

I. ZUSAMMENFASSUNG

Maligne Tumoren bestehen aus zwei Kompartimenten: den entarteten Zellen und einem genetisch stabilen, die malignen Zellen umgebenden und versorgenden Stroma. Viele epitheliale Tumoren exprimieren in diesem Stroma das membrangebundene und als Protease enzymatisch aktive Fibroblasten-Aktivierungs-Protein (FAP), welches sich aufgrund seines Expressionsmusters mit hoher Expressionsdichte und gleichmäßiger Ausbreitungsrate sowie nahezu ausschließlichem Vorkommen im Tumorstroma als immuntherapeutisch nutzbares Oberflächenantigen eignet. Durch die Fusion eines gegen das Fibroblasten-Aktivierungs-Protein gerichtete Single-Chain-Konjugat mit dem immuntherapeutisch wirksamen Tumor Nekrose Faktor (TNF) soll die zielgerichtete Applikation des Immunzytokins im Sinne des Tumortargetings und die Entfaltung der zytotoxischen Aktivität erreicht werden. Aufgrund der limitierenden Toxizität von Tumor Nekrose Faktor, die aus der nicht anti-tumoralen Wirkung des Zytokins hervorgeht, ist die therapeutische Anwendung von humanem rekombinantem TNF deutlich eingeschränkt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Fusionsprotein anti-FAPscFv-TNF gentechnologisch hergestellt, bakteriell exprimiert, gereinigt und charakterisiert: Die variable Region des anti-FAP-Antikörperfragments wurde von Boehringer Ingelheim zur Verfügung gestellt. Zur Generierung des Immunzytokins wurde der Single-Chain-Antikörper anti-FAP mit humanem rekombinantem TNF- α fusioniert und mit dem bakteriellen pET-25b(+)-Vektor in *E. coli* exprimiert. Die Expressionsbedingungen wurden optimiert und das Immunzytokin sowohl in löslicher Form aus dem Periplasma und dem Kulturüberstand sowie in unlöslicher Form aus zytoplasmatischen Einschlusskörpern chromatographisch gereinigt. Nach Konzentrierung bzw. Dialyse gegen ein physiologisches Puffersystem zeigte sich ein deutlicher Proteinverlust, der größtenteils auf die verminderte Stabilität und Aggregatbildung des konzentrierten Proteins zurückzuführen ist. Die Proteinausbeute lag zwischen 50 und 200 μ g je Liter Bakterienkultur. Durch Präparation in großem Maßstab und Vereinigung mehrerer Fraktionen gereinigten Proteins ließ sich dennoch eine ausreichende Menge für die Durchführung funktioneller bzw. zytotoxischer Tests herstellen: Bindung und Integrität des Antikörperkonjugates wurden mittels Anti-Idiotyp-ELISA nachgewiesen. Durchflusszytometrisch konnte eine spezifische Bindung des anti-FAPscFv-TNF auf der FAP-transfizierten Zelllinie HT1080^{FAP} gezeigt werden. Die *in vitro*-Toxizität des Immunzytokins wurde mit der TNF-sensiblen bzw. -resistenten murinen Fibrosarkomzelllinie WEHI-164 S/R überprüft. Gegenwärtig werden weitere Versuche zur Steigerung des

Produktionsniveaus in einem eukaryontischen Expressionssystem und Überprüfung im Tiermodell unternommen.

Prokaryotic Expression and *in vitro*-Characterization of an Antibody Derived TNF Fusion Protein

I. SUMMARY

In epithelial cancers, the tumor compartment consists of two different, but interdependent components, the malignant cells and the tumor stroma. The predominant cells in the tumor stroma are non-transformed fibroblasts, expressing the genetically stable fibroblast-activation protein (FAP) in up to 90% of all cases. Due to its properties and expression pattern FAP is used as a target in anti-cancer therapy. TNF application as a tumor therapeutic reagent is limited by severe side effects, including life-threatening symptoms of shock, but TNF should be successfully applied under conditions that prevent its systemic action. In this work we describe the generation and characterization of the immunocytokine anti-FAPscFv-TNF which targets the tumor stroma by binding to the FAP antigen and delivering TNF- α -bioactivity. The variable region of the anti-FAP single chain antibody was supplied by Boeringer Ingelheim, Germany. Recombinant DNA techniques were used to clone, construct and express the fused immunocytokine anti-FAPscFv-TNF by the prokaryotic expression vector pET-25b(+) in *E. coli*. Fusion protein was purified from *E. coli* inclusion bodies and the soluble periplasmic fraction with a final yield of about 50 – 200 μ g/liter of bacterial culture and analysed by gel electrophoresis and Western blotting. However we noticed a loss of protein yield after concentration attributed to decreased stability and aggregate formation. Nevertheless we succeed in producing a sufficient amount of intact fusion protein to perform the binding analysis and cytotoxicity assay. The immunoreactivity of the anti-FAPscFv-TNF immunocytokines was assessed by flow cytometry using HT 1080 FAP-transfected and mock-transfected HT 1080 par cells and compared to its parental anti-FAPscFv counterpart. To prove the binding to the FAP antigen and the integrity of the entire construct, antigenic recognition was visualized using murine anti-idiotyp ELISA. Cytotoxic activity was confirmed by the standard *in-vitro* assay which depends on TNF-R-I mediated cytotoxicity in murine WEHI-164 cells. In conclusion, our *in-vitro* data demonstrate the anti-tumor efficacy of the immunocytokine anti-FAPscFv-TNF after prokaryotic expression. Further investigations to optimize production levels by changing into an eukaryotic expression system and examine therapeutic efficacy in the mouse model are needed.

I. EINLEITUNG

Antikörper-gestützte Strategien zur Rekrutierung einer Immunantwort haben sich in den letzten Jahren neben Chemo- und Radiotherapie sowie Chirurgie als vierte Säule der Behandlung maligner Erkrankungen zunehmend etabliert. Die Immuntherapie setzt allerdings die Existenz von Oberflächenstrukturen voraus, die auf Tumorzellen spezifisch oder im Übermaß gegenüber gesundem Gewebe vorkommen und somit als Zielstruktur dienen können. Mittlerweile ist eine große Anzahl von Molekülen auf malignen Zellen bekannt, die sich entweder ausschließlich auf malignen, nicht jedoch benignen Zellen nachweisen lassen (tumorspezifische Antigene) oder aber bevorzugt auf malignen Zellen exprimiert werden (tumorassoziierte Antigene) (PAIK et al., 1992, SIEGALL, 1994).

Solide Tumoren scheinen im Vergleich zu hämatologischen Neoplasien jedoch aus mehreren Gründen einer Antikörpertherapie weniger zugänglich: Heterogenität der Antigenexpression und herabgesetzte Empfindlichkeit entarteter Zellen gegenüber Effektormolekülen entstehen auf dem Boden maligner Entartung und stellen Limitationen für eine Antikörper-gestützte Immuntherapie dar. Beobachtungen, dass die Eigenschaften malignen Wachstums nicht allein durch die Tumorzelle, sondern auch das umgebende Stroma determiniert sind, stützen das Konzept der Tumor-Stroma-Interaktion (SELJELID et al., 1999; KUNZ-SCHUGHART & KNUECHEL, 2002): Im Gegensatz zu den entarteten Zellen solider Tumoren sind die Zellen des Tumorstromas genetisch stabil. Fibroblasten repräsentieren in diesem Kompartiment die quantitativ am stärksten vertretene Zellpopulation. *In vitro*- wie *in vivo*-Studien belegen deren entscheidende Rolle für das Wachstumsverhalten maligner Tumoren (ADAMS et al., 1988, CAMPS et al., 1990). Im Gegensatz zu den Fibroblasten des einfachen Bindegewebes können Tumor-assoziierte Fibroblasten eine koordinierende Rolle zur Alteration des umgebenden Gewebes übernehmen und dadurch zum invasiven Wachstum sowie zur Metastasierung der Tumoren beitragen (KINZLER & VOGELSTEIN, 1998). Diese Interaktion ist auf der Ebene spezifischer Rezeptor-Ligand-Komplexe zwischen dem neoplastischen Endothel und verschiedenen Zonen des umgebenden Stromas zu detektieren (IACOBUZIO-DONAHUE et al., 2002). Der Grad der Interaktion ist durch das lokale Zytokinmuster und die Hochregulation chemotaktischer Substanzen sowie mitogener Faktoren gekennzeichnet. In diesem Milieu regen Tumorzellen die benachbarten Fibroblasten zur Expression einer Vielzahl von Proteasen an (AFZAL et al., 1998), die entscheidend an der Alteration der Extrazellulärmatrix (NOEL et al., 1998) beteiligt sind. Die

Proteaseaktivität wiederum initiiert einen Prozess, der histologisch als lokale Fibrose imponiert (HASEBE et al., 2000). Karzinome, die dieses Merkmal aufweisen, zeigen ein deutlich aggressiveres Wachstumsverhalten (HASEBE et al., 1998; HASEBE et al., 2001), metastasieren früher und gehen mit einem schlechteren Gesamtüberleben als nicht fibrosierende Karzinome einher (NISHIMURA et al., 1998; HALVORSEN & SEIM, 1989).

Fibroblasten vieler epithelialer Tumoren exprimieren das membrangebundene Fibroblasten-aktivierende-Protein oder Fibroblasten-Aktivierungsprotein (FAP). Das Protein ist enzymatisch aktiv, wodurch im Stroma ansässige Fibroblasten das angrenzende gesunde Gewebe zersetzen können. FAP ist auch unter dem Namen „Seprase“ (GOLDSTEIN et al., 1997) bekannt, hat ein Molekulargewicht von 95 kDa und gehört als integrales Typ II-Membranglykoprotein zur Familie der Serinproteasen. Von den bislang bekannten Proteasen des Tumorstromas ist FAP aufgrund seiner hohen Expressionsdichte und seiner gleichmäßigen Expressionrate auf der äußeren Zellmembran der Fibroblasten als immuntherapeutisch nutzbares Oberflächenantigen geeignet (GARIN-CHESA et al., 1990, WELT et al., 1994). Die Expression von FAP ist fast ausschließlich auf das Stroma epithelialer Tumoren beschränkt. Ausnahmen hiervon bilden das transiente Erscheinen im Rahmen der Wundheilung sowie die Expression durch eine Untergruppe endokrin aktiver Pankreaszellen. Immunhistologische Analysen von Patienten mit epithelialen Tumoren einschließlich kolorektalen -, Mamma- und Bronchial-Karzinomen (WELT et al., 1994; SCANLAN et al., 1994; PARK et al., 1999) zeigen, dass das Protein von über 90% der im Stroma ansässigen Fibroblasten, nicht jedoch von den Tumorzellen selbst exprimiert wird. Dies gilt für Primärtumoren und Metastasen gleichermaßen. Lediglich einige Weichteilsarkome und manche Osteosarkome sind aufgrund ihrer mesenchymalen Herkunft FAP-positiv (RETTIG et al., 1993). Übrige im Tumor-Stroma vorkommende Zellen sind FAP-negativ.

Durch die Einschleusung von DNA-Fragmenten mithilfe von Vektoren in unterschiedliche Organismen wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Säugetierzellkulturen u. a. ist es möglich geworden, Antikörper oder Antikörperfragmente mit drastisch verminderter Immunogenität unter Erhaltung der Spezifität *in vitro* herzustellen. Hieraus ergibt sich eine Vielzahl von Möglichkeiten der molekularen Umstrukturierung muriner monoklonaler Antikörper: Aus der Verbindung muriner variabler Regionen mit humanen konstanten Regionen entsteht ein chimärer Antikörper. Durch Fusion der hypervariablen Regionen der Antigenbindungsstelle

eines murinen Antikörpers mit einem humanen Antikörper entsteht ein humanisierter Antikörper. Ein Fab-Fragment (Fab) besteht aus der leichten Kette ($V_L + C_L$) und den ersten beiden Domänen der schweren Kette ($V_H + C_{H1}$). Die variablen Regionen $V_H + V_L$ bilden ein Fv-Fragment. Die Expression funktioneller Fv-Fragmente in *E. coli* gelang zum ersten mal Ende der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts. Nach Fusionierung der V_H - und V_L -Gensegmente mit bakteriellen Signalsequenzen und Klonierung der beiden Fragmente in einen bakteriellen Expressionsvektor wurden korrekt gefaltete Heterodimere aus dem Periplasma der Bakterienzelle isoliert. Verglichen mit glykosilierten und phosphorylierten kompletten Antikörpern lassen sich Fab- und Fv-Fragmente leichter rekombinant in Bakterien oder eukaryontischen Zellen herstellen (BETTER et al., 1988).

Im Gegensatz zu den korrespondierenden größeren Fab- und IgG-Formen sind die nur etwa 30 kDa großen Single-Chain-Konjugate scFv stabiler (PANTOLIANO et al., 1991) und haben durch ihre geringe Größe eine höhere Penetranz in Tumoren. Damit sind sie unter anderem besser geeignet, Effektormoleküle in Tumorgewebe einzuschleusen (MILENIC et al., 1991; YOKOTA et al., 1992). Aufgrund ihres niedrigen Molekulargewichtes werden Single-Chain-Konjugate schneller über die Nieren ausgeschieden, woraus eine durchschnittliche biologische Halbwertszeit im menschlichen Serum von nur 3,5 Stunden resultiert (HUSTON et al., 1996). Monoklonale Antikörper als Immunzytokine, Antikörper oder Antikörperfragmente, die als unterschiedliche rekombinante Konstrukte mit direkt oder indirekt tumortoxisch wirksamen humanen Zytokinen (THEUER & PASTAN, 1993; REISFELD et al., 1997; ROSENBLUM et al. 2000), fusioniert wurden, werden bereits in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit getestet.

Tumor Nekrose Faktor wird von zahlreichen Zelltypen in Form eines membranständigen Typ II Proteins (MemTNF) mit einem Molekulargewicht von 26 kDa exprimiert. Die lösliche Form des physiologisch trimeren Zytokins aus nicht kovalent gebundenen Monomeren mit einem Molekulargewicht von jeweils 17,5 kDa entsteht durch proteolytische Spaltung aus der erstgenannten Form (OLD, 1987; KRIEGLER et al., 1988). Zur Signaltransduktion existieren zwei verschiedene TNF-Rezeptor-Typen: TNF-R1 und -R2 (WAJANT & SCHEURICH, 2001), die von der Mehrzahl aller Gewebe exprimiert werden. Die lösliche Form des Zytokins entfaltet ihre systemische Aktivität hauptsächlich infolge Aktivierung des Typ 1-Rezeptors (GRELL et al., 1999). Der membranständige Tumor Nekrose Faktor vermittelt die zytotoxische Wirkung über beide Rezeptortypen, hauptsächlich jedoch durch

Stimulation des Rezeptor-2-Typs (GRELL et al., 1995). Seitdem das anti-tumorale Potential der verschiedenen immunmodulatorischen Eigenschaften von Tumor-Nekrose-Faktor (OLD, 1987; LOCKSLEY et al., 2001) durch komplette Remissionen xenotransplantierter Tumoren offenbar wurde (CREASEY et al., 1986; ASHER et al., 1987), sind Versuche zur Tumoreal-restingierten Rekrutierung von TNF mehrfach an den lethal-toxischen Nebenwirkungen des Zytokins gescheitert (SHERMAN et al., 1988; SPRIGGS et al., 1988). Bis heute stellt die isolierte Extremitätenperfusion die einzige klinisch etablierte Methode zum Erreichen lokal begrenzter und ausreichend hoher Zytokinspiegel dar (LEJEUNE et al., 1998; EGGERMONT & HAGEN, 2001). Verschiedene Strategien wurden entwickelt, um die aus der unkontrollierten TNF-Anreicherung resultierenden unerwünschten Wirkungen nach systemischer Applikation zu vermeiden (MAUCERI et al., 1996; ROBERT et al., 1996).

Ein viel versprechender Ansatz scheint die genetische Fusion des rekombinanten Zytokins mit tumorselektiven Antikörpern zu sein (XIANG, 1999). Die zielgerichtete Akkumulation von Tumor Nekrose Faktor im Tumorstroma epithelialer Tumoren soll durch die Induktion einer Entzündungsreaktion, einer lokalen Apoptose und hämorrhagischen Nekrose letztendlich zur Zerstörung des Tumors führen. Das Vorhaben der vorliegenden Arbeit gründet auf der Selektion eines rekombinanten TNF-gekoppelten Singel-Chain-Antikörperkonjugates zur Therapie epithelialer Tumoren im Sinne eines immunmodulatorischen Tumortargetings.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Molekularbiologische Methoden

1.1 Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente durch die Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifizierung von DNA-Sequenzen erfolgt mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Diese Standardmethode ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung einzelsträngiger DNA, wobei lediglich eine Kopie des Templates vorliegen muss. Man nutzt dabei die Eigenschaften von DNA-Polymerasen, die einen Einzelstrang zum DNA-Doppelstrang polymerisieren können, sofern ihnen ein kurzer, doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht. Durch Zugabe von Oligonukleotidprimern (upstream und downstream), die zum 5' - bzw. 3' -Ende der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind und die Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen ist eine automatisierte Durchführung der PCR in programmierbaren Thermoblöcken möglich. Das Prinzip der PCR beruht auf einem dreiteiligen Reaktionszyklus. Im ersten Schritt wird die Template-DNA bei einer Temperatur von 95 °C denaturiert, d. h. die Tertiärstruktur wird aufgelöst. Dies ist notwendig, um im nachfolgenden Schritt eine Anlagerung der Oligonukleotide an den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt zu ermöglichen. Zum Anbinden der Primer muss der Reaktionsansatz auf die sogenannte Annealing-Temperatur, welche je nach Art bzw. GC-Gehalt des Primers variiert, abgekühlt werden. Zuletzt erfolgt die vom Oligonukleotid ausgehende Doppelstrangsynthese bei einer Temperatur von 72 °C. Diese Reaktionsschleife kann beliebig oft durchlaufen werden.

Für einen Reaktionsansatz wurden 1 µl cDNA, 5 µl 10x Herculase-Puffer (STRATAGENE, AMSTERDAM, NIEDERLANDE), je 1 µl upstream- und downstream-Primer, 1 µl dNTP (AMERSHAM, PHARMACIA, LITTLE CHALFONT, UK) mit H₂O dest. auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Zuletzt wurden 0,5 µl Herculase (STRATAGENE, AMSTERDAM, NIEDERLANDE) hinzugegeben und die Polymerase-Kettreaktion in einem PCR-Gerät (Thermocycler UNO II, BIOMETRA, GÖTTINGEN) unter u. a. Bedingungen gestartet. Die Anzahl

der Schleifen sowie die exakte Annealing Temperatur sind je nach Art des verwendeten Oligonukleotids variabel. Zur Kontaminationsprophylaxe wurden am PCR-Arbeitsplatz gesonderte Pipetten und Pipettenspitzen mit Filtereinsatz verwendet.

95 °C 4 Minuten

95 °C 1 Minute

Annealing 1 Minute

72 °C 2 Minuten

72 °C 10 Minuten

1.2 Agarose-Gelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wandern größenabhängig negativ geladene Nukleinsäurefragmente unterschiedlich weit im elektrischen Feld (MCDONELL et al. 1977). Durch die Verwendung von Ethidiumbromid, einer sequenzunspezifisch an Nukleinsäuren interkalierende Substanz, die bei Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda=300$ nm) Licht der Wellenlänge 590 nm emittiert, können die Nukleinsäuren sichtbar gemacht und bezüglich Reinheit, Größe und Konzentration beurteilt werden.

Zur Präparation und Analyse von DNA-Fragmenten wurden 1-2 g% Agarose (SIGMA, ST. LOUIS, USA) durch Kochen in 1x TAE-Puffer [aus 50x TAE-Stammlösung: 242 g Trishydroxymethylaminomethan (TrisBase, SIGMA, ST. LOUIS, USA), 57,1 ml Eisessig (MERCK, DARMSTADT), 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (MERCK, DARMSTADT) je Liter H₂O dest.] aufgelöst und nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C mit 0,05% Ethidiumbromid (SIGMA, ST. LOUIS, USA) versetzt und in einen vorbereiteten Gelträger (GIBCO, KARLSRUHE) gegossen. Nach Polymerisierung der Polysaccharidlösung wurden die mit Probenpuffer [0,25% Bromphenolblau (SIGMA, ST. LOUIS, USA) 0,25% Xylenxyanol FF, 0,25% Orange G, 40% Sucrose (SIGMA, ST. LOUIS, USA), 1 mM EDTA (MERCK, DARMSTADT) in H₂O dest.] versetzten DNA-Proben in die Geltaschen geladen und

in der Elektrophoresekammer (GIBCO, KARLSRUHE) mit 40 bis 100 V aufgetrennt. Als Puffer diente 1x TAE.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf einer UV-Lichtplatte ($\lambda=260 - 360$ nm) analysiert und mit dem Videosystem fotografiert.

1.3 Reinigung von Nukleinsäuren

Die Gel-Extraktion bzw. Reinigung von DNA-Fragmenten wurde nach der QiaEx-Methode (QIAGEN, HILDEN) durchgeführt.

1.4 Restriktionsspaltung von DNA

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen kann doppelstängige DNA spezifisch geschnitten werden.

In der vorliegenden Arbeit verwendete Restriktionsenzyme:

Restriktionsenzym	Schnittstellen	Puffer	Inkubationsbedingungen
Bam HI	GGA TCC	2 x OPA	1 h, 37 °C
BglII	AGA TCT	2 x OPA	1 h, 37 °C
NcoI	CCA TGG	2 x OPA	2 h, 37 °C

Zur Ermittlung der Konzentration eines Restriktionsenzym gilt als Berechnungsgrundlage: Eine Einheit (U) eines Restriktionsenzym schneidet 1 μ g Lambda-DNA bei einer Temperatur von 37 °C in einer Stunde vollständig.

Ein analytischer Restriktionsverdau erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 15 μ l über etwa eine Stunde. Als Puffer diente OPA (One Phor All), das heißt, der vom Hersteller zur Verfügung gestellte Puffer.

1.5 Dephosphorylierung von 5'-Enden der Expressionsvektoren (Plasmide)

Plasmide sind zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle, die sich unabhängig vom Genom vermehren können. Zur Ausstattung eines Plasmids gehören eine Klonierungsstelle (*MCS = multiple cloning site*) um fremde DNA in das Plasmid einschleusen zu können, eine Stelle zum Replikationsstart (*ori = origin of replication*), Selektionsgen(e) und ein Promoter zur Expression der eingeschleusten DNA.

Um bei der Ligation der zu klonierenden Insert-DNA eine Selbstligation des Vektors zu vermeiden, können mit Hilfe einer Phosphatase die 5'-Phosphatgruppen abgespalten werden.

1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 ermöglicht Verbindung von DNA-Molekülen mit kompatiblen kohäsiven Enden, indem sie die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 3'-Hydroxyl und 5'-Phosphat-Enden der DNA katalysiert (WEISS et al., 1968).

Dazu wurden etwa 100 ng Vektor-DNA zusammen mit etwa dreifach molarem Überschuss des zu klonierenden Restriktionsfragmentes über Nacht mit 1 U T4-DNA-Ligase (BOEHRINGER, MANNHEIM) in einem Reaktionsvolumen von 10 – 20 µl bei 10 – 16 °C in Ligase-Puffer (BOEHRINGER, MANNHEIM) inkubiert.

1.7 Transformation von kompetenten Bakterien

Als Transformation wird die Aufnahme löslicher DNA bzw. die Einführung rekombinanter Plasmid-DNA in Bakterien bezeichnet.

100 µl kompetente Bakterien des Stammes E.coli BL21(DE3) (NOVAGEN, SCHWALBACH) wurden in einem gekühlten Polypropylen-Röhrchen mit 5 µl des

Ligationsansatzes vorsichtig durchmischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem einminütigen Hitzeschock bei 42 °C zur Ausbildung der Selektionsmarker erfolgte die Zugabe von 500 µl SOC-Medium [20 g Bacto-Trypton-NaOH (pH 7,0), 5 g Bacto-Hefe-Extrakt (beide DIFCO, DETROIT, USA), 590 mg NaCl, 190 mg KCl, je 1000 ml H₂O dest.; nach dem Autoklavieren 10 ml MgCl₂-Lösung, 10 ml Glukose hinzufügen, sterilfiltrieren]. Um Resistenz zu bilden, wurde die Bakteriensuspension eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm inkubiert und anschließend unter Selektionsbedingungen auf einer vorgewärmten LB-Agarplatte [10 g Trypton, 5 g Yeastextract, 10 g NaCl, 15 g Agar (DIFCO, DETROIT, USA) je Liter H₂O dest., 1:1000 Ampicillin (RATIOPHARM, ULM)] ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C gelagert.

Durch das Anfertigen von Glycerolstocks ist es möglich, einzelne native Bakterien, aber auch Bakterientransfektanten, die ein bestimmtes Insert enthalten, über mehrere Jahre zu lagern. Hierzu wurde ein Aliquot einer frischen Bakterienkultur mit 40 Vol% Glycerol versetzt und dann bei minus 80 °C gelagert.

1.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli

Die Präparation von Plasmid-DNA (BIRNBOIM & DOLY 1979) erfolgte durch Lyse der Zellen nach der TENS-Methode.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Mini) wurden 2 ml Bakterienkultur LB-Medium [10 g Trypton, 5 g Yeast-Extract (beide DIFCO, DETROIT, USA), 10 g NaCl] mit 1:1000 Carbenicillin (NOVAGEN, SCHWALBACH) über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. 1,5 ml der Übernachtskultur wurden 20 Sekunden bei 15.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgossen und das Pellet in etwa 50–100 µl des restlichen Überstands resuspendiert. Danach wurden 300 µl TENS-Puffer [1x TE, 0,1 M NaOH, 0,5% SDS ad 100 ml H₂O dest.) und 150 µl 3 M NaOAc pH 5,2 hinzugegeben, die Suspension leicht geschüttelt und anschließend 4 Minuten bei 15.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, indem die DNA enthalten ist, wurde in ein neues 2 ml-Röhrchen (EPPENDORF, HAMBURG) überführt, mit 1 ml 95% EtOH (MERCK, DARMSTADT) gefällt und 5 Minuten bei

15.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet in 75% EtOH (MERCK, DARMSTADT) durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 15.000 rpm gewaschen, luftgetrocknet und in 10 µl H₂O + RNase resuspendiert. Nach entsprechendem Restriktionsverdau und Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde die Klonierung überprüft.

2. Proteinbiochemische Methoden

2.1 Prokaryontische Expression und Reinigung des Immunzytokins

2.1.1 Prokaryontische Expression und Präparation des löslichen Immunzytokins

Der bakterielle Expressionsvektor pET-25b(+) (NOVAGEN, SCHWALBACH) ermöglicht unter geeigneten Bedingungen die Sekretion von Antikörpern in den periplasmatischen Raum und in den Bakterienüberstand. Durch die pE1B-Signal-Sequenz wird das Fusionsprotein in das Periplasma sezerniert und kann aus diesem als lösliches Protein isoliert werden. Die Expression und Präparation des löslichen Immunzytokins folgte weitgehend den Angaben von Barth (BARTH et al., 2000).

Je eine Kolonie E. coli des Stammes BL21(DE3) wurde nach Transformation mit dem Plasmid pET zur Expression des Single-Chain-Antikörpers anti-FAP-TNF in 50 ml Terrific Broth Medium [TB-Medium mit 12 g Tryptone, 24 g Yeastextract, 4 ml Glycerol 87% (MERCK, DARMSTADT) und 1:1000 Carbenicillin (NOVAGEN, SCHWALBACH) je Liter H₂O dest.] nach Zusatz von 50 µl ZnCl₂ (1M), 850 µl K₂H₂PO₄ (1M), 1,7 ml K₂HPO₄ (1M) (alle MERCK, DARMSTADT) über Nacht bei 30 °C und ca. 220 rpm inkubiert. Die Übernachtskultur wurde im Verhältnis 1:20 ausgedünnt und in ein Volumen von 200 ml TB-Medium mit 200 µl ZnCl₂ (1M), 3,4 ml K₂HPO₄ (1M), 14,4 ml K₂H₂PO₄ (1M) und 1:1000 Carbenicillin überimpft und bei 30 °C und ca. 220 rpm bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,6 – 1,0 inkubiert. Nach Zugabe eines hochosmolaren Salzgemisches von 8 g NaCl, 18 g Sorbitol (SIGMA, DEISENHOFEN) und 0,3 g Betaine (SIGMA, DEISENHOFEN) je 200 ml Kultur wurden die Bakterien in ihrer logarithmischen Wachstumsphase mit 1 mM IPTG induziert und weitere 15 Stunden bei 30 °C mit ca. 150 rpm inkubiert. Danach

wurde die Bakterienkultur zur Proteinpräparation 10 Minuten bei Raumtemperatur und 4.000 rpm zentrifugiert und das Bakteriensediment 20 Minuten in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Wiederauftauen erfolgte die Resuspension des Pellets in 1,5 ml Lyse-Puffer je Gramm Pellet. Der Lyse-Puffer enthielt 75 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20% Sorbitol (SIGMA, DEISENHOFEN) und eine Tablette EDTA-freie Proteinaseinhibitoren (ROCHE, MANNHEIM) je 50 ml Lysepuffer. Das Gemisch wurde anschließend in 20 ml-Fraktionen mittels Sonicator (BRANSON SONIFIER B15, DANBURY, USA) für 4 mal 30 Sekunden bei Pulseinstellung mit 50% Duty bei Stufe 5 aufgeschlossen. Die Spheroplasten-Abtrennung erfolgte durch 45-minütiges Zentrifugieren mit 12.000 rpm bei 4 °C. Anschließend wurde das Bakterienlysat im Volumen 1:3 mit Elutions-Puffer (75 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10% Glycerol in H₂O) verdünnt und mit einer Porengröße von 2 µm steril filtriert und wie unter 2.1.3 beschrieben weiter säulenchromatographisch gereinigt.

2.1.2 Prokaryontische Expression und Präparation der periplasmatischen Einschlusskörper zur Proteinextraktion

Je eine Kolonie E. coli des Stammes BL21(DE3) (NOVAGEN, SCHWALBACH) wurde nach Transformation mit dem Plasmid pET-25(+) (NOVAGEN, SCHWALBACH) zur Expression des Single-Chain-Antikörpers anti-FAPscFv-TNF über Nacht bei 37 °C und ca. 220 rpm in 30 ml mit 1:1000 Carbenicillin-haltigem (NOVAGEN, SCHWALBACH) LB-Medium inkubiert. Die Übernachtskultur wurde in ein Volumen von 500 ml LB-Medium mit 1:1000 Carbenicillin überimpft und bei 30 °C und ca. 220 rpm bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ von 0,6 – 1,0 inkubiert. In der logarithmischen Wachstumsphase wurde zur Induktion 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosidase, ROTH, KARLSRUHE) hinzugefügt und die Bakterienkultur weitere 20 Stunden bei 30 °C mit ca. 150 rpm inkubiert.

Zur Proteinextraktion bzw. zur Präparation der periplasmatischen Einschlusskörper wurde die Bakterienkultur danach 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 4.000 rpm zentrifugiert und das gewonnene Bakteriensediment gewogen. Pro Gramm Pellet wurden 5 ml BugBuster Protein Extraction Reagent (NOVAGEN, SCHWALBACH) eingesetzt. Nach vollständiger Resuspension wurde pro ml eingesetztem BugBuster

Reagens 1 µl Benzonase hinzugefügt und die Suspension anschließend bei Raumtemperatur 20 Minuten langsam geschüttelt. Die lösliche Fraktion erhielt man durch zwanzigminütiges Zentrifugieren der Suspension mit 8.000 rpm bei 4 °C.

Zur Präparation der periplasmatischen Einschlusskörper wurde das Pellet erneut in gleichem Volumen BugBuster Reagens resuspendiert und mit Lysozym (BOEHRINGER, MANNHEIM) in einer Endkonzentration von 200 µg/ml versetzt, vollständig resuspendiert und danach 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 6 Volumina 1:10 verdünntes BugBuster Reagens (in H₂O dest.) hinzugegeben, die Suspension durch einminütiges Vortexen vollständig resuspendiert und anschließend bei 8.000 rpm und 4 °C 15 Minuten zentrifugiert. Die beiden letzten Arbeitsschritte wurden zweimal wiederholt, das Pellet in 2 ml 8 M Urea [8 M Urea, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl je Liter H₂O (pH 8,0), 1% Triton X] aufgenommen und daraufhin mindestens 30 Minuten bei minus 70 °C gefroren. Nach dem Auftauen wurde die Suspension mittels Sonicator (BRANSON SONIFIER B15, DANBURY, USA) für 4 mal 30 Sekunden bei Pulseinstellung mit 50% Duty bei Stufe 5 aufgeschlossen und anschließend 45 Minuten mit 12.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert.

Das gewonnene Lysat wurde steril filtriert und mittels Affinitätschromatographie wie unter 2.1.3 beschrieben gereinigt. Die im Western-Blot positiven Elutionsfraktionen wurden gepoolt, gegen PBS dialysiert und mittels Separationsfilter Centriscin (MILLIPORE, ESCHBACH) auf ein Volumen von etwa einem Milliliter konzentriert.

2.1.3 Chromatographische Reinigung des Immunzytokins

Zur Präparation der Reinigungssäulen wurden 20 ml Chromatographiesäulen (BIORAD, MÜNCHEN) mit 2 ml Talon-Resin-Kobaltmatrix (CLONTECH; HEIDELBERG), einer Metallaffinitätsmatrix zur Chromatographie beladen und mit ca. 20 Säulenvolumina Elutions-Puffer äquilibriert. Es wurden zwei unterschiedliche Puffer-Systeme verwendet: 75 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10% Glycerol in H₂O zur Reinigung des löslichen Proteins, 8 M Urea zur Reinigung des aus den zytoplasmatischen Einschlusskörpern isolierten Proteins.

Zur Proteinreinigung wurden die äquilibrierten Talonsäulen ein- bis zweimal mit dem verdünnten Bakterienlysat beladen. Bei Tropfgeschwindigkeit wurden die Proteine über ihre His-Erkennungssequenz an die Resin-Kobaltmatrix gebunden. Es folgten zwei Waschschrte mit zunächst 10 Säulenvolumina Elutions-Puffer und 10 Säulenvolumina Elutions-Puffer mit 10 mM Imidazol (MERCK, DARMSTADT). Die Elution der Proteine von der Talon-Resin-Kobaltmatrix wurde mit 5 ml Elutions-Puffer mit 200 mM Imidazol durchgeführt, wobei jeweils Ein-Milliliter-Fractionen zur Erstellung eines Elutionsprofils aufgefangen wurden.

Zum Nachweis des Proteins im Coomassie-Brillant Blue Gel oder im Western-Blot wurden bei jedem Arbeitsschritt der Proteingewinnung Proben entnommen: Je 500 µl Bakterienkultur vor und nach Induktion als Pellet (15000 rpm, 1 Minute) und 15 µl von Lysat, Säulendurchfluss, Waschschrte, 5 Elutionsfraktionen.

Die im Western-Blot positiven Elutionsfraktionen wurden gepoolt, gegen PBS dialysiert und mittels Separationsfilter Centrspin (MILLIPORE, ESCHBACH) auf ein Volumen von etwa einem Milliliter konzentriert.

Zur Dialyse des Antikörpers wurden Spectra/Por® Schläuche (ROTH, KARLSRUHE) mit einer Permeabilität von 12 bis 14 kDa eingesetzt. Die trockenen Dialysemembranen wurden ein bis zwei Stunden in mehreren Litern H₂O dest. eingeweicht und anschließend bei 4 °C mit 0,1% Natriumazid aufbewahrt.

2.2 Analyse und Charakterisierung des Immunzytokins

2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Mit dem „Bio Rad Protein Assay“ (BIORAD, MÜNCHEN) wurden die Konzentrationen der exprimierten und gereinigten Antikörper-Proben bestimmt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird die Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung durch Proteinbindung von 465 nm auf 595 nm ausgenutzt (BRADFORD, 1976). Gemäß den Angaben des Herstellers wurden 800 µl der Proteinlösung in verschiedenen

Verdünnungen mit 200 µl des Bradford-Reagens versetzt und gut vermischt. Nach 5 bis 10 Minuten konnte die Extinktion bei 595 nm gemessen werden. Mithilfe des mitgelieferten Proteinstandards (BSA, 1 mg/ml) wurde die Eichkurve erstellt.

2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld folgte den Angaben von Laemmli (LAEMMLI, 1970). Voraussetzung sind dabei Bedingungen, unter denen Linearisierung und Dissoziation der Proteine in die einzelnen Polypeptide gewährleistet sind. Nach Hitzdenaturierung (95 °C, 5 Minuten) und Verwendung reduzierender Agenzien (β-Mercaptoethanol) binden die denaturierten Polypeptide das anionische Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat). Da die Menge des gebundenen SDS proportional zum Molekulargewicht des entsprechenden Polypeptids ist (SHAPIRO et al., 1967), wandern die SDS-Polypeptidkomplexe in Abhängigkeit von der Größe des Polypeptids unterschiedlich weit im Polyacrylamidgel Richtung Anode, so dass eine Auftrennung der unterschiedlichen Polypeptide möglich wird. Die Verwendung von Zwei-Phasen-Gelen mit Konzentrierung und Ausrichtung aller SDS-Polypeptidkomplexe in einem möglichst kleinen Volumen im oberen Gelabschnitt (stacking gel) und Auftrennung im unteren Abschnitt erhöht die Auflösung der Proteingele (KING & LAEMMLI, 1971). Zur Analyse der Bakterienlysate sowie der Protein-Proben wurden diese mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:5 versetzt [10% (w/v) SDS, 250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 500 mM Dithiothreitol, 0,5% Bromphenol-Blau, 50% Glycerol], 5 Minuten bei 95 °C unter reduzierenden Bedingungen (2 µl Mercaptoethanol, MERCK, DARMSTADT) denaturiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach Standardprotokoll gegossen; die Acrylamidkonzentration betrug für das Sammelgel 5%, für das Trenngel 12%. Als Gelkammer diente die eine Vertikal-Gelkammer (Mini 2-D Cell, BIORAD, MÜNCHEN). Als Puffersystem wurde das diskontinuierliche Laemmli-System (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% SDS) verwendet. Die Proteine wurden im 12% SDS-PAGE-Gel in Laemmli-Puffer elektrophoretisch bei 200 V 30 bis 45 Minuten getrennt.

Zur Proteinfärbung wurde das Polyacrylamidgel entweder für einen Western-Blot vorbereitet oder 1 bis 2 Stunden mit Coomassie-Brilliant-Blue [1 g Coomassie Brilliant Blue R250 (SERVA, HEIDELBERG) in 450 ml Methanol, 450 ml H₂O und 100 ml Eisessig] gefärbt (FAIRBANKS et al., 1971), anschließend der nicht Protein-gebundene Farbstoff mit Entfärberlösung (100 ml Methanol, 100 ml Eisessig, 800 ml H₂O) entfernt und das Proteingel auf 3MM Whatman Papier (WHATMAN INTERNATIONAL LTD., MAIDSTONE, ENGLAND) in einer Gelkammer (BIORAD, MÜNCHEN) 30 Minuten bei 80 °C getrocknet.

2.2.3 Western-Blot-Analyse

Eine Western-Blot-Analyse wird zum spezifischen indirekten Nachweis der im Trenngel fraktionierten Proteine durchgeführt (TOWBIN et al., 1979).

Dazu wurde das Gel nach elektrophoretischer Trennung auf eine mit Blot-Puffer [39 mM Glycin, 48 mM Tris Base, 0,037% SDS, 20% Methanol (pH 8,3)] befeuchtete Nitrozellulosemembran (BIORAD, MÜNCHEN) transferiert und luftblasenfrei zwischen zwei Lagen mit je 2 Whatman 3MM Chromatographie Filtern (WHATMAN INTERNATIONAL LTD., MAIDSTONE, ENGLAND) gelegt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte in einer Blotkammer (Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell, BIORAD, MÜNCHEN) über 30 Minuten bei 20 – 21 V und 300–350 mA. Anschließend wurden die Proteine auf der Nitrozellulosemembran mit Ponceau-S-Lösung (SIGMA, DEISENHOFEN) reversibel angefärbt, die Markerbanden (10 kDa Ladder, GIBCO, KARLSRUHE) wurden gekennzeichnet. Nach Entfärbung des Blots im Wasch-Puffer TBS [50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X, SIGMA, DEISENHOFEN] und Absättigung der Membran mit Block-Puffer (TBS mit 10% Magermilchpulver) über Nacht bei 4 °C und anschließendem Waschen der Membran in TBS folgte eine Immunfärbung mit Antikörpern. Dazu wurde die Membran zunächst mit dem Erstantikörper (anti-HSV-Antikörper, NOVAGEN, SCHWALBACH) im Verhältnis 1:5000 in TBS 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der primäre Antikörper mit einem sekundären, polyklonalen Peroxidase gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörper

(BIORAD, MÜNCHEN) im Verhältnis 1:3000 in TBS markiert und nach dem Protokoll des ECL-Kit (AMERSHAM, BRAUNSCHWEIG) entwickelt.

3. ELISA (enzym linked immunosorbent assay)

Der ELISA ist ein Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest. Hierbei kann die direkte Bindung von Antikörpern an Antigene mittels einer enzymatischen Reaktion nachgewiesen werden, wobei ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umgewandelt wird und spektromerisch gemessen werden kann.

Zur Durchführung eines ELISA wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte (NUNC, WIESBADEN) mit rekombinantem anti-anti-FAPscFv in 50 µl Coating-Puffer/Well (10 mM Na₂CO₃, 10 mM NaHCO₃ in H₂O dest.) bei 4 °C über Nacht beschichtet. Nach mehrmaligem Waschen der ELISA-Platte mit PBS (50 mM Na₂HPO₄, 140 M NaCl (pH 6,9 – 7,0) mit 1% Triton X, SIGMA, DEISENHOFEN) wurden die freien Bindungsstellen mit 100 µl 1,5% Gelatine in PBS eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Nachdem die Platte erneut mehrmals gewaschen wurde, folgte die Inkubation mit dem rekombinanten Testprotein anti-FAPscFv-TNF. Pro Well wurden 50 µl des gereinigten Proteins in PBS 1:2 verdünnt als Zweifachbestimmungen in den Titrationsstufen 1:2 bis 1:256 eingesetzt und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei diente anti-FAP-IgG1-TNF aus CHO- (Chinese Hamster Ovary-) Zellen als Positivkontrolle, der Single-Chain-Antikörper anti-FAP als Negativkontrolle. Es folgten mehrere Waschschrte und die Inkubation der Platte mit dem Primärantikörper anti-TNF (SEROTEC, DUESSELDORF) 1:500 in PBS. Als Sekundärantikörper wurde anti-Kaninchen-Biotin (DIANOVA, HAMBURG) 1:2000 in PBS eingesetzt. Die Inkubation der Platte erfolgte jeweils über 1 Stunde. Zur hochaffinen Detektion von Biotin wurde 1:50000 Streptavidin-Peroxidase (BOEHRINGER, MANNHEIM) für 30 Minuten zugegeben. Zum Nachweis der Streptavidin-Peroxidase wurde die Platte etwa 10 Minuten mit Entwicklerlösung mit einer Tablette 0-Phenylendiamin (SIGMA, DEISENHOFEN) je 10 ml Lösung inkubiert. Die Reaktion wurde mit 3 M HCl gestoppt und im Elisareader (DYNATECH MR 4000) gemessen.

4. Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine fluoreszenzabhängige, multiparametrische Analyse von vitalen Zellen in Suspension. In einem optischen System werden Streulicht- und Fluoreszenzsignale von Partikeln analysiert. Es besteht die Möglichkeit, gleichzeitig bis zu fünf verschiedene physikalische und biochemische Parameter einer einzelnen Zelle zu bestimmen. Die Streulichtsignale geben Auskunft über die Größe und Granularität der im Flüssigkeitsstrom fokussierten Zellen. Darüber hinaus können die Zellen durch bis zu drei verschiedene Fluoreszenzmessungen charakterisiert werden. Entsprechend der angewendeten Färbemethode kann die Fluoreszenzmarkierung auf der Zelloberfläche, im Zytosol oder innerhalb des Zellkerns erfolgen. Die zur Zellmarkierung verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich durch einen speziell ausgerichteten Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm anregen. Die spezifischen Emissionssignale werden mittels Photodetektoren und ihnen vorgeschalteten Filtern gemessen, wobei die Filtersysteme nur den für jeden Farbstoff charakteristischen Anteil des Emissionsspektrums passieren lassen. Die optischen Signale werden in elektrische Impulse konvertiert. Dabei entspricht die Höhe der elektrischen Signale der Intensität der detektierten Lichtsignale. Ein Analog/Digitalwandler konvertiert die in Volt gemessenen Signalintensitäten in digitale Daten, die mit der entsprechenden Software des Herstellers (CellQuest™, BECTON & DICKINSON, HEIDELBERG) erfasst und ausgewertet werden können.

In der vorliegenden Arbeit sollte mithilfe der indirekten Immunfluoreszenzmethode gezeigt werden, ob das Immunzytokin anti-FAPscFv-TNF in der Lage ist an das entsprechende Oberflächenantigen FAP auf der murinen Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 zu binden.

Dazu wurden je 1×10^6 Zellen der Zelllinien HT1080^{FAP} und HT1080^{par} zweimal in PBS gewaschen und 20 Minuten bei 4 °C mit 50 µl des gereinigten rekombinanten anti-FAPscFv-TNF inkubiert. Als Positivkontrolle diente anti-FAPscFv, als Negativkontrolle anti-CD3scFv. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in insgesamt 50 µl eines Antikörpergemisches bestehend aus 1:300 anti-c-myc (Eigenherstellung) und 1:1000 anti-HSV resuspendiert und 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin erneut in PBS gewaschen und zuletzt in 1:100

DTAF-markiertem anti-Maus-Antikörper (DIANOVA, HAMBURG) zu den oben genannten Bedingungen inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 500 µl PBS aufgenommen und anschließend im FACScan (BECTON DICKINSON, HEIDELBERG) detektiert und mit der entsprechenden Software des Herstellers (CellQuest™) ausgewertet.

5. Zellkulturmethoden

5.1 Kultivierung der Zelllinien

Alle verwendeten Medien oder Lösungen wurden durch Sterilfiltration oder durch Autoklavieren sterilisiert.

Folgende Zelllinien wurden verwendet: HT1080^{par} (humane Fibrosarkom-Zelllinie, FAP-negativ), HT1080^{FAP} (humane FAP-transfizierte Fibrosarkom-Zelllinie) zur Verfügung gestellt von BOEHRINGER, MANNHEIM und WEHI-164 S (TNF-sensitive murine Fibrosarkom-Zelllinie) und WEHI-164 R (weitgehend TNF-resistente murine Fibrosarkom-Zelllinie).

Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium (GIBCO, KARLSRUHE) unter Zusatz von 10% hitze-inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS, GIBCO, KARLSRUHE), 0,1 mg/ml Penicillin (HOECHST, FRANKFURT A. MAIN) 0,1 mg/ml Steptomycin (BIOCHROM, BERLIN) und 0,3 mg/ml Glutamin (BIOCHROM, BERLIN) als Standardmedium in Zellkulturflaschen (NUNC, WIESBADEN) im Inkubator bei 37 °C in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre und 5%iger CO₂-Begasung kultiviert. Die Kultivierung der FAP-transfizierten HT-Zelllinie erfordert HT Supplement 50 ng/ml G418 100 mM Methotrexat (Mtx). Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen ein- bis zweimal wöchentlich passagiert. Mittels Trypsin/EDTA (PAA Laboratories, LINZ, ÖSTERREICH) wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst und in einer Verdünnung mit frischem Nährmedium im Verhältnis 1:10 neu ausgesät. Zur Bestimmung von Vitalität und Zellzahl wurden die geernteten Zellen mit Trypanblau gemischt, wobei sich avitale Zellen blau verfärben. Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zahl der vitalen Zellen in Suspension errechnet.

5.2 Zytotoxizitätstest mit rhu-TNF auf den Zelllinien WEHI-164 S/WEHI-164 R

Für diesen Zytotoxizitätstest wurden die beiden murinen Fibrosarkom-Zelllinien WEHI-164 R bzw. WEHI-164 S verwendet. Für WEHI-164 S besteht eine TNF-Sensibilität, für WEHI-164 R eine weitgehende Resistenz gegenüber TNF- α (ESPEVIK, 1986).

Dazu wurden für beide Zelllinien 1×10^4 Zellen in 100 μ l Standardmedium pro Well einer 96-Well-Mikrotiter-Platte (NUNC, WIESBADEN) ausgesät. Die Hälfte der Zellen wurde anschließend mit rekombinantem humanem TNF- α (rhu-TNF, GENZYME, NEU-ISENBURG) in einer Konzentration von 3.000 U/ml in den Titrationsstufen 1:2 bis 1:64 als Dreifachbestimmungen inkubiert. Der Anteil der vitalen Zellen wurde nach 24, 48 und 72 Stunden mit EZ4Y (BIOMEDICA, WIEN, ÖSTERREICH) nach den Angaben des Herstellers bei 492 nm gemessen. Die Absorption der unbehandelten Zellen entsprach definitionsgemäß einer 100%igen Vitalität.

5.3 Zytotoxizitätstest mit dem Immunzytokin anti-FAPscFv-TNF auf den Zelllinien WEHI-164 S/WEHI-164 R

Mithilfe dieses Zytotoxizitätstests sollte die Funktionalität des rekombinanten gereinigten Immunzytokins anti-FAPscFv-TNF auf den WEHI-S/-R-Zellen nachgewiesen werden.

Analog ELISA wurden zwei 96-Well-Mikrotiterplatten (NUNC, WIESBADEN) mit rekombinantem anti-anti-FAPscFv in einer Konzentration von 1 μ g/ml in 50 μ l Standardmedium pro Well über Nacht bei 4 °C gecoatet. Nach mehrmaligem Waschen der ELISA-Platte mit PBS wurden die freien Bindungsstellen mit 100 μ l 1,5% Gelatine in PBS eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Danach wurden die Platten erneut dreimal gewaschen. Die Inkubation mit dem rekombinanten Testprotein anti-FAPscFv-TNF erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur über eine Stunde. Pro Well wurden 50 μ l des gereinigten Proteins als Dreifachbestimmungen in den Titrationsstufen 1:2 bis 1:128 eingesetzt. Zuletzt wurden die Zellen (1×10^4 WEHI-R

bzw. WEHI-S) in 100 μ l Standardmedium pro Well nach mehrmaligem Waschen hinzugefügt und im Inkubator bei 37 °C gelagert. Nach 72 Stunden wurde der Anteil der vitalen Zellen mit EZ4Y (BIOMEDICA, WIEN, ÖSTERREICH) nach den Angaben des Herstellers bei 492 nm gemessen und ausgewertet.

III. ERGEBNISSE

1. Gentechnologische Herstellung des Immunzytokins anti-FAPscFv-TNF

Das DNA-Template der variablen Region der leichten und schweren Kette des anti-FAP-Antikörpers wurde von Boehringer Ingelheim zur Verfügung gestellt.

In vorausgegangenen Versuchsreihen unserer Arbeitsgruppe wurde die variable Region der leichten und schweren Kette durch eine Linkersequenz gekoppelt und in den bakteriellen Expressionsvektor pHOG21 kloniert. Die Linkersequenz kodiert für eine Reihe neutraler Aminosäuren, die die Proteinfunktion nicht verändern, jedoch dem Single-Chain-Antikörper die zur Ausbildung der Tertiärstruktur erforderliche Flexibilität verleihen. Die so hergestellte Expressionskassette diente als Grundlage für die anschließende Generierung des in dieser Arbeit verwendeten Immunzytokins.

1.1 Klonierung des anti-FAPscFv in den bakteriellen Expressionsvektor pET-25b(+)

Der in pHOG21 vorliegende anti-FAPscFv wurde durch Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen NcoI/BamHI nach den Angaben des Herstellers spezifisch geschnitten und mittels Elektrophorese im Agarosegel getrennt. Es folgte die Insertion des NcoI/BamHI geschnittenen anti-FAPscFv durch Ligation mittels Ligase-Enzym nach Angaben des Herstellers in den ebenfalls NcoI/BamHI geschnittenen pET-25b(+)-Vektor. Im Bereich des 3'-Endes der multiple cloning site des pET-Vektors befinden sich ein HSV- und ein His6-Tag mit nachfolgendem Stopcodon. Die HSV-Erkennungssequenz dient der späteren Detektion des Proteins, der His6-Tag erlaubt die Reinigung des Proteins über eine Komplexbildung der Histidinreste mit Kobalt-, oder Nickelionen, die an Säulenharz gekoppelt werden.

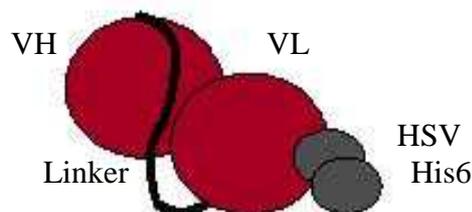
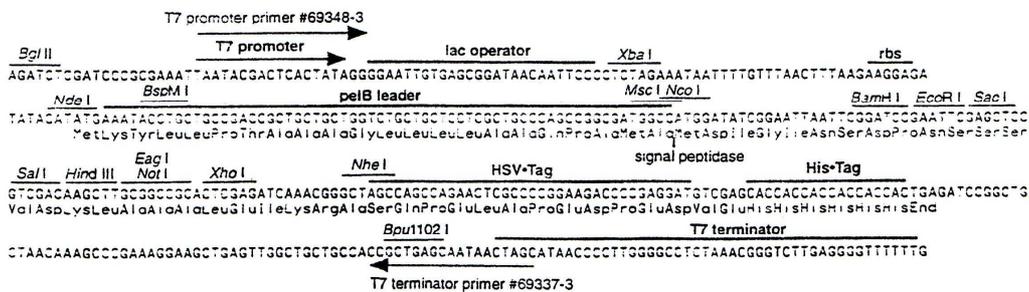
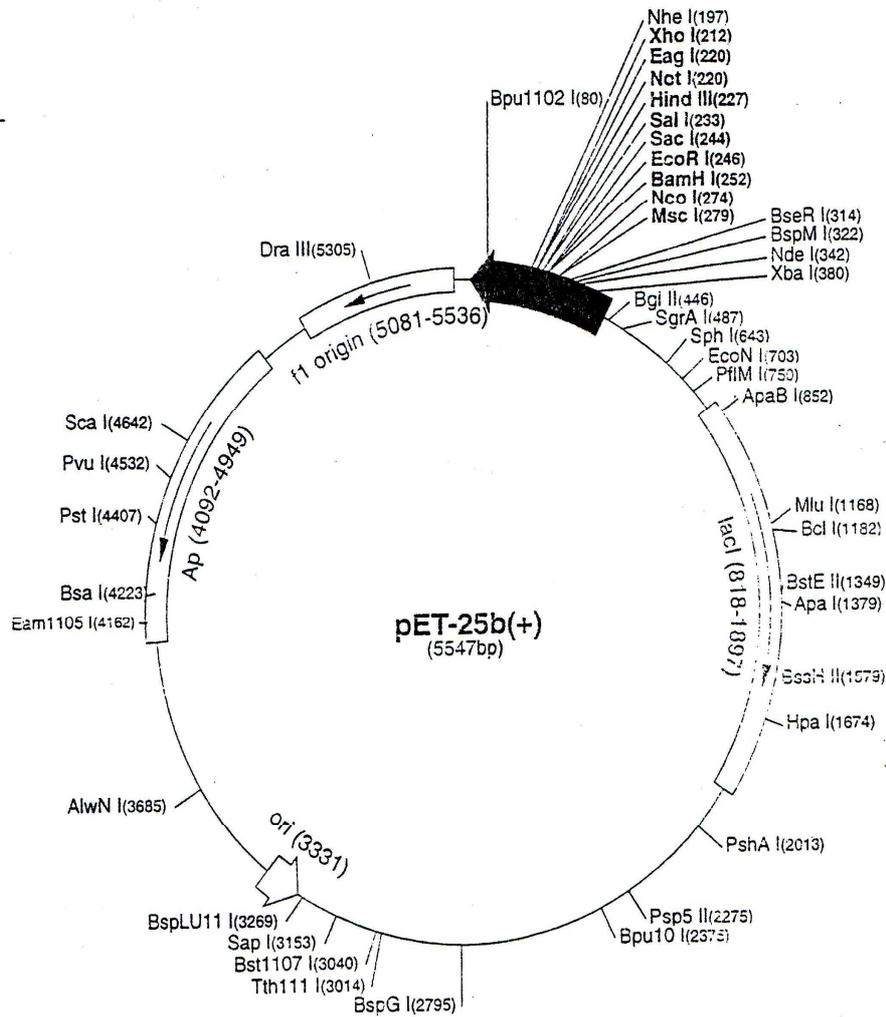


Abb 1.: Schematische Darstellung eines Single-Chain-Antikörpers.



pET-25b(+) cloning/expression region

Abb.2: Schematische Darstellung des pET-25b(+)-Vektors.

1.2 Amplifikation von TNF- α

Humaner Tumor Nekrose Faktor- α wurde mittels PCR aus einer genomischen cDNA-Bank peripherer mononukleärer Zellen amplifiziert. Zur Herstellung der Expressionskassette des Immunzytokins anti-FAPscFv-TNF wurden bereits durch die verwendeten Primer am 5'- bzw. 3'- Ende eine BamHI bzw. BglII-Restriktionsschnittstelle eingefügt.

Primer:

5'-ATCGGATCCGTCTCATCTTCTCGAACCCCGAGTG-3' und

5'-CAGGGCAATGATCCCAAAGTAGAGATCTTTGA-3'

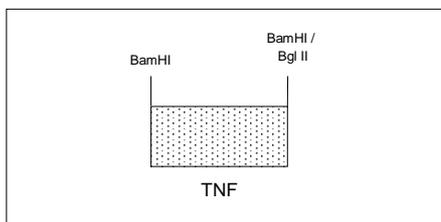


Abb.3: Schematische Darstellung des PCR-Produktes.

1.3 Gentechnologische Herstellung des Immunzytokins anti-FAPscFv-TNF

Zur Fusion des Single-Chain-Antikörpers anti-FAPscFv mit humanem TNF- α wurde im letzten Klonierungsschritt die Expressionskassette pET anti-FAPscFv mit BamHI restringiert und anschließend dephosphoryliert. Der amplifizierte TNF- α wurde BamHI/BglII restringiert und mit der Expressionskassette ligiert.

Die beiden Restriktionsendonukleasen BamHI/BglII sind ligationskompatibel. Nach erfolgreicher Ligation ist die ursprüngliche Restriktionsschnittstelle zerstört und kann weder durch BamHI noch durch BglII restringiert werden. Restriktion und Ligation wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

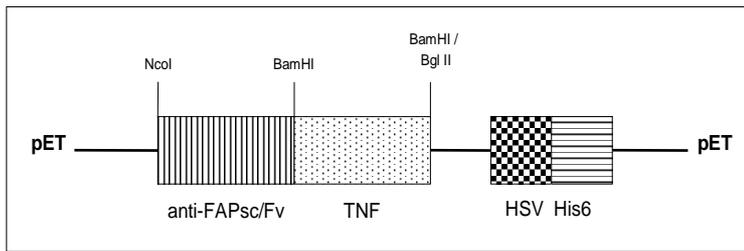


Abb.4: Schematische Darstellung von anti-FAPscFv-TNF in pET-25b(+).

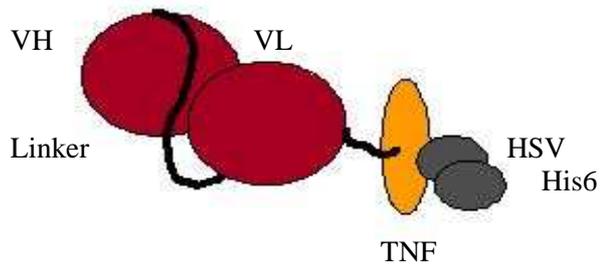


Abb.5: Schematische Darstellung des Immunzytokins anti-FAPscFv-TNF.

2. Expression und Reinigung des Immunzytokins anti-FAPscFv-TNF in pET-25b(+)

2.1 Optimierung der Expressionsbedingungen

Das mittels pET-25b(+)-Vektor in *E. coli* des Stammes BL21 exprimierte Single-Chain-Antikörperkonjugat wird durch die pE1B-Signal-Sequenz in das Periplasma sezerniert und kann aus diesem als lösliches Protein isoliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Variablen Temperatur, Induktionsdauer sowie IPTG-Konzentration entscheidenden Einfluss auf die Menge sezernierten löslichen Proteins in den periplasmatischen Raum haben. Daher wurden für alle genannten Variablen die optimalen Expressionsbedingungen anhand einer Kinetik ermittelt.

2.1.1 Einfluss der Temperatur und der Induktionsdauer

Zur Untersuchung des Einflusses von Temperatur und Dauer der Induktion wurden 2 ml einer Übernachtskultur bei einer optischen Dichte OD_{600} zwischen 0,6 und 1 mit 1,0 mM IPTG unter folgenden Bedingungen induziert:

1	37 °C	4 Stunden
2	37 °C	20 Stunden
3	30 °C	20 Stunden
4	20 °C	20 Stunden

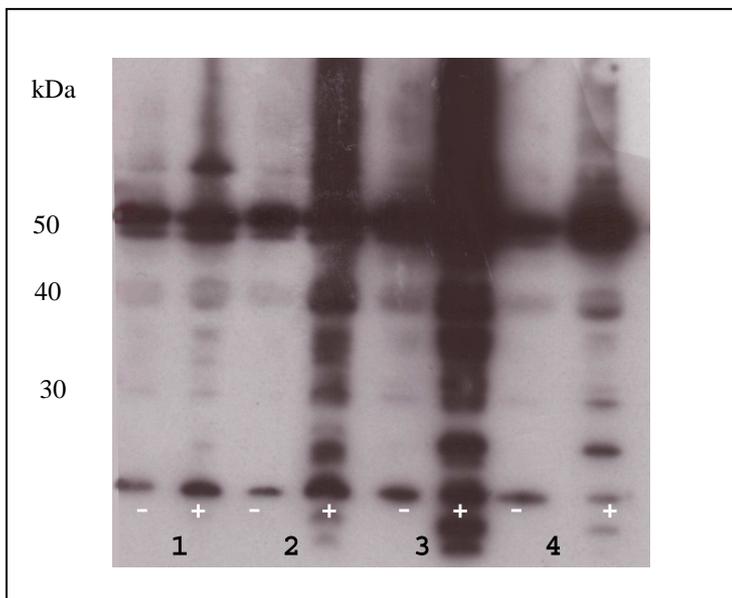


Abb.6: Temperatur- und Zeitkinetik der bakteriellen Expression von anti-FAPscFv-TNF in pET-25b(+). 37 °C/4 h (1), 37 °C/20 h (2), 30 °C/20 h (3), 20 °C/20 h (4).

Die stärkste Proteininduktion- bzw. -expression war bei 30 °C nach 20 Stunden zu erkennen.

2.1.2 Einfluss der IPTG-Konzentration

In einem weiteren Schritt wurden die optimierten Induktionsbedingungen beibehalten und die IPTG-Konzentration variiert. Dazu wurden erneut 2 ml einer Übernachtskultur bei einer OD_{600} zwischen 0,6 und 1 bei 30 °C 20 Stunden mit IPTG-Konzentrationen zwischen 0,1 und 2,0 mM inkubiert.

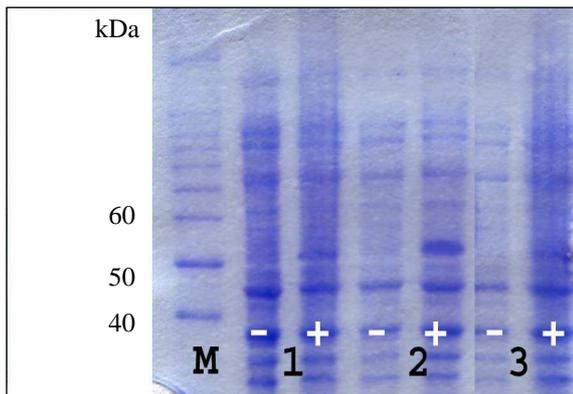


Abb.7: Expression von anti-FAPscFv-TNF in pET-25b(+). IPTG-Konzentrationen von 0,1 mM (1), 1,0 mM (2), 2,0 mM (3).

Zur Reinigung des Antikörperkonjugates im präparativen Maßstab wurde aufgrund dieser Ergebnisse eine IPTG-Konzentration von 1,0 mM gewählt und die Induktion über 20 Stunden bei 30 °C durchgeführt.

2.2 Expression und Reinigung des Immunzytokins anti-FAPscFv-TNF in pET-25b(+) aus Großkulturen

2.2.1 Reinigung des löslichen Immunzytokins anti-FAPscFv-TNF aus dem Periplasma und dem Kulturüberstand von *E. coli* BL21

Zur Durchführung funktioneller *in vitro*-Tests wurden größere Mengen gereinigter Single-Chain-Antikörperkonjugate benötigt. Übernachtskulturen wurden im Verhältnis 1:20 ausgedünnt, in ein Volumen von je 200 ml TB-Medium mit ZnCl₂ (1M), K₂H₂PO₄ (1M), K₂HPO₄ (1M), 1:1000 Carbenicillin überimpft und bei einer optischen Dichte OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 1,0 nach Zugabe eines hochosmolaren Salzgemisches (8 g NaCl, 18 g Sorbitol, 0,3 g Betaine) unter den optimierten Bedingungen induziert. Die Präparation des löslichen Single-Chain-Antikörperkonjugates erfolgte aus dem Periplasma und dem Kulturüberstand von *E. coli* des Stammes BL21. Mittels Talon-Resin-Kobalt-Matrix, einer Metallaffinitäts-Matrix, wurde die chromatographische Reinigung des Fusionsproteins wie in 2.1.3 beschrieben durchgeführt.

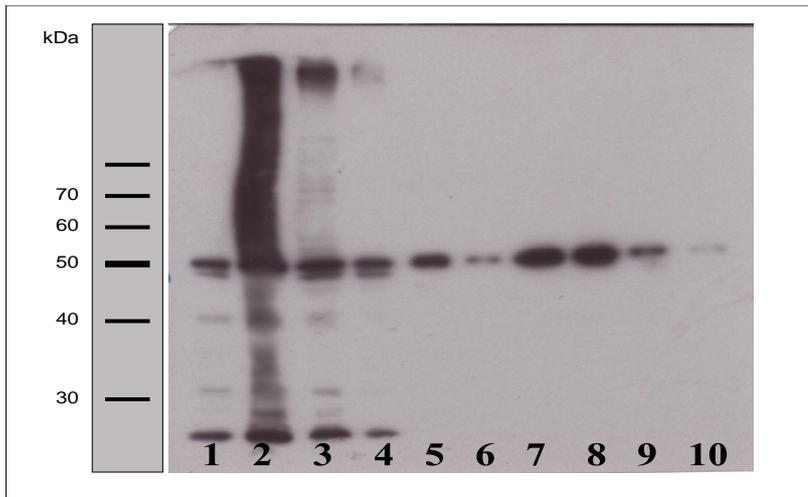


Abb.8: Western-Blot-Analyse der Expression und chromatographischen Reinigung des Immunzytokins anti-FAPscFv-TNF im Periplasma von E. coli BL21(DE3). Bakteriensediment einer nicht induzierten Kultur (1), Bakteriensediment einer mit 1,0 mM IPTG 15 h bei RT induzierten Kultur (2), periplasmatische Fraktion der induzierten Kultur (3), Säulendurchfluß der chromatographischen Reinigung (4) Waschschrift mit 10 mM Imidazol in Elutionspuffer (5), Elutionsfraktionen E1 bis E5 (6-10). Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

Die in der Western-Blot-Analyse positiven Eluate wurden vereinigt und der Elutionspuffer durch Dialyse gegen 1x PBS ausgetauscht. Bei diesem Schritt kam es jedoch häufig zur Präzipitation eines Großteils des löslichen Proteins.

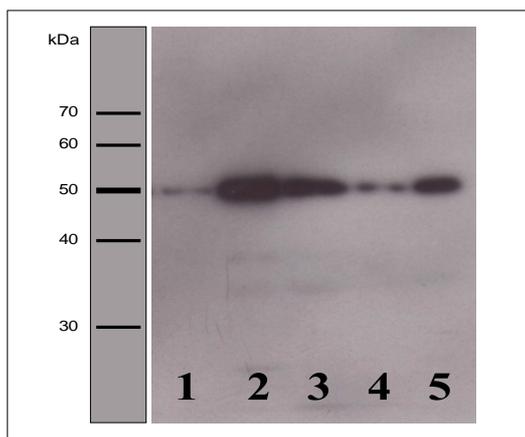


Abb.9: Western-Blot-Analyse des chromatographisch gereinigten löslichen anti-FAPscFv-TNF vor und nach Konzentrierung bzw. Dialyse gegen PBS. Eluate E1 bis E4 (1-4) sowie nach Konzentrierung und Dialyse gegen PBS (5).

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode. Pro Liter Bakterienkultur lag die Proteinkonzentration des gereinigten Fusionsproteins zwischen 50 und 150 µg. Nach Konzentrierung und Dialyse zeigte sich ein deutlicher Proteinverlust. Dies ist größtenteils auf die verminderte Stabilität und

Aggregatbildung des konzentrierten Proteins zurückzuführen. Zur Langzeitaufbewahrung bei minus 80 °C wurden die Proben mit BSA (10 mg/ml) versetzt.

2.2.2 Reinigung des Immunzytokins anti-FAPscFv-TNF aus zytoplasmatischen Einschlusskörpern

Als gramnegatives Bakterium besitzt *E. coli* eine äußere und eine innere Membran. Durch den periplasmatischen Aufschluss bei Präparation der löslichen Antikörperfraktion wird die äußere Bakterienmembran entfernt; zurück bleiben die sogenannten Spheroplasten, die nur noch von der inneren Membran umgeben sind. Eine Analyse des Spheroplastenpellets nach Präparation des Immunzytokins anti-FAPscFv-TNF aus dem Periplasma zeigte, dass ein Großteil des Fusionsproteins in unlöslicher Form in Einschlusskörpern vorlag. Um die Proteinausbeute zu erhöhen, wurde ergänzend eine Präparation aus zytoplasmatischen Einschlusskörpern wie in 2.1.2 beschrieben durchgeführt. Übernachtskulturen von pET anti-FAPscFv-TNF in *E. coli* BL21 wurden in ein Volumen von 500 ml LB-Medium mit 1:1000 Carbenicillin überimpft und die Bakterien durch Zugabe von 1,0 mM IPTG bei einer optischen Dichte OD_{600} von etwa 0,6 unter den optimierten Bedingungen induziert. Die unlöslichen Proteine wurden nach Lyse der Bakterien und Aufschluss der Spheroplasten durch die Talon-Resin-Kobalt-Matrix gereinigt.

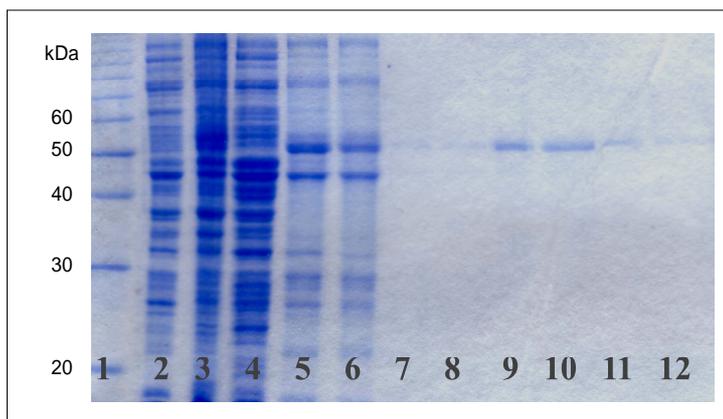


Abb.10: SDS-Page der Expression und Reinigung des Immunzytokins anti-FAPscFv-TNF aus zytoplasmatischen Einschlusskörpern. Marker (1), Bakteriensediment einer nicht induzierten Kultur (2), Bakteriensediment einer mit 1,0 mM IPTG 20 Stunden bei 30 °C induzierten Kultur (3), Lösliche Fraktion (4), zytoplasmatische Einschlusskörper (5), Säulendurchfluß der chromatographischen Reinigung (6), Waschschrift mit 10 mM Imidazol

in Elutionspuffer (7), Elutionsfraktionen E1 bis E5 (8 - 12). Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

Elutionsfraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt und der Elutionspuffer 8 M Urea gegen den physiologischen Puffer 1x PBS ausgetauscht. Danach wurde das vereinigte Eluat mittels Separationsfilter auf ein Volumen von einem Milliliter konzentriert.

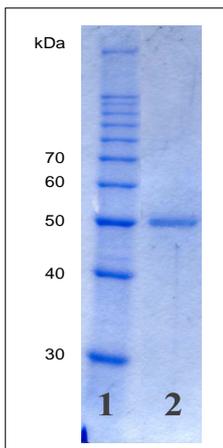


Abb.11: SDS-Page des anti-FAPscFv-TNF nach Präparation und chromatographischer Reinigung der zytoplasmatischen Einschlusskörper. Marker (1), anti-FAPscFv-TNF nach Konzentrierung und Dialyse gegen PBS (2).

Die Konzentration des konzentrierten Proteins wurde mit der Bradford-Methode bestimmt. Die Ausbeute lag zwischen 100 und 200 μg pro Liter Bakterienkultur.

Die Stabilität des aus den zytoplasmatischen Einschlusskörpern gereinigten Proteins war nach Dialyse gegen den physiologischen Puffer 1x PBS und der Konzentrierung deutlich größer als die des löslichen Proteins.

3. Funktionelle Tests *in vitro*

3.1 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Die Spezifität der Bindung des anti-FAPscFv-TNF wurde durchflusszytometrisch untersucht. Die Bindungseigenschaften des Testproteins wurden an zwei unterschiedlichen Zelllinien nach präparativer Reinigung sowohl der löslichen als auch der unlöslichen Antikörperfragmente aufgezeigt:

1. die stabil FAP-transfizierten Zelllinie HT1080^{FAP}
2. die elterliche Zelllinie HT1080^{par}

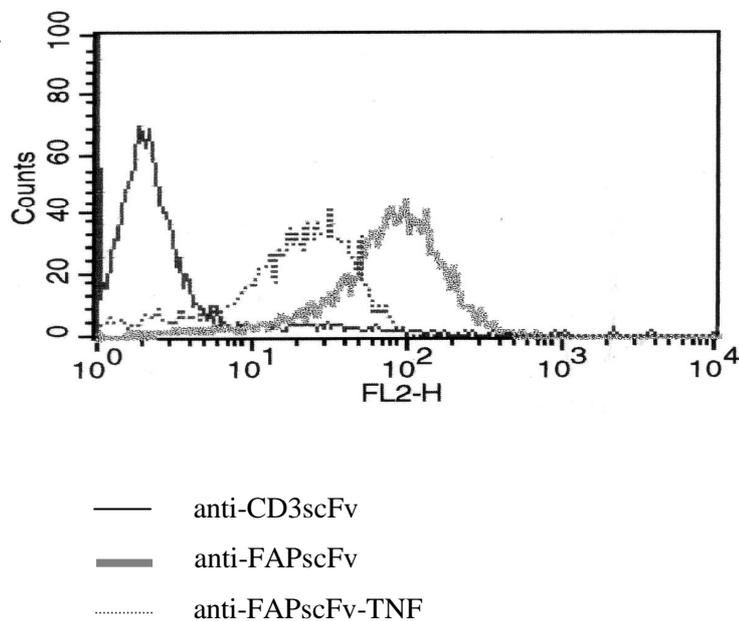


Abb.12: FACS-Analyse von anti-FAP-scFv-TNF auf HT1080^{FAP} nach Expression und Reinigung des löslichen Immunitokins anti-FAPscFv-TNF aus dem Periplasma und dem Bakterienüberstand. Anti-FAPscFv als Positivkontrolle, anti-CD3scFv als Negativkontrolle

Analog der Reinigung des löslichen anti-FAPscFv-TNF wurde das Bindungsverhalten des aus den zytoplasmatischen Einschlusskörpern isolierten und gereinigten Single-Chain-Konjugates untersucht.

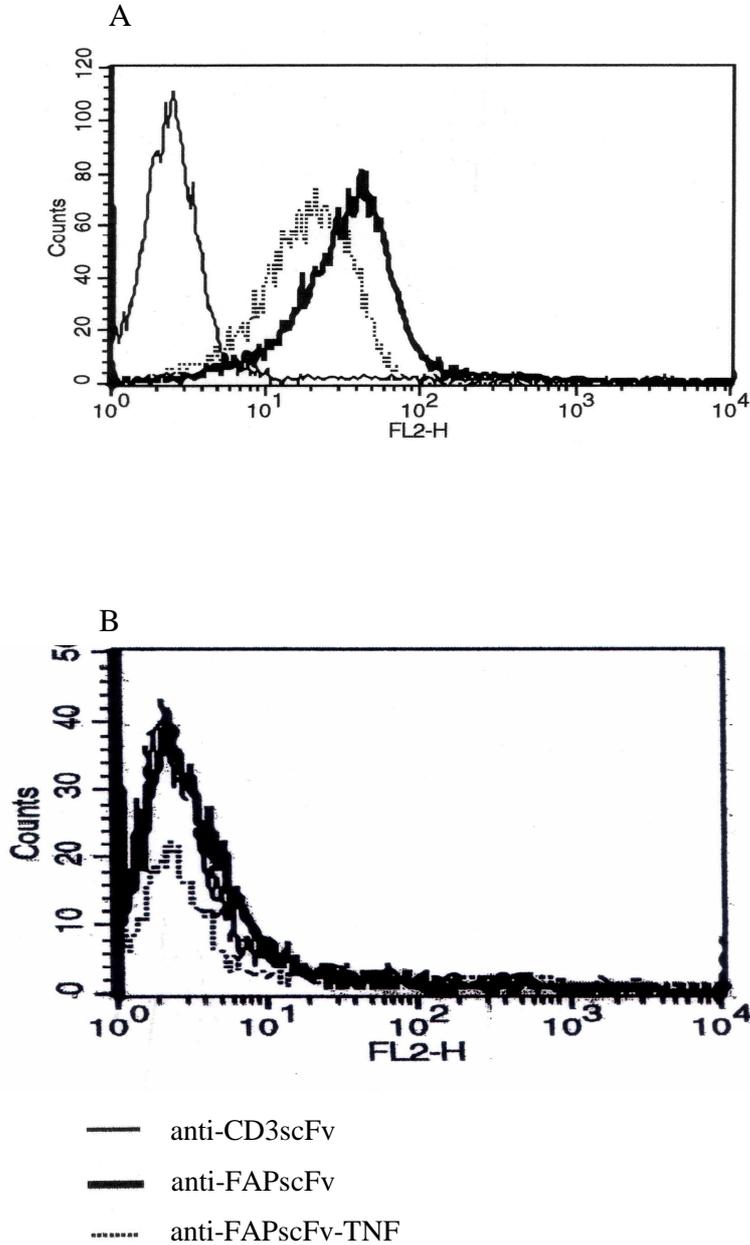


Abb.13: FACS-Analyse von anti-FAPscFv-TNF nach Expression und Reinigung der zytoplasmatischen Einschlusskörper auf HT1080^{FAP} (A) und HT1080^{par} (B). Anti-FAPscFv als Positivkontrolle, anti-CD3scFv als Negativkontrolle.

In beiden Fällen – nach Reinigung des löslichen Proteins aus dem Periplasma und dem Kulturüberstand sowie nach Isolation aus zytoplasmatischen Einschlusskörpern – konnte eine spezifische Bindung des Immunzytokins anti-FAPscFv-TNF auf der FAP-transfizierten Zelllinie HT1080^{FAP} nachgewiesen werden. Auf der FAP-negativen elterlichen Zelllinie HT1080^{par} konnte in beiden Fällen kein spezifisches Bindungsverhalten des Immunzytokins anti-FAPscFv-TNF gezeigt werden.

Da Ausbeute und Stabilität des Testproteins nach Präparation aus zytoplasmatischen Einschlusskörpern größer war als nach Präparation aus Periplasma und Kulturüberstand, wurde im Folgenden die Funktionalität des Immunzytokins nach Isolation und Reinigung aus zytoplasmatischen Einschlusskörpern überprüft.

3.2 ELISA

Mithilfe des ELISA wurden die Bindung und Integrität des Antikörperkonjugates anti-FAPscFv-TNF an den gecoateten anti-FAP-Antiidiotyp nachgewiesen. Die Bindung des Konstruktes erfolgt über den Antikörper-Teil, die Entwicklung über den TNF-Teil. Die Auswertung des ELISAs als Zweifachbestimmung wurde in Titrationsstufen von 1:2 bis 1:256 vorgenommen. Dabei diente der eukaryontisch von CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zellen exprimierte anti-FAP-IgG₁TNF-Antikörper als Positivkontrolle. Es handelt es sich dabei um ein Fusionsprotein aus einem anti-FAP-IgG₁-Antikörper, dessen CH₂- und CH₃-Domäne der schweren Ketten durch ein TNF-Monomer ersetzt wurden. Anti-FAPscFv wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

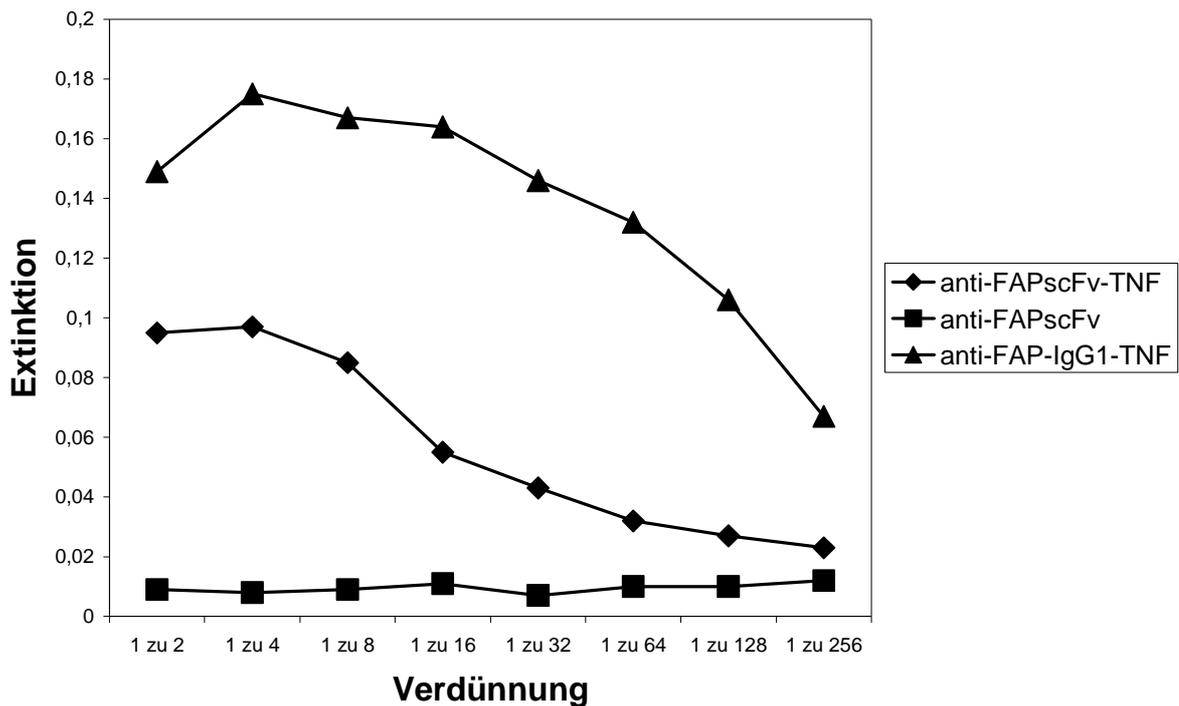


Abb.14: Anti-Idiotyp-ELISA mit anti-FAPscFv-TNF auf anti-FAP-Antiidiotyp.
 Anti-FAPscFv als Negativkontrolle, anti-FAP-IgG₁TNF aus Chinese Hamster Ovary-Zellen als Positivkontrolle.

3.3 *In vitro*-Toxizität

3.3.1 Zytotoxizitätstest mit rhu-TNF- α auf der TNF-sensiblen WEHI-164 S- und der TNF-resistenten WEHI-164 R-Zelllinie

Die TNF-Sensibilität bzw. weitgehende Resistenz der murinen Fibrosarkomzelllinie WEHI-164 S und -R sind bekannt (ESPEVIK et al. 1986, BAUER et al., 2004). Humaner rekombinanter Tumor Nekrose Faktor kann an murinen TNF-Rezeptor-I binden und dadurch nachfolgend Apoptose induzieren. Dieser Zytotoxizitätstest dient als Grundlage zum Vergleich von rhu-TNF- α mit dem hergestellten Immunzytokin anti-FAPscFv-TNF zur Beurteilung der funktionellen Effizienz des Konstruktes.

10^4 Zellen pro Well wurden mit rekombinantem humanem TNF- α (rhu-TNF- α) in einer Konzentration von 3000 U/ml in Titrationsstufen von 1:2 bis 1:64 als Dreifachbestimmungen inkubiert. Der Anteil der vitalen Zellen wurde nach 24, 48 und 72 Stunden ausgewertet. Die Absorption der unbehandelten Zellen entsprach definitionsgemäß einer 100%igen Vitalität. Die maximale Effizienz von rhu-TNF- α

auf WEHI-164 S ergab sich nach einem Zeitraum von 72 Stunden. WEHI-164 R waren zu diesem Zeitpunkt noch weitgehend TNF-resistent.

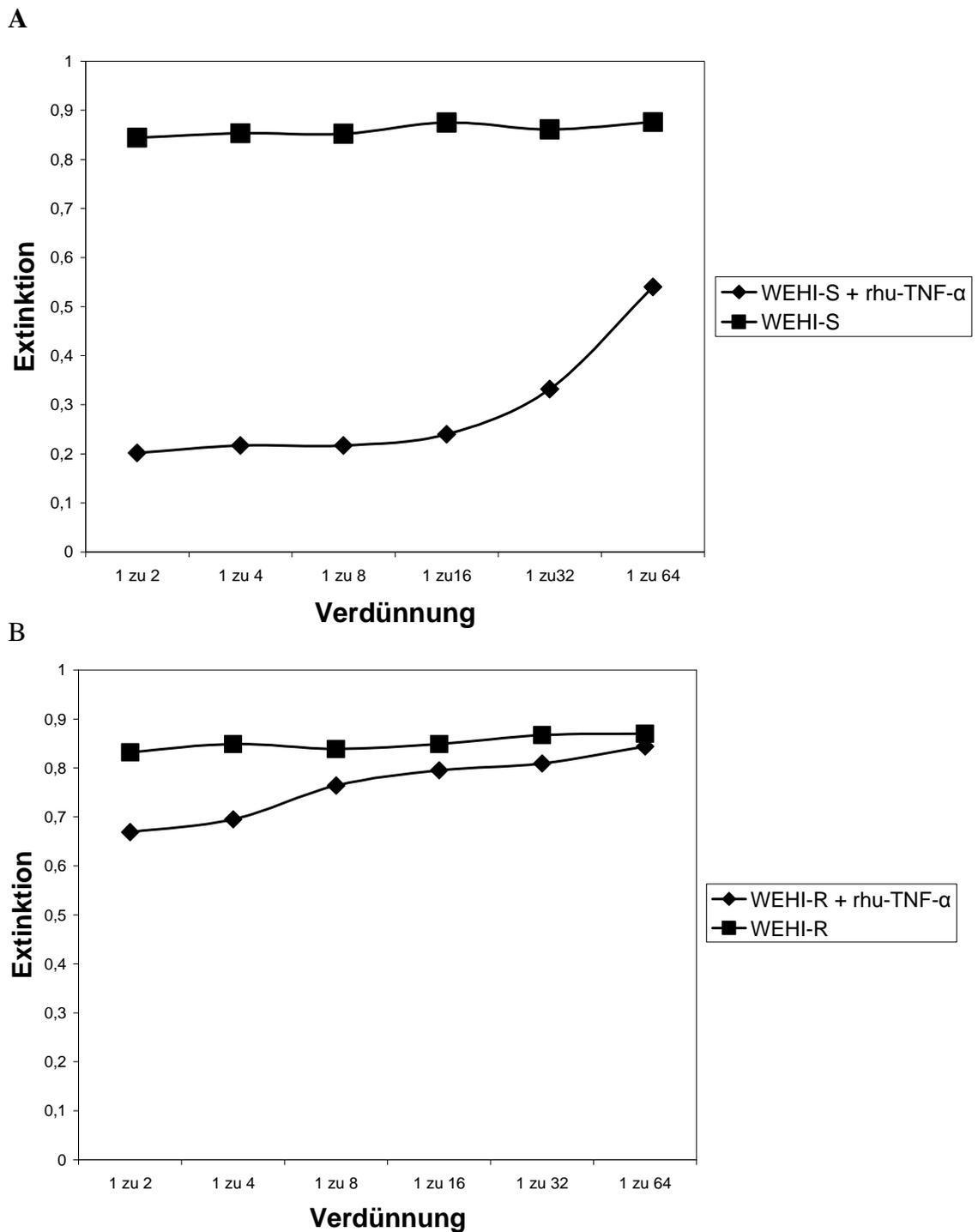


Abb.15: Zytotoxizitätstest rhu-TNF- α auf WEHI-164 S (A) und WEHI-164 R (B).
Auswertung nach 72 Stunden.

3.3.2 Zytotoxizitätstest des Immunzytokins anti-FAPscFv-TNF auf der TNF-sensiblen WEHI-164 S- und der TNF-resistenten WEHI-164 R-Zelllinie

Mithilfe dieses Zytotoxizitätstest sollte die Funktionalität des rekombinanten gereinigten Immunzytokins anti-FAPscFv-TNF auf den WEHI-164 S/-R-Zellen nachgewiesen werden. Pro Well wurden 50 µl des gereinigten Proteins nach Verdünnung in PBS (1:2) in Titrationsstufen von 1:2 bis 1:128 und analog Zytotoxizitätstest mit rhu-TNF- α nach 72 Stunden ausgewertet.

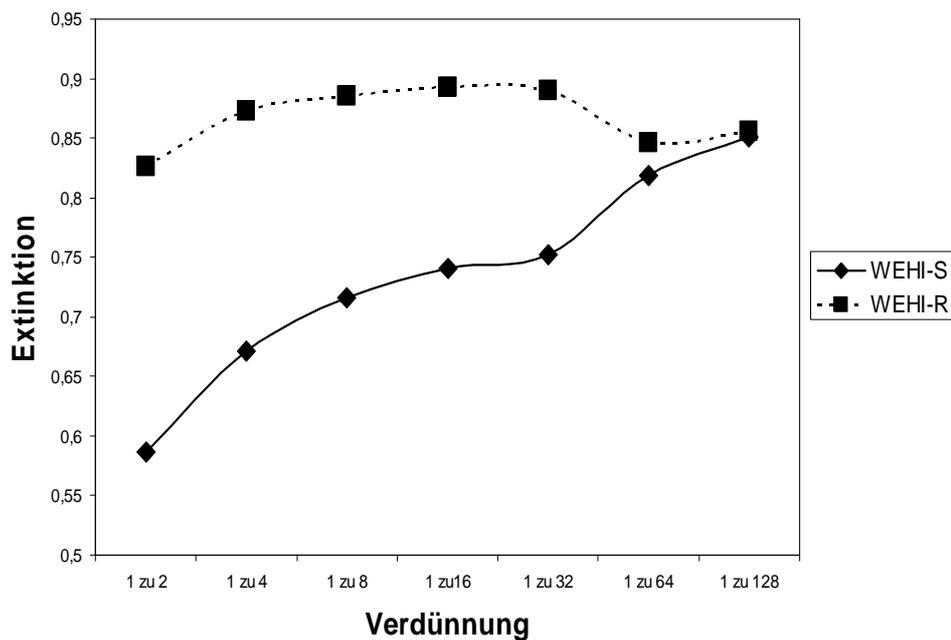


Abb.16: Zytotoxizitätstest anti-FAPscFv-TNF auf WEHI-S und WEHI-R. Auswertung nach 72 Stunden.

Die TNF-Rezeptor-I exprimierenden WEHI-164 S-Zellen zeigten eine konzentrationsabhängige Sensitivität für das Testprotein, während die TNF-Rezeptor-negativen WEHI-164 R-Zellen erwartungsgemäß resistent reagierten.

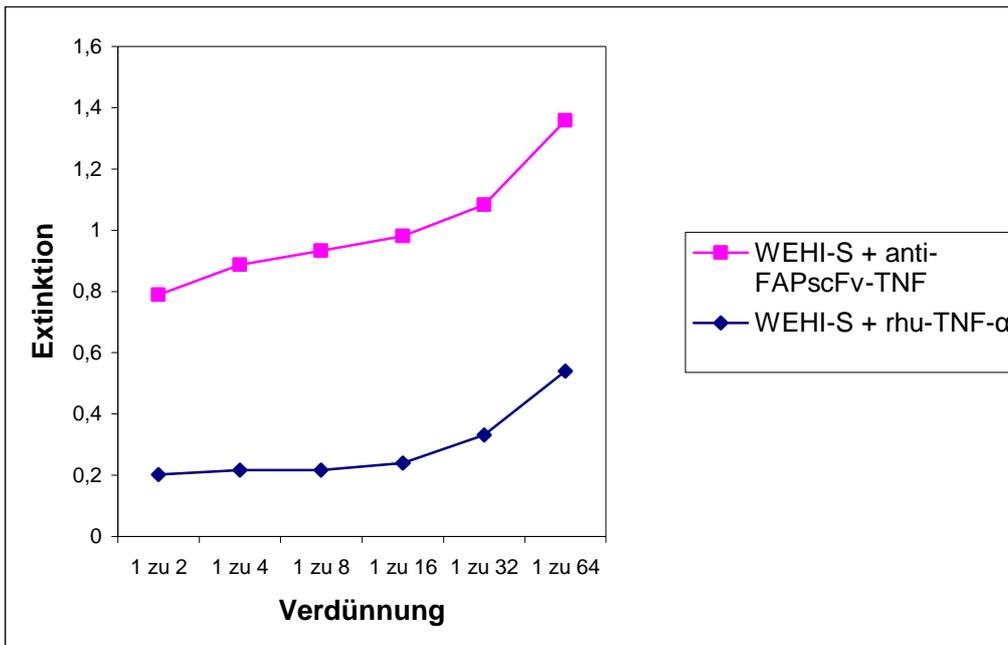


Abb.17: Vergleich von rhu-TNF- α und anti-FAPscFv-TNF auf WEHI-164 S.

Die Apoptoseinduktion zeigte sich erwartungsgemäß konzentrationsabhängig durch rhu-TNF- α wie für anti-FAPscFv-TNF auf den TNF-sensiblen WEHI-164 S-Zellen.

IV. DISKUSSION

Das experimentelle Vorhaben der vorliegenden Arbeit gründete auf der Herstellung eines prokaryontisch exprimierten Immunzytokins mit Spezifität für das im genetisch stabilen Stroma epithelialer Tumoren exprimierte Fibroblasten-Aktivierungsprotein FAP. Gewählt wurde ein etwa 30 kDa großes Single-Chain-Konjugat scFv, welches im Gegensatz zu den korrespondierenden größeren Fab- und IgG-Formen stabiler ist (PANTOLINO et al, 1991) und durch seine höhere Penetranz in Tumoren besser geeignet ist, Effektormoleküle einzuschleusen (MILENIC et al., 1991; YOKOTA et al., 1992). Hierzu wurde der Single-Chain-Antikörper mit dem immuntherapeutisch wirksamen humanen rekombinanten Tumor Nekrose Faktor genetisch fusioniert, dessen therapeutischer Einsatz aufgrund der limitierenden Toxizität des Zytokins (SHERMAN et al., 1988; SPRIGGS et al., 1988) bislang auf die lokale Anwendung im Bereich der isolierten Extremitäten- und Leberperfusion beschränkt ist (LEJEUNE et al., 1998; EGGERMONT et al., 2001). Durch die Fusion mit einem Single-Chain-Konjugat soll die zielgerichtete Applikation im Sinne des Tumortargetings und Entfaltung der zytotoxischen Aktivität in therapeutischer Dosierung erreicht werden. Bisher wurden verschiedene Applikationsformen und Modelle entwickelt, die limitierende Toxizität zu umgehen, die aus der nicht-anti-Tumor-spezifischen Wirkung von TNF resultiert (CORTI et al., 1998; GASPARRI et al., 1999). Versuche, ein Fusionsprotein aus TNF und einem tumor-selektiven Single-Chain-Antikörperfragment (scFv-TNF) herzustellen, zeigten bei verschiedenen Arbeitsgruppen ermutigende Ergebnisse (HOOGENBOOM et al., 1991; YANG et al., 1995, ROSENBLUM et al., 2003).

Prokaryontische Expression und Reinigung des Immunzytokins anti-FAPscFv-TNF

Als Standardmethode zur Produktion großer Mengen rekombinanter Proteine, insbesondere Fusionsproteine, gilt die Transformation Gram-negativer Bakterien und das schrittweise Gewinnen des synthetisierten Proteins aus den Einschlusskörpern (inclusion bodies) der Bakterien durch De- und Renaturierungsvorgänge (BARTH et al., 2000). Die Affinitäten solcher Konstrukte sind denen monoklonaler Antikörper vergleichbar (BIRD et al., 1988). Bei der bakteriellen Expression rekombinater Antikörperfragmente ist die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den β -Faltblattstrukturen der einzelnen Antikörperdomänen unter reduzierenden Bedingungen des Zytoplasmas nicht möglich (BIOCCA et al., 1995, PROBA et al., 1995). Da Disulfidbrücken zur Stabilität von Antikörperfragmenten beitragen

(GLOCKSHUBER et al., 1992; FRISCH et al., 1994; FRISCH et al., 1996), geht mit dem Verlust von Disulfidbrücken eine inkorrekte Faltung und Instabilität der Antikörperfragmente einher. Dies führt zur Bildung unlöslicher Aggregate in Form von so genannten Einschlusskörpern (CABILLY, 1989; HE et al., 1995). Durch geeignete Renaturierungsmethoden ist es möglich, funktionelles Protein aus den Einschlusskörpern zu gewinnen (BIRD et al., 1988; HUSTON et al., 1988).

Im Gegensatz zu den zytoplasmatisch exprimierten Antikörperfragmenten bilden sich im periplasmatischen Raum von *E. coli* korrekt gefaltete funktionelle Proteine. Der Transport von Proteinen durch die bakterielle Plasmamembran ist ähnlich dem Transport von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum eukaryontischer Zellen. In beiden Systemen wird das Protein zunächst als Prekursor mit einer hydrophoben Signal-Sequenz synthetisiert (DOBBERSTEIN et al., 1994). Die Abspaltung des Signalpeptids findet in Bakterien beim Durchtritt des Proteins durch die innere Membran in das Periplasma statt. Analog erfolgt die Prozessierung des Signalpeptids eukaryontischer Zellen im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums nach Proteinsynthese am Ribosom. Um das Immunzytokin möglichst stabil und funktional korrekt gefaltet herstellen zu können, wurde eine jüngst etablierte Methode der prokaryontischen Expression rekombinanter funktionaler Proteine in den periplasmatischen Raum umgesetzt (BARTH et al., 2000). Diese erlaubt unter osmotischem Stress die Produktion größerer Mengen korrekt gefalteter Proteine. Weiterhin entscheidend für die Bildung der Antikörperfragmente ist der Promotor des zur Expression verwendeten Vektors. Unter Kontrolle eines starken T7-Promotors kann das Fusionsprotein in *E. coli* BL 21 durch IPTG induzierbar exprimiert werden (STUDIER et al., 1986; BARTH et al., 2000). Dabei müssen die optimalen Expressionsbedingungen für jedes Antikörperkonstrukt einzeln ermittelt werden. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur Proteinmenge nach Präparation und Reinigung aus dem Periplasma bzw. aus zytoplasmatischen Einschlusskörpern. Die Proteinmenge in zytoplasmatischen Einschlusskörpern kann sehr hoch sein. Expressionsraten von 30 bis 50% der gesamten Proteinmenge sind nicht ungewöhnlich (HUSTON et al., 1991; BARRY & LEE, 1993; REITER et al., 1994). Dagegen beträgt die aus dem Periplasma isolierte Proteinmenge rekombinanter Antikörperfragmente bei guter Expression nur 5-10% des Gesamtproteins (CARTER et al., 1992).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression des Fusionsproteins anti-FAPscFv-TNF in pET 25b(+) sowohl in der löslichen Form als auch in den Einschlusskörpern in *E. coli* von unterschiedlichen Faktoren abhängig ist und beeinflusst wird. Die Menge funktionellen Proteins hing entscheidend von den Induktionsbedingungen ab. Temperatur, IPTG-Konzentration und Induktionsdauer wurden schrittweise variiert und die Expressionsbedingungen des gewünschten Proteins damit optimiert. Für lösliches wie unlösliches Protein erwies sich eine milde Induktionstemperatur als günstig. Temperaturen zwischen 28 und 30 °C erbrachten die quantitativ stärkste Expression und die größte Menge an gereinigtem Immunzytokin. Höhere Temperaturen bis 37 °C minderten die Ausbeute. Mit der gewählten Temperatur unmittelbar verbunden war die Dauer der Induktion. Die Expression des Immunzytokins war im Allgemeinen bereits nach 2 bis 4 Stunden nachweisbar. Für eine Temperatur von 30 °C war eine Induktionsdauer von 20 bis 24 Stunden im Sinne einer möglichst großen Proteinausbeute günstig. Ein weiterer Faktor, der die Menge isolierten Proteins beeinflusst, war die Konzentration des zur Protein-Induktion verwendeten IPTG. Für beide Expressionswege wurde eine IPTG-Konzentration von 1 mM gewählt. Eine geringere Konzentration erwies sich als nicht ausreichend, durch höhere Konzentrationen ließ sich die Ausbeute nicht steigern. Sowohl lösliches aus dem Periplasma als auch unlösliches aus den Einschlusskörpern des Zytoplasmas isoliertes und gereinigtes Protein zeigten eine große Instabilität nach dem Umpuffern von hyperosmolaren Produktionsbedingungen in physiologische Puffersysteme, welche für die Weiterverwendung in funktionellen Testreihen benötigt wurden. Wiederholt kam es zur Präzipitation des Fusionsproteins, und es gelang nur wenig funktionelles anti-FAPscFv-TNF herzustellen. Möglicherweise ist eine physiologische posttranslationale Faltung über Disulfide, die korrekte Ausbildung von β -Strängen und/oder Glukosylierung des rekombinanten Immunzytokins auch durch optimierte bakterielle Expression nicht erreicht worden. Es gelang dennoch, eine ausreichende Menge anti-FAPscFv-TNF für die Durchführung der *in vitro*-Tests herzustellen. Insgesamt lag das Produktionsniveau für lösliches Protein niedriger als für aus zytoplasmatischen Einschlusskörpern isoliertes Protein. Produktionsmengen um 100 μg an löslichem anti-FAPscFv-TNF stehen etwa 200 μg anti-FAP-scFv-TNF aus zytoplasmatischen Einschlusskörpern isoliertem Immunzytokin gegenüber.

***In vitro*-Funktionalität**

Grundsätzlich war die Funktionalität, insbesondere der Nachweis der Bindungseigenschaften von anti-FAPscFv-TNF mittels durchflusszytometrischer Analyse für beide, lösliches und aus zytoplasmatischen Einschlusskörpern isoliertes Immunzytokin nachzuweisen. Aufgrund der geringeren Produktionsmenge an löslichem anti-FAPscFv-TNF insbesondere nach Konzentrierung und dem Umpuffern in ein physiologisches Puffersystem, wurden nachfolgende Überprüfungen der Effektivität des Immunzytokins, das heißt die Apoptoseinduktion auf TNF-sensiblen und -resistenten Zelllinien, nach Präparation und Reinigung von unlöslichem anti-FAPscFv-TNF aus zytoplasmatischen Einschlusskörpern durchgeführt.

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit rekombinant hergestellte und gereinigte Immunzytokin anti-FAPscFv-TNF wurde durchflusszytometrisch mit den etablierten anti-FAP und anti-CD3 Single-Chain-Konjugaten an der elterlichen sowie stabil FAP-transfizierten Zelllinie HT1080 verglichen. Die Bindungseigenschaften des löslichen und unlöslichen Immunzytokins ließen sich an der FAP-transfizierten Zelllinie gleichermaßen nachweisen. Die Durchführung eines Anti-Idiotyp-ELISAs bestätigte erwartungsgemäß die Bindung des Testproteins an den anti-anti-FAP-Idiotyp. Zur Überprüfung der Effektivität des Konstruktes wurde aufgrund des höheren Produktionsniveaus lediglich das aus den zytoplasmatischen Einschlusskörpern isolierte und gereinigte Immunzytokin herangezogen. Im Vergleich mit humanem rekombinantem TNF- α zeigte sich in hohen Konzentrationsbereichen eine beachtliche Toxizität des rekombinanten TNF-Immunzytokins auf der TNF-Rezeptor-I exprimierenden WEHI-S-Zelllinie.

Ausblick

Leider ließ sich das Produktionsniveau des Immunzytokins nach optimierter bakterieller Expression nicht derart steigern, dass eine Überprüfung des von anti-FAPscFv-TNF im Tiermodell möglich war. Ebenso gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, die postulierte Dimerisierung und Trimerisierung zu funktionellem TNF zu demonstrieren. Tatsächlich finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben zur biologischen Aktivität von TNF- α . Aufgrund der *in vitro* nachgewiesenen Funktionalität des Fusionsproteins und den genannten Vorteilen eines Single-Chain-Konjugates gegenüber größeren Antikörperformationen ist eine

Fortsetzung des Vorhabens im Sinne einer Modifizierung des Expressionssystems wünschenswert. Wie bereits am Beispiel des Fusionsproteins anti-FAP-IgG1-TNF, dessen CH₂- und CH₃-Domäne der schweren Ketten durch ein TNF-Monomer ersetzt wurden, demonstriert, gelang nach eukaryontischer Expression in CHO-Zellen eine Steigerung der Proteinausbeute um ein Vielfaches (BAUER et al., 2004). Die Resultate dieser Arbeit ermutigen uns zur Übertragung des anti-FAPscFv-TNF-Immunkytokins in ein eukaryontisches Expressionssystem und ermöglichen eine erfolgreiche Präparation mit deutlich gesteigerter Ausbeute und nachfolgender *in vivo*-Untersuchung.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Afzal S, Lalani EN, Poulsom R, Stubbs A, Rowlinson G, Sato H, Seiki M, Stamp GW (1998) MT1-MMP and MMP-2 mRNA expression in human ovarian tumors: possible implications for the role of desmoplastic fibroblasts. *Hum Pathol* 29: 155-165
2. Alfthan K, Takkinen K, Sizmann D, Soderlund H, Teeri TT (1995) Properties of a single-chain Fv antibody containing different linker peptides. *Prot Eng* 8: 725-731
3. Anand NN, Mandal S, MacKenzie CR, Sadowska J, Sigurskjold B, Young NM, Bundle DR, Narang SA (1991) Bacterial expression and secretion of various single-chain Fv genes encoding proteins specific for a Salmonella serotyp B O-antigen. *J Biol Chem* 266(32): 21874-21879
4. Asher A, Mule JJ, Reichert CM, Shiloni E, Rosenberg SA (1987) Studies on the anti-tumor efficacy of systemically administered recombinant tumor necrosis factor against several murine tumors in vivo. *J Immunol* 138: 963-974
5. Barry MM, Lee JS (1993) Cloning and expression of an autoimmune DNA-binding single chain Fv. Only the heavy chain is required for binding. *Mol Immunol* 30: 833-840.
6. Barth S, Huhn M, Matthey B, Klimka A, Galinski EA, Engert A (2000) Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1572-1579
7. Bauer S, Renner C, Juwana JP, Held G, Ohnesorge S, Gerlach K, Pfreundschuh M (1999) Immunotherapy of human tumors with T-cell-activating bispecific antibodies: stimulation of cytotoxic pathways in vivo. *Cancer Res* 59: 1961-1965
8. Bauer S, Adrian N, Williamson B, Panousis C, Fadle N, Smerd J, Fettah I, Scott AM, Pfreundschuh M, Renner C (2004) Targeted bioactivity of membrane-anchored TNF by an antibody-derived TNF fusion protein. *J Immunol* 172: 3930-3939
9. Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH (1988) Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 240: 1041-1043
10. Beutler B, Bazzoni F (1998) TNF, apoptosis and autoimmunity: a common thread? *Blood Cells Mol Dis* 24: 216-230
11. Biocca S, Ruberti F, Tafani M, Pierandrei-Amaldi P, Cattaneo A (1995) Redox state of single chain Fv fragments targeted to the endoplasmic reticulum, cytosol and mitochondria. *Biotechnology (N Y)* 13: 1110-1115
12. Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufmann BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242: 423-426
13. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523

14. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
15. Brüggemann M, Winter G, Waldmann H, Neuberger MS (1989) The immunogenicity of chimeric antibodies. *J Exp Med* 170: 2153-2157
16. Cabilly S (1989) Growth at sub-optimal temperatures allows the production of functional, antigen-binding Fab fragments in *Escherichia coli*. *Gene* 85: 553-557
17. Carter P, Kelley RF, Rodrigues ML, Snedecor B, Covarrubias M, Velligan MD, Wong WL, Rowland AM, Kotts CE, Carver, ME (1992) High level *Escherichia coli* expression and production of a bivalent humanized antibody fragment. *Biotechnology (N Y)* 10: 163-167
18. Co MS, Baker J, Bednarik K, Janzek E, Neruda W, Mayer P, Plot R, Stumper B, Vasquez M, Queen C, Loibner H (1996) Humanized anti-Lewis Y antibodies: in vitro properties and pharmacokinetics in rhesus monkeys. *Cancer Res* 56: 1118-1125
19. Corti A, Marcucci F (1998) Tumor necrosis factor: strategies for improving the therapeutic index. *J Drug Target* 5: 403-413
20. Creasey AA, Reynolds MT, Laird W (1986) Cures and partial regression of murine and human tumors by recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Res* 46: 5687-5690
21. Dillman RO, Shawler DL, Dillman JB, Royston I (1984) Therapy of chronic lymphocytic leukemia and cutaneous T-cell lymphoma with T101 monoclonal antibody. *J Clin Oncol* 8: 881-891
22. Dobberstein B (1994) On the beaten pathway. *Nature* 367: 599-600
23. Dyer MJ, Hale G, Hayhoe FG, Waldmann H (1989) Effects of CAMPATH-1 antibodies in vivo in patients with lymphoid malignancies: Influence of antibody isotype. *Blood* 73: 1431-1439
24. Eggermont AM, ten Hagen TL (2001) Isolated limb perfusion for extremity soft-tissue sarcomas, in-transit metastases, and other unresectable tumors: credits, debits, and future perspectives. *Curr Oncol Rep* 3: 359-367
25. Espevik T, Nissen-Meyer J (1986) A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 95: 99-105
26. Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10(13): 2606-2617
27. Frisch C, Kolmar H, Fritz HJ (1994) A soluble immunoglobulin variable domain without a disulfide bridge: construction, accumulation in the cytoplasm of *E. coli*, purification and physicochemical characterization. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375: 353-356

28. Frisch C, Kolmar H, Schmidt A, Kleemann G, Reinhardt A, Pohl E, Uson I, Schneider TR, Fritz HJ (1996) Contribution of the intramolecular disulfide bridge to the folding stability of REIV, the variable domain of human immunoglobulin kappa light chain. *Fold Des* 1: 431-440
29. Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ, (1990) Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7235-7239
30. Gasparri A, Moro M, Curnis F, Sacchi A, Pagano S, Veglia F, Casorati G, Siccardi AG, Dellabona P, Corti A (1999) Tumor pretargeting with avidin improves the therapeutic index of biotinylated tumor necrosis factor alpha in mouse models. *Cancer Res* 59: 2917-2923
31. Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I., and Pluckthun, A. (1990). "A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv fragments." *Biochemistry*, 29, 1362-1367.
32. Glockshuber R, Schmidt T, Pluckthun A (1992) The disulfide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding in vitro, and functional expression in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31: 1270-1279
33. Goldstein LA, Ghersi G, Pineiro-Sanchez ML, Salamone M, Yeh Y, Flessate D, Chen WT (1997) Molecular cloning of seprase: a serine integral membrane protease from human melanoma. *Biochim Biophys Acta* 1361: 11-19
34. Grell M, Duoni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfitzenmaier K, Scheurich P (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83: 793-802
35. Grell M, Zimmermann G, Gottfried E, Chen CM, Grünwald U, Huang DCS, Lee YHW, Dürkop H, Engelmann H, Scheurich P, Wajant H, Strasser A (1999) Induction of cell death by tumor necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J* 18: 3034-3043
36. Halvorsen TB, Seim E (1989) Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 42: 162-166
37. Hartmann F, Renner C, Jung W, Deisting C, Juwana M, Eichertopf B, Kloft M, Pfreundschuh M (1997) Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody. *Blood* 89: 2042-2047
38. Hasebe T, Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Tsubono Y, Yamamoto H, Mukai K (1998) Fibrotic focus in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a significant histopathological prognostic parameter for predicting the long-term survival of the patients. *Breast Cancer Res Treat* 49: 195-208
39. Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, Ochiai, A (2000) Proliferative activity of intratumoral fibroblasts is closely correlated with lymph node and distant organ metastases of invasive ductal carcinoma of the breast. *Am J Pathol* 156: 1701-1710

40. Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, Ochiai A (2001) Highly proliferative fibroblasts forming fibrotic focus govern metastasis of invasive ductal carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 14: 325-337
41. He M, Hamon M, Liu H, Kang A, Taussing MJ (1995) Functional expression of a single-chain anti-progesterone antibody fragment in the cytoplasm of a mutant *Escherichia coli*. *Nucl Acids Res* 23: 4009-4010
42. Hoogenboom HR, Volckaaert G, Raus JCM (1991) Targeting of tumor necrosis factor to tumor cells: secretion by myeloma cells of a genetically engineered antibody-tumor necrosis factor hybrid molecule. *Biochim Biophys Acta* 28: 1027-1037
43. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucoleri RE, Haber E, Crea R (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5879-5883
44. Huston JS, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Mc Cartney J, Warren F, Haber E, Oppermann H (1991) Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Methods Enzymol* 203: 46-88
45. Huston JS, George AJ, Adams GP, Stafford WF, Jamar F, Tai MS, McCartney JE, Oppermann H, Heelan BT, Peters AM, Houston LL, Bookman MA, Wolf EJ, Weiner LM (1996) Single-chain Fv radioimmunotargeting. *Q J Nucl Med* 40: 320-333
46. Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, Hempen PM, Jones J, Kern SE (2002) The desmoplastic response to infiltrating breast carcinoma: gene expression at the site of primary invasion and implications for comparison between tumor types. *Cancer Res* 62: 5351-5357
47. Kahazaeli MB, Saleh MN, Wheeler RH, Huster WJ, Holden H, Carrano J, LoBuglio AF (1988) Phase I trial of multiple large doses of murine monoclonal antibody CO17-1A. II. Pharmacokinetics and immune response. *J Natl Cancer Inst* 80: 937-942
48. King J, Laemmli UK (1971) Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J Mol Biol* 62: 465-477
49. Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Landscaping the cancer terrain. *Science* 280: 1036-1037
50. Köhler G, Milstein C (1975) Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497
51. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD (1988) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53: 45-53
52. Kunz-Schughart LA, Knuechel R (2002) Tumor-associated fibroblasts (part I): Active stromal participants in tumor development and progression? *Histol Histopathol* 17: 623-637

53. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
54. Lejeune J, Ruegg C, Lienard D (1998) Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Opin Immunol* 10: 573-580
55. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487-501
56. LuBuglio AF, Saleh MN, Lee J, Khazaeli MB, Carrano R, Holden H, Wheeler RH (1988) Phase I trial of multiple doses of murine monoclonal antibody CO17-1A. I. Clinical aspects. *J Natl Cancer Inst* 80: 932-936
57. Mauceri HJ, Hanna NN, Wayne JD, Hallahan DE, Hellman S, Weichselbaum RR (1996) Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene therapy targeted by ionizing radiation selectively damages tumor vasculature. *Cancer Res* 56: 4311-4314
58. McDonnell MW, Simon MN, Studier FW (1977) Analysis of restriction fragments of T7-DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral alkaline gels. *J Mol Biol* 110: 119-146
59. Miller RA, Oseroff AR, Stratte PT, Levy R (1983) Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell-lymphoma. *Blood* 62: 988-995
60. Milenic, DE, Yokota T, Filpula DR, Finkelman MA, Dodd SW, Wood JF, Whitlow M, Snoy P, Schlom J (1991) Construction, binding properties, metabolism, and tumor targeting of a single-chain Fv derived from the pancarcinoma monoclonal antibody CC49. *Cancer Res* 51: 6363-6371
61. Nishimura R, Hasebe T, Tsubono Y, Ono M, Sugitoh M, Arai T, Mukai K (1998) The fibrotic focus in advanced colorectal carcinoma: a hitherto unrecognized histological predictor for liver metastasis. *Virchows Arch* 433: 517-522
62. Noel A, Hajitou A, L'Hoir C, Maquoi E, Baramova E, Lewalle JM, Remacle A, Kebers F, Brown P, Calberg-Bacq CM, Foidart JM (1998) Inhibition of stromal matrix metalloproteases: effects on breast-tumor promotion by fibroblasts. *Int J Cancer* 76: 267-273:
63. Old LJ (1987) Tumor necrosis factor: polypeptide mediator network. *Nature* 326: 330-331
64. Paik S, Burkhard E, Lippman ME (1992) Clinical significance of erbB2 protein overexpression. *Cancer Treat Res.* 61: 181-191
65. Park JE, Lenter MC, Zimmermann RN, Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ (1999) Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J Biol Chem* 274: 36505-36512
66. Pantoliano MW, Bird RE, Johnson S, Asel ED, Dodd SW, Wood JF, Hardman KD (1991) Conformational stability, folding, and ligand-binding affinity of single-chain

- Fv immunoglobulin fragments expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 30: 10117-10125
67. Proba K, Ge L, Pluckthun A (1995) Functional antibody single-chain fragments from the cytoplasm of *Escherichia coli*: influence of thioredoxin reductase (TrxB). *Gene* 159: 203-207
 68. Ratner A, Clark WR (1993) Role of TNF- α in CD8+ cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis. *J Immunol* 150: 4303-4314
 69. Reisfeld RA, Becker JC, Gillies SD (1997) Immunocytokines: a new approach to immunotherapy of melanoma. *Melanoma Res* 2: 99-106
 70. Reiter Y, Brinkmann U, Jung SH, Lee B, Kasprzyk PG, King CR, Pastan I (1994) Improved binding and antitumor activity of a recombinant anti-erbB2 immunotoxin by disulfide stabilization of the Fv fragment. *J Biol Chem* 269: 18327-18331
 71. Rettig WJ, Garin-Chesa P, Healey JH, Su SL, Ozer HL, Schwab M, Albino AP, Old LJ (1993) Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin. *Cancer Res* 53: 3327-3335
 72. Riethmüller G, Schneider-Gadicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Höffken K, Gruber R, Pichelmaier H, Hirche H, Pichelmayer R (1994) Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group. *Lancet* 343: 1177-1183
 73. Robert B, Mach JP, Mani JC, Yehou M, Folli S, Artus JC, Pelegrin A (1996) Cytokine targeting in tumors using a bispecific antibody directed against carcinoembryonic antigen and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res* 56: 4758-4765
 74. Rosenblum MG, Horn SA, Cheung LH (2000) A novel recombinant fusion toxin targeting HER-2/NEU-over-expressing cells and containing human tumor necrosis factor. *Int J Cancer* 88: 267-273
 75. Rosenblum MG, Cheung LH, Liu Y, Marks JW 3rd (2003) Design, expression, purification, and characterization, in vitro and in vivo, of an antimelanoma single chain Fv antibody fused to the toxin gelonin. *Cancer Res* 63: 3995-4002
 76. Saiki R., Gelfand HD, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* 239: 487-491
 77. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York
 78. Scanlan MJ, Raj BK, Calvo B, Garin-Chesa P, Sanz-Moncasi MP, Healey JH, Old LJ, Rettig WJ (1994) Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5657-5661

79. Scherf U, Benhar I, Webber KO, Pastan I, Brinkmann U (1996) Cytotoxic and antitumor activity of a recombinant tumor necrosis factor-B1 (Fv) fusion protein on LeY antigen-expressing human cancer cells. *Clin Cancer Res* 2: 1523-1531
80. Schroff RW, Foon KA, Beatty SM, Oldham RK, Morgan AC Jr (1985) Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res* 45: 879-885
81. Sears HF, Mattis J, Herlyn D, Häyry P, Atkinson B, Ernst C, Steplewski Z, Koprowski H (1982) Phase-I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumors. *Lancet* 1: 762-765
82. Seljelid R, Jozefowski S, Sveinbjornsson B (1999) Tumor stroma. *Anticancer Res* 19: 4809-4822
83. Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV Jr (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28: 815-820
84. Sherman ML, Spriggs DR, Arthur KA, Imamura K, Frei E 3rd, Kufe DW (1988) Recombinant human tumor necrosis factor administered as a five-day continuous infusion in cancer patients: phase I toxicity and effects on lipid metabolism. *J Clin Oncol* 6: 344-350
85. Siegall CB (1994) Targeted toxins as anticancer agents. *Cancer* 74: 1006-1012
86. Skerra A, Pluckthun A (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240: 1038-1040
87. Spriggs DR, Sherman ML, Michie H, Arthur KA, Imamura K, Wilmore, D, Frei E 3rd, Kufe DW (1988) Recombinant tumor necrosis factor administered as a 24-hour intravenous infusion. A phase I and pharmacologic study. *J Natl Cancer Inst* 80: 1039-1044
88. Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189: 113-130
89. Takkinen K, Laukkanen ML, Sizmann D, Alfthan K, Immonen T, Vanne L, Kaartinen M, Knowles JK, Teeri TT (1991) An active single-chain antibody containing cellulase linker domain is secreted by *Escherichia coli*. *Protein Eng* 4: 837-841
90. Theuer CP, Pastan I (1993) Immunotoxins and recombinant toxins in the treatment of solid carcinomas. *Am J Surg* 166: 284-288
91. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354
92. Wajant H, Scheurich P (2001) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 19-32

93. Weiss SB, Hsu WT, Foft JW, Scherberg NH (1968) Transfer RNA coded by the T4 bacteriophage genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61: 114-121
94. Welt S, Divgi CR, Scott AM, Garin-Chesa P, Finn RD, Graham M, Carswell EA, Cohan A, Larson SM, Old LJ (1994) Antibody targeting in metastatic colon cancer: a phase I study of monoclonal antibody F19 against a cell-surface protein of reactive tumor stromal fibroblasts. *J Clin Oncol* 12: 1193-1203
95. Xiang J (1999) Targeting cytokines to tumors to induce active antitumor immune responses by recombinant fusion proteins. *Hum Antibodies* 9: 23-36
96. Yang J, Moyana T, Xiang J (1995) A genetically engineered single-chain FV/TNF molecule possess the anti-tumor immunoreactivity of FV as well as the cytotoxic activity of tumor necrosis factor. *Mol Immunol* 32: 873-881
97. Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J (1992) Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 52: 3402-3408

VII. ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
Å	Angström
b, kb	Basen, Kilobasen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
C	Cytosin
CD	lymphozytäres Differenzierungsantigen („cluster of differentiation“)
cDNA	mRNA-komplementäre DNA („copy DNA“)
CHO-Zellen	„Chinese Hamster Ovary“-Zellen
C-terminal	Carboxylterminus eines Proteins
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
Fab	Antigenbindungsstelle („fragment antigen binding“)
FACS	Durchflusszytometer („fluorescence-activated cell sorter“)
FAP	Fibroblasten-Aktivierungsprotein
FCS	fötale Kälberserum („fetal calf serum“)
Fv	aus den variablen Domänen der leichten und schweren Kette bestehendes Antikörperfragment
G	Guanin
H	schwere Kette eines Antikörpers
HCl	Chlorwasserstoff
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
HAMA	humane-anti-Maus-Antikörper
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
kDa	kiloDalton
L	leichte Kette eines Antikörpers
LB	Bakterien-Nährmedium („Luria Broth“)
mAk	monoklonaler Antikörper

memTNF	membranständiger Tumor Nekrose Faktor
mRNA	„messenger RNA“
MTx	Methotrexat
N-terminal	Aminoterminus eines Proteins
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
OD	optische Dichte
par	parental
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
rhu-TNF	humaner rekombinanter Tumor Nekrose Faktor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute („rotations per minute“)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RS	Restriktionsschnittstelle
RT	Raumtemperatur
scFv	Antikörperfragment, dessen variable leichte und schwere Kette durch einen Peptidlinker verbunden sind („single chain-Fv“)
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
T	Thymin
TAE	Tris/Acetate/EDTA
TB	Bakterien-Nährmedium („Terrific Broth“)
TE	Tris/EDTA
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF-R	Tumor Nekrose Faktor – Rezeptor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Einheit („unit“)
UV	ultraviolett
Vol	Volumen
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen („volume per volume“)
V _H	variable Region der schweren Kette
V _L	variable Region der leichten Kette
w/v	Masse pro Gesamtvolumen („weight per volume“)

VIII. DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik I, Abteilung Hämatologie-Onkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Michael Pfreundschuh für die Überlassung des Themas und die freundliche und konstruktive Unterstützung bei der wissenschaftlichen Arbeit und der Erstellung der Dissertation.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Christoph Renner sowie Herrn Dr. med. Stefan Bauer aufrichtig für die freundschaftliche und kompetente Anleitung und die hilfsbereite Unterstützung während meiner praktischen Arbeit im onkologischen Labor und bei Fertigstellung der Dissertation.

Ganz herzlich danke ich allen Mitarbeitern des onkologischen Labors, von denen ich in die Techniken der Molekularbiologie und Proteinbiochemie eingeführt wurde, und die mich während meiner Arbeit stets unterstützt haben.

Ich danke ferner meiner Familie und meinen Freunden, von denen jeder seinen Teil zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Insbesondere möchte ich meiner Kollegin und Freundin, Nicole Adrian, für ihre Unterstützung während der Fertigstellung der Dissertation danken.

IV. Lebenslauf

Name:	Barbara Keil	
Geburtsdatum:	28. Mai 1974	
Geburtsort:	Neunkirchen/Saar	
Familienstand:	ledig	
Schulen:	1980 – 1984	Grundschule Neunkirchen/Wellesweiler
	1984 – 1993	Gymnasium am Steinwald/Neunkirchen
	1993	Abitur
Studium	WS 1993/94	Beginn des Studiums der Anglistik und Romanistik, Universität des Saarlandes
	WS 1995/96	Beginn des Studiums der Humanmedizin, Universität des Saarlandes
	März 1998	Ärztliche Vorprüfung
	April 2000	1. Staatsexamen
	April 2000	Beginn der experimentellen Dissertation auf dem Gebiet der Tumorummunologie bei Herrn Prof. M. Pfreundschuh, Innere Medizin I, Universitätsklinikum des Saarlandes
	September 2001	2. Staatsexamen
	Okt 2001 – Okt 2002	Ausbildung im Praktischen Jahr, Universitätsklinikum Homburg, Wahlfach Radiologie
	Oktober 2002	3. Staatsexamen
	Berufstätigkeit	Jan 2003 – Jun 2004
seit Jan 2005		Ausbildung als Ärztin für Innere Medizin, Innere Medizin I, Universitätsklinikum des Saarlandes
Klinische Studien	seit Jan 2005	Prüfarzt Phase II/III-Studien

Homburg, 01.06.2009

Barbara Keil