mit Effektorzellen im Verhältnis 40:1 sowie mit 25 nM GM-CSF behandelt und für weitere 24 Stunden die Impedanz gemessen. Der Zellindexwert zum Zeitpunkt der Zugabe, 24 Stunden nach dem Aussäen der Zielzellen, wurde auf 1 normiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler von mindestens  $n = 4$  unabhängigen Experimenten, durchgeführt jeweils in Tripikaten (**A-C**). Neben dem Zeitverlauf der Impedanzmessung ist der normalisierte Zellindex nach 4 Stunden und 24 Stunden Behandlung als Box-Whisker-Plot mit allen Werten von Min bis Max aus mindestens  $n = 4$  unabhängigen Experimenten dargestellt (**D-F**). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; einfaktorielles Varianzanalyse mit Tukey-Korrektur.

### 3.5.3 Die Dimere unterscheiden sich nicht in der Bindung an HNSCC

Im Anschluss wurde die Bindung der dimeren Antikörper an die Zielzellen analysiert. Dazu wurden die Zellen für eine Stunde mit 625 nM IgA1-Dimer, IgA2WT-Dimer, IgA2P221R-Dimer oder IgA3.0-Dimer inkubiert und der gebundene Antikörper mit einem FITC-markierten Zweitantikörper, gerichtet gegen die humane  $\kappa$ -Kette, am Durchflusszytometer detektiert (Abbildung 26). Wie auch schon beim Vergleich des IgA3.0 zum korrespondierenden IgA2.0-Monomer, konnte auch hier die unterschiedliche ADCC-Effektivität der untersuchten Dimere im Impedanz-Assay nicht auf Unterschiede in der Bindung an die Zielzellen zurückgeführt werden. Alle verglichenen Dimere binden gleichermaßen an die getesteten EGFR-exprimierenden Kopf-Hals-Tumorzelllinien. Die Unterschiede zwischen den Zelllinien ergeben sich aus der unterschiedlich starken EGFR-Expression auf der Oberfläche.



**Abbildung 26: Die Dimere binden mit gleicher Avidität an die Zielzellen**

Die Bindung der dimeren Antikörper an die EGFR-exprimierenden Zielzellen wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem FITC-markierten  $\alpha$ -human- $\kappa$ -chain Antikörper detektiert. Die im Durchflusszytometer gemessene mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde als Box-Whisker-Plot mit allen Werten von Min bis Max aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten dargestellt.

## **3.6 Einfluss löslicher und membranständiger Faktoren auf die Effektivität der ADCC**

### **3.6.1 Lösliche Faktoren in den Überständen von A-431 und KYSE-30 Zellen verbessern die ADCC-Effektivität**

Die Bindung der Antikörper an die Zielzellen, sowohl beim Vergleich IgA2.0 versus IgA3.0 als auch beim Vergleich der IgA-Dimere, lieferte keine Erklärung für die beobachteten Unterschiede in der Effektivität im ADCC-Assay. Um im nächsten Schritt den Einfluss löslicher Faktoren auf die Effektivität der ADCC zu studieren, wurden von den neun Kopf-Hals-Tumorzelllinien und den beiden Kontrollzelllinien A-431 und KYSE-30 Zellkulturüberstände gesammelt. Für den Versuch wurden  $2 \times 10^4$  A-431 Zellen in ihrem Kulturmedium R10<sup>++</sup> für 24 Stunden anwachsen gelassen und der gemessene Zellindexwert auf 1 normiert. Anschließend wurde das Medium vollständig durch frisches Kulturmedium oder die jeweiligen Überstände der Tumorzelllinien ersetzt und 6,25 nM IgA3.0-Antikörper sowie  $0,8 \times 10^6$  Granulozyten zugegeben (Abbildung 27). Nach 4 Stunden konnte, verglichen mit den Reaktionsbedingungen in frischem R10<sup>++</sup> Kulturmedium ( $nCI = 0,397$ ;  $p = 0,0006$ ), durch den Überstand der A-431 Zellen der Zellindex signifikant auf  $nCI = 0,178$  reduziert werden. Auch der Überstand der Ösophaguskarzinom-Zelllinie KYSE-30 verbessert das Ablösen der A-431 Zellen signifikant gegenüber dem frischen Kulturmedium ( $nCI = 0,264$  versus  $nCI = 0,474$ ;  $p = 0,0202$ ). Von den neun untersuchten Kopf-Hals-Tumorzelllinien konnte kein Überstand die Effektivität der ADCC der A-431 Zellen signifikant beeinflussen. Überstände der Zelllinien CAL-33, SAS und SCC-090 wirkten tendenziell ADCC-fördernd, während die Überstände von SAT, UM-SCC-1 und SCC-154 eine Tendenz zur Inhibition zeigten. Kein Unterschied gegenüber der Kontrolle mit D10<sup>++</sup> Kulturmedium konnte bei den Überständen von FaDu, HN und HSC-4 gemessen werden.

**Abbildung 27: Überstände der Tumorzelllinien modulieren die ADCC**

Impedanzmessung der Behandlung von  $2 \times 10^4$  A-431 Zellen nach 24 Stunden mit 6,25 nM IgA3.0 und  $0,8 \times 10^6$  Granulozyten in den Zellkulturüberständen der angegebenen Tumorzelllinien. Dargestellt ist der Mittelwert des normalisierten Zellindex nach 4 Stunden mit Standardabweichung von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ungepaarter t-Test

### 3.6.2 Die Überstände der Tumorzelllinien modulieren die Oberflächenexpression der Granulozyten

Da lösliche Faktoren die ADCC-Effektivität beeinflussen können, wurde als nächstes der Effekt der Überstände auf die Granulozyten untersucht. Hierzu wurden Granulozyten gesunder Spender nach der Isolation für eine Stunde in Überständen der untersuchten Tumorzelllinien sowie dem jeweiligen Kulturmedium inkubiert. Anschließend wurde die Oberflächenexpression von Markern, die für die ADCC interessant sind, mittels Durchflusszytometrie analysiert. Durch die Inkubation mit den konditionierten Medien der Tumorzelllinien kam es gegenüber der jeweiligen Kontrolle zu einer Hochregulation des  $Fc\alpha RI$  (CD89) um das 1,1- bis 1,6-Fache (Abbildung 28A). Die Überstände der beiden HPV-positiven Kopf-Hals-Tumorzelllinien SCC-090 (1,09) und SCC-154 (1,16) zeigten den geringsten Einfluss auf die CD89-Oberflächenexpression, während FaDu (1,57) und HN (1,62) die Menge an CD89 in der Zellmembran der Granulozyten am stärksten erhöhten. Allerdings korrelierte die Stimulation der Oberflächenexpression von CD89 auf den Granulozyten nicht mit der Effektivität des ADCC-Assays der HPV Zelllinien (aus Abbildung 14). CD11b und CD18 sind Integrine, die zusammen den Mac-1 Komplex bilden und wichtige Funktionen bei der Zelladhäsion, Migration und Phagozytose vermitteln. Die Hochregulation durch die konditionierten Medien von Integrin  $\alpha_M$  (CD11b) stimmt mit der von Integrin  $\beta_2$  (CD18) überein (Abbildung 28B,C). Die Oberflächenexpression beider Integrine wurde durch Überstände der Zelllinien, die sensitiv gegenüber der Behandlung mit

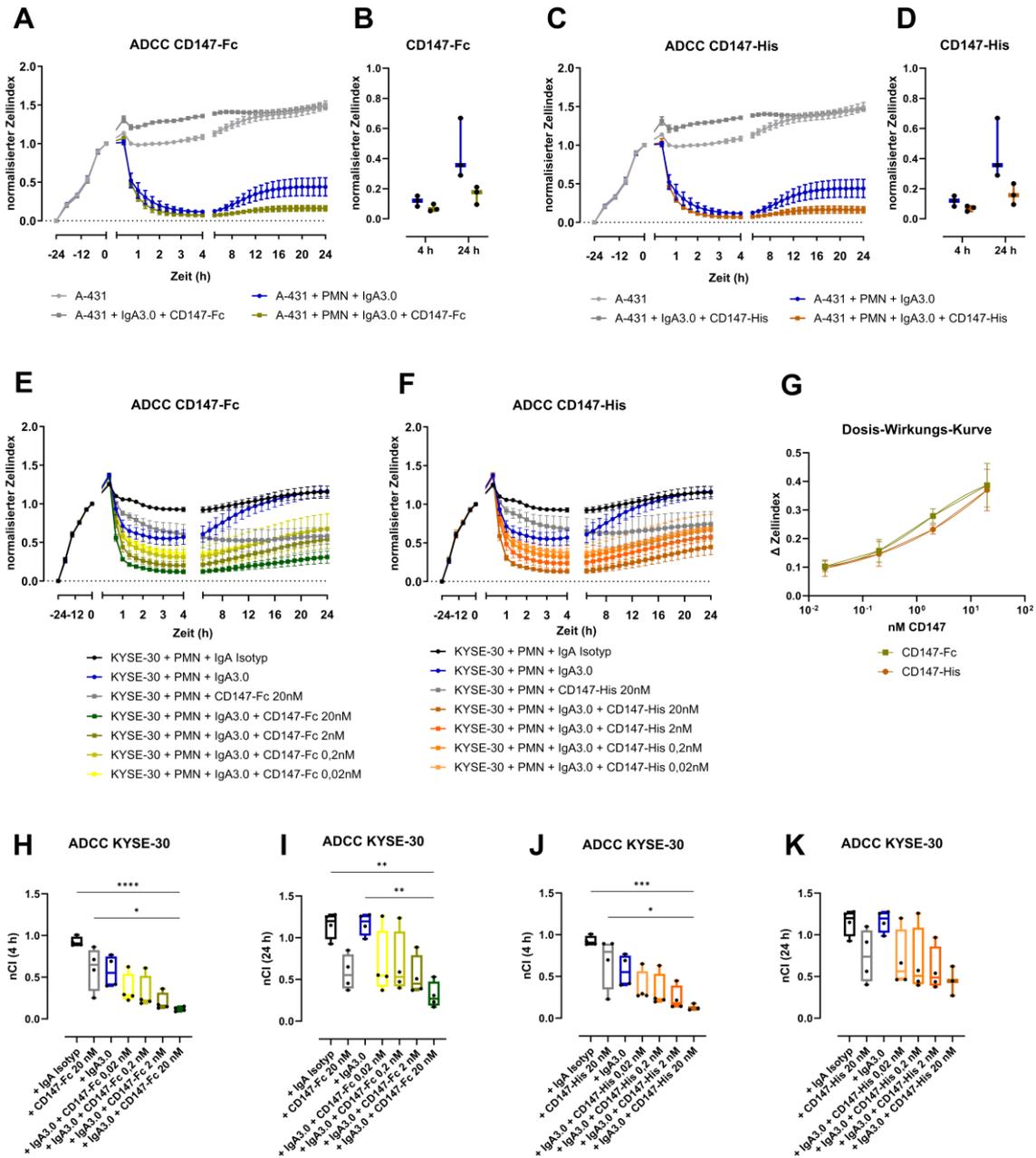
IgA2.0 und PMN reagiert haben, nur schwach verstärkt (CD11b: A-431 = 1,43; KYSE-30 = 1,38 ; SCC-090 = 1,32; CD18: A-431 = 1,45; KYSE-30 = 1,30 ; SCC-090 = 1,26), so dass sich eine negative Korrelation mit dem  $\Delta$ CI nach 4 Stunden ergab (CD11b:  $r = -0,7118$ ;  $p = 0,0315$ ; CD18:  $r = -0,7033$ ;  $p = 0,0345$ ). Die Expression von CD43, ein Zelladhäsionsmolekül, das bei T-Zellen Teil der immunologischen Synapse ist, wurde auf den Granulozyten durch die konditionierten Medien der Tumorzelllinien gegenüber dem Kulturmedium nicht verändert (Abbildung 28D). CD147, das sowohl auf den Granulozyten als auch auf den Zielzellen exprimiert wird, zeigte sich in einem Zytokinarray mit Peniskarzinom-Zelllinien (durchgeführt von Muriel Charlotte Hans geb. Bernhard) als unterschiedlich reguliert in der ADCC (Bernhard u. a. 2021). Durch die konditionierten Medien der Kopf-Hals-Tumorzelllinien wurde die Expression von mCD147 auf der Oberfläche der Granulozyten gesteigert (Abbildung 28E). Überstände der Tumorzellen, die im ADCC-Assay nicht auf die Behandlung mit IgA2.0 und PMN ansprachen, zeigten dabei eine stärkere Hochregulation (HN = 2,23; SAS = 1,85) als die Zelllinien mit gutem Ansprechen. Daraus ergab sich für die Oberflächenexpression von mCD147 auf den Granulozyten nach der Inkubation mit Zellkulturüberständen der Tumorzellen eine signifikant negative Korrelation zum Ansprechen bei der ADCC nach 4 Stunden ( $r = -0,7769$ ;  $p = 0,0138$ ) (Abbildung 28F). Beide HPV<sup>+</sup> Zelllinien UM-SCC-090 ( $p = 0,0003$ ) und UM-SCC-154 ( $p = 0,0113$ ) verursachten eine signifikant geringere Induktion von mCD147 auf der Oberfläche von Granulozyten als die HPV<sup>-</sup> Zelllinie UM-SCC-1. Da CD147 bei vielen malignen Tumoren überexprimiert wird (Landras u. a. 2019; Barillari u. a. 2022), wurde als nächstes die Menge an mCD147 und sCD147 auf den Zellen und in den Überständen der untersuchten Tumorzelllinien analysiert. Hierzu wurden die Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz gefärbt und am Durchflusszytometer die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt. Auf allen elf Tumorzelllinien konnte mCD147 detektiert werden (Abbildung 28G), wobei FaDu (MFI =  $1299 \pm 214$ ) und KYSE-30 (MFI =  $1151 \pm 178$ ) die stärkste und die beiden HPV<sup>+</sup> Zelllinien SCC-090 (MFI =  $448 \pm 163$ ) und SCC-154 (MFI =  $484 \pm 249$ ) die schwächste Oberflächenexpression auswiesen. Beim löslichen CD147 hingegen, welches durch einen Sandwich-ELISA in den Überständen nachgewiesen wurde (Abbildung 28H), konnte bei den beiden HPV<sup>+</sup> Zelllinien SCC-090 ( $751,8 \pm 69,14$  pg/ml) und SCC-154 ( $891,7 \pm 106,3$  pg/ml) nach KYSE-30 ( $990,1 \pm 23,87$  pg/ml) die größte Menge sCD147 gemessen werden. Dabei war die Menge des freigesetzten sCD147 der beiden HPV<sup>+</sup> Zelllinien gegenüber den HPV<sup>-</sup> UM-SCC-1 signifikant erhöht (UM-SCC-090  $p = 0,0038$ , UM-SCC-154  $p = 0,0043$ ). In allen konditionierten Medien konnte sCD147 detektiert werden, wobei durch die Zelllinien CAL-33 ( $250,8 \pm 31,91$  pg/ml) und A-431 ( $314,7 \pm 115,0$  pg/ml) die geringsten Mengen freigesetzt wurden. Lösliche Faktoren in den Überständen der Tumorzelllinien können die Oberflächenexpression der Granulozyten modulieren. Dabei könnte lösliches sowie membranständiges CD147 für die ADCC-Effektivität der Granulozyten gegenüber den Tumorzellen relevant sein.

**Abbildung 28: Lösliche Faktoren beeinflussen die Oberflächenexpression der Granulozyten**

Granulozyten gesunder Spender wurden für eine Stunde mit den Überständen der angegebenen Tumorzelllinien oder dem entsprechenden Kulturmedium inkubiert und anschließend die Oberflächenexpression von CD89 **(A)**, CD11b **(B)**, CD18 **(C)**, CD43 **(D)** und CD147 **(E)** mittels direkter Immunfluoreszenz am Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt ist die relative Oberflächenexpression zum jeweiligen Kulturmedium als Box und Whisker-Plot mit allen Werten von Min bis Max aus mindestens  $n = 3$  unabhängigen Experimenten. Pearson-Korrelation der CD147-Oberflächenexpression der Granulozyten mit dem  $\Delta$ CI nach 4 Stunden **(F)**. Die Oberflächenexpression von CD147 auf den Tumorzelllinien wurde durchflusszytometrisch analysiert und als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) relativ zur Isotypkontrolle dargestellt **(G)**. Aus den Überständen der Tumorzelllinien 24 Stunden nach dem Aussäen wurde die Menge an freigesetztem CD147 durch einen Sandwich-ELISA ermittelt **(H)**. Signifikante Abweichungen zur Kulturmediumkontrolle dargestellt als \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  Signifikanzen der HPV<sup>+</sup> Zelllinien als # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$ ; Tukey-Mehrfachvergleichstest.

### 3.6.3 Lösliches CD147 verbessert die IgA-abhängige ADCC

Um den Effekt von sCD147 auf die IgA-abhängige ADCC zu untersuchen, wurde rekombinant hergestelltes lösliches CD147, das C-terminal entweder einen Fc-Tag oder einen His-Tag gebunden hat, zugegeben. A-431 Zellen wurden 24 Stunden nach der Aussaat mit Granulozyten und 62,5 nM IgA3.0 sowie 20 nM sCD147 behandelt und die Impedanzänderung für weitere 24 Stunden gemessen (Abbildung 29A,C). Bei der initialen Ablösung der A-431 Zellen konnte in diesem Versuchsansatz kein Unterschied zwischen der Kontrolle und der Behandlung mit CD147 festgestellt werden, unabhängig davon welcher C-terminale Tag an das Protein fusioniert war. In der Tendenz zeigten beide Fusionsproteine eine Inhibition des Wiederauswachsens der A-431 Tumorzellen nach 24 Stunden (nCI CD147-Fc =  $0,161 \pm 0,034$ ; nCI CD147-His =  $0,162 \pm 0,04$ ; nCI Kontrolle =  $0,438 \pm 0,117$ ) (Abbildung 29B,D). Der Versuchsansatz wurde mit KYSE-30 Zielzellen, die ein vermindertes Ansprechen auf den IgA3.0-Antikörper zeigten, mit unterschiedlichen Konzentrationen an sCD147 wiederholt (Abbildung 29E,F). Im Vergleich zur Antikörperkontrolle wurde in den ersten 4 Stunden mit beiden Fusionsproteinen eine dosisabhängige Verbesserung der ADCC gemessen. Ohne die Zugabe von CD147 zeigte der Verlauf eine Abnahme des nCI auf  $0,568 \pm 0,02$  nach 4 Stunden und ein vollständiges Wiederauswachsen auf das Niveau der Isotypkontrolle nach 24 Stunden. Durch die zusätzliche Behandlung mit 20 nM CD147-Fc oder CD147-His wurde eine signifikante Abnahme des nCI nach 4 Stunden auf  $0,119 \pm 0,01$  beziehungsweise  $0,131 \pm 0,02$  ( $p < 0,0001$  und  $p = 0,0001$ ) erreicht (Abbildung 29H,J). Die Zugabe von 20 nM CD147-Fc zur ADCC mit IgA3.0 reduzierte das Auswachsen nach 24 Stunden signifikant gegenüber der ADCC mit IgA3.0 (nCI IgA3.0 =  $1,164 \pm 0,07$ ; nCI IgA3.0 + CD147-Fc =  $0,310 \pm 0,08$ ;  $p = 0,0074$ ) (Abbildung 29I). KYSE-30 Zellen zeigten sich auch sensitiv gegenüber 20 nM CD147 und Granulozyten ohne IgA3.0-Antikörper, was sich durch eine stetige Abnahme des nCI über den 24-stündigen Messzeitraum nach der Zugabe ausdrückte und beim Fusionsprotein mit Fc-Tag, der vermutlich eine Quervernetzung der Granulozyten auslösen kann, stärker zu beobachten war als bei CD147-His (Abbildung 29I,K). Der Effekt der Zugabe von CD147 auf die ADCC von KYSE-30 Zellen beruhte vermutlich nicht nur auf einem additiven Effekt, da die Veränderung gegenüber der Isotypenkontrolle bei der Doppelbehandlung größer war als die Summe der Einzelbehandlungen (4 h :  $\Delta$ CI IgA3.0 = 0,358;  $\Delta$ CI CD147 Fc = 0,322;  $\Delta$ CI IgA3.0 + CD147-Fc = 0,801;  $\Delta$ CI CD147-His = 0,248;  $\Delta$ CI IgA3.0 + CD147-His = 0,795). Durch die Zugabe der löslichen CD147-Fusionsproteine wurde die Effektivität des dimeren IgA3.0 im ADCC-Assay gesteigert.



**Abbildung 29: Dosisabhängige Verbesserung des ADCC durch lösliches CD147**

Impedanzmessung über 24 Stunden nach der Behandlung der A-431 Zielzellen mit Effektorzellen im Verhältnis 40:1 und 62,5 nM IgA3.0-Antikörper sowie 20 nM CD147-Fc (A) oder 20 nM CD147-His (C). Darstellung des nCI nach 4 und 24 Stunden mit und ohne Zugabe von CD147-Fc (B) oder CD147-His (D) als Box und Whisker Blot von Min bis Max mit allen Werten. Impedanzmessung über 24 Stunden nach der Behandlung der KYSE-30 Zielzellen mit GM-CSF stimulierten Effektorzellen im Verhältnis 40:1 und 62,5 nM IgA3.0-Antikörper sowie 0,02 bis 20 nM CD147-Fc (E) oder 0,02 bis 20 nM CD147-His (F). Dosis-Wirkungs-Kurve von CD147 auf den  $\Delta$ Zellindex berechnet aus nCI [KYSE-30 + PMN + IgA3.0] – nCI [KYSE-30 + PMN + IgA3.0 + CD147] (G). Darstellung des nCI zu (E) nach 4 Stunden (H) und 24 Stunden (I) und zu (F) nach 4 Stunden (J) und 24 Stunden (K) als Box und Whisker Blot von Min bis Max mit allen Werten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus mindestens n = 3 unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten (A, C, E, F, G). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001; einfaktorische Varianzanalyse mit Tukey-Korrektur.

### 3.6.4 CD147 akkumulierte während der ADCC in der Kontaktzone zwischen Granulozyten und Zielzellen

Zur Visualisierung wurden Immunfluoreszenzfärbungen von CD147 an fixierten Zellen unter ADCC-Bedingungen hergestellt. Hierzu wurden A-431 Zielzellen auf Lysin-beschichteten Deckgläschen für 24 Stunden anwachsen gelassen und anschließend mit Granulozyten im Verhältnis 20:1 und 10 µg/ml IgA2.0-Antikörper behandelt. Der ADCC-Ansatz wurde, ebenso wie unbehandelte A-431 und Granulozyten alleine, nach 30 Minuten fixiert und anschließend CD147 mittels indirekter Immunfluoreszenz gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten am Mikroskop Zeiss LSM780. Unbehandelt zeigten sowohl A-431 als auch Granulozyten eine homogene Verteilung von CD147, wobei das Färbemuster der Granulozyten ein internes Reservoir von CD147, gespeichert in Vesikeln, vermuten lässt (Abbildung 30; weiße Pfeilspitzen). Während der Quervernetzung der Granulozyten mit den A-431 Zielzellen durch den IgA2.0-Antikörper konnte eine verstärkte Färbung von CD147 in den Kontaktzonen der Zellen beobachtet werden (weiße Pfeile).



#### Abbildung 30: Immunfluoreszenzfärbung von CD147 in A-431 und Granulozyten

Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von CD147 an fixierten und permeabilisierten A-431 und Granulozyten, sowie A-431 mit Granulozyten und 10 µg/ml IgA2.0. Die Detektion des CD147-Antikörpers erfolgte mittels eines AlexaFluor546-markierten Zweitantikörpers (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. (n = 2)

Um die Lokalisation von CD147 genauer bestimmen zu können, wurde in einem nächsten Ansatz zusätzlich eine Membranfärbung mit Fluoreszein-markiertem wheat germ agglutinin (WGA) durchgeführt. Die Überlagerung zeigte eine Färbung für CD147 und WGA in den Kontaktzonen von Granulozyten und A-431 Zielzellen (Abbildung 31; weiße Pfeile).



**Abbildung 31: Membranäre Anreicherung von CD147 in der Kontaktzone während der ADCC**

Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von CD147 an fixierten und permeabilisierten A-431, sowie A-431 mit Granulozyten und 10 µg/ml IgA2.0 nach 30 Minuten. Die Detektion des CD147-Antikörpers erfolgte mittels eines AlexaFluor546-markierten Zweitantikörpers (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Die Membranfärbung erfolgte mit Fluoreszein-markiertem wheat germ agglutinin (WGA). (n = 2)

### **3.6.5 Gewebemikroarrays zeigten eine gesteigerte CD147-Expression im Tumorgewebe von Peniskarzinompatienten**

Zur Untersuchung der Rolle von EMMPRIN *in vivo* wurden Tissue-Microarrays (TMA) mit Gewebeproben von 74 Patienten mit Peniskarzinom hinsichtlich ihrer CD147-Expression analysiert. Die TMAs sowie die dazugehörigen klinischen Daten wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Karin Junker zur Verfügung gestellt und wurden bereits publiziert (Hölters u. a. 2019). Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte enthielten Gewebestanden des Tumorzentrums (TMA TZ, n = 73), der Invasionsfront (TMA IF, n = 69) und der dazugehörigen Lymphknotenmetastasen (TMA LM, n = 22) sowie des benachbarten Normalgewebes (TMA NO, n = 24) (Abbildung 32A). Für die Auswertung wurde der immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner gebildet, indem die Farbeintensität (Score 0 bis 3) mit dem Prozentsatz positiver Zellen (Score 0 bis 4) multipliziert wurde

(Remmele und Stegner 1987). In Abbildung 32B sind repräsentative Färbungen für den IRS von 0 (entspricht ungefärbt) bis 12 (entspricht der höchsten Färbeintensität mit mehr als 80 % positiven Zellen) dargestellt. Ein IRS von 3 oder größer wird als positiv gewertet.



**Abbildung 32: CD147 Färbung der Gewebemikroarrays von Peniskarzinompatienten**

Immunhistochemische CD147 Färbung der Gewebemikroarrays von Peniskarzinompatienten. Repräsentative Aufnahmen der Färbungen von Normalgewebe (NO), Tumorzentrum (TZ), Invasionsfront (IF) und Lymphknotenmetastase (LM) (A). Repräsentative Aufnahmen zur Bewertung des immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner von 0 (ungefärbt) bis 12 (höchste Färbeintensität in > 80 % der Zellen) (B).

Die Auswertung ergab, dass gegenüber dem benachbarten Normalgewebe im Tumorgewebe sowohl die Färbeintensität von CD147 als auch die Anzahl CD147 positiv gefärbter Zellen gesteigert ist (Abbildung 33A). Der IRS von CD147 ist im Tumorgewebe unabhängig von der Lokalisation der Probe (Zentrum, Invasionsfront oder Lymphknotenmetastase) gegenüber dem Normalgewebe signifikant erhöht (TZ vs. No,  $p < 0.0001$ ; IF vs. No,  $p < 0.0001$ ; LM vs. No,  $p = 0.0073$ ). Die Entstehung des Peniskarzinoms ist in ungefähr 50 % der Fälle mit einer Hochrisiko-HPV-Infektion assoziiert (Olesen u. a. 2019). Bezieht man den HPV-Status der Patienten in die Auswertung mit ein, zeigte sich ebenfalls die signifikant erhöhte CD147-Expression im Tumorzentrum im Vergleich zum dazugehörigen Normalgewebe (TZ HPV<sup>+</sup> vs. No HPV<sup>+</sup>,  $p = 0.0138$ ; TZ HPV<sup>-</sup> vs. No HPV<sup>-</sup>,  $p < 0.0001$ ) (Abbildung 33B). Betrachtet man nur die HPV<sup>+</sup> Patienten und vergleicht die Anzahl der CD147-positiven Proben, ergibt sich eine signifikante Anreicherung im Tumorzentrum gegenüber dem

Normalgewebe sowie der Infiltrationszone (Abbildung 33C,D). Alle untersuchten HPV-positiven Lymphknotenmetastasen sind auch CD147 positiv, so dass auch hier ein deutlicher Anstieg der IRS CD147<sup>+</sup> Proben gegenüber dem Normalgewebe und der Infiltrationszone gezeigt werden konnte (Abbildung 33E,F). Zu jeder analysierten Gewebeprobe des TMA liegen Informationen zu der Klassifikation der Tumoren nach dem TNM-System vor (Hölters u. a. 2019). Bei der Metastasierung wurden anhand dieser Stadien die Proben in nicht-metastasierend (cN0 und pN0) und metastasierend (pN1, pN2, pN3) unterteilt. Dabei zeigte sich, dass CD147<sup>+</sup> Proben aus Tumorzentrum, Normalgewebe oder Infiltrationszone häufiger metastasierend sind, wenn sie gleichzeitig auch HPV<sup>+</sup> sind (Abbildung 33G-I). Die Daten des Gewebemikroarrays von Peniskarzinompatienten unterstützen die Rolle von CD147 in einer weiteren HPV<sup>+</sup> Tumorentität *in vivo*.



**Abbildung 33: Erhöhte CD147-Expression im HPV<sup>+</sup> metastasierenden Peniskarzinom**

Immunhistochemische CD147-Färbung der Gewebemikroarrays von Peniskarzinompatienten. Auswertung des IRS von CD147 aufgeteilt nach Lokalisation **(A)** und zusätzlich unterteilt in HPV<sup>+</sup> und HPV<sup>-</sup> **(B)**, dargestellt als Box-Whisker-Blot mit allen Werten von Min bis Max. Anzahl der IRS positiven und negativen Proben von HPV<sup>+</sup> Patienten im Vergleich von TZ zu No **(C)**, von IF zu TZ **(D)**, von LM zu No **(E)** und von IF zu LM **(F)**. Status der Metastasierung nach der TNM-Klassifikation in HPV<sup>+</sup> versus HPV<sup>-</sup> Patienten nach Lokalisation No **(G)**, TZ **(H)** und IF **(I)**. Signifikante Unterschiede dargestellt als \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ ; Welch und Brown-Forsythe ANOVA (A und B) und Exakter Test nach Fisher (C-I)

## 4 Diskussion

### 4.1 Der impedanzbasierte Assay ermöglicht die Echtzeitmessung der ADCC durch neutrophile Granulozyten an adhären wachsenden Tumorzellen

Die Rolle der neutrophilen Granulozyten als Effektorzellen in der Antikörpertherapie ist, verglichen mit natürlichen Killerzellen und Makrophagen, weniger gut erforscht. Aufgrund ihrer Fähigkeit, durch IgG- oder IgA-Antikörper opsonisierte Tumorzellen abtöten zu können, sind sie allerdings in den letzten Jahren stärker in den Fokus der Forschung gerückt (Behrens u. a. 2023). Bei den bisherigen, etablierten Methoden für die Messung der ADCC durch neutrophile Granulozyten werden Tumorzellen in Suspension mit radioaktivem  $^{51}\text{Chrom}$  oder fluoreszenzbasierten Farbstoffen wie Calcein oder Carboxyfluoresceindiacetat-*N*-Succinimidylester (CFSE) markiert und deren Freisetzung zu einem festen Zeitpunkt nach der Behandlung gemessen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich der Calceinfreisetzungstest nicht für die Messung der ADCC mit Granulozyten als Effektorzellen an adhären angewachsenen Tumorzellen als Zielzellen eignet. Hierbei zeigte sich die hohe spontane Freisetzung des Calceins in den Überstand von unbehandelten Tumorzellen als limitierender Faktor. Die sich durch die Behandlung mit IgA-Antikörper und Granulozyten abrundenden Tumorzellen konnten mehr Calcein aufnehmen. Daraus resultierte, dass unter ADCC-Bedingungen weniger Calcein im Überstand als durch die spontante Freisetzung der Tumorzellen alleine gemessen wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Impedanz-Assay für die Echtzeitmessung der IgA-abhängigen Zytotoxizität durch neutrophile Granulozyten an adhären wachsenden Tumorzellen etabliert. Das Abtöten der Zielzellen konnte anhand dieser Methode unter physiologischeren Bedingungen, in Echtzeit und ohne das Einbringen fremder Substanzen in die Zielzellen verfolgt werden. Die Etablierung und Anwendung konnte 2019 im *Journal of Immunological Methods* unter dem Titel „Monitoring kinetics reveals critical parameters of IgA-dependent granulocyte-mediated anti-tumor cell cytotoxicity“ (Zwick u. a. 2019) veröffentlicht werden.

Der Assay beruht auf der Messung der Veränderung der Impedanz, die durch das Anhaften von Tumorzellen auf den Mikrogoldelektroden am Boden der E-plates erhöht wird. Das Abtöten der Tumorzellen führt zu deren Ablösen oder Membranzerfall, wodurch die elektrische Impedanz verringert wird. Bereits 2006 konnten Glamann und Hansen die Methode für die Bewertung der Zytotoxizität von NK-Zellen validieren und 2014 wurde von Peper et al. die Etablierung und Validierung als Zytotoxizitätsassay mit  $\text{CD8}^+$  T-Zellen veröffentlicht (Glamann und Hansen 2006;

Peper u. a. 2014). Für die Messungen wurde das X-CELLigence System verwendet und die Impedanz als dimensionsloser Parameter für den Zellindex gemessen. Für die Etablierung der Messung wurden als adhären wachsende Tumorzellen zunächst A-431 Zielzellen, die sich durch ihre sehr hohe Expression des EGFR sehr gut für die Verwendung mit dem 225-IgA2.0-Antikörper eignen, ausgewählt. Zudem existieren zu dieser Zelllinie bereits Daten aus Chromfreisetzungstests, die eine anschließende Vergleichbarkeit ermöglichen. Bei dem 2016 in Lohse et al. beschriebenen 225-IgA2.0-Antikörper handelt es sich um einen für die Tumorthapie optimierten IgA2m(1)-Antikörper mit der gleichen variablen Region des bereits zugelassenen IgG-Antikörpers Cetuximab, der an die extrazelluläre Domäne III des EGFR bindet (Lohse u. a. 2016). Die Festlegung der Standardbedingungen und die darauf folgende Berechnung des  $\Delta CI$  nach 4 Stunden bei den Impedanzmessungen lieferten vergleichbare Ergebnisse zu den zuvor mit den  $^{51}\text{Chrom}$ - und Calceinfreisetzungstests durchgeführten Studien mit dem 225-IgA2.0-Antikörper. Ebenso konnten die Ergebnisse zur Verbesserung der ADCC durch Stimulation der Granulozyten mit GM-CSF und die vollständige Inhibition der ADCC durch den Fc $\alpha$ RI-blockierenden Antikörper bestätigt werden (Lohse u. a. 2016). Jedoch wurden für den adhären durchgeführten Assay signifikant höhere Antikörperkonzentrationen im Vergleich zu den publizierten Freisetzungstests in Suspension benötigt ( $EC_{50} = 3,36 \pm 1,03 \mu\text{g/ml}$  gegenüber CRA  $EC_{50} = 0,75 \pm 0,54 \mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,0034$ ). Das adhären Wachstum der Tumorzellen und direkte Zell-Zell-Kontakte führen zu einer Polarisation und Reorganisation der Zellmembran, an denen der EGFR wesentlich beteiligt ist. Der EGFR-Signalweg fördert sowohl die Ausbildung von fokalen Adhäsionen zur Ausbreitung der Zellen auf Oberflächen als auch die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten durch Adhärenzverbindungen (Chiasson-MacKenzie und McClatchey 2018; Rao u. a. 2020). Dies beeinflusst auch die Aktivierung, Expression und Verteilung des EGFR selbst, der auf der Zelloberfläche in Lipid-Rafts organisiert ist (Lu und Chen 2011; Mollinedo und Gajate 2020; Gao u. a. 2015). Diese Organisation wirkt sich über die verfügbaren EGF-Bindestellen auf die Ligandenbindung aus (Roepstorff u. a. 2002) und könnte eine Erklärung für die benötigten höheren Antikörperkonzentrationen im adhären ADCC-Assay darstellen.

Als Vorteil gegenüber den Endpunktassays lieferte die Echtzeitmessung Erkenntnisse über die Kinetik der IgA-abhängigen granulozytenvermittelten Zellzytotoxizität. So konnte als Zeitpunkt der halbmaximalen Zytotoxizität bei A-431 Zielzellen  $44,4 \pm 10,8$  Minuten berechnet werden. Diese schnelle Aktivierung der Granulozyten spiegelte sich auch in der frühen Freisetzung von Laktoferrin und Aktivierung des oxidativen Bursts eine Stunde nach der Quervernetzung der Granulozyten mit den Zielzellen durch den IgA2.0 wider. Die Freisetzung von Laktoferrin in den Überstand kann als Maß der Degranulierung der Granulozyten gemessen werden und korreliert mit dem Abtöten der Tumorzellen durch neutrophile Granulozyten und  $\alpha$ -EGFR-IgA (Heemskerk u. a. 2021). Allerdings ist in der Literatur auch beschrieben, dass Granulozyten von Patienten, die entweder keine reaktiven

Sauerstoffspezies bilden können oder deren Degranulation defekt ist, ebenso effektiv in ADCC-Assays mit IgG1- oder IgA-Antikörpern markierte Tumorzellen abtöten können wie Granulozyten von gesunden Spendern (Matlung u. a. 2018; Treffers u. a. 2020; van Rees, Brinkhaus, u. a. 2022). Matlung et al. prägten 2018 den Begriff Trogoptose für den Mechanismus, wie Granulozyten antikörperabhängig Tumorzellen abtöten können. Dabei führt die wiederholte Trogozytose, der Transfer von Membranbestandteilen der Zielzelle auf die Effektorzellen, zu einer lokalen Zerstörung der Tumorzellmembran und schließlich zur Lyse der Tumorzelle. Der Zelltod durch Trogoptose ist abhängig von der Signalweiterleitung der Fc-Rezeptoren. Diese kann durch Wortmannin, einem Inhibitor der PI3-Kinase, verhindert werden (Matlung u. a. 2018). Auch im impedanzbasierten ADCC-Assay führte sowohl die Zugabe von Wortmannin als auch die Vorinkubation der Granulozyten mit Wortmannin zu einem Verlust der Effektivität der Granulozyten. Die Vorbehandlung der Zielzellen hatte keinen Effekt auf den ADCC. Die Ergebnisse konnten neben den A-431 Zielzellen auch in KYSE-30 Ösophaguskarziom Zellen bestätigt werden und unterstützen die Annahme der Trogoptose als Mechanismus der Tumorzellbekämpfung durch Granulozyten.

Nicht jede Trogozytose führt zwangsläufig auch zur Trogoptose und damit zum Absterben der Tumorzellen. 2022 konnten Rees et al. durch Lebendzell-Bildgebung zeigen, dass in einer relativ kurzen Zeitspanne mehrere Trogozytoseereignisse stattfinden müssen, so dass sie letztlich auch zum Absterben der Tumorzelle führen. Bis zu einem bestimmten Grad an Trogozytose können die Tumorzellen durch Zellmembranreparatur der Trogoptose entkommen (van Rees, Bouti, u. a. 2022). Neueste Literatur (Singhal u. a. 2024) stellt nochmal genauer dar, dass die Trogozytose – bei den in soliden Tumoren vorherrschenden Bedingungen – meist sublethal verläuft und die benötigte Antigendichte und Effektorzellanzahl für eine Tumorzellyse nicht ausreichend ist. Zudem kommt es durch die sublethale Trogozytose zu einem Verlust des Oberflächenantigens, die damit der Tumorzelle hilft, aus der ADCC zu entkommen. In dem Versuchsansatz von Singhal et al. konnte durch den Einsatz von anti-EGFR-IgA-Antikörper lediglich der stimuliernde Effekt der TAN auf das Tumorzellwachstum amortisiert werden. Die Verwendung von Neutrophilen des peripheren Blutes, so wie sie auch in dieser Arbeit genutzt wurden, führte stimmig mit meinen Ergebnissen hingegen zu einer antitumoralen Aktivität. Passend dazu stellte sich in Kurzzeitmessungen das Verhältnis von Granulozyten zu Zielzellen als entscheidende Einflussgröße auf die Effektivität der ADCC dar. Je mehr Granulozyten pro Zielzelle quervernetzt werden können, desto größer ist die Abnahme der Impedanz. Zudem bestätigten die mit der Impedanzmethode ermöglichten Langzeitmessungen, die in Echtzeit durchgeführt werden konnten, auch das Entkommen der Tumorzellen, indem ein Anstieg der Impedanz das Wiederauwachen der nicht abgetöteten Tumorzellen darstellt. Die Stimulation mit GM-CSF konnte den Anstieg der Impedanz verringern, aber nicht vollständig unterdrücken. Durch mikroskopische Aufnahmen der ADCC im Zeitverlauf konnte die frühzeitige Bildung heterotypischer

Aggregate bestehend aus Granulozyten und Zielzellen visualisiert werden, die jedoch bereits nach 4 Stunden fast vollständig wieder aufgelöst waren, obwohl noch ausreichend Antikörper und lebende Effektorzellen nachgewiesen werden konnten. Die erneute Behandlung der Zielzellen nach 6 Stunden im Impedanz-Assay und Verlaufsmessungen der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies deuten auf eine Erschöpfung der Granulozyten hin. Für die fast vollständige Unterdrückung des Wiederanwachsens der Tumorzellen war die Zugabe frischer Granulozyten des gleichen Spenders ohne erneutes Hinzufügen des Antikörpers ausreichend. Auf die hier beobachtete mögliche Erschöpfung der Granulozyten wird in den Veröffentlichungen zur Trogoptose nicht eingegangen. Erschöpfte Granulozyten von Sepsispatienten zeigen einen Phenotyp mit erhöhter Expression inflammatorischer Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, CD11b und CD29, der *in vitro* durch verlängerte LPS-Stimulation hervorgerufen werden kann (Kourtzelis u. a. 2017). Lin et al. stellten einen Zusammenhang zwischen Erschöpfung und der Aktivierung von Kinasen der Src-Familie über das Adapterprotein TICAM2 her und zeigten eine Möglichkeit der Inhibition durch Dasatinib auf (Lin u. a. 2020). Der Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib könnte für zukünftige Experimente genutzt werden, um im Impedanzassay die Auswirkungen auf die Langzeit-ADCC zu studieren. *In vivo* könnte das Problem der Erschöpfung durch die Rekrutierung frischer Granulozyten gelöst werden. Denn auch im verwendeten ADCC-Assay setzten die Granulozyten nach der IgA-abhängigen Quervernetzung des Fc $\alpha$ RI LTB<sub>4</sub>, ein stark chemotaktisch wirkendes Leukotrien, frei (van der Steen u. a. 2009). Somit unterstützen die Daten die Hypothese einer in sich geschlossenen, sich selbst verstärkenden Rückkopplung durch IgA-Antikörper auf die Rekrutierung von Granulozyten (Heineke und van Egmond 2017).

## 4.2 Screening von adhärent wachsenden Kopf-Hals-Tumorzelllinien

Zur Anwendung des zuvor etablierten impedanzbasierten ADCC-Assays wurden sieben Kopf-Hals-Tumorzelllinien aus unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen ausgewählt. Kopf-Hals-Tumoren stellen aufgrund ihres Immunzellinfiltrates, ihrer EGFR-Überexpression und der bereits erteilten Zulassung von Cetuximab in der Therapie eine für die Antikörpertherapie relevante Tumorentität dar. Die Impedanz-Echtzeitmessung der Behandlung mit 225-IgA2.0-Antikörper und GM-CSF-stimulierten Granulozyten ergab ganz unterschiedliche zelllinienspezifische Effekte sowohl im kurzzeitigen Ansprechen auf die Therapie als auch in der Kinetik der ADCC. Fünf der getesteten Zelllinien zeigten eine signifikante Reduktion der Impedanz nach 4 Stunden durch die Behandlung mit spezifischem Antikörper gegenüber der Isotypenkontrolle, während für zwei Zelllinien über den gesamten Messzeitraum keine signifikante Impedanzänderung zur Kontrolle detektiert werden konnte. Die daraus berechnete Differenz des Zellindex  $\Delta CI$  nach 4 Stunden korrelierte positiv mit dem EGFR-Proteinlevel und der EGFR-Oberflächenexpression der Tumorzellen. Der Zusammenhang der Effektivität des ADCC mit der Oberflächenexpression des EGFR wurde bereits durch Derer et al. mit der Verwendung des Chromfreisetzungstests und stabil transfizierten BHK-21 Zellen nachgewiesen (Derer u. a. 2012) und konnte in meinem physiologischeren Versuchsansatz bestätigt werden. Die mRNA-Expression des EGFR, die durch posttranskriptionale Modifikation stark von dem tatsächlichen Proteinlevel abweichen kann (Vogel und Marcotte 2012), zeigte zwar eine ähnliche Tendenz, korrelierte aber nicht signifikant mit dem kurzzeitigen Ansprechen der untersuchten Zelllinien im ADCC-Assay.

Für die Bewertung der Kinetik wurden der Zeitpunkt der halbmaximalen Reduktion der Impedanz ( $EC_{50}$ -Zeit) und der Kurvenverlauf nach der maximalen Reduktion betrachtet. Dabei zeigte sich, dass aus der  $EC_{50}$ -Zeit keine Rückschlüsse auf die Effektstärke und anhaltende Effektivität der ADCC gezogen werden konnten. Für drei der sieben untersuchten HNSCC-Zelllinien konnte auch nach 24 Stunden kein Wiederauswachsen der Zielzellen gemessen werden, so dass von einer vollständigen Lyse der Tumorzellen ausgegangen werden kann. Gleichzeitig konnte bei zwei dieser Zelllinien eine Sensitivität gegenüber den GM-CSF stimulierten Granulozyten ohne Antikörperzugabe durch einen langsamen aber stetigen Abfall des Zellindexwertes beobachtet werden. Diese direkte antitumorale Funktion von Granulozyten konnte bereits in mehreren Studien belegt werden und beruht zumindest teilweise auf der Expression von Liganden auf den Granulozyten, die der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie angehören. Zum Beispiel können Fas-Ligand und TRAIL mit den entsprechenden Rezeptoren auf der Tumorzelle quervernetzen und deren apoptotischen Zelltod auslösen. TRAIL beispielsweise kann durch die Zytokine IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , die von den Tumorzellen freigesetzt werden, stimuliert werden (zusammengefasst in: (Ustyanovska Avtenyuk u. a. 2020)). Durch die Behandlung mit

quervernetzendem 225-IgA2.0-Antikörper wurde die antitumorale Wirkung der Granulozyten gegenüber diesen Zielzellen weiter verbessert. Die Expression der immunmodulatorischen Zytokine GM-CSF und TNF- $\alpha$ , die unter anderem die Fc $\alpha$ RI-Expression steigern können, sowie des Gegenspielers TGF- $\beta$ 1 (Breedveld und van Egmond 2019) korrelierte allerdings bei den untersuchten Zelllinien weder mit der Effektivität der ADCC nach 4 Stunden noch mit der Nachhaltigkeit des Ansprechens nach 24 Stunden. Für die Menge an sezerniertem CXCL8 ergab sich eine Tendenz hin zu einer negativen Korrelation mit dem  $\Delta$ CI nach 4 Stunden, die im Gegensatz zu eigenen Daten aus Peniskarzinom-Zelllinien steht. In Bernhard et al. konnte der Zusammenhang aus verstärkter CXCL8-Freisetzung, die zu einer gesteigerten Oberflächenexpression des Fc $\alpha$ RI auf Granulozyten führt, und einer gesteigerten Empfindlichkeit der Peniskarzinom-Zellen gegenüber IgA-abhängiger zellulärer Zytotoxizität dargestellt werden. Als mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte die Infektion der Peniskarzinom-Zellen mit HPV dienen, da die hier untersuchten HNSCC-Zelllinien HPV-negativ sind. Das Tumormikromilieu HPV-positiver Peniskarzinome lockt in seiner Zytokinzusammensetzung Neutrophile an und besitzt das Potential, diese für den ADCC zu stimulieren (Bernhard u. a. 2021).

Damit Granulozyten Tumorzellen durch Trophoptose abtöten können, ist ein sehr enger Kontakt zwischen den beiden Zelltypen erforderlich (Behrens u. a. 2022). Diese Art des direkten Zell-Zell-Kontaktes ist zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen extensiv erforscht und wird als immunologische Synapse bezeichnet (Dustin 2014). Die immunologische Synapse zwischen Granulozyten und Tumorzellen ist dagegen noch weniger gut charakterisiert, sie ist jedoch für das Abtöten der Zielzelle essentiell. Für die Ausbildung der Synapse und das Abtöten der Zielzelle ist, neben der Opsonisierung der Tumorzelle mit spezifischen Antikörpern, der Mac-1 Komplex (aus CD11b und CD18) auf den neutrophilen Granulozyten erforderlich (Matlung u. a. 2018; Bouti, Zhao, u. a. 2021). Als mögliche Erklärung für das ganz unterschiedliche Ansprechen der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien im ADCC-Assay wurde die Expression von Mac-1 Liganden (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-4, ICAM-5) untersucht. Die stärkste Expression für ICAM-1 auf mRNA-Ebene zeigte die Zelllinie HSC-4, während die Zelllinie HN die stärkste mRNA-Expression von ICAM-2, ICAM-4 und ICAM-5 aufwies und zusätzlich am meisten ICAM-1 auf der Zelloberfläche hatte. Damit zeigten die beiden Zelllinien, die im ADCC-Assay minimales (HSC-4) oder gar kein Ansprechen (HN) auf die Behandlung hatten, die höchsten Ligandenexpressionen. Im Gegensatz dazu konnte auf den beiden Zelllinien CAL-33 (moderates Ansprechen) und KYSE-30 (sehr gutes Ansprechen) keiner der untersuchten Liganden für Mac-1 nachgewiesen werden. Aus der Expression der ICAM Liganden auf den verwendeten Tumorzellen lassen sich deshalb keine Rückschlüsse auf die Effektivität des IgA-abhängigen ADCC ziehen. Dies könnte zum einen daran liegen, dass in der Literatur bis zu 40 weitere mögliche Bindungspartner für Mac-1 beschrieben sind (Podolnikova u. a. 2015), zum anderen ist für Mac-1 die Inside-Out-Aktivierung beschrieben, die unabhängig von der Ligandenbindung ist und für die Bildung

der immunologischen Synapse ausreichend sein könnte (Yago u. a. 2018; Bouti, Webbers, u. a. 2021). Involviert in die Aktivierung von Mac-1 ist die PI3-Kinase, die durch Wortmannin gehemmt werden kann. Die Inkubation der Granulozyten mit Wortmannin konnte den ADCC verhindern. Neben der Unterdrückung der Signalweiterleitung durch den Fc $\alpha$ RI könnte die fehlende Aktivierung von Mac-1 einen weiteren Wirkmechanismus der Inhibition der PI3K darstellen. Die Ergebnisse der Ligandenexpression deuten eher auf einen negativen Zusammenhang zwischen der ICAM-1-Expression und der ADCC-Effektivität hin und auch in der Literatur ist ein protektiver Mechanismus von ICAM-1 beschrieben. So konnten Hirz et al. zeigen, dass in Tumorzellen, die über ICAM-1 und CD11b mit neutrophilen Granulozyten interagierten, die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika herabgesetzt war (Hirz u. a. 2017). Inwiefern diese Beobachtungen auf den ADCC durch neutrophile Granulozyten übertragen werden könnten, ist noch unklar.

Des Weiteren wurden die mRNA-Level des Tumormarkers LRIG1 untersucht, dessen Expression bei Kopf-Hals-Tumoren mit einer günstigen Prognose verbunden ist (Lindquist u. a. 2014). LRIG1 ist ein Tumorsuppressor mit einer negativen regulatorischen Funktion auf Rezeptortyrosinkinasen, unter anderem auch den EGFR (Jeong u. a. 2020; Billing u. a. 2021). Gur et al. konnten zeigen, dass die Interaktion mit LRIG1 zum lysosomalen Abbau des EGFR führt (Gur u. a. 2004), und auch in den untersuchten Tumorzelllinien ergibt sich ein leichter Trend hin zur negativen Korrelation der LRIG1-Expression mit der EGFR-Proteinexpression. Die Abwesenheit von LRIG1 könnte sich positiv auf die EGFR Level und somit die ADCC-Effektivität auswirken, so dass Patienten mit schlechter Prognose von der Therapie mit EGFR-spezifischen IgA-Antikörpern profitieren könnten.

Die Überexpression des EGFR sowie viele zirkulierende und infiltrierende Granulozyten kennzeichnen Kopf-Hals-Tumorpatienten, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (Dumitru u. a. 2013; Mascarella u. a. 2018). Die Anwendung des impedanzbasierten ADCC-Assays an sieben Kopf-Hals-Tumorzelllinien konnte zeigen, dass in Zukunft dieses Patientenkollektiv von der Immuntherapie mit IgA-Antikörpern profitieren könnte.

### 4.3 Biochemische Charakterisierung und Funktionalität des dimeren IgA3.0

Die bisher zugelassenen therapeutischen Antikörper gehören dem IgG-Subtyp an. Seit mehreren Jahren gibt es Bemühungen, auch IgA-Antikörper, die sich als effizienter in der Aktivierung myeloischer Effektorzellen gezeigt haben (Dechant u. a. 2007; Lohse u. a. 2012), für die Tumorthherapie zu entwickeln. Probleme hierbei ergaben sich aus der geringen Produktion und Stabilität der IgA-Antikörper im Vergleich zum IgG sowie der kurzen Serum-Halbwertszeit und der starken Glykosylierung, die durch vorgenommene Modifikationen bereits deutlich verbessert werden konnten (zusammengefasst in: (van Tetering u. a. 2020)). In früheren Studien zeigte sich *in vitro* eine Überlegenheit der IgA2-Isoform gegenüber IgA1 und von dimerem IgA gegenüber monomerem IgA (Dechant u. a. 2007; Lohse u. a. 2011). Der pharmakokinetisch optimierte monomere IgA2.0-Antikörper, gerichtet gegen den EGFR, zeigte auch im *in vivo* Mausmodell eine verbesserte therapeutische Wirksamkeit gegenüber EGFR-exprimierenden Tumorzellen (Lohse u. a. 2016). Aufgrund dieser Vorarbeiten wurde in dieser Arbeit das zum IgA2.0 korrespondierende Dimer IgA3.0 produziert und im Vergleich zum Monomer sowie weiteren IgA-Dimervarianten analysiert. Die biochemische Charakterisierung zeigte, dass der Austausch der Aminosäuren von Prolin zu Arginin an der Position 211, die eine kovalente Verbindung der leichten und schweren Kette im IgA2-Isotyp ermöglicht, kritisch für die Stabilität des IgA3.0 und IgA2P221R gegenüber IgA2WT ist. Die beobachteten Unterschiede in der molekularen Masse der schweren Ketten konnten anhand der Lektinblots auf die schwache Glykosylierung des optimierten IgA3.0 zurückgeführt werden. Durch die eingefügten Mutationen haben die veränderten IgA2.0- und IgA3.0-Antikörper entsprechend dem IgA1 nur zwei N-Glykosylierungsstellen je schwerer Kette. Passend dazu zeigten die IgA2WT- und IgA2P221R-Dimere mit vier möglichen N-Glykosylierungsstellen je schwerer Kette eine stärkere Glykosylierung mit den verwendeten Lektinen RCA I, AAL, GSL I und eine höhere molekulare Masse der schweren Ketten unter reduzierenden Bedingungen in der Gelelektrophorese. Die Ergebnisse zur terminalen Sialylierung, nachgewiesen mit dem Sambucus Nigra Lektin, ergaben eine schwache terminale Sialylierung des IgA1-Dimer, das physiologisch im Serum zu über 90 % sialyliert vorliegt und naturgemäß stärker sialyliert ist als IgA2 (Steffen u. a. 2020; van Tetering u. a. 2020). Die dem physiologischen Vorkommen widersprüchlichen Ergebnisse könnten durch das verwendete ExpiCHO-Expressionssystem erklärt werden, da die Glykosylierung stark von der zur Produktion verwendeten Zelllinie abhängig sein kann (Yoo u. a. 2010). Für IgA2.0 konnte im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (Lohse u. a. 2016) keine terminale Sialylierung nachgewiesen werden. Dies könnte wiederum an der verwendeten Zelllinie zur Produktion und der unterschiedlichen Nachweismethode mit Lektinen gegenüber der massenspektrometriebasierten Glykoanalyse liegen. Die Serumhalbwertszeit *in vivo* ist abhängig von der Glykosylierung und kann durch die terminale

Sialylierung verlängert werden. In Zukunft könnte die Zugabe der Sialyltransferase bei der Produktion der Antikörper, wie in Rouwendal et al. 2015 beschrieben, eventuell die Verweildauer im Serum steigern (Rouwendal u. a. 2016).

Die Dimerisierung führt zu einer tetravalenten Antigen-Bindungskapazität, die sich auch beim IgA3.0-Dimer gegenüber dem IgA2.0-Monomer in einer verbesserten Fab-vermittelten Bindung an den EGFR darstellt. Die Antigenbindungsaffinität kann durch die Mutation von kritischen Aminosäuren in der konstanten Region der schweren Kette, die sich durch die Gelenkregion hindurch auf die Bindungsdomäne übertragen können, beeinflusst sein (Su u. a. 2018). Beim Vergleich der Dimere untereinander haben die eingefügten Mutationen, verglichen zum IgA2WT, keine Auswirkungen auf die EGFR Bindungseigenschaften. Bei den Fab-vermittelten Funktionen konnten eine Überlegenheit des IgA3.0 gegenüber dem korrespondierenden Monomer IgA2.0 sowie eine verstärkte Wachstumsinhibition durch die optimierten Dimere gegenüber den WT-Dimeren beobachtet werden. Zusammenfassend zeigte der IgA3.0-Antikörper verbesserte Bindungseigenschaften und Vorteile in funktionellen Assays in Abhängigkeit von der Antigenbindung.

In der Betrachtung der Fc-vermittelten Effekte ergab sich ein differenzierteres Bild. Die auch hier vorhandene Überlegenheit in der Bindung zum Fc $\alpha$ RI konnte nicht auf die Effektivität im ADCC-Assay übertragen werden. Durch die Beobachtung der ADCC im Impedanz-Assay in Echtzeit über einen langen Zeitraum konnten zwei unterschiedliche Effekte des Dimers beobachtet werden. Zum einen kam es initial zu einem signifikant verringerten Ablösen der Zielzellen und dadurch zu einem verstärkten Wiederauswachsen der Zielzellen, zum anderen konnte ein dimerspezifischer zytotoxischer Langzeiteffekt beobachtet werden, bei dem eventuell doch die verbesserte Fab-vermittelte Funktionalität zum Tragen kommt.

Beim funktionellen Vergleich von IgA2.0 und IgA3.0 an adhärent wachsenden HPV<sup>+</sup> HNSCC-Zelllinien konnte der IgA3.0-Antikörper keine signifikante ADCC auslösen. Von entscheidender Bedeutung in der ADCC ist die quervernetzende Funktion der Antikörper zwischen Antigen auf der Zielzelle und Fc $\alpha$ RI auf der Effektorzelle. Die Bindung des Fc $\alpha$ RI an die CH2-CH3-Domäne führt zu einer weitreichenden Konformationsänderung, die die Antigenbindung beeinflussen kann (Posgai u. a. 2018; Ling u. a. 2022). Im Gegenzug kann auch die Bindung an das Antigen Konformationsänderungen in der Fc-Domäne auslösen, die wiederum die Bindungsaffinität zum Fc-Rezeptor verändern können (J. Zhao u. a. 2019). Die Publikationen beziehen sich auf monomere IgA- und IgG-Antikörper, können aber vermutlich auch auf Dimere übertragen werden. Durch die tetravalente Bindung könnten Konformationsänderungen eventuell noch größeren Einfluss auf die Quervernetzung haben als im Monomer und damit die veränderte Funktionalität des Dimers zum Monomer erklären. Die Bindungsanalysen an den EGFR auf den Zielzellen wurden in Suspension und

nur als einseitige Bindung untersucht und können daher keine Aussage über die quervernetzenden Eigenschaften des Dimers zwischen adhären wachsenden Tumorzellen und Effektorzellen liefern. Zudem erfolgt die Inkubation der Zielzellen mit den Antikörpern auf Eis, in einem für alle Zelllinien einheitlichen Puffer, so dass die analysierte Bindung von der Bindung an adhären Zielzellen im entsprechend konditionierten Medium abweichen könnte.

Im Vergleich zu den anderen Dimeren konnte keine Einschränkung des IgA3.0 in der ADCC-Effektivität gegenüber den hoch EGFR-exprimierenden Kontrollzelllinien beobachtet werden. Bei den HPV<sup>+</sup> HNSCCs zeigte sich der IgA3.0 ähnlich effektiv wie der IgA2.0 und signifikant verbessert gegenüber den anderen Dimeren. Die verbesserten funktionellen Eigenschaften durch die in den IgA2.0 eingefügten Mutationen kommen in den untersuchten Zelllinien beim IgA3.0-Dimer erst durch die HPV-Infektion der Zielzellen zum Tragen. HPV16 kann durch sein Onkoprotein E5 direkten Einfluss auf die Oberflächenexpression und Aktivierung des EGF-Rezeptors nehmen, indem es unter anderem die Degradierung des Rezeptors inhibiert (Ilahi und Bhatti 2020). Die Expression alleine kann aber nicht die Unterschiede der Dimere untereinander erklären, da sich auch die Bindung der Dimere an die HPV-negativen und -positiven Zellen im in Suspension durchgeführten Bindungsassay nicht unterscheidet. Im adhären Zustand könnte die Organisation der Zellmembran in Lipid Rafts, deren Zusammensetzung ebenfalls durch HPV verändert sein kann (Suprynowicz u. a. 2008), die Zugänglichkeit der Antikörper an den EGFR modulieren. So könnte der weniger glykosylierte IgA3.0 einen Vorteil in der Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen HPV<sup>+</sup> Zielzellen und Granulozyten gegenüber den anderen untersuchten Dimeren aufweisen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die am IgA2.0 durchgeführten Optimierungen, die zu einer deutlichen Verbesserung des IgA2.0 Monomers geführt haben, nicht einfach auf die funktionellen Eigenschaften des daraus aufgebauten Dimers übertragen werden konnten. Vor allem im Fc-vermittelten funktionellen ADCC-Assay konnte die Erwartung einer verbesserten Funktionalität des Dimers zum korrespondierenden Monomer nicht erfüllt werden. Daraufhin wurde eine Umklonierung der schweren Kette des IgA3.0 vorgenommen. Das Wiedereinfügen der Glykosylierungsstelle in der CH2 Region aus dem IgA2WT in den Dimeren IgA3.0 führte zu einem in der ADCC funktionell verbesserten Antikörper (IgA3.1). Die Charakterisierung des IgA3.1-Antikörpers wurde von Julian Reiß durchgeführt und die Ergebnisse in seiner Bachelorarbeit (durchgeführt am Institut für Virologie) beschrieben. Aus der Veränderung der Glykosylierung in der Fc $\alpha$ RI-Bindedomäne und der daraus gesteigerten Effektivität der ADCC lässt sich ableiten, dass für die funktionelle Optimierung der IgA-Dimere vermutlich andere Glykosylierungsstellen als im Monomer von Bedeutung sind.

#### **4.4 CD147 beeinflusst die Effektivität der ADCC *in vitro* und markiert Patienten mit HPV<sup>+</sup> metastasierendem Peniskarzinom *in vivo***

Im nächsten Schritt wurden der etablierte impedanzbasierte ADCC-Assay, die beiden Kontrollzelllinien sowie die neun Kopf-Hals-Tumorzelllinien genutzt, um mögliche Einflüsse auf die Effektivität der IgA-abhängigen ADCC zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass lösliche Faktoren in den Überständen der benutzten Zelllinien die ADCC-Effektivität modulieren können. Bei der Analyse von Oberflächenmolekülen auf den Granulozyten, die möglicherweise an der Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen den Granulozyten und den Zielzellen beteiligt sind, zeigte mCD147 ein interessantes Expressionsmuster. Studien zur Synapsenbildung von T-Zellen deuteten dort auf eine zentrale Rolle von CD147 hin (Staffler u. a. 2003; J. Hu u. a. 2010). CD147 kann mit Mac1 und Kindlin3 interagieren, die beide zu den kritischen Komponenten für die IgA-abhängige ADCC gehören (Heinzmann u. a. 2020; Delyon u. a. 2015). Als wesentlicher Co-Faktor erleichtert Mac1 die Bindung zwischen IgA-Antikörpern und dem Fc $\alpha$ RI sowie die Ausbildung der immunologischen Synapse (van Spriël u. a. 2001; Van Spriël u. a. 2002). Die Interaktion von CD147 mit Mac1 und Kindlin3 könnte somit auf die IgA-Fc-Rezeptor-Bindung, die durch  $\beta$ 1-Integrin/Kindlin3-vermittelte Zelladhäsion und die Synapsenbildung einwirken (Bouti, Zhao, u. a. 2021). Somit beeinflusst mCD147 auf den Granulozyten als alternativer Bindungspartner möglicherweise kritische Faktoren, die für eine effiziente ADCC erforderlich sind. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die negative Korrelation der durch die Tumorzelllinien induzierten mCD147-Expression auf den Granulozyten mit dem Ansprechen der Tumorzellen bei der ADCC.

In einer großen Studie konnten Zhang et al. 2022 die Überexpression von CD147 in 24 von 31 untersuchten Krebsarten gegenüber dem Normalgewebe nachweisen und den Nutzen von CD147 als prognostischen Biomarker für das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben darlegen (Jingwei Zhang u. a. 2022). Die Studie konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen der CD147-Expression und dem Immunzellinfiltrat von T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten und Makrophagen zeigen. Diese und weitere Studien zur CD147-Expression im Tumorgewebe unterscheiden dabei allerdings nicht zwischen der membranständigen oder löslichen Form. In den in dieser Arbeit untersuchten Tumorzellen konnte für mCD147 auf den Tumorzellen selbst keine Korrelation mit der ADCC-Effektivität im Impedanz-Assay gezeigt werden. Lösliches CD147 hingegen konnte in Zellkulturüberständen, die ein Ansprechen auf die IgA3.0-abhängige ADCC zeigten, vermehrt detektiert werden. Lösliches CD147 wird durch die Aktivität der entsprechenden Proteasen (MMPs und ADAM) von den Tumorzellen als Fragment von deren Oberfläche abgespalten (Y. Tang u. a. 2004; Egawa u. a. 2006; Albrechtsen u. a. 2019) und ist assoziiert mit Tumorwachstum, Metastasierung und Resistenzen gegenüber der Chemotherapie (Xin u. a. 2016; Ju u. a. 2008). Dabei ist sCD147 an der

Induktion von Fibroblasten in Krebs-assoziierte Fibroblasten beteiligt und fördert die Invasion und Metastasierung, indem es zur epithelialen-mesenchymalen Transition der Tumorzellen beiträgt (Xu u. a. 2013). Die Zugabe von sCD147 als rekombinant hergestellte Fusionsproteine konnte die IgA3.0-abhängige ADCC-Effektivität in den KYSE-30 Zellen dosisabhängig steigern. Somit erwies sich in Bezug auf eine hohe Effektivität der ADCC im Impedanz-Assay eine schwache Induktion von mCD147 auf Granulozyten und eine große Menge sCD147 im Überstand der HPV<sup>+</sup> Zelllinien als prädiktiv. Zudem könnte diese Kombination eine mögliche Erklärung für die verbesserte Wirksamkeit des IgA3.0-Antikörpers gegenüber den HPV-positiven HNSCC-Zelllinien darstellen und ein Patientenkollektiv mit bisher schlechter Prognose in Zukunft für die IgA-Tumorthherapie qualifizieren.

Die beobachtete Akkumulation von CD147 in der Kontaktzone von Effektor- und Zielzellen während der ADCC lässt auf eine Beteiligung von CD147 bei der Quervernetzung der Zellen schließen. Allerdings konnte in diesem Versuchsansatz nicht zwischen membranständigem und löslichem CD147 unterschieden werden. Eine besondere Schwierigkeit bei dem Design von Experimenten für die Unterscheidung der Effekte von mCD147 und sCD147 liegt in der kurzen Überlebensdauer der aufgereinigten Granulozyten *in vitro*, die eine genetische Veränderung der Granulozyten erschwert. Steigendes Interesse an Granulozyten in der Tumorthherapie und die kürzlich publizierte Differenzierung von humanen pluripotenten Stammzellen zu Granulozyten (Chang u. a. 2022) zum Einsatz als genetisch veränderte CAR Neutrophile (Chang u. a. 2023) könnten neue Erkenntnisse und interessante Möglichkeiten der Forschung mit Granulozyten in Zukunft bieten.

Abschließend konnte ein Zusammenhang der CD147-Expression *in vivo* mit der Metastasierung des HPV<sup>+</sup> Peniskarzinoms anhand der Färbung von Gewebemikroarrays gezeigt werden (publiziert in Mohr u. a. 2022). Durch die zunehmende Prävalenz von Hochrisiko-HPV-Infektionen an Schleimhautstellen wie Gebärmutterhals, Vulva, Penis, Anus und Mandeln steigen auch die jährlichen Inzidenzraten für HPV-bedingte Krebserkrankungen, darunter auch das in Europa noch sehr seltene Peniskarzinom. Die TMAs mit Proben von 74 Patienten mit Peniskarzinom bestätigen die Überexpression von CD147 im Tumorgewebe, vor allem im Tumorzentrum, gegenüber dem Normalgewebe, wie es bereits 2010 von Han et al. allerdings mit limitierter Patientenzahl (17 Patienten) publiziert wurde (Han u. a. 2010), und stellen zudem einen Zusammenhang der CD147-Expression mit dem HPV-Status her. Meine Daten aus der CD147-Färbung der TMA-Schnitte wurden zusammen mit weiteren Biomarkern sowie den klinischen Daten des verwendeten Patientenkollektivs für die Analyse des Einflusses der Tumormikroumgebung auf das Überleben der Peniskarzinompatienten genutzt (Lohse et al. 2024 Manuskript in Vorbereitung „The impact of the tumor microenvironment on the survival of penile cancer patients“). Die Berechnung des Kaplan-Meier-Schätzer ergab, dass sowohl CD147 in Kombination mit CD15 als auch CD147 zusammen mit dem HPV-Status mit einem verringerten Überleben der Patienten einherging. Der HPV+CD147+CD15-

Status stellte sich in der der Analyse der verwendeten Markern als das stärkste Profil zur Vorhersage des metastasenfren Überlebens der Peniskarzinompatienten heraus. Somit könnten vor allem HPV<sup>+</sup> Peniskarzinompatienten von der Immuntherapie mit CD147 als Zielmolekül von Antikörpern (HAb18), Niedermolekularen Inhibitoren (AC-73) sowie CAR T- und NK-Zellen, die Gegenstand der aktuellen Forschung ist, profitieren (Huhe u. a. 2019; Fu u. a. 2016; Tseng u. a. 2020).

Um die molekularen Mechanismen von CD147 bei der HPV-induzierten Tumorentstehung zu entschlüsseln, sind weitere Studien, die auch die unterschiedlichen Funktionen von membranständigem und löslichem CD147 analysieren, erforderlich. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine zukünftige Immuntherapie mit IgA-Antikörpern auch bei Patienten mit hohem Level an sCD147 erfolgreich sein könnte und damit eine Therapieoption für HNSCC- und Peniskarzinompatienten mit bisher schlechter Prognose darstellen könnte.

## 5 Verzeichnisse

### 5.1 Literaturverzeichnis

- Abd Halim, Khairul Bariyyah, Heidi Koldsø, und Mark S. P. Sansom. 2015. „Interactions of the EGFR Juxtamembrane Domain with PIP2-Containing Lipid Bilayers: Insights from Multiscale Molecular Dynamics Simulations“. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Recent developments of molecular dynamics, 1850 (5): 1017–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.09.006>.
- Adrain, Colin, und Matthew Freeman. 2014. „Regulation of Receptor Tyrosine Kinase Ligand Processing“. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (1): a008995. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008995>.
- Aguet, François, Costin N. Antonescu, Marcel Mettlen, Sandra L. Schmid, und Gaudenz Danuser. 2013. „Advances in Analysis of Low Signal-to-Noise Images Link Dynamin and AP2 to the Functions of an Endocytic Checkpoint“. *Developmental Cell* 26 (3): 279–91. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.019>.
- Albrechtsen, Reidar, Nicolai J. Wewer Albrechtsen, Sebastian Gnosa, Jeanette Schwarz, Lars Dyrskjøt, und Marie Kveiborg. 2019. „Identification of ADAM12 as a Novel Basigin Shedase“. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (8): 1957. <https://doi.org/10.3390/ijms20081957>.
- Albregues, Jean, Mario A. Shields, David Ng, Chun Gwon Park, Alexandra Ambrico, Morgan E. Poindexter, Priya Upadhyay, u. a. 2018. „Neutrophil Extracellular Traps Produced during Inflammation Awaken Dormant Cancer Cells in Mice“. *Science (New York, N.Y.)* 361 (6409): eaao4227. <https://doi.org/10.1126/science.aao4227>.
- Alevy, Yael G., Jennifer Tucker, B. Naziruddin, und T. Mohanakumar. 1993. „CD32C (Fcγ RIIC) mRNA Expression and Regulation“. *Molecular Immunology* 30 (8): 775–82. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(93\)90149-6](https://doi.org/10.1016/0161-5890(93)90149-6).
- Aleyd, Esil, Marieke H. Heineke, und Marjolein van Egmond. 2015. „The Era of the Immunoglobulin A Fc Receptor FcαRI; Its Function and Potential as Target in Disease“. *Immunological Reviews* 268 (1): 123–38. <https://doi.org/10.1111/imr.12337>.
- Anderson, C L, L Shen, D M Eicher, M D Wewers, und J K Gill. 1990. „Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes.“ *Journal of Experimental Medicine* 171 (4): 1333–45. <https://doi.org/10.1084/jem.171.4.1333>.
- „Antibody Therapeutics Approved or in Regulatory Review in the EU or US“. o. J. The Antibody Society. Zugegriffen 14. März 2024. <https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>.
- Baba, Miyako, Masahiro Inoue, Kazuyuki Itoh, und Yasuko Nishizawa. 2008. „Blocking CD147 Induces Cell Death in Cancer Cells through Impairment of Glycolytic Energy Metabolism“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 374 (1): 111–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.122>.
- Bajaj, M., M. D. Waterfield, J. Schlessinger, W. R. Taylor, und T. Blundell. 1987. „On the Tertiary Structure of the Extracellular Domains of the Epidermal Growth Factor and Insulin Receptors“. *Biochimica Et Biophysica Acta* 916 (2): 220–26. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(87\)90112-9](https://doi.org/10.1016/0167-4838(87)90112-9).
- Bakema, Jantine E., Annie Bakker, Simone de Haij, Henk Honing, Madelon Bracke, Leo Koenderman, Gestur Vidarsson, Jan G. J. van de Winkel, und Jeanette H. W. Leusen. 2008. „Inside-Out Regulation of FcαRI (CD89) Depends on PP2A“. *The Journal of Immunology* 181 (6): 4080–88. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.4080>.

- Bakema, Jantine E., Sonja H. Ganzevles, Donna M. Fluitsma, Marco W. Schilham, Robert H. J. Beelen, Thomas Valerius, Stefan Lohse, Martin J. Glennie, Jan Paul Medema, und Marjolein van Egmond. 2011. „Targeting Fc $\alpha$ R1 on Polymorphonuclear Cells Induces Tumor Cell Killing through Autophagy“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187 (2): 726–32. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002581>.
- Bardelli, Alberto, und Salvatore Siena. 2010. „Molecular Mechanisms of Resistance to Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer“. *Journal of Clinical Oncology* 28 (7): 1254–61. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.6116>.
- Barillari, Giovanni, Ombretta Melaiu, Marco Gargari, Silvia Pomella, Roberto Bei, und Vincenzo Campanella. 2022. „The Multiple Roles of CD147 in the Development and Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma: An Overview“. *International Journal of Molecular Sciences* 23 (15): 8336. <https://doi.org/10.3390/ijms23158336>.
- Basu, A, und U Sivaprasad. 2007. „Protein Kinase C $\epsilon$  Makes the Life and Death Decision“. *Cellular Signalling* 19 (8): 1633–42. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.04.008>.
- Behrens, Leonie M., Timo K. van den Berg, und Marjolein van Egmond. 2022. „Targeting the CD47-SIRP $\alpha$  Innate Immune Checkpoint to Potentiate Antibody Therapy in Cancer by Neutrophils“. *Cancers* 14 (14): 3366. <https://doi.org/10.3390/cancers14143366>.
- Behrens, Leonie M., Marjolein van Egmond, und Timo K. van den Berg. 2023. „Neutrophils as Immune Effector Cells in Antibody Therapy in Cancer“. *Immunological Reviews* 314 (1): 280–301. <https://doi.org/10.1111/imr.13159>.
- Bernhard, Muriel Charlotte, Anabel Zwick, Tobias Mohr, Gilles Gasparoni, Oybek Khalmurzaev, Vsevolod Borisovich Matveev, Philine Loertzer, u. a. 2021. „The HPV and P63 Status in Penile Cancer Are Linked with the Infiltration and Therapeutic Availability of Neutrophils“. *Molecular Cancer Therapeutics* 20 (2): 423–37. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0173>.
- Beyer, T., S. Lohse, S. Berger, M. Peipp, T. Valerius, und M. Dechant. 2009. „Serum-Free Production and Purification of Chimeric IgA Antibodies“. *Journal of Immunological Methods* 346 (1–2): 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.05.002>.
- Billing, Ola, Ylva Holmgren, Daniel Nosek, Håkan Hedman, und Oskar Hemmingsson. 2021. „LRIG1 Is a Conserved EGFR Regulator Involved in Melanoma Development, Survival and Treatment Resistance“. *Oncogene* 40 (21): 3707–18. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01808-3>.
- Bisi, Sara, Andrea Disanza, Chiara Malinverno, Emanuela Frittoli, Andrea Palamidessi, und Giorgio Scita. 2013. „Membrane and Actin Dynamics Interplay at Lamellipodia Leading Edge“. *Current Opinion in Cell Biology* 25 (5): 565–73. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.04.001>.
- Biswas, C., Y. Zhang, R. DeCastro, H. Guo, T. Nakamura, H. Kataoka, und K. Nabeshima. 1995. „The Human Tumor Cell-Derived Collagenase Stimulatory Factor (Renamed EMMPRIN) Is a Member of the Immunoglobulin Superfamily“. *Cancer Research* 55 (2): 434–39.
- Bogers, W. M., R. K. Stad, L. A. van Es, und M. R. Daha. 1991. „Immunoglobulin A: Interaction with Complement, Phagocytic Cells and Endothelial Cells“. *Complement and Inflammation* 8 (5–6): 347–58. <https://doi.org/10.1159/000463206>.
- Bonner, J. A., K. P. Raisch, H. Q. Trummell, F. Robert, R. F. Meredith, S. A. Spencer, D. J. Buchsbaum, u. a. 2000. „Enhanced Apoptosis with Combination C225/Radiation Treatment Serves as the Impetus for Clinical Investigation in Head and Neck Cancers“. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 18 (21 Suppl): 47S-53S.
- Bonner, James A., Ricard Mesia, Jordi Giralt, Amanda Psyrrri, Ulrich Keilholz, David I. Rosenthal, Frank Beier, Jeltje Schulten, und Jan B. Vermorken. 2017. „P16, HPV, and Cetuximab: What Is the Evidence?“ *The Oncologist* 22 (7): 811–22. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0433>.
- Boross, Peter, Stefan Lohse, Maaïke Nederend, Johannes Hendrik Marco Jansen, Geert van Tetering, Michael Dechant, Matthias Peipp, u. a. 2013. „IgA EGFR Antibodies Mediate Tumour Killing in Vivo“. *EMBO Molecular Medicine* 5 (8): 1213–26. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201929>.

- Borregaard, N. 1997. „Development of Neutrophil Granule Diversity“. *Annals of the New York Academy of Sciences* 832 (Dezember): 62–68. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb46237.x>.
- Borregaard, N., L. Kjeldsen, K. Rygaard, L. Bastholm, M. H. Nielsen, H. Sengeløv, O. W. Bjerrum, and A. H. Johnsen. 1992. „Stimulus-Dependent Secretion of Plasma Proteins from Human Neutrophils“. *The Journal of Clinical Investigation* 90 (1): 86–96. <https://doi.org/10.1172/JCI115860>.
- Borregaard, Niels, und Jack B. Cowland. 1997. „Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte“. *Blood* 89 (10): 3503–21. <https://doi.org/10.1182/blood.V89.10.3503>.
- Bossi, Paolo, Carlo Resteghini, Nicholas Paielli, Lisa Licitra, Silvana Pilotti, und Federica Perrone. 2016. „Prognostic and predictive value of EGFR in head and neck squamous cell carcinoma“. *Oncotarget* 7 (45): 74362–79. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11413>.
- Boucrot, Emmanuel, Antonio P. A. Ferreira, Leonardo Almeida-Souza, Sylvain Debard, Yvonne Vallis, Gillian Howard, Laetitia Bertot, Nathalie Sauvonnet, und Harvey T. McMahon. 2015. „Endophilin Marks and Controls a Clathrin-Independent Endocytic Pathway“. *Nature* 517 (7535): 460–65. <https://doi.org/10.1038/nature14067>.
- Bougatef, Faten, Cathy Quemener, Sabrina Kellouche, Benyoussef Naïmi, Marie-Pierre Podgorniak, Guy Millot, Eric E. Gabison, u. a. 2009. „EMMPRIN promotes angiogenesis through hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$ -mediated regulation of soluble VEGF isoforms and their receptor VEGFR-2“. *Blood* 114 (27): 5547–56. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-217380>.
- Bouti, Panagiota, Steven D. S. Webbers, Susanna C. Fagerholm, Ronen Alon, Markus Moser, Hanke L. Matlung, und Taco W. Kuijpers. 2021. „ $\beta$ 2 Integrin Signaling Cascade in Neutrophils: More Than a Single Function“. *Frontiers in Immunology* 11 (Februar): 619925. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.619925>.
- Bouti, Panagiota, Xi Wen Zhao, Paul J.J.H. Verkuijlen, Anton T.J. Tool, Michel van Houdt, Nezihe Köker, Mustafa Yavuz Köker, u. a. 2021. „Kindlin3-Dependent CD11b/CD18-Integrin Activation Is Required for Potentiation of Neutrophil Cytotoxicity by CD47–SIRP $\alpha$  Checkpoint Disruption“. *Cancer Immunology Research* 9 (2): 147–55. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-20-0491>.
- Bracke, M., J. W. Lammers, P. J. Coffey, und L. Koenderman. 2001. „Cytokine-Induced inside-out Activation of Fc $\alpha$ R (CD89) Is Mediated by a Single Serine Residue (S263) in the Intracellular Domain of the Receptor“. *Blood* 97 (11): 3478–83. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.11.3478>.
- Brandsma, Arianne M., Sina Bondza, Mitchell Evers, Rosanne Koutstaal, Maaïke Nederend, J. H. Marco Jansen, Thies Rösner, Thomas Valerius, Jeanette H. W. Leusen, und Toine ten Broeke. 2019. „Potent Fc Receptor Signaling by IgA Leads to Superior Killing of Cancer Cells by Neutrophils Compared to IgG“. *Frontiers in Immunology* 10 (April): 704. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00704>.
- Brandsma, Arianne M., Shamir R. Jacobino, Saskia Meyer, Toine ten Broeke, und Jeanette H. W. Leusen. 2015. „Fc Receptor Inside-out Signaling and Possible Impact on Antibody Therapy“. *Immunological Reviews* 268 (1): 74–87. <https://doi.org/10.1111/imr.12332>.
- Branzk, Nora, Aleksandra Lubojemska, Sarah E. Hardison, Qian Wang, Maximiliano G. Gutierrez, Gordon D. Brown, und Venizelos Papayannopoulos. 2014. „Neutrophils Sense Microbe Size and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps in Response to Large Pathogens“. *Nature Immunology* 15 (11): 1017–25. <https://doi.org/10.1038/ni.2987>.
- Breedveld, Annelot, und Marjolein van Egmond. 2019. „IgA and Fc $\alpha$ RI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities“. *Frontiers in Immunology* 10: 553. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00553>.
- Broeke, Toine ten, Henk Honing, Arianne M. Brandsma, Shamir Jacobino, Jantine E. Bakema, Deon Kanters, Jan A. M. van der Linden, Madelon Bracke, Leo Koenderman, und Jeanette H. W. Leusen. 2019. „Fc $\alpha$ RI Dynamics Are Regulated by GSK-3 and PKC $\zeta$  During Cytokine Mediated

- Inside-Out Signaling". *Frontiers in Immunology* 9 (Januar): 3191. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03191>.
- Bruhns, Pierre, und Friederike Jönsson. 2015. „Mouse and Human FcR Effector Functions". *Immunological Reviews* 268 (1): 25–51. <https://doi.org/10.1111/imr.12350>.
- Brunke, Christina, Stefan Lohse, Stefanie Derer, Matthias Peipp, Peter Boross, Christian Kellner, Thomas Beyer, u. a. 2013. „Effect of a Tail Piece Cysteine Deletion on Biochemical and Functional Properties of an Epidermal Growth Factor Receptor-Directed IgA2m(1) Antibody". *mAbs* 5 (6): 936–45. <https://doi.org/10.4161/mabs.26396>.
- Burgess, Antony W. 2008. „EGFR Family: Structure Physiology Signalling and Therapeutic Targets". *Growth Factors (Chur, Switzerland)* 26 (5): 263–74. <https://doi.org/10.1080/08977190802312844>.
- Burgess, Antony W., Hyun-Soo Cho, Charles Eigenbrot, Kathryn M. Ferguson, Thomas P. J. Garrett, Daniel J. Leahy, Mark A. Lemmon, Mark X. Sliwkowski, Colin W. Ward, und Shigeyuki Yokoyama. 2003. „An Open-and-Shut Case? Recent Insights into the Activation of EGF/ErbB Receptors". *Molecular Cell* 12 (3): 541–52. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00350-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00350-2).
- Burtness, Barbara, Kevin J. Harrington, Richard Greil, Denis Soulières, Makoto Tahara, Gilberto de Castro, Amanda Psyrri, u. a. 2019. „Pembrolizumab Alone or with Chemotherapy versus Cetuximab with Chemotherapy for Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (KEYNOTE-048): A Randomised, Open-Label, Phase 3 Study". *The Lancet* 394 (10212): 1915–28. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32591-7).
- Busso-Lopes, Ariane F., Leandro X. Neves, Guilherme A. Câmara, Daniela C. Granato, Marco Antônio M. Pretti, Henry Heberle, Fábio M. S. Patroni, u. a. 2022. „Connecting Multiple Microenvironment Proteomes Uncovers the Biology in Head and Neck Cancer". *Nature Communications* 13 (1): 6725. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34407-1>.
- Butin-Israeli, Veronika, Triet M. Bui, Hannah L. Wiesolek, Lorraine Mascarenhas, Joseph J. Lee, Lindsey C. Mehl, Kaitlyn R. Knutson, u. a. 2019. „Neutrophil-Induced Genomic Instability Impedes Resolution of Inflammation and Wound Healing". *The Journal of Clinical Investigation* 129 (2): 712–26. <https://doi.org/10.1172/JCI122085>.
- Caldieri, Giusi, Elisa Barbieri, Gilda Nappo, Andrea Raimondi, Massimo Bonora, Alexia Conte, Lisette G. G. C. Verhoef, u. a. 2017. „Reticulon 3-Dependent ER-PM Contact Sites Control EGFR Nonclathrin Endocytosis". *Science (New York, N.Y.)* 356 (6338): 617–24. <https://doi.org/10.1126/science.aah6152>.
- Calero, M, J Escribano, Anders Grubb, und E Méndez. 1994. „Location of a novel type of interpolypeptide chain linkage in the human protein HC-IgA complex (HC-IgA) and identification of a heterogeneous chromophore associated with the complex". *Journal of Biological Chemistry* 269 (1): 384–89.
- Cancer Genome Atlas Network. 2015. „Comprehensive Genomic Characterization of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas". *Nature* 517 (7536): 576–82. <https://doi.org/10.1038/nature14129>.
- Cantrell, D.A. 2001. „Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways". *Journal of Cell Science* 114 (8): 1439–45. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.8.1439>.
- Carayannopoulos, L., J. M. Hexham, und J. D. Capra. 1996. „Localization of the Binding Site for the Monocyte Immunoglobulin (Ig) A-Fc Receptor (CD89) to the Domain Boundary between Calpha2 and Calpha3 in Human IgA1". *The Journal of Experimental Medicine* 183 (4): 1579–86. <https://doi.org/10.1084/jem.183.4.1579>.
- Carthon, Bradley C., Chaan S. Ng, Curtis A. Pettaway, und Lance C. Pagliaro. 2014. „Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Therapy in Locally Advanced or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Penis". *BJU international* 113 (6): 871–77. <https://doi.org/10.1111/bju.12450>.
- Chahoud, Jad, Frederico O. Gleber-Netto, Barrett Z. McCormick, Priya Rao, Xin Lu, Ming Guo, Margaret B. Morgan, u. a. 2021. „Whole-Exome Sequencing in Penile Squamous Cell Carcinoma Uncovers Novel Prognostic Categorization and Drug Targets Similar to Head and Neck Squamous Cell Carcinoma". *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the*

- American Association for Cancer Research* 27 (9): 2560–70. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-4004>.
- Chang, Yun, Xuechao Cai, Ramizah Syahirah, Yuxing Yao, Yang Xu, Gyuhung Jin, Vijesh J. Bhute, u. a. 2023. „CAR-Neutrophil Mediated Delivery of Tumor-Microenvironment Responsive Nanodrugs for Glioblastoma Chemo-Immunotherapy“. *Nature Communications* 14 (1): 2266. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37872-4>.
- Chang, Yun, Ramizah Syahirah, Xuepeng Wang, Gyuhung Jin, Sandra Torregrosa-Allen, Bennett D. Elzey, Sydney N. Hummel, u. a. 2022. „Engineering Chimeric Antigen Receptor Neutrophils from Human Pluripotent Stem Cells for Targeted Cancer Immunotherapy“. *Cell Reports* 40 (3): 111128. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111128>.
- Chaux, Alcides, Enrico Munari, Betina Katz, Rajni Sharma, Kristen Lecksell, Antonio L. Cubilla, Arthur L. Burnett, und George J. Netto. 2013. „The Epidermal Growth Factor Receptor Is Frequently Overexpressed in Penile Squamous Cell Carcinomas: A Tissue Microarray and Digital Image Analysis Study of 112 Cases“. *Human Pathology* 44 (12): 2690–95. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.07.012>.
- Chen, Zhi-Nan, Li Mi, Jing Xu, Fei Song, Qing Zhang, Zheng Zhang, Jin-Liang Xing, u. a. 2006. „Targeting Radioimmunotherapy of Hepatocellular Carcinoma with Iodine (131I) Metuximab Injection: Clinical Phase I/II Trials“. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 65 (2): 435–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2005.12.034>.
- Chiasson-MacKenzie, Christine, und Andrea I. McClatchey. 2018. „Cell–Cell Contact and Receptor Tyrosine Kinase Signaling“. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (6): a029215. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029215>.
- Childers, Noel K., Maureen G. Bruce, und Jerry R. McGhee. 1989. „Molecular mechanisms of immunoglobulin a defense“. *Annual Review of Microbiology* 43 (1): 503–36. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.43.100189.002443>.
- Comen, Elizabeth, Paulina Wojnarowicz, Venkatraman E. Seshan, Riddhi Shah, Courtney Coker, Larry Norton, und Robert Benezra. 2016. „TNF Is a Key Cytokine Mediating Neutrophil Cytotoxic Activity in Breast Cancer Patients“. *Npj Breast Cancer* 2 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2016.9>.
- Conley, Mary Ellen, und Dominique L. Delacroix. 1987. „Intravascular and Mucosal Immunoglobulin A: Two Separate but Related Systems of Immune Defense?“ *Annals of Internal Medicine* 106 (6): 892–99. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-106-6-892>.
- Conrad, Daniel H., Coles M. Squire, William C. Bartlett, und Steven E. Dierks. 1991. „Fcε Receptors“. *Current Opinion in Immunology* 3 (6): 859–64. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(05\)80004-4](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(05)80004-4).
- Cui, Hong-Yong, Tao Guo, Shi-Jie Wang, Pu Zhao, Zhi-Shou Dong, Yang Zhang, Jian-Li Jiang, Zhi-Nan Chen, und Xiao-Ling Yu. 2012. „Dimerization Is Essential for HAb18G/CD147 Promoting Tumor Invasion via MAPK Pathway“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 419 (3): 517–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.049>.
- Cunningham, David, Yves Humblet, Salvatore Siena, David Khayat, Harry Bleiberg, Armando Santoro, Danny Bets, u. a. 2004. „Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer“. *New England Journal of Medicine* 351 (4): 337–45. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa033025>.
- Daëron, M., S. Latour, O. Malbec, E. Espinosa, P. Pina, S. Pasmans, und W. H. Fridman. 1995. „The Same Tyrosine-Based Inhibition Motif, in the Intracytoplasmic Domain of Fc Gamma RIIb, Regulates Negatively BCR-, TCR-, and FcR-Dependent Cell Activation“. *Immunity* 3 (5): 635–46. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90134-5](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90134-5).
- Dale, David C., Laurence Boxer, und W. Conrad Liles. 2008. „The phagocytes: neutrophils and monocytes“. *Blood* 112 (4): 935–45. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-077917>.
- Dancey, J T, K A Deubelbeiss, L A Harker, und C A Finch. 1976. „Neutrophil kinetics in man.“ *Journal of Clinical Investigation* 58 (3): 705–15.

- Davies, D. R., E. A. Padlan, und D. M. Segal. 1975. „Three-Dimensional Structure of Immunoglobulins“. *Annual Review of Biochemistry* 44: 639–67. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.44.070175.003231>.
- Dechant, Michael, Thomas Beyer, Tanja Schneider-Merck, Wencke Weisner, Matthias Peipp, Jan G. J. van de Winkel, und Thomas Valerius. 2007. „Effector Mechanisms of Recombinant IgA Antibodies against Epidermal Growth Factor Receptor“. *The Journal of Immunology* 179 (5): 2936–43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.2936>.
- Delacroix, D L, C Dive, J C Rambaud, und J P Vaerman. 1982. „IgA subclasses in various secretions and in serum.“ *Immunology* 47 (2): 383–85.
- Delyon, Julie, Farah Khayati, Ibtissem Djaafri, Marie-Pierre Podgorniak, Aurélie Sadoux, Niclas Setterblad, Zineb Boutalbi, u. a. 2015. „EMMPRIN Regulates B1 Integrin-Mediated Adhesion through Kindlin-3 in Human Melanoma Cells“. *Experimental Dermatology* 24 (6): 443–48. <https://doi.org/10.1111/exd.12693>.
- Derer, Stefanie, Philip Bauer, Stefan Lohse, Andreas H. Scheel, Sven Berger, Christian Kellner, Matthias Peipp, und Thomas Valerius. 2012. „Impact of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Cell Surface Expression Levels on Effector Mechanisms of EGFR Antibodies“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 189 (11): 5230–39. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202037>.
- Deryugina, Elena I., Ewa Zajac, Anna Juncker-Jensen, Tatyana A. Kupriyanova, Lisa Welter, und James P. Quigley. 2014. „Tissue-Infiltrating Neutrophils Constitute the Major In Vivo Source of Angiogenesis-Inducing MMP-9 in the Tumor Microenvironment“. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 16 (10): 771–88. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.08.013>.
- Desjarlais, John R., Greg A. Lazar, Eugene A. Zhukovsky, und Seung Y. Chu. 2007. „Optimizing Engagement of the Immune System by Anti-Tumor Antibodies: An Engineer’s Perspective“. *Drug Discovery Today* 12 (21–22): 898–910. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.08.009>.
- Dhodapkar, Kavita M., Joseph Krasovsky, Barbara Williamson, und Madhav V. Dhodapkar. 2002. „Antitumor Monoclonal Antibodies Enhance Cross-Presentation of Cellular Antigens and the Generation of Myeloma-Specific Killer T Cells by Dendritic Cells“. *The Journal of Experimental Medicine* 195 (1): 125–33. <https://doi.org/10.1084/jem.20011097>.
- Di Carlo, Emma, Guido Forni, PierLuigi Lollini, Mario P. Colombo, Andrea Modesti, und Piero Musiani. 2001. „The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions“. *Blood* 97 (2): 339–45. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.2.339>.
- Dissemond, Joachim, Tatjana K. Weimann, Lars A. Schneider, Achim Schneeberger, Karin Scharffetter-Kochanek, Manfred Goos, und Stephan N. Wagner. 2003. „Activated Neutrophils Exert Antitumor Activity Against Human Melanoma Cells: Reactive Oxygen Species-Induced Mechanisms and Their Modulation by Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor“. *Journal of Investigative Dermatology* 121 (4): 936–38. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12475.x>.
- Dubois, Eline A., und Adam F. Cohen. 2009. „Panitumumab“. *British Journal of Clinical Pharmacology* 68 (4): 482–83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2009.03492.x>.
- Dumitru, Claudia A., Stephan Lang, und Sven Brandau. 2013. „Modulation of Neutrophil Granulocytes in the Tumor Microenvironment: Mechanisms and Consequences for Tumor Progression“. *Seminars in Cancer Biology* 23 (3): 141–48. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.02.005>.
- Dupré-Crochet, Sophie, Marie Erard, und Oliver Nüße. 2013. „ROS Production in Phagocytes: Why, When, and Where?“ *Journal of Leukocyte Biology* 94 (4): 657–70. <https://doi.org/10.1189/jlb.1012544>.
- Dustin, Michael L. 2014. „The Immunological Synapse“. *Cancer Immunology Research* 2 (11): 1023–33. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0161>.
- Egawa, Nagayasu, Naohiko Koshikawa, Taizo Tomari, Kazuki Nabeshima, Toshiaki Isobe, und Motoharu Seiki. 2006. „Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP/MMP-14) Cleaves and Releases a 22-kDa Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN)

- Fragment from Tumor Cells \*". *Journal of Biological Chemistry* 281 (49): 37576–85.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M606993200>.
- Egesten, Arne, Janine Breton-Gorius, Josette Guichard, Urban Gullberg, und Inge Olsson. 1994. „The Heterogeneity of Azurophil Granules in Neutrophil Promyelocytes: Immunogold Localization of Myeloperoxidase, Cathepsin G, Elastase, Proteinase 3, and Bactericidal/Permeability Increasing Protein“. *Blood* 83 (10): 2985–94.  
<https://doi.org/10.1182/blood.V83.10.2985.2985>.
- Egmond, M. van, E. van Garderen, A. B. van Spriel, C. A. Damen, E. S. van Amersfoort, G. van Zandbergen, J. van Hattum, J. Kuiper, und J. G. van de Winkel. 2000. „FcalphaRI-Positive Liver Kupffer Cells: Reappraisal of the Function of Immunoglobulin A in Immunity“. *Nature Medicine* 6 (6): 680–85. <https://doi.org/10.1038/76261>.
- Egmond, M. van, A. B. van Spriel, H. Vermeulen, G. Huls, E. van Garderen, und J. G. van de Winkel. 2001. „Enhancement of Polymorphonuclear Cell-Mediated Tumor Cell Killing on Simultaneous Engagement of fcgammaRI (CD64) and fcalphaRI (CD89)“. *Cancer Research* 61 (10): 4055–60.
- Ekman, Anna-Karin, und Lars Olaf Cardell. 2010. „The Expression and Function of Nod-like Receptors in Neutrophils“. *Immunology* 130 (1): 55–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03212.x>.
- El-Benna, Jamel, Margarita Hurtado-Nedelec, Viviana Marzaioli, Jean-Claude Marie, Marie-Anne Gougerot-Pocidalo, und Pham My-Chan Dang. 2016. „Priming of the Neutrophil Respiratory Burst: Role in Host Defense and Inflammation“. *Immunological Reviews* 273 (1): 180–93.  
<https://doi.org/10.1111/imr.12447>.
- EMA. 2018a. „Erbitux“. Text. European Medicines Agency. 17. September 2018.  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/erbitux>.
- . 2018b. „Vectibix“. Text. European Medicines Agency. 17. September 2018.  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vectibix>.
- Feinstein, D., und E. C. Franklin. 1966. „Two Antigenically Distinguishable Subclasses of Human A Myeloma Proteins Differing in Their Heavy Chains“. *Nature* 212 (5069): 1496–98.  
<https://doi.org/10.1038/2121496a0>.
- Ferguson, Kathryn M., Mitchell B. Berger, Jeannine M. Mendrola, Hyun Soo Cho, Daniel J. Leahy, und Mark A. Lemmon. 2003. „EGF Activates Its Receptor by Removing Interactions That Autoinhibit Ectodomain Dimerization“. *Molecular Cell* 11 (2): 507–17.  
[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00047-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00047-9).
- Floch, Renaud Le, Johanna Chiche, Ibtissam Marchiq, Tanesha Naiken, Karine Ilc, Clare M. Murray, Susan E. Critchlow, Danièle Roux, Marie-Pierre Simon, und Jacques Pouyssegur. 2011. „CD147 Subunit of Lactate/H<sup>+</sup> Symporters MCT1 and Hypoxia-Inducible MCT4 Is Critical for Energetics and Growth of Glycolytic Tumors“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (40): 16663–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106123108>.
- Frangione, B., und C. Wolfenstein-Todel. 1972. „Partial Duplication in the ‚Hinge‘ Region of IgA 1 Myeloma Proteins“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (12): 3673–76. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.12.3673>.
- Fu, Zhi-guang, Li Wang, Hong-yong Cui, Jian-long Peng, Shi-jie Wang, Jie-jie Geng, Ji-de Liu, u. a. 2016. „A Novel Small-Molecule Compound Targeting CD147 Inhibits the Motility and Invasion of Hepatocellular Carcinoma Cells“. *Oncotarget* 7 (8): 9429–47.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.6990>.
- Fuchs, Tobias A., Ulrike Abed, Christian Goosmann, Robert Hurwitz, Ilka Schulze, Volker Wahn, Yvette Weinrauch, Volker Brinkmann, und Arturo Zychlinsky. 2007. „Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps“. *The Journal of Cell Biology* 176 (2): 231–41.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>.
- Fujiyama, Y., K. Kobayashi, S. Senda, Y. Benno, T. Bamba, und S. Hosoda. 1985. „A Novel IgA Protease from Clostridium Sp. Capable of Cleaving IgA1 and IgA2 A2m(1) but Not IgA2 A2m(2) Allotype Paraproteins“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 134 (1): 573–76.

- Galdiero, Maria Rosaria, Eduardo Bonavita, Isabella Barajon, Cecilia Garlanda, Alberto Mantovani, und Sébastien Jaillon. 2013. „Tumor Associated Macrophages and Neutrophils in Cancer“. *Immunobiology* 218 (11): 1402–10. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.06.003>.
- Gao, Jing, Ye Wang, Mingjun Cai, Yangang Pan, Haijiao Xu, Junguang Jiang, Hongbin Ji, und Hongda Wang. 2015. „Mechanistic Insights into EGFR Membrane Clustering Revealed by Super-Resolution Imaging“. *Nanoscale* 7 (6): 2511–19. <https://doi.org/10.1039/c4nr04962d>.
- Geissmann, Frédéric, Pierre Launay, Benoit Pasquier, Yves Lepelletier, Michelle Leborgne, Agnès Lehen, Nicole Brousse, und Renato C. Monteiro. 2001. „A Subset of Human Dendritic Cells Expresses IgA Fc Receptor (CD89), Which Mediates Internalization and Activation Upon Cross-Linking by IgA Complexes“. *The Journal of Immunology* 166 (1): 346–52. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.346>.
- Glamann, Joakim, und Anker Jon Hansen. 2006. „Dynamic Detection of Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity and Cell Adhesion by Electrical Impedance Measurements“. *Assay and Drug Development Technologies* 4 (5): 555–63. <https://doi.org/10.1089/adt.2006.4.555>.
- Goh, Lai Kuan, Fangtian Huang, Woong Kim, Steven Gygi, und Alexander Sorkin. 2010. „Multiple Mechanisms Collectively Regulate Clathrin-Mediated Endocytosis of the Epidermal Growth Factor Receptor“. *The Journal of Cell Biology* 189 (5): 871–83. <https://doi.org/10.1083/jcb.201001008>.
- Golay, Josée, Fabio Da Roit, Luca Bologna, Claudia Ferrara, Jeanette H. Leusen, Alessandro Rambaldi, Christian Klein, und Martino Introna. 2013. „Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab“. *Blood* 122 (20): 3482–91. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-504043>.
- Golay, Josée, Rut Valgardsdottir, Gerta Musaraj, Damiano Giupponi, Orietta Spinelli, und Martino Introna. 2019. „Human neutrophils express low levels of FcγRIIIA, which plays a role in PMN activation“. *Blood* 133 (13): 1395–1405. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-07-864538>.
- Gou, Hong-Feng, Xiang Li, Meng Qiu, Ke Cheng, Long-Hao Li, Hang Dong, Ye Chen, u. a. 2013. „Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-RAS Signaling Pathway in Penile Squamous Cell Carcinoma“. *PLOS ONE* 8 (4): e62175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062175>.
- Governa, Valeria, Emanuele Trella, Valentina Mele, Luigi Tornillo, Francesca Amicarella, Eleonora Cremonesi, Manuele Giuseppe Muraro, u. a. 2017. „The Interplay Between Neutrophils and CD8+ T Cells Improves Survival in Human Colorectal Cancer“. *Clinical Cancer Research* 23 (14): 3847–58. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2047>.
- Grandis, Jennifer Rubin, und David J. Tweardy. 1993. „Elevated Levels of Transforming Growth Factor  $\alpha$  and Epidermal Growth Factor Receptor Messenger RNA Are Early Markers of Carcinogenesis in Head and Neck Cancer“. *Cancer Research* 53 (15): 3579–84.
- Greenberg, Steven, und Sergio Grinstein. 2002. „Phagocytosis and Innate Immunity“. *Current Opinion in Immunology* 14 (1): 136–45. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(01\)00309-0](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(01)00309-0).
- Gulle, Heinz, Aysen Samstag, Martha M. Eibl, und Hermann M. Wolf. 1998. „Physical and Functional Association of Fc $\alpha$ R With Protein Tyrosine Kinase Lyn“. *Blood* 91 (2): 383–91. <https://doi.org/10.1182/blood.V91.2.383>.
- Güngör, Nejla, Ad M. Knaapen, Armelle Munnia, Marco Peluso, Guido R. Haenen, Roland K. Chiu, Roger W. L. Godschalk, und Frederik J. van Schooten. 2010. „Genotoxic Effects of Neutrophils and Hypochlorous Acid“. *Mutagenesis* 25 (2): 149–54. <https://doi.org/10.1093/mutage/geb053>.
- Gur, Gal, Chanan Rubin, Menachem Katz, Ido Amit, Ami Citri, Jonas Nilsson, Ninette Amariglio, u. a. 2004. „LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation“. *The EMBO Journal* 23 (16): 3270–81. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600342>.
- Hafkamp, Harriet C., Ernst J. M. Speel, Annick Haesevoets, Fredrik J. Bot, Winand N. M. Dinjens, Frans C. S. Ramaekers, Anton H. N. Hopman, und Johannes J. Manni. 2003. „A Subset of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Exhibits Integration of HPV 16/18 DNA and Overexpression of p16INK4A and P53 in the Absence of Mutations in P53 Exons 5-8“. *International Journal of Cancer* 107 (3): 394–400. <https://doi.org/10.1002/ijc.11389>.

- Han, Zhao-dong, Hui-chan He, Xue-cheng Bi, Wei-jun Qin, Qi-shan Dai, Jun Zou, Yong-kang Ye, u. a. 2010. „Expression and Clinical Significance of CD147 in Genitourinary Carcinomas“. *The Journal of Surgical Research* 160 (2): 260–67. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.11.838>.
- Hansen, Ivo S., Willianne Hoepel, Sebastiaan A. J. Zaat, Dominique L. P. Baeten, und Jeroen den Dunnen. 2017. „Serum IgA Immune Complexes Promote Proinflammatory Cytokine Production by Human Macrophages, Monocytes, and Kupffer Cells through Fc $\alpha$ RI-TLR Cross-Talk“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 199 (12): 4124–31. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700883>.
- Hansen, Ivo S., Lisette Krabbendam, Jochem H. Bernink, Fabricio Loayza-Puch, Willianne Hoepel, Johan A. van Burgsteden, Elsa C. Kuijper, u. a. 2018. „Fc $\alpha$ RI Co-Stimulation Converts Human Intestinal CD103+ Dendritic Cells into pro-Inflammatory Cells through Glycolytic Reprogramming“. *Nature Communications* 9 (1): 863. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03318-5>.
- Harris, Raymond C., Eunkyung Chung, und Robert J. Coffey. 2003. „EGF Receptor Ligands“. *Experimental Cell Research* 284 (1): 2–13. [https://doi.org/10.1016/s0014-4827\(02\)00105-2](https://doi.org/10.1016/s0014-4827(02)00105-2).
- Hashibe, Mia, Paul Brennan, Shu-Chun Chuang, Stefania Boccia, Xavier Castellsague, Chu Chen, Maria Paula Curado, u. a. 2009. „Interaction between Tobacco and Alcohol Use and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium“. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18 (2): 541–50. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0347>.
- Hattar, Katja, Katharina Franz, Michael Ludwig, Ulf Sibelius, Jochen Wilhelm, Jürgen Lohmeyer, Rajkumar Savai, u. a. 2014. „Interactions between Neutrophils and Non-Small Cell Lung Cancer Cells: Enhancement of Tumor Proliferation and Inflammatory Mediator Synthesis“. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 63 (12): 1297–1306. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1606-z>.
- Hayashi, Fumitaka, Terry K. Means, und Andrew D. Luster. 2003. „Toll-like Receptors Stimulate Human Neutrophil Function“. *Blood* 102 (7): 2660–69. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1078>.
- Heemskerk, Niels, Mandy Gruijs, A. Robin Temming, Marieke H. Heineke, Dennis Y. Gout, Tessa Hellingman, Cornelis W. Tuk, u. a. 2021. „Augmented Antibody-Based Anticancer Therapeutics Boost Neutrophil Cytotoxicity“. *The Journal of Clinical Investigation* 131 (6): e134680, 134680. <https://doi.org/10.1172/JCI134680>.
- Heineke, Marieke H., und Marjolein van Egmond. 2017. „Immunoglobulin A: Magic Bullet or Trojan Horse?“ *European Journal of Clinical Investigation* 47 (2): 184–92. <https://doi.org/10.1111/eci.12716>.
- Heinzmann, David, Moritz Noethel, Saskia V. Ungern-Sternberg, Ioannis Mitroulis, Meinrad Gawaz, Triantafyllos Chavakis, Andreas E. May, und Peter Seizer. 2020. „CD147 Is a Novel Interaction Partner of Integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2 Mediating Leukocyte and Platelet Adhesion“. *Biomolecules* 10 (4): E541. <https://doi.org/10.3390/biom10040541>.
- Herr, Andrew B. 2020. „Secret(ory) revealed: the long-awaited structures of secretory IgA“. *Cell Research* 30 (7): 558–59. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0351-4>.
- Herr, Andrew B., Edward R Ballister, und Pamela J Bjorkman. 2003. „Insights into IgA-Mediated Immune Responses from the Crystal Structures of Human Fc $\alpha$ RI and Its Complex with IgA1-Fc“ 423: 7.
- Hijaze, Nizar, Max Ledersnaider, Elina Simanovich, Sameer Kassem, und Michal A. Rahat. 2021. „Inducing regulated necrosis and shifting macrophage polarization with anti-EMMPRIN antibody (161-pAb) and complement factors“. *Journal of Leukocyte Biology* 110 (2): 343–56. <https://doi.org/10.1002/JLB.3A0520-333R>.
- Hirz, Taghreed, Eva-Laure Matera, Kamel Chettab, Lars Petter Jordheim, Doriane Mathé, Anne Evesque, Justine Esmenjaud, Gilles Salles, und Charles Dumontet. 2017. „Neutrophils Protect Lymphoma Cells against Cytotoxic and Targeted Therapies through CD11b/ICAM-1 Binding“. *Oncotarget* 8 (42): 72818–34. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20350>.

- Hölters, Sebastian, Oybek Khalmurzaev, Alexey Pryalukhin, Philine Loertzer, Martin Janssen, Julia Heinzlbecker, Stefan Ueberdiek, u. a. 2019. „Challenging the Prognostic Impact of the New WHO and TNM Classifications with Special Emphasis on HPV Status in Penile Carcinoma“. *Virchows Archiv* 475 (2): 211–21. <https://doi.org/10.1007/s00428-019-02566-0>.
- Hu, Jinsong, Nana Dang, Hui Yao, Yu Li, Hongxin Zhang, Xiangmin Yang, Jing Xu, u. a. 2010. „Involvement of HAb18G/CD147 in T Cell Activation and Immunological Synapse Formation“. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14 (8): 2132–43. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01012.x>.
- Hu, Yanping, Michael J. Turner, Jacqueline Shields, Matthew S. Gale, Elizabeth Hutto, Bruce L. Roberts, William M. Siders, und Johanne M. Kaplan. 2009. „Investigation of the Mechanism of Action of Alemtuzumab in a Human CD52 Transgenic Mouse Model“. *Immunology* 128 (2): 260–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03115.x>.
- Huhe, Muren, Jiaxin Lou, Yumeng Zhu, Yu Zhao, Ying Shi, Bo Wang, Xiuxuan Sun, Xiaoqin Zhang, Yang Zhang, und Zhi-Nan Chen. 2019. „A Novel Antibody-Drug Conjugate, HcHAb18-DM1, Has Potent Anti-Tumor Activity against Human Non-Small Cell Lung Cancer“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 513 (4): 1083–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.046>.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, und P. M. Howley. 1993. „Localization of the E6-AP Regions That Direct Human Papillomavirus E6 Binding, Association with P53, and Ubiquitination of Associated Proteins“. *Molecular and Cellular Biology* 13 (8): 4918–27. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.8.4918-4927.1993>.
- Ilahi, Naureen Ehsan, und Attya Bhatti. 2020. „Impact of HPV E5 on Viral Life Cycle via EGFR Signaling“. *Microbial Pathogenesis* 139 (Februar): 103923. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103923>.
- Jaillon, Sebastien, Andrea Ponzetta, Diletta Di Mitri, Angela Santoni, Raffaella Bonecchi, und Alberto Mantovani. 2020. „Neutrophil Diversity and Plasticity in Tumour Progression and Therapy“. *Nature Reviews Cancer* 20 (9): 485–503. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0281-y>.
- Jensen, Hanne Krogh, Frede Donskov, Niels Marcussen, Marianne Nordmark, Finn Lundbeck, und Hans von der Maase. 2009. „Presence of Intratumoral Neutrophils Is an Independent Prognostic Factor in Localized Renal Cell Carcinoma“. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (28): 4709–17. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.9498>.
- Jeong, Danielle, Daniela Lozano Casasbuenas, Archana Gengatharan, Kyshona Edwards, Armen Saghatelyan, David R. Kaplan, Freda D. Miller, und Scott A. Yuzwa. 2020. „LRIG1-Mediated Inhibition of EGF Receptor Signaling Regulates Neural Precursor Cell Proliferation in the Neocortex“. *Cell Reports* 33 (2). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108257>.
- Jiang, Xuejun, Fangtian Huang, Andriy Marusyk, und Alexander Sorkin. 2003. „Grb2 Regulates Internalization of EGF Receptors through Clathrin-Coated Pits“. *Molecular Biology of the Cell* 14 (3): 858–70. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-08-0532>.
- Johansson, A., A. J. Jesaitis, H. Lundqvist, K. E. Magnusson, C. Sjölin, A. Karlsson, und C. Dahlgren. 1995. „Different Subcellular Localization of Cytochrome b and the Dormant NADPH-Oxidase in Neutrophils and Macrophages: Effect on the Production of Reactive Oxygen Species during Phagocytosis“. *Cellular Immunology* 161 (1): 61–71. <https://doi.org/10.1006/cimm.1995.1009>.
- Joshi, Vidhu B., Philippe E. Spiess, Andrea Necchi, Curtis A. Pettaway, und Jad Chahoud. 2022. „Immune-Based Therapies in Penile Cancer“. *Nature Reviews Urology* 19 (8): 457–74. <https://doi.org/10.1038/s41585-022-00617-x>.
- Ju, Xing-Zhu, Jin-Ming Yang, Xiao-Yan Zhou, Zi-Ting Li, und Xiao-Hua Wu. 2008. „EMMPRIN Expression as a Prognostic Factor in Radiotherapy of Cervical Cancer“. *Clinical Cancer Research* 14 (2): 494–501. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1072>.
- Kadlecova, Zuzana, Stephanie J. Spielman, Dinah Loerke, Aparna Mohanakrishnan, Dana Kim Reed, und Sandra L. Schmid. 2017. „Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis by Hierarchical

- Allosteric Activation of AP2". *The Journal of Cell Biology* 216 (1): 167–79.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.201608071>.
- Kanekura, Takuro, Xiang Chen, und Tamotsu Kanzaki. 2002. „Basigin (Cd147) Is Expressed on Melanoma Cells and Induces Tumor Cell Invasion by Stimulating Production of Matrix Metalloproteinases by Fibroblasts". *International Journal of Cancer* 99 (4): 520–28.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.10390>.
- Karlsson, Anna, und Claes Dahlgren. 2002. „Assembly and Activation of the Neutrophil NADPH Oxidase in Granule Membranes". *Antioxidants & Redox Signaling* 4 (1): 49–60.  
<https://doi.org/10.1089/152308602753625852>.
- Kataoka, H., R. DeCastro, S. Zucker, und C. Biswas. 1993. „Tumor Cell-Derived Collagenase-Stimulatory Factor Increases Expression of Interstitial Collagenase, Stromelysin, and 72-kDa Gelatinase". *Cancer Research* 53 (13): 3154–58.
- Kellner, C., W. K. Bleeker, J. J. Lammerts van Bueren, M. Staudinger, K. Klausz, S. Derer, P. Glorius, u. a. 2011. „Human Kappa Light Chain Targeted Pseudomonas Exotoxin A—Identifying Human Antibodies and Fab Fragments with Favorable Characteristics for Antibody-Drug Conjugate Development". *Journal of Immunological Methods* 371 (1–2): 122–33.  
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.06.023>.
- Kennedy, Adam D., Janet A. Willment, David W. Dorward, David L. Williams, Gordon D. Brown, und Frank R. DeLeo. 2007. „Dectin-1 Promotes Fungicidal Activity of Human Neutrophils". *European Journal of Immunology* 37 (2): 467–78. <https://doi.org/10.1002/eji.200636653>.
- Kidd, Laura C., Sharon Chaing, Juan Chipollini, Anna R. Giuliano, Philippe E. Spiess, und Pranav Sharma. 2017. „Relationship between human papillomavirus and penile cancer—implications for prevention and treatment". *Translational Andrology and Urology* 6 (5): 791–802.  
<https://doi.org/10.21037/tau.2017.06.27>.
- Kirk, P., M. C. Wilson, C. Heddle, M. H. Brown, A. N. Barclay, und A. P. Halestrap. 2000. „CD147 Is Tightly Associated with Lactate Transporters MCT1 and MCT4 and Facilitates Their Cell Surface Expression". *The EMBO Journal* 19 (15): 3896–3904.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/19.15.3896>.
- Kjeldsen, L., H. Sengeløv, K. Lollike, M. H. Nielsen, und N. Borregaard. 1994. „Isolation and Characterization of Gelatinase Granules from Human Neutrophils". *Blood* 83 (6): 1640–49.
- Klingelutz, Aloysius J., Scott A. Foster, und James K. McDougall. 1996. „Telomerase Activation by the E6 Gene Product of Human Papillomavirus Type 16". *Nature* 380 (6569): 79–82.  
<https://doi.org/10.1038/380079a0>.
- Knutti, Nadine, Michael Kuepper, und Karlheinz Friedrich. 2015. „Soluble Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN, EMN) Regulates Cancer-Related Cellular Functions by Homotypic Interactions with Surface CD147". *The FEBS Journal* 282 (21): 4187–4200.  
<https://doi.org/10.1111/febs.13414>.
- Koga, Yuhki, Akinobu Matsuzaki, Aiko Suminoe, Hiroyoshi Hattori, und Toshiro Hara. 2004. „Neutrophil-Derived TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL): A Novel Mechanism of Antitumor Effect by Neutrophils". *Cancer Research* 64 (3): 1037–43.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-1808>.
- Kolk, L. E. van der, M. de Haas, A. J. Grillo-López, J. W. Baars, und M. H. J. van Oers. 2002. „Analysis of CD20-Dependent Cellular Cytotoxicity by G-CSF-Stimulated Neutrophils". *Leukemia* 16 (4): 693–99. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402424>.
- Koshland, M. E. 1975. „Structure and Function of the J Chain". *Advances in Immunology* 20: 41–69.  
[https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60206-0](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60206-0).
- Kourtzelis, Ioannis, Ioannis Mitroulis, Janusz von Renesse, George Hajishengallis, und Triantafyllos Chavakis. 2017. „From leukocyte recruitment to resolution of inflammation: the cardinal role of integrins". *Journal of Leukocyte Biology* 102 (3): 677–83.  
<https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0117-024R>.
- Kovacs, Erika, Rahul Das, Qi Wang, Timothy S. Collier, Aaron Cantor, Yongjian Huang, Kathryn Wong, u. a. 2015. „Analysis of the Role of the C-Terminal Tail in the Regulation of the Epidermal

- Growth Factor Receptor". *Molecular and Cellular Biology* 35 (17): 3083–3102. <https://doi.org/10.1128/MCB.00248-15>.
- Kubota, Tsuguo, Rinpei Niwa, Mitsuo Satoh, Shiro Akinaga, Kenya Shitara, und Nobuo Hanai. 2009. „Engineered Therapeutic Antibodies with Improved Effector Functions“. *Cancer Science* 100 (9): 1566–72. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01222.x>.
- Kurai, Jun, Hiroki Chikumi, Kiyoshi Hashimoto, Kosuke Yamaguchi, Akira Yamasaki, Takanori Sako, Hirokazu Touge, u. a. 2007. „Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Mediated by Cetuximab against Lung Cancer Cell Lines“. *Clinical Cancer Research* 13 (5): 1552–61. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1726>.
- Ladányi, Andrea. 2015. „Prognostic and Predictive Significance of Immune Cells Infiltrating Cutaneous Melanoma“. *Pigment Cell & Melanoma Research* 28 (5): 490–500. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12371>.
- Landras, Alexandra, Coralie Reger de Moura, Fanelie Jouenne, Celeste Lebbe, Suzanne Menashi, und Samia Mourah. 2019. „CD147 Is a Promising Target of Tumor Progression and a Prognostic Biomarker“. *Cancers* 11 (11): 1803. <https://doi.org/10.3390/cancers11111803>.
- Lang, M. L., M. J. Glennie, und M. A. Kerr. 1997. „Human Neutrophil Fc Alpha R and Fc Gamma RIIa but Not Fc Gamma RIIIb Generate Intracellular Calcium Signals Which Trigger the Respiratory Burst“. *Biochemical Society Transactions* 25 (2): 333S. <https://doi.org/10.1042/bst025333s>.
- Lang, Mark L., Yih-Wen Chen, Li Shen, Hong Gao, Gillian A. Lang, Terri K. Wade, und William F. Wade. 2002. „IgA Fc Receptor (FcalphaR) Cross-Linking Recruits Tyrosine Kinases, Phosphoinositide Kinases and Serine/Threonine Kinases to Glycolipid Rafts“. *The Biochemical Journal* 364 (Pt 2): 517–25. <https://doi.org/10.1042/BJ20011696>.
- Lavens, N., R. Gupta, und L.A. Wood. 2010. „egfr overexpression in squamous cell carcinoma of the penis“. *Current Oncology* 17 (1): 4–6.
- Leemans, C. René, Boudewijn J. M. Braakhuis, und Ruud H. Brakenhoff. 2011. „The Molecular Biology of Head and Neck Cancer“. *Nature Reviews Cancer* 11 (1): 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2982>.
- Levkowitz, G., H. Waterman, E. Zamir, Z. Kam, S. Oved, W. Y. Langdon, L. Beguinot, B. Geiger, und Y. Yarden. 1998. „C-Cbl/Sli-1 Regulates Endocytic Sorting and Ubiquitination of the Epidermal Growth Factor Receptor“. *Genes & Development* 12 (23): 3663–74. <https://doi.org/10.1101/gad.12.23.3663>.
- Ley, Klaus, Carlo Laudanna, Myron I. Cybulsky, und Sussan Nourshargh. 2007. „Getting to the Site of Inflammation: The Leukocyte Adhesion Cascade Updated“. *Nature Reviews Immunology* 7 (9): 678–89. <https://doi.org/10.1038/nri2156>.
- Li, Shiqing, Karl R. Schmitz, Philip D. Jeffrey, Jed J. W. Wiltzius, Paul Kussie, und Kathryn M. Ferguson. 2005. „Structural Basis for Inhibition of the Epidermal Growth Factor Receptor by Cetuximab“. *Cancer Cell* 7 (4): 301–11. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.03.003>.
- Liang, Wei, und Napoleone Ferrara. 2016. „The Complex Role of Neutrophils in Tumor Angiogenesis and Metastasis“. *Cancer Immunology Research* 4 (2): 83–91. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0313>.
- Liao, Cheng-Gong, Ling-Min Kong, Fei Song, Jin-Liang Xing, Long-Xin Wang, Zhi-Jian Sun, Hao Tang, u. a. 2011. „Characterization of Basigin Isoforms and the Inhibitory Function of Basigin-3 in Human Hepatocellular Carcinoma Proliferation and Invasion“. *Molecular and Cellular Biology* 31 (13): 2591–2604. <https://doi.org/10.1128/MCB.05160-11>.
- Lin, RuiCi, Yao Zhang, Kisha Pradhan, und Liwu Li. 2020. „TICAM2-Related Pathway Mediates Neutrophil Exhaustion“. *Scientific Reports* 10 (1): 14397. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71379-y>.
- Lindquist, David, Samuel Kvarnbrink, Roger Henriksson, und Håkan Hedman. 2014. „LRIG and Cancer Prognosis“. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 53 (9): 1135–42. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2014.953258>.
- Ling, Wei-Li, Chinh Tran-To Su, Wai-Heng Lua, Joshua Yi Yeo, Jun-Jie Poh, Yuen-Ling Ng, Anil Wipat, und Samuel Ken-En Gan. 2022. „Variable-Heavy (VH) Families Influencing IgA1&2

- Engagement to the Antigen, Fc $\alpha$ RI and Superantigen Proteins G, A, and L". *Scientific Reports* 12 (1): 6510. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10388-5>.
- Lohse, Stefan, Christina Brunke, Stefanie Derer, Matthias Peipp, Peter Boross, Christian Kellner, Thomas Beyer, u. a. 2012. „Characterization of a Mutated IgA2 Antibody of the m(1) Allotype against the Epidermal Growth Factor Receptor for the Recruitment of Monocytes and Macrophages". *The Journal of Biological Chemistry* 287 (30): 25139–50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.353060>.
- Lohse, Stefan, Stefanie Derer, Thomas Beyer, Katja Klausz, Matthias Peipp, Jeanette H. W. Leusen, Jan G. J. van de Winkel, Michael Dechant, und Thomas Valerius. 2011. „Recombinant Dimeric IgA Antibodies against the Epidermal Growth Factor Receptor Mediate Effective Tumor Cell Killing". *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (6): 3770–78. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003082>.
- Lohse, Stefan, Saskia Meyer, Laura A. P. M. Meulenbroek, J. H. Marco Jansen, Maaïke Nederend, Anna Kretschmer, Katja Klausz, u. a. 2016. „An Anti-EGFR IgA That Displays Improved Pharmacokinetics and Myeloid Effector Cell Engagement In Vivo". *Cancer Research* 76 (2): 403–17. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1232>.
- Lominadze, George, David W. Powell, Greg C. Luerman, Andrew J. Link, Richard A. Ward, und Kenneth R. McLeish. 2005. „Proteomic Analysis of Human Neutrophil Granules". *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 4 (10): 1503–21. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500143-MCP200>.
- Lowell, G. H., L. F. Smith, J. M. Griffiss, und B. L. Brandt. 1980. „IgA-Dependent, Monocyte-Mediated, Antibacterial Activity". *The Journal of Experimental Medicine* 152 (2): 452–57. <https://doi.org/10.1084/jem.152.2.452>.
- Lowenstein, E. J., R. J. Daly, A. G. Batzer, W. Li, B. Margolis, R. Lammers, A. Ullrich, E. Y. Skolnik, D. Bar-Sagi, und J. Schlessinger. 1992. „The SH2 and SH3 Domain-Containing Protein GRB2 Links Receptor Tyrosine Kinases to Ras Signaling". *Cell* 70 (3): 431–42. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90167-B](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90167-B).
- Lu, Ying-Che, und Hong-Chen Chen. 2011. „Involvement of lipid rafts in adhesion-induced activation of Met and EGFR". *Journal of Biomedical Science* 18 (1): 78. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-18-78>.
- Maliszewski, C R, C J March, M A Schoenborn, S Gimpel, und L Shen. 1990. „Expression cloning of a human Fc receptor for IgA." *Journal of Experimental Medicine* 172 (6): 1665–72. <https://doi.org/10.1084/jem.172.6.1665>.
- Maloney, D. G., A. J. Grillo-López, C. A. White, D. Bodkin, R. J. Schilder, J. A. Neidhart, N. Janakiraman, u. a. 1997. „IDEC-C2B8 (Rituximab) Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy in Patients with Relapsed Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma". *Blood* 90 (6): 2188–95.
- Margetts, Jane, Laura F. Ogle, Stephen L. Chan, Anthony W. H. Chan, K. C. Allen Chan, David Jamieson, Catherine E. Willoughby, u. a. 2018. „Neutrophils: Driving Progression and Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma?" *British Journal of Cancer* 118 (2): 248–57. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.386>.
- Margolis, B., N. Li, A. Koch, M. Mohammadi, D. R. Hurwitz, A. Zilberstein, A. Ullrich, T. Pawson, und J. Schlessinger. 1990. „The Tyrosine Phosphorylated Carboxyterminus of the EGF Receptor Is a Binding Site for GAP and PLC-Gamma". *The EMBO Journal* 9 (13): 4375–80.
- Mascarella, Marco A., Erin Mannard, Sabrina Daniela Silva, und Anthony Zeitouni. 2018. „Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Head and Neck Cancer Prognosis: A Systematic Review and Meta-Analysis". *Head & Neck* 40 (5): 1091–1100. <https://doi.org/10.1002/hed.25075>.
- Matlung, Hanke L., Liane Babes, Xi Wen Zhao, Michel van Houdt, Louise W. Treffers, Dieke J. van Rees, Katka Franke, u. a. 2018. „Neutrophils Kill Antibody-Opsonized Cancer Cells by Trogoptosis". *Cell Reports* 23 (13): 3946–3959.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.082>.
- Mattu, T. S., R. J. Pleass, A. C. Willis, M. Kilian, M. R. Wormald, A. C. Lellouch, P. M. Rudd, J. M. Woof, und R. A. Dwek. 1998. „The Glycosylation and Structure of Human Serum IgA1, Fab, and Fc Regions and the Role of N-Glycosylation on Fc $\alpha$  Receptor Interactions". *The Journal of Biological Chemistry* 273 (4): 2260–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2260>.

- Mazanec, M. B., C. S. Kaetzel, M. E. Lamm, D. Fletcher, und J. G. Nedrud. 1992. „Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (15): 6901–5.
- McDaniel, Andrew S., Daniel H. Hovelson, Andi K. Cani, Chia-Jen Liu, Yali Zhai, Yajia Zhang, Alon Z. Weizer, u. a. 2015. „Genomic Profiling of Penile Squamous Cell Carcinoma Reveals New Opportunities for Targeted Therapy“. *Cancer Research* 75 (24): 5219–27. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1004>.
- McEwan, William A, Jerry C H Tam, Ruth E Watkinson, Susanna R Bidgood, Donna L Mallery, und Leo C James. 2013. „Intracellular Antibody-Bound Pathogens Stimulate Immune Signaling via the Fc Receptor TRIM21“. *Nature Immunology* 14 (4): 327–36. <https://doi.org/10.1038/ni.2548>.
- Mehanna, Hisham, Tom Beech, Tom Nicholson, Iman El-Hariry, Christopher McConkey, Vinidh Paleri, und Sally Roberts. 2013. „Prevalence of Human Papillomavirus in Oropharyngeal and Nonoropharyngeal Head and Neck Cancer--Systematic Review and Meta-Analysis of Trends by Time and Region“. *Head & Neck* 35 (5): 747–55. <https://doi.org/10.1002/hed.22015>.
- Mendelsohn, John, und Jose Baselga. 2006. „Epidermal Growth Factor Receptor Targeting in Cancer“. *Seminars in Oncology* 33 (4): 369–85. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2006.04.003>.
- Mestecky, J., R. E. Schrohenloher, R. Kulhavy, G. P. Wright, und M. Tomana. 1974. „Site of J Chain Attachment to Human Polymeric IgA“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (2): 544–48. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.2.544>.
- Miralda, Irina, Silvia M. Uriarte, und Kenneth R. McLeish. 2017. „Multiple Phenotypic Changes Define Neutrophil Priming“. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7: 217. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00217>.
- Mistry, Dippica, und Robert A. Stockley. 2006. „IgA1 Protease“. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38 (8): 1244–48. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.10.005>.
- Mohr, Tobias, Anabel Zwick, Muriel Charlotte Hans, Isabelle Ariane Bley, Felix Leon Braun, Oybek Khalmurzaev, Vsevolod Borisovich Matveev, u. a. 2022. „The prominent role of the S100A8/S100A9-CD147 axis in the progression of penile cancer“. *Frontiers in Oncology* 12 (Oktober): 891511. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.891511>.
- Mollinedo, Faustino, und Consuelo Gajate. 2020. „Lipid Rafts as Signaling Hubs in Cancer Cell Survival/Death and Invasion: Implications in Tumor Progression and Therapy: Thematic Review Series: Biology of Lipid Rafts“. *Journal of Lipid Research* 61 (5): 611–35. <https://doi.org/10.1194/jlr.TR119000439>.
- Monteiro, R. C., H. Kubagawa, und M. D. Cooper. 1990. „Cellular Distribution, Regulation, and Biochemical Nature of an Fc Alpha Receptor in Humans“. *The Journal of Experimental Medicine* 171 (3): 597–613. <https://doi.org/10.1084/jem.171.3.597>.
- Morton, H. C., M. van Egmond, und J. G. van de Winkel. 1996. „Structure and Function of Human IgA Fc Receptors (Fc Alpha R)“. *Critical Reviews in Immunology* 16 (4): 423–40.
- Morton, H. C., I. E. van den Herik-Oudijk, P. Vossebeld, A. Snijders, A. J. Verhoeven, P. J. Capel, und J. G. van de Winkel. 1995. „Functional Association between the Human Myeloid Immunoglobulin A Fc Receptor (CD89) and FcR Gamma Chain. Molecular Basis for CD89/FcR Gamma Chain Association“. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (50): 29781–87. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.50.29781>.
- Mostov, K. E. 1994. „Transepithelial Transport of Immunoglobulins“. *Annual Review of Immunology* 12: 63–84. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.000431>.
- Nabeshima, Kazuki, William S. Lane, und Chitra Biswas. 1991. „Partial Sequencing and Characterization of the Tumor Cell-Derived Collagenase Stimulatory Factor“. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 285 (1): 90–96. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90332-D](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90332-D).
- Nakamura, Koji, Alexander Malykhin, und K. Mark Coggeshall. 2002. „The Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase negatively regulates Fcγ receptor-mediated phagocytosis through immunoreceptor tyrosine-based activation motif-bearing phagocytic receptors“. *Blood* 100 (9): 3374–82. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-03-0787>.
- Necchi, Andrea, Patrizia Giannatempo, Salvatore Lo Vullo, Daniele Raggi, Nicola Nicolai, Maurizio Colecchia, Federica Perrone, Luigi Mariani, und Roberto Salvioni. 2016. „Panitumumab

- Treatment for Advanced Penile Squamous Cell Carcinoma When Surgery and Chemotherapy Have Failed". *Clinical Genitourinary Cancer* 14 (3): 231–36. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2015.08.001>.
- Necchi, Andrea, Salvatore Lo Vullo, Federica Perrone, Daniele Raggi, Patrizia Giannatempo, Giuseppina Calareso, Nicola Nicolai, u. a. 2018. „First-Line Therapy with Dacomitinib, an Orally Available Pan-HER Tyrosine Kinase Inhibitor, for Locally Advanced or Metastatic Penile Squamous Cell Carcinoma: Results of an Open-Label, Single-Arm, Single-Centre, Phase 2 Study". *BJU International* 121 (3): 348–56. <https://doi.org/10.1111/bju.14013>.
- Nichols, Anthony C., David A. Palma, Winsion Chow, Susan Tan, Chandheeb Rajakumar, Giananthy Rizzo, Kevin Fung, u. a. 2013. „High Frequency of Activating PIK3CA Mutations in Human Papillomavirus-Positive Oropharyngeal Cancer". *JAMA Otolaryngology-- Head & Neck Surgery* 139 (6): 617–22. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2013.3210>.
- Nihei, Yoshihito, Hitoshi Suzuki, and Yusuke Suzuki. 2023. „Current understanding of IgA antibodies in the pathogenesis of IgA nephropathy". *Frontiers in Immunology* 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1165394>.
- Ogiso, Hideo, Ryuichiro Ishitani, Osamu Nureki, Shuya Fukai, Mari Yamanaka, Jae-Hoon Kim, Kazuki Saito, u. a. 2002. „Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains". *Cell* 110 (6): 775–87. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00963-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00963-7).
- Ohno, T., H. Kubagawa, S. K. Sanders, and M. D. Cooper. 1990. „Biochemical Nature of an Fc Mu Receptor on Human B-Lineage Cells". *The Journal of Experimental Medicine* 172 (4): 1165–75. <https://doi.org/10.1084/jem.172.4.1165>.
- Olesen, Tina Bech, Freja Lærke Sand, Christina Louise Rasmussen, Vanna Albieri, Birgitte Grønkræ Toft, Bodil Norrild, Christian Munk, and Susanne Krüger Kjær. 2019. „Prevalence of Human Papillomavirus DNA and p16INK4a in Penile Cancer and Penile Intraepithelial Neoplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis". *The Lancet Oncology* 20 (1): 145–58. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30682-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30682-X).
- Oliva, José Luis, Erin M. Griner, und Marcelo G. Kazanietz. 2005. „PKC Isozymes and Diacylglycerol-Regulated Proteins as Effectors of Growth Factor Receptors". *Growth Factors (Chur, Switzerland)* 23 (4): 245–52. <https://doi.org/10.1080/08977190500366043>.
- Olthof, Nadine C., Christian U. Huebbers, Jutta Kolligs, Mieke Henfling, Frans C. S. Ramaekers, Iris Cornet, Josefa A. van Lent-Albrechts, u. a. 2015. „Viral Load, Gene Expression and Mapping of Viral Integration Sites in HPV16-Associated HNSCC Cell Lines". *International Journal of Cancer* 136 (5): E207–218. <https://doi.org/10.1002/ijc.29112>.
- O'Neill, Shannon K., Andrew Getahun, Stephen B. Gauld, Kevin T. Merrell, Idan Tamir, Mia J. Smith, Joseph M. Dal Porto, Quan-Zhen Li, und John C. Cambier. 2011. „Monophosphorylation of CD79a and CD79b ITAM Motifs Initiates a SHIP-1 Phosphatase-Mediated Inhibitory Signaling Cascade Required for B Cell Anergy". *Immunity* 35 (5): 746–56. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.10.011>.
- Orth, James D., Eugene W. Krueger, Shaun G. Weller, und Mark A. McNiven. 2006. „A Novel Endocytic Mechanism of Epidermal Growth Factor Receptor Sequestration and Internalization". *Cancer Research* 66 (7): 3603–10. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2916>.
- Park, Rae-Kil, Kayvon D. Izadi, Yashwant M. Deo, und Donald L. Durden. 1999. „Role of Src in the Modulation of Multiple Adaptor Proteins in Fc $\alpha$ RI Oxidant Signaling". *Blood* 94 (6): 2112–20. <https://doi.org/10.1182/blood.V94.6.2112>.
- Pasquier, Benoît, Pierre Launay, Yutaka Kanamaru, Ivan C. Moura, Séverine Pfirsch, Claude Ruffié, Dominique Hélin, u. a. 2005. „Identification of Fc $\alpha$ RI as an Inhibitory Receptor That Controls Inflammation: Dual Role of Fc $\gamma$ RIII ITAM". *Immunity* 22 (1): 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.11.017>.
- Peper, Janet Kerstin, Heiko Schuster, Markus W. Löffler, Barbara Schmid-Horch, Hans-Georg Rammensee, und Stefan Stevanović. 2014. „An Impedance-Based Cytotoxicity Assay for Real-

- Time and Label-Free Assessment of T-Cell-Mediated Killing of Adherent Cells". *Journal of Immunological Methods* 405 (März): 192–98. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.01.012>.
- Pfefferkorn, L. C., und G. R. Yeaman. 1994. „Association of IgA-Fc Receptors (Fc Alpha R) with Fc Epsilon RI Gamma 2 Subunits in U937 Cells. Aggregation Induces the Tyrosine Phosphorylation of Gamma 2.“ *The Journal of Immunology* 153 (7): 3228–36.
- Pillay, Janesh, Ineke den Braber, Nienke Vrisekoop, Lydia M. Kwast, Rob J. de Boer, José A. M. Borghans, Kiki Tesselaar, und Leo Koenderman. 2010. „In Vivo Labeling with  $^2\text{H}_2\text{O}$  Reveals a Human Neutrophil Lifespan of 5.4 Days“. *Blood* 116 (4): 625–27. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-259028>.
- Pim, D., M. Collins, und L. Banks. 1992. „Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor.“ *Oncogene*.
- Pines, G., P. H. Huang, Y. Zwang, F. M. White, und Y. Yarden. 2010. „EGFRvIV: A Previously Uncharacterized Oncogenic Mutant Reveals a Kinase Autoinhibitory Mechanism“. *Oncogene* 29 (43): 5850–60. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.313>.
- Pleass, R. J., J. I. Dunlop, C. M. Anderson, und J. M. Woof. 1999. „Identification of Residues in the CH2/CH3 Domain Interface of IgA Essential for Interaction with the Human Fc $\alpha$  Receptor (Fc $\alpha$ R) CD89“. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (33): 23508–14. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.23508>.
- Podolnikova, Nataly P., Andriy V. Podolnikov, Thomas A. Haas, Valeryi K. Lishko, und Tatiana P. Ugarova. 2015. „Ligand Recognition Specificity of Leukocyte Integrin  $\alpha\text{M}\beta 2$  (Mac-1, CD11b/CD18) and Its Functional Consequences“. *Biochemistry* 54 (6): 1408–20. <https://doi.org/10.1021/bi5013782>.
- Posgai, Monica T., Sam Tondast-Navaei, Manori Jayasinghe, George M. Ibrahim, George Stan, und Andrew B. Herr. 2018. „Fc $\alpha$ RI Binding at the IgA1 CH2-CH3 Interface Induces Long-Range Conformational Changes That Are Transmitted to the Hinge Region“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (38): E8882–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807478115>.
- Rafidi, Hanine, Francisco Mercado, Michael Astudillo, William H. D. Fry, Matthew Saldana, Kermit L. Carraway, und Colleen Sweeney. 2013. „Leucine-Rich Repeat and Immunoglobulin Domain-Containing Protein-1 (Lrig1) Negative Regulatory Action toward ErbB Receptor Tyrosine Kinases Is Opposed by Leucine-Rich Repeat and Immunoglobulin Domain-Containing Protein 3 (Lrig3)“. *The Journal of Biological Chemistry* 288 (30): 21593–605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.486050>.
- Rao, Tejeshwar C., Victor Pui-Yan Ma, Aaron Blanchard, Tara M. Urner, Shreya Grandhi, Khalid Salaita, und Alexa L. Mattheyses. 2020. „EGFR Activation Attenuates the Mechanical Threshold for Integrin Tension and Focal Adhesion Formation“. *Journal of Cell Science* 133 (13). <https://doi.org/10.1242/jcs.238840>.
- Ravetch, J. V., und S. Bolland. 2001. „IgG Fc Receptors“. *Annual Review of Immunology* 19: 275–90. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.275>.
- Red Brewer, Monica, Sung Hee Choi, Diego Alvarado, Katarina Moravcevic, Ambra Pozzi, Mark A. Lemmon, und Graham Carpenter. 2009. „The Juxtamembrane Region of the EGF Receptor Functions as an Activation Domain“. *Molecular Cell* 34 (6): 641–51. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.034>.
- Rees, Dieke J van, Panagiota Bouti, Bart Klein, Paul J H Verkuijlen, Michel van Houdt, Karin Schornagel, Anton T J Tool, u. a. 2022. „Cancer cells resist antibody-mediated destruction by neutrophils through activation of the exocyst complex“. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 10 (6): e004820. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-004820>.
- Rees, Dieke J. van, Maximilian Brinkhaus, Bart Klein, Paul Verkuijlen, Anton T.J. Tool, Karin Schornagel, Louise W. Treffers, u. a. 2022. „Sodium stibogluconate and CD47-SIRP $\alpha$  blockade overcome resistance of anti-CD20–opsonized B cells to neutrophil killing“. *Blood Advances* 6 (7): 2156–66. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005367>.

- Remmele, W., und H. E. Stegner. 1987. „[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]“. *Der Pathologe* 8 (3): 138–40.
- Reterink, T. J., G. van Zandbergen, M. van Egmond, N. Klar-Mohamad, C. H. Morton, J. G. van de Winkel, und M. R. Daha. 1997. „Size-Dependent Effect of IgA on the IgA Fc Receptor (CD89)“. *European Journal of Immunology* 27 (9): 2219–24. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270915>.
- Reth, M. 1989. „Antigen Receptor Tail Clue“. *Nature* 338 (6214): 383–84. <https://doi.org/10.1038/338383b0>.
- Robinson, Janet K., Thomas G. Blanchard, Alan D. Levine, Steven N. Emancipator, und Michael E. Lamm. 2001. „A Mucosal IgA-Mediated Excretory Immune System In Vivo“. *The Journal of Immunology* 166 (6): 3688–92. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.6.3688>.
- Roepstorff, Kirstine, Michael Vibo Grandal, Lasse Henriksen, Stine Louise Jeppe Knudsen, Mads Lerdrup, Lene Grøvdal, Berthe Marie Willumsen, und Bo van Deurs. 2009. „Differential Effects of EGFR Ligands on Endocytic Sorting of the Receptor“. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 10 (8): 1115–27. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00943.x>.
- Roepstorff, Kirstine, Peter Thomsen, Kirsten Sandvig, und Bo van Deurs. 2002. „Sequestration of Epidermal Growth Factor Receptors in Non-Caveolar Lipid Rafts Inhibits Ligand Binding \*“. *Journal of Biological Chemistry* 277 (21): 18954–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201422200>.
- Roock, Wendy De, Bart Claes, David Bernasconi, Jef De Schutter, Bart Biesmans, George Fountzilias, Konstantine T. Kalogeras, u. a. 2010. „Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA Mutations on the Efficacy of Cetuximab plus Chemotherapy in Chemotherapy-Refractory Metastatic Colorectal Cancer: A Retrospective Consortium Analysis“. *The Lancet Oncology* 11 (8): 753–62. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70130-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70130-3).
- Roskoski, Robert. 2014. „The ErbB/HER Family of Protein-Tyrosine Kinases and Cancer“. *Pharmacological Research* 79 (Januar): 34–74. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.002>.
- Rossi, Edmund A., David M. Goldenberg, Rosana Michel, Diane L. Rossi, Daniel J. Wallace, und Chien-Hsing Chang. 2013. „Trogocytosis of multiple B-cell surface markers by CD22 targeting with epratuzumab“. *Blood* 122 (17): 3020–29. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-473744>.
- Rouwental, Gerard JA, Miranda M van der Lee, Saskia Meyer, Karli R Reiding, Jan Schouten, Guy de Roo, David F Egging, u. a. 2016. „A comparison of anti-HER2 IgA and IgG1 in vivo efficacy is facilitated by high N-glycan sialylation of the IgA“. *mAbs* 8 (1): 74–86. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1102812>.
- Saini, Massimo, Barbara M. Szczerba, und Nicola Aceto. 2019. „Circulating Tumor Cell-Neutrophil Tango along the Metastatic Process“. *Cancer Research* 79 (24): 6067–73. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1972>.
- Schaffer, F. M., R. C. Monteiro, J. E. Volanakis, und M. D. Cooper. 1991. „IgA Deficiency“. *Immunodeficiency Reviews* 3 (1): 15–44.
- Scheffner, M, K Münger, J M Huibregtse, und P M Howley. 1992. „Targeted degradation of the retinoblastoma protein by human papillomavirus E7-E6 fusion proteins.“ *The EMBO Journal* 11 (7): 2425–31.
- Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, und P. M. Howley. 1990. „The E6 Oncoprotein Encoded by Human Papillomavirus Types 16 and 18 Promotes the Degradation of P53“. *Cell* 63 (6): 1129–36. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90409-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90409-8).
- Schlessinger, Joseph, und Mark A. Lemmon. 2003. „SH2 and PTB Domains in Tyrosine Kinase Signaling“. *Science's STKE* 2003 (191): re12–re12. <https://doi.org/10.1126/stke.2003.191.re12>.
- Segal, A. W., J. Dorling, und S. Coade. 1980. „Kinetics of Fusion of the Cytoplasmic Granules with Phagocytic Vacuoles in Human Polymorphonuclear Leukocytes. Biochemical and Morphological Studies“. *The Journal of Cell Biology* 85 (1): 42–59. <https://doi.org/10.1083/jcb.85.1.42>.

- Sengeløv, H, L Kjeldsen, M S Diamond, T A Springer, und N Borregaard. 1993. „Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils.“ *Journal of Clinical Investigation* 92 (3): 1467–76.
- Sengeløv, H., L. Kjeldsen, W. Kroeze, M. Berger, und N. Borregaard. 1994. „Secretory Vesicles Are the Intracellular Reservoir of Complement Receptor 1 in Human Neutrophils“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 153 (2): 804–10.
- Senior, Bernard W., und Jenny M. Woof. 2005. „The Influences of Hinge Length and Composition on the Susceptibility of Human IgA to Cleavage by Diverse Bacterial IgA1 Proteases“. *The Journal of Immunology* 174 (12): 7792–99. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.12.7792>.
- Sharma, Padmanee, Sangeeta Goswami, Deblina Raychaudhuri, Bilal A. Siddiqui, Pratishta Singh, Ashwat Nagarajan, Jieliu Liu, u. a. 2023. „Immune Checkpoint Therapy-Current Perspectives and Future Directions“. *Cell* 186 (8): 1652–69. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.006>.
- Shen, Meixiao, Pingping Hu, Frede Donskov, Guanghui Wang, Qi Liu, und Jiajun Du. 2014. „Tumor-Associated Neutrophils as a New Prognostic Factor in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis“. *PLOS ONE* 9 (6): e98259. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098259>.
- Shibata-Koyama, Mami, Shigeru Iida, Hirofumi Misaka, Katsuhiko Mori, Keiichi Yano, Kenya Shitara, und Mitsuo Satoh. 2009. „Nonfucosylated Rituximab Potentiates Human Neutrophil Phagocytosis through Its High Binding for FcγRIIIb and MHC Class II Expression on the Phagocytotic Neutrophils“. *Experimental Hematology* 37 (3): 309–21. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.11.006>.
- Shibuya, A., N. Sakamoto, Y. Shimizu, K. Shibuya, M. Osawa, T. Hiroshima, H. J. Eyre, u. a. 2000. „Fc Alpha/Mu Receptor Mediates Endocytosis of IgM-Coated Microbes“. *Nature Immunology* 1 (5): 441–46. <https://doi.org/10.1038/80886>.
- Sigismund, Sara, Elisabetta Argenzio, Daniela Tosoni, Elena Cavallaro, Simona Polo, und Pier Paolo Di Fiore. 2008. „Clathrin-Mediated Internalization Is Essential for Sustained EGFR Signaling but Dispensable for Degradation“. *Developmental Cell* 15 (2): 209–19. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.06.012>.
- Sigismund, Sara, Daniele Avanzato, und Letizia Lanzetti. 2018. „Emerging Functions of the EGFR in Cancer“. *Molecular Oncology* 12 (1): 3–20. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12155>.
- Sigismund, Sara, Stefano Confalonieri, Andrea Ciliberto, Simona Polo, Giorgio Scita, und Pier Paolo Di Fiore. 2012. „Endocytosis and Signaling: Cell Logistics Shape the Eukaryotic Cell Plan“. *Physiological Reviews* 92 (1): 273–366. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2011>.
- Simister, Neil E. 2003. „Placental Transport of Immunoglobulin G“. *Vaccine* 21 (24): 3365–69. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(03\)00334-7](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00334-7).
- Singha, Netai C., Tara Nekoroski, Chunmei Zhao, Rebecca Symons, Ping Jiang, Gregory I. Frost, Zhongdong Huang, und H. Michael Shepard. 2015. „Tumor-Associated Hyaluronan Limits Efficacy of Monoclonal Antibody Therapy“. *Molecular Cancer Therapeutics* 14 (2): 523–32. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0580>.
- Singhal, Sunil, Pratik S. Bhojnagarwala, Shaun O’Brien, Edmund K. Moon, Alfred L. Garfall, Abhishek S. Rao, Jon G. Quatromoni, u. a. 2016. „Origin and Role of a Subset of Tumor-Associated Neutrophils with Antigen-Presenting Cell Features in Early-Stage Human Lung Cancer“. *Cancer Cell* 30 (1): 120–35. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.001>.
- Singhal, Sunil, Abhishek S. Rao, Jason Stadanlick, Kyle Bruns, Neil T. Sullivan, Andres Bermudez, Adam Honig-Frand, u. a. 2024. „Human Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils Regulate Anti-Tumor Antibody Efficacy through Lethal and Sublethal Trophocytosis“. *Cancer Research*, Januar. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-23-2135>.
- Spriell, A. B. van, J. H. Leusen, M. van Egmond, H. B. Dijkman, K. J. Assmann, T. N. Mayadas, und J. G. van de Winkel. 2001. „Mac-1 (CD11b/CD18) Is Essential for Fc Receptor-Mediated Neutrophil Cytotoxicity and Immunologic Synapse Formation“. *Blood* 97 (8): 2478–86. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.8.2478>.
- Spring, Frances A., Christopher H. Holmes, Karen L. Simpson, William J. Mawby, M. Jules Mattes, Yasuto Okubo, und Stephen F. Parsons. 1997. „The Oka Blood Group Antigen Is a Marker for the M6 Leukocyte Activation Antigen, the Human Homolog of OX-47 Antigen, Basigin and

- Neurothelin, an Immunoglobulin Superfamily Molecule That Is Widely Expressed in Human Cells and Tissues". *European Journal of Immunology* 27 (4): 891–97.  
<https://doi.org/10.1002/eji.1830270414>.
- Staffler, Günther, Andreas Szekeres, Gerhard J. Schütz, Marcus D. Säemann, Elisabeth Prager, Maximilian Zeyda, Karel Drbal, Gerhard J. Zlabinger, Thomas M. Stulnig, und Hannes Stockinger. 2003. „Selective Inhibition of T Cell Activation via CD147 through Novel Modulation of Lipid Rafts". *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (4): 1707–14.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.4.1707>.
- Stankiewicz, Elzbieta, David M. Prowse, Mansum Ng, Jack Cuzick, David Mesher, Frances Hiscock, Yong-Jie Lu, u. a. 2011. „Alternative HER/PTEN/Akt Pathway Activation in HPV Positive and Negative Penile Carcinomas". *PLoS ONE* 6 (3): e17517.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017517>.
- Steen, Lydia van der, Cornelis W. Tuk, Jantine E. Bakema, Gijs Kooij, Arie Reijkerkerk, Gestur Vidarsson, Gerd Bouma, u. a. 2009. „Immunoglobulin A: Fc(Alpha)RI Interactions Induce Neutrophil Migration through Release of Leukotriene B4". *Gastroenterology* 137 (6): 2018–2029.e1-3.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.06.047>.
- Steffen, Ulrike, Carolien A. Koeleman, Maria V. Sokolova, Holger Bang, Arnd Kleyer, Jürgen Rech, Harald Unterweger, u. a. 2020. „IgA Subclasses Have Different Effector Functions Associated with Distinct Glycosylation Profiles". *Nature Communications* 11 (1): 120.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13992-8>.
- Stein, Andrew P., Sandeep Saha, Jennifer L. Kraninger, Adam D. Swick, Menggang Yu, Paul F. Lambertg, und Randall Kimple. 2015. „Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal cancer: a systematic review". *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 21 (3): 138–46.  
<https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000115>.
- Stewart, W W, und M A Kerr. 1990. „The specificity of the human neutrophil IgA receptor (Fc alpha R) determined by measurement of chemiluminescence induced by serum or secretory IgA1 or IgA2." *Immunology* 71 (3): 328–34.
- Straight, S. W., B. Herman, und D. J. McCance. 1995. „The E5 Oncoprotein of Human Papillomavirus Type 16 Inhibits the Acidification of Endosomes in Human Keratinocytes". *Journal of Virology* 69 (5): 3185–92. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.5.3185-3192.1995>.
- Strizova, Z., J. Vachtenheim, und J. Bartunkova. 2019. „The Potential Role of Neutrophil Trogocytosis and G-CSF in the Loss of HER2 Expression". *Breast Cancer Research and Treatment* 178 (1): 247–48. <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05386-7>.
- Su, Chinh Tran-To, Wai-Heng Lua, Wei-Li Ling, und Samuel Ken-En Gan. 2018. „Allosteric Effects between the Antibody Constant and Variable Regions: A Study of IgA Fc Mutations on Antigen Binding". *Antibodies (Basel, Switzerland)* 7 (2): 20.  
<https://doi.org/10.3390/antib7020020>.
- Sun, Bingwei, Weiting Qin, Mingming Song, Lu Liu, Yao Yu, Xinxin Qi, und Hui Sun. 2018. „Neutrophil Suppresses Tumor Cell Proliferation via Fas /Fas Ligand Pathway Mediated Cell Cycle Arrested". *International Journal of Biological Sciences* 14 (14): 2103–13.  
<https://doi.org/10.7150/ijbs.29297>.
- Sun, J., und M. E. Hemler. 2001. „Regulation of MMP-1 and MMP-2 Production through CD147/Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer Interactions". *Cancer Research* 61 (5): 2276–81.
- Supryniewicz, F. A., G. L. Disbrow, E. Krawczyk, V. Simic, K. Lantzky, und R. Schlegel. 2008. „HPV-16 E5 Oncoprotein Upregulates Lipid Raft Components Caveolin-1 and Ganglioside GM1 at the Plasma Membrane of Cervical Cells". *Oncogene* 27 (8): 1071–78.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210725>.
- Szabó, Balázs, Györgyi A. Nelhubel, Adél Kárpáti, István Kenessey, Balázs Jóri, Csilla Székely, István Peták, u. a. 2011. „Clinical Significance of Genetic Alterations and Expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas". *Oral Oncology* 47 (6): 487–96. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.03.020>.

- Tang, J., Y.-M. Wu, P. Zhao, X.-M. Yang, J.-L. Jiang, und Z.-N. Chen. 2008. „Overexpression of HAB18G/CD147 Promotes Invasion and Metastasis via A3 $\beta$ 1 Integrin Mediated FAK-Paxillin and FAK-PI3K-Ca<sup>2+</sup> Pathways“. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (18): 2933–42. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8315-8>.
- Tang, Yi, Prabakaran Kesavan, Marian T. Nakada, und Li Yan. 2004. „Tumor-Stroma Interaction: Positive Feedback Regulation of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) Expression and Matrix Metalloproteinase-Dependent Generation of Soluble EMMPRIN“. *Molecular Cancer Research: MCR* 2 (2): 73–80.
- Tarelli, Edward, Alice C. Smith, Bruce M. Hendry, Stephen J. Challacombe, und Shideh Pouria. 2004. „Human Serum IgA1 Is Substituted with up to Six O-Glycans as Shown by Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry“. *Carbohydrate Research* 339 (13): 2329–35. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.07.011>.
- Tetering, Geert van, Mitchell Evers, Chilam Chan, Marjolein Stip, und Jeanette Leusen. 2020. „Fc Engineering Strategies to Advance IgA Antibodies as Therapeutic Agents“. *Antibodies (Basel, Switzerland)* 9 (4): E70. <https://doi.org/10.3390/antib9040070>.
- Thiel, Kristina W., und Graham Carpenter. 2007. „Epidermal Growth Factor Receptor Juxtamembrane Region Regulates Allosteric Tyrosine Kinase Activation“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (49): 19238–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703854104>.
- Thomas, Miranda, und Lawrence Banks. 1998. „Inhibition of Bak-Induced Apoptosis by HPV-18 E6“. *Oncogene* 17 (23): 2943–54. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202223>.
- Tomana, Milan, William Niedermeier, Jiri Mestecky, und Frantisek Skvaril. 1976. „The Differences in Carbohydrate Composition between the Subclasses of IgA Immunoglobulins“. *Immunochemistry* 13 (4): 325–28. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(76\)90342-6](https://doi.org/10.1016/0019-2791(76)90342-6).
- Tomasi, T. B. 1970. „Structure and Function of Mucosal Antibodies“. *Annual Review of Medicine* 21: 281–98. <https://doi.org/10.1146/annurev.me.21.020170.001433>.
- Treffers, Louise W., Toine Ten Broeke, Thies Rösner, J. H. Marco Jansen, Michel van Houdt, Steffen Kahle, Karin Schornagel, u. a. 2020. „IgA-Mediated Killing of Tumor Cells by Neutrophils Is Enhanced by CD47-SIRP $\alpha$  Checkpoint Inhibition“. *Cancer Immunology Research* 8 (1): 120–30. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0144>.
- Treffers, Louise W., Xi Wen Zhao, Joris van der Heijden, Sietse Q. Nagelkerke, Dieke J. van Rees, Patricia Gonzalez, Judy Geissler, u. a. 2018. „Genetic Variation of Human Neutrophil Fc $\gamma$  Receptors and SIRP $\alpha$  in Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity towards Cancer Cells“. *European Journal of Immunology* 48 (2): 344–54. <https://doi.org/10.1002/eji.201747215>.
- Trellakis, Sokratis, Kirsten Bruderek, Claudia A. Dumitru, Hossein Gholaman, Xiang Gu, Agnes Bankfalvi, André Scherag, u. a. 2011. „Polymorphonuclear Granulocytes in Human Head and Neck Cancer: Enhanced Inflammatory Activity, Modulation by Cancer Cells and Expansion in Advanced Disease“. *International Journal of Cancer* 129 (9): 2183–93. <https://doi.org/10.1002/ijc.25892>.
- Trivedi, S., F. Concha-Benavente, R. M. Srivastava, H. B. Jie, S. P. Gibson, N. C. Schmitt, und R. L. Ferris. 2015. „Immune Biomarkers of Anti-EGFR Monoclonal Antibody Therapy“. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 26 (1): 40–47. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu156>.
- Trivedi, Sumita, Raghvendra M. Srivastava, Fernando Concha-Benavente, Soldano Ferrone, Tatiana M. Garcia-Bates, Jing Li, und Robert L. Ferris. 2016. „Anti-EGFR Targeted Monoclonal Antibody Isotype Influences Antitumor Cellular Immunity in Head and Neck Cancer Patients“. *Clinical Cancer Research* 22 (21): 5229–37. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2971>.
- Tseng, Hsiang-Chi, Wei Xiong, Saiaditya Badeti, Yan Yang, Minh Ma, Ting Liu, Carlos A. Ramos, u. a. 2020. „Efficacy of Anti-CD147 Chimeric Antigen Receptors Targeting Hepatocellular Carcinoma“. *Nature Communications* 11 (1): 4810. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18444-2>.
- Ullrich, A., L. Coussens, J. S. Hayflick, T. J. Dull, A. Gray, A. W. Tam, J. Lee, Y. Yarden, T. A. Libermann, und J. Schlessinger. 1984. „Human Epidermal Growth Factor Receptor cDNA Sequence and

- Aberrant Expression of the Amplified Gene in A431 Epidermoid Carcinoma Cells". *Nature* 309 (5967): 418–25. <https://doi.org/10.1038/309418a0>.
- Ustyanovska Avtenyuk, Natasha, Nienke Visser, Edwin Bremer, und Valerie R. Wiersma. 2020. „The Neutrophil: The Underdog That Packs a Punch in the Fight against Cancer“. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (21): 7820. <https://doi.org/10.3390/ijms21217820>.
- Valerius, T., B. Stockmeyer, A. B. van Spriel, R. F. Graziano, I. E. van den Herik-Oudijk, R. Repp, Y. M. Deo, u. a. 1997. „FcalphaRI (CD89) as a Novel Trigger Molecule for Bispecific Antibody Therapy“. *Blood* 90 (11): 4485–92.
- Valero, Cristina, Laura Pardo, Montserrat López, Jacinto García, Mercedes Camacho, Miquel Quer, und Xavier León. 2017. „Pretreatment Count of Peripheral Neutrophils, Monocytes, and Lymphocytes as Independent Prognostic Factor in Patients with Head and Neck Cancer“. *Head & Neck* 39 (2): 219–26. <https://doi.org/10.1002/hed.24561>.
- Valgardsdottir, Rut, Irene Cattaneo, Christian Klein, Martino Introna, Marina Figliuzzi, und Josée Golay. 2017. „Human neutrophils mediate trogocytosis rather than phagocytosis of CLL B cells opsonized with anti-CD20 antibodies“. *Blood* 129 (19): 2636–44. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-735605>.
- Van den Eynde, M., J. F. Baurain, F. Mazzeo, und J. P. Machiels. 2011. „Epidermal Growth Factor Receptor Targeted Therapies for Solid Tumours“. *Acta Clinica Belgica* 66 (1): 10–17. <https://doi.org/10.2143/ACB.66.1.2062508>.
- Van Emburgh, Beth O., Sabrina Arena, Giulia Siravegna, Luca Lazzari, Giovanni Crisafulli, Giorgio Corti, Benedetta Mussolin, u. a. 2016. „Acquired RAS or EGFR Mutations and Duration of Response to EGFR Blockade in Colorectal Cancer“. *Nature Communications* 7 (1): 13665. <https://doi.org/10.1038/ncomms13665>.
- Van Spriel, Annemiek B., Jeanette H. W. Leusen, Henriëtte Vilé, und Jan G. J. Van De Winkel. 2002. „Mac-1 (CD11b/CD18) as Accessory Molecule for Fc Alpha R (CD89) Binding of IgA“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (7): 3831–36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.7.3831>.
- Van Doorslaer, Koenraad, Zhiwen Li, Sandhya Xirasagar, Piet Maes, David Kaminsky, David Liou, Qiang Sun, Ramandeep Kaur, Yentram Huyen, und Alison A. McBride. 2017. „The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database“. *Nucleic Acids Research* 45 (D1): D499–506. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw879>.
- Veldman, Tim, Izumi Horikawa, J. Carl Barrett, und Richard Schlegel. 2001. „Transcriptional Activation of the Telomerase hTERT Gene by Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein“. *Journal of Virology* 75 (9): 4467–72. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.9.4467-4472.2001>.
- Vermorken, Jan B., Ricard Mesia, Fernando Rivera, Eva Remenar, Andrzej Kawecky, Sylvie Rottey, Jozsef Erfan, u. a. 2008. „Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer“. *The New England Journal of Medicine* 359 (11): 1116–27. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802656>.
- Villaseñor, Roberto, Hidenori Nonaka, Perla Del Conte-Zerial, Yannis Kalaidzidis, und Marino Zerial. 2015. „Regulation of EGFR Signal Transduction by Analogue-to-Digital Conversion in Endosomes“. *eLife* 4 (Februar). <https://doi.org/10.7554/eLife.06156>.
- Vogel, Christine, und Edward M. Marcotte. 2012. „Insights into the Regulation of Protein Abundance from Proteomic and Transcriptomic Analyses“. *Nature Reviews Genetics* 13 (4): 227–32. <https://doi.org/10.1038/nrg3185>.
- Vukovic, N., A. van Elsas, J. S. Verbeek, und D. M. W. Zaiss. 2021. „Isotype Selection for Antibody-Based Cancer Therapy“. *Clinical & Experimental Immunology* 203 (3): 351–65. <https://doi.org/10.1111/cei.13545>.
- Walter, Miriam, Elina Simanovich, Vera Brod, Nitza Lahat, Haim Bitterman, und Michal A. Rahat. 2016. „An epitope-specific novel anti-EMMPRIN polyclonal antibody inhibits tumor progression“. *OncolImmunology* 5 (2): e1078056. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1078056>.
- Waterman, Hadassa, Menachem Katz, Chanan Rubin, Keren Shtiegman, Sara Lavi, Ari Elson, Thomas Jovin, und Yosef Yarden. 2002. „A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and

- endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling". *The EMBO Journal* 21 (3): 303–13. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.303>.
- Waterman, Paul M., und John C. Cambier. 2010. „The Conundrum of Inhibitory Signaling by ITAM-Containing Immunoreceptors: Potential Molecular Mechanisms". *FEBS Letters* 584 (24): 4878–82. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.029>.
- Watson, Richard A., Miranda Thomas, Lawrence Banks, und Sally Roberts. 2003. „Activity of the human papillomavirus E6 PDZ-binding motif correlates with an enhanced morphological transformation of immortalized human keratinocytes". *Journal of Cell Science* 116 (24): 4925–34. <https://doi.org/10.1242/jcs.00809>.
- Weicker, Jena, und Brian J. Underdown. 1975. „A Study of the Association of Human Secretory Component with IgA and IgM Proteins". *The Journal of Immunology* 114 (4): 1337–44.
- Weisbart, R. H., A. Kacena, A. Schuh, und D. W. Golde. 1988. „GM-CSF Induces Human Neutrophil IgA-Mediated Phagocytosis by an IgA Fc Receptor Activation Mechanism". *Nature* 332 (6165): 647–48. <https://doi.org/10.1038/332647a0>.
- Wheeler, Deric L., Emily F. Dunn, und Paul M. Harari. 2010. „Understanding Resistance to EGFR Inhibitors—Impact on Future Treatment Strategies". *Nature Reviews Clinical Oncology* 7 (9): 493–507. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.97>.
- Williams, R., und R. Gibbons. 1972. „Inhibition of Bacterial Adherence by Secretory Immunoglobulin A: A Mechanism of Antigen Disposal". *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.177.4050.697>.
- Wilson, Marieangela C., David Meredith, Jocelyn E. Manning Fox, Christine Manoharan, Andrew J. Davies, und Andrew P. Halestrap. 2005. „Basigin (CD147) Is the Target for Organomercurial Inhibition of Monocarboxylate Transporter Isoforms 1 and 4: THE ANCILLARY PROTEIN FOR THE INSENSITIVE MCT2 IS EMBIGIN (Gp70) \*". *Journal of Biological Chemistry* 280 (29): 27213–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411950200>.
- Wines, Bruce D., Mark D. Hulett, Gary P. Jamieson, Halina M. Trist, Joanne M. Spratt, und P. Mark Hogarth. 1999. „Identification of Residues in the First Domain of Human Fc $\alpha$  Receptor Essential for Interaction with IgA". *The Journal of Immunology* 162 (4): 2146–53.
- Wines, Bruce D., Natasha Willoughby, John D. Fraser, und P. Mark Hogarth. 2006. „A Competitive Mechanism for Staphylococcal Toxin SSL7 Inhibiting the Leukocyte IgA Receptor, Fc alphaRI, Is Revealed by SSL7 Binding at the C Alpha2/C Alpha3 Interface of IgA". *The Journal of Biological Chemistry* 281 (3): 1389–93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509334200>.
- Wislez, Marie, Jocelyne Fleury-Feith, Nathalie Rabbe, Joelle Moreau, Danielle Cesari, Bernard Milleron, Charles Mayaud, Martine Antoine, Paul Soler, und Jacques Cadranel. 2001. „Tumor-Derived Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Granulocyte Colony-Stimulating Factor Prolong the Survival of Neutrophils Infiltrating Bronchoalveolar Subtype Pulmonary Adenocarcinoma". *The American Journal of Pathology* 159 (4): 1423–33. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62529-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62529-1).
- Woof, Jenny M., und Dennis R. Burton. 2004. „Human Antibody-Fc Receptor Interactions Illuminated by Crystal Structures". *Nature Reviews. Immunology* 4 (2): 89–99. <https://doi.org/10.1038/nri1266>.
- Wright, Alison, Michael E. Lamm, und Yung T. Huang. 2008. „Excretion of Human Immunodeficiency Virus Type 1 through Polarized Epithelium by Immunoglobulin A". *Journal of Virology* 82 (23): 11526–35. <https://doi.org/10.1128/JVI.01111-08>.
- Wright, Helen L., Huw B. Thomas, Robert J. Moots, und Steven W. Edwards. 2013. „RNA-Seq Reveals Activation of Both Common and Cytokine-Specific Pathways Following Neutrophil Priming". *PloS One* 8 (3): e58598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058598>.
- Wu, Albert M., June H. Wu, Tanuja Singh, Li-Ju Lai, Zhangung Yang, und Anthony Herp. 2006. „Recognition Factors of Ricinus Communis Agglutinin 1 (RCA(1))". *Molecular Immunology* 43 (10): 1700–1715. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.09.008>.
- Wu, Jing, Ke Cheng, Ling Yuan, Yang Du, Cong Li, Ye Chen, Yu Yang, Hong-Feng Gou, Feng Xu, und Ji-Yan Liu. 2016. „Recurrent Penile Squamous Cell Carcinoma Successfully Treated With

- Cetuximab, Chemotherapy, and Radiotherapy". *Clinical Genitourinary Cancer* 14 (1): e135-137. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2015.10.010>.
- Wu, Leilei, Linping Ke, Zhenshan Zhang, Jinming Yu, und Xue Meng. 2020. „Development of EGFR TKIs and Options to Manage Resistance of Third-Generation EGFR TKI Osimertinib: Conventional Ways and Immune Checkpoint Inhibitors". *Frontiers in Oncology* 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.602762>.
- Xin, Xiaoyan, Xianqin Zeng, Huajian Gu, Min Li, Huaming Tan, Zhishan Jin, Teng Hua, Rui Shi, und Hongbo Wang. 2016. „CD147/EMMPRIN Overexpression and Prognosis in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis". *Scientific Reports* 6 (1): 32804. <https://doi.org/10.1038/srep32804>.
- Xu, Jing, Yang Lu, Songbo Qiu, Zhi-Nan Chen, und Zhen Fan. 2013. „A Novel Role of EMMPRIN/CD147 in Transformation of Quiescent Fibroblasts to Cancer-Associated Fibroblasts by Breast Cancer Cells". *Cancer Letters* 335 (2): 380–86. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.054>.
- Yago, Tadayuki, Nan Zhang, Liang Zhao, Charles S. Abrams, und Rodger P. McEver. 2018. „Selectins and Chemokines Use Shared and Distinct Signals to Activate B2 Integrins in Neutrophils". *Blood Advances* 2 (7): 731–44. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017015602>.
- Yan, Jun, Goetz Kloecker, Chris Fleming, Michael Bousamra, Richard Hansen, Xiaoling Hu, Chuanlin Ding, u. a. 2014. „Human Polymorphonuclear Neutrophils Specifically Recognize and Kill Cancerous Cells". *Oncoimmunology* 3 (7): e950163. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.950163>.
- Yang, Lin, Yu Huang, Lie Zhou, Yuhong Dai, und Guangyuan Hu. 2019. „High pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictor of poor survival prognosis in head and neck squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis". *Head & Neck* 41 (5): 1525–35. <https://doi.org/10.1002/hed.25583>.
- Yoo, Esther M, Li J Yu, Letitia A Wims, David Goldberg, und Sherie L Morrison. 2010. „Differences in N-glycan structures found on recombinant IgA1 and IgA2 produced in murine myeloma and CHO cell lines". *mAbs* 2 (3): 320–34.
- Yoshida, Masaru, Steven M. Claypool, Jessica S. Wagner, Emiko Mizoguchi, Atsushi Mizoguchi, Derry C. Roopenian, Wayne I. Lencer, und Richard S. Blumberg. 2004. „Human Neonatal Fc Receptor Mediates Transport of IgG into Luminal Secretions for Delivery of Antigens to Mucosal Dendritic Cells". *Immunity* 20 (6): 769–83. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.05.007>.
- Yu, Xiao-Ling, Tiancen Hu, Jia-Mu Du, Jian-Ping Ding, Xiang-Min Yang, Jian Zhang, Bin Yang, u. a. 2008. „Crystal Structure of HAB18G/CD147: Implications for Immunoglobulin Superfamily Homophilic Adhesion". *The Journal of Biological Chemistry* 283 (26): 18056–65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802694200>.
- Zhang, Jingwei, Zeyu Wang, Xun Zhang, Ziyu Dai, Wen Zhi-Peng, Jing Yu, Yun Peng, u. a. 2022. „Large-Scale Single-Cell and Bulk Sequencing Analyses Reveal the Prognostic Value and Immune Aspects of CD147 in Pan-Cancer". *Frontiers in Immunology* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.810471>.
- Zhang, Juechao, Xuan Qiao, Huifang Shi, Xiaoqing Han, Wenguang Liu, Xiujian Tian, und Xianlu Zeng. 2016. „Circulating Tumor-Associated Neutrophils (cTAN) Contribute to Circulating Tumor Cell Survival by Suppressing Peripheral Leukocyte Activation". *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (4): 5397–5404. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4349-3>.
- Zhang, Xuewu, Jodi Gureasko, Kui Shen, Philip A. Cole, und John Kuriyan. 2006. „An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor". *Cell* 125 (6): 1137–49. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.013>.
- Zhao, Jun, Ruth Nussinov, und Buyong Ma. 2019. „Antigen Binding Allosterically Promotes Fc Receptor Recognition". *mAbs* 11 (1): 58–74. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1522178>.
- Zhao, Xi Wen, Ellen M. van Beek, Karin Schornagel, Hans Van der Maaden, Michel Van Houdt, Marielle A. Otten, Pascal Finetti, u. a. 2011. „CD47-Signal Regulatory Protein- $\alpha$  (SIRP $\alpha$ )

- Interactions Form a Barrier for Antibody-Mediated Tumor Cell Destruction". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (45): 18342–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106550108>.
- Zhu, Xiaoli, Fengmei Zhang, Wei Zhang, Jing He, Yulan Zhao, und Xingming Chen. 2013. „Prognostic Role of Epidermal Growth Factor Receptor in Head and Neck Cancer: A Meta-Analysis“. *Journal of Surgical Oncology* 108 (6): 387–97. <https://doi.org/10.1002/jso.23406>.
- Zinn, Sacha, Rodrigo Vazquez-Lombardi, Carsten Zimmermann, Puja Sapra, Lutz Jermutus, und Daniel Christ. 2023. „Advances in Antibody-Based Therapy in Oncology“. *Nature Cancer* 4 (2): 165–80. <https://doi.org/10.1038/s43018-023-00516-z>.
- Zwick, Anabel, Muriel Bernhard, Arne Knoerck, Maximilian Linxweiler, Bernhard Schick, Joana Heinzlmann, Sigrun Smola, und Stefan Lohse. 2019. „Monitoring Kinetics Reveals Critical Parameters of IgA-Dependent Granulocyte-Mediated Anti-Tumor Cell Cytotoxicity“. *Journal of Immunological Methods* 473 (Oktober): 112644. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112644>.

## 5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Wirkmechanismen von Antikörpern in der Tumorthherapie .....	2
Abbildung 2. Schematische Darstellung der monomeren und dimeren IgA-Struktur .....	4
Abbildung 3. Humane Fc Rezeptoren .....	6
Abbildung 4. <i>Inside-out</i> Signal des Fc $\alpha$ RI .....	7
Abbildung 5. <i>Outside-in</i> Signal des Fc $\alpha$ RI .....	8
Abbildung 6. Antitumorale Aktivitäten neutrophiler Granulozyten .....	13
Abbildung 7. IgA-Antikörper Engineering .....	16
Abbildung 8. Calceinfreisetzungstest benötigt Zielzellen in suspension .....	58
Abbildung 9: Titrations zur Etablierung der Impedanz-Messung .....	60
Abbildung 10: Funktionsanalyse der Granulozyten zeigt eine frühe Degranulierung .....	61
Abbildung 11: Effekt von Chloroquin und Wortmannin auf den ADCC unterstützt Trogoptose als Mechanismus der ADCC .....	62
Abbildung 12: Langzeitmessungen zeigten ein Wiederauswachen der Zielzellen .....	64
Abbildung 13: Erschöpfung der Granulozyten .....	66
Abbildung 14: ADCC Zelllinien .....	68
Abbildung 15: Korrelation der EGFR-Expression mit $\Delta$ CI .....	70
Abbildung 16: Expressionsanalyse Tumorzelllinien .....	73
Abbildung 17: Biochemische Charakterisierung der dimeren IgA-Antikörper .....	76
Abbildung 18: Lektin Blots zeigen Glykosylierungsprofil der IgA-Antikörper .....	77
Abbildung 19: Fab-vermittelte Rezeptorbindung und Funktionen des IgA3.0 im Vergleich zu IgA2.0 .....	79
Abbildung 20: Fc-vermittelte Rezeptorbindung und Funktionen des IgA3.0 im Vergleich zu IgA2.0 ...	81
Abbildung 21: ADCC Zelllinien IgA2.0 versus IgA3.0 .....	83
Abbildung 22: Bindungsanalyse Tumorzelllinien .....	84
Abbildung 23: Fab-vermittelte Rezeptorbindung und Funktionen der IgA-Dimere .....	86
Abbildung 24: Fc-vermittelte Rezeptorbindung und Funktionen der IgA-Dimere .....	88
Abbildung 25: Fc-vermittelte Effekte der IgA-Antikörper auf HPV16 <sup>+</sup> HNSCC .....	90
Abbildung 26: Die Dimere binden mit gleicher Avidität an die Zielzellen .....	91
Abbildung 27: Überstände der Tumorzelllinien modulieren die ADCC .....	93
Abbildung 28: Lösliche Faktoren beeinflussen die Oberflächenexpression der Granulozyten .....	95
Abbildung 29: Dosisabhängige Verbesserung des ADCC durch lösliches CD147 .....	97
Abbildung 30: Immunfluoreszenzfärbung von CD147 in A-431 und Granulozyten .....	98
Abbildung 31: Membranäre Anreicherung von CD147 in der Kontaktzone während der ADCC .....	99
Abbildung 32: CD147 Färbung der Gewebemikroarrays von Peniskarzinompatienten .....	100

Abbildung 33: Erhöhte CD147-Expression im HPV<sup>+</sup> metastasierenden Peniskarzinom 102

### 5.3 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AAL	Aleuria aurantia lectin
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
ADCP	antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose
BLK	B-Lymphozytenkinase
CD147	Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer
CDC	komplementabhängige Zytotoxizität
CFSE	Carboxyfluoresceindiacetat- <i>N</i> -Succinimidylester
CH	konstante Domäne
CI	Zellindex
CME	Clathrin mediated endocytosis
CXCL8	Interleukin-8
EC	extrazelluläre Domäne
EC <sub>50</sub>	halbmaximale Effektivität
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor
EMMPRIN	Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer
ESCC	Ösophagus-Plattenepithelkarzinom
Fab	antigenbindendes Fragment
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FasL	Fas Ligand
Fc	kristallisierbares Fragment
FcR	Fc-Rezeptor
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G-CSF	Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor

GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase 3
GSL	Griffonia simplicifolia lectin
h	Stunden
HB-EGF	heparin-binding EGF-like growth factor
HB-EGF	heparin-binding EGF-like growth factor
HC	schwere Kette
HIF-2 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor
HNSCC	Head and Neck squamous cell carcinoma
HPV	humane Papillomviren
HR-HPV	Hochrisiko-HPV-Typen
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IC <sub>50</sub>	halbmaximale Inhibition
IgA2.0	225-IgA2m(1)-N166G-P221R-C331S-N337T-I338L-T339S-dC471-dY472
IgA3.0	225-IgA2m(1)-N166G-P221R-C331S-N337T-I338L-T339S
IL	Interleukin
IMAC	Immobilisierte-Metall-Affinitätschromatographie
ITAM	Immunoreceptor tyrosin-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif
LC	leichte Kette
LRIG	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B4
mCD147	membranständiges CD147
M <sub>f</sub>	mobile fraction
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase 9
NCE	non-clathrin endocytosis
nCI	normalisierter Zellindex
NET	Neutrophil Extracellular Trap
nM	Nanomolar
nm	Nanometer

PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP <sub>2</sub> )
PKC	Proteinkinase C
PLC $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
PP2A	Proteinphosphatase 2
pRb	Retinoblastom-Protein
PRR	Pattern-Recognition-Rezeptoren
PSCC	Plattenepithelkarzinom des Penis
RCA	Ricinus communis lectin A
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
sCD147	lösliches CD147
SFM	Serum freies Medium
SHP1	Src homology 2 domain-containing Inositol-5-Phosphatase 1
SNL	Sambucus nigra lectin
SYK	Tyrosinkinase Spleen Tyrosin Kinase
TAN	tumorassoziierte neutrophile Granulozyten
TGF- $\alpha$	Transforming growth factor $\alpha$
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRAIL	TNF-verwandter Apoptose induzierender Ligand
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VH	variable Domäne
$\Delta$	delta, Differenz

## 6 Publikationen

### 6.1 Eigene Publikationen zu dieser Arbeit:

**Zwick Anabel**, Muriel Bernhard, Arne Knoerck, Maximilian Linxweiler, Bernhard Schick, Joana Heinzlmann, Sigrun Smola, und Stefan Lohse. 2019. „Monitoring Kinetics Reveals Critical Parameters of IgA-Dependent Granulocyte-Mediated Anti-Tumor Cell Cytotoxicity“. *Journal of Immunological Methods* 473 (Oktober): 112644. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112644>

Mohr Tobias, **Anabel Zwick**, Muriel Charlotte Hans, Isabelle Ariane Bley, Felix Leon Braun, Oybek Khalmurzaev, Vsevolod Borisovich Matveev, u. a. 2022. „The prominent role of the S100A8/S100A9-CD147 axis in the progression of penile cancer“. *Frontiers in Oncology* 12 (Oktober): 891511. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.891511>.

In Revision (Stand März 2024) bei *The Journal of Immunology*:

**Anabel Zwick**, Felix Leon Braun, Lennert Jochen Weber, Manuel Linder, Maximilian Linxweiler, Stefan Lohse. „Engineering dimeric EGFR-directed IgA antibodies reveals a central role of CD147 during neutrophil-mediated tumor cell killing of head and neck squamous cancer cells“

### 6.2 Eigene Publikationen aus anderen wissenschaftlichen Projekten (chronologisch):

Bley Isabelle Ariane, **Anabel Zwick**, Muriel Charlotte Hans, Katrin Thieser, Viktoria Wagner, Nicole Ludwig, Oybek Khalmurzaev, u. a. 2022. „DKK1 Inhibits Canonical Wnt Signaling in Human Papillomavirus-Positive Penile Cancer Cells“. *Translational Oncology* 15 (1): 101267. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101267>.

Lohse Stefan, Anna Sternjakob-Marthaler, Paul Lagemann, Jakob Schöpe, Jürgen Rissland, Nastasja Seiwert, Thorsten Pfuhl, (...) **Anabel Zwick** u. a. 2022. „German Federal-State-Wide Seroprevalence Study of 1st SARS-CoV-2 Pandemic Wave Shows Importance of Long-Term Antibody Test Performance“. *Communications Medicine* 2: 52. <https://doi.org/10.1038/s43856-022-00100-z>.

Bernhard Muriel Charlotte, **Anabel Zwick**, Tobias Mohr, Gilles Gasparoni, Oybek Khalmurzaev, Vsevolod Borisovich Matveev, Philine Loertzer, u. a. 2021. „The HPV and P63 Status in Penile Cancer

Are Linked with the Infiltration and Therapeutic Availability of Neutrophils“. *Molecular Cancer Therapeutics* 20 (2): 423–37. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0173>.

Decker Sarah, **Anabel Zwick**, Shifa Khaja Saleem, Sandra Kissel, Andres Rettig, Konrad Aumann, und Christine Dierks. 2019. „Optimized Xenograft Protocol for Chronic Lymphocytic Leukemia Results in High Engraftment Efficiency for All CLL Subgroups“. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (24): 6277. <https://doi.org/10.3390/ijms20246277>.

Müller Tony Andreas, Sandra Pennisi, **Anabel Zwick**, Sarah Decker, Claudius Klein, Benjamin Rister, Alina Rudolf, u. a. 2019. „PIM1 Inhibition Effectively Enhances Plerixafor-Induced HSC Mobilization by Counteracting CXCR4 Upregulation and Blocking CXCL12 Secretion“. *Leukemia* 33 (5): 1296–1301. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0428-6>.

Palau Anna, Anne-Kathrin Garz, Jeannine Diesch, **Anabel Zwick**, Roberto Malinverni, Vanesa Valero, Katrina Lappin, u. a. 2017. „Polycomb Protein RING1A Limits Hematopoietic Differentiation in Myelodysplastic Syndromes“. *Oncotarget* 8 (70): 115002–17. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22839>.

Diesch Jeannine, **Anabel Zwick**, Anne-Kathrin Garz, Anna Palau, Marcus Buschbeck, und Katharina S. Götze. 2016. „A Clinical-Molecular Update on Azanucleoside-Based Therapy for the Treatment of Hematologic Cancers“. *Clinical Epigenetics* 8: 71. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0237-y>.

Klein Claudius, **Anabel Zwick**, Sandra Kissel, Christine Ulrike Forster, Dietmar Pfeifer, Marie Follo, Anna Lena Illert, u. a. 2016. „Ptch2 Loss Drives Myeloproliferation and Myeloproliferative Neoplasm Progression“. *The Journal of Experimental Medicine* 213 (2): 273–90. <https://doi.org/10.1084/jem.20150556>.

Decker Sarah, Johannes Finter, Aaron James Forde, Sandra Kissel, Juerg Schwaller, Thomas Sebastian Mack, **Anabel Kuhn**, u. a. 2014. „PIM Kinases Are Essential for Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Survival (PIM2/3) and CXCR4-Mediated Microenvironmental Interactions (PIM1)“. *Molecular Cancer Therapeutics* 13 (5): 1231–45. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0575-T>.

## 7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Bedanken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stefan Lohse, der mir diese Promotion ermöglicht hat und mich jederzeit durch ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung begleitet hat. Einen großen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Klaus Römer für die Erstellung des Erstgutachtens aussprechen. Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Sigrun Smola für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion am virologischen Institut bedanken.

Vielen Dank an Frau Prof. Dr. Junker für die Überlassung der TMA-Schnitte und an ihre Arbeitsgruppe für die hilfreichen Tipps zur Färbung.

Für die Unterstützung bei den Immunfluoreszenzaufnahmen möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Bernd Bufe bedanken. Ein herzliches Dankeschön auch an Arne Knoerck für die Einführung und Hilfe bei den Einstellungen für die Lebendzell-Bildgebung sowie bei der Prozessierung der Daten.

Einen Dank möchte ich auch an Frau Bender-Omlor aussprechen, die jederzeit für die Blutentnahme an meinen vielen freiwilligen Spendern zur Verfügung stand. Ein großer Dank geht an alle die mein Projekt durch ihre Blutspende unterstützt haben.

Vielen Dank an alle meine Kollegen und Kolleginnen aus der Arbeitsgruppe – Katharina, Luca, Julia, Markus, Katharina, Julia, Islam, Lucia, Pascal, Martha, Michael, Anna, Lise – für die vielen schönen Momente und das Verständnis und die Unterstützung in anstrengenden Zeiten. Für die hervorragende technische Unterstützung danke ich Jessica, Barbara und Katrin. Auf euch konnte ich mich immer verlassen. Auch bei der Diagnostik und allen anderen Arbeitsgruppen am Institut möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung während des Studiums, der Promotion und in allen Lebenslagen. Meinem Mann und meinen Kindern danke ich für ihre Liebe und Geduld.

Ein herzliches Dankeschön!

## 8 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.