Aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. O. D. Wiestler
Arbeitsgruppe Apoptoseregulation
Leiter: Dr. H. Walczak

Das tumortherapeutische Potential optimierter Agonisten der Rezeptoren des Apoptose-induzierenden Liganden TRAIL

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von

Manuela Schader

aus Bürstadt

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 03.11.2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent: Prof. Dr. M. Eilers
Koreferent: Prof. Dr. F. Czubayko

Zusammenfassung

Trotz der Entwicklung neuer Wirkstoffen und verbesserter Therapien ist die Bekämpfung von Tumoren weiterhin eine große Herausforderung. Apo-2L oder „tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis ligand“ (TRAIL), TRAIL, ist ein Mitglied der TNF-Familie und ein vielversprechendes Protein für die Krebstherapie, weil es selektiv in transformierten, nicht aber in gesunden Zellen Apoptose induziert. Zudem scheint das TRAIL-System die Resistenz von vielen Tumoren gegenüber derzeitigen Behandlungs-Strategien, die im wesentlichen aus Chemotherapie und Bestrahlung bestehen, überwinden zu können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zuerst rekombinante multimerisierte Einzelkettenantikörperfragmente mit den Spezifitäten anti-TRAIL-R2 und anti-CD95 (APO-1/Fas) hergestellt und charakterisiert. Aus Hybridomzellen, die monoklonale Antikörper gegen TRAIL-R2 und CD95 produzieren, wurden nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese die für die variablen schweren und leichten Antikörperketten (V_H und V_L) kodierenden Gene mittels PCR amplifiziert. Die Herstellung der Expressionsvektoren erfolgte durch C-terminale Fusion der V_H- und V_L-Expressionskassetten an die Multimerisierungsdomäne eines modifizierten Leuzin-Zippers. Nach Transformation von *E.coli* mit den Expressionsvektoren und Expression der rekombinanten Proteine wurde die Spezifität und Aktivität der scFv-anti-TRAIL-R2- und scFv-anti-APO-1-Fragmente nach erfolgreicher *in vitro* Rückfaltung untersucht. Funktionelle Bindung von scFv-anti-TRAIL-R2-Antikörperfragmenten konnte auf TRAIL-R2-exprimierenden Tumorzellen durch FACS-Analyse nachgewiesen werden. Die lytische Aktivität des Antikörperderivates auf verschiedenen Tumorzellen war nur minimal. Im Falle des scFv-anti-APO-1-Antikörperfragmentes konnte sowohl Bindung, als auch zytotoxische Aktivität auf CD95-exprimierenden Tumorzellen gezeigt werden. Das agonistische Potential war jedoch nicht höher als beim Ausgangsantikörper anti-APO-1.

Zudem wurde in dieser Arbeit eine hochaktive rekombinante Form von TRAIL, IZ-TRAIL, entwickelt. Rekombinant in *E.coli* exprimiertes IZ-TRAIL konnte in großen Mengen durch sequentielle Affintitätschromatographie gereinigt werden. Hohe anti-

tumorale Wirksamkeit von IZ-TRAIL als Einzeltherpeutikum sowie in Kombination mit Chemotherapeutika wurde auf zahlreichen Tumorzellen *in vitro* gezeigt. Trotz der hohen Wirksamkeit auf Tumorzellen, konnte keine Zytotoxizität in der Maus und auf frisch isolierten primären humanen Hepatozyten, auch in Kombination mit diversen Chemotherapeutika nachgewiesen werden. Mit IZ-TRAIL wurde eine TRAIL-Version entwickelt, die im Vergleich zu nicht getaggten TRAIL-Versionen eine hohe anti-tumorale Wirkung hat, und gleichzeitig für primäre Zellen nicht toxisch ist.

Abstract

Despite the development of new drugs and the improvement of therapies, the fight against cancer is still ongoing. Apo-2L or tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis ligand, TRAIL, is one of several members of the TNF family and due its selectivity towards transformed versus normal cells it bears the potential as a cancer therapeutic agent. Furthermore, the TRAIL system seems to circumvent the resistance of tumors induced by treatment with chemo- and radiotherapie.

In this study multivalent single chain antibody fragments (scFv fragments) specific for TRAIL-R2 and CD95 were generated and analysed. CDNA was prepared from isolated RNA of hybridoma cells expressing monoclonal antibody for TRAIL-R2 and CD95 (APO-1/Fas) and used for PCR amplification of heavy and light variable regions (V_H and V_L) genes. The V_H and V_L expression cassettes were C-terminally fused to a multimerisation domain of a modified leucine-zipper. The recombinant proteins were produced by transformation of *E.coli* with the generated expression leucine zipper plasmids. Specificity and activity of the *in-vitro*-refolded scFv-anti-TRAIL-R2 and scFv-anti-APO-1 antibody fragments have been evaluated. The specific binding of the scFv-anti-TRAIL-R2 fragment to TRAIL-R2 expressing tumor cells was confirmed by FACS analysis. Only minimal lytic activity of the scFv-anti-TRAIL-R2 fragment on a variety of tumor cells could be detected. In the case of the scFv-anti-APO-1 fragments, specific binding as well as lytic activity was observed. However, compared to the parental anti-APO-1 antibody the potential of this recombinant antibody was not increased.

In addition, a highly active recombinant version of TRAIL, IZ-TRAIL, was generated in this study. IZ-TRAIL was recombinantly in *E.coli* expressed and purified in large scale by sequential affinity chromatography. The anti-tumoral efficacy of IZ-TRAIL alone or in combination with different chemotherapeutic drugs was evaluated on a variety of tumor cells. Besides the high apoptosis-inducing activity on cancer cells, no toxicity in mice and on freshly isolated human hepatocytes of either IZ-TRAIL alone or in combination with diverse chemotherapeutic drugs was observed. Therefore, in contrast

to non-tagged versions of TRAIL this recombinant IZ-TRAIL shows high activity against tumor cells and, at the same time, it is not toxic to primary cells.

I EINLEITUNG 1

1 Antikörper und Antikörperfragmente 1

1.1 Antikörperstruktur 1
1.2 Monoklonale Antikörper 3
1.3 Rekombinante Antikörper 4
1.4 Wirkungsmechanismen von Antikörpern 8

2 Apoptose - Der programmierte Zelltod 10

2.1 Todesrezeptoren 11
2.2 Das TRAIL (Apo-2L)-System 16

3 Ziel der Arbeit 24

II MATERIAL UND METHODEN 25

1 Material 25

1.1 Chemikalien 25
1.2 Allgemein verwendete Lösungen und Puffer 25
1.3 Medien 27
1.4 Biologisches Material 28
1.5 Antikörper 30
1.6 Materialien für die Molekularbiologie 31

2 Methoden 35

2.1 Mikrobiologische Methoden 35
2.2 Molekularbiologische Methoden 38
2.3 Biochemische Methoden 42
2.4 Gelfiltration 50
2.5 Zellbiologische Methoden 51
2.6 Immunohistologische Methoden 54

III ERGEBNISSE: 57

1 Rekombinante Antikörper 57

1.1 Klonierung von scFv-Fragmenten gegen CD95 und TRAIL-R2 57
1.2 Analyse der rekombinanten Antikörperfragmente 67

2 TRAIL 73

2.1 Expression und Aufreinigung von verschiedenen TRAIL-Derivaten 74
2.2 Charakterisierung der rekombinanten TRAIL-Versionen 77
2.3 Aktivität der TRAIL-Proteine in vitro 79
2.4 Charakterisierung in vivo 85

IV DISKUSSION 88

1 Produktion von rekombinanten Antikörperfragmenten für die Aktivierung von Todesrezeptoren 89

1.1 Konstruktion der Antikörperfragmente 89
1.2 Expression und in vitro Faltung der scFv-Antikörperfragmente 90
1.3 Charakterisierung der scFv-Antikörperfragmente 92

2 IZ-TRAIL 95

2.1 IZ-TRAIL-Aktivität 95
2.2 IZ-TRAIL als Therapeutikum 98

V ANHANG 100

1 Abkürzungen 100

2 Literatur 105

3 Lebenslauf 116

4 Verzeichnis der akademischen Lehrer 118

5 Danksagung 119

6 Ehrenwörtliche Erklärung 120

I EINLEITUNG

1 Antikörper und Antikörperfragmente

Die technologischen Fortschritte der vergangenen 10 Jahre haben monoklonale Antikörper zu einer bedeutenden Substanzklasse der sogenannten Biotherapeutika werden lassen. Insbesondere seit die Produktion humanisierter Antikörper möglich ist (Hurle and Gross, 1994; Jolliffe, 1993; Sandhu, 1994; Steplewski et al., 1988), finden sich Anwendungsgebiete in der Onkologie (Segal et al., 1999; Weiner, 1999), sowie in der Behandlung von Infektionskrankheiten und Autoimmunerkrankungen (Deo et al., 1997; Mouser and Hyams, 1999).

1.1 Antikörperstruktur

Die molekulare Stuktur der Antikörpermoleküle konnte in den späten sechziger Jahren aufgeklärt werden (Edelman et al., 1969). Antikörper bestehen aus Polypeptidketten unterschiedlicher Molekülgrößen, die über kovalente und nichtkovalente Bindungen miteinander in Verbindung stehen. Man kann eine leichte (L) Kette mit einer Größe von ca. 24 kDa von einer ca. 55 kDa großen schweren Kette (H), welche die Immunglobulin (Ig)-Klasse bestimmt, unterscheiden. Je zwei identische L- und H-Ketten bilden nach paarweiser Zusammenlagerung ein IgG-, IgD- oder ein IgE-Molekül. Ein IgM-Molekül besteht aus einem Pentamer fünf monomerer Grundeinheiten, IgA kommt als sezerniertes Immunglobulin sowohl in monomerer als auch polymerer Form vor. Jede L- und H-Kette eines Ig setzt sich aus mehreren globulären Domänen zusammen, die aus ungefähr je 100 Aminosäuren bestehen. Je nach Ig-Klasse besteht die H-Kette aus drei oder vier „konstanten“ (C-) Domänen und einer „variablen“ (V-) Dömäne, die leichte Kette setzt sich aus je einer V- und C-Domäne zusammen (Abb. 1).

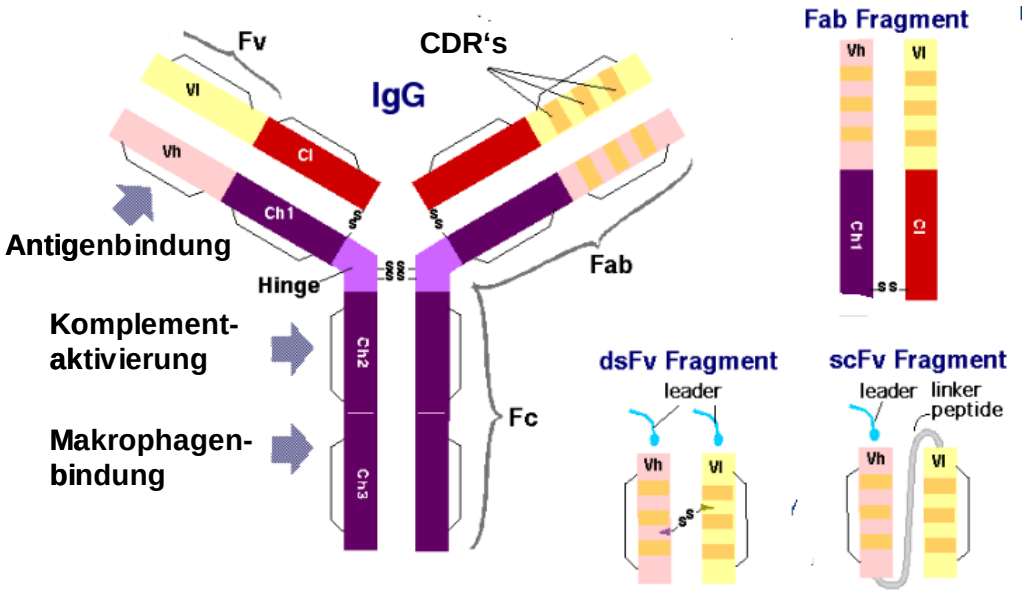


Abb. 1 : Schematische Darstellung eines Immunglobulins (IgG) und davon abgeleiteten antigenbindenden Fragmenten. Abkürzungen: VH: variable Region der schweren Kette; VL: variable Region der leichten Kette; CH1-CH3: konstante Regionen der schweren Kette; CL: konstante Region der leichten Kette, Hinge: Hinge-Region (Verbindungsgelenk); Fab: antigenbindendes Fragment; Fc: kristallisierbares Fragment; Fv: variabler Bereich; CDR's: complementary determining regions; Linker: Peptidverbindung zur Verknüpfung von VH und VL; -SS-: Disulfidbrücken (Abb. von S. Dübel, modifziert).

Die N-terminale V-Domäne jeder Kette zeigt im Vergleich mit den C-Domänen eine hohe Sequenzvariabilität, so dass bereits früh vermutet wurde, dass die variablen Domänen die Antigenbindungsstelle repräsentieren (Kabat and Wu, 1971). Untersucht man die Sequenzen innerhalb der V-Domäne näher, so zeigen sich neben relativ konservierten Bereichen („framework regions"= FR) drei Bereiche extremer Sequenzvariabilität, die hypervariablen Regionen („complementary determining regions" = CDR).

Kristallographische Untersuchungen haben die strukturellen Antigenbindungsstellen schliesslich aufklären können. Die FR-Regionen bilden ein Gerüst aus einer doppelten ß-Faltblattstruktur, aus dem sich in einer definierten räumlichen, schleifenähnlichen Anordnung die Antigenbindungsstellen erheben. Die relative Anordnung der drei Schleifen der leichten sowie der schweren Kette zueinander bestimmen die strukturelle Antigenbindungsstelle (Poljak et al., 1973; Segal et al., 1974).

Die konstanten Regionen des Fc-Abschnitts eines Antikörpers sind für die

Effektorfunktionen des Moleküls verantwortlich. Die antikörperabhängige komplementvermittelte Zytotoxizität wird durch Bindung von C1q an die CH2-Domäne des Antikörpers (Duncan and Winter, 1988) eingeleitet, allerdings sind beim Menschen nur die IgG3- und IgG1-Subtypen zur klassischen Komplementaktivierung in der Lage. Die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität wird über die Bindung des Antiköpers mit seinem Fc-Fragment an die Fc-Rezeptoren (FcR) der Effektorzelle vermittelt. Es sind drei verschiedene Fc-Rezeptoren bekannt, die abhängig vom Effektorzell-Typ und dem Aktivierungsgrad der Effektorzellen exprimiert werden. FcγRI ist ein hochaffiner Rezeptor für monomeres IgG und wird auf humanen aktivierten Monozyten und Makrophagen exprimiert. FcγRII ist ein niedrigaffiner Rezeptor auf der Oberfläche von Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Thrombozyten. FcγRIII wird auf neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass monozytäre FcγRI und FcγRII sowie auf NK-Zellen exprimierte FcγRIII effiziente Effektormoleküle zur Lyse von Tumorzellen sind (Fanger et al., 1999; Graziano and Fanger, 1987).

1.2 Monoklonale Antikörper

Die Möglichkeit der Herstellung monoklonaler Antikörper (mAk) definierter Spezifitäten mit Hilfe der Myelomzell-Fusionstechnik eröffnete neue Möglichkeiten in der Immundiagnostik und Therapie verschiedenster Erkrankungen.

Die Herstellung solcher Hybridomzelllinien erfolgt in der Weise, dass nach Immunisierung eines Nagetieres mit einem bestimmten Antigen Lymphozyten aus der Milz des Tieres mit einer immortalen Myelomzelllinie fusioniert werden. Jede so entstandene Hybridzelle produziert einen Antikörper einer bestimmten Spezifität. Durch Einzelzell-Klonierung können Zelllinien gewonnen werden, die einen Antikörper mit definierter Spezifität sezernieren. Einzelklone können dann hinsichtlich der gewünschten Spezifität gegenüber dem Antigen untersucht und in großen Mengen produziert werden (Koehler, 1975).

Der diagnostische und therapeutische Einsatz solcher muriner monoklonaler Antikörper beim Menschen ist limitiert durch die gegen das Maus-Protein gebildeteten Antikörper im Empfänger („human anti–mouse antibodies = HAMA). Die HAMA-Antwort lässt

sich durchschnittlich nach 1-2 Wochen nachweisen (Schroff et al., 1985) und kann bei Reexposition, entsprechend der Kinetik einer sekundären Immunantwort, allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock auslösen (Sears et al., 1982). Im Rahmen dieser HAMA-Antwort werden Antikörper gebildet, die zu ca. 90% gegen Epitope der konstanten Domänen des Maus-Antikörpers gerichtet sind (Bruggemann et al., 1989). Des weiteren werden die murinen monoklonalen Antikörper bei wiederholter Gabe durch die induzierten anti-Maus-Antikörper rasch neutralisiert (Miller et al., 1983) und durch den schnellen Metabolismus der entstehenden Immunkomplexe die biologischen Halbwertszeiten im menschlichen Serum deutlich verkürzt (Khazaeli et al., 1988). Eine Möglichkeit, um die Immunogenität dieser Maus-Antikörper für den Menschen zu reduzieren, ist daher die Herstellung von chimären Antikörpern, welche aus dem antigenbindenden variablen Bereich (Fv) eines monoklonalen Maus-Antikörpers definierter Spezifität und den konstanten Bereichen eines humanen Immunglobulins bestehen (Morrison et al., 1984). Um die Immunogenität monoklonaler Maus-Antikörper weiter zu reduzieren, können ihre CDR-Regionen auf ein humanes Antikörper-Gerüst übertragen werden. Durch dieses als „CDR-grafting“ bezeichnete Verfahren werden humanisierte Antikörper generiert, in denen nur noch die CDR-Regionen murinen Ursprungs sind (Morrison, et al., 1984; Winter and Harris, 1993). Auch aus transgenen Mäusen mit humanem Antikörpergenrepertoire können unter Verwendung der bewährten Hybridomtechnologie humane Antikörper generiert werden (Fishwild et al., 1996; Jakobovits, 1995).

1.3 Rekombinante Antikörper

Durch die in den letzten Jahren entwickelten gentechnischen Methoden eröffneten sich neue Möglichkeiten, die geschilderten Probleme bei diagnostischer oder therapeutischer Gabe monoklonaler Antikörper (mAk) zu umgehen. Durch die Einschleusung von Antikörpergenen mit Hilfe von Vektoren in die unterschiedlichsten Organismen, wie Bakterien, Hefen, Pflanzen, Baculoviren und Säugertier-Zellkultur ist es möglich geworden, Antikörper oder Antikörper-Fragmente mit drastisch verminderter Immunogenität unter Erhaltung der Spezifität *in vitro* herzustellen.

Die Wirksamkeit erster therapeutisch eingesetzter rekombinanter Antikörper beim Menschen konnte bereits an großen Patientenkollektiven gezeigt werden. Viele Wirkstoffe sind inzwischen zur Behandlung therapierefraktärer Non-Hodgkin-Lymphome (Leget and Czuczman, 1998), zur Palliativtherapie metastasierter Mammakarzinome (Robertson, 1998), zur adjuvanten Behandlung von Kolorektalkarzinomen oder zur Behandlung von Morbus Crohn (Hanauer et al., 1998) zugelassen. Die Liste der für die Therapie von viralen und inflammatorischen Krankheiten sowie in der Krebsbehandlung zugelassenen Antikörper wächst ständig (Tabelle 1).

Produkt	Zielmolekül	AK	Indikation	Unternehmen	Zulassung
Orthoclone Okt 3	CD3	mAk	Transplantat-abstoßung	Orthio-Biotech, Janssen-Cilag	1986
ReoPro Abciximab	gpIIb/IIIa (Intergrin)	Fab	Thrombose Gerinnungshemmung	Centocor/Lilly	1995
Humaspect Votumumab		mAk	Detektion des Kolon-Karzinoms	Organon Teknika	1996
Zenapax Daclizumab	CD25 (IL-2RαKette)	mAk (hum.)	Tranplantat-Abstoßung	Protein Design Labs, Hoffmann La Roche	1999
Rituximab Mabthera	CD20	mAk (chim.)	B-Zell Lymphome	Genentech, IDEC, Zenyaku Kogyo, Hoffmann-La Roche	1998
Remicade Infliximab	TNF-α	mAk (chim.)	therapierefrakterer Colitis Ulcerosa	Centocor, Schering-Plough, Tanabe Seiyaku	1999
Simulect Basiliximab	CD25 (IL-2R)	mAk (chim.)	Akute Nierentranspantat-Abstoßung	Novartis	1998
Synagis Palivizumab	RSV-F Protein	mAk (hum.)	RSV Infektionen	Medimmune, Abbott Lab, Boehringer Ingelheim	1999
Herceptin Trastuzumab	HER2-Rezeptor	mAk (chim.)	Brustkrebs	Genentech	2000
MabCampath Alemtuzumab	CD52	mAk (hum.)	Chronisch lymphozytische Leukämie (Non-Hodgkin-Lymphom)	Millenium&Ilex UK Ltd.	2001
Humira	TNF-α	human	Rheumatoide Arthritis	CAT/Abbott	2003
Erbitux	VEGF	mAk (chim.)	Darmkrebs (Antiangionese)	Imclone/BMS/Merck	2004
Avastin	VEGF	MAk (hum.)	Darmkrebs (Antiangionese)	Genentech/Roche	2004

Tabelle 1: In Deutschland zugelassene therapeutischeAntikörper. Quelle: Informationssekretariat Biotechnologie (ISB). Abkürzungen: chim.: chimärisiert; hum.: humanisiert.

1.3.1 Fab-Fragmente

Monovalente Fab-Fragmente und divalente F(ab')$_2$-Fragmente, die aus der leichten Kette (V_L + C_L) und den ersten beiden Domänen der schweren Kette (V_H + C_{H1}) eines Antikörpers bestehen, können konventionell durch Proteaseverdau (Papain, Pepsin) monoklonaler Antikörper hergestellt werden (Parham, 1983). Alternativ können solche Fragmente auch rekombinant produziert und in *E. coli* exprimiert werden (Better et al., 1988).

Eine Möglichkeit zur Herstellung bispezifischer Fab-Fragmente (Yokota et al., 1992) bsF(ab')$_2$ besteht in der chemischen Kopplung von zwei Fab-Fragmenten über Disulfidbrücken oder Thioetherverbindungen (Rodrigues et al., 1992). Des weiteren können zwei Fab'-Fragmente mit Hilfe der Leuzin-Zippers der beiden Transkriptionsfaktoren Jun und Fos zu bispezifischen Fragmenten verknüpft werden. Fos und Jun formen über hydrophobe Wechselwirkungen von Leuzin-Resten ein Heterodimer (Kostelny et al., 1992). Die Herstellung Jun/Fos–stabilisierter bispezifischer Fab-Fragmente erfolgt in der Weise, das 3' der CH1-Domäne des Fab-Fragments der ersten Spezifität eine für Jun, am 3' Ende des Fab-Fragments der zweiten Spezifität eine für Fos kodierende Sequenz kloniert wird, so dass nach Expression der Konstruke in murinen Myelom-Zellen oder in E.coli Jun/Fos-stabilisierte Heterodimere ausgebildet werden.

1.3.2 Fv- und scFv-Fragmente

Die Expression funktioneller Fv-Fragmente in *E.coli* gelang zum ersten Mal Ende der 80er Jahre. Nach Fusionierung der V_H- und der V_L-Gensegmente mit einer periplasmatischen bakteriellen Signalsequenz und Klonierung der beiden Fragmente in einen bakteriellen Expressionsvektor wurden korrekt gefaltete Heterodimere aus dem Periplasma der Bakterienzelle isoliert. Die Affinitätskonstante entsprach der des nativen Antikörpers (Skerra and Pluckthun, 1988). Die variablen Domänen des Fv-Fragments sind nicht-kovalent miteinander verbunden und es kann zur Dissoziation der beiden Domänen kommen, insbesondere bei niedrigen Proteinkonzentrationen (Glockshuber et al., 1990). Um die Bildung äquimolarer, heterodimerer Formationen solcher Fv-

Fragmente zu erzwingen, wurde zwischen die beiden Gensegmente eine für ein synthetisches Peptid kodierende Sequenz kloniert, die das carboxyterminale Ende der V_L-Domäne mit dem Aminoterminus der V_H-Domäne flexibel verbindet („single chain"-Fv = scFv) (Huston et al., 1988). Die Affinitäten solcher Konstrukte sind mit denen monoklonaler Antikörper vergleichbar (Bird et al., 1988). Das „Linker"-Peptid, welches die beiden variablen Domänen miteinander verbindet, muß hydrophil sein sowie eine ausreichende Länge und Flexibilität besitzen, damit die beiden Domänen eine intakte Antigenbindungsstelle ausbilden können. Um den Abstand von 35-40 Å zu überbrücken, beträgt die Mindestlänge für einen Linker 12 Aminosäuren (Pantoliano et al., 1991). Eine häufig verwendete Aminosäuresequenz, welche die erwähnten Anforderungen erfüllt ist $(Gly_4Ser)_3$ (Huston, et al., 1988).

Beim Einsatz dieser rekombinanten Antikörper-Fragmente *in vivo* konnte im Vergleich mit dem korrespondierenden monoklonalen Ig-Molekül gezeigt werden, dass scFv-Antikörper schneller und tiefer in den Tumor eindringen (Yokota, et al., 1992). Die scFv-Ak werden jedoch aufgrund ihres niedrigen Molekulargewichts nach kurzer Zeit über die Niere eliminiert, was zu einer durchschnittlichen biologischen Halbwertszeit von nur 3,5 Stunden im menschlichen Serum führt (Huston et al., 1996). Diese beiden Eigenschaften können gut zur Diagnostik mittels Immunszintigraphie genutzt werden, indem der scFv-Antikörper an ein kurzlebiges Radionuklid gekoppelt wird. So kann beispielsweise im Rahmen der Tumornachsorge ein Rezidiv sehr früh erkannt werden, auch wenn ein entsprechender Nachweis mit konventionellen bildgebenden Verfahren zu diesem Zeitpunkt noch nicht erbracht werden kann. Gleichzeitig wird die Strahlenbelastung durch die kurze biologische Halbwertszeit des Antikörper-Fragments sehr gering gehalten (Yokota et al., 1993).

1.3.3 Bispezifische scFv-Fragmente

Bispezifische scFv-Fragmente $bs(scFv)_2$ können durch Verknüpfung zweier scFv-Fragmente mit einem zusätzlichen flexiblen Linkerpeptid konstruiert werden (Mallender and Voss, 1994). Solche Moleküle werden entweder durch Renaturierung aus Einschlusskörpern, aus dem Periplasma von *E.coli* oder aus eukaryontischem Kulturüberstand gewonnen (De Jonge et al., 1995). Werden $bs(scFv)_2$ eukaryontisch

exprimiert, zeigen sie mit den parentalen scFv-Antikörpern vergleichbare Bindungsaffinitäten (Hayden et al., 1994). Bei der prokaryontischen Expression bilden sich präferentiell unlösliche Aggregate im Zytoplasma der Bakterien (Gruber et al., 1994). Neben einer geringen Proteinmenge durch ineffiziente Renaturierung der bs(scFv)2-Fragmente aus bakteriellen Einschlusskörpern ist die korrekt Faltung der vier mit Linkerpeptiden verbundenen Domänen erschwert und kann zum funktionellen Antigenbindungsverlust führen (Mack et al., 1995).

1.4 Wirkungsmechanismen von Antikörpern

Der größte Teil von unkonjugierten mAks findet in der Klinik im Bereich von Autoimmunität und Immunsuppression seine Anwendung. Die Antikörper agieren, indem sie Immunantworten blockieren oder auch modulieren. Entweder blockieren sie ein Schlüssel-Cytokin oder eine Rezeptor-Liganden-Interaktion im Immunsystem. Ein gutes Beispiel ist die klinische Anwendung des anti–tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) mAk (Infliximab) bei der Behandlung von Rheumatischer Arthritis (RA) und Morbus Crohn (Saez-Llorens et al., 1998; Sandborn and Hanauer, 1999). Der mAk bindet und blockiert lösliches TNF-alpha und unterdrückt so das proinflammatorische Signal. Weitere TNF-Antagonisten in der Therapie von RA sind der mAk Humira und Enbrel ein Fusionsprotein aus der extrazellulären TNF-R-Domäne und IgG1-Fc-Region. Ein Beispiel für die Blockierung von Rezeptor-Liganden Interaktionen ist der anti-CD25 mAK, der den Rezeptor für Interleukin-2 auf T-Zellen blockiert und somit die Interleukin-2 vermittelte Proliferation aktivierter T-Lymphozyten bei Allotransplantationen verhindert (Cahn et al., 1995).

Antikörper finden auch Anwendung in der Behandlung von Tumoren. Um Antikörper effektiv in der Krebstherapie einsetzen zu können, sollten sie in direkter oder indirekter Weise Tumorzellen eliminieren. Oftmals wird die Zytotoxizität eines therapeutischen Antikörpers über die Fc-abhängige Rekrutierung von Effektorzellen des Immunssytems vermittelt (Clynes et al., 2000; Ward and Ghetie, 1995). Eine weitere Möglichkeit besteht darin die tumorspezifischen Antikörper mit einem Toxin (Immunotoxin), einem radioaktiven Atom (Radioimmuntherapie) oder einem Chemotherapeutikum zu konjugieren. Nach dem Andocken der Antikörper an die Tumorzelle können diese

Substanzen gezielt die Zelle zerstören. Antikörper können auch durch die Induktion von Apoptose oder durch die Modulierung von anti-apoptotischen Signalkaskaden Tumorzellen eliminieren (Benini et al., 2001; Liu and Fan, 2001; Reed, 2002; Trauth et al., 1989).

Mit Rituximab (anti-CD20) und Trastuzumab (anti-Her2/neu) sind zwei Antikörper in der Anwendung, die anscheinend direkt die rezeptorvermittelte Signalkaskade beeinflussen und somit ihre zytotoxische Wirkung ausüben. Im Falle von Rituximab beruht die Wirkung auf zahlreichen Veränderungen, die die Signalkaskade betreffen, wie einer erhöhten Tyrosin-Phosphorylierung, einer Aktivierung von Protein-Kinase C und der Hochregulation von Myc (Cragg et al., 1999). Viele Antigene auf Tumoren sind Mitglieder von Wachstumsfaktor-Rezeptor-Familien und übermitteln mitogene Signale, so dass die Wirkung der Antikörper in der Blockierung der Ligand-Rezeptor Interaktion liegt. Abb. 2 gibt einen Überblick über mögliche Strategien von therapeutischen Antikörpern, die zur Apoptoseinduktion in Tumorzellen führen können.

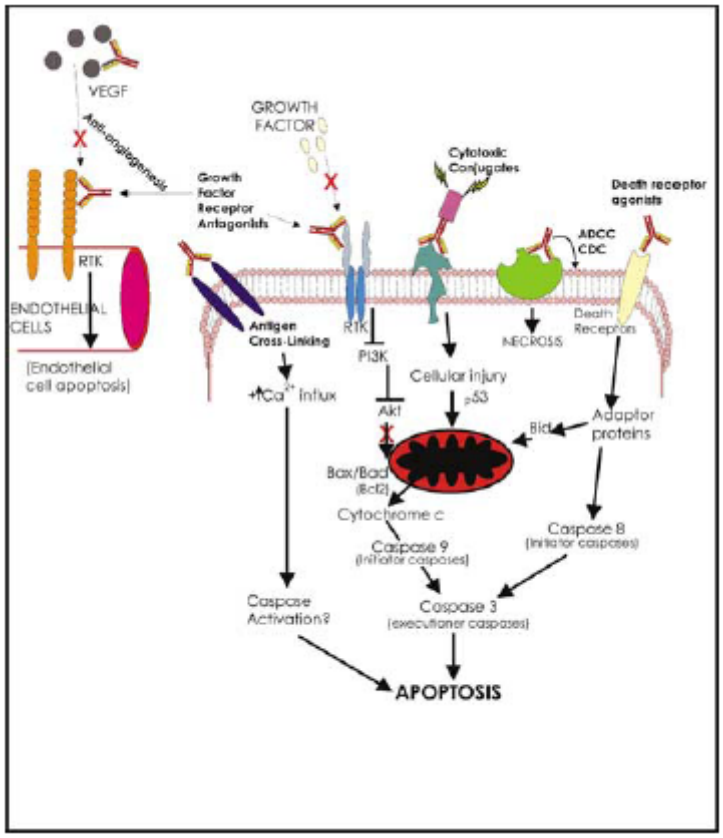


Abb. 2: Strategien zur Eliminierung von Tumorzellen durch therapeutische Antikörper (Ludwig et al., 2003) 1. Blockade von Mitgliedern der Wachstumsfaktor-Rezeptor-Familie oder eines Cytokins. 2. ADCC („antibody-directed-cellular-cytoxicity"): Ak-vermittlelte zelluläre Zytotoxizität. 3. Tumorspezifische Antikörper konjugiert mit einem Toxin (Immunotoxin), einem radioaktiven Atom (Radioimmuntherapie) oder einem Chemotherapeutikum. 4. Agonistische Todesrezeptor-spezifische-Antikörper.

2 Apoptose - Der programmierte Zelltod

Bereits im zweiten nachchristlichen Jahrhundert hatte Galenus Galen die Regression von larvalen und fetalen Strukturen im Laufe der Ontogenese beschrieben (Barclay, 1944; Clarke and Clarke, 1996). In der Mitte des letzten Jahrhunderts erkannte Carl Vogt, dass Zellen einen vorhersagbaren, „programmierten" Tod sterben können (Vogt, 1842). 1951 konnte der Embryologe Glucksmann die Regression fätaler Strukturen auf den Tod einzelner Zellen zurückführen (Glucksmann 1951). Kerr, Wyllie und Currie schließlich beobachteten an toxinbehandelten Leberzellen eine den sterbenden Embryonalzellen vergleichbare Morphologie und prägten hierfür den Begriff „Apoptose" (Kerr et al., 1972).

Schon bald wurde erkannt, dass Apoptose nicht nur in der Embryogenese von Bedeutung ist (Los et al., 1999; Vaux and Korsmeyer, 1999). Eine besondere Rolle spielt sie bei der Erhaltung der Gewebshomöostase. Des weiteren werden durch virale Infektionen oder genomische Mutationen geschädigte Zellen mittels Apoptose entfernt (Thompson, 1995). Apoptose kann durch verschiedene Stimuli wie Hitzeschock, Glucokortikoide, γ- und Röntgenstrahlung, Zytokine, Wachstumsfaktorenentzug und pharmakologische Substanzen ausgelöst werden.

Im Gegensatz zur Nekrose, einer weiteren Form des Zelltods, ist die Apoptose durch die Aktivierung regulierbarer katabolischer Enzyme, wie Proteasen und Nukleasen, charakterisiert und führt zu einer Vielzahl morphologischer und molekularer Veränderungen.

Diese Veränderungen umfassen das Schrumpfen der Zelle und die Kondensation des Chromatins, welches durch spezielle Endonukleasen abgebaut wird. Durch die internukleosomale Spaltung von DNA entsteht die nach der Elektrophorese charakteristische „DNA-Leiter", die aus DNA-Stücken mit einer Länge von 200 Basenpaaren und ganzzahligen Vielfachen davon besteht (Wyllie et al., 1980). Ein Verlust der Membranstabilität führt zur Ausstülpung der Zelle (Zeiose). Dies mündet schließlich im Abschnüren membranumschlossener Teile der Zelle, die als apoptotische Körperchen bezeichnet werden. Die schrumpfende Zelle und die apoptotischen Körperchen werden von Makrophagen und Nachbarzellen an Membranveränderungen

wie der Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Aussenseite der Plasmamembran erkannt und beseitigt (Duvall et al., 1985; Fadok et al., 1992; Savill et al., 1990).

Im Gegensatz dazu ist die Nekrose keinem geregelten Mechanismus zum Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren unterworfen. Nekrose ist durch ein Anschwellen der Zelle (Oncose) charakterisiert, was zur Zerstörung der Plasmamembran und zur Freisetzung des Zytosols und von Zellorganellen in den interzellularen Raum führt. Eine inflammatorische Reaktion mit Gewebeschädigung ist die Folge. Trotz der gegensätzlichen Charakteristika von Nekrose und Apoptose gibt es Hinweise dafür, dass beide Prozesse miteinander gekoppelt sein können. So kann die Blockade eines apoptotischen Signalweges zur Nekrose einer Zelle führen (Vercammen et al., 1998).

2.1 Todesrezeptoren

Mit CD95 (APO-1/Fas) wurde 1989 zum ersten Mal ein Oberflächenmolekül beschrieben, das in der Lage ist, Apoptose auszulösen (Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992; Trauth, et al., 1989; Yonehara et al., 1989).

CD95 ist ein differentiell glykosyliertes Typ I Transmembranprotein, welches in den meisten Säugetiergeweben exprimiert wird (Leithauser et al., 1993). Es gehört zur TNF-/NGF-Rezeptorfamilie (Bodmer et al., 2002; Locksley et al., 2001). Charakteristisch für diese Familie ist das Vorhandensein von zwei bis sechs extrazellulären cysteinreichen Domänen. Die biologischen Effekte, die von Rezeptoren dieser Familie vermittelt werden, umfassen verschiedene Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Aktivierung oder Apoptose (Bodmer, et al., 2002; Locksley, et al., 2001).

Eine Subfamilie bilden die sogenannten Todesrezeptoren, die sich durch die gemeinsame Eigenschaft auszeichnen, Apoptose auszulösen (Peter and Krammer, 1998). Derzeit sind sechs humane Todesrezeptoren bekannt: TNF-R1 (CD120a), CD95 (Apo-1/Fas), TRAMP (Apo-3/LARD/DR3/WSL1), TRAIL-R1 (Apo-2/DR4), TRAIL-R2 (DR5/KILLER/TRICK2/Apo2) und DR6 (Ashkenazi and Dixit, 1999; Schulze-Osthoff et al., 1998).

Strukturell zeichnen sich die Todesrezeptoren durch eine ungefähr 80 Aminosäure lange, homologe intrazelluläre Domäne aus, die als Todesdomäne (engl.: death domain,

DD) bezeichnet wird und für die Apoptoseinduktion essentiell ist (Itoh et al., 1993; Tartaglia et al., 1993).

Todesrezeptoren wie CD95 und TNF-R1 können durch agonistische Antikörper aktiviert werden (Trauth, et al., 1989). Unter physiologischen Bedingungen vollzieht sich die Aktivierung der Todesrezeptoren durch die Bindung spezifischer Liganden der Todes-Liganden-Familie. Mit Ausnahme von LTα sind die Todesliganden der TNF-Familie Typ II Transmembranproteine, von denen eine lösliche Form durch die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen generiert werden kann. Einige Studien haben die zytotoxische Aktivität des löslichen Liganden (CD95L) gezeigt (Krammer, 1999), wohingegen andere Arbeiten darauf hinweisen, dass die Zytotoxizität nicht signifikant ist, oder der lösliche CD95L gar Apoptose inhibiert (Schneider et al., 1998; Suda et al., 1997).

2.1.1 Das CD95-System

2.1.1.1 Rezeptoraggregation als Stimulus

Mit der Entdeckung spezifischer Rezeptoren, die Apoptose auslösen können, war eine Grundlage geschaffen, um die zur Apoptose führenden Signalwege zu studieren. Erste Hinweise auf den Ursprung des Signals lieferte die Strukturanalyse des TNF-R1 im Komplex mit LTα. Es konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor nach Bindung des Liganden als Trimer vorliegt (Banner et al., 1993), wodurch das Signal in das Innere der Zelle weitergeleitet wird. Funktionelle Studien zeigten, dass ein CD95-Dimer keine Apoptose auslösen kann, wohingegen ein multimerisierter Rezeptor in der Lage ist, das apoptotische Signal in die Zelle weiterzuleiten (Dhein et al., 1992). In einer neueren Studien wurde gezeigt, dass nur ein CD95-Hexamer, nicht jedoch ein CD95-Trimer, in der Lage ist, die apoptotische Signalkaskade einzuleiten (Holler et al., 2003).

Zudem wurde eine Region in der äußersten cysteinreichen Domäne verschiedener Todesrezeptoren, u.a. CD95 beschrieben, über welche die Rezeptoren bereits vor Stimulation interagieren und Trimere bilden (Chan et al., 2000; Papoff et al., 1999; Siegel et al., 2000). Diese Domäne wird PLAD (engl.: pre-ligand binding assembly domain) genannt. Die Bindung des Todesliganden an den Rezeptor induziert

wahrscheinlich somit die Vernetzung von präformierten Di- oder Trimeren zu Multimeren (Algeciras-Schimnich et al., 2002).

2.1.1.2 Der Tod-induzierende Signalkomplex

Nach Stimulation von CD95 multimerisiert der Rezeptor und es bildet sich innerhalb von Sekunden ein Proteinkomplex aus, der als Tod-induzierender Signalkomplex (engl.: death-inducing signaling complex, DISC) bezeichnet wird (Kischkel et al., 1995).
Oligomerisierter CD95-Rezeptor bildet mit seiner intrazellulären DD die Grundstruktur, an die das Adapterprotein FADD (Mort1) (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995; Kischkel, et al., 1995) über seine C-terminale DD angelagert wird. FADD selbst übt keine enzymatische Funktion aus, sondern bindet über eine zusätzliche charakteristische Domäne, die am N-Terminus von FADD lokalisiert ist und als DED ("death effector domain") bezeichnet wird mit Procaspase-8 und –10 Effektormoleküle. Dominant negatives FADD (DN-FADD) ohne DED verhindert *in vitro* (Chinnaiyan et al., 1996b; Wajant et al., 1998) und *in vivo* (Newton et al., 1998) die CD95-vermittelte Apoptose, während überexprimiertes FADD oder der N-Terminus von FADD allein Apoptose auslösen (Chinnaiyan et al., 1996a)(Chinnaiyan et al., 1996b). Zellen von $FADD^{-/-}$-Mäusen sind resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Yeh et al., 1998; Zhang et al., 1998). Über die DED von FADD werden Procaspase-8, Procaspase-10 und cFLIP an den DISC rekrutiert (Boldin et al., 1996; Fernandes-Alnemri et al., 1996; Irmler et al., 1997a; Kischkel et al., 2001; Muzio et al., 1996; Scaffidi et al., 1997).
Die Aktivierung von Caspase-8 erfolgt über Autoproteolyse (Martin et al., 1998; Muzio et al., 1998; Yang et al., 1998) und führt zur Bildung von drei Proteinuntereinheiten: Prodomäne, p18- und p10-Untereinheit (Medema et al., 1997b; Muzio, et al., 1996). Jeweils zwei Untereinheiten von p18 und p10 bilden dabei eine heterotetramere Struktur aus, die die aktive Protease darstellt. Diese spaltet die Caspasen-3, -6 und -7, wodurch diese aktiviert werden (Enari et al., 1995; Los et al., 1995; Medema et al., 1997a; Muzio et al., 1997; Orth et al., 1996; Scaffidi, et al., 1997; Srinivasula et al., 1996). Zellen aus Caspase-$8^{-/-}$-Mäusen sind resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Varfolomeev et al., 1998).

Es gibt drei exprimierte Spleißvarianten von c-FLIP, die mit dem DISC assoziieren, $FLIP_L$ und $FLIP_S$ (Irmler et al., 1997b). Dabei handelt es sich um Inhibitoren, die die Prozessierung und Aktivierung von Procaspase-8 am DISC inhibieren (Krueger et al., 2001; Scaffidi et al., 1999). Kürzlich wurde eine weitere Isoform, $FLIP_R$ beschrieben. Interessanterweise wurde c-$FLIP_R$ nach Stimulation von CD95 am DISC von T-und B-Zellen und auch in humanen primären T-Zellen nach CD3/CD28-Stimulation gefunden. C-$FLIP_R$ hat zahlreiche Eigenschaften mit $FLIP_S$ gemein, wie die kurze Halbwertszeit und die Expressionkinetik nach Stimulation. Es ist noch nicht geklärt, wie die differentielle Expression der beiden Isoformen, $FLIP_S$ und $FLIP_R$ in verschiedenen Zellen reguliert wird und wie dadurch die physiologische Rolle der kurzen Isoform von cFLIP beeinflusst wird (Golks et al., 2005)

2.1.1.3 Die zwei CD95-Signaltransduktionswege

Beim Vergleich unterschiedlich differenzierter Zellen und verschiedener Zelllinien wurden im Hinblick auf die Signalübertragung nach CD95-Stimulation zwei Zelltypen identifiziert, die als Typ I- und Typ II-Zellen bezeichnet werden (Scaffidi et al., 1998).
In Typ I-Zellen wird die Induktion der Apoptose von der Aktivierung großer Mengen an Caspase-8 im CD95-DISC begleitet. Dieser folgt eine rasche Spaltung von Caspase-3 noch vor dem Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi m$), was eine direkte Aktivierung der Caspase-Kaskade vermuten lässt. Im Gegensatz dazu ist die DISC-Bildung in Typ II-Zellen trotz ähnlicher CD95-Expression auf der Zelloberfläche schwach. In Typ-II-Zellen ist die Auslösung der Apoptose abhängig von der Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges, einem Prozeß, der bei vielen Apoptose–auslösenden Stimuli eine entscheidene Rolle spielt (Gross et al., 2001; Kroemer et al., 1997). Starke Aktivierung von Caspasen erfolgt erst nach dem Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi m$) (Scaffidi, et al., 1998). Daraus lässt sich schliessen, das Typ II-Zellen bei der CD95-induzierten Apoptose die Mitochondrien als Verstärker nutzen, um die Exekutionsphase der Caspasen-Kaskade einzuleiten. Die Aktivierung der Mitochondrien wird durch das pro-apoptotische Bcl-2 Familienmitglied Bid vermittelt. Bid ist ein Substrat von Caspase-8. In Typ II Zellen spalten die geringeren Mengen am CD95-DISC aktivierter Caspase-8 das Molekül Bid

in tBid. Gespaltenes tBid assoziiert mit der äusseren Mitochondrienmembran und induziert den Verlust von ΔΨm und die Freisetzung apoptogener Faktoren wie z.B. AIF (Susin et al., 1996) und Cytochrom c (Liu et al., 1996). Im Zytosol binden Cytochrom c und ATP das Cofaktorprotein Apaf-1, welches dann Procaspase-9 bindet (Zou et al., 1997). In diesem als Apoptosom bezeichneten Komplex wird Procaspase-9 zum aktiven Enzym prozessiert und initiiert die Caspase-Kaskade unterhalb der Mitochondrien (Zou et al., 1999). Das Apoptosom wurde als Holoenzym beschrieben, wobei Caspase-9 die katalytische Unterheit und Apaf-1 der allosterische Regulator darstellt (Rodriguez et al., 1999)(siehe Abb. 3).

Da Mitochondrien für CD95-Typ II , aber nicht für CD95-Typ I Zellen, essentiell sind führt die Überexpression anti-apoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder wie bcl-2 oder bcl-xl zur Blockierung der Caspase-8- und Caspase-3-Aktivierung und somit zur Inhibition der Apoptose in CD95-Typ II-Zellen (Schmitz et al., 2000).

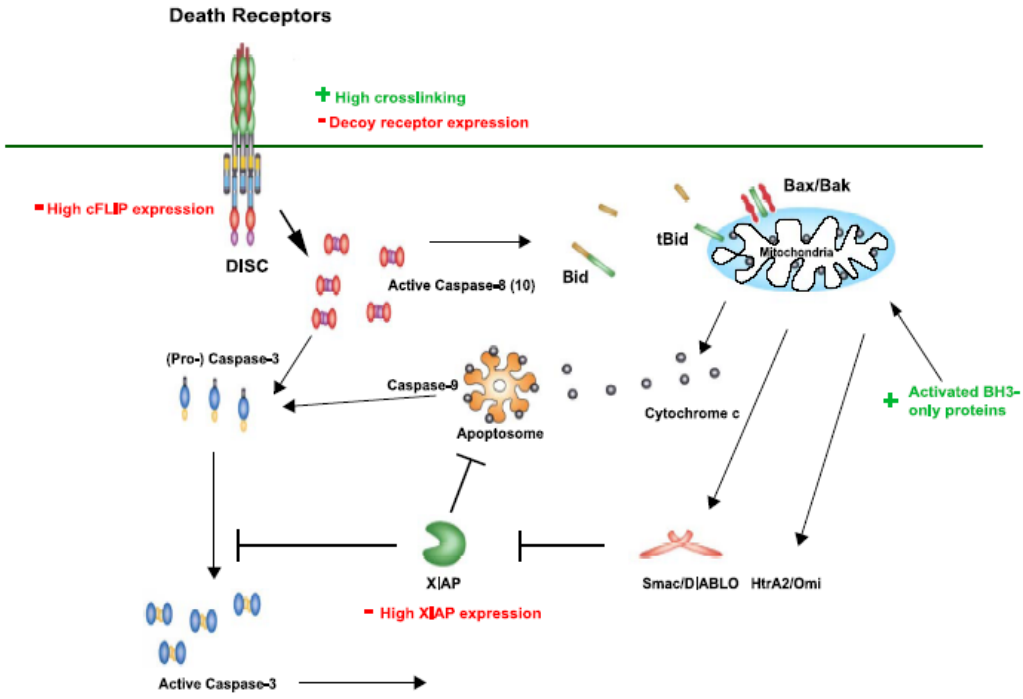


Abb. 3: Modell der extrinsischen (Todesrezeptoren) und intrinsischen (Mitochondrium) Apoptose-Induktion (Sprick and Walczak, 2004). Erläuterungen siehe Text.

2.2 Das TRAIL (Apo-2L)-System

2.2.1 TRAIL und seine Rezeptoren

Durch Homologievergleiche mit den CD95-Liganden und TNF identifizierten Wiley und Pitti ein neues Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie. Aufgrund der großen Sequenzähnlichkeit in der extrazellulären Domäne zu Apo-1 (28% identisch) und TNF (23% identisch) wurde der neue Apoptose-induzierende Ligand von Wiley et al. als TRAIL für „TNF-related apoptosis-inducing ligand“ und von Pitti et al. als Apo-2L bezeichnet (Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995).

Interessanterweise induziert TRAIL Apoptose in einer Reihe von Tumorzelllinien, nicht aber in primären nicht neoplastischen Zellen.

TRAIL ist in der Lage an fünf verschiedenen Rezeptoren zu binden. Zwei davon, TRAIL–R1/DR4 (Pan et al., 1997b; Schneider et al., 1997a) und TRAIL-R2/DR5 (MacFarlane et al., 1997; Pan et al., 1997a; Schneider et al., 1997b; Screaton et al., 1997; Walczak et al., 1997; Wu et al., 1997) sind Apoptose-induzierende Rezeptoren. TRAIL-R3, (LIT, DcR1) ein Glykosyl-Phospatidylinositol (GPI)-verankertes Oberflächenmolekül und TRAIL-R4 (TRUNDD, DcR2), charakterisiert duch eine verkürzte intrazelluläre Domäne, sowie der lösliche Rezeptor OPG haben diese Fähigkeit nicht. Die physiologische Relevanz von OPG als ein Rezeptor für TRAIL ist aufgrund der geringen Affinität von TRAIL zu OPG unter physiologischen Temperaturen wenig definiert (Truneh et al., 2000). Die Wechselwirkung von OPG mit seinem spezifischen Liganden, RANKL (Lacey et al., 1998), ist vor allem an der Knochen-Homöostase beteiligt (Lacey, et al., 1998; Simonet et al., 1997). Eine weitere Studie beschreibt OPG als Überlebensfaktor hormon-resistenter Prostata-Tumorzellen. Die hohe Produktion von OPG verhindert wahrscheinlich in diesen Zellen die Kapazität von TRAIL Apoptose auszulösen (Holen et al., 2002).

Die unterschiedliche Funktionalität der Rezeptoren lies vermuten, dass TRAIL-R3 und TRAIL-R4 als sogenannte Scheinrezeptoren (engl.: „decoy receptors; DcR) fungieren und um die Bindung von TRAIL an TRAIL-R1 und TRAIL–R2 kompetieren (Pan et al., 1998; Sheridan et al., 1997). Bisher konnte für die meisten Tumorzelllinien und primären Tumore jedoch keine oder nur eine begrenzte Korrelation zwischen TRAIL-

Sensitivität und TRAIL-R3 bzw. TRAIL-R4 Expression nachgewiesen werden (Kim and Gupta, 2000; Kim et al., 2000; Nimmanapalli et al., 2001; Petak et al., 2000). In Studien mit jeweils einem Rezeptor-blockierenden, monoklonalen Antikörper wurde eine intrazelluläre Regulation der Resistenz versus Sensitivität gezeigt (Ganten et al., 2004; Leverkus et al., 2000). Nur die Oberflächenexpression der TRAIL-Rezeptoren zu analysieren kann missführend sein, da gezeigt wurde, dass TRAIL-R3 und TRAIL-R4 intrazellulär lokalisiert sein können und erst nach einer Stimulation mit TRAIL an die Zelloberfläche gelangen (Zhang et al., 2000).

In der Maus wurde bislang nur ein TRAIL-Todesrezeptor identifiziert (Wu et al., 1999). Zusätzlich wurden zwei sogenannte Scheinrezeptoren, mTRAIL-DcR1 und mTRAIL-DcR2, die wenig Strukturhomologien zu den humanen TRAIL-R3 und TRAIL-R4 aufweisen, identifiziert (Schneider et al., 2003).

2.2.2 Signaltransduktion der TRAIL-vermittelten Apoptose

Die Analyse der Signaltransduktion der TRAIL-vermittelten Apoptose weist starke Ähnlichkeiten mit der CD95-induzierten Apoptose auf. Die eingehende Erforschung der nativen TRAIL-R1- und TRAIL-R2–Todeskomplexe zeigte nach Stimulation mit TRAIL eine voneinander unabhängige Rekrutierung von FADD und Procaspase-8, sowie Procaspase-10 an die beiden Todesrezptoren, wobei sowohl homomere als auch heteromere Komplexe gebildet werden können (Kischkel et al., 2000).

TRAIL-resistente FADD- und Caspase-8-defiziente, ausschließlich TRAIL-R2 exprimierende Jurkat-Zellen, ließen sich durch die exogene Expression dieser Proteine für TRAIL-induzierte Apoptose sensitivieren. FADD und Caspase-8 sind für diesen Signalkomplex essentiell. Es wurde auch gezeigt, dass Caspase-10 nach FADD-abhängiger Rekrutierung an den nativen DISC aktiviert wird, aber Caspase-8 nicht funktionell ersetzen kann (Sprick et al., 2002).

Zudem wurde beschrieben, dass TRAIL-R1 und TRAIL-R2 unterschiedliche Rezeptorstimuli benötigen, um aktiviert zu werden. Funktionelle Studien zeigten, dass TRAIL-R1 vermutlich durch Trimere, wohingegen TRAIL-R2 durch die Bindung multimerisierter Liganden die Apoptose einleitet (Muhlenbeck et al., 2000).

PED/PEA-15 („phosphoprotein enriched in diabetes/phosphoprotein enriched in astrocytes-15 kD“) konnte bis jetzt nur in Gliomazellen als DISC-Komponente nachgewiesen werden. Die Regulation der PED-Rekrutierung erfolgt über dessen Phosphorylierung. Wird die PED-Phosphorylierung inhibiert, findet keine Rekrutierung an den DISC statt und die Zellen werden sensitiver für TRAIL-induzierte Apoptose. Ob PED/PEA-15 auch in anderen Zellen eine regulierende Funktion ausübt, muß noch untersucht werden (Xiao et al., 2002a).

Andere Proteine wie RIP und TRADD, die für den TNFα-Signalkomplex beschrieben wurden, scheinen am TRAIL-DISC nicht beteiligt zu sein (Kischkel, et al., 2000). Im Anschluß an die Ausbildung des DISC erfolgt die Caspase-Spaltung und somit die Aktivierung der Apoptose-Kaskade.

Trotz der ähnlichen Signalkaskade zwischen CD95- und TRAIL-induzierter Apoptose, besteht ein wesentlicher Unterschied. Die meisten primären Zellen sind resistent gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose, wohingegen über das CD95-System Apoptose induziert werden kann.

2.2.3 Sensitivität versus Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose

Die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber TRAIL, ist im Vergleich zu nicht transformierten Zellen deutlich erhöht. Die erhöhte Sensitivität geht oft mit einer erhöhten Oberflächenexpression der TRAIL-Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 einher (Zhang et al., 1999). Jedoch lässt sich die mRNA-Expression der Todesrezeptoren nicht nur in malignen, sondern auch in vielen gesunden Zelltypen nachweisen. Mit der Entdeckung der zwei TRAIL-Scheinrezeptoren, schien das Paradoxon gelöst zu sein. Es konnte in einzelnen Fällen nachgewiesen werden, dass die Resistenz von bestimmten Zelllinien mit einer erhöhten Expression von TRAIL-R3 und TRAIL-R4 korreliert, jedoch besteht keine generelle Korrelation zwischen der Expression der Scheinrezeptoren und einer TRAIL-Resistenz (Gura, 1997). Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, wie die Expression der TRAIL-bindenden Rezeptoren die Resistenz bzw. Sensitivität moduliert (Kim and Gupta, 2000; Zhang et al., 2001).

Das Fehlen von Caspase-8 und Caspase-10 in den meisten Neuroblastom-Zelllinien erklärt deren Resistenz gegenüber TRAIL (Eggert et al., 2001). Die fehlende Expression

dieser Initiatorcaspasen ist jedoch nicht der alleinige Faktor. Vielmehr ist wahrscheinlich das Zusammenspiel mehrerer agonistischer und inhibitorischer Moleküle intrazellulär exprimierter Proteine ebenfalls an der Regulierung des TRAIL-System involviert (Eggert, et al., 2001).

Die zellulären FLICE-inhibierenden Proteine (c-FLIPs) sind zu Caspase-8 und Caspase-10 homolog, jedoch fehlt Ihnen die Proteasaktivität (Tschopp et al., 1998). Durch Rekrutierung der beiden Splicevarianten von FLIP, $FLIP_S$ und $FLIP_{L,}$ anstelle von Caspase-8 oder –10 in den DISC wird die Aktivierung der Caspasekaskade blockiert. Dies kann letztendlich zur TRAIL-Resistenz führen (Irmler, et al., 1997b; Wang et al., 2000). Vor kurzem wurde beschrieben, dass c-$FLIP_L$ unabhängig von FADD an die DD von TRAIL-R2 rekrutiert wird und die Ausbildung eines aktiven DISC inhibiert (Jin et al., 2004).

Die Funktion von FLIP ist jedoch noch nicht völlig geklärt. Burns und El-Deiry konnten in einer TRAIL-resistenten Kolonkarzinomzelllinie zeigen, dass nur die kurze Form von c-FLIP zur Inhibierung der TRAIL-induzierten Apoptose führt (Burns and El-Deiry, 2001). Auch in malignen Mesothelzellen (MM) führt die Überexpression von c-$FLIP_{S/L}$ zur Inhibierung des Rezeptor-induzierten Zelltodes (Rippo et al., 2004). Weitere Studien zeigen, dass eine direkte Korrelation zwischen der Menge an c-FLIP und der TRAIL-Resistenz besteht (Griffith et al., 1998; Kim, et al., 2000). Durch induzierbare Ubiquitinierung und Proteasom-abhängige Degradierung von FLIP werden Tumorzelllinien für TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert (Kim et al., 2002). Andere Studien hingegen können keine Korrelation zwischen FLIP-Expression und TRAIL-Resistenz feststellen (Zhang, et al., 2001). Kürzlich wurde gezeigt, dass die direkte Repression von FLIP durch c-myc in transformierten Zellen mit einer erhöhten TRAIL-Sensitivität korreliert (Ricci et al., 2004). Dagegen zeigen andere Experimente, dass nach CD95-Ligation Caspase-8 durch Heterodimerisierung mit c-$FLIP_L$ aktiviert wird. (Chang et al., 2002; Micheau et al., 2002).

In vielen „mismatch-repair“ (MMR)–defizienten Tumoren besitzt das proapoptotische zur Bcl-2-Familie gehörende Protein Bax eine Mutation und ist dadurch inaktiviert. Es konnte gezeigt werden, dass Bax für TRAIL-induzierte Apoptose in Tumorzellen essentiell ist, indem es die Freisetzung des mitochondrialen Proteins „second mitochondria-derived activator of caspases“ (Smac)/“direct IAP-binding family protein

with low pH“ (DIABLO) und somit die Neutralisierung der apoptose-inhibitorischen Funktion der IAP-Proteinfamiliemitglieder ermöglicht (Deng et al., 2002).

Bax-Inaktivierung in MMR-defizienten Tumoren führt zu einer Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose. Wiedereinführung von Bax in Bax-defiziente Zellen stellt die Sensitivität wieder her. Die spezifische Hemmung der XIAP-Expression mit RNAi sensitivierte Tumorzellen für diverse Chemotherapeutika und TRAIL (McManus et al., 2004). Durch Genstransfer exprimiertes Smac/Diablo oder ein Zellmembran-permeables Smac-Peptid führten zur Sensitivierung von primär TRAIL-resistenten humanen Neuroblastom- und Melanom-Zellen. Eine komplette Tumorregression konnte in einem intrakranialen malignen Glioma-Xenograft Model durch die Kombination von Smac-Peptiden mit TRAIL erreicht werden (Fulda et al., 2002).

In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass die Kombination von Chemotherapie und TRAIL die Resistenz gegenüber TRAIL aufheben kann (Deng, et al., 2002; Mizutani et al., 2002). Über die molekularen Ursachen liegen teilweise nur spärliche Daten vor. Jedoch konnten in TRAIL-resistenten Hepatomzelllinien nach Sensitivierung mit dem Chemotherapeutikum 5-FU eine verstärkte Caspase-8-Rekrutierung und -Aktivierung am DISC gezeigt werden (Ganten, et al., 2004).

Aber nicht nur die Kombination von konventionellen Chemotherapeutika, sondern auch Proteasom-Inhibitoren zusammen mit TRAIL können die Resistenz von Tumorzellen überwinden. Es wurde gezeigt, dass PS-341, ein Proteasom-Inhibitor, in Prostata-, Kolon-Karzinom und Multiplen Myelom die TRAIL-induzierte Apoptose signifikant erhöhte. Der zugrundeliegende Mechanismus ist eine erhöhte Caspasespaltung am DISC, die zu einer Bak-abhängigen Freisetzung von proapoptotischen mitchondrialen Proteinen führt (Johnson et al., 2003). Der Proteasom-Inhibitor MG132 bewirkt eine Hochregulation von TRAIL-R2 und agiert synergistisch mit TRAIL in der Apoptose-Induktion in Bax-profizienten und -defizienten Zellen (He et al., 2004). Jedoch führt die Proteasominhibierung in primären Keratinozyten zur Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose. Die Sensitivierung wird durch die Effektorcaspase-3 und nicht durch erhöhte Caspase-8-Rekrutierung und -Aktivierung an den DISC reguliert (Leverkus et al., 2003). Eine Kombination von TRAIL und Proteasominhibitoren in der klinischen Anwedung könnte somit problematisch werden.

Zahlreiche Faktoren können an der Regulation der Sensitivität gegenüber TRAIL beteiligt sein. In der Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3 wurde Interleukin-8 als

Inhibitor für TRAIL-induzierte Apoptose identifiziert (Abdollahi et al., 2003). NF-κB-induzierte Hochregulation von FLIP, Bcl-X_L, und XIAP, wie sie nach Bindung von TNF an TNF-RI beobachtet wurden (Karin et al., 2002), könnten weitere Regulationsmechanismen darstellen, die die Zelle vor TRAIL-induzierter Apoptose schützen. Wiederum sensitiviert spezifische Herunterregulierung von NF-κB durch Inaktivierung von I-κB-Kinase signifikant für TRAIL-induzierte Apoptose (Ravi and Bedi, 2002).

Aktivierung von Protein-Kinase-C (PKC) inhibiert die Rekrutierung von den obligatorischen Todesdomänen-enthaltenen Adapterproteinen an den Todeszeptor und moduliert die TRAIL-induzierte Apoptose (Harper et al., 2003; Sarker et al., 2001). Auch die Mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen (MAPK) (Tran et al., 2001) und AKT (Thakkar et al., 2001) beinflussen die TRAIL-Sensitivität. Ein neuer interessanter Mechanismus liegt der synergistischen Wirkung von all-trans-Retinolsäure und deren Derivaten kombiniert mit TRAIL zugrunde. Retinolsäure synergiert nicht nur mit TRAIL, sondern induziert auch die Expression von TRAIL und somit Apoptose in einer autokrinen oder parakrinen Weise auf Tumorzellen (Altucci et al., 2001). Der synergistische Effekt von TRAIL und Retinolsäuren wurde für zahlreiche Tumorarten wie Leukämie, Lungen- und Prostata-Krebs (Bradbury, 2001; Sun et al., 2000a; Sun et al., 2000b) gezeigt.

Der zugrunde liegende Mechanismus, der für die beobachtete anti-tumorale Wirkung von Histon-Deacetylase (HDAC)-Inhibitoren verantwortlich ist, wurde vor Kurzem entschlüsselt. In Leukämiezellen konnte gezeigt werden, dass HDAC-Inhibitoren über eine Hochregulation von TRAIL, TRAIL-R2, CD95L und CD95 Apoptose induzieren (Insinga et al., 2005; Nebbioso et al., 2005).

2.2.4 TRAIL und das Potential als Therapeutikum

Die lösliche rekombinante Form von TRAIL ist aus verschiedenen Gründen ein sehr interessantes Molekül für die Krebstherapie. Es gibt nur sehr wenige Therapeutika, die spezifisch für Tumorzellen sind und zugleich effizient Apoptose induzieren können. Der überwiegende Teil der Tumorzelllinien und über 50 primäre humane Tumorarten, die bisher untersucht worden sind, zeigen in der immunhistochemischen Färbung eine

TRAIL-R1 und/oder eine TRAIL-R2-Expression. Es konnte in Maus- und Primaten-Experimenten nach TRAIL-Administration eine signifikante Regresssion des Tumorwachstums ohne systemische Zytotoxizität gezeigt werden (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999).

Die Apoptose-Induktion als Antwort auf DNA-schädigende Agenzien wie Chemotherapeutika ist von der Funktion des Tumorsuppressorproteins p53 abhängig, das den sogenannten intrinsischen Apoptose-Signalweg aktiviert. Leider ist in den meisten Tumoren das Protein p53 inaktiviert und Tumorzellen werden gegenüber vielen Chemotherapeutika resistent.

TRAIL induziert Apopotose in einer Reihe von Tumoren unabhängig von der p53-Expression. Somit besteht die Möglichkeit, die Chemo- oder Radio-Resistenz durch die gleichzeitige Behandlung mit TRAIL zu umgehen. Aber nicht nur die Behandlung von Tumoren mit Mutationen im p53-Gen macht TRAIL zu einem effektiven Therapeutikum, sondern auch die Kombination von Chemotherapeutika und TRAIL in p53-Wildtyp-Tumorzellen. Durch Chemotherapeutika werden primär TRAIL-resistente Zelllinien sensitiv gegenüber TRAIL, wobei die Hochregulation des TRAIL-R2 eine Rolle zu spielen scheint (El-Deiry, 2001; Nagane et al., 2001).

Darüber hinaus ist TRAIL auch auf primären humanen Tumoren von Patienten mit Multiplem Myelom oder Kolonkarzinom wirksam. In Xenograft-Mausmodellen konnte die Wirkung von TRAIL auf Kolon-, Mamma-Karzinom, Multiplen Myelom und Glioblastom gezeigt werden. Auch die Kombination von TRAIL mit verschiedenen chemotherapeutischen Agenzien oder Radiotherapie zeigte in Xenograft-Studien eine synergistische anti-Tumorwirkung. Eine Zusammenfassung über alle bisher durchgeführten präklinischen Studien mit verschiedenen TRAIL-Formen ist bei Wajant et al. aufgeführt (Wajant et al., 2005).

Mittlerweile sind zahlreiche Unterschiede in der Wirksamkeit von TRAIL gegenüber Tumoren und primären Zellen publiziert worden. Die unterschiedliche Wirksamkeit scheint mit den strukturellen und biochemischen Eigenschaften der verschiedenen rekombinanten TRAIL-Proteine zusammen zuhängen. Eine TRAIL-Version beinhaltet die Aminosäuren 114-281, fusioniert an ein aminoterminales Polyhistidin (Jo et al., 2000). Eine zweite Variation besteht aus den Aminosäuren 95-281, verbunden mit einem modifizierten Hefe Gal-4 Leuzin-Zipper (LZ), welcher die Oligomerisierung des Proteins fördert (Walczak, et al., 1999). Die dritte Form enthält die AS 95-281 und ein

aminoterminales Flag-Tag, welches mit einem anti-Flag-Antikörper vernetzt werden kann und somit die Aktivität verstärkt (Ichikawa et al., 2001). Zur Zeit wird eine vierte, nicht getaggte Version von TRAIL, Apo-2L, mit den Aminosäuren 114-281 in einer klinischen Studie der Phase I getestet. Diese Form von TRAIL wird wahrscheinlich aufgrund des Fehlens exogener Proteinsequenzen im Patienten nicht immunogen sein. Experimente in nicht-humanem Primaten, wie Affen und Cynomolgus zeigten, dass eine kurzfristige Administration von TRAIL/Apo-2L auch in hohen Dosen sehr gut toleriert wird (Lawrence et al., 2001).

Neben dem Liganden TRAIL sind agonistische Antikörper, die die TRAIL-Rezeptoren aktivieren eine attraktive Alternative. Mit TRA-8 wurde 2001 erstmals ein TRAIL-R2-spezifischer Antikörper mit antitumoraler Aktivität beschrieben (Ichikawa, et al., 2001). Mittlerweile haben TRAIL–R1- und TRAIL-R2-spezifische Antikörper sowohl die präklinische Phase, als auch die Phase I der klinischen Prüfung abgeschlossen (Hymphreys, 2002; Tolcher, 2004). Der humane mAk HGS-ETR1 gegen TRAIL-R2 ist momentan in der Phase II der klinischen Entwicklung und wird in Patienten als Therapie von Lungenkarzinom, Darmkarzinom und Non-Hodkin-Lymphom getestet. Eine weitere Option besteht in der Gentherapie. Erst kürzlich wurde die antitumorale Wirkung und verlängerte Expression eines auf einem adenoviralen Vektor kodierten TRAIL gezeigt. Unter einem hTERT-Pomoter adenoviral exprimiertes TRAIL induzierte in verschiedenen Brustzelllinien, eingeschlossen denjenigen, die resistent gegenüber Doxirubicin und löslichem TRAIL-Protein waren, sehr effizient Apoptose (Lin et al., 2002). Obwohl die Gentherapie ein großes Potential besitzt sind noch zahlreiche Herausforderungen zu meistern. Dazu gehören neben der Entwicklung geeigneter Vektorsysteme vor allem der Ausschluss von Nebenwirkungen und Immunreaktionen.

3 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung eines rekombinanten TRAIL-Rezeptor-Agonisten, der bei möglichst geringer oder nicht vorhandener Toxizität auf nicht transformierten Zellen eine hohe zytotoxische Wirksamkeit gegenüber Tumorzellen ausübt. Die Strategie bestand darin, die beiden vielversprechendsten der möglichen Wege zu verfolgen: zum einen die Herstellung multimerisierter Antikörperfragmente gegen TRAIL-Todesrezeptoren und zum anderen hochaktive rekombinante Formen des Liganden TRAIL.

Für Ersteres sollten funktionelle multimerisierte Einzelketten („single chain“)-Antikörperfragmente gegen TRAIL-R2 hergestellt werden. Ein Einzelketten-Antikörperfragment gegen den Todesrezeptor CD95 sollte hierbei als positive Kontrolle dienen. Die multimerisierten rekombinanten Antikörperfragmente sollten die CD95- bzw. TRAIL-R2-vermittelte Apoptose induzieren und somit die Eigenschaften des physiologischen Liganden imitieren. Nach Transformation von *E.coli* mit den Expressionsvektoren und Expression der rekombinanten Proteine sollten funktionelle Bindungseigenschaften durchflußzytometrisch untersucht und die Expressions-Bedingungen optimiert werden. Mit Hilfe eines Zytotoxizitätstest sollte untersucht werden, ob die rekombinanten Antikörperfragmente auf Tumorzellen nicht aber auf normalen Zellen Apoptose induzieren können.

Die zweite Möglichkeit rekombinante TRAIL-Rezeptor-Agonisten herzustellen, sollte durch Generierung rekombinanter hochaktiver Formen des Liganden erreicht werden. Diese Formen von TRAIL sollten ein Maximum an Aktivität auf humanen Tumorzelllinien bzw. humanen Tumoren zeigen, nicht aber zytotoxisch auf primäre Zellen, insbesondere humane Hepatozyten wirken. Abschließend sollten zwei unterschiedliche TRAIL-Rezeptor-Agonisten hinsichtlich ihres Potential als Biotherapeutikum in der Krebstherapie analysiert werden.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien

Sämtliche Chemikalien besaßen analytischen Reinheitsgrad und wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Amersham Biosciences (Freiburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Gerbu (Gaiberg) bezogen.

Biochemikalien	**Hersteller**
Ni-NTA	Qiagen
Hydroxyapatit	Bio-Rad
HisTrap (1ml)	Amersham
HiTrap Protein G HP	Amersham

1.2 Allgemein verwendete Lösungen und Puffer

Blockierungs-Puffer (Immunoblot)	5,00 % Milchpulver 0,05 % Tween-20 in PBS (4°C)
FACS-Puffer	5,00 % FCS [v/v] 0,05 % NaN_3 [w/v] in PBS (4°C)
Laufpuffer (MOPS 20x)	1,00 M MOPS 1,00 M Tris-Base 69,30 mM SDS 20,50 mM EDTA ad 500 ml aq. bidest. 1x Puffer mit aq. bidest., pH = 7,7

Laufpuffer (MES 20x)	1,00 M MES 1,00 M Tris-Base 69,3 mM SDS 20,50 mM EDTA ad 500 ml aq. bidest. 1x Puffer mit aq. bidest., pH = 7,7
LDS-Probenpuffer (4x)	560 mM Tris-Bas 480 mM Tris-HCl 280 mM LDS 1,61 mM EDTA 0,75 ml 1% Serva Blue G250 in aq. bidest 0,25 ml 1% Phenolrot
PBS	137,00 mM NaCl 8,10 mM Na_2HPO_4 2,70 mM KCl 1,50 mM KH_2PO_4 mit aq. bidest pH = 7,4
PI-Lösung	5 µg/ml Propidiumiodid in PBS (4°C)
Nicoletti-Puffer	0,10% Natriumcitrat (w/v) 0,10% Triton X-100 50 µg/ml Propdiumoidid
Transferp. (NuPAGE 20x)	500 mM Bicine 500 mM Bis-Tris 20,5 mM 1 mM Chlorobutanol ad 125ml aq. bidest. 1x Puffer mit aq. bidest., pH = 7,2 1x Puffer + 10 % [v/v] Methanol
Waschpuffer (Immunoblot)	0,05 % Tween-20 (v/v) in PBS
TAE (Tris-Acetate-EDTA)	40 mM Tris Base 20 mM Essigsäure 10 mM EDTA
TBE (Tris-Borate-EDTA)	90 mM Tris Base 90 mM Borsäure 1mM EDTA

1.3 Medien

1.3.1 Kulturmedium für Bakterien

Kulturmedium für Bakterien: 10 g/l Tryptone
10 g/l NaCl
5 g/l Hefeextrakt
mit NaOH pH auf 7,4 einstellen

LB-Agar Platten wurden durch Zugabe von 15g/l Bacto-Agar vor dem Erhitzen hergestellt.

1.3.2 Kulturmedien für eukaryontische Zellen:

Alle Kulturmedien stammen von der Firma Gibco/Invitrogen. RPMI 1640 und DMEM enthielten das stabilere Glutamax anstatt Glutamine als Glutaminquelle. Zu allen Medien wurde 10% FCS zugefügt. Für die Gewinnung von Antikörpern wurde 5%FCS mit geringen Anteil an Immunglobulinen zum Medium dazugegeben. Die Zellen wurden ohne zusätzliche Antibiotika kultiviert mit Ausnahme von Großkulturen in Rollerflaschen. Bei diesen Kulturen wurden die Antibiotika Pencillin und Streptomycin in einer Endkonzentration von 1% zugefügt, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden.

1.3.3 Kultivierung von primären humanen Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten wurden durch eine Zwei-Schritt-Perfusion wie bei Berry et. al. beschrieben und von Schulze-Bergkamen (Schulze-Bergkamen et al., 2003) modifiziert, gewonnen. Ein gesundes Stück Leber wurde mit Ca^{2+}- und Mg^{2+}-freien Hank's Medium (Hank's balanced salt solution; Gibco BRL) mit 0,5 mM EGTA (Sigma) und 50 mM HEPES (Sigma) für 20 Minuten perfundiert. Für weitere 15-25 Minuten erfolgte eine Perfusion mit William's Medium E (WME; Gibco BRL) mit

0,05% Kollagnase Typ IV (Sigma) und 5 mM $CaCl_2$. Die Hepatozyten wurden mechanisch von der Leberkaspel getrennt und filtriert. Die gewonnene Hepatozytensupension wurde 3 mal in eiskaltem, serumfreien WME gewaschen und in einer Dichte von 7.0 x 10^5 auf einer mit Kollagen (Kollagen TypeI; Serva Biochemicals) beschichteten 96-Loch-Boden-Platte ausplatiert. Nach 2 Stunden wurde das Medium durch Zugabe von WME mit 5% FCS ersetzt. Nach 12h und dann täglich wurden die primären Hepatozyten mit serumfreiem WME-Kultivierungsmedium versorgt. Alle Experimente erfolgten in Abwesenheit von FCS. Die frisch isolierten humanen Hepatozyten wurden bei 37°C und 10% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Kultivierungsmedium : Williams' Medium E
0,6 % Glucose
0,2 M HEPES
50 µg/ml Gentamycin
100 µg/ml Pencillin
100 µg/ml Streptomycin
1,5 % DMSO
0,14 U/ml Insulin
0,04 mg/ml Hydrokortison

1.4 Biologisches Material

1.4.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	**Referenz, Anbieter**
Top 10	Invitrogen
DH5 α	Clontech
Rosetta (DE3) pLysS	Clontech

1.4.2 Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
BJAB	Humane EBV-negative-humane-Burkitt-Lymphom- Zelllinie (Clements et al, 1975)
BL60	Humane Gruppe-1 Burkitt-Lymphom-Zelllinie
SKW6.4	Humane B-Lymphomblastoide-Zelllinie
CEM	Gruppe-1 Burkitt-Lymphom-Zelllinie
Jurkat A3	Humane, akute T-Lymphom-Zelllinie (Juo et al., 1998)
Jurkat J16	Humane maligne T-Zelllinie (Zhang et al., 1989)
HepG2	Humane Hepatom-Zelllinie, p53 positiv
HuH7	Humane Hepatom-Zelllinie
Hep3b	Humane Hepatom-Zelllinie, p53 negativ
U937	Humane monoblastische Lymphom-Zelllinie
HeLa	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie
Colo205	Humane Kolonkarzinom-Zelllinie
SHEP	Humane Neuroblastom-Zelllinie
DanG	Humane Pankreaskarzinom-Zelllinie
HT1080	Humane Fibrosarkom-Zelllinie
A549	Humane Lungenkarzinom-Zelllinie, p53+ (Giard et al., 1972)
COS-7	Affen-Nieren-Fibroblasten-Zelllinie

1.5 Antikörper

1.5.1 Unkonjugierte Antikörper

Antikörper	Antigen	Quelle
HS 101	TRAIL-R1 extrazelluläre Domäne	eigenes Labor
HS 201	TRAIL-R2 extrazelluläre Domäne	eigenes Labor
HS 301	TRAIL-R3 extrazelluläre Domäne TRAIL-R1	eigenes Labor
HS 401	TRAIL-R4 extrazelluläre Domäne	eigenes Labor
HS 501	Lösliches TRAIL	eigenes Labor
HS 601	Modif. Leuzin-Zipper	eigenes Labor
anti-APO-1 (IgG3)	CD95-extrazelluläre Domäne	Trauth et al.;1989
M180	Humanes TRAIL	Immunex Corp., Seattle USA
M183	Humanes TRAIL	Immunex Corp., Seattle USA
$(His)_5$	Polyhistidin	Novagen

1.5.2 Konjugierte Antikörper

Antikörper	Sybtyp	Quelle
anti-IgG1, Bio	Maus-IgG1	Southern Biotechnology, Birmingham USA
anti-IgG1, HRP	Maus-IgG1	Southern Biotechnology, Birmingham USA
anti-Ig (H+L), Bio	Maus- IgM + -IgG +-IgA (H+L)	Southern Biotechnology, Birmingham USA
anti-IgG (H+L), Bio	Maus- IgG1+-IgG2a + -IgG2b+ -IgG3	Southern Biotechnology, Birmingham USA

1.6 Materialien für die Molekularbiologie

1.6.1 Vektoren

Plasmid	Referenz/Herkunft
pcDNA3.1 Hygro	Invitrogen
pcDNA3.1 BVp35	Eigenes Labor
pcDNA3.1 scFv-anti-TRAIL-R2	Manuela Schader
pcDNA3.1 scFv-anti-APO-1	Manuela Schader
pcDNA3.1 lacZ	Manuela Schader
pET28a	Novagen
pBluescrikt SK	Stratagen
pET28a scFv-anti-APO-1LZHis	Manuela Schader
pET28a scFv-anti-APO-1His	Manuela Schader
pET28a scFv-anti-TRAIL-R2-LZHis	Manuela Schader
pcDNA3.1 IZ-CD95-Ligand	Manuela Schader
pET28a IZ-TRAIL	Manuela Schader
pcDNA3.1 TRAIL-R2-Fc	Daniela Willen

1.6.2 Oligonukleotide

Name	5’ -Nukleotidsequenzen
Isoleuzin-Zipper Oligo 1	TAT***ACTAGT***ATTGAAAAAAAAATTGAAGCGATTGAAAAGAAG ATCGAGGCCATCGAGAAG
Isoleuzin-Zipper Oligo 2	TATA***GATCTC***GCTTCAATTTTTTTTTCAATCGCTTCAATTTT CTTCTCGATGGCCTCGATCTTCTT
5’-sTRAIL AS 95	TA***AGATCT***ACCTCTGAGGAAACC
3’-sTRAIL AS 281	TATATATA**GCGGCCGC**TTAGCCAACTAAAAAGGC
5’-Nco AS 114 TRAIL	TATA***CCATGG***TGAGAGAAAGAGGTCCTCAG
5’-Nco IZ	CATG***CCATGG***GTATTGAAAAAAAAATTGAAGCGATT

Tabelle 2: Als PCR-Primer verwendete Oligonukleotide zur Klonierung der TRAIL-Versionen. Restriktionsschnittstellen sind kursiv und fett dargestellt.

Name	5' -Nukleotidsequenzen
5'- Ig kappa Signalpeptid-Hind III	TATA***AAGCTT****GCCACC*ATGGAGACAGACACACT
3'- Ig kappa Signalpeptid-Eco RI	GA***GAATTC***GTCACCAGTGGAACCTGG
5'-human hinge Region-Xba I	TA***TCTAGA***ACCCCGCTGGGTGACACCACCCACA CCTCCGGTCGTATGAAACAGATAGAGGATAAG
3'-LZ-Stopp-Not I	ATAAGAAT***GCGGCCGC****TTA*CCGCTCGCCAATCAGCTT
3'-LZ-Stopp-ohne Not I	TATA***GCGGCCGC***CCGCTCGCCAATCAGCTT
5'-V_HAPO-Nco I	CATG***CCATGG***TGAAGCTGGTGGAGTCA
3'-V_LAPO-BamHI (ohne LZ)	CG***GGATCC***ATCAGCCCGTTTGATTTCCAG
5'-V_HTR2-Nco I	TATA***CCATGG***AGGTGAAGCTGCAGGAGTCA
3'-V_LTR2 Bam HI (ohne LZ)	CG***GGATCC***CCGTTTTATTTCCAGCTTGGT

Tabelle 3: Als PCR-Primer verwendete Oligonukleotide. Restriktionsschnittstellen sind kursiv und fett dargestelt.

Hybrid-isierungs-Region	Name	5 '-Nukleotidsequenz
κ-Kette variable Domäne AS 1-10	5´-V_L-κ-Spe I-1 5´-V_L-κ-Spe I-2	GG***ACTAGT***GATATC(A/T)TG(A/C)TGACCCAA(A/T)CTCCA CTCTC GG**ACTAGT**GATATCGT(G/T)CTCAC(C/T)CA(A/G)TCTCCA GCAAT
κ-Kette konstante Domäne AS116-109	3`-V_L-κ_AS 116-109-Xba I	GG***TCTAGA***GGGAAGATGGTATCCAGTTGGTGCAGCATC AGC
schwere Kette variable Domäne AS 1-8	5'-V_H γ AS 1-8 Eco RI	GA***GAATTC***GAGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCTAGC CTGGTG
γ 3 schwere konstante Domäne	3'-V_H γ AS 7-1-AscI	A***GGCGCGCC***GACCAAGGGATAGACAGATGG
γ 1 schwere konstante Domäne	3'-V_H γ AS 7-1-Asc I	A**GGCGCGCC**AGATGGGGGTGTCGTTTT
Linker-Peptid Oligo-1	5'-Linker	***CGCGCCC***GGTGGTGGTGGTTCGGGTGGTGGTGGTTCGG GTGGTGGTGGTTCGA
Linker–Peptid Oligo-2	3'-Linker-	CTAGTCGAACCACCACCACCCGAACCACCACCACCCGAA CCACCACCA***CCGGG***

Tabelle 4: Als PCR-Primer verwendete Oligonukleotide zur Amplifikation der variablen schweren und leichten Ketten. Restriktionsschnittstellen sind kursiv und fett dargestellt.

1.6.3 Enzyme und Kits

Enzyme/Kit	Hersteller
Pfu Turbo DNA Polymerase	Stratagene
Expand TM-High Fidelity	Roche Diagnostics
Klenow Polymerase	MBI Fermentas
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics
SuperscripII First Strand Synthesis Kit	Invitrogen
Taq DNA Ploymerase	Sigma, Taufkirchen, Germany
Restriktionsenzyme	New England Biolabs Roche
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAgen Plasmid Midi + Maxi Kit	Qiagen
Qiagen Mini-Elute Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Limulus Amebocyte Lysate Kit	BioWhittaker
Chemolumineszenz-Kit Super Signal West Dura	Pierce
Fugene	Roche Diagnostics
In Situ Cell Death Detection Kit	Roche Diagnostic
Alkalische Phosphatase SAP	Roche Diagnostic
Streptavidin HRP	BD Pharmingen
Kollagnenase	Sigma
Quickchange Mutagenese Kit	Stratagene

Alle Enzyme und Kits wurden nach Angaben des Herstellers verwendet.

1.6.4 Molekulargewichtsmarker

Proteinmarker

SeeBlueTM Plus2 Pre-Stained Standards	Invitrogen
Mark 12	Invitrogen

DNA-Marker

Smart Ladder von 200 bp bis 10 kB	Eurogentec
Super Ladder low 20 bp	Eurogentec

1.6.5 Sonstiges

Coomassie Brillant Blue Lösung:

60 mg Coomassie G-250 in 25 ml 100% Ethanol

1000 ml 150 mM Citronensäure (pH 2,1-2,2)

POD Substrat (10 mg/ml Tabletten)	Roche; Mannheim
dNTP-Mix	MBI Fermentas
Streptavidin-FITC	BD Pharmingen
Streptavidin-PE	BD Pharmingen
7-AAD	BD Pharmingen
Kollagen Typ I	Sigma
Insulin	Sigma
Ultrafiltration-Membranen	Millipore
CD95-Fc	Apogenix

2 Methoden

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Stammhaltung und Kultivierung der verwendeten E.coli Stämme

Die verschiedenen Stämme von *E.coli* wurden zur kurzfristigen Lagerung auf Antibiotika enthaltenen Agarplatten ausgestrichen und bei 10°C aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung wurden Gycerolstock von Übernachtkulturen angelegt [50% (V/V) E.coli ÜN-Kultur, 50% (V/V) Glycerin] und bei –70° gelagert.
Zur Anzucht von Übernacht-Kulturen werden je 5-10 ml LB-Medium in sterilen Reagenzröhrchen mittels steriler Zahnstocher von Einzelkolonien auf Agarplatten oder von Gycerolstocks angeimpft und bei 250 rpm im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert.

2.1.2 Verwendete Antibiotika

Die folgenden Antibiotika wurden eingesetzt zu Positivselektion von *E.coli* Stämmen mit Resistenz-vermittelnden Genen:

Antibiotikum	**Konzentration der Stammlösung**	**Arbeitskonzentration**
Ampicillin (Natrium- Salz)	100 mg/ml H_20	100 µg ml^{-1}
Chloramphenicol	34 mg/ml 100% ETOH	34 µg ml^{-1}
Kanamycin	30 mg/ml H_20	30 µg ml^{-1}

2.1.3 Mäuse

Sämtliche durchgeführten Tierexperimente standen im Einklang mit dem deutschen Tierschutzrecht und den Tierschutzbestimmungen des Landes Baden-Württemberg.
Balb/c-Mäuse wurden in sterilen ventilierten Isolatoren mit autoklaviertem Käfigmaterial gehalten.

2.1.4 Transformation von E.coli

Zur Transformation von kompetenten *E.coli* Stämmen wurden 1-10 ng der zu transformierenden DNA oder die Hälfte des Ligationsansatzes mit den kompetenten Top10, DH5α Zellen bzw. Rosetta (DE3) pLysS gemischt und für 20-60 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock (30-45 s bei 42°C im Tischinkubator) und 2 min auf Eis wurden 80-800 µl LB-Medium zu den transformierten Zellen zugegeben und diese 1h bei 37°C, 300 rpm inkubiert und auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotika ausplatiert.

2.1.5 Expression rekombinanter Proteine in E.coli

Zur Expression von den in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteinen wurde der *E.coli*-Stamm Rosetta (DE3) pLysS mit den Expressionskonstrukten transformiert.
Von der Übernachtkultur der Transformanden werden 200 ml LB-Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben 1:500 angeimpft und bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Bei Erreichen einer OD_{600} von 0,6-0,8 wird die Expression durch Zugabe von IPTG induziert und die Kultur entweder für 4,5 weitere Stunden bei 37°C oder über Nacht bei 18°C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 4100 rpm für 20 min werden die Zellen geerntet und lysiert oder eventuell bei –20°C gelagert.

2.1.6 Zellaufschluß von E.coli

Zum Zellaufschluß wurde das Zellpellet aus 200 ml Kultur in 4 ml Aufschlusspuffer resuspendiert, 3 mal in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei 42°C im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde der Ansatz 5 mal jeweils 2-3 Minuten durch Ultraschallbehandlung (5 min, duty cycle 30; output control 40) bei 4°C auf Eis aufgeschlossen. Eine Zusatz von Lysozym zum Aufschlusspuffer war augrund des verwendeten *E.coli*-Stammes, der endogenes Lysozym produziert, nicht nötig.

Danach wird die Suspension in Reaktionsgefäße überführt und die Zelltrümmer oder die isolierten Einschlusskörper durch Zentrifugation bei 15000 rpm für 1 Stunde bei 4°C isoliert. Der Überstand (bei löslichem Protein) bzw. die isolierten Einschlusskörper können bis zur Weiterverarbeitung bei –20°C gelagert werden.

Aufschlußpuffer für scFv-Antikörperfragmente

50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
200 mM NaCl
100 mM KCl
10,00 % Glycerol [v/v]
0,5 % Triton-X100
frisch 2 mM ß-ME
0,5 mM PMSF
5 µM E-64
1,2 µg/ml Aprotinin
1 µM Pepstatin

Aufschlußpuffer für IZ-TRAIL

50 mM Kaliumphosphat (pH 7,4)
200 mM NaCl
100 mM KCl
10,00 % Glycerol [v/v]
0,5 % Triton-X100
frisch 2 mM ß-ME bzw. 2 mM DTT
0,5 mM PMSF
5 µM E-64
1,2 µg/ml Aprotinin
1 µM Pepstatin

Für die Extraktion von shTRAIL wurde anstelle von ß-Mercaptoethanol 2 mM DTT im Aufschlusspuffer verwendet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von RNA und reverse Transkription

Die Isolierung von RNA aus Hybridomzelllinien erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit.
Die reverse Transkription wurde mit der SuperScript II Reverse Transkriptase (RT) (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Je 1 µg RNA aus der Hybridomzelllinie anti-APO-1 und anti TRAIL-R2 wurde mit 1 µl Oligo (dT)-Primer und 1 µl 10 mM dNTP in einem Volumen von 12 µl gemischt und für 5 min bei 65°C und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Nach Inkubation wurden 4 µl 5 x RT-Puffer und 2 µl 0,1 M DTT zugefügt und das Ganze bei 2 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl (200U) PowerScript II RT erfolgte die cDNA-Synthese für 50 min bei 42°C. Durch Inkubation für 15 min bei 70°C wurde die RT inaktiviert. Die synthetisierte einzelsträngige cDNA wurde bei –20°C aufbewahrt.

2.2.2 PCR zur Amplifikation von murinen Antikörpergenen und DNA-Fragmenten

Für die Amplifikation von Gensegmenten oder DNA-Fragmenten mittels PCR (polymerase chain reaction) wurden zwei Oligonukleotid-Primer verwendet, die gegenläufig mit komplementärer DNA hybridisierten und den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierten. Zur spezifischen Amplifikation eines Abschnittes wurde der folgende 50 µl Reaktionsansatz auf Eis pipettiert. Die variabel angegebenen Komponenten müssen empirisch gewählt werden. Für analytische PCRs wurde die Taq-Polymerase und für präparative PCRs wegen ihrer 3'-5'-Korrekturlesefähigkeit die Turbo-Pfu-Polymerase eingesetzt. Für die Amplifikation der murinen Antikörperfragmente wurde die Expand High Fidelity (Roche) verwendet.
Die anschließende zyklische PCR erfolgt in einen Thermocycler, wobei die optimalen Programmparameter, insbesondere die Hybridisierungstemperatur empirisch ermittelt werden mussten.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10x-Polymerase-Puffer	5 µl	1x
dNTP-Mix 10 mM	1 µl	0,2 mM
$MgCl_2$ 25 mM	0-5 µl	0-2,5 mM
BSA 10 mg/ml	0-2,5 µl	0-50 µg
Primer a 10pmol/µl	1 µl	10 pmol
Primer b 10pmol/µl	1 µl	10 pmol
Template	1-4 µl	-
Polymerase	1 µl	2,5 U/50µl
H_20	ad 50µl	-

Der PCR-Ansätze wurden zunächst 3 min auf 95°C erhitzt und anschießend zyklisch 25-30 mal 45 sec bei 95°C denaturiert, 45 sec bei 53-60 °C mit den Primer hybridisiert und 90 sec bei 72°C für die Synthese des komplementären Stranges inkubiert. Temperatur und Zeiten wurden je nach Primer Hybridisierungstemperatur und Länge des zu amplifizierenden DNA-Elements gewählt.

2.2.3 Vektordephosphorylierung

Bei der Ligation von DNA in Klonierungsvektoren muss der durch Restriktionsspaltung linearisierte Vektor dephosphoryliert werden, um eine Ligation der Vektorenden zu verhindern. Lineare DNA wurde durch die Alkalische Phosphatase SAP (**S**hrimp **A**lkaline **P**hosphatase) dephosphoryliert. Die Reaktion wurde 45 bis 60 min bei 37°C inkubiert und das Enzym danach 15 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Der linearisierte, dephosphorylierte Vektor wurde durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt.

2.2.4 DNA-Ligation

Die Ligationsreaktion ist am effizientesten bei einem molaren Verhältnis des Vektors zum Insert von 1:3-1:4. Die Konzentrationen der Vektor- und Insertpräparationen wurden nach deren Volumen und der DNA-Menge vor der Isolierung (Bandenstärke auf

dem Agarosegel) grob abgeschätzt und die Ligationsreaktion danach ausgerichtet. Eine Ligationsreaktion bestand aus:

15 µl Klonierungsvektor + Insert (ggf. + H_2O)

2 µl 10x Ligationspuffer (mit ATP)

1 µl T4-DNA-Ligase

Die Ligation wurde 3 bis 4 h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

2.2.5 Punkt-Mutagenese von zirkulären Plasmiden mit dem Quickchange Mutagnese Kit (Stratagene)

Die gezielte Korrektur von einzelnen Punktmutationen wurde mit dem Quickchange Mutagenesis Kit weitgehend nach den Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wird das komplette zirkuläre Plasmid mit Hilfe entgegengesetzt gerichteter revers-komplementärer Primer (ca. 40 bp Länge, die die Mutation mittig enthalten) ampliziert. Vor der Transformation des neu synthetisierten Plasmids mit Mutation in *E.coli* erfolgte dessen positive Selektion durch DpnI-Verdau des parentalen Plasmidringes, da DpnI ausschließlich methylierte DNA schneidet.

2.2.6 Klonierung von IZ-TRAIL

Die *de novo* Herstellung des Isoleuzin-Zippers erfolgte durch Hybridisierung zweier um 24 Basen komplementärer Oligonukleotidesequenzen. Aufgrund der sich 4-fach wiederholenden Nukleotidsequenz wurde für den Hybridsierungsbereich alternative Codons, die jedoch für die gleiche Aminosäure codieren, gewählt (Abb. 4).

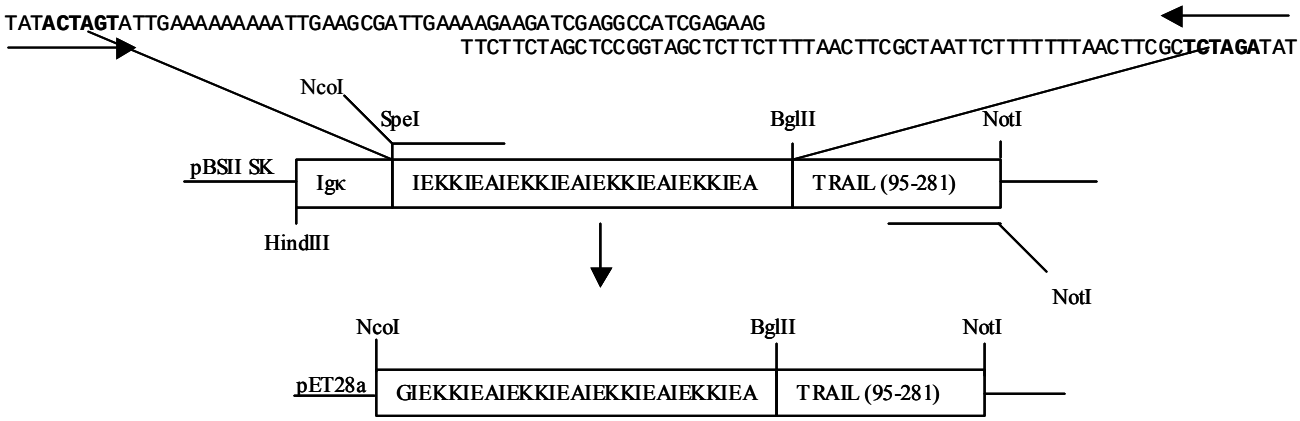


Abb. 4: Schematische Darstellung der Klonierung von IZ-TRAIL
Schematische Darstellung der *de novo* Herstellung des Isoleuzin-Zippers durch Hybridisierung zweier Oligonukleotide, anschließender PCR und Klonierung in den Expressionvektor pBluescript SK. Mit einem spezifischen Primerset erfolgte die Klonierung in pET28a. Dargestellt sind die für die Herstellung der Expressionsvektoren verwendeteten Restriktionsschnittstellen.

Die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration einer verdünnten Lösung erfolgte durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Spektralphotometer. Dabei wurde die genaue Konzentration nach folgender Formel ermittelt.

ssDNA: Konzentration [µg/ml] = OD260 x Verdünnungsfaktor x 30 [µg/ml]

Zur Hybridisierung wurden je 5 µg der einzelsträngigen Oligos (IZ-Oligo-1 und –2) in einem Volumen von 15 µl für 5 Minuten bei 67°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch kurze Inkubation bei 0°C gestoppt. Zum Reaktionsansatz wurden 2 µl dNTPs Mix (je 2.5 mM), 2 µl 10x Puffer und 0,5 µl Klenow Polymerase (1 U) zugefügt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl 0.5 M EDTA–Lösung wurde die Reaktion beendet. Die doppelsträngien Oligos wurden mit den Restikionsendonukleasen Spe I und Bgl II in einem Volumen von 100 µl für 2 Stunden bei 37°C verdaut und mit Ethanol gefällt. Zu 1 Volumen DNA-Lösung wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2, 1µl Kopräzipitator und 2,5 Volumen Ethanol (-20°C) gegeben, die Lösung kurz gemischt und zur Fällung 30 Minuten bei –70°C inkubiert. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 13000 rpm, 4°C wurde der Niederschlag mit 70% (V/V) Ethanol (-20°C) gewaschen, getrocknet und in 20 µl H_20 resuspendiert.

Zur Reinigung und Präparation der doppelsträngigen Oligos wurde der Ansatz durch präparative Polyacrylamidelektrophorese (12% PAA) aufgtrennt. Die Gelelektrophorese wurde in 1 x TBE-Puffer für 2h Stunden, bei 100 Volt, 10 mA durchgeführt. Der Nachweis der DNA erfolgte mit Ethidiumbromid (Sambrook, 1989). Das gewünschte DNA-Fragment von rund 80 Basenpaaren wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und über Nacht im Schüttelinkubator bei Raumtemperatur mit 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA eluiert. Eine Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des Mini-Elute Purification Kit nach Angaben des Herstellers. Zur Elution der gereinigten ds Oligonukleotide wurde H_2O verwendet.

Zur Herstellung des pBluescriptSK-Expressionplasmides wurde die mit Spe I/Bgl II restriktionsverdaute Peptidsequenz des Isoleuzin-Zippers, in einer zweifachen Ligation, mit der mit einem spezifischen Primerset amplifizierten und Bgl II/Not I restriktionverdauten TRAIL-Nukleotidsequenz der Aminosäuren 95-281 in einen mit den Restriktionsendonukleasen Spe I/Not I dephosphorylierten pBluescript SK kloniert. Durch Verdau mit Hind III/Not I bzw. mit einem spezifischen Primerpaaren erfolgte die Umklonierung in pcDNA3.1 und pET28a.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Reinigung rekombinanter Proteine

2.3.1.1 Reinigung von Einsschlusskörpern und Renaturierung in vitro

Die Herstellung funktioneller Einzelketten-Antikörperfragmente erfolgte durch mehrmaliges Waschen der in Einschlusskörpern exprimierten Proteine. Dabei wurden die Einschlusskörper in Waschpuffer I gut resuspendiert und durch Zentrifugation bei 15000 rpm bei 4°C für 20 min isoliert. Dieser Schritt wurde abhängig von der Kontamination der Einschlusskörper 1-2 mal wiederholt. Zuletzt wurde die Einschlusskörper mit Waschpuffer II gewaschen. Nach Zentrifugation wurden die Proteine in Solubilisierungspuffer für 1-2 h bei RT gelöst. Nach 1-2 h Stunden wurde DTT in einer Endkonzentration von 10 mg/ml für eine weitere Stunde zugefügt.

Die Renaturierung der Proteine erfolgte durch langsames Zugeben der solubilisierten scFv-Antikörperfragmente unter Rühren in die Renaturierungslösung. Nach 10 Minuten wurde die Lösung vom Magnetrührer genommen und über Nacht ohne weiteres Rühren stehen gelassen. Nach der *in vitro* Faltung wurde die Lösung durch Ultrafiltration eingeengt. Beim Rückfaltungsprozeß ausgefallene Päzipitate wurden bei 23300 rpm für 15 min bei 4°C abentrifugiert.

Waschpuffer I für Einschlusskörper:

100 mM Tris-HCl pH 8,0
2 M Urea
5 mM EDTA
5 mM DTT
2 % Triton X-100

Waschpuffer II für Einschlusskörper:

100 mM Tris-HCl pH 8,0
2 % Triton X-100

Solubilisierungspuffer :

100 mM Tris-HCl pH 8,0
6 M Guanidinium–HCl

Renaturierungspuffer:

100 mM Tris-HCl pH 8,0
2 mM EDTA
0,5 M Arginine-HCl
0,9 mM GSSG

Aufbewahrungspuffer:

20 mM Tris-HCl pH 7,4
100 mM Urea

2.3.1.2 Reinigung von IZ-TRAIL

Die Reinigung des löslich exprimierten IZ-TRAIL Proteins erfolgte über zwei chromatographische Schritte. Zuerst wurde der Überstand über eine Keramik-Hydroxyapatitsäule aufgereinigt, bevor er in einem weiteren Aufreinigungsschritt über eine Ni-NTA-Säule gereinigt wurde.

2.3.1.2.1 Hydroxyapatit TypI Reinigungsschritt

Hydroxyapatit ($Ca(PO_4)_3OH)_2$ ist eine bestimmte Form von Kalziumphosphat und kann als Matrix für chromatographische Aufreinigung von Proteinen benutzt werden. Die Proteinbindung erfolgt über die Wechselwirkungen der Amino- und Carboxylgruppen der Proteine und den Ca^{2+} und PO_4^{3-}-Gruppen des Säulenmaterials. Basische Proteine binden über elektrostatische Wechselwirkungen mit der PO_4^{3-} Oberfläche, während saure und neutrale Proteine über ihre Carboxylgruppe an Ca^{2+} -Ionen binden. Durch Erhöhung der Phosphat-Konzentration im Puffer erfolgte die Elution des Proteins. Weitere Elutionsmöglichkeiten bestehen in der Zugabe von Mg^{2+}, Ca^{2+}, NaCl oder der Änderung des pH-Wertes.

Die mit Hydroxyapatit (Typ I) gepackte Säule wurde mit 50 mM Kaliumphosphat, 100 mM NaCl, 0,02% Tween-20, 1 mM DTT (pH 8,0) bei einer Flussrate von 8 ml/min und einem maximalen Druck von 0,22 Mpa (2,2 bar) equilibriert. Bei einer Flussrate von 3 ml/ min wurde der IZ-TRAIL- enthaltende Überstand auf die Säule aufgetragen und mit Equilibrierungspuffer gewaschen bis die UV-Absorption die Basislinie erreicht hatte. Mit 5-6 Säulenvolumen wurde die Säule mit 150 mM Kaliumphosphat, 100 mM NaCl, 0,02% Tween-20, 1 mM DTT (pH 8,0) bei einer Flussrate von 8 ml/min gewaschen. Die

Elution erfolgte bei 400 mM Kaliumphosphat, 100 mM NaCl, 0,02% Tween-20, 1 mM DTT (pH 8,0). Im Chromatogramm positive Fraktionen wurden vereinigt und anschließend auf die Ni-NTA-Säule aufgetragen.

2.3.1.2.2 Ni-NTA Reinigungsschritt

Trotz nicht vorhandener Poly-Histidine in der Aminosäuresequenz von IZ-TRAIL ist eine Affinitätsreinigung über Ni^{2+}-Ionen möglich. Wahrscheinlich sind interne Histidinreste an der Komplexbildung mit Nickel beteiligt.
Die von der Hydroxyapatit-Säule eluierten, vereinigten IZ-TRAIL-haltigen Fraktionen wurden auf eine mit 3 Säulenvolumen equilibrierte Ni-NTA Säule aufgetragen. Dabei wurde eine Flussrate von 2 ml/min nicht überschritten. Nach dem Spülen der Säule mit 3-4 Säulenvolumina an Equilibrierungspuffer wurde IZ-TRAIL mit einer geringen Konzentration Imidazol eluiert. IZ-TRAIL-haltige Fraktionen, die keine oder nur sehr geringe Mengen an anderen Proteinen enthielten wurden vereinigt und gegen den Aufbewahrungsbuffer dialysiert.

Equilibrierungs/Wasch-Puffer:

50 mM Tris-HCl pH 7,4
200 mM NaCl
100 mM KCl
10,00 % Glycerol [v/v]
0,5 % Triton-X100
frisch 2mM ß-Mercaptoethanol

Elutionspuffer:

20 mM Tris-HCl pH 8,0
50 mM Imidazol
300 mM NaCl
frisch 2 mM ß-Mercaptoethanol

Aufbewahrungspuffer:

20 mM Tris-HCl pH 8,0
0,5 M Arginin-HCl
100 mM NaCl
0,02% Tween-20

2.3.1.3 Reinigung von shTRAIL

Die Reinigung von shTRAIL erfolgte über eine HisTrap HP 1ml Säule mit den wie bei 2.3.1.2.2 für IZ-TRAIL beschriebenen Puffern. Allen Reinigungspuffern wurde anstelle von ß-Mercaptoethanol 2 mM DTT zugegeben. Der Aufbewahrungspuffer enthielt zusätzlich zur Stabilisierung der Proteine 100 µM ZnCl.

2.3.2 Western-Blot-Analyse

Für die Western-Blot-Analyse der Lysate und Überstände der mit den scFv-Vektorkonstrukten transfizierten COS-7-Zellen wurden 20 µg der Lysate, bestimmt mit der BCA Methode (Pierce), und 10 µl der Überstände mit 2-fach konzentrietem Standard reduzierendem Probenpuffer (2 x RSB) versetzt und nach Hitzedenaturierung, 10 min bei 70°C, auf ein 4-12% NuPage Bis-Tris Gradienten Gel (Novex) aufgetragen. Nach dem Lauf in MOPS- oder MES- Puffer nach den Herstellerangaben wurden die Proteine durch Elektrotransfer auf eine Nitrozellulose-Membran (Amersham Pharmacia Biotech) transferiert. Die Membran wurde anschließend für 1h bei RT mit 5% Magermilchlösung geblockt, kurz mit PBS/0,05% Tween-20 gewaschen und mit den Erstantikörpern über Nacht inkubiert. Nach 5 Waschschritten mit PBS/0,05% Tween-20 (je 3 min) wurde der Blot mit 1:20000 verdünnten HRP-konjugierten Isotyp spezifischen Zweitantikörpern für 1h Stunde inkubiert und nach weiteren 5 Waschschritten (je 3 min) mittels ECL entwickelt (Perbio Science, Bonn).

2.3.3 Antikörperproduktion und ELISA

2.3.3.1 Anti-IZ-TRAIL Antikörperproduktion

2.3.3.1.1 Immunisierung von Mäusen und Fusionierung

Um die Halbwertszeit von IZ-TRAIL zu bestimmen, wurde ein Sandwich ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent-assay) etabliert. Dazu mußte zunächst ein Antikörper, der IZ-TRAIL im nativen Zustand erkennt, hergestellt werden. 8-12 Wochen alte Balb/c Mäuse wurden fünf mal im Abstand von 3 Wochen mit 10 µg/200µl gereinigtem IZ-TRAIL immunisiert. Die erste Injektion erfolgte subcutan in komplettem Freud'schen Adjuvans in den Nacken der Mäuse. Die zweite Injektion erfolgte in die gleiche Injektionsstelle in inkompletten Freud'schen Adjuvans, danach ohne Adjuvans intraperitoneal und subcutan. 1 Woche nach der letzten Injektion wurden 10 µg/200µl IZ-TRAIL intravenös in die Schwanzvene injiziert. Nach 3 Tagen wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet und die Milzzellen mit der murinen B-Zell-Myelom-Zelllinie Sp2/0 fusioniert. In Kürze: nach Tötung einer immunisierten Maus mittels zervikaler Dislokation wurde ihre Milz steril entnommen und in vorgewärmtem DMEM (ohne FCS) für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Milz mit einer Schere zerkleinert und auf einem Drahtnetz mit 0,5 mm Porenweite unter Zugabe von DMEM über einer Petrischale zerrieben. Die gewonnene Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 2 x mit 50 ml DMEM (ohne FCS) gewaschen. Parallel dazu wurden 5 x 10^7 SP2/0-Zellen geerntet, gezählt und mit 50 ml DMEM (ohne FCS) 2x gewaschen. Die Zellen wurden in 10 ml DMEM (ohne FCS) resuspendiert, vereinigt und 10 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgenommen und das Zellpellet vorsichtig vom Boden gelöst. Danach wurden 1,5 ml PEG-Lösung innerhalb von 90s dazugegeben und das Zentrifugenröhrchen eine Minute im 37° Wasserbad geschwenkt. Danach erfolgte die tropfenweise Zugabe von 5 ml DMEM (ohne FCS) in einem Zeitraum von 5 Minuten. Die Zellsuspension wurde in einem letzten Schritt in 250 ml HAT-Medium gegeben und in 25 sterile 96-Lochplatten mit 100 µl pro Loch ausplatiert.

HAT-Medium:

70 U/ml IL-6 (Stock 200000 U/ml)
20 ml HAT (50x)
100 ml FCS (final 10%)
100 ml Condimed H1
5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung
5 ml ß-Mercaptoethanol
mit DMEM auf 1L

Polyethylenglycol (PEG)-Lösung: 50% PEG
50% HEPES

Nach 10 bis 14 Tagen Kultivierung wurden die ersten Hybridomklone sichtbar. Um die Gefahr zu minimieren, mehrere Klone aus einem Kavitat weiter zu kultivieren, wurden nach Möglichkeit nur diejenigen Klone getestet, die deutlich sichtbar auf eine einzelne Zelle zurückgingen. Nach 14 Tagen konnte auf HT-Medium, nach weiteren 7 Tagen auf ein Standard-Medium umgestellt werden. Die Klone, die Antikörper produzierten (Analyse mittels ELISA), wurden schrittweise in 24- und 6-Loch-Platten, später auch in Zellkulturflaschen von bis zu 500 ml Volumen umgesetzt.

HT-Medium: wie HAT-Medium, jedoch HT-Lösung statt HAT-Lösung

Standardmedium:

DMEM
10% FCS
1% Penicillin-Streptomycin-Lösung

Die Zellkulturüberstände wurden in einem direkten ELISA auf die Produktion von IZ-TRAIL spezifischen Antikörpern getestet. 1 µg/ml IZ-TRAIL (100 µl/Kavitat) wurden in 0,2 M Bicarbonatpuffer pH 9,6 bei 4°C über Nacht auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Blocken mit Medium mit 10% FCS (200 µl/Kavität) für 1,5 h bei 37°C abgesättigt. Anschließend wurden die mit

IZ-TRAIL beschichteten und geblockten Mikrotiterplatten mit 50 µl der Hybridomüberstände für 1h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation mit Biotin-konjugierten Ziege anti-Maus-Ig-Antikörper (125 ng/ml) für 1h bei 37°C und mit HRP-gekoppeltem–Streptavidin für 0,5 h, 37°C. Durch Inkubation mit 100 µl 1mg/ml O-Phenylenediamine (OPD) in 0,1 M Citratpuffer pH 5,0 und 1 µl/ml 30% H_2O_2 erfolgte die Detektion. Die Farbreaktion wurde mit 25 µl 3N Schwefelsäure nach einigen Minuten abgestoppt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde jeweils mit 200 µl PBS/0,05% Tween-20 je 3 mal gewaschen. Hybridomzellen von positiven Klonen wurden hochgezogen und die im Zellkulturüberstand enthaltenen Antikörper wurden mittels HiTrap Protein G-Säulen gereinigt.

2.3.3.1.2 Reinigung von anti-IZ-TRAIL-Antikörper

Antikörper wurden aus dem Zellkulturüberstand über eine 1 ml HiTrap Protein G HP Säule aufgereinigt. Der zuvor abzentrifugierte (4000 rpm, 10 Minuten, 4°C) und filtrierte Zellkulturüberstand wurde mit 1 ml pro Minute über die mit Laufpuffer equilibrierte HiTrap Protein G gepumpt. Nach Durchlauf des Überstandes wurde die Säule mit 10 ml Laufpuffer gespült und die Antikörper bei niedrigem pH eluiert. Die eluierten 500 µl Fraktionen wurden sofort mit 15-25 µl Neutralisationspuffer neutralisiert. Die die Ak-haltigen Eluate wurden vereinigt und gegen 5 L PBS pH 7,4 bei 4°C dialysiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch. Die Regenierung und Lagerung der Säule erfolgte nach den Angaben der Herstellers.

Laufpuffer:
20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0

Elutionpuffer:
0,1 M Glycin-HCl pH 2,7

Neutralisationspuffer:
1 M Tris-HCl pH 9

2.3.3.1.3 ELISA zur Detektion von Serum IZ-TRAIL

Es wurden 96-Loch Mikrotiterplatten über Nacht mit 100 µl/Kavitat 1 µg/ml TRAIL-R2-Fc in 0,2 M Bicarbonatpuffer pH 9,6 inkubiert. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch Blocken mit 10% FCS/Medium (200 µl/Kavitat) für 1,5 h bei 37°C abgesättigt. Zum Nachweis von IZ-TRAIL im Mausserum wurde eine Verdünnungreihe in PBS/0,05% Tween-20 hergestellt. 100 µl/Kavitat der einzelnen Verdünnungsstufen wurden 1 h bei 37°C inkubiert. Parallel wurde eine Verdünnungsreihe von IZ-TRAIL (Standardkurve) hergestellt und ebenfalls inkubiert.
1 µg/ml anti-IZ-TRAIL (Name:PLIZE) in PBS/0,05% Tween-20 wurden für 1h bei 37°C auf der Platte inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 100 µl/Kavitat HRP-konjugiertem Ziege-anti-Maus IgG1-Antikörper (125 ng/ml) und eine Inkubation für 1h bei 37°C. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde jeweils mit 200 µl PBS/0,05%Tween je 3 mal gewaschen. Die Detektion erfolgte mit 100 µl/Loch OPD-Substrat in 0,1 M Citratpuffer pH 5 und 1 µl/ml 30% H_2O_2 für 5 Minuten bei RT. Die Farbreaktion wurde mit 25 µl/Kavitat 3 N H_2SO_4 abgestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

2.3.4 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte für die scFv-Antikörperfragmente mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays (Bradford, 1976) und für IZ-TRAIL und shTRAIL photometrisch durch Messung der Absorption bei UV_{280}.
Eine Absorption von 1 entspricht 0,99 mg/ml IZ-TRAIL
Eine Absorption von 1 entspricht entspricht 0,77 mg/ml shTRAIL

2.4 Gelfiltration

Das Vorliegen von Monomeren, Dimeren oder Trimeren in den TRAIL-Präparationen wurde durch Gelfiltration mit einer Superdex 200 HR 10/30 Säule (Pharmacia) und

anschließender Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine analysiert. Die Säule hat ein Gesamtvolumen von 2,4 ml und ein Ausschlussvolumen von 800 µl. Je ca 10-20 µg Protein wurden in einem Volumen von 20 µl auf die Säule aufgetragen und in 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 8,0 bei 12°C aufgetrennt. Folgende Proteine wurden als Molekulargewichtsstandards (Pharmacia) verwendet.

Protein	Molekulargewicht
Bovine Katalase	240 kDa
ß-Amylase	200 kDa
Alkohol-Dehydrogenase	150 kDa
Bovine Serum Albumin	67 kDa
Egg Albumin	45 kDa

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Zellkultur

Die Zellen wurden in den geeigneten Medien bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem CO_2 –Gehalt von 5% kultiviert.

2.5.2 FACS-Analysen

Die Expression von Zelloberflächenproteinen wurde durch Färbung mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Proteinen und anschließender Messung im Durchflußzytometer bestimmt.

Nach der Zellzahlbestimmung wurden jeweils etwa 1x 10^6 Zellen/Loch in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit U-förmigem Boden in FACS-Puffer ausplattiert. Zu dem Gesamtvolumen von 50 µl wurden in FACS-Puffer verdünnte scFv-anti-APO-1 und scFv-anti-TR2 bzw. Kontrollantikörper (Endkonzentration 10 µg/ml) pipettiert. Im

Folgenden wurden alle Inkubationsschritte für 20 min auf Eis in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Zellen wie folgt drei Mal mit FACS-Puffer gewaschen: nach Zugabe von 100 µl kaltem FACS-Puffer wurden die Zellen abzentrifugiert (4°C, 3 min, 1300 rpm), der Überstand verworfen und die Zellen erneut zweimal mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen. Danach erfolgte zunächst eine Inkubation mit anti-His-Antikörper (5 µg/ml) bzw. Medium, dann erfolgte eine Inkubation der Zellen mit biotinyliertem Sekundärantikörper (1:200 in FACS-Puffer, z.B. Ziege-α-Maus-IgG1-Bio). Die letzte Inkubation erfolgte mit Streptavidin-PE (1:200) im Dunkeln. Im Anschluss an diese Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen und abschließend in 100 µl bis 200 µl FACS-Puffer mit 7-AAD (1:200) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in FACS-Röhrchen überführt und im Durchflußzytometer gemessen. Die Unterscheidung von toten und lebendigen Zellen erfolgte mittels 7-AAD Färbung. Nur lebende Zellen (7-AAD negativ) wurden auf ihre Fluoreszenz im FL2-Detektor ausgewertet.

2.5.3 Zelltodnachweise

2.5.3.1 Apoptosemessung aufgrund morphologischer Veränderung (FSC/SSC-Analyse)

Bestimmte morphologische Veränderungen sind ein Charakteristikum des apoptotischen Zelltodes. So schrumpfen Zellen im Verlauf der Apoptose aufgrund veränderter Membranorganisation, Zerstörung von Komponenten des Zytoskeletts und aufgrund von Zellmassenverlust durch Abschnürung von apoptotischen Körperchen. Von lebenden und den an Größe zunehmenden nekrotischen Zellen lassen sich apoptotische Zellen daher im Durchflusszytometer aufgrund ihres geringeren forward scatter (FSC)-Signals unterscheiden. Darüber hinaus weisen apoptotische Zellen eine modifizierte Organisation von Kern und Zytoplasma auf. Kondensiertes Zytoplasma wird aufgrund der erhöhten Granularität als vergrößertes side scatter (SSC)-Signal im Durchflusszytometer sichtbar. Der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen in einer Zellpopulation ließ sich daher mittels FACScan bestimmen: das FSC-Signal wurde gegen das SSC-Signal aufgetragen (FSC/SSC) und die Zellen in- und außerhalb der

angegebenen Regionen, die für die Populationen typisch sind, ausgewertet.

2.5.3.2 Ausschluss von Propidiumiodid

Der rote Fluoreszenzfarbstoff Propidium - als Propidiumiodid-Salz verwendet (PI) - wird unspezifisch von toten Zellen aufgenommen. Das Propidium-Kation ist nicht in der Lage, die intakte Plasmamembran von lebenden Zellen zu überwinden und reichert sich daher nur in Zellen an, welche die Integrität der Plasmamembran bereits verloren haben (Tanke et al., 1982). Dieser Verlust trifft alle toten Zellen gleichermaßen - apoptotische wie nekrotische- und kann mit Hilfe eines Durchflusszytometers bestimmt werden.
Dazu wurden je 2 x 10^5 Zellen in 100 µl Medium pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte in Gegenwart oder Abwesenheit eines zytotoxischen Agens inkubiert. Zur Bestimmung des Zelltodes wurden die Zellen in 1 ml-FACS-Röhrchen überführt und kurz vor der Messung im Durchflusszytometer bei 4 C mit 100 µl PI-Lösung (5 µg/ml) versetzt. Anregung des Propidiumions erfolgte bei 535 nm. Die Emission erfolgte über ein breites Maximum um 617 nm und wurde daher im FL2- und FL3-Detektor gemessen.

2.5.3.3 Bestimmung von Zellkernen mit subdiploiden DNA-Gehalt

Mit Hilfe einer von Nicoletti et al. (1991) etablierten Methode lassen sich die unterschiedlichen Größen der polymeren genomischen DNA in apoptotischen und nichtapoptotischen Zellkernen detektieren. Dazu werden jeweils 2 x 10^5 Zellen in 100 µl Nicoletti-Puffer ÜN bei 4 C unter Lichtabschluss lysiert. Die Pufferbedingungen erlaubten die Zelllyse ohne Zerstörung der Kerne und die Interkalation des roten Fluoreszenzfarbstoffs Propidium in die genomische DNA (Waring, 1965). Propidium bildet mit den Basenpaaren der DNA einen „*charge transfer*“-Komplex aus, der in Abhängigkeit der Anzahl der Propidium-Basenpaar-Interaktionen zu einer bis zu 30-fachen Fluoreszenzverstärkung führt (Arndt-Jovin et al., 1989). Neben den vitalen diploiden und sich gerade teilenden tetraploiden Zellkernen lassen sich daher im FL-3-Detektor des Durchflusszytometers die apoptotischen Zellkerne als ”subdiploider DNA-Peak” ausmachen (<2n); da es nur im Verlauf der Apoptose zur Fragmentierung von

DNA kommt, lassen sich mittels dieser Methode apoptotische von nekrotischen Zellen unterscheiden.

2.5.4 Vitalitäts-Test (MTT-Test)

Die Vitalität der Zellen wurde photometrisch mit dem MTT [3-4,5-cimethylthiazol-2yl)-2,5 diphenyl] tretrazoliumbromid-Test bestimmt. Das Tetrazoliumsalz ist ein gelbliches wasserlösliches Substrat das durch mitochondriale Enzyme in blaues Formazankristall gespalten wird. Die mitochondriale Aktivität in den Zellen wird als Maß für die zytotoxische Aktivität einer Substanz verwendet. Zu den in 96-Lochplatten ausplattierten und in 100 µl Medium kultivierten Zellen wurden 20 µl der MTT-Lösung (Stock: 5 mg/ml in PBS) gegeben. 4-5 Stunden nach Inkubation im Brutschrank bei 37°C wird das die MTT-Lösung enthaltene Medium abgesaugt und 100 µl 95% Isopropanol/5% Essigsäure dazugeben, um das wasserunlösliche Produkt zu extrahieren. Die Absorption wird photometrisch bei einer Wellenlänge 570 bestimmt.

2.6 Immunohistologische Methoden

2.6.1 Schneiden und Fixierung von Gewebe:

Die Organe Leber, Herz, Milz und Lunge wurden den Tieren entnommen, sofort in im flüssigem Stickstoff vorgekühltem 2-Methylbutan schockgeforen und bei –80°C gelagert. Die gefrorenen Organe wurden mit einem Kryostat bei –25°C geschnitten (10 µm), mit einem unbeschichteten Objektträger (Renner) abgenommen und für eine Stunde an der Luft getrocknet.

2.6.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Folgende Lösungen kamen bei der HE-Färbung zur Anwendung:

Gills Hämatoxylin:

6 g Hämatoxylin
4,2 g Aluminiumsulfat
1,4 g kristalline Zitronensäure
0,6 g Natriumjodatin
269 ml Ethylenglycol
680 ml destilliertes H_20

Eosinlösung:

1 g Eosin (gelblich)
70% EtOH

1% Lithiumcarbonat:

1 g Lithiumcarbonat
100 ml destilliertes H_20

1% säurehaltiger Alkohol:

99 ml 70 % Alkohol
1 ml konzen. HCl

Die Schnitte wurden in Wasser gespült und jeweils in den folgenden Lösungen gefärbt: Hämatoxylin-Lsg. (5 min), Lithiumcarbonat 1% (5 min), säurehaltiger Alkohol 1% (wenige Sekunden), Eosin-Lsg (5 min). Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Schnitte in Wasser gewaschen. Nach 24 Stunden Trocknen der Schnitte wurden sie im Lichtmikroskop in einer 10-fachen, 20-fachen und 40-fachen Vergrößerung untersucht.

2.6.3 TUNEL-Färbung (TDT-mediated dUTP nick end labeling)

Während der Apoptose kommt es in den Zellen zur DNA-Fragmentierung. Dadurch entstehen doppelsträngige, niedermolekulare DNA-Fragmente und Einzelstrangbrüche (nicks). Diese DNA-Strangbrüche können durch eine enzymatische Reaktion angefärbt werden, indem freie 3'-OH-Enden mit modifizierten Nukleotiden markiert werden. Diese Markierung erfolgt durch das Enzym Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT), welches Nukleotide matrizenunabhängig an freie 3'-OH-Enden anheftet. Die Nukleotide sind mit Fluoreszein markiert, so dass die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop erfolgen kann.

Die Detektion von apoptotischen Zellen in Leberschnitten wurden nach Herstellerangeben mit dem „ In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics) durchgeführt.

III Ergebnisse:

1 Rekombinante Antikörper

Die Eigenschaft des TRAIL/TRAIL-Rezeptor Systems in erster Linie zytotoxisch auf verschiedene Tumorzellen zu wirken, während die meisten primären nicht transformierten Zellen resistent für TRAIL-induzierte Apoptose sind, macht es zu einem attraktiven System für die Krebstherapie. Aufgrund der noch nicht völlig aufgeklärten Funktion von TRAIL-R3 und TRAIL-R4 ist die zielgerichtete spezifische Aktivierung einer der beiden Todesrezeptoren durch einen Antikörper optimal. Die Spezifität eines rekombinanten agonistischen Antikörpers gegen TRAIL-R2 führt zu einer lokalen Konzentration am Todesrezeptor und zu dessen Aktivierung. ScFv-Antikörperfragmente bieten im Vergleich zu einem intakten Antikörper zudem andere wichtige Vorteile. Es kommt aufgrund der kleineren Molekülgröße, bei Erhaltung der Antigenbindungskapazität zu einer verminderten Immunogenität und zur besseren Gewebe- und Tumorpenetration, insbesondere von soliden Tumoren. Zudem lassen sich scFv-Antikörper-Fragmente einfach, schnell und kostengünstig in *E.coli* herstellen.

1.1 Klonierung von scFv-Fragmenten gegen CD95 und TRAIL-R2

Ausgangspunkt für die Herstellung von funktionellen scFv-Antiköperfragmenten waren die in der Arbeitsgruppe vorliegenden monoklonalen Antikörper gegen CD95 (anti-APO-1) und gegen TRAIL-R2 (HS201). Der mAk gegen TRAIL-R2 zeigte nach Immobilisierung lytische Aktivität auf Hep3B Tumorzellen (persönliche Mitteilung). Der monoklonale Antikörper anti-APO-1 vom Subtyp IgG3κ besitzt *per se* intrinsische agonistische Aktivität und wurde als positive Kontrolle benutzt (Trauth, et al., 1989). Um einen scFv-Antikörper zu generieren, der die Fähigkeit besitzt die Rezeptoren auf

der Zelloberfläche ausreichend zu vernetzen, wurden die scFv-Antikörperfragmente an die Oligomerisierungsdomäne des Leuzin-Zipper Motif fusioniert (Walczak, et al., 1999). Eine kurze Gelenkregion vor dem Leuzin-Zipper-Motif sollte dem Molekül die nötige Flexibilität geben, um mehrere Rezeptoren auf der Zelloberfläche simultan zu binden (Eisenberg et al., 1986). Die mögliche Struktur des Antikörpermoleküls ist in Abb. 5B dargestellt.

Die Klonierungstrategie der variablen Domänen der schweren und leichten Ketten zur Expression der scFv-Antikörper, anti-APO-1 und anti-TRAIL-R2 im eukaryontischen Expressionsvektor pBluescriptSK bzw. pcDNA3.1 und dem prokaryontischen Vektor pET28a ist in der Abb. 5A schematisch dargestellt. Zur Produktion der Antikörperfragmente wurden parallel zwei Möglichkeiten der Proteinexpression, ein eukaryontisches und prokaryontisches Expressionsystem etabliert.

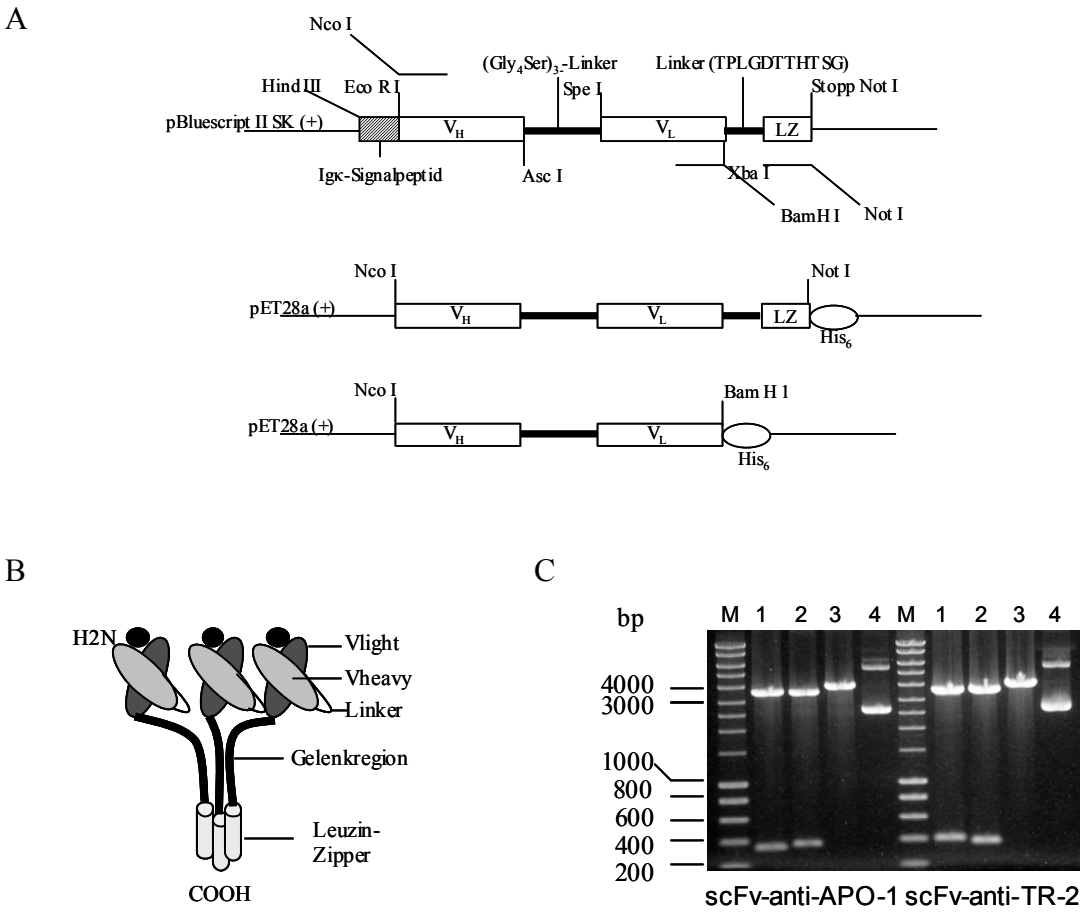


Abb. 5: Schematische Darstellung der Klonierung der scFv-Antikörper anti-CD95 und anti-TRAIL-R2 (A) Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Expressionsvektoren und Angriffspunkte der ausgewählten Primer zur Amplifikation der variablen Domänen der schweren und leichten Kette des scFv-anti-APO-1 und scFv-anti-TRAIL-R2. Dargestellt sind die Restriktionschnittstellen Hind III, Nco I, Asc I, Spe I, Xba I und Not I, die Igκ-Signalsequenz, die Sequenz des Leuzin-Zippers (LZ) und die Polyhistidinsequenz (His_6).
(B) Strukturelles Modell eines über die Leuzin-Zipper Domäne trimerisierten scFv-Antikörpers.
(C) 1,5%-iges Agarosegel mit Restriktionsverdau von Plasmid-DNA eines scFv-anti-APO-1 und scFv-anti-TRAIL-R2-Klons. M: DNA-Marker; (1) variable Domäne der schweren Kette: pBSK-Plasmid verdaut mit Eco RI x Asc I; (2) variable Domäne der leichten Kette: pBSK-Plasmid verdaut mit SpeI und XbaI; (3) durch HindIII linearisierte DNA; unverdaute Kontroll-DNA.

1.1.1 Eukaryontische Expression von scFv-Antikörperfragmenten

Aus den in der Arbeitsgruppe vorliegenden Hybridomzelllinien, die murine monoklonale Antikörper gegen CD95 und TRAIL-R2 produzieren, wurde die RNA

isoliert und mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Um mögliche Mutationen, Insertationen oder Deletionen zu erkennen und zu vermeiden wurden drei unabhängige PCR-Reaktionen angesetzt. Augrund der einfachen blau/weiß Selektion wurde das Konstrukt *de novo* Schritt für Schritt in den pBluescript SK+-Vektor kloniert. Zur PCR-Amplifikation der variablen γ schweren Kette wurden ein Primerset gewählt, dass am 5'-Ende an die Framework1 und am 3'-Ende an die CH1 Domäne hybridisiert. Die durch die Primer eingeführten Restriktionsschnittstellen wurden so gewählt, dass sie nicht in der Sequenz der variablen Domänen schneiden (Ames et al., 1995). Der $(Gly_4Ser)_3$–Linker wurde durch die Hybridisierung zweier komplementärer Oligonukleotide, die die Linkersequenz codieren, hergestellt. Die Igκ-Signalsequenz wurde aus dem vorhandenen pSecTag-Vektor durch die PCR-Methode amplifiziert. Nach elektrophoretischer Aufreinigung der PCR-Produkte wurde die Signalsequenz und die variable schwere Kette restriktionsverdaut. Nach Klonierung der Igκ-Signalsequenz wurde in einem zweifachen Ligationsschritt die variable schwere Kette zusammen mit den phosphorylierten hybridisierten Linkeroligonukleotiden in den pBluescriptSK-Vektor kloniert. In ähnlicher Weise wurde mit der variablen leichten Kette und dem N-terminalen Leuzin-Zipper verfahren. Die leichte Kette wurde mit einem spezifischen Primerset amplifiziert, das 5' am Anfang der variablen Region der leichten Kette und 3' am aminoterminalen Ende der CH1-Region der leichten Kette bindet. Aufgrund der nicht bekannten Sequenz wurden zwei verschiedene degenerierte 5'-Primer, 5'-V_Lκ–1 und 5'-V_Lκ–2 ausgetestet (Dubel et al., 1994). Mit beiden Primern konnte ein PCR-Produkt der leichten Kette aus der c-DNA amplifiziert werden. Die Einführung einer Gelenkregion vor dem Leuzin-Zipper Motiv erfolgte über den 5'-Leuzin-Zipper Primer. Die Sequenzen wurden nach jedem Klonierungsschritt überprüft, um mögliche Mutationen und Leserasterverschiebungen, die eventuell durch die PCR Reaktion auftreten könnten, auszuschließen. Das Agarosegel in Abb. 5C zeigt die variablen Domänen der schweren und leichten Kette nach Restriktionsverdau mit den spezifischen Restriktionsendonukleasen. Nach erfolgreicher Klonierung des pBluescriptSK-Vektorgerüstes für den anti-APO-1 Antikörper konnten in einfacher Weise die variablen Domänen der schweren und leichten Kette gegen die der TRAIL-R2 eingetauscht werden. Bei der Etablierung der PCR-Reaktionsbedingungen für die leichte Kette zeigte nur der 5'- V_Lκ–2 verwendete Primer ein PCR-Produkt. Nach Abgleich mit der Kabat-Datenbank und Identifikation der CDR`s wurden mutationsfreie Klone durch

Restriktionsverdau mit Hind III und Not I in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Um die Antikörperfragmente transient zu exprimieren wurde die Säugetier-Zelllinie COS-7 mit den angegebenen Expressionskonstrukten und dem Baculusvirusprotein p35, einem Apoptoseinhibitor, kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen in 5% FCS für 3 weitere Tage kultiviert. Am dritten Tag wurden der Überstand und die Zellen geerntet und die Expression der Antikörperfragmente im SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen untersucht. Wie in Abb. 6 zu sehen ist, konnten die Einzelkettenantikörper für TRAIL-R2 mit und ohne Gelenkregion (GR) vor dem LZ nur in den Lysaten in der erwarteten Größe von 35 kDa bzw. 32 kDa mit einem anti-LZ Antikörper detektiert werden. Durch Koexpression des anti-apoptotischen Proteins p35 von Baculovirus erhöhte sich die scFv-anti-TRAIL-R2 Expression deutlich (Suliman et al., 2001). Sekretorische scFv-Antikörperfragmente konnten nicht im Überstand nachgewiesen werden. Die transiente Expression der scFv-anti-APO-1 Antikörperfragmente zeigte ebenfalls nur eine Anreicherung des Proteins im Zytoplasma (Daten nicht gezeigt).

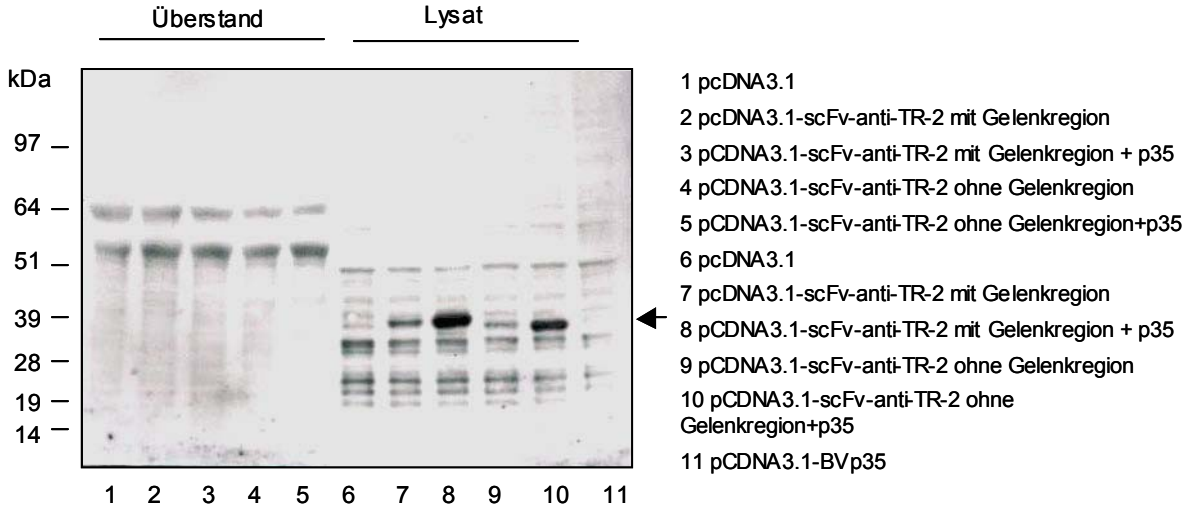


Abb. 6: Eukaryontische Expression des scFv-anti-TRAIL-R2-Antikörperfragmentes
1,5 x 10^5 COS-7- Zellen wurden in 6-Loch Platten mittels Fugene-Reagenz kotransfiziert mit pcDNA3.1-BVp35 und pCDNA3.1-lacZ bzw. pCDNA3.1 bzw. pcDNA3.1-scFv-Antikörperfragmenten im Verhältnis 3:1 bei einer Gesamtmenge an DNA von 4 µg. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Überstande und die Zellen geerntet. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe der LacZ-Färbung überprüft. Gezeigt ist ein Immunoblot der Zelllysate (20 µg) und Überstände (10 µl) der angegebenen Proteine die mit anti-LZ-Antikörper HS601 detektiert wurden.

1.1.2 Prokaryontische Expression von scFv-Antikörperfragmenten

Parallel zur Expression in COS-7-Zellen wurden die scFv-Antikörperfragmente gegen TRAIL-R2 und CD95 mit der Gliederung V_H-$(Gly_4Ser)_3$–V_L-Linker-LZ mit einem spezifischen Primerpaar mittels PCR amplifiziert und in einen bakteriellen Expressionvektor kloniert. Mit dem 5'-Primer wurde die NcoI Schnittstelle eingeführt. Die 3'-Primer wurden so gewählt, das ein Kontrukt mit Leuzin-Zipper sowie ein Konstrukt ohne diese Oligomerisierungsdomäne in pET28a kloniert werden konnten und beide Expressionkonstrukte mit einem Histidinanker versehen waren (Abb. 5A).

1.1.3 Expression und Aufreinigung

1.1.3.1 Einfluss des Bakterienstammes

Die scFv-anti-APO-1 und scFv-anti-TRAIL-R2 Vektorkonstrukte wurden in *E.coli* Rosetta (DE3) pLysS unter einem T7-Promoter exprimiert. Dieser *E.coli*-Stamm exprimiert verstärkt t-RNAs welche von *E.coli* nur selten verwendete Codons erkennen (R= argU: AGA und AGG, I= ileY: ATA; L= leuW: CTA). Damit kann mit diesem Stamm dem Problem des „Codon bias" (Bervorzugung gewisser Codons) vorgebeugt werden. Zur Untersuchung welchen Einfluss der Bakterienstamm auf die Expression der scFv-Antikörperfragmente besitzt, wurden 5 ml einer Übernachtkultur bei einer OD_{600} von 0,6 in zwei unterschiedlichen *E.coli*-Stämmen mit 1 mM IPTG induziert.
Die Abb. 7 zeigt die Expression des scFv-anti-TRAIL-R2 Vektorkontruktes in BL21 (DE3)- und Rosetta (DE3) pLysS *E.coli*-Stämmen. Das Protein wurde nur in dem die zusätzlichen t-RNA's enthaltenen *E.coli*-Stamm Rosetta (DE3) pLysS in moderater Menge exprimiert. Für die folgenden Experimenten wurde dieser Bakterienstamm beibehalten.

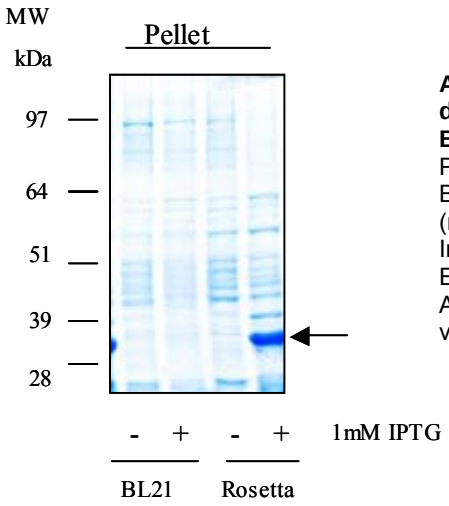


Abb. 7: Coomassie Analyse der Expression des scFv-anti-TRAIL-R2 in Abhängigkeit des Bakterienstammes: Auf einem 4-12% SDS-Polyacrylamid-Gel wurden die Bakterienlysate von BL21 (DE3) (links) und Rosetta (DE3) pLysS (rechts) nach 4 Stunden mit und ohne 1 mM IPTG Induktion bei 37°C aufgetrennt. Der Pfeil zeigt die Expression des anti-TRAIL-R2 scFv-Antiköperfragments bei einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa.

1.1.3.2 Einfluss der Temperatur auf die scFv-Expression

Zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die scFv-Antikörper-Expression wurden 5 ml einer Übernachtkultur bei einer OD_{600} von 0,6 mit 1 mM IPTG bei unterschiedlichen Temperaturen induziert. Am Beispiel des scFv-anti-TRAIL-R2 sind in der folgenden Abbildung das Bakterienpellet und lösliche cytoplasmatische Proteine nach Induktion bei 18°C, bei 30°C und 37°C für 16 h dargestellt. Unter denaturierenden SDS-Gelelektrophoresebedingungen erscheint bei entsprechendem Molekulargewicht eine Proteinbande für scFv-anti-TRAIL-R2. Nach Induktion bei 30°C und 37°C ist Proteinexpression in der Coomassie-Brillant-Blue Analyse zu erkennen (Abb. 8A und B). Der Immunoblot mit dem anti-LZ-Antikörper HS601 zeigt außerdem, dass sehr geringe Mengen Protein schon bei 18°C exprimiert werden. Die Antikörperfragmente werden ausschließlich als unlösliche Aggregate im Pellet detektiert. Zudem zeigt der Blot N-terminale Abbauprodukte des scFv-anti-TRAIL-R2, die in der Brillant-Blue-Analyse nicht detektierbar waren. Durch Variation der IPTG-Konzentration und der Induktionsdauer war es nicht möglich eine lösliche Expression zu erzielen.

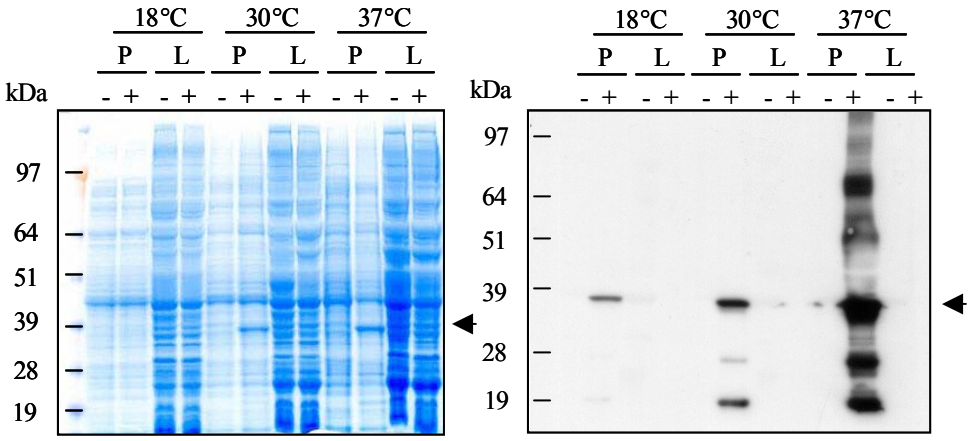


Abb. 8: Analyse der scF-anti-TRAIL-R2-Expression in Abhängigkeit von der Induktionstemperatur
(A) Coomassie-Gel: Mittels SDS-PAGE (4-12%) wurden je 5 µl der in 50 µl 2 x RSB aufgenommenen isolierten Pellets (P) und 10 µl der Lysate (L) nach Induktion mit und ohne 1 mM IPTG bei verschiedenen Temperaturen aufgetrennt.
(B) Immunoblot mit anti-Leuzin-Zipper Antikörper HS601 des in A dargestellten Gels.

1.1.3.3 Einfluss der Induktionsdauer auf die scFv-Expression

Um den Einfluss der Induktionsdauer auf die Protein-Expression zu untersuchen, wurde eine 10 ml Kultur angelegt und die Bakterien bei einer OD_{600} von 0,7 mit 1 mM IPTG induziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion wurden Proben von jeweils 1 ml aus der Bakterienkultur entnommen, abzentrifugiert und lysiert. In Abb. 9A sind die Proben nach unterschiedlicher Induktionsdauer in einem mit Coomassie-Brillant-Blue eingefärbten SDS-Gel dargestellt.

Bereits nach einstündiger Induktion zeigte sich nach SDS-PAGE-Analyse und Coomassie-Brillant-Blue-Färbung eine Expression von scFv-anti-TRAIL-R2 - Antikörperfragmenten mit maximaler Expression nach 3 Stunden. Die Expression von scFv-anti-APO-1 zeigte bei einer Induktion mit 1 mM IPTG bei 37°C eine vergleichbare Kinetik (Abb. 9B).

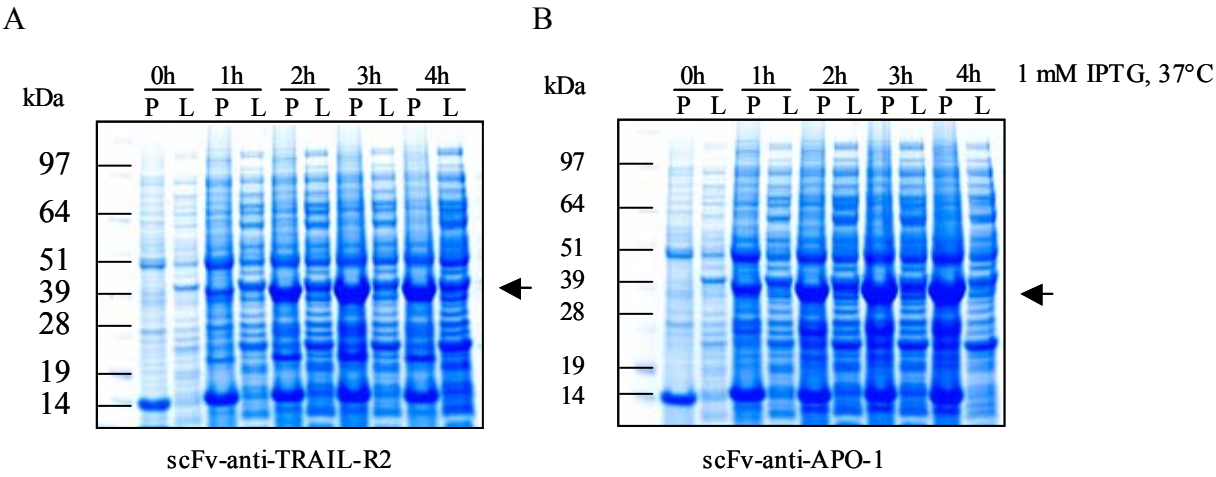


Abb. 9: Analyse der Expression der scFv-Antikörperfragmente in Abhängigkeit von der Induktionsdauer
Zu den Zeitpunkten 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, und 4 h wurden jeweils 1 ml induzierter Bakterienkultur abzentrifugiert und lysiert. Das Lysat wurde nach Zentrifugation abgenommen und das Pellet in 50 µl 2 x RSB aufgenommen. Je 10 µl des Bakterienpellets (P) und 10 µl des Bakterienlysates (L) wurden mittels SDS-Page (4-12%) aufgetrennt.
(A) Expressionskinetik von scFv-anti-TRAIL-R2, (B) Expressionskinetik von scFv-anti-APO-1.
Die Pfeile zeigen die Expression von scFv-anti-TRAIL-R2 (A) und scFv-anti-APO-1 (B).

1.1.4 Isolation und Rückfaltung der scFv-Antiköperfragmente

Nach Optimierung der Expressionsbedingungen wurden je 200 ml LB-Medium mit einer Übernachtkultur von Rosetta (DE3) pLysS-pET28-scFv-anti-APO-1 bzw. -TRAIL-R2 angeimpft und die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG bei einer OD_{600} von ca. 0,7 für 4h bei 37°C induziert. Die in den Bakterien als unlösliche Aggregate akkumulierten scFv-Antikörperfragmente wurden wie in Kapitel 2.1.6 beschrieben, isoliert. Die Einschlusskörper wurden von den löslichen und Membran-Proteinen durch Zelllyse und Sonifizieren bei 4°C separiert und durch Zentrifugation isoliert. Durch wiederholtes Waschen der Einschlusskörper konnten vergleichsweise saubere Antikörperfragmente isoliert werden (Abb. 10). Ein zusätzlicher Reinigungschritt sollte erst nach Überprüfung der Funktionalität erfolgen. Die Produktion der Antikörperfragmente in Einschlusskörpern bietet den Vorteil in einem einzigen Reinigungsschritt große Mengen an sauberem Protein herzustellen und gleichzeitig minimale bakterielle Lipopolysaccharid-Kontamination (Endotoxin) zu haben.

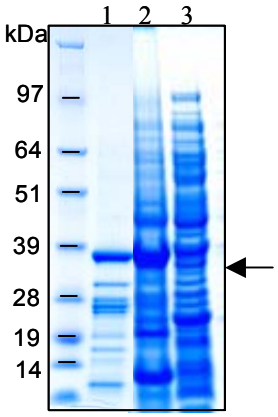


Abb. 10: Analyse der isolierten scFv-Antikörperfragmente
(1) Isolierte Einschlusskörper von scFv-anti-TRAIL-R2 nach Waschen. (2) Rosetta (DE3) pLysS pET28-scFv-anti-TRAIL-R2 mit 1 mM IPTG für 4 h Stunden bei 37°C induziert, (3) ohne IPTG für 4 h Stunden bei 37°. Der Pfeil zeigt die Proteinexpression von scFv-anti-TRAIL-R2.

Die in den Einschlusskörpern vorliegenden unlöslichen inaktiven Proteine wurden nach Isolation in Denaturierungspuffer gelöst. Um die Disulfidbrücken komplett zu reduzieren wurden die solubilisierten Proteine bei Raumtemperatur mit DTT in einer Endkonzentration von 10 mg/ml für 2 h inkubiert. Unlösliche Bakterienverunreinigungen wurden abzentrifugiert. Die Rückfaltung der solubilisierten und reduzierten Proteine erfolgte durch eine 1:100 Verdünnung in einen oxidiertes Glutathion (GSSG) enthaltenen Rückfaltungspuffer bei 4°C. Oxidiertes GSSG zusammen mit DTT bilden ein optimales Redox-System, welches die korrekte Bildung von Disulfidbrücken begünstigt. Die Renaturierung von den scFv-Antikörperfragmenten durch Verdünnung in einem Tris Puffer oder in PBS führte zu nicht funktionellen Antikörperfragmenten (Daten nicht gezeigt). Durch Ultrafiltration wurden die Proteine aufkonzentriert. Nicht korrekt gefaltete Proteine fielen als Präzipitate aus. In einem letzten Schritt wurden die scFv-Antikörperfragmente gegen einen geeigneten Aufbewahrungspuffe dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde colormetrisch nach der Methode von Bradford bestimmt und ergab eine Ausbeute von 10-12 mg pro 200 ml induzierter Bakterienkultur.

1.2 Analyse der rekombinanten Antikörperfragmente

1.2.1 Bindung und Aktivität des scFv-anti-TRAIL-R2 Antikörperfragmentes

Um die Funktionalität des generierten scFv-anti-TRAIL-R2 zu untersuchen, wurden die Antikörperderivate mit TRAIL-R2-exprimierenden Tumorzellen inkubiert und durchflußzytomterisch untersucht (Abb. 11). Die funktionelle Bindung konnte auf in Suspension gehaltenen B-Zelllymphomen wie z.B. BJAB und CEM, sowie auf adhaerenten Tumorzelllinien wie der Fibrosarkomlinie HT1080, und den Hepatomlinien Hep3B, HepG2 gezeigt werden. Durch Präinkubation mit TRAIL-R2-Fc konnte die Bindung des scFv-anti-TRAIL2 blockiert werden (Abb. 11A). Als positive Kontrolle ist zudem in der Abb.11 die Bindung des monoklonalen parentalen Antikörpers HS201 gezeigt. Das Bindungsverhalten (Fluoreszenzintensität) des parentalen mAks und des scFv-Antikörpers kann aufgrund der unterschiedlichen Färbeverfahren nicht verglichen werden. Die FACS Analyse wie unter 2.5.2 in Material und Methoden beschrieben zeigt, dass der scFv-anti-TRAIL-R2 Antikörper auf TRAIL-R2 exprimierenden Zellen funktionell und spezifisch bindet.

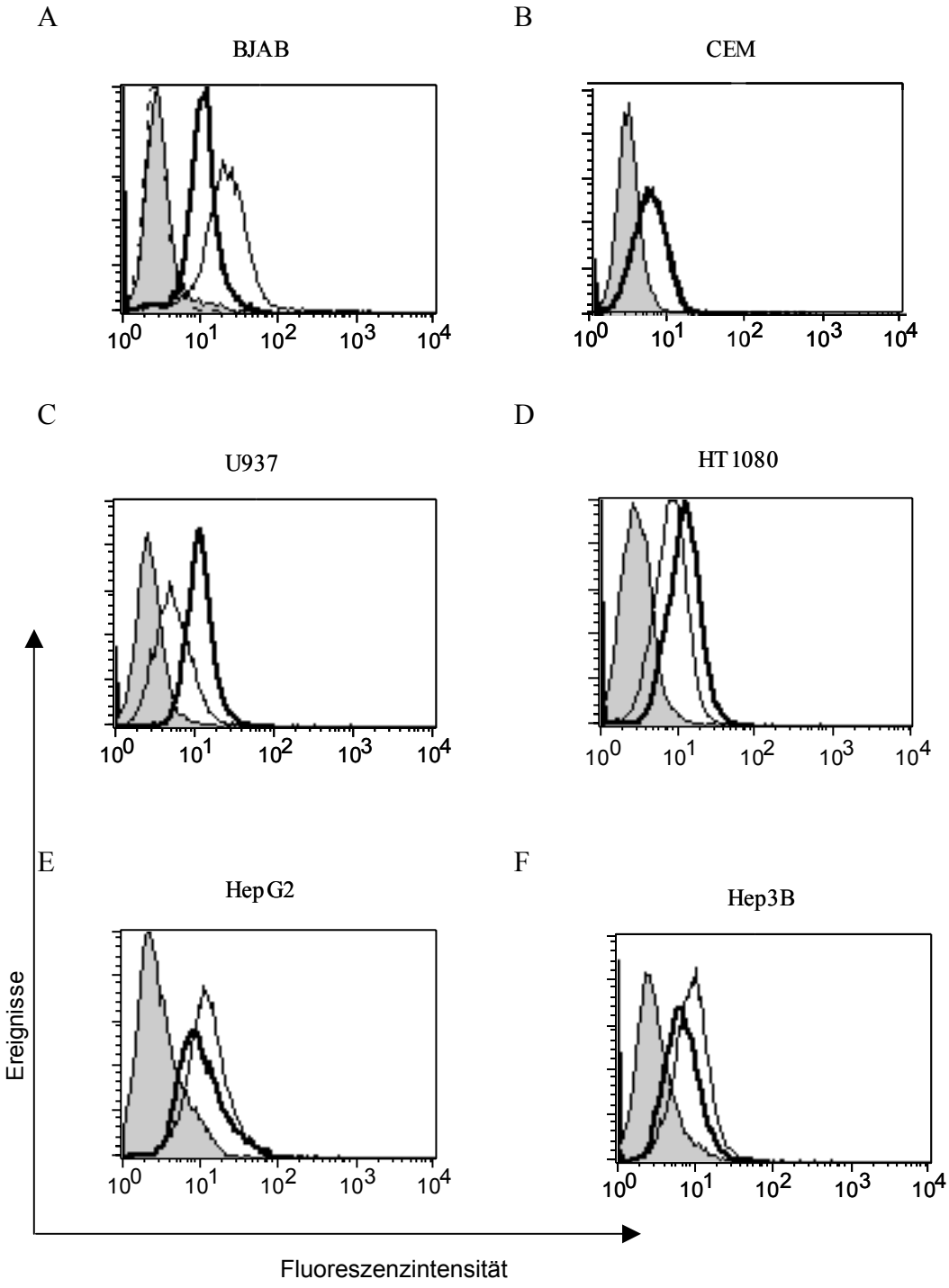


Abb. 11: Bindung der anti-TRAIL-R2 scFv-Antikörperfragmente nach *in vitro* Faltung
Die Abbildungen A-F zeigen die Bindung vom parentalen HS201 Antikörper (▬) und scFv-anti-TRAIL-R2 Derivates (—) auf verschiedenen Tumorzelllinien. (A) BJAB; Blockierung der Bindung von scFv-anti-TRAIL-R2 durch Präinkubation mit TRAIL-R2-Fc für 30 min bei RT vor Zugabe zu den Zellen (- - -), (B) CEM, (C) U937, (D) HT1080, (E) HepG2, (F) Hep3B. Die grau gefüllte Fläche kennzeichnet die Negativkontrolle. Die Oberflächenfärbung erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben.

Um die funktionelle Aktivität des scFv-anti-TRAIL-R2-Antikörperfragments zu analysieren wurden TRAIL-sensitive Tumorzellen sowie mit Chemotherapeutikum sensitivierte TRAIL-resistente Tumorzelllinien mit verschiedenen Konzentrationen an parentalem Antikörper und rekombinantem Antikörperfragment inkubiert. Die apoptotische Aktivität der Antikörper wurde anhand der Kernfragmentierung nach der Methode von Nicoletti et al. (1991) bestimmt. Geringe agonistische Aktivität konnte mit scFv-anti-TRAIL-R2 nur auf durch das Chemotherapeutikum 5-Fluoruracil (5-FU) sensitivierten Hep3B gezeigt werden (Abb. 12). Zudem zeigt die Abbildung, dass der parentale Antikörper HS201 auch nach Sensitivierung der Zellen mit 5-FU nur geringfügig Apoptose induziert. Die Inkubation von scFv-anti-TRAIL-R2 mit einer Reihe anderer Tumozelllinien, auch TRAIL-sensitiver Zelllinien, zeigte keine Aktivitätssteigerung im Vergleich zum monoklonalen Antikörper. Durch Präinkubation mit einem anti-Histidin-Antikörper wurde die Aktivität von scFv-anti-TRAIL-R2 nicht erhöht.

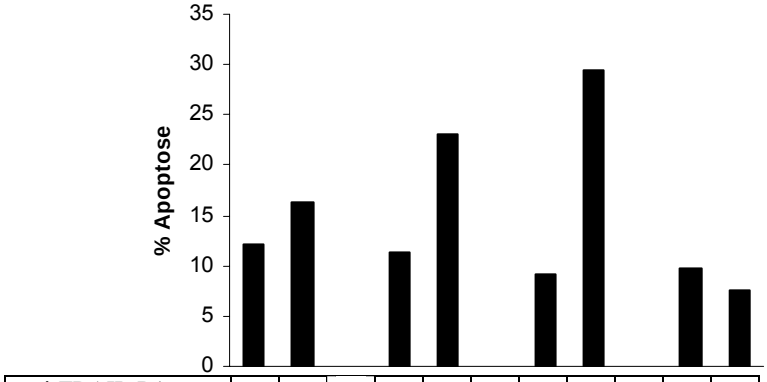


Abb. 12: Aktivität des scFv-anti-TRAIL-R2-Antikörperfragmentes auf Hep3B- Zellen.
Hep3B Zellen wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von 5-FU (100 µg/ml) mit dem parentalen Antikörpern HS201 (10 µg/ml) bzw. mit scFv-anti-TRAIL-R2 (20 µg/ml) für 24 Stunden inkubiert . Die Apoptose wurde anhand der Kernfragmentierung nach der Methode von Nicoletti et al. 1991 bestimmt. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Experiment von zwei durchgeführten Experimenten.

1.2.2 Bindung und Aktivität des scFv-anti-APO-1 Antikörperfragmentes

Die funktionelle Analyse des scFv-anti-APO-1 Antikörperfragmentes wurde durch Inkubation des rekombinanten Antikörperfragmentes mit CD95-exprimierenden Zellen durchgeführt. Zudem wurde die Bindung eines Antikörperfragmentes ohne Multimerisierungsdomäne, scFv-anti-APO-1-His, untersucht. Abb. 13 zeigt spezifische Bindung von scFv-anti-APO-1-LZ (Abb. 13A) und scFv-anti-APO-1-His (Abb. 13B) auf dem CD95-exprimierenden T-Zell-Lymphom H9. Diese Bindungen können durch Präinkubation mit CD95-Fc inhibiert werden (Abb. 13A und B). Bindungeigenschaften und Aktivität der scFv-Antikörper wurden sowohl auf Typ I- als auch auf Typ II-Zellen untersucht. Abb. 14 zeigt die Bindung von scFv-anti-APO-1-LZ und scFv-anti-APO-1-His auf TypI-Zellen wie dem B-Zell-Lymphom SKW6.4- (Abb. 14A links) und dem T-Zell-Lymphom H9 (Abb. 14A links). Ebenso konnte auf der Typ II T-Zell-Lymphomlinie JA3 die spezifische Bindung der Antikörperderivate gezeigt werden (Abb. 15 links). Die agonistische Aktivität des parentalen Antikörpers und seiner Derivate wurde durch Inkubation der Antiköperfragmente in den angegebenen Konzentrationen mit den Zellen und anschließender durchflußzytometrischer Untersuchung der apoptotischen Zellen bestimmt. Der Zytotoxizitätstest zeigte, dass der rekombinante scFv-anti-APO-1-LZ lytische Aktivität besitzt, die mit der Aktivität des parentalen Antikörpers bei höheren Konzentrationen vergleichbar ist. Die Inkubation der Zellen mit niedrigen Konzentrationen zeigte für den mAk anti-APO-1 eine höhere Aktivität. Die agonistische Aktivität ist nicht Zelltyp spezifisch, da scFv-anti-APO-1-LZ auf Typ I-, als auch auf Typ II-Zellen Apoptose induzierte (Abb. 14 und 15). Die Inkubation unterschiedlicher Konzentrationen an scFv-anti-APO-1-His mit CD95-exprimierenden Tumorzellen und Bestimmung der apoptotischen Zellen im FACS zeigte, dass der scFv-anti-APO-1-His ohne Leuzin-Zipper keine zytotoxische Aktivität besitzt. Die Aktivität konnte jedoch durch einen Überschuß an einem anti-Histidin-Antikörper partiell wieder hergestellt werden (Abb. 16B). Die Vernetzung von scFv-anti-APO-1-LZ oder des mAk anti-APO-1 zeigte keine Aktivitätssteigerung (Abb. 16A).

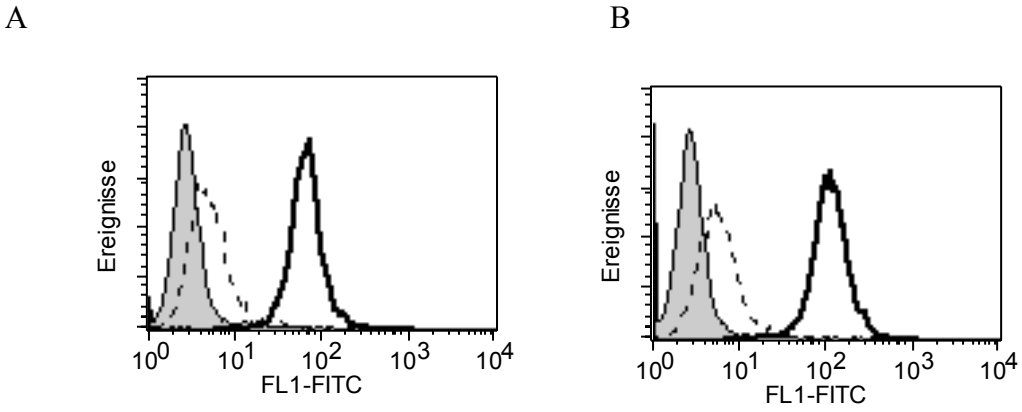


Abb. 13: Oberflächenbindung von scFv-anti-APO-1-Derivaten auf H9-Zellen
Die Abbildung zeigt die Bindung von scFv-anti-APO-1-LZ (A) (▬) und scFv-anti-APO-1-His (B) (▬) auf H9-Zellen, die durch Präinkubation mit CD95-Fc für 30 min bei RT inhibiert wird (- - -). Die grau gefüllte Fläche kennzeichnet die Negativkontrolle. Die Oberflächenfärbung erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben.

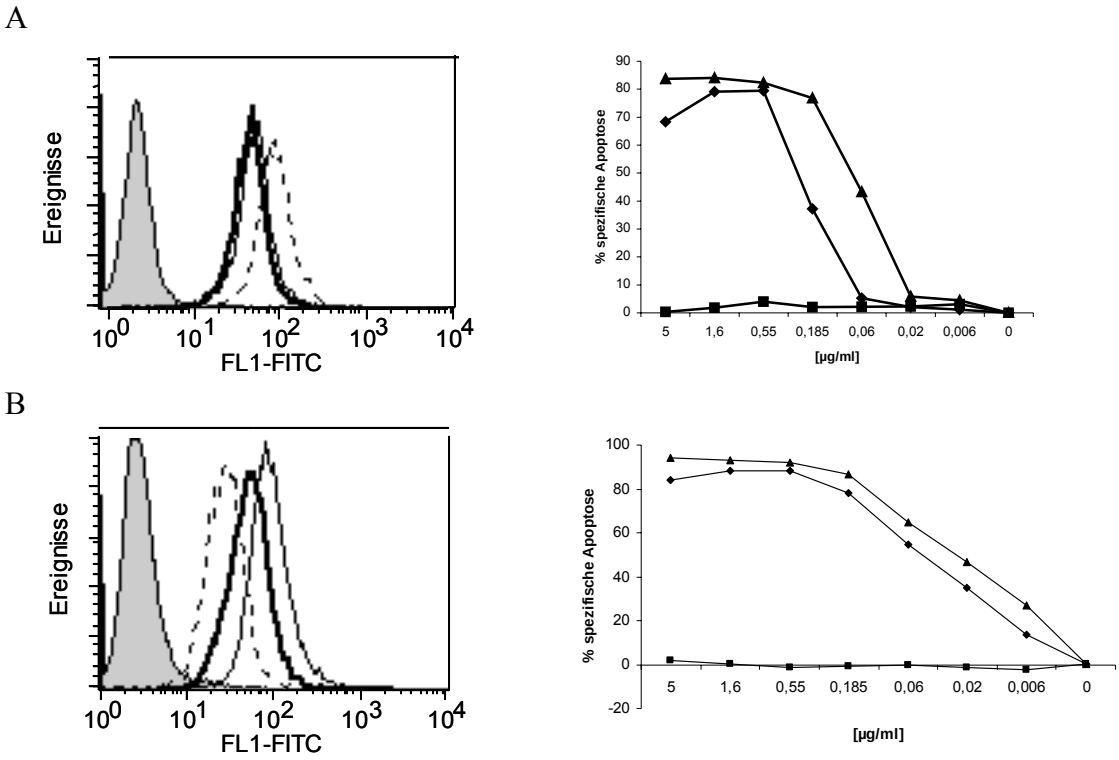


Abb. 14: Oberflächenbindung und Aktivität der scFv-anti-APO-1-Antikörperfragmente nach in vitro Faltung auf H9-Zellen (A) und SKW6.4-Zellen (B) (Typ I-Zellen).
(A) Die linke Abbildung zeigt die Bindung von scFv-anti-APO-1-LZ (− −), scFv-anti-APO-1-His (—) und des parentalen anti-APO-1 (▬) auf H9-Zellen. Die grau gefüllte Fläche kennzeichnet die Negativkontrolle. Die rechte Abbildung zeigt die zytotoxische Aktivität von scFv-anti-APO-1-LZ (♦), scFv-anti-APO-1-His (■) und anti-APO-1 (▲) auf H9-Zellen. Die Zellen wurden für 16h mit den angegebenen Konzentrationen von Antikörpern inkubiert.
(B) Die linke Abbildung zeigt die Bindung von scFv-anti-APO-1-LZ (− −), scFv-anti-APO-1-His (—) und parentalen anti-APO-1 (▬) auf SKW6.4-Zellen. Die rechte Abbildung zeigt die zytotoxische Aktivität von scFv-anti-APO-1-LZ (♦), scFv-anti-APO-1-His (■) und mAk anti-APO-1 (▲) auf SKW6.4-Zellen. Für die durchflußzytometrische Untersuchung wurden jeweils jeweiles 1x 10^6 wie in Methoden und Methoden beschrieben gefärbt. Die Apoptose wurde anhand der Zellmorphologie im FACS bestimmt.

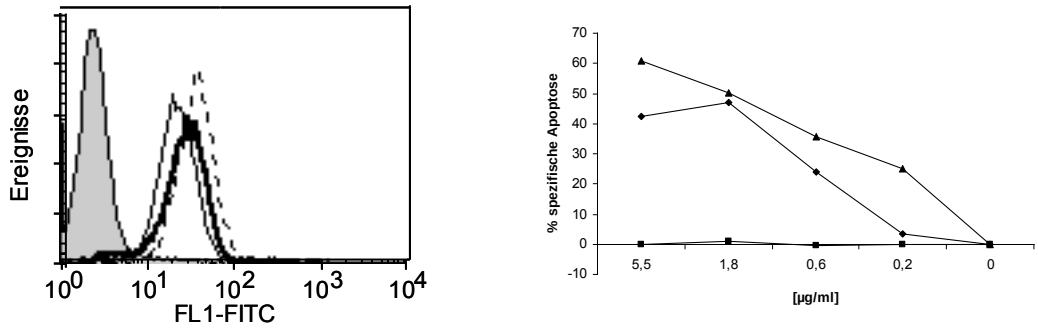
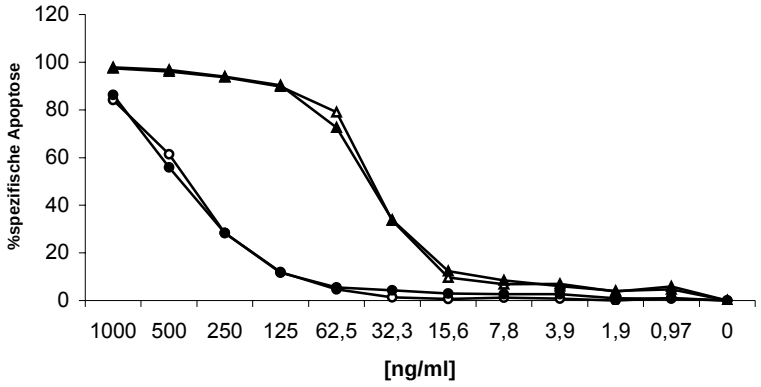


Abb. 15: Oberflächenbindung und Aktivität der scFv- anti-APO-1-Antikörperfragmente nach *in vitro* Faltung auf JA3-Zellen (Typ II-Zellen).
(A) Die Abbildung zeigt die Bindung von anti-APO-1-LZ (− −), anti-APO-1-His (—) und parental anti-APO-1 (▬) Antikörper auf JA3-Zellen. Die grau gefüllte Fäche kennzeichnet die Negativkontrolle.
(B) Die rechte Abbildung zeigt die zytotoxische Aktivität von scFv-anti-APO-1-LZ (♦), scFv-anti-APO-1 (■) und anti-APO-1 (▲) auf JA3-Zellen. Die Zellen wurden für 16h mit den angegebenen Konzentrationen von Antikörpern inkubiert. Bestimmt wurde die Apoptose anhand der Zellmorphologie und Aufnahme von PI (FSC/SSC-PI). Die Oberflächenfärbung wurde jeweils mit 1x 10^6 Zellen wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt .

A



B

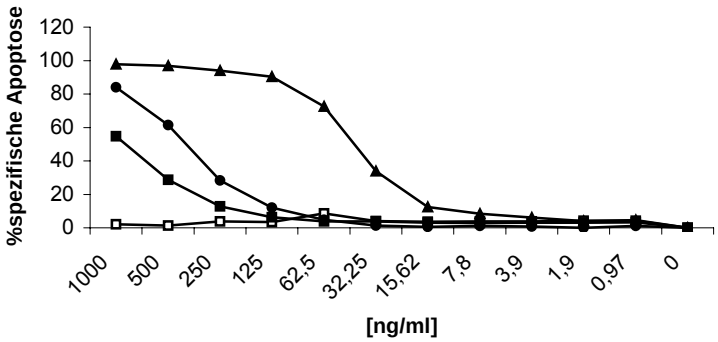


Abb.16: Aktivität der scFv- anti-APO-1-Antikörperfragmente auf SKW6.4-Zellen
(A) Die Abbildung zeigt die zytotoxische Aktivität von scFv-anti-APO-1-LZ ohne (●), mit anti-Histidin Antikörper (○) und mAk anti-APO-1 ohne (▲) und mit Protein (Δ) auf SKW6.4-Zellen.
(B) Dargestellt ist die zytotoxische Aktivität von scFv-anti-APO-1-LZ (●), scFv-anti APO-1 ohne (□) und mit anti-Histidin Antikörper (■) und anti-APO-1 (▲) auf SKW 6.4 Zellen. Die oben genannten Proteine wurden für 20 h mit den Zellen inkubiert. Die Inkubation der Antikörper mit einem Histidin-Antikörper oder Protein A erfolgt für 30 Minuten bei RT vor Zugabe zu den Zellen. Die Apoptose wurde anhand der Morphologie bestimmt.

Sowohl der scFv-anti-APO-1-His als auch der scFv-anti-APO-1-LZ Antikörper zeigen Bindung auf CD95-exprimierenden Zellen, jedoch nur der scFv-anti-APO-1-LZ zeigt agonistische Aktivität. Dies zeigt, dass nur der multimerisierte scFv-Antikörper Apoptose induzieren kann.

2 TRAIL

Zur Zeit ist die Eliminierung von Krebszellen durch die Induktion von Apoptose durch Chemotherapie oder Bestrahlung die wichtigste Strategie die in der Krebstherapie bei Primärtumoren angewendet wird. Ansätze todesrezeptorspezifische Agentien wie lösliches TNF oder agonistische anti-CD95 (APO-1/Fas) Antikörper in der Krebstherapie einzusetzen, scheiterten an der systemischen bzw. organspezifischen Toxizität dieser Substanzen. TRAIL hingegen scheint nach den ersten Untersuchungen in therapeutisch relevanten Mengen keine Toxizität hervorzurufen.

Einige Studien von verschiedenen TRAIL-Präparationen zeigten Toxizität auf humanen Zellen wie menschlichen Hepatozyten, epithelialen Prostatazellen sowie Gehirngewebe (Jo, et al., 2000; Nesterov et al., 2002; Nitsch et al., 2000). Es wird angenommen, dass die potentielle Toxizität von in einem bakteriellen System exprimierten His-getaggtem TRAIL auf Aggregate zurückzuführen ist. Dies zeigt, dass die Herstellung eines nicht aggregierenden TRAIL-Derivates sehr wichtig ist, um eine entsprechende Sicherheit zu gewährleisten und organspezifische bzw. systemische Toxizität zu vermeiden.

Um rekombinantes TRAIL in der Krebstherapie einzusetzen, sollte das Optimum an pharmakologischer Wirksamkeit bei minimaler Toxizität erzielt werden.

Zu Beginn der Arbeit lag keine rekombinante Form von TRAIL vor, die das therapeutische Potential in vollen Maße nutzte. In dieser Arbeit wurde eine sehr potente neue Präparation von TRAIL entwickelt, die im Vergleich zur ungetaggten Version eine höhere Aktivität besitzt, in Lösung stabil ist ohne zu aggregieren und auf primäre Zellen wie Hepatozyten nicht toxisch wirkt. Zudem ist die neue rekombinante Form einfach, kostengünstig und schnell in *E.coli* herstellbar.

2.1 Expression und Aufreinigung von verschiedenen TRAIL-Derivaten

Um ein trimerisiertes TRAIL mit verbesserten Eigenschaften herzustellen wurde TRAIL (Aminosäuren 95-281) N-terminal mit einer stabilisierenden Trimerisierungsdomäne, dem Isoleuzin Zipper fusioniert (Abb. 17).

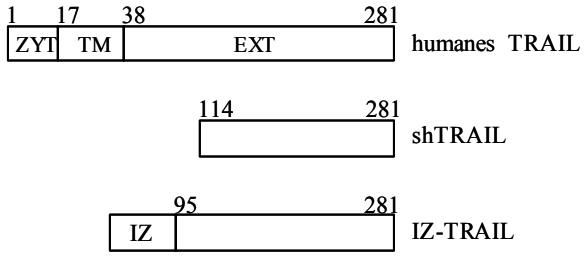


Abb. 17: Schematische Darstellung der verschiedenen rekombinanten TRAIL-Proteine.
Die Strukturen von humanem TRAIL und den löslichen TRAIL-Derivaten sind schematisch gezeigt. ZYT, TM, EXT und IZ repräsentieren: zytoplasmatische (ZYT) Domäne, Transmembrandomäne (TM), extrazelluläre Domäne (EXT) und Isoleuzin-Zipper (IZ). Die Zahlen stehen für die Aminosäurepositionen im jeweiligen Protein.

Die Sequenz des Isoleuzin-Zippers $(IEKKIEA)_4$ wurde wie von Suzuki et al. publiziert, gewählt (Suzuki et al., 1998). Dort wurde gezeigt, dass das Isoleuzin-Zipper-Peptid eine parallel trimerisierte *coiled-coil*-Struktur in Lösung bildet. Die Globulärstruktur des Isoleuzin-Zipper-Peptides ist natürlich vorkommenden nativen Proteinen sehr ähnlich. Für die Konstruktion von IZ-TRAIL wurde die Nukleotidsequenz des synthetischen Isoleuzin-Zipper vor die mittels PCR amplifizierte für die TNF-Homologiedomäne kodierende DNA von TRAIL (AS 95-281) gesetzt. Zuerst wurde die Sequenz von IZ-TRAIL in den pBluescriptSK-Vektor kloniert. Die *de novo* Herstellung der Isoleuzin-Zipper-Sequenz erfolgte durch die Hybridisierung zweier, um 24 Basen komplementärer Oligonukleotide und nachfolgender PCR-Reaktion. Anschließend wurden die doppelsträngigen Oligos mit den Restriktionsnukleasen Spe I und Bgl II geschnitten und nach Fällung über ein 12%-PAA Gel gereinigt. Zusammen mit dem Bgl II und Not I restriktionsverdauten aufgereinigten PCR-Produkt von TRAIL wurden beide Fragmente in einer zweifachen Ligation in den mit den Restriktionsendonukleasen Spe I und Not I verdauten und eine Signalsequenz enthaltenen Vektor pcDNA3.1

kloniert. Über PCR-Amplifikation mit einem spezifischen Primerset erfolgte die Subklonierung in den bakteriellen Vektor pET28a über die Restriktionsschnittstellen Nco I und Not I. Durch Sequenzanalyse wurden die mutationsfreien Expressionsplasmide identifiziert.

Zuerst wurde die bakterielle Expression von IZ-TRAIL etabliert. Das pET28-IZ-TRAIL Expressionsplasmid konnte nach der Transformation in Zellen des *E.coli*-Stammes Rosetta (DE3) pLysS unter einem T7 Promoter als lösliches Protein exprimiert werden. Abb. 18 zeigt, dass eine maximale Ausbeute an löslichem IZ-TRAIL Protein bei 18°C für 18 h bei einer IPTG-Konzentration von 0,2 mM erreicht wird. Ein Drittel des exprimierten IZ-TRAIL liegt bei diesen Expressionsbedingungen dennoch in unlöslichen Einschlusskörpern vor.

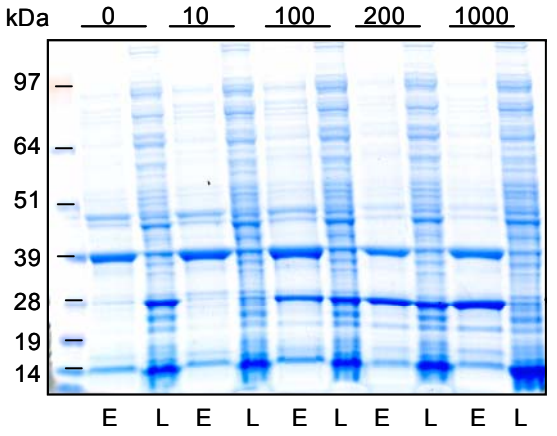


Abb. 18: Analyse der IZ-TRAIL Expression in Abhängigkeit der IPTG-Konzentration: Mittels SDS-PAGE (4-12%) wurden jeweils 10 µl der isolierten Einschlusskörper (E) und 10 µl der Lysate nach Induktionen mit den angegebenen IPTG-Konzentrationen bei 18°C für 20 h, aufgetrennt.

Nach erfolgreicher Etablierung der Expressionsbedingungen für IZ-TRAIL erfolgte eine Expression im präparativen Maßstab unter den oben genannten Bedingungen. Dafür wurden 250 ml LB-Medium mit einer Übernachtkultur von Rosetta (DE3) pLysS pET28-IZ-TRAIL angeimpft und bei einer OD_{600} von 0,6-0,8 mit 0,2 mM IPTG induziert.

Nach Extraktion des löslichen Proteins erfolgte eine zwei Stufen Affinitätsaufreinigung mit einer Keramik-Hydroxyapatit- und Ni-NTA-Agarose-Säule. Die Bindung der nicht mit Poly-Histidin-getaggten-Version von IZ-TRAIL an der immobilisierten Metall-Ionen-Affinitätschromatographischen (IMAC)-Säule erfolgte wahrscheinlich über interne Histidin-Aminosäurereste. Die Zelllysate der induzierten und nicht-induzierten Kultur, Waschfraktionen sowie die während der Reinigung gesammelten Fraktionen

wurden durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 19A und B). Nach zweifacher affinitäts-chromatischer Aufreinigung liegt das Protein in hoher Reinheit vor (Abb. 19B).

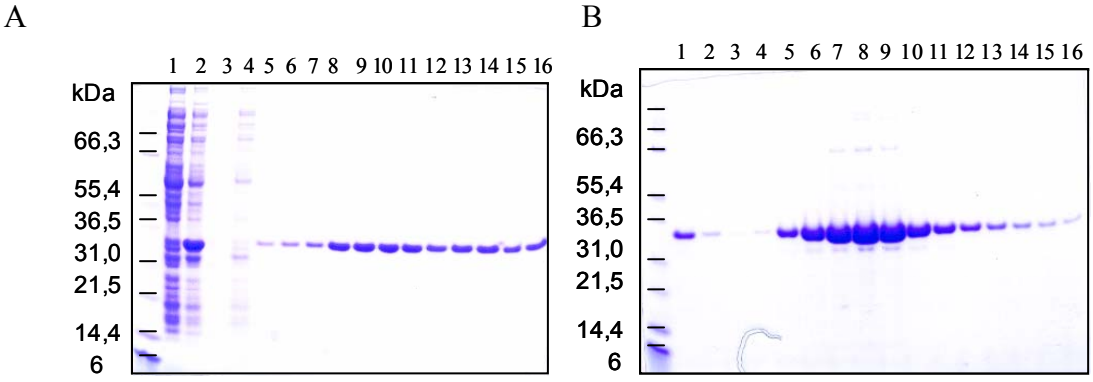


Abb. 19: Zwei-Stufen-Affinitätschromatographie von IZ-TRAIL
(A) Hydroxyapatit-Chromatographie: Spur 1: E.coli Zellextrakt nicht induziert, Spur 2: E.coli Zellextrakt induziert, Spur 3 Durchlauf, Spur 4: Waschfraktion, Spur 5-16 eluierte Fraktionen.
(B) Ni-NTA-Chromatographie: Spur 1:IZ-TRAIL Auftrag nach Hydroxyapatit-Aufreinigung, Spur 2: Durchfluß, Spur 3 und 4: Waschfraktionen, Spur 5-17 eluierte Fraktionen.

Unabhängig von der Reihenfolge der chromatographischen Schritte ist die Ausbeute und Reinheit an rekombinanten IZ-TRAIL vergleichbar. Es wurde eine Ausbeute von ca. 15 mg rekombinanten IZ-TRAIL pro 1L induzierter Bakterienkultur erzielt.

In einem letzten Schritt wurden die das IZ-TRAIL Protein enthaltenen Elutionsfraktionen vereinigt und in einen geeigneten Puffer für die Langzeitaufbewahrung bei –80°C dialysiert. Die Konzentrationsbestimmung der Präparation erfolge photometrisch und wurde anhand des spezifischen Extinktionskoeffizienten von 25580 $M^{-1}cm^{-1}$ errechnet. Die Austestung der optimalen Pufferbedingungen zeigte, dass die Proteinpräparation von IZ-TRAIL insbesondere bei Konzentrationen zwischen 2 und 10 mg/ml in Aufbewahrungspuffer wie PBS pH 7,4 ohne weitere Agenzien nicht stabil war. Dies zeigte sich optisch durch Aggregation und Präzipitation des Proteins, was durch Zugabe von 0,5 M Arginine-HCl vermieden werden konnte. Die Bestimmung des Endotoxin Gehaltes in der Lösung mittels Limulus-Amoebocyte-Lysat-Analyse ergab einen Endotoxingehalt von 1,32 U/ml.

2.1.1 Expression und Aufreinigung von shTRAIL

Um das Expressionskonstrukt für shTRAIL zu erstellen, wurde die Nukleotidsequenz von TRAIL der Aminosäuren 114-281 mittels PCR amplifiziert, und über die Restriktionsschnittstellen Nco I und Not I in den den bakteriellen Vektor pET28a ligiert. Es wurde gezeigt, dass Zink für die native Struktur und Stabilität von TRAIL erforderlich ist (Hymowitz et al., 2000). Die Proteininduktion von pET28-shTRAIL erfolgte daher in Anwesenheit von 2 mM DTT und 100 µM ZnCl im LB-Medium. Zudem enthielten alle für die Reinigung benötigten Puffer 2 mM DTT, um eine Aggregation zu vemeiden. Die Reinigung erfolgte nach Extraktion des Proteins über eine HisTrap-HP-Affinitätssäule (Abb. 20). Die shTRAIL-haltigen Fraktionen 6-11 wurden vereinigt und gegen einen Aufbewahrungsbuffer mit DTT und ZnCl dialysiert. Die Konzentrations-Bestimmung erfolgte photometrisch anhand der Absorption bei UV_{280}.

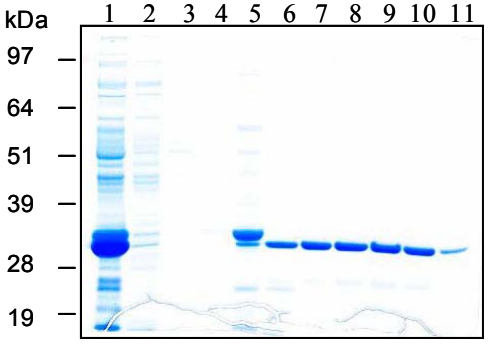


Abb. 20.: Aufreinigung von shTRAIL
SDS-PAGE-Analyse nach Coomassie-Brillant-Blue-Färbung von IMAC-aufgereinigtem shTRAIL Protein: Spur 1: E.coli Zellextrakt induziert, Spur 2 Durchlauf, Spur 3-4 Waschfraktionen, Spur 5-11 eluierte Fraktionen nach immobilisierter Metall-Ionen-Affinitätschromatographie (IMAC).

2.2 Charakterisierung der rekombinanten TRAIL-Versionen

Die aufgereinigten rekombinanten TRAIL-Versionen IZ-TRAIL und shTRAIL wurden im nächsten Schritt mittels Gelelektrophorese und Gelfiltration analysiert.
Die analytische Gelfiltrationschromatographie von IZ-TRAIL unter nativen

Bedingungen ergibt ein relatives Molekulargewicht von 82 kDa. Dies zeigt an, dass das in Bakterien exprimierte IZ-TRAIL mit einem theoretischen Molekulargewicht von 26 kDa als stabiles lösliches Homotrimer vorliegt. Ein geringer Prozentsatz von IZ-TRAIL eluiert bei einem Molekulargewicht von 190 kDa und liegt demnach als Hexamer in Lösung vor. ShTRAIL eluierte in der Gelfiltrationschromatographie bei einem Molekulargewicht von 52 kDa Protein und liegt in der Präparation ausschließlich als Trimer vor (Abb. 21B).

Die SDS-Gel-Analyse nach Commassie-Brilliant-Blue-Färbung zeigt zudem, dass ein Teil der in der IZ-TRAIL-Präparation vorliegenden Monomere unter nicht reduzierenden Bedingungen über Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpfte Dimere bzw. Trimere bildet. Auch in der shTRAIL-Präparation sind die TRAIL-Monomere teilweise kovalent über Disulfidbrücken miteinander verbunden (Abb. 21A).

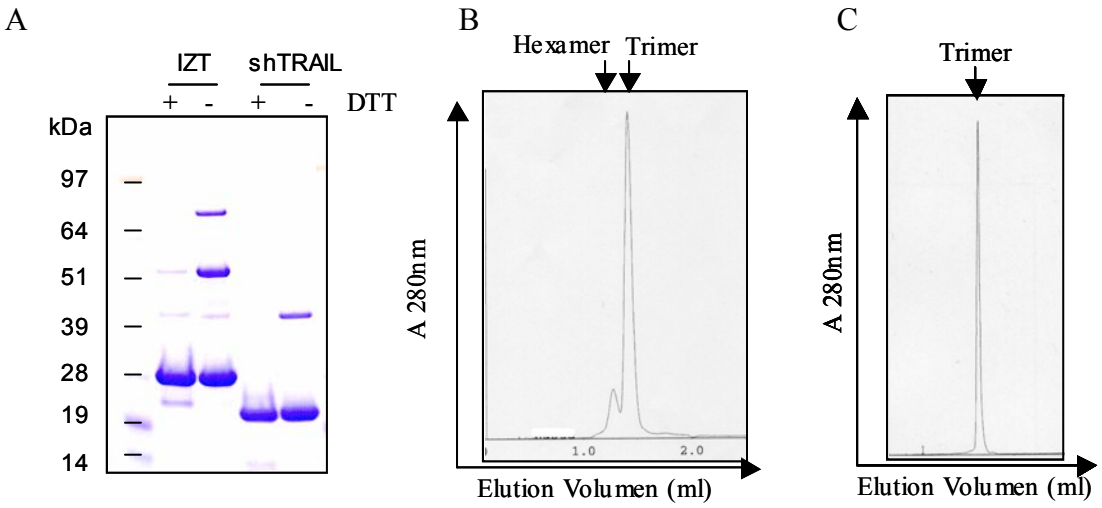


Abb. 21: Charakterisierung der rekombinanten löslichen TRAIL-Proteine
(A) SDS–PAGE-Analyse ohne (-) oder mit (+) 100 mM DTT nach Coomassie–Brillant-Blue Färbung. (B) und (C) Analytische Gelfiltrationschromatographie von IZ-TRAIL (B) und shTRAIL (C). Jeweils 10-20 µg gereinigtes IZ-TRAIL bzw. shTRAIL wurden auf eine Superdex 200 Sepharose Säule aufgetragen.

Um die Stabilität des aufgereinigten rekombinanten IZ-TRAIL-Proteins zu testen wurde das Protein mehrmals im flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei 42°C aufgetaut. Die Bioaktivität wurde durch Inkubation mit der TRAIL-sensitiven Tumorzelllinie BL60 bestimmt. Selbst nach dieser harschen Behandlung vermindert sich Stabilität und Aktivität von IZ-TRAIL nur minimal (Abb. 22).

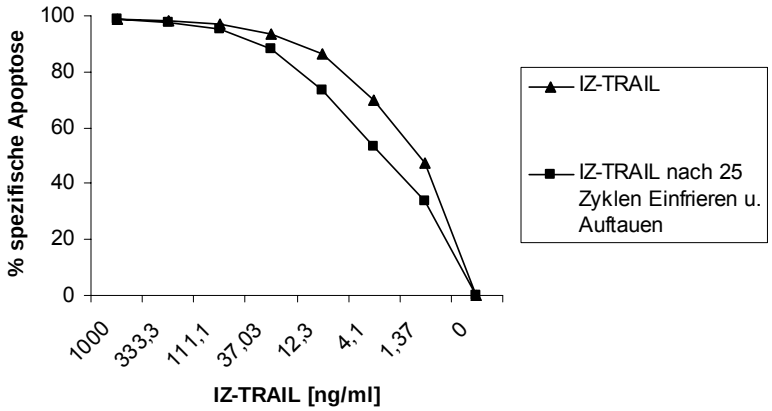


Abb. 22 Stabilität und Aktivität von IZ-TRAIL
IZ-TRAIL wurde vor (▲) bzw. nach 20 Zyklen „Einfrieren und Auftauen" (■) in den angegebenen Konzentrationen mit BL60-Zellen für 18 h Stunden inkubiert und die Apoptose durchflußzytometrisch anhand der Morphologie und PI-Aufnahme bestimmt.

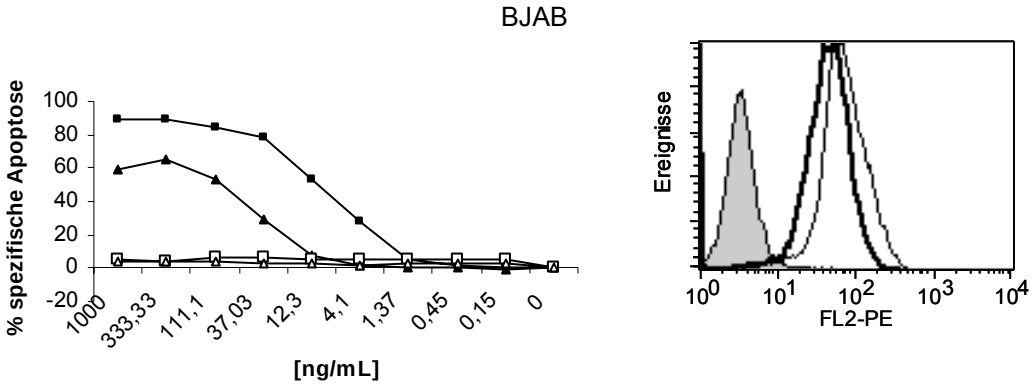
2.3 Aktivität der TRAIL-Proteine *in vitro*

2.3.1 Aktivität der verschiedenen TRAIL-Proteine auf Tumorzelllinien

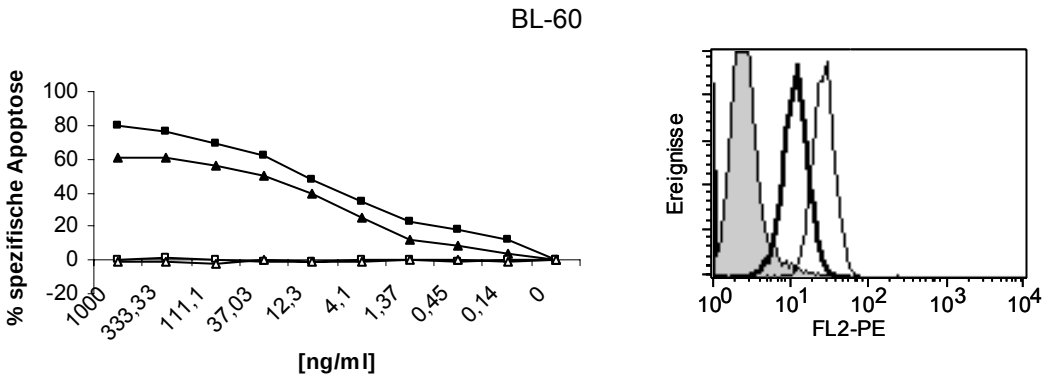
Die Aktivität der verschiedenen TRAIL-Versionen wurde auf TRAIL-R1 und TRAIL-R2 unterschiedlich hoch exprimierenden Tumorzelllinien getestet. Verschiedene Tumorzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen für 18 h mit IZ-TRAIL bzw. shTRAIL inkubiert und die zytotoxische Aktivität durch Analyse des FSC/SSC im FACS oder photometrisch mittels MTT-Assay bestimmt. Getestet wurden jeweils eine repräsentative Tumorzelllinie einer Tumorart.

Bei der Analyse zeigte sich, dass IZ-TRAIL im Vergleich zum shTRAIL eine höhere Aktivität besitzt (Abb. 23). Auf ausschließlich TRAIL-R2-exprimierenden Tumorzelllinien wie dem T-Zell-Lymphom JA3 und dem monoblastischen Lymphom U937 zeigte shTRAIL im Vergleich zu IZ-TRAIL eine deutlich geringere Aktivität. Die apoptotische induzierende Aktivität von IZ-TRAIL gegenüber Zellen, die beide Todesrezeptoren exprimieren war ebenfalls höher, jedoch war der Unterschied zu shTRAIL nicht so deutlich. Die zytotoxische Aktivität von shTRAIL und IZ-TRAIL konnte durch Neutralisierung mit löslichem TRAIL-R2-Fc inhibiert werden (Abb. 23A-D).

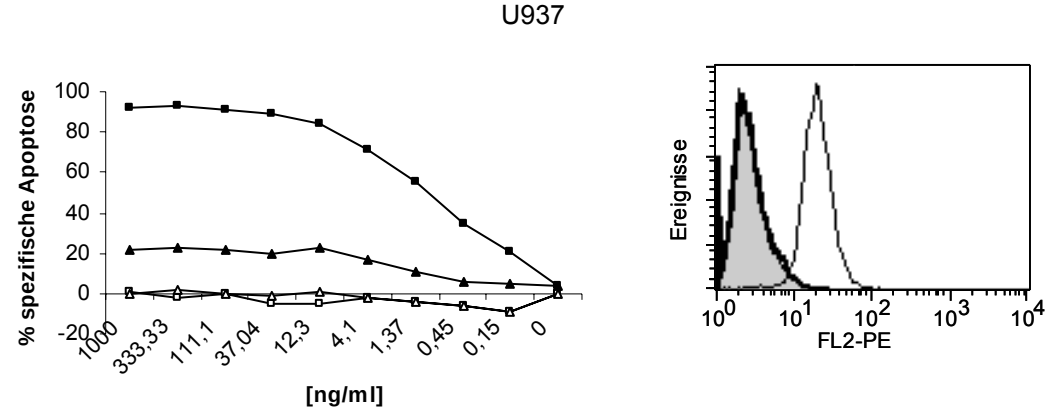
A


BJAB
% spezifische Apoptose
100
80
60
40
20
0
-20
1000
333,33
111,1
37,03
12,3
4,1
1,37
0,45
0,15
0
[ng/mL]
Ereignisse
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-PE

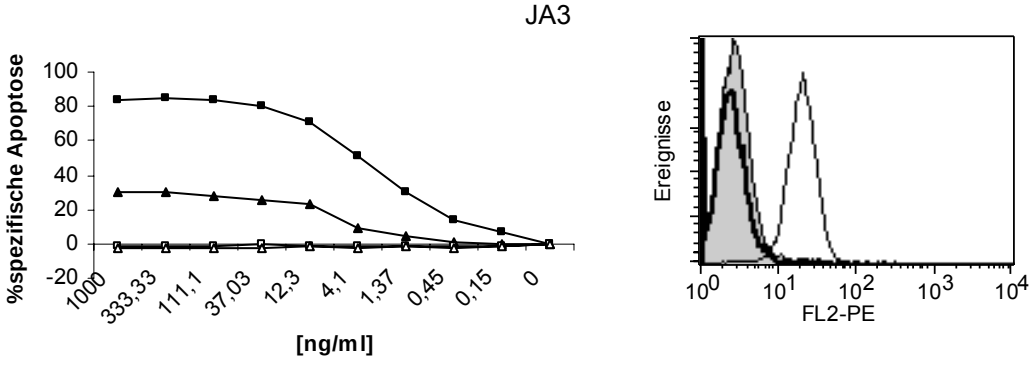
B


BL-60
% spezifische Apoptose
100
80
60
40
20
0
-20
1000
333,33
111,1
37,03
12,3
4,1
1,37
0,45
0,14
0
[ng/ml]
Ereignisse
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-PE

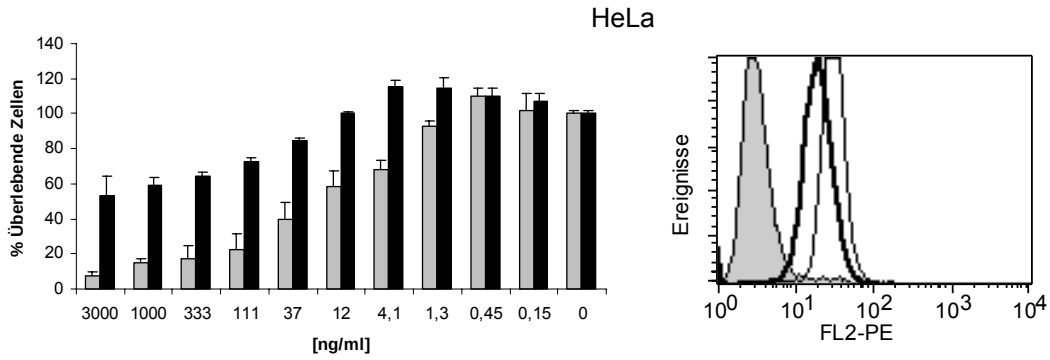
C


U937
% spezifische Apoptose
100
80
60
40
20
0
-20
1000
333,33
111,1
37,04
12,3
4,1
1,37
0,45
0,15
0
[ng/ml]
Ereignisse
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-PE

D


JA3
%spezifische Apoptose
100
80
60
40
20
0
-20
1000
333,33
111,1
37,03
12,3
4,1
1,37
0,45
0,15
0
[ng/ml]
Ereignisse
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-PE

E



F

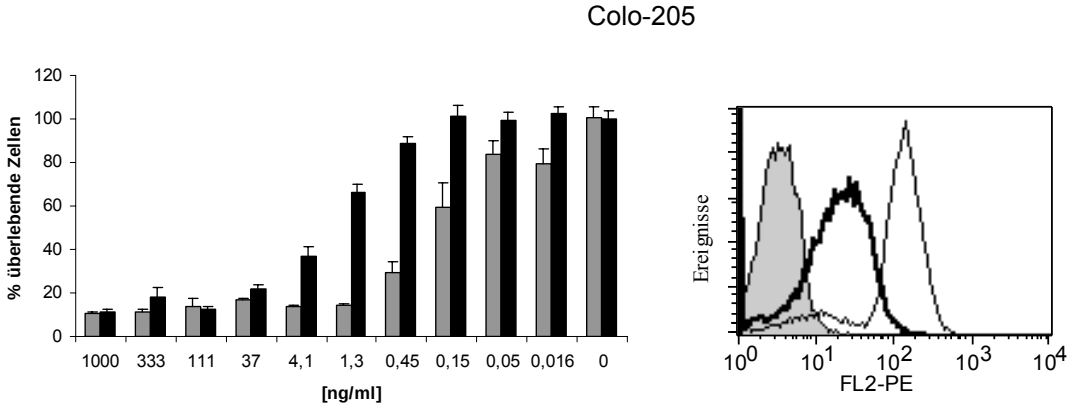


Abb. 23: Aktivität von IZ-TRAIL und shTRAIL *in vitro*
(A-D) Verschiedene humane Tumorzelllinien wurden mit IZ-TRAIL in Abwesenheit (■) oder Anwesenheit (□) von TRAIL-R2-Fc bzw. mit shTRAIL in Abwesenheit (▲) oder in Anwesenheit von TRAIL-R2-Fc (Δ) in den angegebenen Konzentrationen für 18h Stunden inkubiert und die Apoptose anhand der Zellmorphologie (FSC/SSC) bestimmt (linke Abb.). Die Präinkubation von IZ-TRAIL bzw. shTRAIL mit TRAIL-R2-Fc erfolgte für 30 min bei RT vor Behandlung der Zellen. (A) BJAB-Zellen (Burkitt-Lymphom), (B) BL60-Zellen (Burkitt-Lymphom), (C) U937–Zellen (monoblastisches Lymphom), (D) JA3-Zellen (T-Zell-Lymphom).
(E-F) Verschiedene humane Tumorzelllinien wurden in einer Dichte von 70-80% in 96-Lochplatten ausplattiert, mit den angegebenen Konzentrationen von IZ-TRAIL (graue Balken) oder shTRAIL (schwarze Balken) für 18 Stunden inkubiert und die Zytotoxizität mittels MTT-Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen (E) HeLa-Zellen (Cervixkarzinom), (F) Colo-205-Zellen (Kolonkarzinom)
Zudem wurde die Oberflächenexpression von TRAIL-R1 (dicke Linie) und TRAIL-R2 (dünne Linie) im FACS analysiert (rechte Abb.). Die grau gefüllt Fläche stellt die Negativkontrolle da.

2.3.2 Kooperative Zytotoxizität von IZ-TRAIL und Chemotherapeutika

Etwa 50% der Tumorzelllinien sind gegenüber TRAIL nicht sensitiv. Die Kombination von Chemotherapeutika und TRAIL kann die Resistenz von Tumorzelllinien aufheben. Um die zytotoxische Aktivität von IZ-TRAIL in Kombination mit Chemotherapeutika in vitro zu testen wurde der Effekt der Kombinationstherapie auf mehreren Tumorzelllinien analysiert. Die Vorbehandlung von primär TRAIL-resistenten Tumorzelllinien mit verschiedenen klinisch relevanten Chemotherapeutika zeigte, dass eine Sensitivierung für TRAIL induzierte Apoptose erreicht wird. Schon bei relativ geringen, subtoxischen Konzentrationen an Chemotherapeutika konnte eine Sensitivierung für TRAIL erzielt werden. Die Abb. 24 zeigt einen Überblick von resistenten Tumorzelllinien, die durch Vorbehandlung mit einem Chemotherapeutikum für 6 h und anschließender Zugabe von IZ-TRAIL für weitere 24 h für TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert werden. Die p53-positive Leberkarzinomzelllinie HuH7, wurde durch die sequenzielle Behandlung mit Mitomycin bzw. Irinotecan und IZ-TRAIL sehr stark sensitiviert. Das Überleben dieser Tumorzellen erniedrigte sich von 60% bei Mitomycin alleine auf 30% bzw. von 70% bei Irinotecan alleine auf 40% bei einer IZ-TRAIL-Konzentration von 1 µg/ml IZ-TRAIL. Auch bei der für p53-negativen Leberkarzinomzelllinie Hep3B konnte die Überlebensrate von ca 75% mit 5-FU alleine bei einer Konzentration von 100 µg/ml durch Zusatzbehandlung mit 1µg/ml IZ-TRAIL auf 50% reduziert werden.

Desweiteren konnten die Tumorzelllinien SHEP (Neuroblastom), DanG (Pankreaskarzinom) und A549 (Lungenkarzinom) durch Vorbehandlung mit Chemotherapeutika für TRAIL-induzierte Apoptose sentiviert werden (Abb. 24C-E). Bei relativ geringen gleichbleibenden Konzentrationen an Chemotherapeutika ist die Effizienz von IZ-TRAIL Apoptose zu induzieren von der Dosis abhängig.

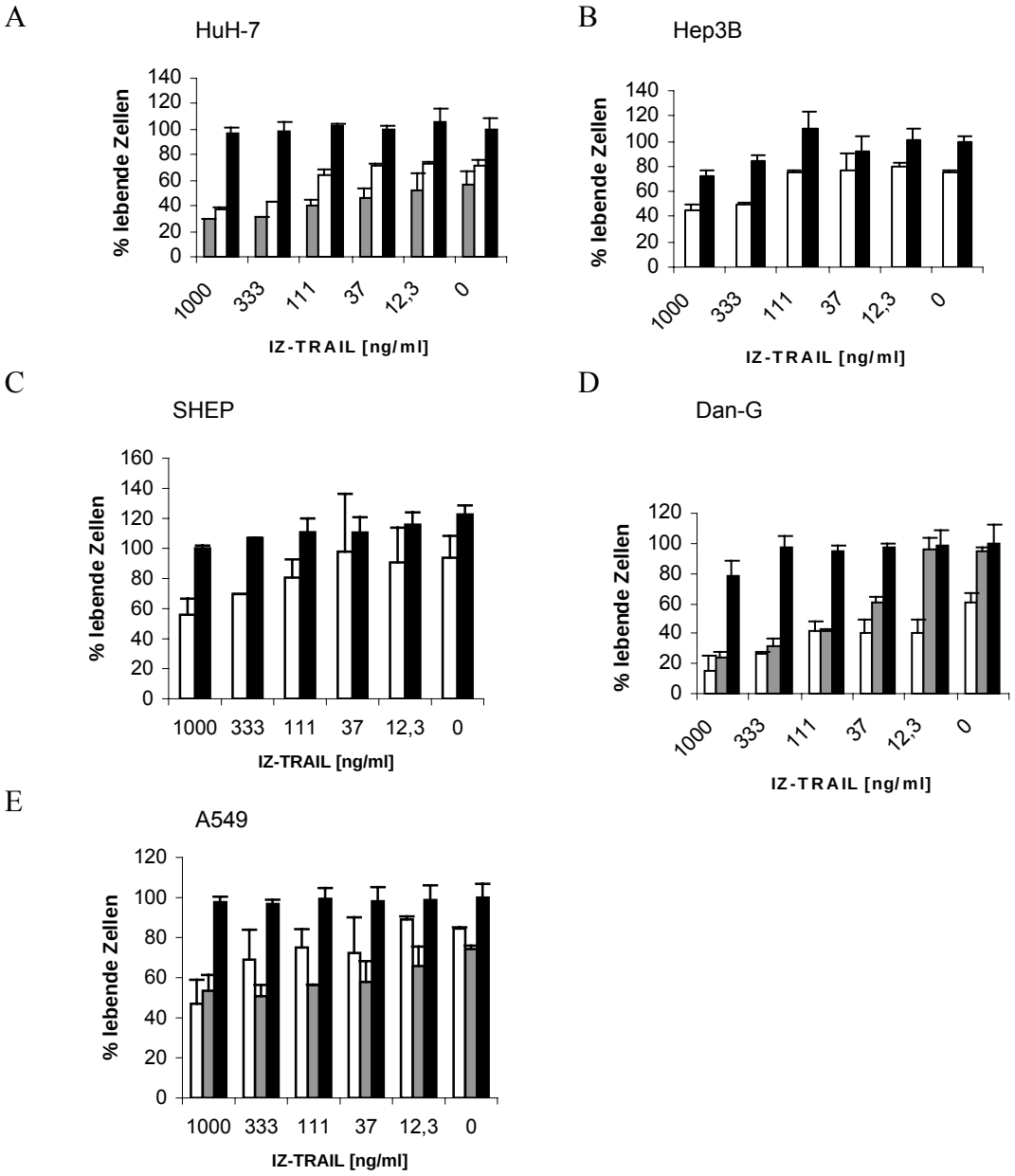


Abb. 24: Aktivität von IZ-TRAIL auf TRAIL-resistenten Zellen nach Sensitivierung mit Chemotherapeutika

(A) HuH7-Zellen wurden für 6 h ohne (schwarze Balken) bzw. mit 1 µg/ml Mitomycin (weiße Balken),1 µg/ml Irinotecan (graue Balken) präinkubiert und mit verschiedenen Konzentrationen von IZ-TRAIL für 16 h behandelt. Das Überleben der Zellen wurde mittels MTT-Assay wie in 2.5.4 beschrieben bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Messungen.

(B) Hep3B-Zellen wurden für 6 h ohne (schwarze Balken) bzw. mit 100 µg/ml 5-FU (weiße Balken) inkubiert und mit verschiedenen Konzentrationen von IZ-TRAIlL für 16 h behandelt.

(C) SHEP-Zellen wurden für 6 h ohne (schwarze Balken) bzw. mit Etopsid 2 µg/ml (weiße Balken) inkubiert und mit verschiedenen Konzentrationen von IZ-TRAIL für 16h behandelt.

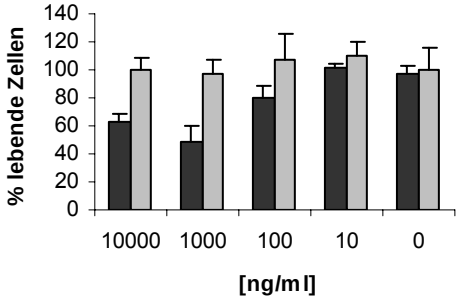
(D) DanG-Zellen wurden ohne (schwarze Balken) bzw. mit Gemzar 2 µg/ml (weiße Balken), Bleomycin 2 µg/ml (graue Balken) für 6 h inkubiert und mit verschiedenen Konzentrationen von IZ-TRAIL für 16 h behandelt.

(E) A549-Zellen wurden 6 h ohne (schwarze Balken) bzw. mit 1µg/ml Mitomycin (weiße Balken) und 2 µg/ml Irinotecan (graue Balken) präinkubiert und mit verschiedenen Konzentrationen von IZ-TRAIL für 16 h behandelt.

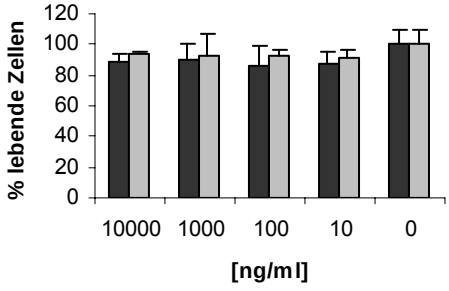
2.3.3 Wirkung von IZ-TRAIL auf primären Hepatozyten

Für einige TRAIL-Versionen wie das mit Histidin-getaggte-TRAIL und eine durch Antikörper kreuzvernetzte mit Flag kombinierte Version wurde gezeigt, dass diese zytotoxisch auf primäre Hepatozyten wirken können. Um das therapeutische Potential des rekombinanten löslichen IZ-TRAIL Protein zu evaluieren, wurde die Präparation auf frisch isolierten primären Hepatozyten getestet. Für diesen Zweck wurde ein *in-vitro* System zur Kultivierung frisch isolierter humaner Hepatozyten wie in 1.3.3 beschrieben, angewendet. Abb. 25A und B zeigen, dass primäre humane Hepatozyten am Tag nach der Isolierung (Tag 2), nicht aber nach 4 Tagen in Kultur sensitiv für IZ-TRAIL induzierte Apoptose sind. Der agonistische anti-APO-1 Antikörper vom Subtyp IgG3 zerstörte hingegen am Tag 5 90% der menschlichen Hepatozyten (Abb. 25C). Die Kombination von IZ-TRAIL mit verschiedenen Chemotherapeutika wie Mitomycin (DNA-Alkylierung) [10µg/ml], Etoposid (Topoisomerase-Inhibitor II) [30µg/ml] oder Irinotecan (Topoisomerase-Inhibitor I) [100µg/ml] zeigt nur bei höheren Konzentrationen dieser Substanzen eine minimale Apoptose-auslösende Aktivität (Abb. 25D).

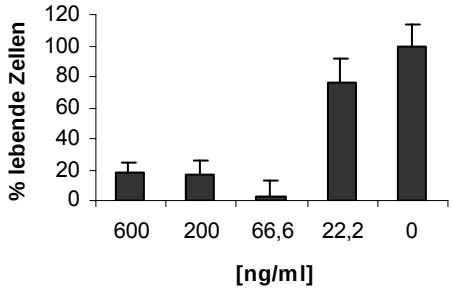
A



B



C



D

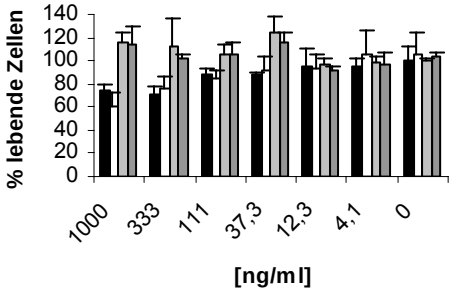


Abb. 25: IZ-TRAIL ist auf primären menschlichen Hepatozyten nicht toxisch.
Primäre humane Hepatozyten wurden nach einem Tag in Zellkultur (A) oder nach 4 Tagen in Zellkultur (B) mit IZ-TRAIL (schwarz), shTRAIL (grau) und mit dem anti-CD95 Antikörper anti-APO-1 (C) in den angegebenen Konzentrationen für 12 h inkubiert. Das Überleben der Zellen wurde mittels MTT-Assay wie in 2.5.4 beschrieben, bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Messungen.
(D) Primäre humane Hepatozyten (Tag 5) wurden mit IZ-TRAIL (schwarz) und mit 10 µg/ml Mitomycin (weiss), 30 µg/ml Etoposid (hellgrau), 100 µg/ml Irinotecan (dunkelgrau) für 16 h inkubiert und die Toxizität mittels MTT-Assay bestimmt.

2.4 Charakterisierung *in vivo*

2.4.1 Pharmakokinetik von IZ-TRAIL

Die weitere Charakterisierung von IZ-TRAIL erfolgte *in vivo* durch Bestimmung des pharmakokinetischen Profils unter physiologischen Bedingungen. Um die Serumkonzentration von IZ-TRAIL bestimmen zu können musste zunächst ein Antikörper, der das native Protein erkennt, generiert und ein zum Nachweis von IZ-TRAIL geeigneter ELISA etabliert werden. Die Herstellung des Antikörpers und die Durchführung des ELISAs erfolgte wie in 2.3.3.1 beschrieben. Die Abb. 26 zeigt die Serumkonzentration von IZ-TRAIL in Abhängigkeit der Zeit nach intravenöser Administration von 10 µg/200 µl IZ-TRAIL über die Mausschwanzvene. Es wurde der Mittelwert von 6 Mausinjektionen bestimmt. Die maximale Plasmakonzentration wurde nach 5 Minuten mit 812 ng/ml +/- 182ng/ml für IZ-TRAIL erreicht. Nach 8 Stunden

konnte IZ-TRAIL noch in einer Konzentration von 18 ng/ml detektiert werden, 24 Stunden nach Injektion war es im Serum nicht mehr nachweisbar. Die Halbwertszeit für IZ-TRAIL wurde mit $T_{1/2}$ 78,3 Minuten bestimmt. Ein paralleler Zytotoxizitätstest *ex vivo* zeigt zudem, dass das rekombinante IZ-TRAIL-Protein nach wie vor biologisch hochaktiv ist (Abb. 26A u B).

A B

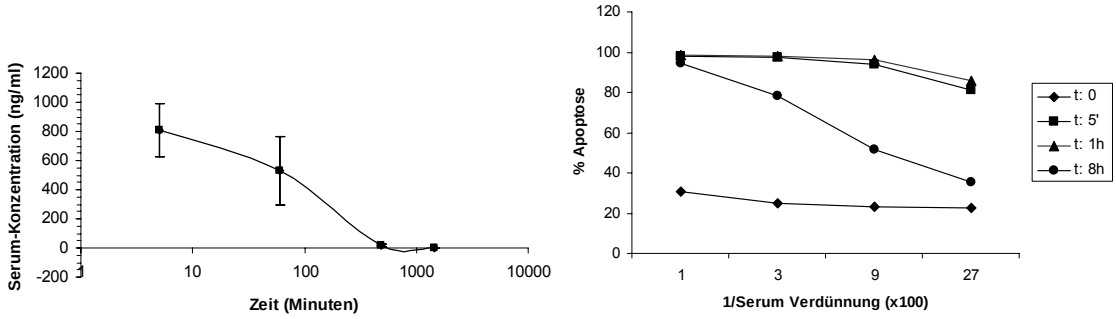


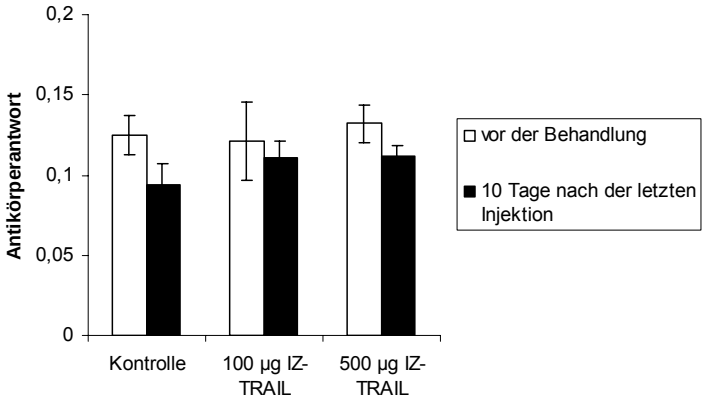
Abb. 26: Pharmakokinetisches Profil und Bioaktivität von IZ-TRAIL
(A) Serumkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit nach intravenöser Injektion von 10 µg IZ-TRAIL. 5 Minuten, 1, 4, 8 und 24 Stunden nach Injektion wurde Blut über die Schwanzvene entnommen und die im Serum vorhandene IZ-TRAIL Konzentration im ELISA bestimmt.
(B) Das zu den oben genannten Zeitpunkten gewonnene Serum wurde auf JA3-Zellen im Zytotoxizitätstest auf IZ-TRAIL Aktivität getestet. Die Apoptose wurde anhand der der Morphologie und PI-Aufnahme (FSC/SSC-PI) bestimmt.

2.4.2 Toxizität und Immunogenität

Um die Toxizität und Immunogenität von IZ-TRAIL zu analysieren wurden höhere Mengen IZ-TRAIL (500 µg/Tag, 100 µg/Tag) oder Kontrollpuffer täglich für 14 Tage intraperitoneal in 4 Wochen alte Balb/c Mäuse (n:6) appliziert. Am Tag 0, 14 und 24 wurden Blutproben und nach zervikaler Dislokation der Mäuse die Organe Herz, Leber und Milz entnommen. Die Serumproben von Balb/c Mäusen, bei denen IZ-TRAIL oder Kontrollpuffer appliziert wurde, wurden im ELISA auf neutralisierende Antikörper gegen IZ-TRAIL analysiert. Die Mäuse denen IZ-TRAIL injeziert worden war zeigten im Vergleich zu Mäuse, denen Kontrollpuffer injeziert worden war keine erhöhte Antikörper Antwort (Abb. 27A). Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den behandelten Gruppen im Verhalten, der Nahrungsaufnahme und der Serumbiochemie

beobachtet. Die Histologie der Leber, wie Abb. 27B zeigt war normal und wies kein nekrotisches Gewebe auf, wie es nach Administration von 10 µg IZ-CD95-Ligand zu sehen war. Auch die TUNEL (TdT- mediated dUTP nick end labeling) – Färbung der Leberschnitte zeigte, dass kein massiver Tod von Leberzellen selbst nach Administration höherer Dosen IZ-TRAIL über einen längeren Zeitraum nachweisbar war (Daten nicht gezeigt).

A



B

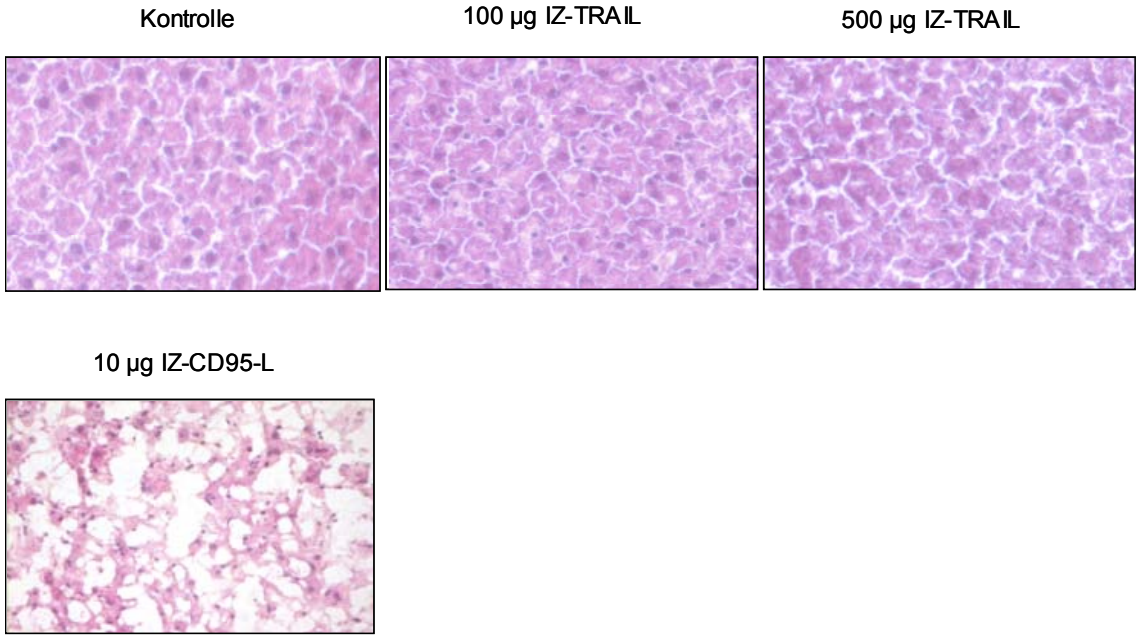


Abb. 27: Toxizität und Immunogenität von IZ-TRAIL
(A) Pro Gruppe wurden 6 Balb/c-Mäuse täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen entweder mit Puffer (Kontrolle) oder mit 100 µg oder 500 µg IZ-TRAIL intraperitoneal injeziert.. Am Tag 0 und 10 Tage nach der letzten Injektion wurde das Serum der Mäuse gewonnen und auf gegen IZ-TRAIL-gerichtete Antikörper untersucht. (B) Hematoxylin und Eosin gefärbte Leberschnitte von den mit den angegebenen Konzentrationen von IZ-TRAIL, IZ-CD95-L oder Kontrollpuffer behandelten Balb/c -Mäusen. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Schnitt je einer behandelten Gruppe. Die Balb/c-Maus, der 10 µg IZ-CD95Ligand i.p injeziert wurde verstarb eines plötzlichen Todes nach 40 Minuten.

IV Diskussion

Die momentane Krebsbekämpfung stützt sich derzeit vor allem auf drei dominante Säulen, die chirurgische Resektion, die Behandlung mittels Bestrahlung (Radiotherapie) und die Chemotherapie. Leider sind diese Ansätze in vielen Fällen nicht heilend und auch durch unerwünschte häufig sehr ausgeprägte Nebenwirkungen und die selektive Proliferation von durch die Behandlung resistent gewordenen Tumorzellen limitiert. Obwohl die Therapie verschiedener Tumorarten durch frühzeitige Diagnose, eine verbesserte Chemotherapie und neue Therapieansätze, wie z.B. therapeutische Antikörper, im letzten Jahrzehnt Fortschritte gemacht hat, ist eine allgemeine anwendbare Therapieform auch in der Zukunft nicht zu erwarten.

Alles deutet darauf hin, dass biologische, zielgerichtete Tumortherapien die zukünftigen Therapieansätze gegen den Krebs sein werden, da sie aufgrund ihrer Tumorspezifität die Nebenwirkungen minimieren und die durch konventionelle Behandlung herbeigeführte Resistenz von Tumoren umgehen und überwinden zu können scheinen.

Die multifunktionellen Zytokine der TNF-Liganden-Familie weisen ein großes Potential als anti-tumorale therapeutische Agentien auf, indem sie auf die Tumorzellen oder auf das den Tumor umgebende Gewebe, insbesondere auch auf die Gefäßversorgung zielen. Jedoch ist der Einsatz von CD95-Ligand bzw. TNF-α in der Klinik aufgrund der fehlenden Tumorselektivität und der daraus resultierenden Toxizität limitiert. TRAIL hingegen ist ein vielversprechendes Protein für die Krebstherapie, weil es selektiv in transformierten, nicht aber in gesunden Zellen Apoptose induziert. Die Apoptoseinduktion durch Aktivierung der TRAIL-Todesrezeptoren ist im Gegensatz zu den konventionellen therapeutischen Agentien unabhängig vom Tumorsupressorprotein p53, welches in über der Hälfte der humanen Tumoren inaktiviert ist. Zudem ist eine Kombination von TRAIL mit konventionellen Therapien möglich.

1 Produktion von rekombinanten Antikörperfragmenten für die Aktivierung von Todesrezeptoren

1.1 Konstruktion der Antikörperfragmente

Zu Beginn der Arbeit standen noch keine rekombinanten Antikörper mit agonistischer Aktivität zur Verfügung, die selektiv an die Todesrezeptoren TRAIL-R2 bzw. CD95 binden. Die spezifische Bindung der rekombinanten Antikörpermoleküle sollte ein ausreichender Stimulus für die Apoptoseinduktion sein. Der rekombinante Antikörper wurde als Einzelkettenantikörper hergestellt, da dieser die kleinste Antikörper-Einheit mit antigenbindender Eigenschaft ist und zudem durch genetische Veränderung wie durch die Fusionierung mit einer Multimerisierungsdomäne (antibody engineering) veränderte biochemische Eigenschaften aufweisen kann. Trimerisierte Liganden der TNF-Familie binden die entsprechenden Rezeptoren. Aus diesem Grund wurde der Einzelkettenantikörper an die Trimerisierungs- bzw. Oligomerisierungsdomäne eines modifizierten Leuzin-Zippers fusioniert (Walczak, et al., 1999). Der multivalente Antikörper sollte ein ausreichender Stimulus für die Rezeptoraktivierung darstellen (Abb. 5B). Bisher sind zahlreiche selbstassoziierende Strukturen, wie Helices (Regan and DeGrado, 1988) oder *coiled-coils* (Leuzin-Zipper) (O'Shea et al., 1991; O'Shea et al., 1989) die zu bivalenten bzw. tetravalenten scFv-Antikörper-Fragmenten führen, untersucht worden. Eine ausführliche Übersicht gibt der Artikel von A.Plückthun und P.Pack (Pluckthun and Pack, 1997). Zur Herstellung von stabilen, multivalenten rekombinanten single-chain Antikörper-Fragmenten war es zunächst notwendig einen geeigneten Expressionsvektor zu generieren (Abb. 5A). Fv-Fragmente sind aufgrund der nicht-kovalent verknüpften Polypeptidketten sehr instabil. Dieses Problem wurde durch die Einführung eines flexiblen, proteaseresistenten Peptidlinker mit der Aminosäuresequenz $(Gly_4Ser)_3$ zwischen den beiden variablen Domänen umgangen (Huston, et al., 1988). Single-chain variable Fragmente, bei denen die Antigenbindungsdomänen mit einem flexiblen Polypeptidlinker verbunden sind, stellen ein minimales Antigenbindungsformat eines Antikörpers dar, der in *E.coli* exprimiert werden kann (Bird, et al., 1988; Huston, et al., 1988). Eine hier nicht verfolgte Strategie,

um multivalente Antikörper-Fragmente herzustellen, ist die Verkürzung des Linkerpeptids. Atwell et al. konnten am Beispiel eines anti-Neuraminidase scFv-Antikörpers zeigen, dass eine Verkürzung des Linkerpeptides auf 0 bis 2 Aminosäurereste bei einer V_H–V_L-Orientierung zu einer Trimerisierung, die Verkürzung auf 3-5 Aminosäurereste hingegen zu Dimeren führt (Atwell et al., 1999). Ob dies auch auf andere scFv-Antikörperfragmente zutrifft, bleibt offen, da die Komposition der Linkersequenz und die daran angrenzenden Aminosäuren sehr präzise von Atwell et al. nach Röntgenstrukturanalysen gewählt wurden (Malby et al., 1994).

Neben den neu eingeführten biochemischen Eigenschaften bietet dieses Antikörperformat im Gegensatz zu einem monoklonalen Antikörper die Vorteile einer besseren Einwanderung in das Tumorgewebe, einer kürzeren Verweildauer im Gewebe und einer schnelleren Auswaschung aus der Blutzirkulation (Adams et al., 1993; Colcher et al., 1990; Huston et al., 1993; Milenic et al., 1991; Yokota, et al., 1992). Ein systematischer Vergleich verschiedener rekombinanter Antikörperfragmente, die gegen das Karzinoembryonale Antigen (CEA) gerichtet waren, ergab folgende Ergebnisse: monomere scFv-Fragmente wurden zu schnell über die Niere aus dem Blut eluiert. Dadurch konnten keine signifikanten Antikörperkonzentrationen im Tumorgewebe erreicht werden. Von den dimeren scFv-Antikörperfragmenten wurden bereits 15% im Tumorgewebe wiedergefunden. Den besten Effekt gab jedoch ein Konstrukt von der dreifachen Größe eines Monomers: Es bestand aus zwei scFv-Fragmenten, die durch eine CH3-Domäne zusammengehalten wurden. Komplette IgG-Antikörper wurden vergleichsweise schlechter vom Tumorgewebe gebunden (Wu et al., 1996). Offensichtlich bewirken kleinere Antikörperfragmente (Fab' und scFv) eine gleichmäßigere Bindung an das Tumorgewebe als das komplette IgG (Buchsbaum, 1995).

1.2 Expression und *in vitro* Faltung der scFv-Antikörperfragmente

Bei der bakteriellen Expression rekombinanter Antikörperfragmente ist die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den ß-Faltblattstrukturen der einzelnen Antikörperdomänen unter reduzierenden Bedingungen nicht möglich (Biocca et al., 1995; Proba et al., 1995). Da Disulfidbrücken zur Stabilität von Antikörperfragmenten

beitragen (Frisch et al., 1994; Frisch et al., 1996; Glockshuber et al., 1992), geht mit dem Verlust von Disulfidbrücken eine inkorrekte Faltung und Instabilität der Antikörperfragmente einher, was zur Bildung unlöslicher Aggregate in Form von sog. „Einschlusskörpern“ führt. Bei der Expression der rekombinanten scFv-Fragmente in *E.coli* wurden zwar hohe Expressionsausbeuten der Proteine erzielt, die gebildeten scFv-anti-TRAIL-R2 und scFv-anti-APO-1 wurden aber ausschliesslich als Einschlusskörper im Cytoplasma von *E.coli* abgelagert (Abb. 8B). Um daraus funktionierende Antikörper gewinnen zu können, musste erst eine aufwendige Renaturierung der denaturierten Antikörperfragmente durchgeführt werden. Es gelang nicht, die Antikörperfragmente scFv-anti-TRAIL-R2 und scFv-anti-APO-1 als lösliche Proteine in einem eukaryontischen System zu produzieren (Abb. 6). Dies ist aufgrund der komplexen Struktur nicht ungewöhnlich. Allerdings wurde ein scFv-Antikörper gegen den TNF-Rezeptor in Säugerzellkulturen nicht sezerniert, konnte aber in Insektenzellen als lösliches Protein exprimiert werden (Brocks et al., 1997). Der Versuch die scFv-anti-TRAIL-R2 und scFv-anti-APO-1-Fragmente mit einem speziellen Sekretionsvektor in *E.coli* periplasmatisch zu produzieren, scheiterte augrund der fehlenden Sekretion ins Periplasma. Die periplasmatische Expression bietet den Vorteil, dass im Unterschied zum Zytoplasma ein oxidierendes Milieu vorliegt, welches die korrekte Ausbildung der V-Domäne und Disulfidbrücken in den Antikörperketten ermöglicht (Verma et al., 1998) (Power and Hudson, 2000). Häufig sinkt die Ausbeute an heterologen Proteinen mit zunehmender Zahl der Untereinheiten oder Domänen (Skerra and Pluckthun, 1991), insbesondere dann, wenn die Ausbildung von Disulfidbrücken für die native Struktur und Funktionalität des Proteins erforderlich ist. Die Sekretion rekombinanter Proteine ist häufig bei Mehr-Domänen-Proteinen ineffizient (Skerra and Pluckthun, 1991). Auch die Expression als lösliche funktionale Antikörperfragmente im Zytoplasma von *E.coli*, wie sie in einigen Fällen beschrieben ist (Proba, et al., 1995), konnte durch Optimierung der Expressionsbedingungen wie Induktionstemperatur oder Indukionsdauer nicht erreicht werden (Abb. 8). Der Vorteil der Renaturierung bakterieller Einschlusskörper besteht in einem sehr einfachen und effizienten Reinigungsschritt, bei dem das bakterielle Lipopolysaccharid Endotoxin entfernt wird. Dies ist speziell wichtig für Proteine, die in der Therapie Anwendung finden. Die scFv-anti-TRAIL-R2 und anti-APO-1 Antikörperderivate konnten als funktionelle Proteine aus zytoplasmatischen Einschlusskörpern aufgereinigt und

renaturiert werden (Abb. 11). Wie am Beispiel des rekombinanten scFv-anti-TRAIL-R2 zu sehen ist (Abb. 10), konnten nach Zelllyse die Einschlusskörper von der Gesamtheit der löslichen Proteine in einem einzigen Schritt isoliert werden. Auf einen weiteren Reingungsschritt wurde verzichtet, da die Antikörper erst auf Funktionalität überprüft werden sollten. Trotz Zugabe von Proteaseinhibitoren ließ es sich nicht vermeiden, dass N-terminal verkürzte scFv-Fragmente isoliert wurden (Abb. 8B). Die Rückfaltung erfolgte nach Solubilisieren der Einschlusskörper in 6 M Guanidinium-Chlorid durch langsames Zugeben des denaturierten Antikörperfragmentes zur Renaturierungslösung. Bei der *in vitro* Rückfaltung zeigte sich, dass eine Endkonzentration von 10-100 µg/ml rekombinanten Antikörpers nicht überschritten werden sollte. Zu hohe Konzentrationen während des Faltungsprozesses führten zu einer massiven Aggregation von wahrscheinlich noch nicht vollständig renaturierten Proteinen. Als hilfreich bei der Renaturierung hat sich die Verwendung schwach destabilisierender Agentien wie 0,5 M Arginin-HCl oder auch 1 M NDSB während des Rückfaltungsprozesses erwiesen. Auf die Zugabe von Chaperonen wie GroEL oder der Protein-Disulfid-Isomerase, die zur einer verbesserten Faltungseffizienz führen sollen (Duenas et al., 1994), wurde verzichtet. Momentan werden diese Methoden noch kontrovers diskutiert (Humphreys et al., 1996; Lah et al., 1994). In einem letzten Schritt wurden die Einzelkettenantikörper gegen einen geeigneten Aufbewahrungspuffer dialysiert. Es zeigte sich, dass die hergestellten scFv-Antikörperfragmente in verschiedenen Lagerungspuffern in ihrer funktionellen Form sehr stabil waren und über mehrere Monate ohne Schutzprotein bei –20°C aufbewahrt werden konnten.

1.3 Charakterisierung der scFv-Antikörperfragmente

Die Funktionalität und Spezifität der hergestellten Antikörperfragmente scFv-anti-TRAIL-R2 und scFv-anti-APO-1 wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie nachgewiesen. Ein Vergleich des Bindungsverhaltens der parentalen monoklonalen Antikörpern mit den davon abgeleiteten scFv-Antikörperfragmenten ist aus zweierlei Gründen nicht möglich. Erstens wurden für den Bindungsnachweis unterschiedliche Antikörper und zweitens unterschiedliche Detektionsschritte beim Nachweis der Bindung angewendet. Durch Generierung der Einzelkettenantikörperfragmente anti-

TRAIL-R2 und anti-APO-1 wurde die Funktionalität und die Spezifität nicht beeinflusst (Abb. 11 und 13). Die Effizienz von anti-APO-1 Apoptose durch Bindung an das Oberflächenmolekül CD95 (APO-1/Fas) zu induzieren ist in zahlreichen Veröffentlichungen gezeigt worden. Die agonistische Aktivität des Antikörpers ist dabei durch den Isotyp bestimmt, der die Fähigkeit besitzt, zu aggregieren (Dhein, et al., 1992). Ein muriner IgG3 Antikörper besitzt die Eigenschaft über Fc-Fc-Interaktionen zu oligomerisieren (Abdelmoula et al., 1989; Greenspan et al., 1988; Greenspan et al., 1987).

Die Analyse der scFv-anti-APO-1-Antikörperfragmente mit und ohne Multimersierungsdomäne im Zytotoxizitätstest zeigte, dass nur der Antikörper mit dem Leuzin-Zipper agonistische Aktivität aufwies (Abb. 14-16). Die zytotoxische Aktivität war bei höheren Konzentrationen, der des parentalen IgG3 Antikörper ähnlich. Bei niedrigen Konzentrationen war der scFv-anti-APO-1 weniger effizient als der mAk anti-APO-1 (IgG3). Der scFv-anti-APO-1 ohne Leuzin-Zipper war nicht aktiv. Die verminderte Aktivität des scFv-anti-APO-1 Antikörpers im Vergleich zum parentalen Antikörper beruht wahrscheinlich auf der nicht ausreichenden Oligomerisierung der CD95-Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche. Bei hohen Konzentrationen liegen die scFv-Antikörperfragmente wahrscheinlich als höher organisierte Komplexe wie z.B als Hexamere oder Multimere vor. Der parentale Antikörper scheint maximal aggregiert zu sein, da sich die Apoptose-induzierende Aktivität durch die Kreuzvernetzung mit Protein A nicht weiter steigern lässt (Abb. 16A).

Die nur partielle Wiederherstellung der Aktivität des scFv-anti-APO-1 zeigt, dass der zur Kreuzvernetzung verwendete anti-$(His)_5$-Antikörper die scFv-anti-APO-1-Fragmente nicht effizient kreuzvernetzen oder die eingesetzte Konzentration des anti-$(His)_6$-Antikörpers zu gering war (Abb. 16B). Die Notwendigkeit von höher organisierten Liganden für die Aktivierung der Todesrezeptoren, wird durch mehrere Daten unterstützt. Es ist publiziert worden, dass der membranständige CD95-Ligand, nicht hingegen der lösliche CD95-Ligand, den CD95-Rezeptor aktivieren kann. Der lösliche Ligand fungiert eher als kompetitiver Inhibitor des membranständigen Liganden (Schneider, et al., 1998; Suda, et al., 1997). CD95-spezifische Antikörper vom IgM- und IgG3-Isotyp, mit Protein A vernetzter IgG2b-Antikörper und die Kombination von löslichem CD95-Ligand und einem nicht agonistischen CD95-spezifischen Antikörper können CD95-vermittelte Apoptose induzieren (Huang et al., 1999;

Kischkel, et al., 1995; Xiao et al., 2002b). Zudem wurde gezeigt, dass CD95-Ligand durch Fusionierung mit einer Fc-Domäne eines Antikörpers die Bildung von hexameren Strukturen fördert, und die CD95-vermittelte Apoptose induziert (Holler, et al., 2003).

Die Idee agonistische anti-CD95-Antikörper in der Tumortherapie einzusetzen wurde aufgrund der beobachteten akuten Lebertoxizität und dem schnellen Tod der Mäuse nach Injektion agonistischer anti-CD95-Antikörper schnell verworfen (Timmer et al., 2002). Mittlerweile sind aufgrund der rekombinanten Antikörpertechnologie neue Konzepte entwickelt worden, die das Problem der unerwünschten Nebenwirkungen vermeiden. Obwohl der lösliche trimerisierte CD95-Ligand *per se* wenig Aktivität ausübt, wird er nach Bindung an eine extrazelluläre Matrix aktiv (Aoki et al., 2001). Die Hypothese, dass CD95-Ligand durch die Immobilisierung aktiv wird, wurde durch ein trimeres Fusionsprotein, das aus CD95-Ligand und einem N-terminalen Einzelketten-Antikörper [spezifisch für den Tumormarker FAP (fibroblast activation marker)] besteht, bestätigt (Samel et al., 2003; Scanlan et al., 1994). Ähnlich wie löslicher CD95-Ligand ist das anti-FAP-CD95-L Fusionsprotein auf FAP-negativen, CD95-positiven Zellen nicht aktiv. Auf FAP-exprimierenden Zellen induziert das Fusionsprotein mit gleicher Effizienz wie vernetzter CD95-Ligand Apoptose. Das anti-FAP-CD95-L Fusionsprotein zeigt zudem keine Lebertoxizität bzw. systemische Toxizität und verhindert *in vivo* das Wachstum von FAP-exprimierenden Tumor-Xenotransplantaten in Mäusen.

Das scFv-anti-TRAIL-R2-Antikörperfragment zeigte trotz Bindung an den TRAIL-R2 auf verschiedenen Tumrozelllinien nur minimale agonistische Aktivität (Abb. 11 und 12). Auch die zusätzliche Inkubation mit einem vernetzendem anti-$(His)_5$ oder anti-Leuzin-Zipper Antikörper zeigte keinen Einfluss auf die Aktivität. Die fehlende Aktivierung des scFv-anti-TRAIL-R2 Antikörpers könnte auf eine geringe lokale Dichte der TRAIL-R2-Rezeptoren auf der Zelloberfläche zurückzuführen sein. CD95 ist auf den meisten Tumorzellen höher exprimiert als TRAIL-R2. Eine mögliche Erklärung für die minimale Aktivität könnte auch in der nicht ausreichenden Flexibilität des multivalenten Antikörpermoleküls und der daraus resultierenden Unfähigkeit die TRAIL-R2 Todesrezeptoren effizient zu binden und kreuzzuvernetzen, liegen. Die positive Bindung der scFv-anti-TRAIL-R2 auf verschiedenen Tumorzellen wie in der FACS-Analyse zu sehen ist (Abb. 11), kann nicht ausschliessen, dass der Antikörper nicht mono- oder bivalent an die Todesrezeptoren bindet. Die geringe Aktivität des

kreuzvernetzten scFv-anti-TRAIL-R2 legt den Schluß nahe, dass die intrinsische Aktivität eines Antikörper eine entscheidende Rolle spielt. Die Bindung des scFv-Antikörpers an verschiedene Epitope der extrazellulären Domäne des TRAIL-R2 ist nicht ausreichend, die für die Aktivierung des Rezeptors nötige Konformationsänderung einzuleiten.

Mittlerweile sind agonistische TRAIL-R1-und TRAIL-R2-spezifische Antikörper entwickelt worden, die sich sich in Phase II der klinischen Prüfung befinden. Es ist daher davon auszugehen, dass andere Antikörper, die gegen TRAIL-R2 oder auch gegen TRAIL-R1 gerichtet sind, besser für die hier beschriebene Technologie geeignet sein könnten, als der anti-APO-1 und der anti-TRAIL-R2-HS201-Antikörper.

2 IZ-TRAIL

2.1 IZ-TRAIL-Aktivität

Das lösliche rekombinante TRAIL hat das größte Potential von allen Todesrezeptor-Liganden der TNF-Familie in Zukunft als systemische oder lokale Applikation in der Krebstherapie Anwendung zu finden. Obwohl TRAIL-R1 und TRAIL-R2 auf den meisten nicht-transformierten Zellen exprimiert ist, wird die intravenöse Applikation von optimiertem löslichem trimerisierten TRAIL in Mäusen und in nicht-humanen-Primaten gut toleriert (Ashkenazi, et al., 1999; Walczak, et al., 1999). Zudem zeigt trimerisiertes TRAIL keinen zytotoxischen Effekt auf humanen primären Hepatozyten und Endothelzellen. Jedoch sind zahlreiche humane Tumorzelllinien und primäre Tumorgewebe für TRAIL-induzierte-Apoptose sensitiv oder werden nach Behandlung mit Chemotherapeutika TRAIL sensitiv.

Normale Körperzellen sind anscheinend durch bisher nur ansatzweise aufgeklärte Mechanismen vor TRAIL-induzierter-Apoptose geschützt. Es wurde keine zytotoxische Wirkung von nicht-getaggtem TRAIL auf primären Zellen wie Lungenfibroblasten, Brustepithelzellen, Kolonmuskelzellen (Ashkenazi, et al., 1999), Osteoblasten (Atkins

et al., 2002) und Hepatozyten (Nagata, 1997) beobachtet. Die Selektivität von TRAIL auf Tumoren ist jedoch aufgehoben, wenn bestimmte aggregierte Formen von TRAIL, wie das in *E.coli* produzierte mit einer $(His)_6$-Peptidsequenz getaggte-TRAIL oder adenoviral-transduziertes, membrangebundenes TRAIL angewendet werden. Unterschiedliche Bioaktivitäten verschiedener TRAIL-Präparationen wurde auf primären Kulturen von humanen Prostatazellen und Keratinozyten, die resistent gegenüber löslichem TRAIL, jedoch sensitiv für aggregiertes TRAIL waren, gezeigt (Kayagaki et al., 1999; Lawrence, et al., 2001; Voelkel-Johnson et al., 2002).

Auf zahlreichen Tumorzelllinien wurde gezeigt, dass kreuzvernetztes lösliches TRAIL effizienter Apoptose induziert als nicht vernetztes TRAIL (Chen et al., 2001; Gong and Almasan, 2000; Muhlenbeck, et al., 2000).

Mit IZ-TRAIL wurde eine lösliche rekombinante Version von TRAIL entwickelt, die *in vitro* eine höhere Wirksamkeit als shTRAIL besitzt. Durch sequentielle Affinitätschromatographie konnte rekombinant in *E.coli* exprimiertes IZ-TRAIL in großen Mengen und hoher Reinheit gereinigt werden (Abb. 19). IZ-TRAIL induzierte in verschiedenen Tumorlinien wie B- und T-Zelllymphomen, Hepatomen, Zervix- und Kolonkarzinom sehr effizient Apoptose (Abb. 23). Für die Aktivierung der beiden TRAIL-Todesrezeptoren werden unterschiedliche Rezeptorstimuli benötigt. Während lösliches trimerisiertes TRAIL die TRAIL-R1 Signalkaskade noch effizient induziert, ist die TRAIL-R2 induzierte Apoptose gering (Muhlenbeck, et al., 2000). Auf Tumorzelllinien wie Jurkat und U937, die ausschließlich TRAIL-R2 auf der Zelloberfläche exprimieren, zeigte IZ-TRAIL eine um Magnituden höhere zytotoxische Aktivität, die mit shTRAIL nicht erreicht wird (Abb. 23C und D). Diese Daten bestätigen, dass für die Aktivierung von TRAIL-R2 auf humanen Tumorzelllinien bzw. primären humanen Tumoren eine ausreichende Multimerisierung des Rezeptors benötigt wird, die mit den sogenannten „sicheren“ TRAIL-Präparationen nicht erreicht wird. Das von Genentech produzierte „optimierte“ TRAIL (Apo-2L) zeigte nur in Kombination mit Chemotherapie eine überzeugende anti-tumorale Wirkung. Die Wirksamkeit von TRAIL/Apo-2L als Einzeltherapeutikum wurde bisher nur in Xenograft-Modellen mit sehr TRAIL-sensitiven Tumorzelllinien wie z.B der Kolonkarzinomlinie Colo-205 nachgewiesen. Obwohl über TRAIL-R1 und TRAIL-R2 Apoptose induziert werden kann, scheint die Apoptoseinduktion in Tumorzellen hauptsächlich über TRAIL-R2 eingeleitet zu werden (Kelley et al., 2005). Zudem besitzt TRAIL bei 37°C eine

bevorzugte Bindungsaffinität für TRAIL-R2 gegenüber TRAIL-R1 (Truneh, et al., 2000).

Die anti-tumorale Wirkung von IZ-TRAIL als Einzeltherapeutikum wird demnächst *in vivo* untersucht werden. Die Kombination von rekombinantem IZ-TRAIL und verschiedenen Chemotherapeutika sensitivierte für TRAIL-induzierte Apoptose. Dieser sensitivierende Effekt wurde bereits bei geringen subtoxischen Konzentrationen des Chemotherapeutikums beobachtet (Abb. 24). Nur sehr wenige Studien zeigen die Effizienz von TRAIL in Kombination mit Chemotherapeutika *in vivo* [Übersicht bei (Wajant, et al., 2005)]. Überzeugende Daten lieferte eine Studie, in der frisch isoliertes Kolonkarzinomgewebe in SCID-Mäuse transplantiert wurde (Gliniak and Le, 1999). Nach TRAIL-Applikation wurde die Tumorprogression signifikant inhibiert. Eine verstärkte anti-tumorale Wirkung wurde in Kombination von 5-Fluoruracil (5-FU) bzw. Campthothecin (CPT-11) gezeigt, die zu einer kompletten Regression von einigen Tumoren führte (Naka et al., 2002). Es ist geplant die anti-tumorale Wirkung von IZ-TRAIL in Kombination mit einer Reihe von klinisch relevanten Chemotherapeutika *in vivo* zu untersuchen.

TRAIL induziert in vielen humanen Tumorzelllinien (Wiley, et al., 1995), nicht aber in normalen Zellen Apoptose. Es wurde publiziert, dass einige rekombinante Formen von TRAIL wie das mit Polyhistidin-getaggte-TRAIL (Jo, et al., 2000) und eine durch einen Antikörper kreuzvernetzte Flag-getaggte Form von TRAIL (Ichikawa, et al., 2001) zytotoxisch für primäre Hepatozyten sind. Es wird diskutiert, ob die beobachtete Lebertoxizität auf die geringe Löslichkeit und Aggregation dieser beiden rekombinanten Formen zurückzuführen ist. Es scheint, dass heterologe Oligomere oder kreuzvernetzte TRAIL-Formen die TRAIL-Todesrezptoren zu stark multimerisieren und dadurch auf primären humanen Hepatozyten Apoptose induziert wird (Ichikawa, et al., 2001). Die beobachtete Lebertoxizität scheint demnach von der TRAIL-Form abzuhängen. Experimente mit frisch isolierten humanen Hepatozyten nach 4 Tagen in der Zellkultur zeigen, dass IZ-TRAIL als Einzelwirkstoff, als auch in Kombinaton mit den Chemotherapeutika Mitomycin, Etoposid und Irinotecan nicht toxisch auf primäre Hepatozyten wirkt (Abb. 25B und D). Erstaunlicherweise wirkte IZ-TRAIL direkt nach der Präparation der primären Hepatozyten (Tag 1) auf diesen zytotoxisch (Abb. 25A). Im Gegensatz dazu induzierte anti-APO-1 auf frisch isolierten (Tag 1) sowie auf nach mehreren Tagen in Zellkultur kultivierten primären Hepatozyten in niedrigen

Konzentrationen sehr effizient Apoptose (Abb. 25C). Dies impliziert, dass intrazelluläre Mechanismen für die am Tag 5 beobachtete Resistenz primärer Hepatozyten verantwortlich sind. Es scheint daher wichtig zu sein, den Zellen nach Einzelzellisolation ausreichend Zeit zur Adaption und Zell-Zell-Kontakt-Ausbildung zu geben. Ob andere primäre Zellen gleichfalls gegen IZ-TRAIL geschützt sind, konnte in dieser Arbeit nicht untersucht werden. Desweiteren konnte keine Lebertoxizität in Mäusen nach täglicher intraperitonealer Injektion von höheren Dosen IZ-TRAIL über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet werden (Abb. 27B). Die Sicherheit des IZ-TRAIL im Gegensatz zu aggregierenden Präparationen zeigte sich in der hohen Stabilität selbst nach harschen Behandlungen. Es wurde keine Aggregation oder stark verminderte Aktivität beobachtet (Abb. 22).

2.2 IZ-TRAIL als Therapeutikum

Durch das Anfügen des Isoleuzin-Zippers-Peptides wurde nicht nur die Wirksamkeit *in vitro* gesteigert, sondern auch die pharmakologischen Eigenschaften von TRAIL verbessert. IZ-TRAIL hat im Gegensatz zu shTRAIL eine um das 8-fach erhöhte Halbwertszeit (Abb. 26). Das durch Zink stabilisierte Apo-2L-Protein zeigt ein relativ schlechtes pharmakologisches Profil (Kelley et al., 2001). Das Protein wird in der Maus innerhalb von 5 Minuten über die Niere ausgeschieden. Die Plasma-Halbwertszeit beschreibt nicht nur die renale Eliminierungsleistung, sondern auch die Verteilung des Proteins im Organismus. In weiterführenden Experimenten wird die Bioverteilung von IZ-TRAIL in der Maus pharmakologisch untersucht werden.

Bei Fusionsproteinen ist die Immunogenität ein weit verbreitetes Problem. Die Immunogenität verschiedener therapeutischer Proteine, die in der klinischen Entwicklung sind, ist im Moment noch nicht geklärt. Durch die Fusion von TRAIL mit einer synthetischen Stabilitätsdomäne könnte eine Immunantwort hervogerrufen werden. Fusionsproteine sind per Definition synthetische Moleküle, die so in der Natur nicht vorkommen. Um eine durch IZ-TRAIL induzierte Immunantwort abzuschätzen, wurden nach Injektion von IZ-TRAIL in die Maus die Antikörperkonzentrationen durch ELISA bestimmt. Es wurden 10 Tage nach der letzten IZ-TRAIL-Injektion keine erhöhten Antikörperkonzentrationen im Serum von Mäusen detektiert (Abb. 27A).

Hingegen konnten durch Immunisierungen mit einem Adjuvans erfolgreich Antikörper gegen IZ-TRAIL induziert werden, die in den verschiedenen Anwendungen wie Immunoblot, ELISA oder auch FACS Anwendung finden. Das Problem der aufkommenden Immunogenität sollte durch Experimente in höheren Säugetieren, wie z.B Affen, untersucht werden.

Desweiteren besteht die Möglichkeit, die therapeutische Aktivität und eventuelle Immunogenität von IZ-TRAIL durch gezielte chemische Modifikation wie die kovalente Verknüpfung von IZ-TRAIL mit Polyethylenglycol (PEG) zu verbessern. Pegylierung erhöht die Stabilität und beeinflusst die pharmakokinetischen Eigenschaften eines Proteins (Calceti et al., 2004). Bei einer randomisierten Pegylierung wird die Bioaktivität eines Proteins meist negativ beeinflusst. Anhand von TNF-α konnte gezeigt werden, dass eine durch genetische Veränderung zielgerichtete N-terminale Pegylierung möglich ist. Das mono-pegylierte TNF war biologisch aktiv und zeigte eine verbesserte anti-tumorale Wirkung. Die normalerweise nach TNF-Applikation auftretenden Nebenwirkungen wurden mit dem pegylierten TNF nicht beobachtet (Yamamoto et al., 2003). Die Struktur von PEG, in Bezug auf Größe und Verzweigung hatte einen signifikanten Einfluss auf die beobachtete anti-tumorale Aktivität (Yoshioka et al., 2004). Ob die chemische Verknüpfung mit PEG zu einer verbesserten Bioverfügbarkeit, Gewebepenetration, Serum-stabilität, -halbwertszeit und verminderter potentiellen Immunogenität von IZ-TRAIL führt, könnte in weiteren Experimenten untersucht werden.

Mit IZ-TRAIL wurde eine vielversprechende rekombinante Form von TRAIL entwickelt, die ein großes Potential hat als Biotherapeutikum in der Tumorbekämpfung Anwendung zu finden. In dieser Arbeit konnte die selektiv hohe Wirksamkeit von IZ-TRAIL gegenüber Tumorzellen, nicht aber gegenüber nicht transformierten Zellen gezeigt werden.

V Anhang

1 Abkürzungen

Å	Angström
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Transmembranpotential
Abb.	Abbildung
ADCC	antibody dependent cell-mediated cytoxicity
AIF	**A**poptose **i**nduzierender **F**aktor
Ag	Antigen
Apaf-1	**A**poptosis-**p**rotein-**a**ssociated-**f**actor-1
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	**A**denosin **T**ri**p**hosphat
Bp	Basenpaar
BSA	**B**ovine **s**erum **a**lbumine
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Carboxy-
CAD	**C**aspase-**a**ctivated **D**Nase
CARD	**C**aspase **a**ctivation and **r**ecruitment **d**omain
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CDR	complementary determining region (komplementaritätsbestimmende Region)
CD95	Nomenklaturname des Oberflächenantigens APO-1/Fas
CRD	**c**ystein **r**ich **d**omain
CH	konstante Region der schweren Antikörperkette
CL	konstante Region der leichten Antikörperkette
cIAP	**c**ellular **i**nhibitor of **a**poptosis **p**rotein

DD	***d**eath **d**omain* (Todesdomäne)
DcR	***dec**oy **r**eceptor* (Scheinrezeptor)
DED	**d**eath **e**ffector **d**omain
DISC	**d**eath-**i**nducing **s**ignaling **c**omplex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	**d**esoxyribo**n**ucleid **a**cid
DNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DR	***d**eath **r**eceptor* (Todesrezeptor)
ds	doppelsträngig
E.coli	Escherichia coli
ECL	**e**nhanced **c**hemo**l**uminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Fab	antigenbindendes Fragment
Fc	**c**rystallizing **f**ragment
FACS	**F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orter
FADD	**F**as-**a**ssociated **d**eath **d**omain protein
FCS	***f**etal **c**alf **s**erum* (fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FLIP	**FL**ICE **i**nhibierendes **P**rotein
FSC	***f**orward **sc**atter* (Vorwärts-Streuung)
Fv	variabler Bereich eines Antikörpers
GPI	**G**lykosyl**p**hosphatidyl**i**nositol
h	*hora* (Stunde)
H	schwere Kette eines Antikörpermoleküls
HAMA	**h**uman-**a**nti-**m**ouse-**a**ntibodys
HRP	**h**orse **r**addish **p**eroxidase
hu	human
IAP	**i**nhibitor of **a**poptosis **p**rotein
IFN	Interferon
Ig	**I**mmun**g**lobulin
IMAC	**i**mmobilized **m**etal **a**ffinity **c**hromatography

	(immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie)
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalaktopyranosid
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Ligand
L	Leichte Kette eines Antikörpermoleküls
LacZ	β-Galactosidase-Gen
LB	Luria Bertani
LH	**l**uteinizing **h**ormone
LIF	**l**eukemia **i**nhibitory **f**actor
LIT	**L**ymphozyten-**I**nhibitor von **T**RAIL
LTα	Lymphotoxin-alphaμg
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	mikromolar
M	Molar (mol/L)
mA	Milliampere
ME	Mercaptoethanol
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	**m**essenger **r**ibo**n**ucleid **a**cid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
m	murin
MK	**m**ouse homologue of hu**K**iller/DR5
MW	Molekulargewicht
NF-κB	**N**ukleärer **F**aktor **κB**
ng	Nanogramm
NK-Zellen	**N**atürliche **K**illerzellen
nM	Nanomolar
NP-40	Nonidet P-40

nt	Nukleotide
NTA	Nitriloessigsäure
OD	Optische Dichte
OPG	**O**steo**p**rote**g**erin
ORF	**O**pen **r**eading **f**rame
PAGE	**P**oly**a**crylamid-**G**el**e**lektrophorese
PARP	**p**oly-(**A**DP-**r**ibose)-**P**olymerase
PBS	**p**hosphate **b**uffered **s**aline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	β-Phycoerythrin
PEG	**P**oly-**E**thylen-**G**ycol
Pfu	**p**laque **f**orming **u**nít
pH	potentia hydrogenii
PI	**P**ropidium**i**odid
PLAD	**p**re-**l**igand-binding **a**ssembly **d**omain
R	Rezeptor
RIP	**R**eceptor **i**nteracting **p**rotein
RNA	**r**ibonucleid **a**cid
rpm	*rounds per minute* (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
Sc	single chain (Einzelketten)
SDS	Natrium(**S**odium)**d**odecyl**s**ulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SF	Superfamilie
SODD	**s**ilencer **o**f **d**eath **d**omain
SP	Signalpeptid
Ss	single strand (Einzelstrang)
SSC	***s**ide **s**catter* (Seitwärts-Streuung)
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
TM	**T**rans**m**embrandomäne
TNF	**T**umor **n**ecrosis **f**actor

TRADD	**T**NF-**R**eceptor **a**ssociated **d**eath **d**omain
TRAF	**T**NF-**R**eceptor **a**ssociated **f**actor
TRAIL	**T**NF-**r**elated **A**poptosis-**i**nducing **l**igand
TRANCE	**T**NF-**r**elated **a**ctivation-i**n**duced **c**ytokin**e**
TRID	**T**RAIL **r**eceptor without an **i**ntracellular **d**omain
TRUNDD	TRAIL receptor with a **trun**cated **d**eath **d**omain
Tris	Tris(hydroxymethyl)-methylamin
TWEAK	**t**umor necrosis factor family member that **weak**ly induces apoptosis
UV	ultraviolett
VH	variable Region der schweren Antikörperkette
VL	variable Region der leichten Antikörperkette
v/v	Volumenprozent
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoyl-β-D-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

2 Literatur

Abdelmoula, M., Spertini, F., Shibata, T., Gyotoku, Y., Luzuy, S., Lambert, P. H., and Izui, S. (1989). *J Immunol* **143,** 526-32.

Abdollahi, T., Robertson, N. M., Abdollahi, A., and Litwack, G. (2003). *Cancer Res* **63,** 4521-6.

Adams, G. P., McCartney, J. E., Tai, M. S., Oppermann, H., Huston, J. S., Stafford, W. F., 3rd, Bookman, M. A., Fand, I., Houston, L. L., and Weiner, L. M. (1993). *Cancer Res* **53,** 4026-34.

Algeciras-Schimnich, A., Shen, L., Barnhart, B. C., Murmann, A. E., Burkhardt, J. K., and Peter, M. E. (2002). *Mol Cell Biol* **22,** 207-20.

Altucci, L., Rossin, A., Raffelsberger, W., Reitmair, A., Chomienne, C., and Gronemeyer, H. (2001). *Nat Med* **7,** 680-6.

Ames, R. S., Tornetta, M. A., Deen, K., Jones, C. S., Swift, A. M., and Ganguly, S. (1995). *J Immunol Methods* **184,** 177-86.

Aoki, K., Kurooka, M., Chen, J. J., Petryniak, J., Nabel, E. G., and Nabel, G. J. (2001). *Nat Immunol* **2,** 333-7.

Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1999). *Curr Opin Cell Biol* **11,** 255-60.

Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S. A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I. L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokh, Z., and Schwall, R. H. (1999). *J Clin Invest* **104,** 155-62.

Atkins, G. J., Bouralexis, S., Evdokiou, A., Hay, S., Labrinidis, A., Zannettino, A. C., Haynes, D. R., and Findlay, D. M. (2002). *Bone* **31,** 448-56.

Atwell, J. L., Breheney, K. A., Lawrence, L. J., McCoy, A. J., Kortt, A. A., and Hudson, P. J. (1999). *Protein Eng* **12,** 597-604.

Banner, D. W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., Loetscher, H., and Lesslauer, W. (1993). *Cell* **73,** 431-45.

Barclay, A. E., Franklin, K.J., Prichard, M.L. (1944). *Blackwell, Oxford*.

Benini, S., Manara, M. C., Baldini, N., Cerisano, V., Massimo, S., Mercuri, M., Lollini, P. L., Nanni, P., Picci, P., and Scotlandi, K. (2001). *Clin Cancer Res* **7,** 1790-7.

Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R., and Horwitz, A. H. (1988). *Science* **240,** 1041-3.

Biocca, S., Ruberti, F., Tafani, M., Pierandrei-Amaldi, P., and Cattaneo, A. (1995). *Biotechnology (N Y)* **13,** 1110-5.

Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S., and Whitlow, M. (1988). *Science* **242,** 423-6.

Bodmer, J. L., Schneider, P., and Tschopp, J. (2002). *Trends Biochem Sci* **27,** 19-26.

Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D. (1996). *Cell* **85,** 803-15.

Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., and Wallach, D. (1995). *J Biol Chem* **270,** 7795-8.

Bradbury, J. (2001). *Lancet* **357,** 1770.

Brocks, B., Rode, H. J., Klein, M., Gerlach, E., Dubel, S., Little, M., Pfizenmaier, K., and Moosmayer, D. (1997). *Immunotechnology* **3,** 173-84.

Bruggemann, M., Winter, G., Waldmann, H., and Neuberger, M. S. (1989). *J Exp Med* **170,** 2153-7.

Buchsbaum, D. J. (1995). *Cancer Res* **55,** 5729s-5732s.

Burns, T. F., and El-Deiry, W. S. (2001). *J Biol Chem* **276,** 37879-86.

Cahn, J. Y., Bordigoni, P., Tiberghien, P., Milpied, N., Brion, A., Widjenes, J., Lioure, B., Michel, G., Burdach, S., Kolb, H. J., and et al. (1995). *Transplantation* **60,** 939-42.

Calceti, P., Salmaso, S., Walker, G., and Bernkop-Schnurch, A. (2004). *Eur J Pharm Sci* **22,** 315-23.

Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., and Lenardo, M. J. (2000). *Science* **288,** 2351-4.

Chang, D. W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimnich, A., Barnhart, B. C., Yaish-Ohad, S., Peter, M. E., and Yang, X. (2002). *Embo J* **21,** 3704-14.

Chen, Q., Gong, B., Mahmoud-Ahmed, A. S., Zhou, A., Hsi, E. D., Hussein, M., and Almasan, A. (2001). *Blood* **98,** 2183-92.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. (1995). *Cell* **81,** 505-12.

Chinnaiyan, A. M., Orth, K., O'Rourke, K., Duan, H., Poirier, G. G., and Dixit, V. M. (1996a). *J Biol Chem* **271,** 4573-6.

Chinnaiyan, A. M., Tepper, C. G., Seldin, M. F., O'Rourke, K., Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M. (1996b). *J Biol Chem* **271,** 4961-5.

Clarke, P. G., and Clarke, S. (1996). *Anat Embryol (Berl)* **193,** 81-99.

Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., and Ravetch, J. V. (2000). *Nat Med* **6,** 443-6.

Colcher, D., Bird, R., Roselli, M., Hardman, K. D., Johnson, S., Pope, S., Dodd, S. W., Pantoliano, M. W., Milenic, D. E., and Schlom, J. (1990). *J Natl Cancer Inst* **82,** 1191-7.

Cragg, M. S., French, R. R., and Glennie, M. J. (1999). *Curr Opin Immunol* **11,** 541-7.

De Jonge, J., Brissinck, J., Heirman, C., Demanet, C., Leo, O., Moser, M., and Thielemans, K. (1995). *Mol Immunol* **32,** 1405-12.

Deng, Y., Lin, Y., and Wu, X. (2002). *Genes Dev* **16,** 33-45.

Deo, Y. M., Graziano, R. F., Repp, R., and van de Winkel, J. G. (1997). *Immunol Today* **18,** 127-35.

Dhein, J., Daniel, P. T., Trauth, B. C., Oehm, A., Moller, P., and Krammer, P. H. (1992). *J Immunol* **149,** 3166-73.

Dubel, S., Breitling, F., Fuchs, P., Zewe, M., Gotter, S., Welschof, M., Moldenhauer, G., and Little, M. (1994). *J Immunol Methods* **175,** 89-95.

Duenas, M., Vazquez, J., Ayala, M., Soderlind, E., Ohlin, M., Perez, L., Borrebaeck, C. A., and Gavilondo, J. V. (1994). *Biotechniques* **16,** 476-7, 480-3.

Duncan, A. R., and Winter, G. (1988). *Nature* **332,** 738-40.

Duvall, E., Wyllie, A. H., and Morris, R. G. (1985). *Immunology* **56,** 351-8.

Edelman, G. M., Cunningham, B. A., Gall, W. E., Gottlieb, P. D., Rutishauser, U., and Waxdal, M. J. (1969). *Proc Natl Acad Sci U S A* **63,** 78-85.

Eggert, A., Grotzer, M. A., Zuzak, T. J., Wiewrodt, B. R., Ho, R., Ikegaki, N., and Brodeur, G. M. (2001). *Cancer Res* **61,** 1314-9.

Eisenberg, D., Wilcox, W., Eshita, S. M., Pryciak, P. M., Ho, S. P., and DeGrado, W. F. (1986). *Proteins* **1,** 16-22.

El-Deiry, W. S. (2001). *Cell Death Differ* **8,** 1066-75.

Enari, M., Hug, H., and Nagata, S. (1995). *Nature* **375,** 78-81.

Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., and Henson, P. M. (1992). *J Immunol* **148,** 2207-16.

Fanger, N. A., Maliszewski, C. R., Schooley, K., and Griffith, T. S. (1999). *J Exp Med* **190,** 1155-64.

Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R. C., Krebs, J., Srinivasula, S. M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L. C., Trapani, J. A., Tomaselli, K. J., Litwack, G., and Alnemri, E. S. (1996). *Proc Natl Acad Sci U S A* **93,** 7464-9.

Fishwild, D. M., O'Donnell, S. L., Bengoechea, T., Hudson, D. V., Harding, F., Bernhard, S. L., Jones, D., Kay, R. M., Higgins, K. M., Schramm, S. R., and Lonberg, N. (1996). *Nat Biotechnol* **14,** 845-51.

Frisch, C., Kolmar, H., and Fritz, H. J. (1994). *Biol Chem Hoppe Seyler* **375,** 353-6.

Frisch, C., Kolmar, H., Schmidt, A., Kleemann, G., Reinhardt, A., Pohl, E., Uson, I., Schneider, T. R., and Fritz, H. J. (1996). *Fold Des* **1,** 431-40.

Fulda, S., Wick, W., Weller, M., and Debatin, K. M. (2002). *Nat Med* **8,** 808-15.

Ganten, T. M., Haas, T. L., Sykora, J., Stahl, H., Sprick, M. R., Fas, S. C., Krueger, A., Weigand, M. A., Grosse-Wilde, A., Stremmel, W., Krammer, P. H., and Walczak, H. (2004). *Cell Death Differ*.

Gliniak, B., and Le, T. (1999). *Cancer Res* **59,** 6153-8.

Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I., and Pluckthun, A. (1990). *Biochemistry* **29,** 1362-7.

Glockshuber, R., Schmidt, T., and Pluckthun, A. (1992). *Biochemistry* **31,** 1270-9.

Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2005). *J Biol Chem*.

Gong, B., and Almasan, A. (2000). *Biochem Biophys Res Commun* **278,** 747-52.

Graziano, R. F., and Fanger, M. W. (1987). *J Immunol* **139,** 3536-41.

Greenspan, N. S., Dacek, D. A., and Cooper, L. J. (1988). *J Immunol* **141,** 4276-82.

Greenspan, N. S., Monafo, W. J., and Davie, J. M. (1987). *J Immunol* **138,** 285-92.

Griffith, T. S., Chin, W. A., Jackson, G. C., Lynch, D. H., and Kubin, M. Z. (1998). *J Immunol* **161,** 2833-40.

Gross, N., Balmas, K., Beretta Brognara, C., and Tschopp, J. (2001). *Med Pediatr Oncol* **36,** 111-4.

Gruber, M., Schodin, B. A., Wilson, E. R., and Kranz, D. M. (1994). *J Immunol* **152,** 5368-74.

Gura, T. (1997). *Science* **277,** 768.

Hanauer, S. B., Cohen, R. D., Becker, R. V., 3rd, Larson, L. R., and Vreeland, M. G. (1998). *Clin Ther* **20,** 1009-28.

Harper, N., Hughes, M. A., Farrow, S. N., Cohen, G. M., and MacFarlane, M. (2003). *J Biol Chem* **278,** 44338-47.

Hayden, M. S., Linsley, P. S., Gayle, M. A., Bajorath, J., Brady, W. A., Norris, N. A., Fell, H. P., Ledbetter, J. A., and Gilliland, L. K. (1994). *Ther Immunol* **1,** 3-15.

He, Q., Huang, Y., and Sheikh, M. S. (2004). *Oncogene* **23,** 2554-8.

Holen, I., Croucher, P. I., Hamdy, F. C., and Eaton, C. L. (2002). *Cancer Res* **62,** 1619-23.

Holler, N., Tardivel, A., Kovacsovics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T., Engel, J., Schneider, P., and Tschopp, J. (2003). *Mol Cell Biol* **23,** 1428-40.

Huang, D. C., Hahne, M., Schroeter, M., Frei, K., Fontana, A., Villunger, A., Newton, K., Tschopp, J., and Strasser, A. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A* **96,** 14871-6.

Humphreys, D. P., Weir, N., Lawson, A., Mountain, A., and Lund, P. A. (1996). *FEBS Lett* **380,** 194-7.

Hurle, M. R., and Gross, M. (1994). *Curr Opin Biotechnol* **5,** 428-33.

Huston, J. S., George, A. J., Adams, G. P., Stafford, W. F., Jamar, F., Tai, M. S., McCartney, J. E., Oppermann, H., Heelan, B. T., Peters, A. M., Houston, L. L., Bookman, M. A., Wolf, E. J., and Weiner, L. M. (1996). *Q J Nucl Med* **40,** 320-33.

Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M. S., Novotny, J., Margolies, M. N., Ridge, R. J., Bruccoleri, R. E., Haber, E., Crea, R., and et al. (1988). *Proc Natl Acad Sci U S A* **85,** 5879-83.

Huston, J. S., Tai, M. S., McCartney, J., Keck, P., and Oppermann, H. (1993). *Cell Biophys* **22,** 189-224.

Hymowitz, S. G., O'Connell, M. P., Ultsch, M. H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., de Vos, A. M., and Kelley, R. F. (2000). *Biochemistry* **39,** 633-40.

Hymphreys, R. (2002). *Symposium for Biology Therapy*.

Ichikawa, K., Liu, W., Zhao, L., Wang, Z., Liu, D., Ohtsuka, T., Zhang, H., Mountz, J. D., Koopman, W. J., Kimberly, R. P., and Zhou, T. (2001). *Nat Med* **7,** 954-60.

Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., Gelmetti, V., Marchesi, F., Viale, A., Altucci, L., Nervi, C., Minucci, S., and Pelicci, P. G. (2005). *Nat Med* **11,** 71-6.

Irmler, M., Hofmann, K., Vaux, D., and Tschopp, J. (1997a). *FEBS Lett* **406,** 189-90.

Irmler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E., and Tschopp, J. (1997b). *Nature* **388,** 190-5.

Itoh, N., Tsujimoto, Y., and Nagata, S. (1993). *J Immunol* **151,** 621-7.

Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S. (1991). *Cell* **66,** 233-43.

Jakobovits, A. (1995). *Curr Opin Biotechnol* **6,** 561-6.

Jin, T. G., Kurakin, A., Benhaga, N., Abe, K., Mohseni, M., Sandra, F., Song, K., Kay, B. K., and Khosravi-Far, R. (2004). *J Biol Chem* **279,** 55594-601.

Jo, M., Kim, T. H., Seol, D. W., Esplen, J. E., Dorko, K., Billiar, T. R., and Strom, S. C. (2000). *Nat Med* **6,** 564-7.

Johnson, T. R., Stone, K., Nikrad, M., Yeh, T., Zong, W. X., Thompson, C. B., Nesterov, A., and Kraft, A. S. (2003). *Oncogene* **22,** 4953-63.

Jolliffe, L. K. (1993). *Int Rev Immunol* **10,** 241-50.

Kabat, E. A., and Wu, T. T. (1971). *Ann N Y Acad Sci* **190,** 382-93.

Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., and Li, Z. W. (2002). *Nat Rev Cancer* **2,** 301-10.

Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Kawasaki, A., Akiba, H., Okumura, K., and Yagita, H. (1999). *J Immunol* **162,** 2639-47.

Kelley, R. F., Totpal, K., Lindstrom, S. H., Mathieu, M., Billeci, K., Deforge, L., Pai, R., Hymowitz, S. G., and Ashkenazi, A. (2005). *J Biol Chem* **280,** 2205-12.

Kelley, S. K., Harris, L. A., Xie, D., Deforge, L., Totpal, K., Bussiere, J., and Fox, J. A. (2001). *J Pharmacol Exp Ther* **299,** 31-8.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). *Br J Cancer* **26,** 239-57.

Khazaeli, M. B., Saleh, M. N., Wheeler, R. H., Huster, W. J., Holden, H., Carrano, R., and LoBuglio, A. F. (1988). *J Natl Cancer Inst* **80,** 937-42.

Kim, C. H., and Gupta, S. (2000). *Int J Oncol* **16,** 1137-9.

Kim, K., Fisher, M. J., Xu, S. Q., and el-Deiry, W. S. (2000). *Clin Cancer Res* **6,** 335-46.

Kim, Y., Suh, N., Sporn, M., and Reed, J. C. (2002). *J Biol Chem* **277,** 22320-9.

Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1995). *Embo J* **14,** 5579-88.

Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J., and Ashkenazi, A. (2000). *Immunity* **12,** 611-20.

Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., and Ashkenazi, A. (2001). *J Biol Chem* **276,** 46639-46646.

Koehler, J. K. (1975). *J Cell Biol* **67,** 647-59.

Kostelny, S. A., Cole, M. S., and Tso, J. Y. (1992). *J Immunol* **148,** 1547-53.

Krammer, P. H. (1999). *Adv Immunol* **71,** 163-210.

Kroemer, G., Zamzami, N., and Susin, S. A. (1997). *Immunol Today* **18,** 44-51.

Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S. (2001). *J Biol Chem* **276,** 20633-40.

Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y. X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J., and Boyle, W. J. (1998). *Cell* **93,** 165-76.

Lah, M., Goldstraw, A., White, J. F., Dolezal, O., Malby, R., and Hudson, P. J. (1994). *Hum Antibodies Hybridomas* **5,** 48-56.

Lawrence, D., Shahrokh, Z., Marsters, S., Achilles, K., Shih, D., Mounho, B., Hillan, K., Totpal, K., DeForge, L., Schow, P., Hooley, J., Sherwood, S., Pai, R., Leung, S., Khan, L., Gliniak, B., Bussiere, J., Smith, C. A., Strom, S. S., Kelley, S., Fox, J. A., Thomas, D., and Ashkenazi, A. (2001). *Nat Med* **7,** 383-5.

Leget, G. A., and Czuczman, M. S. (1998). *Curr Opin Oncol* **10,** 548-51.

Leithauser, F., Dhein, J., Mechtersheimer, G., Koretz, K., Bruderlein, S., Henne, C., Schmidt, A., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Moller, P. (1993). *Lab Invest* **69,** 415-29.

Leverkus, M., Neumann, M., Mengling, T., Rauch, C. T., Brocker, E. B., Krammer, P. H., and Walczak, H. (2000). *Cancer Res* **60,** 553-9.

Leverkus, M., Sprick, M. R., Wachter, T., Mengling, T., Baumann, B., Serfling, E., Brocker, E. B., Goebeler, M., Neumann, M., and Walczak, H. (2003). *Mol Cell Biol* **23,** 777-90.

Lin, T., Huang, X., Gu, J., Zhang, L., Roth, J. A., Xiong, M., Curley, S. A., Yu, Y., Hunt, K. K., and Fang, B. (2002). *Oncogene* **21,** 8020-8.

Liu, B., and Fan, Z. (2001). *Oncogene* **20,** 3726-34.

Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). *Cell* **86,** 147-57.

Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). *Cell* **104,** 487-501.

Los, M., Van de Craen, M., Penning, L. C., Schenk, H., Westendorp, M., Baeuerle, P. A., Droge, W., Krammer, P. H., Fiers, W., and Schulze-Osthoff, K. (1995). *Nature* **375,** 81-3.

Los, M., Wesselborg, S., and Schulze-Osthoff, K. (1999). *Immunity* **10,** 629-39.

Ludwig, D. L., Pereira, D. S., Zhu, Z., Hicklin, D. J., and Bohlen, P. (2003). *Oncogene* **22,** 9097-106.

MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G. M., and Alnemri, E. S. (1997). *J Biol Chem* **272,** 25417-20.

Mack, M., Riethmuller, G., and Kufer, P. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A* **92,** 7021-5.

Malby, R. L., Tulip, W. R., Harley, V. R., McKimm-Breschkin, J. L., Laver, W. G., Webster, R. G., and Colman, P. M. (1994). *Structure* **2,** 733-46.

Mallender, W. D., and Voss, E. W., Jr. (1994). *J Biol Chem* **269,** 199-206.

Martin, D. A., Siegel, R. M., Zheng, L., and Lenardo, M. J. (1998). *J Biol Chem* **273,** 4345-9.

McManus, D. C., Lefebvre, C. A., Cherton-Horvat, G., St-Jean, M., Kandimalla, E. R., Agrawal, S., Morris, S. J., Durkin, J. P., and Lacasse, E. C. (2004). *Oncogene* **23,** 8105-17.

Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1997a). *Embo J* **16,** 2794-804.

Medema, J. P., Toes, R. E., Scaffidi, C., Zheng, T. S., Flavell, R. A., Melief, C. J., Peter, M. E., Offringa, R., and Krammer, P. H. (1997b). *Eur J Immunol* **27,** 3492-8.

Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D. W., Briand, C., and Grutter, M. G. (2002). *J Biol Chem* **277,** 45162-71.

Milenic, D. E., Yokota, T., Filpula, D. R., Finkelman, M. A., Dodd, S. W., Wood, J. F., Whitlow, M., Snoy, P., and Schlom, J. (1991). *Cancer Res* **51,** 6363-71.

Miller, R. A., Oseroff, A. R., Stratte, P. T., and Levy, R. (1983). *Blood* **62,** 988-95.

Mizutani, Y., Nakanishi, H., Yoshida, O., Fukushima, M., Bonavida, B., and Miki, T. (2002). *Eur J Cancer* **38,** 167-76.

Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A., and Oi, V. T. (1984). *Proc Natl Acad Sci U S A* **81,** 6851-5.

Mouser, J. F., and Hyams, J. S. (1999). *Clin Ther* **21,** 932-42; discussion 931.

Muhlenbeck, F., Schneider, P., Bodmer, J. L., Schwenzer, R., Hauser, A., Schubert, G., Scheurich, P., Moosmayer, D., Tschopp, J., and Wajant, H. (2000). *J Biol Chem* **275,** 32208-13.

Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M. (1996). *Cell* **85,** 817-27.

Muzio, M., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1997). *J Biol Chem* **272,** 2952-6.

Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1998). *J Biol Chem* **273,** 2926-30.

Nagane, M., Huang, H. J., and Cavenee, W. K. (2001). *Apoptosis* **6,** 191-7.

Nagata, S. (1997). *Cell* **88,** 355-65.

Naka, T., Sugamura, K., Hylander, B. L., Widmer, M. B., Rustum, Y. M., and Repasky, E. A. (2002). *Cancer Res* **62,** 5800-6.

Nebbioso, A., Clarke, N., Voltz, E., Germain, E., Ambrosino, C., Bontempo, P., Alvarez, R., Schiavone, E. M., Ferrara, F., Bresciani, F., Weisz, A., de Lera, A. R., Gronemeyer, H., and Altucci, L. (2005). *Nat Med* **11,** 77-84.

Nesterov, A., Ivashchenko, Y., and Kraft, A. S. (2002). *Oncogene* **21,** 1135-40.

Newton, K., Harris, A. W., Bath, M. L., Smith, K. G., and Strasser, A. (1998). *Embo J* **17,** 706-18.

Nimmanapalli, R., Perkins, C. L., Orlando, M., O'Bryan, E., Nguyen, D., and Bhalla, K. N. (2001). *Cancer Res* **61,** 759-63.

Nitsch, R., Bechmann, I., Deisz, R. A., Haas, D., Lehmann, T. N., Wendling, U., and Zipp, F. (2000). *Lancet* **356,** 827-8.

Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B. C., and et al. (1992). *J Biol Chem* **267,** 10709-15.

Orth, K., Chinnaiyan, A. M., Garg, M., Froelich, C. J., and Dixit, V. M. (1996). *J Biol Chem* **271,** 16443-6.

O'Shea, E. K., Klemm, J. D., Kim, P. S., and Alber, T. (1991). *Science* **254,** 539-44.

O'Shea, E. K., Rutkowski, R., and Kim, P. S. (1989). *Science* **243,** 538-42.

Pan, G., Ni, J., Wei, Y. F., Yu, G., Gentz, R., and Dixit, V. M. (1997a). *Science* **277,** 815-8.

Pan, G., Ni, J., Yu, G., Wei, Y. F., and Dixit, V. M. (1998). *FEBS Lett* **424,** 41-5.

Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., and Dixit, V. M. (1997b). *Science* **276,** 111-3.

Pantoliano, M. W., Bird, R. E., Johnson, S., Asel, E. D., Dodd, S. W., Wood, J. F., and Hardman, K. D. (1991). *Biochemistry* **30,** 10117-25.

Papoff, G., Hausler, P., Eramo, A., Pagano, M. G., Di Leve, G., Signore, A., and Ruberti, G. (1999). *J Biol Chem* **274,** 38241-50.

Parham, P. (1983). *J Immunol* **131,** 2895-902.

Petak, I., Douglas, L., Tillman, D. M., Vernes, R., and Houghton, J. A. (2000). *Clin Cancer Res* **6,** 4119-27.

Peter, M. E., and Krammer, P. H. (1998). *Curr Opin Immunol* **10,** 545-51.

Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A., and Ashkenazi, A. (1996). *J Biol Chem* **271,** 12687-90.

Pluckthun, A., and Pack, P. (1997). *Immunotechnology* **3,** 83-105.

Poljak, R. J., Amzel, L. M., Avey, H. P., Chen, B. L., Phizackerley, R. P., and Saul, F. (1973). *Proc Natl Acad Sci U S A* **70,** 3305-10.

Power, B. E., and Hudson, P. J. (2000). *J Immunol Methods* **242,** 193-204.

Proba, K., Ge, L., and Pluckthun, A. (1995). *Gene* **159,** 203-7.

Ravi, R., and Bedi, A. (2002). *Cancer Res* **62,** 4180-5.

Reed, J. C. (2002). *Nat Rev Drug Discov* **1,** 111-21.

Regan, L., and DeGrado, W. F. (1988). *Science* **241,** 976-8.

Ricci, M. S., Jin, Z., Dews, M., Yu, D., Thomas-Tikhonenko, A., Dicker, D. T., and El-Deiry, W. S. (2004). *Mol Cell Biol* **24,** 8541-55.

Rippo, M. R., Moretti, S., Vescovi, S., Tomasetti, M., Orecchia, S., Amici, G., Catalano, A., and Procopio, A. (2004). *Oncogene* **23,** 7753-60.

Robertson, D. (1998). *Nat Biotechnol* **16,** 615.

Rodrigues, M. L., Shalaby, M. R., Werther, W., Presta, L., and Carter, P. (1992). *Int J Cancer Suppl* **7,** 45-50.

Rodriguez, A., Oliver, H., Zou, H., Chen, P., Wang, X., and Abrams, J. M. (1999). *Nat Cell Biol* **1,** 272-9.

Saez-Llorens, X., Castano, E., Null, D., Steichen, J., Sanchez, P. J., Ramilo, O., Top, F. H., Jr., and Connor, E. (1998). *Pediatr Infect Dis J* **17,** 787-91.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.

Samel, D., Muller, D., Gerspach, J., Assohou-Luty, C., Sass, G., Tiegs, G., Pfizenmaier, K., and Wajant, H. (2003). *J Biol Chem* **278,** 32077-82.

Sandborn, W. J., and Hanauer, S. B. (1999). *Inflamm Bowel Dis* **5,** 119-33.

Sandhu, J. S. (1994). *Gene* **150,** 409-10.

Sarker, M., Ruiz-Ruiz, C., and Lopez-Rivas, A. (2001). *Cell Death Differ* **8,** 172-81.

Savill, J., Dransfield, I., Hogg, N., and Haslett, C. (1990). *Nature* **343,** 170-3.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). *Embo J* **17,** 1675-87.

Scaffidi, C., Medema, J. P., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1997). *J Biol Chem* **272,** 26953-8.

Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1999). *J Biol Chem* **274,** 1541-8.

Scanlan, M. J., Raj, B. K., Calvo, B., Garin-Chesa, P., Sanz-Moncasi, M. P., Healey, J. H., Old, L. J., and Rettig, W. J. (1994). *Proc Natl Acad Sci U S A* **91,** 5657-61.

Schmitz, I., Kirchhoff, S., and Krammer, P. H. (2000). *Int J Biochem Cell Biol* **32,** 1123-36.

Schneider, P., Bodmer, J. L., Thome, M., Hofmann, K., Holler, N., and Tschopp, J. (1997a). *FEBS Lett* **416,** 329-34.

Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J. L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A., and Tschopp, J. (1998). *J Exp Med* **187,** 1205-13.

Schneider, P., Olson, D., Tardivel, A., Browning, B., Lugovskoy, A., Gong, D., Dobles, M., Hertig, S., Hofmann, K., Van Vlijmen, H., Hsu, Y. M., Burkly, L. C., Tschopp, J., and Zheng, T. S. (2003). *J Biol Chem* **278,** 5444-54.

Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J. L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N., and Tschopp, J. (1997b). *Immunity* **7,** 831-6.

Schroff, R. W., Foon, K. A., Beatty, S. M., Oldham, R. K., and Morgan, A. C., Jr. (1985). *Cancer Res* **45,** 879-85.

Schulze-Bergkamen, H., Untergasser, A., Dax, A., Vogel, H., Buchler, P., Klar, E., Lehnert, T., Friess, H., Buchler, M. W., Kirschfink, M., Stremmel, W., Krammer, P. H., Muller, M., and Protzer, U. (2003). *J Hepatol* **38,** 736-44.

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M. E. (1998). *Eur J Biochem* **254,** 439-59.

Screaton, G. R., Mongkolsapaya, J., Xu, X. N., Cowper, A. E., McMichael, A. J., and Bell, J. I. (1997). *Curr Biol* **7,** 693-6.

Sears, H. F., Atkinson, B., Mattis, J., Ernst, C., Herlyn, D., Steplewski, Z., Hayry, P., and Koprowski, H. (1982). *Lancet* **1,** 762-5.

Segal, D. M., Padlan, E. A., Cohen, G. H., Rudikoff, S., Potter, M., and Davies, D. R. (1974). *Proc Natl Acad Sci U S A* **71,** 4298-302.

Segal, D. M., Weiner, G. J., and Weiner, L. M. (1999). *Curr Opin Immunol* **11,** 558-62.

Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C. L., Baker, K., Wood, W. I., Goddard, A. D., Godowski, P., and Ashkenazi, A. (1997). *Science* **277,** 818-21.

Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y., and Lenardo, M. J. (2000). *Science* **288,** 2354-7.

Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H. L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Boyle, W. J., and et al. (1997). *Cell* **89,** 309-19.

Skerra, A., and Pluckthun, A. (1988). *Science* **240,** 1038-41.

Skerra, A., and Pluckthun, A. (1991). *Protein Eng* **4,** 971-9.

Sprick, M. R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M. A., and Walczak, H. (2002). *Embo J* **21,** 4520-30.

Sprick, M. R., and Walczak, H. (2004). *Biochim Biophys Acta* **1644,** 125-32.

Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Zangrilli, J., Robertson, N., Armstrong, R. C., Wang, L., Trapani, J. A., Tomaselli, K. J., Litwack, G., and Alnemri, E. S. (1996). *J Biol Chem* **271,** 27099-106.

Steplewski, Z., Sun, L. K., Shearman, C. W., Ghrayeb, J., Daddona, P., and Koprowski, H. (1988). *Proc Natl Acad Sci U S A* **85,** 4852-6.

Suda, T., Hashimoto, H., Tanaka, M., Ochi, T., and Nagata, S. (1997). *J Exp Med* **186,** 2045-50.

Suliman, A., Lam, A., Datta, R., and Srivastava, R. K. (2001). *Oncogene* **20,** 2122-33.

Sun, S. Y., Yue, P., Hong, W. K., and Lotan, R. (2000a). *Cancer Res* **60,** 7149-55.

Sun, S. Y., Yue, P., and Lotan, R. (2000b). *Oncogene* **19,** 4513-22.

Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., and Kroemer, G. (1996). *J Exp Med* **184,** 1331-41.

Suzuki, K., Hiroaki, H., Kohda, D., and Tanaka, T. (1998). *Protein Eng* **11,** 1051-5.

Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., and Goeddel, D. V. (1993). *Cell* **74,** 845-53.

Thakkar, H., Chen, X., Tyan, F., Gim, S., Robinson, H., Lee, C., Pandey, S. K., Nwokorie, C., Onwudiwe, N., and Srivastava, R. K. (2001). *J Biol Chem* **276,** 38361-9.

Thompson, C. B. (1995). *Science* **267,** 1456-62.

Timmer, T., de Vries, E. G., and de Jong, S. (2002). *J Pathol* **196,** 125-34.

Tolcher, A. W. (2004). *16.th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics#197*.

Tran, S. E., Holmstrom, T. H., Ahonen, M., Kahari, V. M., and Eriksson, J. E. (2001). *J Biol Chem* **276,** 16484-90.

Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. (1989). *Science* **245,** 301-5.

Truneh, A., Sharma, S., Silverman, C., Khandekar, S., Reddy, M. P., Deen, K. C., McLaughlin, M. M., Srinivasula, S. M., Livi, G. P., Marshall, L. A., Alnemri, E. S., Williams, W. V., and Doyle, M. L. (2000). *J Biol Chem* **275,** 23319-25.

Tschopp, J., Irmler, M., and Thome, M. (1998). *Curr Opin Immunol* **10,** 552-8.

Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannilkulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K. B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P., and Wallach, D. (1998). *Immunity* **9,** 267-76.

Vaux, D. L., and Korsmeyer, S. J. (1999). *Cell* **96,** 245-54.

Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Van de Craen, M., Declercq, W., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998). *J Exp Med* **188,** 919-30.

Verma, R., Boleti, E., and George, A. J. (1998). *J Immunol Methods* **216,** 165-81.

Voelkel-Johnson, C., King, D. L., and Norris, J. S. (2002). *Cancer Gene Ther* **9,** 164-72.

Vogt, C. (1842). *Solothurn*.

Wajant, H., Gerspach, J., and Pfizenmaier, K. (2005). *Cytokine Growth Factor Rev* **16,** 55-76.

Wajant, H., Johannes, F. J., Haas, E., Siemienski, K., Schwenzer, R., Schubert, G., Weiss, T., Grell, M., and Scheurich, P. (1998). *Curr Biol* **8,** 113-6.

Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A., Goodwin, R. G., and Rauch, C. T. (1997). *Embo J* **16,** 5386-97.

Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. C., and Lynch, D. H. (1999). *Nat Med* **5,** 157-63.

Wang, J., Lobito, A. A., Shen, F., Hornung, F., Winoto, A., and Lenardo, M. J. (2000). *Eur J Immunol* **30,** 155-63.

Ward, E. S., and Ghetie, V. (1995). *Ther Immunol* **2,** 77-94.

Weiner, L. M. (1999). *Semin Oncol* **26,** 43-51.

Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A., and et al. (1995). *Immunity* **3,** 673-82.

Winter, G., and Harris, W. J. (1993). *Immunol Today* **14,** 243-6.

Wu, A. M., Chen, W., Raubitschek, A., Williams, L. E., Neumaier, M., Fischer, R., Hu, S. Z., Odom-Maryon, T., Wong, J. Y., and Shively, J. E. (1996). *Immunotechnology* **2,** 21-36.

Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D. D., Zhou, J. Y., Muschel, R., Hamilton, S. R., Spinner, N. B., Markowitz, S., Wu, G., and el-Deiry, W. S. (1997). *Nat Genet* **17,** 141-3.

Wu, G. S., Burns, T. F., Zhan, Y., Alnemri, E. S., and El-Deiry, W. S. (1999). *Cancer Res* **59,** 2770-5.

Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1980). *Int Rev Cytol* **68,** 251-306.

Xiao, C., Yang, B. F., Asadi, N., Beguinot, F., and Hao, C. (2002a). *J Biol Chem* **277,** 25020-5.

Xiao, S., Jodo, S., Sung, S. S., Marshak-Rothstein, A., and Ju, S. T. (2002b). *J Biol Chem* **277,** 50907-13.

Yamamoto, Y., Tsutsumi, Y., Yoshioka, Y., Nishibata, T., Kobayashi, K., Okamoto, T., Mukai, Y., Shimizu, T., Nakagawa, S., Nagata, S., and Mayumi, T. (2003). *Nat Biotechnol* **21,** 546-52.

Yang, X., Chang, H. Y., and Baltimore, D. (1998). *Mol Cell* **1,** 319-25.

Yeh, W. C., Pompa, J. L., McCurrach, M. E., Shu, H. B., Elia, A. J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El-Deiry, W. S., Lowe, S. W., Goeddel, D. V., and Mak, T. W. (1998). *Science* **279,** 1954-8.

Yokota, S., Okazaki, M., Yoshida, M., and Seon, B. K. (1993). *Leuk Res* **17,** 69-79.

Yokota, T., Milenic, D. E., Whitlow, M., and Schlom, J. (1992). *Cancer Res* **52,** 3402-8.

Yonehara, S., Ishii, A., and Yonehara, M. (1989). *J Exp Med* **169,** 1747-56.

Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y., Ikemizu, S., Yamamoto, Y., Shibata, H., Nishibata, T., Mukai, Y., Okamoto, T., Taniai, M., Kawamura, M., Abe, Y., Nakagawa, S., Nagata, S., Yamagata, Y., and Mayumi, T. (2004). *Biochem Biophys Res Commun* **315,** 808-14.

Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N. H., and Winoto, A. (1998). *Nature* **392,** 296-300.

Zhang, X. D., Franco, A., Myers, K., Gray, C., Nguyen, T., and Hersey, P. (1999). *Cancer Res* **59,** 2747-53.

Zhang, X. D., Franco, A. V., Nguyen, T., Gray, C. P., and Hersey, P. (2000). *J Immunol* **164,** 3961-70.

Zhang, X. D., Zhang, X. Y., Gray, C. P., Nguyen, T., and Hersey, P. (2001). *Cancer Res* **61,** 7339-48.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). *Cell* **90,** 405-13.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999). *J Biol Chem* **274,** 11549-56.

3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Manuela Schader
Geburtsdatum/-ort:	13.04.1973 in Lampertheim
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Anschrift	Gaisberg-Str.48, 69115 Heidelberg

Schulbildung

1979-1983	Grundschule in Bürstadt
1983-1992	Gymnasium Liebfrauenschule Bensheim, Abitur 1992

Beruflicher Werdegang

1992-1995	Ausbildung zur Biologielaborantin im Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg

Studium

1995-1999	Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg
13.09.2000	Diplom
Nov. 1999-Aug. 2000	Diplomarbeit im Fach Molekularbiologie im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung in Marburg im Labor von Prof. Dr. M. Eilers mit dem Thema: Regulation der Miz-1 Funktion durch den Transkriptionsfaktor Myc

Feb. 2001-Apr. 2005	Promotionarbeit am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg im Labor von Dr. H. Walczak mit dem Thema: „Das tumortherapeutische Potential optimierter Agonisten der Rezeptoren des Apoptose-induzierenden Liganden TRAIL“

Auslandsaufenthalte

Apr. 2000- Juni 2000	Laboraufenthalt am Institut of Cancer Research Chester Beatty Laboratories, London UK

4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren:

Aurich, Beato, Daut, Eilers, Elsässer, Daut, Habermehl, Hartmann, Hasilik, Kirchner, Lammel, Löffler, Lührmann, Koolmann, Kontermann, Knöller, Müller, Schäfer, Seifart, Seitz, Steinmetz, Suske, Röhm

:

5 Danksagung

Dr. Henning Walczak danke ich für die Überlassung und Gestaltung des Themas und der mir gegebenen Möglichkeit, die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am DKFZ anzufertigen. Seine motivierenden Ratschläge in Verbindung mit den hervorragenden Bedingungen haben viel zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. M. Eilers danke ich für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit an der Universität in Marburg sowie die Übernahme der Begutachtung.

Prof Dr. P. Krammer und seiner Arbeitgruppe danke ich für die intensiven und fruchtvollen Diskussionen in den Seminaren.

Dr. M. Sprick danke ich für seine ständige Hilfsbereitschaft, die vielen engagierten fachlichen Ratschläge und seine konstruktive Kritik im Verlauf dieser Arbeit.

Dipl. Biologe T. Haas und H. Stahl danke ich für die Unterstützung bei Fragen rund um das Protein und der Proteinreinigung.

Dr. P. Büchler, Dr. H. Schulze Bergkammen, Dr. T. Ganten und Dr. R. Koschny danke ich, dass sie mir den Zugang zu primären Hepatozyten ermöglicht haben.

Insbesondere möchte meinen ehemaligen Azubis, Daniel Strauß und Pola Linzmayer für ihren Einsatz danken.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Walczak, insbesondere Dipl. Humanbiologin D. Willen möchte ich für das gute Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft danken.

In einer für mich privat persönlich nicht einfachen Zeit danke ich besonders, meinen langjährigen Freunden, Christine, Jü und Silke und meiner Familie - Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Das tumortherapeutische Potential optimierter Agonisten der Rezeptoren des Apoptose-induzierenden Liganden TRAIL“ am Deutschen Krebsforschungzentrum unter Leitung von Dr. Walczak ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Orginalarbeiten:

Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M., and Massague, J. (2001). *Nat Cell Biol* **3,** 400-8.
Ganten, T., Koschny, R., Sykora, J., Schulze-Bergkamen, H., Büchler, P., Haas, T., Schader, M., Untergasser, A., Stremmel, W., Walczak, H.. Manuskript in Vorbereitung.

Buchbeiträge:

Willen, D., Schader, M., Buchkapitel: „Physiological role of TRAIL “ in Apoptosis & Cancer Therapy (Debatin, K.M., Fulda, S., ed.) Wiley-VCH in press.

Heidelberg 14.05.2005

Manuela Schader