

In vitro und in vivo Charakterisierung eines proapoptotischen Antikörperderivates für die Tumorthherapie

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Dierk Samel
aus Tübingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Harald Wajant
Mitberichter: Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier
Tag der mündlichen Prüfung: 28. Januar 2005

Institut für Zellbiologie und Immunologie
Universität Stuttgart

2005

In vitro und in vivo Charakterisierung eines proapoptotischen Antikörperderivates für die Tumorthherapie

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Dierk Samel
aus Tübingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Harald Wajant
Mitberichter: Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier
Tag der mündlichen Prüfung: 28. Januar 2005

Institut für Zellbiologie und Immunologie
Universität Stuttgart

2005

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Zusammenfassung	4
3	Einleitung	6
3.1	Die erworbenen Fähigkeiten von Krebs	7
3.2	Inflammation und neoplastische Progression	17
3.3	Apoptose	24
3.4	Das Tumorstroma und das Modellantigen FAP	33
3.5	Aufgabenstellung	35
4	Materialien	36
4.1	Materialien für die Zellkultur	36
4.2	Chemikalien und Reagenzien	36
4.3	Antikörper	37
4.4	Plasmide	38
4.5	Zell-Linien	38
5	Methoden	39
5.1	Zellbiologische Methoden	39
5.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zell-Linien	39
5.1.2	Zellernte	39
5.1.3	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	40
5.1.4	Zytotoxizitätsassay	40
5.1.5	Transfektion eukaryotischer Zell-Linien	41
5.1.6	Produktion rekombinanter Liganden und Antikörperderivate	43
5.1.7	Immunfärbung von Zellen für EPICS-Analyse und FACSSorting	44
5.2	Biochemische und molekularbiologische Methoden	45
5.2.1	Ankonzentrierung rekombinanter Proteine	45
5.2.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung von Flag-Fusionsproteinen	46
5.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	48
5.2.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese: SDS-PAGE	49
5.2.5	Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	50
5.2.6	Western Blot (Towbin et al., 1979)	51

5.2.7	Präparation zellulärer Lysate	52
5.2.8	Nachweis von Interleukin-8 im ELISA	53
5.2.9	Caspase-Aktivitätsassay	54
5.3	Tierexperimentelle Methoden	54
6	Ergebnisse	57
6.1	Das Antikörperderivat scFv40-Flag-FasL: Produktion und Aufreinigung	57
6.2	In vitro Charakterisierung von scFv40-Flag-FasL	64
6.2.1	Proapoptotische Wirkungsweise von scFv40-Flag-FasL in vitro	64
6.2.2	Nichtapoptotische Wirkung von scFv40-Flag-FasL in vitro	73
6.3	Die systemische Applikation von scFv40-Flag-FasL induziert in vivo keine akut toxische Wirkung.	75
6.4	Studium der antitumoralen Wirkung von scFv40-Flag-FasL in vivo	82
6.4.1	Die Behandlung mit scFv40-Flag-FasL und CHX inhibiert das Wachstum von HT1080-FAP-Tumorzellen in vivo.	83
6.4.2	Die Kobehandlung mit Cycloheximid ist für die antitumorale Wirkung von scFv40-Flag-FasL in vivo nicht zwingend erforderlich.	84
6.4.3	Die Therapie mit scFv40-Flag-FasL inhibiert in vivo exklusiv das Wachstum FAP-positiver Tumorzellen.	88
6.4.4	Etablierte Tumore lassen sich durch lokale Administration von scFv40-Flag-FasL behandeln.	90
7	Diskussion	95
7.1	Produktion und Aufreinigung von scFv40-Flag-FasL	95
7.2	Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften von scFv40-Flag-FasL in vitro	97
7.3	Untersuchung der Wirkung von scFv40-Flag-FasL nach systemischer Applikation in vivo	102
7.4	Die antitumorale Wirkung von scFv40-Flag-FasL in vivo	103
7.5	Die paradoxen Funktionen von FasL in der Immunbiologie	105
8	Summary	112
9	Literaturverzeichnis	115

1 Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-di-3-ethylenbenzthiaolinsulfonsäure
AIF	apoptosis-inducing factor
AMC	7-Amido-4-methylcumarin
AP	Alkalische Phosphatase
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-associated X protein
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyphosphat-p-Toluidinsalz
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BIR	baculovirus IAP repeat
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celsius
CARD	caspase recruitment domain
Caspase	Cysteiny-Aspartat-spezifische Protease
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
cFLIP	cellular FLICE-inhibitory protein (= CASH, CASPER, CLARP, FLAME-1, I-FLICE, MRIT, Usurpin)
CHX	Cycloheximid
ciAP1	cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (= MIHB, HIAP-2)
ciAP2	cellular inhibitor of apoptosis protein 2 (=MIHC, HIAP-1)
CRD	cysteine-rich domain
DD	death domain
DED	death effector domain
DIABLO	direct IAP-binding protein with low pI (= Smac)
DISC	death-inducing signaling complex
DMF	N,N-Dimethyl-Formamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DR3	death receptor 3 (= Apo3, LARD, TRAMP, Wsl-1)
DR4	death receptor 4 (= TRAIL-R1, Apo2)
DR5	death receptor 5 (= TRAIL-R2, TRICK2, KILLER)
DR6	death receptor 6
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	Effektor Konzentration 50 %

EDAR	Ectodysplasin-A Rezeptor
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
F	Farad
FACS	fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas associated death domain protein (= MORT1)
FCS	fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLICE	FADD-like ICE (= MACH, Mch5, Caspase-8)
g	Normfallbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
h	Stunde
HBSS	Hank's balanced salt solution
HtrA2	high temperature requirement protein A2 (= Omi)
IAP	inhibitor of apoptosis protein
ICE	interleukin-1 β -converting enzyme
IgG	Immunglobulin G
IL8	Interleukin-8
kDa	kilo-Dalton
M	molar (Mol/Liter)
MACH	MORT1-associated CED-3 homologue
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute
MORT1	mediator of receptor-induced toxicity
mRNA	messenger ribonucleic acid
NAIP	neuronal apoptosis inhibitor protein
NBT	4-Nitrotetrazoliumchloridblau
NF κ B	nuclear factor κ B
NGFR	nerve growth factor receptor
NPP	p-Nitrophenylphosphat
OD _{x nm}	Optische Dichte bei x nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	poly (ADP ribose) polymerase
PBA	PBS mit BSA und Azid
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PE	Phycoerythrin
PLAD	pre-ligand assembly domain
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RIP	receptor-interacting protein

RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
ROS	reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
scFv	single chain fragment variable
SDS	sodiumdodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
Smac	second mitochondria-derived activator of caspase (= DIABLO)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	transforming growth factor beta
TNF	tumor necrosis factor
TNF-R1	TNF receptor 1 (= CD120a)
TRADD	TNF-R1-associated death domain protein
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand (= Apo2L)
TRAIL-R1	TRAIL receptor 1 (= DR4, Apo2)
TRAIL-R2	TRAIL receptor 2 (= DR5, TRICK2, KILLER)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TWEAK	TNF-related weak ability to induce apoptosis
U	Enzymeinheit
ün	über Nacht
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein (= MIHA, hILP)
z-VAD-fmk	N-Benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-Fluoromethylketon

2 Zusammenfassung

Die konventionelle Krebstherapie umfaßt neben der chirurgischen Entfernung von Tumoren in erster Linie die Bestrahlung und Administration von Chemotherapeutika. Mit den letztgenannten Methoden werden in proliferierenden Zellen fatale, irreparable Schäden verursacht, die in einer sekundären Reaktion schließlich zur Induktion des programmierten Zelltodes führen. Diese Therapieformen haben mit der Entstehung resistenter Tumorzellen zu kämpfen und schädigen darüber hinaus das gesunde Gewebe, da sie nicht zwischen malignen und nicht-malignen proliferierenden Zellen differenzieren können. In den letzten Jahren wurde daher intensiv an der Entwicklung selektiver Ansätze gearbeitet, die sich vorhandener biologischer Mechanismen bedienen, um Tumorzellen anzugreifen. Von Frau Dr. Müller Szeraws wurde in diesem Zusammenhang das rekombinante Antikörperderivat scFv40-Flag-FasL hergestellt, das am Aminoterminal eine humane, FAP-spezifische „single chain“-Domäne besitzt und carboxyterminal die extrazelluläre Region von FasL trägt (Müller Szeraws, 2002). Die „single chain“-Domäne vermittelt die für die Aktivierung erforderliche Antigen-abhängige Immobilisierung des per se inaktiven scFv40-Flag-FasL auf FAP-exprimierenden Zellen. Dementsprechend konnte mittels FACS-Analyse demonstriert werden, daß sich die spezifische Bindung von scFv40-Flag-FasL exklusiv auf FAP-transfizierten HT1080- und HeLa-Zellen beobachten läßt. Bei der Untersuchung des zytotoxischen Potenzials konnte in vitro gezeigt werden, daß scFv40-Flag-FasL auf HT1080-FAP- bzw. HeLa-FAP-Zellen um den Faktor 100 bis 1000 zytotoxischer wirkt als auf die FAP-negativen parentalen Zellen, obwohl die untersuchten Zell-Linien HT1080 und HT1080-FAP respektive HeLa und HeLa-FAP grundsätzlich eine vergleichbare Sensitivität für FasL-induzierten Zelltod aufweisen. Die zytotoxische Wirkung von scFv40-Flag-FasL konnte durch Präinkubation der Zellen mit dem Caspaseinhibitor z-VAD-fmk blockiert werden. Eine nähere Charakterisierung der beobachteten Effekte zeigte, daß die Stimulation mit scFv40-Flag-FasL selektiv in HT1080-FAP- und HeLa-FAP-Zellen zur Prozessierung von Procaspase-8 und Aktivierung von Caspase-3 führt. Darüber hinaus konnte in vitro demonstriert werden, daß scFv40-Flag-FasL in HT1080-FAP-Zellen die Produktion von IL8 induziert. Mit der Bindung und Immobilisierung von scFv40-Flag-FasL an membranständigem FAP wird das Molekül in einen vollwertigen bioaktiven Zustand versetzt und es kann, vergleichbar mit rekombinantem quervernetztem FasL, sowohl die proapoptischen als auch die geninduktiven Funktionen des Rezeptors CD95/Fas induzieren. Konventionelle Fas-Agonisten wirken in vivo nach

systemischer Administration insbesondere auf Hepatozyten stark zytotoxisch, was schnell zum Tod der behandelten Tiere führt. Wie die Untersuchung der systemischen Toxizität von scFv40-Flag-FasL in vivo zeigte, ist hier die Konstruktion eines Fas-Agonisten gelungen, der selbst bei intravenöser Administration von höchsten Einzeldosen keine fulminanten oder gar letalen Nebenwirkungen induziert. Die postulierte antitumorale Aktivität von scFv40-Flag-FasL wurde durch Behandlung subkutan transplantierte Tumorzellen in vivo untersucht. Die lokale Applikation von scFv40-Flag-FasL inhibiert das Wachstum von HT1080-FAP-Zellen, nicht aber die Entwicklung von subkutanen Tumoren aus parentalen, FAP-negativen HT1080-Zellen. Ob die antitumorale Wirkung in vivo auf der unmittelbaren Induktion von Apoptose in FAP-positiven und dazu direkt benachbarten Zellen oder auf der Aktivierung von Effektormechanismen des Immunsystems beruht, konnte noch nicht aufgeklärt werden. Die hier beschriebenen in vivo-Studien sind allerdings vielversprechend und demonstrieren, daß das Prinzip der Antigen-abhängigen Immobilisierung von FasL und lokalen Aktivierung von Fas in vivo für die Tumorthherapie genutzt werden kann.

3 Einleitung

Das normale Verhalten einer Zelle in vielzelligen Organismen unterliegt einer strengen Kontrolle durch ein komplexes Netzwerk von Signalwegen. Diese Kontrollmechanismen gestatten einer Zelle die Proliferation nur in besonderen Situationen, in denen eine Zellteilung für den Gesamtorganismus erforderlich ist, beispielsweise während der Embryonalentwicklung oder im Rahmen der Wundheilung. Bricht die ordentliche Regulation der Proliferation zusammen, im Allgemeinen aufgrund von Defekten in diesen Signalwegen, besteht die Gefahr der Entwicklung von Krebs.

In einfachen multizellulären Organismen, wie *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*, die zumindest als adulte Tiere größtenteils bis vollständig aus postmitotischen somatischen Zellen bestehen, ist die Entwicklung von Krebs aber nicht zu beobachten (Campisi, 2003). Hingegen leiden komplexe multizelluläre Organismen, wie Maus und Mensch, insbesondere in fortgeschrittenem Lebensalter an Krebs. Im Unterschied zu den einfachen verfügen die komplexen Organismen über erneuerbare Gewebe, die es auch dem adulten Individuum ermöglichen, Zellen zu ersetzen, die durch stochastische, pathologische oder katastrophale Schäden oder durch Differenzierung verloren gehen (Campisi, 2003). Durch die Proliferation der Zellen in erneuerbaren Geweben besteht die Gefahr, erworbene Mutationen weiter zu verbreiten und durch Akkumulation von Mutationen bilden Zellen nach und nach maligne Charakteristiken aus.

Die Sicherheitsmechanismen, die in komplexen Organismen der Tumorentwicklung vorbeugen, lassen sich zwei unterschiedlichen Kategorien zuordnen. Eine Sicherheitsmaßnahme beruht auf dem Einsatz von „caretaker“-Proteinen, die das Genom vor der Manifestation potenziell onkogener Mutationen bewahren (Campisi, 2003). Der andere Mechanismus bedient sich sogenannter „gatekeeper“-Proteine, die das Wachstum potenzieller Tumorzellen einschränken oder diese eliminieren. Der Unterschied zwischen beiden Mechanismen der Tumorsuppression ist darin zu sehen, daß „caretaker“-Proteine für die zelluläre Integrität und das Überleben der einzelnen Zelle dienen, wohingegen „gatekeeper“-Proteine für die Funktion des Gewebes und des gesamten Organismus sorgen. Bei den „caretaker“-Proteinen handelt es sich um Komponenten der DNS-Reparaturmechanismen, darunter die RECQ-ähnlichen Helicasen, Faktoren der Nukleotid-Exzisionsreparatur und

Proteinkomplexe, die der Erhaltung der Telomere dienen (Campisi, 2003). Die prominentesten Vertreter der „gatekeeper“-Tumorsuppressoren sind p53 und die RB-Proteine, die maßgeblich die zellulären Prozesse Apoptose und Seneszenz regulieren (Campisi, 2003). Der Entwicklung von Krebs sind somit Grenzen gesetzt, die aber Ziel genetischer Veränderungen sind: Tumorzellen besitzen Defekte in diesen Tumorsuppressionsmechanismen, die die normale zelluläre Proliferation und Homöostase regulieren.

Bei der Tumorentwicklung im Menschen handelt es sich um einen stufenweisen Prozeß, wobei die einzelnen Schritte genetische Veränderungen widerspiegeln, die eine progressive Transformation normaler humaner Zellen in hochmaligne Abkömmlinge vorantreiben (Hanahan und Weinberg, 2000). Das Genom der Tumorzellen weist an zahlreichen Stellen dauerhafte Veränderungen auf, bei denen es sich um kleine Schäden wie Punktmutationen bis hin zu offensichtlichen Änderungen in der Zahl oder Zusammensetzung der Chromosomen handeln kann (Kinzler und Vogelstein, 1996). Die Auswirkungen genetischer Veränderungen, die in der einen oder anderen Art und Weise einen Wachstumsvorteil bieten, führen zur progressiven Umwandlung normaler Zellen in Krebszellen (Foulds, 1954; Nowell, 1976). Hanahan und Weinberg postulierten im Jahr 2000, daß sich sämtliche Tumorzellen während ihrer Entwicklung eine identische Kombination an funktionellen Eigenschaften aneignen, mit deren Hilfe das maligne Wachstum möglich wird (Hanahan und Weinberg, 2000). Bei diesen Fähigkeiten handelt es sich um die autonome Versorgung mit wachstumsfördernden Signalen, die Unempfindlichkeit gegenüber antiproliferativen Stimuli und die Resistenz gegen programmierten Zelltod. Darüber hinaus erwerben Tumorzellen ein unbegrenztes replikatives Potenzial, sie induzieren Angiogenese und entwickeln die Fähigkeit zu invasivem Wachstum und der Bildung von Metastasen (Hanahan und Weinberg, 2000). Diese Fähigkeiten sollen im Folgenden genauer beschrieben werden und an Beispielen die funktionelle Bedeutung aufgezeigt werden.

3.1 Die erworbenen Fähigkeiten von Krebs

Normale gesunde Zellen müssen im Ruhezustand mit mitogenen Wachstumssignalen stimuliert werden, bevor sie mit der aktiven Proliferation

beginnen können (Hanahan und Weinberg, 2000). Tumorzellen zeigen aber eine deutlich reduzierte Abhängigkeit von diesen exogenen Signalen, indem sie zahlreiche Wachstumsstimuli selbst generieren (Hanahan und Weinberg, 2000). Diese Autonomie kann auf molekularer Ebene durch drei verschiedene Strategien erreicht werden, darunter die Veränderung der extrazellulären Wachstumssignale oder der signalvermittelnden Transmembranrezeptoren. Zahlreiche Tumorzellen können Wachstumsfaktoren synthetisieren, auf die sie selbst reagieren und schaffen so eine positive Rückkopplungsschleife, die man auch als autokrine Stimulation bezeichnet (Fedi et al., 1997). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß Glioblastome ebenso wie Sarkome „platelet derived growth factor“ (PDGF) und „tumor growth factor alpha“ (TGF- α) produzieren (Fedi et al., 1997). Auch durch Überexpression der Transmembranrezeptoren, die meist mit Tyrosinkinaseaktivität ausgestattet sind, können Tumorzellen hypersensitiv auf basale Konzentrationen des entsprechenden Wachstumsfaktors reagieren, mit denen unter normalen Umständen keine proliferative Antwort induziert werden würde (Fedi et al., 1997). Das gilt zum Beispiel für den „epidermal growth factor receptor“ EGF-R/*erbB*, der unter anderem von Hirn- und Brusttumoren überexprimiert wird und auch für den Rezeptor HER2/*neu*, der in Magen- und Brustkarzinomen überexprimiert wird. Die Überexpression solcher Rezeptoren kann außerdem zu Liganden-unabhängiger Signalgebung befähigen (DiFiore et al., 1987). Diese Art der Signalinduktion wurde ebenfalls bei Rezeptoren beobachtet, die umfassende strukturelle Veränderungen erfahren haben. Für bestimmte Varianten des EGF-Rezeptors, denen große Teile der zytoplasmatischen Domäne fehlen, konnte gezeigt werden, daß sie konstitutiv Signale aussenden (Fedi et al., 1997).

Die Unabhängigkeit von exogenen Wachstumsstimuli kann auch durch Variation der intrazellulären Signalkreise erzielt werden, die die exogenen Signale in zelluläre Aktionen umwandeln. Die Stimulation der Rezeptoren für Wachstumsfaktoren aktiviert zentrale mitogene Signalkaskaden wie den SOS-Ras-Raf-MAP-Kinase-Signalweg (Hanahan und Weinberg, 2000). Eine zentrale Funktion in dieser Signalkaskade haben die Ras-Proteine und dementsprechend häufig exprimieren humane Tumore Ras-Proteine, die durch Punktmutationen konstitutiv aktiviert sind, ohne daß deren übliche „upstream“-Regulatoren aktiviert werden müssen (Medema und Bos, 1993). Tatsächlich kann man in etwa 20 % aller Tumore eine aktivierende Mutation in einem der Ras-Gene nachweisen (Bos, 1989). In diesem Zustand kann

Ras die Serin/Threonin-Kinase Raf aktivieren, die wiederum die Mitogen-aktivierte Proteinkinasekaskade (MAPK-Kaskade) initiiert (Downward, 2003). Dies mündet in der Aktivierung der „extracellular signal-regulated kinases“ ERK-1 und -2, die Transkriptionsfaktoren wie die Mitglieder der ELK-Familie phosphorylieren und aktivieren, welche ihrerseits die Expression von Fos regulieren. Ein weiteres Substrat der ERK-Kinasen ist cJun und so wird die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP1 eingeleitet, der aus Fos-Jun-Heterodimeren besteht (Yordy und Muise-Helmericks, 2000). Auf diese Weise kann Raf regulatorische Schlüsselproteine wie zum Beispiel die D-Typ-Zykline induzieren, die der Zelle ein Fortschreiten durch die G1-Phase des Zellzyklus gestatten (Pruitt und Der, 2001).

Neben dem Raf-MAPK-Signalweg kann Ras durch direkte Interaktion auch die Phosphatidylinositol-3-Lipidkinasen (PI3K) induzieren, die durch Phosphorylierung von PIP₂ den „second messenger“ PIP₃ generieren (Downward, 2003). Eine Vielzahl untergeordneter Enzyme wird durch die Aktivität von PI3K reguliert, darunter die Serin/Threonin-Kinasen der Akt/PKB-Familie, die eine starke antiapoptotische Wirkung ausüben (Datta et al., 1999). Über die Verbindung der PI3K zu Rac, einem Mitglied der Rho-Familie, kann nach der Aktivierung nicht nur das Zytoskelett reguliert werden, sondern auch Signalwege von Transkriptionsfaktoren wie NFκB, der die Expression einer Vielzahl von antiapoptotischen Faktoren kontrolliert (Downward, 2003). Aktiviertes Ras kann auf einen weiteren Effektorsignalweg namens „RALGDS-pathway“ einwirken und so die „forkhead“-Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie inhibieren (DeRuiter et al., 2001). Diese Transkriptionsfaktoren können den Arrest im Zellzyklus durch Induktion von Kip1/p27, einem Inhibitor für Zyklin-abhängige Kinasen, einleiten und außerdem Apoptose durch Expression von Bim und FasL auslösen (DeRuiter et al., 2001). Die Aktivierung von Ras auf natürlichem Wege oder durch Mutation während der Tumorigenese verhindert daher diese Effektormechanismen. Die permanente Aktivierung von Ras leistet damit mehrere entscheidende Beiträge zum malignen Phänotyp von Tumorzellen, darunter die Deregulation des Wachstums und die Beeinflussung des programmierten Zelltodes.

Bei der Aufklärung der Ursachen für die unkontrollierte Proliferation von Tumorzellen stellt sich zunehmend deutlicher heraus, daß die Signalgebung der offensichtlich gesunden Nachbarzellen, wie Fibroblasten oder endotheliale Zellen im Tumorgewebe, eine entscheidende Triebfeder für die Tumorprogression ist

(Hanahan und Weinberg, 2000). Eine erfolgreiche Tumorzelle ist entsprechend diesem Modell diejenige, die ihre Nachbarzellen zur reichlichen Produktion von wachstumsstimulierenden Signalen anhalten kann (Skobe und Fusenig, 1998). Weiterhin gibt es Anzeichen dafür, daß inflammatorische Zellen an Orte des neoplastischen Wachstums rekrutiert werden und die Proliferation der Tumorzellen fördern, anstatt sie zu eliminieren (Cordon-Cardo und Prives, 1999; Coussens et al., 1999; Hudson et al., 1999).

Eine weitere charakteristische Eigenschaft von Tumorzellen ist deren Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen. In einem gesunden Gewebe dient eine Vielzahl antiproliferativer Signale als Gegengewicht zu wachstumsfördernden Stimuli und dadurch wird ein zellulärer Ruhezustand und die Homöostase des Gewebes aufrechterhalten (Hanahan und Weinberg, 2000). Die antiproliferativen Signale können über zwei verschiedene Effektormechanismen das Zellwachstum inhibieren. Einerseits werden Zellen gezwungen, aus der aktiven Proliferationsphase des Zellzyklus auszutreten und sich in den Ruhezustand G_0 zu begeben, aus dem sie bei entsprechenden permissiven extrazellulären Signalen wieder in den aktiven Teilungszyklus zurückkehren können (Hanahan und Weinberg, 2000). Alternativ dazu geben Zellen ihr proliferatives Potenzial vollständig auf, treten irreversibel in einen postmitotischen Zustand ein und nehmen typische Differenzierungsmerkmale an. Zahlreiche antiproliferative Signale sind mit den Kontrollmechanismen des Zellzyklus verknüpft, insbesondere mit denjenigen Komponenten, die die Transition der Zelle durch die G1-Phase steuern (Hanahan und Weinberg, 2000). Auf molekularer Ebene spielen das Retinoblastoma-Protein pRb und die verwandten Proteine p107 und p130 eine zentrale Rolle, da von diesen Tumorsuppressoren sämtliche antiproliferativen Signale prozessiert werden (Hanahan und Weinberg, 2000). In hypophosphoryliertem Zustand inhibiert pRb die Proliferation dadurch, daß es die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie sequestriert und so deren Funktion blockiert (Sherr, 2001). Diese Transkriptionsfaktoren aktivieren die Expression einer Vielzahl von Genen, die an der DNS-Replikation und dem Nukleotidmetabolismus beteiligt sind und so wird die Progression der Zelle in die S-Phase beschleunigt (Sherr, 2001). Die Aktivität von pRb wird im Wesentlichen über den Phosphorylierungsstatus reguliert. Verantwortlich für die Inaktivierung von pRb durch Phosphorylierung sind die Zyklin-D- und -E-abhängigen Kinasen, insbesondere CDK4 und CDK6 (Sherr, 2001). Wichtige lösliche Signalmoleküle mit

antiproliferativer Wirkung sind die Mitglieder der „transforming growth factor beta“ (TGF- β)-Familie, die an spezifische heteromere Transmembranrezeptoren mit zytoplasmatischer Serin/Threonin-Kinasedomäne binden (Massague, 2000). Zwei der wichtigsten von TGF- β regulierten Zielgene in epithelialen Zellen sind *p15/INK4b*, das einen CDK-Inhibitor codiert und dessen Expression durch TGF- β induziert wird, und der potente Transkriptionsaktivator *c-myc*, der an der Proliferation beteiligte Gene induziert und selbst durch TGF- β reprimiert wird (Shi und Massague, 2003). Über die Induktion der p15/INK4b- und p21-Proteine kann TGF- β Zyklin-CDK-Komplexe inhibieren und so die Inaktivierung von pRb verhindern (Hanahan und Weinberg, 2000). Tumorzellen können die Sensibilität für TGF- β verlieren, indem die Expression der TGF- β -Rezeptoren reduziert wird oder mutante, nicht funktionelle Rezeptoren gebildet werden (Fyran und Reiss, 1993; Markowitz, 1995). Die Inaktivierung zytoplasmatischer Komponenten des TGF- β -Signalweges durch Mutation ist ebenfalls nachzuweisen (Hanahan und Weinberg, 2000). Schlußendlich wird durch alle diese genetischen Veränderungen der an pRb konvergierende, antiproliferative Signalkreis zerstört. Neben dieser Unempfindlichkeit für antiproliferative Signale nutzen Tumorzellen zusätzliche Strategien, um einer terminalen Differenzierung und somit einem irreversibel postmitotischen Zustand zu entgehen (Hanahan und Weinberg, 2000). Die terminale Differenzierung kann mit Hilfe des onkogenen Transkriptionsfaktors *c-myc* verhindert werden. Während der normalen Entwicklung kann die wachstumsfördernde Wirkung von Myc in Kombination mit einem weiteren Faktor namens Max dadurch verdrängt werden, daß Max alternative Komplexe mit der Gruppe der Mad-Transkriptionsfaktoren ausbildet (Hanahan und Weinberg, 2000). Diese Mad-Max-Komplexe lösen dagegen Signale in Richtung terminaler Differenzierung aus und wirken damit der Proliferation entgegen (Foley und Eisenman, 1999). Durch die Überexpression des Onkoproteins *c-myc*, die in zahlreichen Tumoren beobachtet werden kann, wird die Balance zwischen diesen Komplexen in Richtung der Myc-Max-Aggregate verschoben. Dadurch wird eine Differenzierung verhindert und die Proliferation gefördert (Hanahan und Weinberg, 2000).

Die Fähigkeit von Tumorzellen in ihrer Zahl zu expandieren wird nicht allein durch deren Wachstumsrate bestimmt, sondern auch durch die Absterberate. Ein erster Hinweis darauf, daß bei diesem Zellsterben der programmierte Zelltod eine bedeutende Rolle spielt und als Schranke für die Entwicklung von Krebs dient, wurde

1972 von Kerr, Wyllie und Currie gefunden. Sie beobachteten, daß in hormonabhängigen Tumorzellen durch den Entzug von Wachstumsfaktoren massiv apoptotische Prozesse ausgelöst werden (Kerr et al., 1972). Mit der Entdeckung des Onkogens *bcl-2*, das in folliculären Lymphomen aufgrund einer chromosomalen Translokation überexprimiert wird (Korsmeyer, 1992), und der Aufklärung der antiapoptotischen Aktivität von *bcl-2* begann die Untersuchung von Apoptose im Zusammenhang mit Krebs auf molekularer Ebene. Wird das *bcl-2*-Gen in transgenen Mäusen mit dem Onkogen *c-myc* koexprimiert, dann unterstützt *bcl-2* die Entstehung von B-Zell-Lymphomen, da es das Überleben der Lymphozyten fördert, ohne dabei die *c-myc*-induzierte Proliferation zusätzlich zu stimulieren (Strasser et al., 1990). Zahlreiche weitere Beobachtungen unterstützen die These, daß Defekte in der apoptotischen Maschinerie die Tumorprogression dramatisch beschleunigen (Hanahan und Weinberg, 2000). Die biochemischen Prozesse und morphologischen Veränderungen, die während der Apoptose in einer Zelle eintreten, werden später detailliert dargestellt.

Das Wachstumsprogramm von Tumorzellen wird durch die autonome Versorgung mit Wachstumssignalen, durch die Unempfindlichkeit gegenüber antiproliferativen Stimuli und der Resistenz gegen Apoptose von den Signalen der Umgebung entkoppelt. Wie die Forschungsergebnisse aus den letzten Jahrzehnten belegen, genügt dies allein nicht, um das expansive Wachstum von Tumoren zu garantieren. So besitzen in vitro kultivierte Zellen nur ein begrenztes replikatives Potenzial (Hayflick, 1997). Humane diploide Fibroblasten z. B. stellen nach etwa 60 bis 80 Teilungen in Kultur das Wachstum ein und entwickeln einen charakteristischen seneszenten Phänotyp (Mathon und Lloyd, 2001). Der Arrest im Zellzyklus wird durch Signale induziert, die die Tumorsuppressoren p53 und pRb aktivieren. Der senescente Zustand ist außergewöhnlich stabil und kann in Kultur mehrere Jahre aufrecht erhalten werden, da die Zellen weiterhin metabolisch aktiv sind (Mathon und Lloyd, 2001). Durch Inaktivierung der pRb- und p53-Tumorsuppressorsignalwege wird die Seneszenz allerdings überwunden und die Zellen beginnen erneut zu proliferieren (Mathon und Lloyd, 2001). Die Teilungsfähigkeit ist auch dann noch nicht unbegrenzt und nach etwa 20 bis 30 zusätzlichen Teilungszyklen treten die Zellen in eine zelluläre Krise ein. In dieser Krise proliferieren die Zellen zwar kontinuierlich, aber viele sterben durch eintretende Apoptose, die durch chromosomale Abberationen ausgelöst wird

(Mathon und Lloyd, 2001). Nur eine von 10^7 Zellen kann der zellulären Krise entkommen und durch unbegrenzte Teilungsfähigkeit einen immortalisierten Zustand erlangen (Wright et al., 1989). Die molekularen Mechanismen, die die intrinsische replikative Lebensspanne von humanen diploiden Fibroblasten bestimmen, werden offensichtlich allein durch die Verkürzung der Telomere kontrolliert. Die fortschreitende Verkürzung der Telomere ist dem Umstand zuzuschreiben, daß DNS-Polymerasen einen DNS-Strang nur mit Hilfe eines entsprechenden „primers“ in 5'-3'-Richtung synthetisieren können (Mathon und Lloyd, 2001). Am äußersten 3'-Ende der Chromosomen verbleibt deshalb ein Abschnitt, der nicht repliziert werden kann und daher verlieren die Telomere bei jeder Teilung zwischen 50 und 200 Basenpaaren an Länge. Die ungeschützten Enden unterschiedlicher Chromosomen werden dann häufig miteinander fusioniert, was schließlich zu schwerwiegenden chromosomalen Abberationen führt, da die entstehenden multizentrischen Chromosomen während der Mitose zufällig brechen (Mathon und Lloyd, 2001). In der betroffenen Zelle löst das eine zelluläre Krise aus, die beinahe unvermeidlich mit deren Tod endet (Counter et al., 1992). Die Erosion der Telomere wird aber durch einen besonderen Ribonukleoproteinkomplex namens Telomerase verhindert, der einzelsträngige hexamere „DNA-repeats“ an die 3'-Enden der Chromosomen anfügt, die nun von gewöhnlichen DNS-Polymerasen wieder zum Doppelstrang komplettiert werden können (Mathon und Lloyd, 2001). Die Telomeraseexpression unterliegt aber in physiologisch gesunden Zellen einer strengen Regulation und korreliert mit den proliferativen Anforderungen der Zelle. In hämatopoietischen Zellen, die während ihrer Entwicklung und der klonalen Expansion im Zuge von Immunantworten stark proliferieren, ist eine deutliche Telomeraseaktivität detektierbar, wohingegen sie beispielsweise im Gehirn nicht nachweisbar ist (Mathon und Lloyd, 2001). In praktisch allen Typen maligner Zellen ist die Stabilisierung der Telomere nachweisbar, die in den meisten Fällen durch Überexpression der Telomeraseaktivität erreicht wird (Hanahan und Weinberg, 2000). In selteneren Fällen ist aber auch ein alternativer Mechanismus zu beobachten, bei dem die Erosion der Telomere über den interchromosomalen Austausch von Sequenzen durch Rekombination verhindert wird (Bryan et al., 1995). In zahlreichen Arbeiten konnte in vitro und durch das Studium von Telomerase-defizienten Tiermodellen auch in vivo gezeigt werden, daß es sich bei der Erhaltung der Telomere zweifellos

um eine Schlüsselkomponente handelt, die für unbegrenztes Wachstum unerlässlich ist (Hanahan und Weinberg, 2000).

Eine weitere Eigenschaft, die sich neoplastisches Gewebe für progressives Wachstum aneignet, ist die Anregung von Angiogenese. Das vaskuläre Gefäßsystem versorgt sämtliche Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen, die für die normale Funktion und das Überleben erforderlich sind, und führt Stoffwechselendprodukte wieder ab. Daher müssen sich alle Zellen innerhalb eines Radius von maximal 100 µm zum nächsten kapillaren Blutgefäß befinden (Hanahan und Weinberg, 2000). Während der Organogenese wird diese Nähe über das koordinierte Wachstum von Gefäßen und Parenchym sichergestellt. Im adulten Gewebe ist die Entstehung neuer Blutgefäße, die sogenannte Angiogenese, ein sorgfältig regulierter Prozess (Hanahan und Weinberg, 2000). Die Balance zwischen positiven und negativen Signalen fördert oder inhibiert die Angiogenese. Bei den prominentesten Angiogenese-induzierenden Signalmolekülen handelt es sich um „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) und die „fibroblast growth factors“ -1 und -2 (FGF-1 und -2). Diese binden an Transmembranrezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität, die von endothelialen Zellen präsentiert werden (Fedi et al., 1997; Veikkola und Alitalo, 1999). Als Prototyp eines Angiogeneseinhibitors gilt Thrombospondin-1, das an den Transmembranrezeptor CD36, der ebenfalls von endothelialen Zellen gebildet wird, bindet (Bull et al., 1994). Die Bedeutung der Induktion von Angiogenese für das Tumorstadium konnte zum Beispiel mit neutralisierenden Antikörpern gegen VEGF demonstriert werden, die die Neovaskularisierung unterdrücken und so das Wachstum subkutaner Tumore in Mäusen beeinträchtigen (Kim et al., 1993). Die Fähigkeit zur Induktion und Erhaltung der Angiogenese wird während der Tumorentwicklung in einem oder mehreren diskreten Schritten erworben. Bei der Untersuchung der Tumorigenese in transgenen Mausmodellen wurde beobachtet, daß die Angiogenese über einen sogenannten „angiogenic switch“ aktiviert wird, der in jedem Stadium der Tumorstadium auftreten kann und für das exponentielle Wachstum unerlässlich ist (Hanahan und Weinberg, 2000). Der „angiogenic switch“ wird von Tumorzellen durch eine Störung der normalen Balance zwischen Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese induziert. So weisen zahlreiche Tumore im Vergleich zu normalen Zellen eine gesteigerte Expression an VEGF und FGF-1 und -2 auf oder sie reduzieren die Expression endogener Inhibitoren wie Thrombospondin-1 oder β -Interferon. Darüber hinaus ist in manchen Tumoren auch

eine kombinierte Änderung der Genexpression von Aktivatoren respektive Inhibitoren nachweisbar (Hanahan und Weinberg, 2000). Ein gut dokumentiertes Beispiel hierfür stellt die Expressionskontrolle von Thrombospondin-1 dar. In manchen Zellen wird Thrombospondin-1 durch den Tumorsuppressor p53 induziert und daher ist ein Funktionsverlust von p53 mit einer sinkenden Produktion von Thrombospondin-1 verbunden, wodurch endotheliale Zellen von dessen inhibitorischen Wirkung befreit werden (Dameron et al., 1994). Bei der Untersuchung von Tumorgewebe wurde deutlich, daß die normalerweise sorgfältig regulierte Expression von pro- und antiangiogenen Faktoren bei der pathologischen Angiogenese eher chaotisch abläuft. Die Blutgefäße im Tumorgewebe wachsen nämlich ohne erkennbare Richtung und sind darüber hinaus von unnatürlicher und dilatierter Morphologie (Bergers und Benjamin, 2003). Die Gefäße sind dann auch nicht als definierte Venolen, Arteriolen oder Kapillargefäße organisiert, sondern enden oftmals als Sackgasse (Bergers und Benjamin, 2003).

Eine weitere Eigenschaft, die die meisten Typen humaner Tumore früher oder später entwickeln, ist die Fähigkeit zu invasivem Wachstum und zur Bildung von Metastasen. So ist das Auswandern der Tumorzellen vom ursprünglichen Entstehungsort und die Ansiedlung in entfernten Organen und Geweben in 90 % der humanen Tumorerkrankungen für den Tod des betreffenden Patienten verantwortlich (Sporn, 1996). Das invasive Wachstum und die Metastasierung sind außerordentlich komplexe Prozesse und die genetischen und biochemischen Grundlagen sind noch nicht umfassend aufgeklärt. An der Verankerung von Zellen in ihrem umgebenden Gewebe sind verschiedene Proteinfamilien beteiligt, die in Zellen mit invasivem Potenzial in veränderter Art und Weise exprimiert werden. Bei den betreffenden Proteinen handelt es sich um Zelladhäsionsmoleküle (CAM), insbesondere um die Mitglieder der Immunglobulin- und Kalzium-abhängigen Cadherin-Familien, die Zell-Zell-Interaktionen vermitteln, und Integrine, die die Zellen mit der extrazellulären Matrix verbinden (Hanahan und Weinberg, 2000). Bemerkenswerterweise übertragen alle diese adhäsiven Interaktionen regulatorische Signale in die Zelle (Aplin et al., 1998). Eine häufig beobachtete Abweichung in der Interaktion zwischen Zelle und Umgebung in Tumoren findet man bei E-Cadherin. Die Kopplung zweier benachbarter Zellen über E-Cadherinbrücken induziert antiproliferative Signale, die via zyttoplasmatische Verbindungen mit β -Catenin an intrazelluläre Signalkreise weitergeleitet werden, und so auf den Transkriptionsfaktor Lef/TCF einwirken

(Christofori und Semb, 1999). Die Funktion von E-Cadherin ist offensichtlich in zahlreichen epithelialen Krebsarten gestört, beispielsweise durch inaktivierende Mutationen in den E-Cadherin- oder β -Catenin-Genen, durch Repression der Transkription oder durch Proteolyse der extrazellulären Cadherindomäne (Christofori und Semb, 1999). In kultivierten Tumorzellen und in einem transgenen Mausmodell, mit dem die Tumorentwicklung untersucht wurde, führt die erzwungene Expression von E-Cadherin zu einer Reduktion des invasiven und metastasierenden Phänotyps (Christofori und Semb, 1999). Bei E-Cadherin handelt es sich daher um einen wirksamen Suppressor von invasivem Wachstum und Metastasierung in epithelialen Tumorarten, dessen funktionelle Eliminierung einen entscheidenden Schritt für den Erwerb dieser Eigenschaft darstellt.

Weiterhin kann man in invasiven und metastasierenden Zellen Veränderungen in der Expression von Integrinen feststellen (Hanahan und Weinberg, 2000). Tumorzellen treffen bei invasivem und metastasierendem Wachstum auf neues Gewebe mit einer anderen Mikroumgebung, die neue Matrixkomponenten aufweist. Die erfolgreiche Bildung von Kolonien an diesen Orten erfordert eine Anpassung der Tumorzellen, die durch Variation im Expressionsspektrum der α - und β -Untereinheiten der Integrine erreicht wird (Hanahan und Weinberg, 2000). Mit diesen neuartigen Permutationen entstehen neue Integrinsubtypen mit eigenen Substratpräferenzen. Karzinomzellen fördern die Invasivität, indem das Expressionsspektrum der Integrine so geändert wird, daß eine bevorzugte Bindung an die degradierten Stromakomponenten, die von extrazellulären Proteasen erzeugt werden, möglich wird (Lukashev und Werb, 1998). Eine artifizielle Expression von speziellen Integrinuntereinheiten in kultivierten Zellen induziert oder inhibiert die Fähigkeit zu Invasion und Metastasierung, woraus die essentielle Rolle dieser Rezeptoren bei diesen Prozessen deutlich wird (Varner und Cheresch, 1996).

Ein weiterer wichtiger Parameter für das invasive und metastasierende Wachstum betrifft die extrazellulären Proteasen (Hanahan und Weinberg, 2000). Häufig ist die Expression von Proteasen induziert, die von Proteaseinhibitoren reprimiert und inaktive Proteasezymogene werden in aktive Enzyme konvertiert. Matrixdegradierende Proteasen sind typischerweise mit der Zelloberfläche assoziiert, indem sie als Transmembranproteine synthetisiert werden, mit spezifischen Rezeptoren verknüpft werden oder mit Integrinen assoziieren (Stetler-Stevenson, 1999). Es ist leicht nachvollziehbar, daß die Verankerung aktiver Proteasen auf der

Zelloberfläche das invasive Wachstum der Tumorzellen in das benachbarte Stroma, durch Gefäßwände und durch normale epitheliale Zellschichten fördert (Hanahan und Weinberg, 2000). Es ist aber nur schwer möglich, die Rolle bestimmter Proteasen in diesem Prozess eindeutig zu identifizieren, da sie ebenfalls an anderen Schlüsseleigenschaften wie der Angiogenese beteiligt sind und so direkt oder indirekt an invasivem Wachstum mitwirken (Hanahan und Weinberg, 2000).

3.2 Inflammation und neoplastische Progression

Die Effektormechanismen des Immunsystems können einerseits direkt gegen Tumorzellen gerichtet sein oder als Nebeneffekt im Rahmen von Infektion und Inflammation die Entwicklung und Progression von Tumorzellen inhibieren. Allerdings können Zytokine des Immunsystems auch das Wachstum von Tumorzellen antreiben, deren Empfänglichkeit für proapoptotische Stimuli entscheidend reduzieren und darüber hinaus invasives Wachstum und die Bildung von Metastasen fördern. Das Immunsystem spielt daher offenbar in der Entwicklung von Tumoren eine ambivalente Rolle. So konnte in einigen Arbeiten gezeigt werden, daß intratumorale lymphozytäre Infiltrate in Neoplasien früher Entwicklungsstadien deutlich mit einer Reduktion der Entwicklung von Metastasen korrelieren und dieser Effekt bei verschiedenen Krebsarten mit einer erhöhten Überlebensrate der betroffenen Patienten verbunden ist (Dranoff, 2004). Daraus geht hervor, daß es Effektormechanismen des Immunsystems geben muß, die die Progression der Tumorentwicklung abschwächen. Alternative epidemiologische Daten zeigen aber, daß diverse Formen der chronischen Inflammation das Risiko der malignen Transformation erheblich steigern, so daß die anhaltende Reaktivität des Immunsystems offenbar die Tumorentwicklung fördert (Coussens und Werb, 2002). Die Untersuchung von Gewebeproben aus Krebserkrankungen, in denen bereits eine Dissemination der Tumorzellen eingetreten war, eröffnete ein weiteres Szenario der Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Immunsystem, da in diesen Proben keine Infiltrate bestehend aus Immunzellen gefunden werden konnten. Diese Tumorzellen können offenbar ihre Detektion durch das Immunsystem vermeiden (Dranoff, 2004).

Tumorzellen exprimieren häufig Stress-bezogene Genfamilien wie MICA und MICB, die als Liganden für NKG2D-Rezeptoren von „natural killer cells“ (NK-Zellen), zytotoxischen T-Lymphozyten und Phagozyten dienen (Dranoff, 2004). Weiterhin überwachen NK-Zellen mit Hilfe einer Kombination aus aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren wie den „killer cell inhibitory immunoglobulin-like receptors“ (KIR) die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen, deren Verlust gewöhnlich während der Karzinogenese zu beobachten ist (Karre, 2002). Dendritische Zellen können über die Interaktion des Rezeptors CD36 und dem Integrin $\alpha_V\beta_5$ mit den korrespondierenden Liganden CD36L bzw. $\alpha_V\beta_5L$ auf der Oberfläche von Tumorzellen apoptotische Zellen phagozytieren. Nekrotische Tumorzellen setzen außerdem „heat shock“-Proteine frei, die als Chaperone für die Aufnahme von tumorspezifischen Peptiden über sogenannte „scavenger receptors“ oder CD91 durch dendritische Zellen oder Makrophagen dienen (Dranoff, 2004).

Die Erkennung von Tumorzellen durch das adaptive Immunsystem wird über einen indirekten Mechanismus namens „cross priming“ ermöglicht. Tumorzellen exprimieren typischerweise keine kostimulatorischen Moleküle, wie zum Beispiel die Mitglieder der B7-Familie, die für eine direkte Induktion einer wirksamen, über T-Lymphozyten vermittelten Immunantwort von Bedeutung sind (Sharpe und Freeman, 2002). Eine Aktivierung der T-Zell-vermittelten Effektormechanismen wird möglich, nachdem dendritische Zellen Bruchstücke von Tumorzellen phagozytiert und das Material für die Präsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen prozessiert haben. Als professionelle Antigen-präsentierende Zellen exprimieren die dendritischen Zellen auch die erforderlichen kostimulatorischen Moleküle wie B7-1 und B7-2 und stimulieren in regionalen Lymphknoten die tumorspezifischen Lymphozyten (Dranoff, 2004). Über diesen Mechanismus werden CD4- und CD8-positive T-Zellen aktiviert, die auf MHC-restringierte Tumorpeptide reagieren. Die bisher identifizierten tumorspezifischen Antigene klassifiziert man entsprechend ihres Expressionsprofils. Bei einer Gruppe handelt es sich um Antigene, deren codierende Gene in einer Vielzahl von Tumoren exprimiert werden, wohingegen in normalen Geweben mit Ausnahme von Plazenta und Testes die Expression nicht nachweisbar ist, wie zum Beispiel die Mitglieder der MAGE-Genfamilie (Vigneron et al., 2002). Weitere Klassen tumorspezifischer Antigene sind Differenzierungsmarker wie Tyrosinase, die in normalen Melanozyten und Melanomen exprimiert wird, oder Antigene von Genen

wie *PRAME* und *Her-2/neu*, die in Tumorzellen überexprimiert werden (Vigneron et al., 2002). Neben diesen Antigenen, die für zahlreiche verschiedene Tumore charakteristisch sind, gibt es solche, die von mutierten tumorassoziierten Genprodukten stammen und somit nicht in verschiedenen Tumoren nachweisbar sind, sondern spezifisch für einen bestimmten Tumor sind (Vigneron et al., 2002). Die Erkennung dieser Antigene über CD4-positive T-Zellen ermöglicht neben der Induktion einer Zell-vermittelten Immunität auch die Produktion von spezifischen Antikörpern gegen amplifizierte oder mutierte Tumorantigene (Dranoff, 2004). Anhand der Entwicklung klinisch evidenter Tumore wird aber ersichtlich, daß diese Immunreaktionen nicht immer die Progression von Tumorzellen verhindern können, da manche Zellen der Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem entkommen können. Die Mechanismen, auf der das Mißlingen der Immunabwehr von Tumoren beruht, sind noch nicht umfassend aufgeklärt, aber dabei spielt höchstwahrscheinlich ineffizientes „cross priming“ ebenso eine Rolle wie die Entstehung von Toleranz gegenüber Selbstantigenen (Dranoff, 2004). Auch die Produktion von immunsuppressiven Faktoren durch die Tumorzellen und deren genomische Instabilität tragen dazu bei, daß Tumorzellen trotz der Überwachung durch das Immunsystem proliferieren können (Dranoff, 2004).

Eine Variable, die entscheidend für die Reaktion des Immunsystems auf die Tumorprogression sein kann, ist das in der Mikroumgebung des Tumors produzierte Spektrum an Zytokinen. Um die inhibitorische Wirkung von Zytokinen im Rahmen der Tumorentstehung zu analysieren, wurde von verschiedenen Gruppen die Empfindlichkeit immundefizienter Mäuse gegenüber chemischen Karzinogenen untersucht. So konnte gezeigt werden, daß Mäuse mit defektem Interferon- γ (IFN- γ)-Signalweg im Vergleich zu Kontrolltieren mit einer gesteigerten Bildung von Tumoren bei gleichzeitig kürzerer Latenzzeit auf die Behandlung mit dem polyzyklischen Kohlenwasserstoff Methylcholanthren reagieren (Kaplan et al., 1998; Street et al., 2001; Qin et al., 2002). Eine vergleichbar sensitive Reaktion auf Karzinogene konnte auch in Mäusen mit IFN- γ - oder IFN- γ -Rezeptor-Defizienz ebenso wie mit STAT1-Defizienz, einem für die Signalgebung von IFN- γ wichtigen Transkriptionsfaktor, festgestellt werden (Dranoff, 2004). Ein defekter IFN- γ -Signalweg wirkt sich in vielfältiger Weise auf die Tumorentstehung aus, z. B. durch die Abschwächung von Wachstumskontrolle und Sensitivität gegenüber proapoptotischen Stimuli in den

Zielzellen. Insbesondere fehlt in solchen Tieren die IFN- γ -induzierte Produktion von MHC-Klasse-I-Molekülen, die für die adaptive Immunität wichtig ist (Dranoff, 2004). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Tumorprogression durch eine Inflammation bedeutend gefördert werden kann. Tatsächlich entwickelt sich an Orten chronischer Infektion und Inflammation oftmals Krebs (Coussens und Werb, 2002). In einem entzündlichen Mikromilieu teilen sich auch diejenigen Zellen kontinuierlich, die der anhaltenden Schädigung der Erbinformation durch Mutagene ausgesetzt sind, da deren Proliferation durch die Präsenz inflammatorischer Zellen in Kombination mit Wachstums- und Überlebensfaktoren gefördert wird (Coussens und Werb, 2002). Eine Schlüsseleigenschaft der normalen Inflammation ist die Selbstbegrenzung der Immunantwort nach erfolgreicher Abwehr der Pathogene. Die Dysregulation der miteinander verknüpften humoralen und zellulären Immunität kann schließlich zu pathologischen Abnormalitäten führen, was bei der neoplastischen Progression der Fall zu sein scheint (Coussens und Werb, 2002). Tumorzellen können einerseits die Produktion von Zytokinen und Chemokinen selbst übernehmen und so die Rekrutierung von Leukozyten fördern. Andererseits wurden in Tumoringfiltraten diverse Leukozyten, wie Neutrophile und Eosinophile, Makrophagen, Mastzellen, Lymphozyten und dendritische Zellen, gefunden, die durch die Produktion eines entsprechenden Spektrums an Zytokinen, zytotoxischen Mediatoren wie reaktive Sauerstoffspezies, Serin- und Cysteinproteasen, Matrixmetalloproteinasen und membranperforierenden Agenzien, die neoplastische Transformation antreiben können (Coussens und Werb, 2002). Eine entscheidende Komponente der inflammatorischen Infiltrate neoplastischer Gewebe sind die tumorassoziierten Makrophagen (TAM), an denen die ambivalente Funktion des Immunsystems besonders deutlich wird. Nach der Stimulation der TAMs mit IL2, Interferon und IL12 können sie neoplastische Zellen eliminieren (Tsung et al., 2002). Im Gegenzug produzieren sie aber eine Vielzahl angiogener und lymphangiogener Wachstumsfaktoren, Zytokine und Proteasen, die die neoplastische Progression deutlich steigern können (Schoppmann et al., 2002). Darüber hinaus konnte dokumentiert werden, daß TAMs und Tumorzellen IL10 produzieren, das effektiv die antitumorale Wirkung von zytotoxischen T-Zellen abschwächt. Bei der Entwicklung von Melanomen bilden aktivierte Makrophagen TGF- β , TNF- α , IL1- α , Metaboliten von Arachidonsäure und extrazelluläre Proteasen (Torisu et al., 2000). Melanozyten synthetisieren als Antwort darauf IL8 und „vascular endothelial growth factor A“

(VEGF-A) und induzieren so die vaskuläre Angiogenese unter parakriner Kontrolle (Torisu et al., 2000). Die Infiltration durch Makrophagen ist daher eng verknüpft mit der Invasivität primärer Melanome, die teilweise auf der von Makrophagen regulierten tumorassoziierten Angiogenese beruht (Ono et al., 1999). Weiterhin konnte beobachtet werden, daß TAMs während der Entwicklung humaner Cervixkarzinome VEGF-C und -D sowie den Rezeptor VEGF-R-3 produzieren, die an der Bildung von Lymphgefäßen und lymphatischen Metastasen beteiligt sind (Schoppmann et al., 2002). Da die TAMs somit im Zentrum bei der Rekrutierung und Reaktion auf angiogene und lymphangiogene Stimuli stehen, können sie die Dissemination von Tumoren begünstigen.

Die funktionelle Bedeutung der Rekrutierung von Makrophagen an Orte des neoplastischen Wachstums wurde auch mit transgenen Mausmodellen untersucht und demonstriert. Die Tiere einer transgenen Linie, die das „polyoma virus middle“ (PyMT)-Gen unter der Kontrolle des „mouse mammary tumour virus long terminal repeat“ (MMTV-LTR) exprimieren, sind besonders anfällig für die Entwicklung von Brustkrebs (Lin et al., 2001). Werden diese Mäuse mit „colony stimulating factor 1“ (CSF-1)-defizienten Tieren gekreuzt, läßt sich in den Nachkommen beobachten, daß die CSF-1-Nullmutation zwar nicht die Entwicklung der neoplastischen Frühstadien hemmen kann, aber die Entstehung von invasiven Karzinomen und pulmonären Metastasen im Spätstadium ist deutlich reduziert (Lin et al., 2001). Wird die Expression von CSF-1 gezielt im Brustepithel der CSF-1/PyMT-Mäuse aktiviert, kann man außer der Rekrutierung von Makrophagen ebenfalls die Entwicklung primärer Tumore und die Bildung von Metastasen beobachten (Wahl und Kleinman, 1998). Diese Experimente zeigen die kausale Verbindung zwischen CSF-1-abhängigen infiltrierenden Makrophagen und dem malignen Potenzial epithelialer Zellen auf. Weitere Experimente zeigen darüber hinaus die Funktion von Neutrophilen, Eosinophilen, Mastzellen und aktivierten T-Lymphozyten, die ebenfalls durch Produktion von extrazellulären Proteasen, proangiogenen Faktoren und Chemokinen an der Potenzierung der neoplastischen Prozesse beteiligt sind (Coussens und Werb, 2002).

Die Involvierung inflammatorischer Zellen an der neoplastischen Progression läßt sich daher kaum abweisen, es stellt sich aber die Frage, aufgrund welcher Ereignisse die inflammatorischen Zellen ursächlich mit in das Geschehen einbezogen werden? Eine gängige Hypothese dazu ist, daß sich zahlreiche bösartige Tumore im Bereich

von Infektionen und Inflammationen als Begleiteffekt der regulären Immunantwort bilden (Coussens und Werb, 2002). Es ist darüber hinaus bekannt, daß persistierende Infektionen zu chronischer Inflammation führen. Leukozyten und phagozytierende Zellen verursachen in normalen proliferierenden Zellen DNS-Schäden durch die Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffradikalen, die eigentlich die Infektion bekämpfen sollen (Maeda und Akaike, 1998). Eine andauernde Schädigung und Regeneration des Gewebes in der Anwesenheit der hochreaktiven Radikale wirkt sich auch auf das Genom im proliferierenden Epithel aus und so kann es zu permanenten genomischen Veränderungen durch Punktmutationen, Deletion und Rekombination kommen (Coussens und Werb, 2002). Tatsächlich kann man Mutationen in p53 in vergleichbarer Häufigkeit nachweisen, wenn sich Tumore in Begleitung chronisch inflammatorischer Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis oder Morbus Crohn entwickelt haben (Yamanishi et al., 2002). Eine deutliche Assoziation von chronischer Entzündung und maligner Erkrankung ist bei der Entwicklung von Colonkarzinomen in Patienten mit Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn zu beobachten (Coussens und Werb, 2002). Auch eine chronische Infektion mit *Helicobacter pylori* ist als Hauptursache für die Entstehung von Magenkarzinomen anerkannt (Ernst und Gold, 2000). Durch die chronische Inflammation werden im Laufe der Zeit umfangreiche DNS-Schäden induziert, die schließlich zur Entwicklung von Magenkarzinomen führen (Ernst und Gold, 2000). Neben den durch die inflammatorischen Zellen direkt verursachten DNS-Schäden verschlimmert die Synthese des „macrophage migration inhibitory factors“ (MIF) durch Makrophagen und T-Lymphozyten die Situation erheblich. Bei MIF handelt es sich um ein potentes Zytokin, das die transkriptionelle Aktivität von p53 unterdrückt (Hudson et al., 1999). Die dauerhafte Suppression der regulativen Funktionen von p53 in infiltrierten Geweben kann die Proliferation fördern und die Lebensspanne ausdehnen (Hudson et al., 1999). Nebenbei wird ein Milieu geschaffen, in dem die normale zelluläre Reaktion auf DNS-Schäden unterdrückt und die Akkumulation potenziell onkogener Mutationen verstärkt wird (Coussens und Werb, 2002). Auch mit Hilfe von transgenen Tiermodellen konnte demonstriert werden, daß persistierende Infektionen zur Tumorentwicklung beitragen können. In GM-CSF/IFN- γ -„double-knockout“-Mäusen entstehen bei chronischer Infektion und Inflammation diverse hämatologische und solide Neoplasien, die sich in den Wildtyp-Mäusen innerhalb eines vergleichbaren Zeitraumes nicht bilden (Dranoff, 2004). Die

Entwicklung von Lymphomen und soliden Tumoren in diesen Mäusen kann durch eine antimikrobielle Therapie inhibiert werden, woraus nicht nur hervorgeht, daß infektiöse Keime die Tumorentstehung begünstigen, sondern daß GM-CSF und IFN- γ Schlüsselfunktionen bei der Unterdrückung von mikrobiell-induzierten Tumoren übernehmen (Dranoff, 2004). Auch durch Virusinfektionen mit DNS-Tumoviren können Zellen direkt transformiert werden, indem aktive Onkogene in das Genom inseriert werden, obwohl weitere Mechanismen ebenfalls daran beteiligt sein müssen. Das Epstein-Barr-Virus verursacht die anhaltende Proliferation von B-Lymphozyten, die in Kombination mit einer sekundären Mutation zu neoplastischer Progression und maligner Konversion führen kann und so in der Entstehung des Burkitt-Lymphoms resultiert (Coussens und Werb, 2002). Die chronische Infektion mit Hepatitis-B- oder -C-Viren (HBV/HCV) erhöht das Risiko der Entstehung von hepatozellulären Karzinomen. Allerdings sind die molekularen Mechanismen wenig verstanden, obwohl es Anzeichen für eine klonale Integration viraler DNS in Tumorzellen und das umgebende Parenchym gibt (Coussens und Werb, 2002). Dennoch konnte in diesen viralen Genomen keine definierten transformierenden Sequenzen identifiziert werden, die als virale Onkogene wirken. Außerdem gibt es keine Hinweise für die Aktivierung eines typischen zellulären Onkogens oder die Inaktivierung eines zellulären Tumorsuppressors durch die virale Infektion (Coussens und Werb, 2002). Das „HCV core protein“ interagiert aber mit dem „signal transducer and activator of transcription 3“ (STAT3), einem Transkriptionsfaktor, der an der Zytokinsignalgebung beteiligt ist (Bromberg und Darnell, 2000). Diese Interaktion führt zu einer verstärkten Proliferation und Expression von Bcl-X_L und Zyklin-D. Eine chronische virale Replikation in Hepatozyten kann daher das lokale Zytokinprofil und in infizierten Zellen die Reaktion auf proapoptotische und proliferative Signale ändern (Bromberg und Darnell, 2000). Die Immunreaktion gegen virale Proteine resultiert wiederum in einer chronischen Inflammation (Coussens und Werb, 2002).

Ein zusätzlicher wichtiger Hinweis auf die Bedeutung der Inflammation für die neoplastische Progression kommt aus der Analyse des Krebsrisikos unter Langzeitbehandlung von Patienten mit Aspirin und nicht-steroidalen Antirheumatika. Viele Daten demonstrieren, daß die Einnahme dieser Medikamente das Risiko der Entstehung von Colonkarzinomen um 40-50 % reduziert und auch vor Lungen-, Ösophagus- und Magenkarzinomen schützt (Coussens und Werb, 2002).

3.3 Apoptose

In multizellulären Organismen besteht die Notwendigkeit, überschüssige oder potenziell gefährliche Zellen zu entfernen. Diesem Zweck dient der sogenannte programmierte Zelltod, ein besonderes molekulares Programm, für das Currie und Mitarbeiter den Begriff Apoptose prägten. Damit beschrieben diese Autoren eine weit verbreitete Form des Zelltodes, den sie in verschiedenen Geweben und Zelltypen beobachten konnten (Kerr et al., 1972). In der Embryonalentwicklung ist der programmierte Zelltod von großer Bedeutung für die Gestaltgebung von Strukturen wie Fingern oder Zehen beim Menschen bzw. bei der Maus (Baehrecke, 2002). Auch in späteren Lebensphasen kann Apoptose beobachtet werden, beispielsweise im Immunsystem der Vertebrata, wo autoreaktive Lymphozyten während der Entwicklung durch Induktion des programmierten Zelltodes ausselektioniert werden (Krammer, 2000).

Für die charakteristischen morphologischen Änderungen in apoptotischen Zellen ist die gezielte Aktivierung einer Reihe von Cysteinproteasen verantwortlich. Aufgrund ihrer Homologie fasst man diese Proteasen in der Caspasefamilie zusammen (Hengartner, 2000; Degterev et al., 2003). Die Identifikation von Caspasen in *C. elegans* und *Drosophila* zeigt, daß die für die Exekution von Apoptose erforderliche Grundausstattung evolutionär konserviert ist (Degterev et al., 2003). Derzeit sind mit Caspase-1 bis -10 und Caspase-14 insgesamt 11 humane Caspasen bekannt. Das ursprünglich als Caspase-13 klassifizierte Protein stellte sich später als bovines Homolog von Caspase-4 dar und bei Caspase-11 und -12 handelt es sich um murine Enzyme, die höchstwahrscheinlich Homologe der humanen Caspasen 4 und 5 sind (Degterev et al., 2003). Den Mitgliedern der Caspasefamilie ist eine katalytische Triade gemeinsam, die aus einem Cystein (Cys 285), einem Histidin (His 237) und der Carbonylgruppe der Aminosäure in Position 177 im aktiven Zentrum gebildet wird (nummeriert entsprechend der Proteinsequenz von Caspase-1; Degterev et al., 2003). Ein weiteres Merkmal der Caspasen ist die Spaltung von Substraten nach Asparaginsäureresten, wobei die Substratspezifität der Caspasen von den der Spaltstelle vorangehenden Aminosäuren bestimmt wird (Hengartner, 2000). Sämtliche Caspasen werden als inaktive Zymogene synthetisiert und enthalten eine Prodomäne gefolgt von einer großen und einer kleinen Untereinheit. Die Aktivierung der Zymogene erfolgt über eine Reihe von Spaltungen, wobei zunächst die kleine

von der großen Untereinheit abgetrennt wird, gefolgt von der Entfernung der Prodomäne (Degterev et al., 2003). Aufgrund der Funktion werden die Mitglieder der Caspasefamilie den Untergruppen der Initiator- bzw. der Effektorcaspasen zugeordnet (Degterev et al., 2003). Die Initiatorcaspasen verfügen über eine große Prodomäne, die eines von zwei typischen Protein-Protein-Interaktionsmotiven aufweisen: Caspase-8 und -10 enthalten die sogenannte „death effector domain“ (DED), wohingegen in Caspase-1, -2, -4, -5, -9, -11 und -12 die „caspase activation and recruitment domain“ (CARD) vorhanden ist (Degterev et al., 2003). Diese großen Prodomänen bilden die Grundlage für die Interaktion mit „upstream“ angeordneten Adaptermolekülen, die die Aktivierung der Initiatorcaspasen vermitteln. Die Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7), die für die eigentliche Ausführung des apoptotischen Programms durch Proteolyse zahlreicher zellulärer Substrate verantwortlich sind, werden typischerweise von den Initiatorcaspasen prozessiert und aktiviert und enthalten lediglich kurze Prodomänen (Degterev et al., 2003). Die Initiatorcaspasen 8 und 9 zeigen selbst als Zymogene eine erhebliche Grundaktivität, die sich durch Prozessierung um das 10- bis 100-fache steigern läßt (Degterev et al., 2003). Die Effektorcaspase 3 zeigt im Gegensatz dazu in der Proform eine deutlich niedrigere basale Aktivität, die sich durch Prozessierung aber um mehr als das 10000-fache steigern läßt, so daß in diesem Sinne nur die Effektorcaspasen als echte Zymogene anzusehen sind (Stennicke und Salvesen, 1999).

Aktivierte Caspasen schneiden selektiv eine begrenzte Auswahl an Substraten an einer oder wenigen Schnittstellen (Hengartner, 2000). In den meisten Fällen führt die Spaltung des Substrates zu dessen Inaktivierung, aber Caspasen können Proteine auch direkt durch Entfernung einer negativ-regulatorischen Untereinheit oder indirekt durch Inaktivierung einer regulatorischen Untereinheit aktivieren (Hengartner, 2000). Zu den Substraten der Caspasen gehören nicht nur Struktur-erhaltende Proteine, wie zum Beispiel die nukleären Lamine, oder Proteine des Zytoskeletts, wie Folin und Gelsolin, deren Spaltung für die offensichtlichen morphologischen Veränderungen, wie Schrumpfung und „budding“ des Nukleus respektive dem Verlust der zellulären Gestalt, verantwortlich ist (Hengartner, 2000). Weitere Substrate der Caspasen sind Proteine, die direkt an der Regulation und Exekution von Apoptose beteiligt sind, wie zum Beispiel andere Caspasen oder das Bcl-2-Familienmitglied Bid. Die Nuklease „caspase-activated DNase“ (CAD) schneidet genomische DNS internukleosomal und generiert so die charakteristischen Fragmente der „apoptotic DNA ladder“ (Nagata,

2000). In lebenden Zellen liegt CAD als inaktiver Komplex mit der inhibitorischen Untereinheit ICAD vor und mit der Caspase-3-vermittelten Spaltung des Inhibitors wird die katalytische Untereinheit freigesetzt und aktiviert (Enari et al., 1998). Neben diesen Substraten spalten Caspasen regulatorische Proteine und Signalproteine und modulieren so Signalwege und Regelkreise. Mit der Spaltung zellulärer Reparaturproteine durch Caspasen kann die Ausführung von Apoptose beschleunigt und sichergestellt werden. Das anschaulichste Beispiel bietet das DNS-Reparaturenzym Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP), das durch Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNS aktiviert wird und welches die Anbindung von ADP-Ribosepolymeren an zahlreiche nukleäre Faktoren katalysiert und dadurch die Reparatur beschleunigt (Degterev et al., 2003). Allerdings erfordert dieser Prozess große Mengen an NAD⁺ und erschöpft damit indirekt die zellulären ATP-Vorräte. Die Aufzehrung von ATP verhindert aber die Exekution des apoptotischen Programms und induziert stattdessen Nekrose. Die beobachtete Caspase-vermittelte Spaltung und Inaktivierung von PARP während der Apoptose garantiert damit, daß parallel keine nekrotischen Prozesse stattfinden können (Degterev et al., 2003).

Die Aktivierung der Initiatorcaspasen (Procaspase-8, -9, und -10) wird über Induktion des extrinsischen oder intrinsischen Signalweges ausgelöst (Kaufmann und Vaux, 2003). Eine zentrale Funktion im intrinsischen apoptotischen Signalweg besitzen die Mitochondrien, da im Intermembranraum zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran proapoptotische Moleküle lokalisiert sind (Saelens et al., 2004). Bei diesen zytotoxischen Proteinen handelt es sich um Cytochrom-c, Endonuklease-G und „apoptosis inducing factor“ AIF sowie die kürzlich identifizierten „second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low PI“ (Smac/DIABLO) und „high temperature requirement protein A2“ (HtrA2/Omi). Die Membranintegrität der „outer mitochondrial membrane“ (OMM) sichert die Sequestrierung dieser Komponenten, sie kann aber durch die Oligomerisierung der proapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder Bax und Bak (Kuwana et al., 2002), oder durch die Bildung von Megaporen, den sogenannten „permeability transition pore complexes“ (PTPC), zerstört werden. Das führt zur Permeabilisierung der OMM und somit zur Freisetzung einer Vielzahl von Proteinen aus dem Intermembranraum, darunter auch die genannten Faktoren, die das apoptotische Programm in Gang setzen können (Saelens et al., 2004). Der intrinsische Signalweg wird über unterschiedliche Arten von zellulärem Stress wie UV-Strahlung und DNS-Schäden,

Influx von Ca^{2+} -Ionen oder dem Entzug von Wachstumsfaktoren induziert (Vogelstein et al., 2000). Auch während der Tumorigenese treten physiologische Zustände wie Hypoxie, deregulierte Expression von Onkogenen oder Erosion der Telomere ein, die als „gatekeeper“-Sicherheitsmechanismen diesen intrinsischen apoptotischen Signalweg aktivieren (Vogelstein et al., 2000). Die Wahrnehmung von zellulärem Stress und Schäden erfolgt über die „BH3-only proteins“ aus der Bcl-2-Familie. Konstitutiv synthetisierte „BH3-only proteins“ werden unter normalen Bedingungen in inaktivem Zustand bereitgehalten und bei Bedarf über unterschiedliche Mechanismen aktiviert. So wird zum Beispiel Bid nach der Phosphorylierung durch Kinasen wie Akt/PKB oder Proteinkinase-A von Mitgliedern der 14-3-3-Familie zunächst zurückgehalten und die Aktivierung erfordert eine Dephosphorylierung durch Calcineurin (Cory et al., 2003). Wie bereits angesprochen wird die Aktivierung von Bid durch Caspase-8 oder Granzym-B-vermittelte proteolytische Spaltung eingeleitet, so daß über diese Querverbindung auch eine Amplifikation des extrinsischen apoptotischen Signalweges möglich ist (Cory et al., 2003). Aktivierte „BH3-only proteins“ binden meistens an Bcl-2 und weitere antiapoptotische Homologe und neutralisieren so deren überlebensfördernde Funktion.

Für die Initiation von Apoptose über den intrinsischen Weg ist die Aktivierung von Procaspase-9 essentiell, die durch einen Proteinkomplex namens Apoptosom möglich wird. Die Bildung des Apoptosoms aus 7 Apaf-1-Molekülen wird mit der angesprochenen Freisetzung von Cytochrom-c aus den Mitochondrien induziert (Saelens et al., 2004). Das Apaf-1-Protein enthält eine aminoternale CARD-Domäne, die in inaktivem Zustand durch eine entsprechende Krümmung des Proteins zwischen zwei β -Propellerdomänen in der carboxyterminalen Region verborgen wird. Durch diese Konformation wird die Autoaggregation mehrerer Apaf-1-Moleküle über dieses Protein-Protein-Interaktionsmotiv verhindert (Acehan et al., 2002). Das ins Zytosol entlassene Cytochrom-c verdrängt die CARD-Domäne aus dem Raum zwischen den β -Propellerdomänen und das Apaf-1-Molekül kann eine entspannte Konformation einnehmen, die durch Bindung von ATP und dATP an die interne „nucleotide binding site“ (NBS) fixiert wird (Acehan et al., 2002). Über die jetzt exponierte CARD-Domäne ist die Oligomerisierung mehrerer APAF-1-Moleküle möglich und es entsteht ein Rad-ähnliches Aggregat, das in seinem Zentrum eine hohe lokale Konzentration an CARD-Domänen aufweist (Acehan et al., 2002). Diese molekulare Plattform rekrutiert Procaspase-9 via Interaktion der CARD-Domänen.

Die Aktivierung von Caspase-9 wurde lange Zeit als einzigartig innerhalb der Caspasefamilie angesehen, da die volle katalytische Aktivität durch eine Konformationsänderung erreicht wird und eine proteolytische Spaltung dafür nicht zwingend erforderlich ist (Degterev et al., 2003). Entsprechend den Ergebnissen von Acehan und Mitarbeitern erfordert die Aktivierung von Procaspase-9 die Bindung monomerer Zymogene an das Apoptosom, woraufhin sich anschließend aktive Caspasedimere bilden können. Die autoproteolytische Spaltung eröffnet nun die Möglichkeit, die Aktivität von Caspase-9 am Apoptosom regulieren zu können, da Mitglieder der „inhibitor of apoptosis“ (IAP)-Proteinfamilie an den nach der Prozessierung exponierten Aminoterminus der kleinen Untereinheit der Caspase binden können und so deren Aktivität inhibieren (Acehan et al., 2002). Aktive Caspase-9 induziert die Exekution des apoptotischen Programms durch proteolytische Prozessierung der Effektorcaspasen 3 und 7 (Degterev et al., 2003). Auch die katalytische Aktivität dieser Caspasen unterliegt der direkten Inhibition durch Mitglieder der IAP-Proteinfamilie, deren Charakteristikum die sogenannte „baculoviral IAP repeat“ (BIR)-Domäne ist (Liston et al., 2003). Die zugehörigen Mitglieder verfügen über eine bis drei Kopien dieses evolutionär konservierten Motivs. Die Exekution des apoptotischen Programms durch die Effektorcaspasen wird insbesondere von XIAP, cIAP1, cIAP2 und NAIP verhindert, wobei XIAP außerdem ein effizienter Inhibitor von Caspase-9 ist (Saelens et al., 2004). In Säugerzellen wird die von den IAP-Proteinen aufgebaute antiapoptotische Barriere durch die antagonistischen, IAP-bindenden Proteine Smac/DIABLO und HtrA2/Omi überwunden (Saelens et al., 2004). Smac/DIABLO kann mit seinem „IAP binding motif“ (IBM)-Motiv an XIAP, cIAP1 und cIAP2 binden und verdrängt dadurch Caspase-9 aus dem Komplex mit XIAP, was wiederum die Aktivierung von Caspase-9 fördert (Saelens et al., 2004). Auch HtrA2/Omi kompetiert mit Caspase-3, -7 und -9 um die Bindung an XIAP, cIAP1 und cIAP2 und unterstützt so die Aktivierung der Caspasen (Saelens et al., 2004). Mit Hilfe der Serinprotease-Aktivität kann HtrA2/Omi gebundene IAP-Proteine außerdem proteolytisch spalten und diese irreversibel inaktivieren (Saelens et al., 2004). Bei der Permeabilisierung der Mitochondrienmembran werden außerdem Endonuklease-G und AIF freigesetzt, die zur Kondensation des Chromatins und der DNS-Fragmentierung im Nukleus beitragen (Saelens et al., 2004).

In Vertebrata hat sich ein zusätzlicher proapoptotischer Signalweg entwickelt, bei dem die Aktivierung von Procaspase-8 und der homologen Procaspase-10 durch Stimulation von Transmembranrezeptoren induziert wird. Da dieser Mechanismus offensichtlich von extrazellulären Signalen abhängt, spricht man auch vom extrinsischen Signalweg. Bei den Rezeptoren, die zur Initiation von Apoptose fähig sind, handelt es sich um eine Subgruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie, die aufgrund dieser Fähigkeiten auch als Todesrezeptoren bezeichnet wird (Ashkenazi, 2002). Allgemein zeichnen sich die Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie durch homologe Proteinsequenzen in der extrazellulären Domäne aus, insbesondere durch die charakteristischen Cystein-reichen Domänen (CRD), von denen in aller Regel 3 bis 4 am Aminoterminal der Rezeptoren vorhanden sind (Ashkenazi, 2002). Innerhalb der zytoplasmatischen Domäne konnte kein übergeordnetes strukturelles Motiv identifiziert werden, das in allen Rezeptoren dieser Familie nachweisbar wäre. Allerdings verfügen die Vertreter aus der Subgruppe der Todesrezeptoren über eine definierte zytoplasmatische Domäne aus ungefähr 80 Aminosäuren, die man als „death domain“ (DD) bezeichnet (Ashkenazi, 2002). Bei den am fundiertesten erforschten Todesrezeptoren handelt es sich um CD95/Fas (Itoh et al., 1991), TNF-R1 (Schall et al., 1990), TRAIL-R1/DR4 (Pan et al., 1997) und TRAIL-R2/DR5 (Walczak et al., 1997). Die Funktion von DR3/TRAMP (Chinnaiyan et al., 1996) und DR6 (Pan et al., 1998) ist dagegen noch nicht umfassend aufgeklärt. Eine charakteristische DD ist weiterhin im „nerve growth factor receptor“ (NGFR), der ebenfalls Zelltod induzieren kann, enthalten (Liepinsh et al., 1997) und DD-verwandte Sequenzen konnten auch in der zytoplasmatischen Domäne des EDA-Rezeptors EDAR identifiziert werden (Locksley et al., 2001).

Die signalgebende Grundeinheit der TNF-Rezeptor-Superfamilie besteht aus drei Rezeptoren, an die der entsprechende trimere Ligand bindet. Lange Zeit wurde angenommen, daß drei Rezeptormonomere durch den trimeren Liganden zum endgültigen Ligand-Rezeptor-Komplex rekrutiert und zusammengefügt werden (Locksley et al., 2001). Neuere Ergebnisse haben aber gezeigt, daß bestimmte Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie schon vor der Bindung des Liganden in oligomeren Komplexen auf der Zelloberfläche vorliegen (Chan et al., 2000 a und b). Die Liganden-unabhängige Assoziation von Rezeptormonomeren wird durch eine aminoterminal Region namens „pre-ligand assembly domain“ (PLAD) vermittelt (Chan et al., 2000 a und b). Dieses PLAD-Motiv ist innerhalb der ersten Cystein-

reichen Domäne von Fas, TNF-R1, TNF-R2, TRAIL-R1 und CD40 identifiziert worden und deren Existenz impliziert, daß zumindest die Trimerisierung dieser Rezeptoren nicht durch den entsprechenden Liganden ausgelöst wird, sondern daß der Ligand an einen bereits assoziierten trimeren Rezeptorkomplex bindet und eine Konformationsänderung induziert, die eine Signalgebung ermöglicht und fördert (Ashkenazi, 2002).

Die Todesrezeptoren bilden nach der Bindung der entsprechenden Liganden aus der TNF-Liganden-Superfamilie multimere Komplexe, die die Aktivierung der apikalen Caspasen ermöglichen (Debatin und Kramer, 2004). Der entstehende Rezeptorkomplex wird als „death-inducing signaling complex“ (DISC) bezeichnet und ist ausführlich anhand des CD95/Fas-Rezeptors charakterisiert worden, dessen Hauptfunktion die Induktion von Apoptose ist (Peter und Kramer, 2003). Der präassoziierte CD95/Fas-Rezeptor wird nach Bindung des membranständigen Liganden CD95L/FasL aktiviert und zur Bildung des DISC fähig. Das Adaptermolekül „Fas associated DD containing protein“ (FADD) kann über homophile Interaktion seiner DD an die aggregierten Todesdomänen des Rezeptorkomplexes binden (Peter und Kramer, 2003). Am Aminoterminal besitzt FADD eine „death effector domain“ (DED), mit deren Hilfe das Adaptermolekül eine Verbindung zu Caspase-8 und -10 herstellen kann. Über homophile Interaktion mit FADD werden Procaspase-8 und -10 aus dem Zytoplasma in den DISC rekrutiert (Peter und Kramer, 2003).

Das „induced proximity“-Modell erklärt die Aktivierung der apikalen Caspasen mit Hilfe ihrer basalen Aktivität. Werden diesem Modell zufolge zwei Caspase-8-Monomere im DISC in enge räumliche Nachbarschaft zueinander gebracht, genügt deren niedrige basale Aktivität, um die benachbarte Procaspase proteolytisch zu spalten und somit vollständig zu aktivieren (Salvesen und Dixit, 1999). Entsprechend neueren Ergebnissen von Kelly Boatright und Kollegen wird Procaspase-8 bereits durch Dimerisierung und die damit verbundene Konformationsänderung aktiviert (Boatright et al., 2003). Die interne proteolytische Spaltung ist ein sekundäres Ereignis, das nicht der Aktivierung selbst sondern lediglich der Stabilisierung der aktiven Dimere dient (Boatright et al., 2003). Der DISC bietet die makromolekulare Plattform für die Dimerisierung der monomeren apikalen Caspasen, die im Gegensatz zu den Effektorcaspasen unter physiologischen Konzentrationen keine Dimere bilden. Das äußert sich in einem K_D -Wert für die Dimerisierung von Caspase-8 respektive -9 von $> 1 \mu\text{M}$ (Boatright et al., 2003). Mit der Rekrutierung monomerer

Caspase-8 in den DISC über die Interaktion der DEDs wird lokal eine hohe Konzentration an Caspase-8 hergestellt und so die Entstehung aktiver Dimere begünstigt. Durch Autoproteolyse wird das entstandene Dimer schließlich stabilisiert und kann aus dem DISC entlassen werden, ohne wieder in inaktive Monomere zu dissoziieren. Die Rekrutierung von Caspase-10 in den DISC wurde ebenfalls beschrieben (Peter und Kramer, 2003). Im Zusammenhang mit der Bildung des CD95/Fas-DISC und dem Modus der Induktion von Apoptose durch CD95/Fas konnten zwei unterschiedliche Kategorien von Zelltypen definiert werden. In den sogenannten Typ-I-Zellen wird am DISC ein ausreichend großes Quantum an Caspase-8 gebildet, das zur Prozessierung und Aktivierung von Caspase-3 genügt und die Exekution des apoptotischen Programms auslöst (Peter und Kramer, 2003). In Typ-II-Zellen wird wenig Caspase-8 aktiviert, da in diesen Zellen offenbar auch nur eine schwache Bildung des DISC und daher reduzierte Rekrutierung von FADD eintritt (Peter und Kramer, 2003). Die in diesem Zelltyp induzierte CD95/Fas-vermittelte Apoptose beruht zumindest teilweise auf der Spaltung des „BH3-only proteins“ Bid durch Caspase-8. Nach der Prozessierung von Bid entsteht ein proapoptotisches Fragment namens „truncated Bid“ (tBid), das die Aggregation von Bax oder Bak einleitet und so den intrinsischen apoptotischen Weg via die Mitochondrien als Amplifikationsmechanismus aktiviert (Peter und Kramer, 2003). Die Beteiligung des mitochondriellen Weges an der CD95/Fas-vermittelten Apoptose in Typ-II-Zellen wird auch in der Empfindlichkeit für die Expression antiapoptotischer Familienmitglieder deutlich. Mit der ektopischen Expression von Bcl-2 oder Bcl-X_L werden Typ-II-Zellen resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose, wohingegen die Expression von Bcl-2 oder Bcl-X_L in Typ-I-Zellen keinen Schutz vor CD95-vermittelter Apoptose bietet (Peter und Kramer, 2003).

Die Bildung des hier für CD95/Fas beschriebenen DISC wurde in dieser Form ebenfalls bei den Todesrezeptoren DR4 und DR5 beobachtet, nachdem diese mit dem zugehörigen Liganden TRAIL aktiviert wurden (Ashkenazi, 2002). Der TNF-R1 ist vor allem für seine geninduktive Signalgebung bekannt, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB und der Induktion der „Jun N-terminal kinase“ (JNK)- und p38-MAPK-Kaskade führt und damit das Überleben der stimulierten Zelle fördert (Wajant et al., 2003 a). Darüber hinaus kann die Stimulation des TNF-R1 unter bestimmten physiologischen Situationen auch zur Induktion von Zelltod führen. Obwohl die Signaltransduktion des TNF-R1 bereits seit langem untersucht wird,

konnten die molekularen Mechanismen des TNF-R1-induzierten Zelltodes erst in jüngerer Vergangenheit näher beschrieben werden. Insbesondere war lange Zeit ungeklärt, mit Hilfe welcher Mechanismen der TNF-R1 so gegensätzliche Ereignisse bzw. zelluläre Antworten wie einerseits Überleben, Differenzierung und Proliferation und andererseits Apoptose induzieren kann. Olivier Micheau und Jürg Tschopp konnten demonstrieren, daß der TNF-R1-induzierte proapoptotische Signalweg auf der sequentiellen Entstehung zweier unterschiedlicher Signalkomplexe basiert (Micheau und Tschopp, 2003). Nach der Stimulation von TNF-R1 mit löslichem TNF bildet sich in kurzer Zeit ein membranständiger Rezeptorkomplex aus TNF-R1 selbst sowie TRADD, RIP, TRAF2 und cIAP1. Dieser sogenannte Komplex-I entsteht in „lipid rafts“, wo höchstwahrscheinlich auch posttranslationale Modifikationen an verschiedenen komplexassoziierten Proteinen vorgenommen werden (Micheau und Tschopp, 2003). Der Komplex-I existiert nur vorübergehend, vermittelt aber die geninduktiven Fähigkeiten des TNF-R1. Hierbei ist die Aktivierung von NFκB von besonderer Bedeutung, da über diesen Transkriptionsfaktor auch die Expression antiapoptotischer Proteine wie „FLICE-inhibitory protein long“ (FLIP_L) reguliert wird (Kreuz et al., 2001; Micheau et al., 2001). Ein Großteil der assoziierten Proteine dissoziiert nach circa einer Stunde vom Rezeptor ab und das posttranslational modifizierte TRADD dient als zentrale Plattform für die Rekrutierung von FADD, welches wiederum die Dimerisierung der apikalen Caspasen 8 und 10 und damit deren Aktivierung fördert. Bei diesem TRADD-induzierten Typ-II-Komplex handelt es sich um einen löslichen, zytoplasmatischen Komplex, der schließlich die Induktion von Apoptose vermittelt, vorausgesetzt, daß Komplex-I keine effiziente Aktivierung von NFκB und produktive Expression antiapoptotischer Proteine wie FLIP_L einleiten konnte (Micheau und Tschopp, 2003). In diesem Fall sind größere Mengen an Caspase-10 in Komplex-II nachweisbar. Wurde aber via das initiale Signal von Komplex-I die transkriptionelle Aktivität von NFκB effizient induziert und ausreichend große Mengen an FLIP_L exprimiert, dann wird die proapoptotische Wirkung von Caspase-8 durch Rekrutierung von FLIP_L in den Komplex-II inhibiert. Unter diesen Bedingungen hat Caspase-10 nur begrenzten Zugang zu Caspase-8 in Komplex-II (Micheau und Tschopp, 2003). Bei diesen Vorgängen handelt es sich offenbar um einen Kontrollmechanismus, der die transkriptionelle Aktivität des NFκB-Signalweges prüft und Zellen mit defektem NFκB-Signal durch TNF-induzierte Apoptose eliminiert. Auch die „signaling“-Eigenschaften der anderen Todesrezeptoren erschöpfen sich

nicht allein in der Induktion von Apoptose. Tatsächlich können die Todesrezeptoren über Interaktion mit Vertretern aus der TRAF-Familie auch geninduktive Fähigkeiten ausüben, wobei diese Adaptermoleküle bemerkenswerterweise hauptsächlich als signalvermittelnde Komponenten der Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie ohne DD bekannt sind (Wajant et al., 2001 b).

3.4 Das Tumorstroma und das Modellantigen FAP

Solide Tumore bestehen aus zwei voneinander abhängigen Kompartimenten, dem Parenchym der neoplastischen Zellen und dem Stroma, dessen Wachstum von den neoplastischen Zellen induziert wurde und in welchem diese eingebettet und verbreitet sind. Es bietet die vaskuläre Infrastruktur für die Versorgung der Tumore mit Nährstoffen und ermöglicht den Gasaustausch und Abtransport von Stoffwechselendprodukten. Solide wachsende Tumore jeglichen zellulären Ursprungs müssen Stroma induzieren, um über eine Größe von 1 bis 2 mm hinaus wachsen zu können (Hanahan und Weinberg, 2000). Eine systemische Behandlung solider Tumore, die sich im Patienten in einer beträchtlichen Zeitspanne innerhalb von Monaten oder gar Jahren etabliert haben, gestaltet sich schwierig, da Tumorzellen eine außerordentliche genetische Instabilität aufweisen und so stets die Gefahr der Entwicklung von therapieresistenten Varianten besteht (Hans Schreiber, Universität Chicago, Konferenz „Strategies for Immune Therapy“, Würzburg, 2004). Die Proliferationsrate der Tumorzellen selbst ist allerdings sehr gering, zum Problem für den Organismus wird das Wachstum des Tumorstromas, das 80-90 % der gesamten Masse eines soliden Tumors ausmachen kann, wie es zum Beispiel bei Karzinomen von Brust, Magen oder Pankreas der Fall ist. Das Tumorstroma ist größtenteils ein Produkt des normalen, nicht malignen Gewebes und wird hauptsächlich vom interstitiellen Bindegewebe gebildet. Es enthält Elemente des zirkulierenden Blutes wie Plasma- und Serumkomponenten und eine Vielzahl an tumorinfiltrierenden inflammatorischen Zellen. Ein weiterer Typ normaler Zellen sind die stromalen Fibroblasten, die die Tumorzellen sowie die endothelialen Zellen der Gefäße umgeben. Da sie aus dem nicht malignen Gewebe rekrutiert werden, sind sie genetisch stabil, so daß sie als Zielstruktur für die Tumorthherapie von Vorteil sind. Ein molekulares Kennzeichen der reaktiven Fibroblasten des Tumorstromas ist die

selektive Expression des Glycoproteins „fibroblast activation protein“ (FAP) auf der Zelloberfläche (Garin-Chesa et al., 1990). Normale ruhende Fibrozyten im adulten Organismus weisen für gewöhnlich keine detektierbare Expression an FAP auf, lediglich im granulären Gewebe der Wundheilung und bei bestimmten chronisch inflammatorischen Krankheiten konnten FAP-positive Fibroblasten beobachtet werden (Niedermeyer et al., 2000). Als Marker reaktiver Fibroblasten im Tumorstroma wurde das Antigen FAP ursprünglich mit dem monoklonalen Antikörper F19 identifiziert (Rettig et al., 1986). Humanes FAP ist ein 95 kDa großes Typ-II-Membranprotein mit einem kurzen zytoplasmatischen Aminoterminus, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer großen extrazellulären Domäne (Park et al., 1999). FAP bildet auf der Zelloberfläche homomere, hochmolekulare Komplexe (> 400 kDa) aus (Rettig et al., 1994). Allerdings konnten auch FAP-Dimere in heterotetrameren Komplexen mit $\alpha_3\beta_1$ -Integrinen auf Invadopodien von Tumorzellen nachgewiesen werden (Mueller et al., 1999). Auf Ebene der Aminosäuresequenz zeigt humanes FAP eine Homologie von 48 % zu dem T-Zell-Aktivierungsantigen CD26, einem ebenfalls membranständigen Molekül mit Dipeptidylpeptidase-IV (DPP-IV)-Aktivität (Scanlan et al., 1994). Die drei katalytischen Aminosäurereste (Histidin, Asparagin und Serin) der DPP-IV-homologen Proteine aus verschiedenen Spezies und andere Serinproteasen sind ebenfalls in humanem FAP konserviert und daher liegt eine ähnliche Funktion als proteolytisches Enzym nahe (Niedermeyer et al., 1998). In einer weiteren Studie konnte die Funktion als Serinprotease mit dualer Spezifität nachgewiesen werden. Einerseits weist FAP in vitro Aktivität als Dipeptidylpeptidase auf und spaltet bevorzugt aminoterminaler Xaa-Pro-Sequenzen (Park et al., 1999). In dieser Funktion könnte FAP für die proteolytische Aktivierung von Peptidhormonen und Chemokinen von Bedeutung sein, wie es auch für andere Mitglieder der Familie der Prolin-spezifischen Serinoligopeptidasen gezeigt werden konnte (Brubaker et al., 1997; Proost et al., 1998). Andererseits konnte von Park und Mitarbeitern in vitro gezeigt werden, daß FAP Gelatine und natives Typ-I-Kollagen degradieren kann und Gelatinase- respektive Kollagenaseaktivität besitzt (Park et al., 1999). Mit dieser Wirkung könnte FAP bei der proteolytischen Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle für die Remodellierung von Gewebe im Rahmen von normalen und pathologischen Prozessen spielen (Park et al., 1999).

3.5 Aufgabenstellung

In der Arbeit von Frau Dr. Müller Szeraws wurde demonstriert, daß das Fusionsprotein scFv40-Flag-FasL im Vergleich zu anderen FAP-spezifischen scFv-Zytokinkonstrukten in vitro vielversprechende Eigenschaften hinsichtlich der Antigen-abhängigen Induktion von Zelltod aufweist. Für die Herstellung eines solchen Antikörper-Zytokinderivates ist FasL in besonderer Weise geeignet, da dieser Todesligand in seiner löslichen, d. h. nicht membrangebundenen Form keine Aktivität aufweist (Schneider et al., 1998). Die Bioaktivität des löslichen scFv40-Flag-FasL wird erst durch die Bindung des „single chain“-Anteils an membranständiges FAP hergestellt und das Fusionsprotein erlangt durch diese Immobilisierung die Fähigkeit, den Rezeptor CD95/Fas effizient zu stimulieren. Auf diese Weise ist es möglich, das latente zytotoxische Potenzial von scFv40-Flag-FasL selektiv an Antigen-positiven Zielzellen und benachbarten Zellen zu aktivieren.

Für die Untersuchung der antitumoralen Aktivität von scFv40-Flag-FasL in vivo im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das Fusionsprotein zunächst in ausreichender Quantität und Qualität produziert werden. In vitro sollte die zytotoxische Wirkung anschließend näher charakterisiert und darüber hinaus die geninduktive Signalkapazität von scFv40-Flag-FasL herausgearbeitet werden. Anlaß für diese Analysen geben neuere Arbeiten, die neben der dominierenden apoptotischen Signaltransduktion des FasL/Fas-Systems die Existenz Fas-vermittelter nicht-apoptotischer Signalwege aufdecken (Wajant et al., 2003 b; Kreuz et al., 2004).

Sämtliche bisher beschriebenen Agenzien, die zu einer Aktivierung des Fas-Rezeptors fähig sind und deren proapoptotische Wirkung für die Anwendung in der Tumorthherapie zunächst in vivo analysiert wurde, weisen bei der systemischen Behandlung von Mäusen mehr oder minder schwere hepatotoxische Effekte auf, die für den Organismus tödlich sein können (Timmer et al., 2002). Aus diesem Grund wurde die systemische Toxizität von scFv40-Flag-FasL nach intravenöser Injektion im murinen Organismus untersucht. Schließlich sollte im weiteren Verlauf der Arbeit das antitumorale Potenzial von scFv40-Flag-FasL anhand der Behandlung xenotransplanteder Tumorzellen in *nu/nu* NMRI-Mäusen studiert werden.

4 Materialien

4.1 Materialien für die Zellkultur

DMSO	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Eosin Y	Serva, Heidelberg
FCS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
G418	Invitrogen, Karlsruhe
HBSS	Seromed, Berlin
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640	Seromed, Berlin
Trypsin/EDTA-Lösung	Seromed, Berlin
Zellkulturflaschen und -platten	Greiner, Frickenhausen

4.2 Chemikalien und Reagenzien

ABTS	Boehringer, Mannheim
Acrylamidlösung (30 %)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
BCIP	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Bio-Rad-Lösung	Bio-Rad, München
Blotting-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Caspase-3-Substrat (Ac-DEVD-AMC)	Alexis Biochemicals, Grünberg
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Methanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
NBT	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Nitrozellulose	Pall Corporation, Pensacola, USA
Nonidet-P40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Protease-Inhibitor-Cocktail	Boehringer, Mannheim
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tween-20	Merck, Darmstadt
z-VAD-fmk	Bachem, Heidelberg

Die rekombinanten Proteine Fas-Fc und Fas-Comp wurden von Dr. P. Schneider und Dr. J. Tschopp (Universität Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

4.3 Antikörper

Die zur Durchführung dieser Arbeit verwendeten Antikörper oder Seren stammen von den folgenden Quellen:

anti-Caspase-8 (human), Maus, monoklonal	Prof. Dr. Schulze-Osthoff, Universität Düsseldorf
anti-FAP cF19y1 (human), monoklonal	Dr. W. J. Rettig, Boehringer Ingelheim Pharma KG
anti-Flag M2, Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
anti-Human-IgG, FITC-Konjugat, Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
anti-Maus-IgG, Alkalische Phosphatase -Konjugat, Ziege, F(ab) ₂ -Fragment	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
anti-Maus-IgG, FITC-Konjugat, Kaninchen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
anti-Maus-IgG, PE-Konjugat, Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

4.4 Plasmide

pcDNA3-huFAP

Das Expressionsplasmid für humanes FAP wurde von Dr. D. L. Müller Szeraws am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart hergestellt und für die stabile Transfektion von HeLa-Zellen zur Verfügung gestellt.

pCR3-Flag-FasL

Für die Produktion von rekombinantem FasL wurde das Expressionsplasmid pCR3-Flag-FasL verwendet, das von Dr. M. Fotin-Mleczek (Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart) kloniert und zur Verfügung gestellt wurde.

pcDNA3-scFv40-Flag-FasL

Das Expressionsplasmid für das Antikörperderivat scFv40-Flag-FasL wurde von Dr. D. L. Müller Szeraws am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart kloniert und zur Verfügung gestellt (Müller Szeraws, 2002).

4.5 Zell-Linien

HEK293	ATCC, Rockville, MD, USA
HEK293-Flag-FasL	diese Arbeit
HEK293-scFv40-Flag-FasL	Dr. D. L. Müller Szeraws, Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart
HeLa	ATCC, Rockville, MD, USA
HeLa-FAP	diese Arbeit
HT1080	Dr. W. J. Rettig, Boehringer Ingelheim Pharma KG
HT1080-FAP	Dr. W. J. Rettig, Boehringer Ingelheim Pharma KG

5 Methoden

5.1 Zellbiologische Methoden

5.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zell-Linien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Zell-Linien wurden in RPMI 1640-Medium supplementiert mit 5 % FCS kultiviert. Vor dem ersten Gebrauch wurde das FCS für ca. 30 min bei 56 °C im Wasserbad hitzeinaktiviert. Dem Medium wurde zusätzlich eine gebrauchsfertige Penicillin-Streptomycin-Lösung (Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers zugesetzt. Alle Zell-Linien wurden bei 37 °C in einem Inkubator mit 96 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert.

5.1.2 Zellernte

Zur Subkultivierung der adhärennten Zellen wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und durch die Behandlung mit Trypsin/EDTA (0,025 %/ 10 mM in PBS, PBS: 20 mM NaPhosphat, 0,7 % (w/v) NaCl, pH 7,2) bei 37 °C für 5 bis 10 min wurden die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von HBSS mit 2 % FCS (1:1 v/v) inaktiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, RT) pelletiert und in frischem Kulturmedium aufgenommen. In der Regel wurden die Zellen für die weitere Kultivierung im Verhältnis 1:10 bis 1:20 verdünnt und der Rest nach Bedarf auf Gewebekulturplatten für die Experimente ausgesät. Sofern erforderlich wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu wurden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Eosinlösung (0,4 % (w/v) Eosin Y, 0,9 % (w/v) NaCl, 0,05 % (w/v) NaN₃) versetzt, gemischt und ein Teil davon in die Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden vier Großquadrate ausgezählt und ein Mittelwert gebildet. Das Volumen über einem Großquadrat beträgt 0,1 mm³ oder 10⁻⁴ cm³, so daß sich die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension folgendermaßen berechnen läßt:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor (hier 2)} \times 10^4/\text{ml}$$

5.1.3 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Für die Langzeitlagerung von Zell-Linien wurde eine exponentiell wachsende Kultur geerntet und abzentrifugiert (5 min, 1500 rpm, RT). Pro Aliquot wurden 5×10^6 Zellen in 1 ml FCS mit 10 % DMSO eingefroren. Das Zellpellet wurde nach dem Abzentrifugieren (1500 rpm, 5 min, RT) in dem entsprechenden Volumen Einfriermedium resuspendiert und die Zellsuspension in sterile Einfrierröhrchen überführt. Diese wurden in eine Einfrierdose mit Isopropanolfüllung gestellt. Durch das Isopropanol wird der Einfrierprozess auf -80 °C verlangsamt. Sollte eine Zell-Linie wieder in Kultur genommen werden, so wurden die tiefgefrorenen Zellen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und in 10 ml HBSS mit 2 % FCS gewaschen. Die Zellen wurden im Anschluß in vorgewärmtem Kulturmedium in eine mittlere oder große Zellkulturflasche ausgesät.

5.1.4 Zytotoxizitätsassay

Für Zytotoxizitätsassays wurden $2,0 \times 10^4$ Zellen in 100 μl RPMI mit 5 % FCS pro „well“ in „96-well“-Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen, wie im Ergebnisteil angegeben, mit den entsprechenden Reagenzien behandelt. Dabei wurde stets mit einem Endvolumen von 200 μl pro „well“ gearbeitet. Nach Ablauf der Stimulation wurde die Vitalität der Zellen durch Färbung mit Kristallviolett bestimmt. Dazu wurde das Medium verworfen und pro „well“ 100 μl Kristallviolettlösung (0,5 % (w/v) Kristallviolett, 20 % (v/v) Methanol) zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde die Färbelösung entfernt und die Platten mehrere Male vorsichtig mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Platten üN getrocknet. Am folgenden Tag wurde das in den „wells“ verbliebene Kristallviolett durch Zugabe von Methanol (100 μl pro „well“) gelöst. Um eine vollständige Auflösung des Farbstoffes zu erzielen, wurden die Mikrotiterplatten für 30 min bei RT auf einen Schüttler gestellt. Danach wurde die Messung der Absorption in einem Spektrophotometer (Spectramax 340 PC 384, Molecular Devices, USA) bei einer Wellenlänge von 550 nm vorgenommen.

5.1.5 Transfektion eukaryotischer Zell-Linien

Für die stabile und transiente Produktion des Antikörperderivates bzw. von rekombinantem Flag-FasL wurden HEK293-Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. Die Transfektion wurde mit „Lipofectamine 2000“-Reagens (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) vorgenommen. Anhand der Anleitung des Herstellers wurde folgendes Transfektionsprotokoll etabliert:

In einer „6-well“-Platte wurden $1,5 \times 10^6$ HEK293-Zellen pro „well“ in 5 ml RPMI mit 5 % FCS ausgesät und üN bei 37 °C inkubiert. Bei dieser Zelldichte erzielt man am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 90 %. Pro Ansatz wurden 4 µg Plasmid-DNA in 250 µl RPMI ohne FCS in ein steriles Gefäß vorgelegt. Des Weiteren wurden separat je Ansatz 10 µl „Lipofectamine 2000“ in 250 µl RPMI ohne FCS verdünnt, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Lösungen gemischt und weitere 20 min bei RT inkubiert, um die Bildung der Komplexe aus DNA und „Lipofectamine 2000“ zu ermöglichen. Kurz vor Ende dieser Inkubationszeit wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen und pro „well“ durch 2 ml vorgewärmtes RPMI ohne FCS ersetzt. Dazu wurden 500 µl Transfektionsansatz gegeben, vorsichtig gemischt und die Zellen für mindestens 3 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Transfektionsmedium nicht entfernt, sondern jedem Ansatz 2,5 ml RPMI mit 10 % FCS zugegeben und die Zellen üN bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen geerntet und für die transiente Produktion in 10 cm großen Petrischalen in 15 ml RPMI mit 1,5 % FCS ausgesät.

Für die Herstellung einer stabil produzierenden HEK293-Population wurden die Zellen ebenfalls am Tag nach der Transfektion geerntet und in 10 cm großen Petrischalen in 12 ml RPMI mit 5 % FCS ausgesät. Die Zellen wurden zunächst 24 h ohne Antibiotikum im Brutschrank inkubiert. Das Expressionsplasmid pCR3-Flag-FasL ist mit einem Neomycinresistenzgen ausgestattet, so daß für die Selektion das Neomycin-Analogon G418 eingesetzt wurde. Am darauffolgenden Tag wurde das Kulturmedium gewechselt und für die Selektion mit 800 µg/ml G418 versetzt. Der Selektionsdruck wurde 10 bis 14 Tage aufrechterhalten, wobei das Medium täglich erneuert und mit frischem G418 versetzt wurde. Nach Abschluß der Selektionsphase wurde die polyklonale Population geerntet und die Synthese des rekombinanten Proteins durch Analyse des Zellkulturmediums mittels Western Blot kontrolliert. Durch limitierende Verdünnung wurde ein stabil transfizierter HEK293-Einzelklon für

die Produktion des rekombinanten Proteins isoliert. Dazu wurde eine Zellsuspension der polyklonalen Population mit einer Zelldichte von 1000 Zellen/ml angesetzt und in mehreren „96-well“-MTP wurde davon eine Verdünnungsreihe (10 Stufen, Verdünnung 1:2) angelegt. Die Platten wurden für 10 bis 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Einzelklone wurden unter dem Mikroskop identifiziert und die Produktion des rekombinanten Proteins durch Analyse des Kulturüberstandes im Western Blot kontrolliert. Von den positiven Einzelklonen wurden nach der Expansion jeweils 3×10^6 Zellen in 12 ml RPMI mit 1,5 % FCS auf 10 cm Petrischalen ausgesät und für 4 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Überstände wurden geerntet und mittels Western Blot analysiert, um den besten Produzenten zu identifizieren.

Die transiente Produktion rekombinanter Proteine wurde darüber hinaus auch durch Elektroporation von HEK293-Zellen mit dem entsprechenden Expressionsplasmid durchgeführt. Für einen Produktionsansatz in einer 15 cm großen Petrischale wurden 20×10^6 HEK293-Zellen in 0,8 ml RPMI mit 5 % FCS aufgenommen und mit 20 µg Plasmid-DNA gemischt. Die Zellsuspension wurde luftblasenfrei in eine sterile Elektroporationsküvette (4 mm Elektrodenabstand, PeqLab, Erlangen, Deutschland) überführt. Die Elektroporation wurde in einem Elektroporator (Easyject Plus 70-1010, PeqLab, Erlangen, Deutschland) durch einen Puls von 250 V bei 1800 µF und unendlichem Widerstand vorgenommen. Direkt im Anschluß wurden die Zellen in 40 ml RPMI mit 1,5 % FCS ausgesät und mindestens 4 Tage im Brutschrank inkubiert.

Für die Herstellung von stabil FAP-exprimierenden HeLa-Zellen wurden die parentalen Zellen mit dem Expressionsplasmid pcDNA3-huFAP transfiziert. Der Vektor pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe) ist mit einem Neomycinresistenzgen ausgestattet und stabil transfizierte Zellen lassen sich daher durch Selektion mit G418 erzeugen. Für die Elektroporation wurden 5×10^6 Zellen in 0,8 ml RPMI mit 5 % FCS aufgenommen und mit 25 µg Plasmid-DNA gemischt. Die Zellsuspension wurde luftblasenfrei in Elektroporationsküvetten mit 4 mm Elektrodenabstand überführt und mit einem Puls von 250 V bei 1800 µF und unendlichem Widerstand elektroporiert (Easyject Plus 70-1010, PeqLab, Erlangen, Deutschland). Direkt danach wurden die Zellen in 12 ml RPMI mit 5 % FCS aufgenommen und in einer 10 cm großen Zellkulturschale ausgesät. Vor der Selektion wurden die Zellen zunächst 24 h ohne Antibiotikum bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Regenerationsphase wurde die Selektion mit 800 µg/ml G418 in RPMI mit 5 % FCS

begonnen. Das Medium wurde bis zum Ende der Absterbephase täglich und anschließend alle 2 Tage gewechselt. Nach der 14 Tage dauernden Selektion wurden die Einzelklone geerntet und vereint. Aus der polyklonalen Kultur wurden positive Zellen mittels FACS angereichert. Für die Markierung des Oberflächenantigens FAP wurden die Zellen zunächst mit dem Primärantikörper cF19γ1 inkubiert und anschließend mit FITC-markiertem anti-Human-IgG-Serum gefärbt. Die abgetrennten positiven Zellen wurden expandiert und die Anreicherung mittels FACS wurde solange wiederholt, bis eine homogene Population mit gleichmäßig hoher FAP-Expression hergestellt worden war.

5.1.6 Produktion rekombinanter Liganden und Antikörperderivate

Für die Herstellung des Antikörperderivates wurde die Zell-Linie HEK293-scFv40-Flag-FasL zunächst in RPMI mit 5 % FCS expandiert. Für die eigentliche Produktion wurde das Kulturmedium nur mit 0,5 % FCS versetzt und daher wurde eine sequentielle Adaption der HEK293-Zellen an diese Kulturbedingungen vorgenommen. Eine große Zellkulturflasche mit Zellen, die bisher mit 5 % FCS kultiviert wurden und auf ca. 90 % Konfluenz herangewachsen waren, wurde geerntet und in einem Verhältnis von 1:10 in RPMI mit 1,5 % FCS in große Zellkulturflaschen ausgesät. Unter diesen Bedingungen wurden die Zellen 2 bis 3 mal passagiert. Anschließend wurden circa 15×10^6 Zellen in große Zellkulturflaschen mit 50 ml RPMI mit 0,5 % FCS ausgesät und insgesamt für 9 Tage im Brutschrank inkubiert. Nach 5 bis 6 Tagen wurden 25 ml des Kulturüberstandes abgenommen und gesammelt. Das entnommene Medium wurde durch Zugabe von 25 ml frischem RPMI mit 0,5 % FCS ersetzt und die Zellen für weitere 3 bis 4 Tage inkubiert. Nach 9-tägiger Inkubation wurde die Produktion beendet und der gesamte Überstand wurde abgenommen und in 50 ml Polypropylenröhrchen für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Bis zur weiteren Aufarbeitung von scFv40-Flag-FasL wurden die gesammelten Überstände bei 4 °C gelagert. Während der Produktion wurden regelmäßig Proben im Western Blot analysiert und der Gehalt an rekombinantem Protein kontrolliert. Typischerweise konnten mit dieser Produktionsweise Konzentrationen von 5 bis 10 mg/l Protein erzielt werden. Die in den Flaschen verbliebenen Zellen wurden mit Trypsin/EDTA geerntet und wieder im Verhältnis 1:3 in 50 ml RPMI mit 0,5 % FCS ausgesät. Davor

wurden die Zellkulturflaschen mit HBSS und 2 % FCS gespült, um das Trypsin/EDTA zu inaktivieren.

Da diese Vorgehensweise sehr zeit- und arbeitsintensiv ist, wurde außerdem auch nach folgendem Protokoll produziert: Die HEK293-Zellen wurden zunächst in großen Zellkulturflaschen in RPMI mit 5 % FCS expandiert. Bei einer Zelldichte von 90 % wurden die Zellen geerntet und ohne vorherige Anpassung an das Wachstum in Medium mit wenig FCS direkt in große Gewebekulturschalen in 50 ml RPMI mit 1 % FCS ausgesät. Die Zellen einer großen Flasche wurden hier auf drei große Petrischalen verteilt. Nach 5 bis 6-tägiger Inkubation wurden jeweils 25 ml Überstand geerntet, für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und bei 4 °C gelagert. Die Produktion wurde nach Zugabe von 25 ml frischem Medium mit 0,5 % FCS weitere 3 bis 4 Tage fortgeführt. Nach dieser Zeit wurde der komplette Überstand abgenommen und die Zellen verworfen. Bei Bedarf wurden die Zellen neu ausgesät. Auch die so produzierten Überstände wurden durch Analyse im Western Blot kontrolliert. Auf diese Weise wurden ca. 5 mg/l Protein gewonnen.

5.1.7 Immunfärbung von Zellen für EPICS-Analyse und FACSsorting

Für die durchflußzytometrische Analyse von Zellen im EPICS wurden circa $0,5 \times 10^6$ Zellen eingesetzt, wohingegen für eine Anreicherung mittels FACS 10×10^6 Zellen vorbereitet wurden. Zunächst wurde die erforderliche Menge an Zellen geerntet abzentrifugiert und die Zellpellets in 200 µl PBA (0,025 % BSA in PBS, PBS: 20 mM NaPhosphat, 0,7 % (w/v) NaCl, pH 7,2) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in eine „96-well“-MTP mit Spitzboden überführt und nochmals abzentrifugiert (1500 rpm, RT, 5 min). Anschließend wurden die Zellen in 200 µl PBA mit dem erforderlichen Erstantikörper oder scFv40-Flag-FasL (Endkonzentration je 2 µg/ml) resuspendiert und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit PBA gewaschen (5 min abzentrifugieren bei 1500 rpm und RT, aufnehmen in 200 µl PBA und nochmals abzentrifugieren), die Pellets in 200 µl PBA mit dem notwendigen Zweitantikörper (Verdünnung 1:100) resuspendiert und für eine weitere Stunde bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.

Zum Nachweis der Bindung von scFv40-Flag-FasL an den Tumorstromamarker FAP wurde das interne Flag-Epitop des rekombinanten Proteins ausgenützt. Dazu wurde der monoklonale Antikörper anti-Flag M2 (2 µg/ml) in 200 µl PBA mit FITC- bzw. PE-

markiertem anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:100, Kaninchenserum Sigma, Deisenhofen, Deutschland) für 1 h bei RT vorinkubiert. Anschließend wurden die dafür vorgesehenen Zellen in dieser Lösung resuspendiert und ebenfalls 1 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen nochmals mit je 200 µl PBA gewaschen und für die EPICS-Analyse in 400 µl PBA aufgenommen. Die Analyse der Zellen wurde mit dem EPICS-Durchflußzytometer (Flow Cytometer EPICS XL-MCL, Beckman Coulter, Krefeld) vorgenommen. Für die Anreicherung mittels FACS wurden die Zellen in 4 ml PBA resuspendiert und in sterilen, 5 ml großen Falconröhrchen vorgelegt. Das Sortieren der Zellen wurde mit einem FACStar^{PLUS} (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) durchgeführt.

5.2 Biochemische und molekularbiologische Methoden

5.2.1 Ankonzentrierung rekombinanter Proteine

Die Konzentration rekombinanter Proteine in Zellkulturüberständen wurde durch Reduktion des Volumens gesteigert. Zu diesem Zweck wurden Dialyseschläuche (Visking Typ 20/30, Ausschlußgrenze 14 kDa, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) von ca. 80 cm Länge für 10 min in einer Na₂CO₃-Lösung (30 g/l) gekocht und danach gründlich mit fließendem Wasser gespült. Die Schläuche wurden in 1 mM EDTA-Lösung autoklaviert. Unter einer Sterilbank wurden die Schläuche jeweils mit ca. 250 ml Überstand gefüllt, verschlossen und in einer Schale für 5 bis 6 h gegen PEG 6000 dialysiert. Nach ausreichender Volumenreduktion (circa 10 x) wurde das anhaftende PEG 6000 unter fließendem Wasser von den Schläuchen abgespült und das Konzentrat unter der Sterilbank entnommen. War eine weitere Ankonzentrierung dieses Materials erforderlich, dann wurde das Konzentrat aus mehreren Schläuchen vereint und das Flüssigkeitsvolumen nochmals um das 5-fache durch eine wiederholte Dialyse gegen PEG 6000 reduziert. Auf diese Weise konnte eine ca. 50-fache Ankonzentrierung erzielt werden. Die Konzentrate wurden zur Sicherheit sterilfiltriert (Sterilfilter FP30/0,2 CA-S Rotring 0,2 µm, Schleicher und Schuell).

5.2.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Flag-Fusionsproteinen

Die Fusion eines rekombinanten Proteines mit einem sogenannten Flag-Tag, dem Flag-Oktapeptid bestehend aus N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C, bietet für dessen Handhabung mehrere Vorteile. Neben einer einfachen Detektion dieser Proteine im Western Blot mit Hilfe eines Flag-spezifischen Antikörpers wird außerdem eine Aufreinigung dieses Proteins aus einem Proteingemisch mittels Affinitätschromatographie möglich.

Zur affinitätschromatographischen Aufreinigung der rekombinanten Flag-markierten Proteine wurde das „anti-Flag M2 Affinity Gel“ von Sigma eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine Agarosematrix, an welcher der monoklonale Antikörper anti-Flag M2 über kovalente Bindung immobilisiert ist. Das für eine Aufreinigung einer bestimmten Menge bzw. Masse eines Proteins erforderliche Volumen an M2-Agarose wurde anhand folgender Verhältnismäßigkeit ermittelt:

Nach Herstellerangaben bindet 1 ml M2-Agarose zwischen 6 und 12 nmol eines Flag-markierten Proteins. Binden 6 nmol eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 50 kDa pro Milliliter M2-Agarose, so entspricht das 300 µg Protein.

Für die Chromatographie wurde eine Glassäule (20 mm Durchmesser) mit eingelassener Fritte (Porosität 2) und einem Absperrhahn verwendet. Die erforderliche Menge an M2-Agarose wurde in diese Chromatographiesäule überführt und mit 25 ml TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4, vor Gebrauch sterilfiltriert) gemischt. Die Glassäule wurde mit einer Klemme an der Laborbank befestigt und es wurde ca. 20 min gewartet, bis sich die Agarosebeads abgesetzt hatten. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgelassen und die M2-Agarose vor der ersten Benutzung 3 x nacheinander mit dem Eigenvolumen an Glycin-HCl-Lösung (0,1 M Glycin-HCl, pH 3,5, vor Gebrauch sterilfiltriert) gespült. Direkt im Anschluß wurde die Säule durch Waschen mit 5 x 20 ml TBS äquilibriert und so für den Probenauftrag vorbereitet. Eine Flasche mit dem entsprechenden Volumen an Zellkulturüberstand wurde oberhalb der Säule angebracht und mit ihr über einen dünnen Silikonschlauch verbunden, so daß die Flüssigkeit nach einmaligem Ansaugen mit einer Plastikspritze allein durch Wirkung der Schwerkraft auf die Säule fließen konnte. Mit Hilfe einer Schlauchklemme und dem Absperrhahn an der Glassäule wurde die Flußrate auf ca. 1,5 ml/min eingestellt. Es wurde darauf geachtet, daß das Gelbett nicht trocken lief. Nachdem der Zellkulturüberstand

vollständig über die Säule gelaufen war, wurde diese 3 x mit 50 ml TBS gespült, um ungebundenes Protein zu entfernen. Die Elution der spezifisch gebundenen Flag-Fusionsproteine wurde durch Konkurrenz mit Flag-Peptid vorgenommen. Dazu wurde eine Lösung von 100 µg/ml Flag-Peptid in sterilem TBS angesetzt und die Säule 4 x nacheinander mit dem Eigenvolumen an eingesetzter M2-Agarose beladen. Am Ablauf wurden zeitgleich Fraktionen in sterilen 2 ml Kryovials bzw. bei größerem Säulenvolumen in sterilen 15 ml Falconröhrchen gesammelt. Das Volumen der aufgefangenen Fraktionen richtete sich ebenfalls nach dem für die Aufreinigung eingesetzten Säulenvolumen: pro Milliliter M2-Agarose wurde ein Milliliter Eluat je Fraktion gesammelt. Nachdem die Flag-Peptid-Lösung aufgetragen war, wurde die Säule mit weiteren vier Säulenvolumen an TBS-Lösung beladen, die ebenfalls als Elutionsfraktionen am Ablauf aufgefangen wurden. Unter den hier gewählten bzw. eingestellten Bedingungen eluierte das aufgereinigte Protein hauptsächlich in den Fraktionen 2 und 3, wohingegen in den Fraktionen 4 und 5 lediglich Spuren des Proteins zu finden waren. Bei Fraktion 1 handelte es sich in erster Linie um das Totvolumen der Säule. Die Fraktionen wurden nur dann sofort sterilfiltriert, wenn sie bis zur weiteren Verwendung mehr als 3 Tage bei 4 °C aufbewahrt wurden. Auf eine sofortige Sterilfiltration wurde verzichtet, wenn mit diesem Material innerhalb der nächsten 2 bis 3 Tage weiter gearbeitet wurde, um die Verluste an Protein zu minimieren.

Die Chromatographiesäule wurde nach der Benutzung mit 3 x 25 ml Glycin-HCl-Lösung (0,1 M Glycin-HCl, pH 3,5) gespült und sofort mit 3 x 50 ml TBS äquilibriert. Für die Aufbewahrung der Säule bei 4 °C wurden 50 ml TBS mit Natriumazid versetzt (Endkonzentration 0,2 % (v/v)), die Säule mit 35 ml davon gespült und bei geschlossenem Absperrhahn mit dem Rest überschichtet. Die Glassäule wurde an den Öffnungen mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C eingelagert. Vor der nächsten Benutzung wurde das Gelbett in der Säule durch Auf- und Abpipettieren aufgewirbelt. Nachdem sich die M2-Agarose abgesetzt hatte, wurde die Säule mit 3 x 50 ml TBS gespült und danach wurde mit dem Auftragen der Probe begonnen.

Die Konzentration der aufgereinigten Proteine im Eluat betrug typischerweise zwischen 100 und 250 µg/ml. Bei Bedarf wurden die Fraktionen 2 und 3 von mehreren aufeinanderfolgenden Aufreinigungen miteinander vereint und nochmals durch Volumenreduktion ankonzentriert. Dazu wurde die Proteinlösung in autoklavierte Dialyseschläuche (Visking Typ 20/30, Ausschlußgrenze 14 kDa, Carl

Roth GmbH, Karlsruhe) überführt und 2-3 h gegen PEG 6000 bei RT dialysiert. So konnte die Proteinkonzentration um ca. das 5-fache gesteigert werden. Zur Entfernung von Flag-Peptid im Eluat wurde die Proteinlösung gegen TBS dialysiert. Dazu wurde das PEG 6000 gründlich unter fließendem Wasser vom Dialyseschlauch abgespült und dieser in ein Gefäß mit 2 l TBS gehängt. Insgesamt wurde für 6 h dialysiert, wobei die TBS-Lösung alle 2 h ausgetauscht wurde. Die Proteinkonzentration wurde durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm und mittels BCA-Assay bestimmt.

5.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration aufgereinigter Proteine wurde einerseits durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Diese Methode basiert auf der Absorption von UV-Licht durch aromatische Aminosäuren in Proteinen, in erster Linie auf den Tryptophan- und Tyrosinresten und zu geringerem Ausmaß auch auf Phenylalaninresten. Mit Hilfe des in silico ermittelten Extinktionskoeffizienten eines Proteins wurde dessen Konzentration aus dem Meßwert der Absorption bei 280 nm berechnet. Aus der bekannten Nukleinsäuresequenz konnte mit der „DNA-Star Software“ die Aminosäuresequenz des Proteins abgeleitet werden. Die Proteinanalyse mit dieser Software ergab für rekombinantes Flag-FasL ein Molekulargewicht von 21,89 kDa und für das reine Protein in Lösung einen Extinktionskoeffizienten von 0,81 mg/ml (= 1 OD_{280 nm}). Für das in dieser Arbeit untersuchte Antikörperderivat scFv40-Flag-FasL lieferte die Proteinanalyse ein Molekulargewicht von 46,29 kDa und einen Extinktionskoeffizienten von 0,54 mg/ml (= 1 OD_{280 nm}).

Neben der direkten Messung der Absorption wurde der sogenannte BCA-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt. Es handelt sich dabei um einen kolorimetrischen Assay, der auf der Reduktion von Cu²⁺-Ionen in Cu⁺-Ionen durch die Peptidbindungen der Proteine beruht. Die einwertigen Cu⁺-Ionen werden mit hoher Spezifität von Bicinchoninsäure (BCA: „bicinchonic acid“), einem Chelatbildner, gebunden und es entsteht ein wasserlöslicher purpurfarbener Komplex. Für diese Quantifizierungsmethode wurde das „BC Assay Protein Quantitation Kit“ (Uptima Interchim, Frankreich) verwendet. Dabei wurde gemäß dem Standardprotokoll des Herstellers für Messungen im Mikrotiterplattenmaßstab gearbeitet. Dieses Protokoll

erlaubt die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen mit einer Konzentration von 20 µg/ml bis zu 2 mg/ml. Für die Messung wurde jede Probe sowie eine serielle Verdünnung des Proteinstandards BSA als Dreifachwert angesetzt. Die Inkubation der Proben mit dem „BC-Assay“-Reagens wurde für exakt 30 min bei 37 °C im Wasserbad vorgenommen. Dazu wurde die „96-well“-MTP mit Parafilm wasserdicht abgeklebt und im Wasserbad sicher fixiert. Die Reaktion wurde stets unter gleichen Temperaturbedingungen inkubiert und immer zur selben Zeit abgebrochen, um eine gute Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Die Absorption des entstehenden Kupferkomplexes wurde bei 562 nm im Spektrophotometer (Spectramax 340 PC 384, Molecular Devices, USA) gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit Hilfe einer Eichgeraden berechnet, die anhand der Meßwerte der seriellen Verdünnung des BSA-Proteinstandards erstellt wurde.

Mit dem Bradford-Assay wurde die Proteinkonzentration zellulärer Lysate bestimmt, die im Anschluß mittels Western Blot analysiert werden sollten (Bradford, 1976). Dazu wurde die „BioRad Protein Assay Solution“ (BioRad, München) nach Herstellerangaben eingesetzt. Mit einem Spektrophotometer (Ultrospec 1000, Pharmacia) wurde die OD bei $\lambda = 595$ nm gemessen und die zugehörige Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Eichgeraden ermittelt, die über die Messung von Proteinlösungen bekannter Konzentration erstellt wurde.

5.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese: SDS-PAGE

Für die standardmäßige Trennung komplexer Proteinmischungen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt, die einen schnellen Nachweis der zu identifizierenden Proteine und die Bestimmung des Molekulargewichts dieser Proteine erlaubt. Die Auftrennung von Proteingemischen wurde in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Phase, Lübeck) durchgeführt. Die Glasplatten wurden vor Gebrauch gründlich mit Wasser gespült und mit den erforderlichen Abstandshaltern mit Hilfe von Klammern zusammengebaut. In aller Regel wurde eine 13,5 %-ige Trenngellösung (13,5 % Polyacrylamid, 375 mM Tris, 3,75 mM SDS, pH 8,8) angesetzt, deren Polymerisation durch Zugabe von APS und TEMED gestartet wurde (Endkonzentration für APS und TEMED je 0,1 %). Die Lösung wurde in die vorbereitete Glasapparatur gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde das Isopropanol mit Wasser ausgespült und

die bereits vorbereitete Sammelgellösung (6 % Polyacrylamid, 125 mM Tris, 3,75 SDS, pH 6,8) wurde ebenfalls nach Zugabe von APS und TEMED (Endkonzentration je 0,1 %) zum Auspolymerisieren auf das Trenngel gegossen und der gewünschte Kamm eingesetzt. Die Proben wurden mit 1/5 ihres Eigenvolumens an 5 x Probenpuffer (0,05 mM Tris, 5 mM EDTA, 175 mM SDS, 40 mM DTT, 5,5 M Glycerin, 0,5 % (w/v) Bromphenolblau, pH 8,0) versetzt und anschließend für 3-5 min bei 95 °C denaturiert. Danach wurden die Proben kurz abzentrifugiert und aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurde eine Mischung aus vorgefärbten Referenzproteinen (Broad Range Prestained Protein Marker, New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 45 mA Gleichstrom mit SDS-PAGE Laufpuffer (50 mM Tris, 380 mM Glycin, 4 mM SDS, pH 8,3) durchgeführt und abgebrochen, sobald das Bromphenolblau das Ende des Gels erreicht hatte.

5.2.5 Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine durch Anfärbung mit „Coomassie Brilliant Blue“ oder Silberfärbung detektiert. Mit der hier eingesetzten Coomassiefärbemethode konnten noch 250 ng Protein (BSA) je Laufspur nachgewiesen werden. Für die Silberfärbung wurde das „Proteosilver™ Silverstain Kit“ (Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen) eingesetzt, dessen Nachweisgrenze bei 20 ng Protein (BSA) lag.

Für die Färbung von Proteinen mit „Coomassie Brilliant Blue“ wurde das Polyacrylamidgel für 30 min in der Färbelösung (0,06 % „Coomassie Brilliant Blue G250“, 50 % Methanol, 10 % Essigsäure) auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Das Gel wurde danach in ein Becherglas mit Wasser gegeben und durch mehrmaliges Aufkochen in einem Mikrowellenherd entfärbt. Das Wasser wurde jeweils gegen frisches ausgetauscht. Für eine vollständige Entfärbung des Hintergrunds wurde das Gel weitere 2 Tage bei 4 °C in Wasser inkubiert. Auch hier wurde das Wasser regelmäßig gewechselt.

Die Silberfärbung von Proteingelen mit dem „Proteosilver™ Silverstain Kit“ (Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen) wurde streng nach Anleitung des Herstellers vorgenommen. Allerdings wurde nur die Hälfte der für die Reagenzien angegebenen

Mengen verwendet, da dies für die Färbung von Proteingelen mit den Maßen 13 cm x 5,5 cm und einer Dicke von 1,5 mm ausreichend war.

5.2.6 Western Blot (Towbin et al., 1979)

Alternativ zur direkten Färbung im Gel wurde ein elektrophoretischer Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran vorgenommen. Die im Acrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden durch das Elektroblobverfahren in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Phase, Lübeck) auf eine Nitrozellulosemembran entsprechender Größe übertragen. Für den Elektroblob wurde das Gel in folgender Reihenfolge zwischen eine zugeschnittene Nitrozellulosemembran und Whatman-Filterpapier gelegt: Kathode / 4 x Filterpapier / Gel / Nitrozellulose / 4 x Filterpapier / Anode. Die Nitrozellulose und das Filterpapier wurden vorher in Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, pH 8,3) getränkt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 1,5 mA Gleichstrom pro cm² Gelfläche für ca. 80 min. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran durch Inkubation für 1 h in 3 % Milch in PBS-Tween (20 mM Na-Phosphat, 0,7 % (w/v) NaCl, 0,05 % (v/v) Tween-20, pH 7,2) abgesättigt. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min in PBS-Tween gewaschen und daraufhin mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert (2 h bei RT oder üN bei 4 °C). Alle primären Antikörper wurden in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Die erforderlichen Verdünnungen wurden mit PBS-Tween angesetzt und jeder Antikörper-Lösung wurde Natriumazid (Endkonzentration 0,04 %) und BSA (Endkonzentration 0,25 %) zugegeben. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran 3 x 10 min in PBS-Tween gewaschen und anschließend mit dem erforderlichen AP-markierten sekundären Antikörper (Verdünnung 1 : 5000 in PBS-Tween) 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde anschließend nochmals 3 x 10 min in PBS-Tween gewaschen und der Blot in AP-Färbepuffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl, pH 9,5) mit 0,162 mg/ml BCIP (BCIP-Stammlösung: 45 mg BCIP pro ml 100 % DMF) und 0,324 mg/ml NBT (NBT-Stammlösung: 90 mg NBT pro ml 70 % DMF) entwickelt. Die Färbung wurde bei der gewünschten Signalintensität durch Waschen der Membran mit H₂O beendet und zur Dokumentation wurden die Blots photographiert.

5.2.7 Präparation zellulärer Lysate

Für die Untersuchung zellulärer Extrakte mittels Western Blot wurden $3,0 \times 10^6$ Zellen von den parentalen Linien HT1080 und HeLa sowie den zugehörigen FAP-positiven Transfektanten in Petrischalen (\varnothing 6 cm) ausgesät und $\ddot{u}N$ im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen wie gewünscht stimuliert und anschließend auf Eis geerntet und abzentrifugiert (5 min, 1500 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 150 μ l Lysispuffer (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, pH 7,9) resuspendiert. Dem Lysispuffer wurde vor Gebrauch die erforderliche Menge an Proteinaseinhibitor (Complete Proteinase Inhibitor, Boehringer Ingelheim, Mannheim) sowie DTT (Endkonzentration 1mM) zugegeben. Die Zellsuspension wurde in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden je Ansatz 8 μ l Nonidet-P40 (10 % Nonidet-P40 in PBS, PBS: 20 mM NaPhosphat, 0,7 % (w/v) NaCl, pH 7,2) zugegeben und die Zellen 2 min kräftig bei 4 °C geschüttelt. Die Lysate wurden zentrifugiert (10 min, 13 000 rpm, 4 °C) und der Überstand in neue Gefäße überführt. Mit Hilfe des Bradford-Assays (Bradford, 1976) wurde die Proteinkonzentration der zellulären Extrakte bestimmt und diese bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Für den Nachweis der Prozessierung von Caspase-8 im Western Blot bei gleichzeitiger Bestimmung der Aktivität von Caspase-3 in denselben Lysaten wurden außerdem zelluläre Extrakte anhand des folgenden Protokolls präpariert. In 6 cm großen Petrischalen wurden $3,0 \times 10^6$ HT1080- bzw. HT1080-FAP-Zellen ausgesät und $\ddot{u}N$ inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen wie im Ergebnisteil angegeben stimuliert. Danach wurden die Zellen auf Eis geerntet und durch Zentrifugation (5 min 1500 rpm, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 180 μ l Lysispuffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris, 1 % Nonidet-P40, pH 7,4) resuspendiert. Dem Lysispuffer wurde vor Gebrauch die erforderliche Menge Proteinaseinhibitor (Complete Proteinase Inhibitor, Boehringer Ingelheim, Mannheim) zugegeben. Die Suspension wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate abzentrifugiert (15 min, 13 000 rpm, 4 °C) und der Überstand in neue Eppendorfgefäße überführt. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Assay bestimmt und die zellulären Extrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

5.2.8 Nachweis von Interleukin-8 im ELISA

Am Tag vor der Stimulation wurden $2,0 \times 10^6$ HT1080- bzw. HT1080-FAP-Zellen in „96-well“-MTP mit Flachboden in je 100 μ l RPMI mit 5 % FCS ausgesät und üN inkubiert. Da die Zellen konstitutiv IL8 bilden, wurde das Medium am folgenden Tag abgenommen und die Zellen mit den gewünschten Reagenzien in frischem Medium für 6 bis 8 h stimuliert. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurde der Kulturüberstand abgenommen und in eine neue „96-well“-MTP überführt. Diese wurde bis zur weiteren Untersuchung der Überstände bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Für den Nachweis von IL8 im ELISA wurde das „OptEIA™ Human IL8-Set“ von Pharmingen (San Diego, USA) verwendet. Von sämtlichen Komponenten dieses Kits wurde lediglich die Hälfte der im Protokoll angegebenen Mengen eingesetzt. Für das Waschen und Blocken sowie von den Proben wurden die normalen Volumina eingesetzt. Die erforderliche Zahl an „96-well“-ELISA-MTP (Greiner Microlon, Greiner, Frickenhausen) wurden für den ELISA mit dem „anti-human IL8 capture antibody“ bis auf die Menge entsprechend dem Protokoll des „OptEIA™ IL8“-Elisakits beschichtet, gewaschen und geblockt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 100 μ l Zellkulturüberstand sowie eine vorbereitete Verdünnungsreihe von rekombinantem IL8 für die Erstellung einer Eichgeraden in jedes „well“ gegeben und die Platte für 2 h bei RT inkubiert. Im Anschluß wurde die Platte gewaschen und der sogenannte „working detector“ zugegeben. Dabei handelt es sich um den Komplex aus biotinyliertem Detektionsantikörper für IL8 und der Avidin-gekoppelten „horseradish peroxidase“. Diese „working detector“-Lösung wurde jeweils direkt vor der Anwendung präpariert. Die ELISA-Platte wurde nach 1 h Inkubation mit dem „working detector“ gewaschen und pro „well“ wurden 100 μ l ABTS-Substratlösung zugegeben. ABTS wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in Substratpuffer gelöst (ABTS und Substratpuffer: Boehringer Ingelheim, Mannheim). Die Platte wurde mit der Substratlösung für 10 min bei RT inkubiert und die Absorption im Spektrophotometer (Spectramax 340 PC 384, Molecular Devices, USA) bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

5.2.9 Caspase-Aktivitätsassay

Die Zellen wurden wie im Ergebnisteil beschrieben stimuliert und die Lysate entsprechend dem Protokoll in Abschnitt 5.2.7 hergestellt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Bradford-Assay wurden 30 µg Protein jeder Probe mit Caspaseaktivitätspuffer auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt und in eine „96-well“-Platte überführt. Für die Messung im Fluoreszenzspektrometer wurden „96-well“-MTP (Nalge Nunc International, Dänemark) eingesetzt und als fluorogenes Substrat für Caspase-3 wurde Ac-DEVD-AMC (Alexis Biochemicals) verwendet. Von diesem Substrat wurde eine 5 mM Stammlösung in DMSO angesetzt. Vor der unmittelbaren Anwendung des Substrates im Caspase-Assay wurde zunächst separat in einer Petrischale ein „mastermix“ hergestellt, wobei für jedes „well“ 1 µl der Ac-DEVD-AMC-Stammlösung auf ein Volumen von 50 µl mit Caspase-Aktivitätspuffer aufgefüllt wurde. Zum Start der Reaktion wurden 50 µl der vorbereiteten Substratlösung zu den in der „96-well“-MTP vorgelegten Zellextrakten gegeben und die Platte bei RT im Fluoreszenzspektrometer (FLUOstar, BMG Labtech, Offenburg) inkubiert. Über den Zeitraum von 1 h wurde alle 15 min eine Messung der Fluoreszenz vorgenommen. Die Anregungswellenlänge betrug 390 nm und das Emissionsspektrum zwischen 380 und 480 nm wurde aufgezeichnet, wobei sich das Emissionsmaximum bei 436 nm befand.

5.3 Tierexperimentelle Methoden

Die für diese Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden unter Einhaltung der gesetzlichen Bestimmungen vorgenommen und vom Regierungspräsidium Stuttgart genehmigt. Für die Experimente wurden ausschließlich Tiere weiblichen Geschlechts der Linien C57BL/6 x CBA/J, CD1 und *nu/nu* NMRI verwendet, die von der Firma Centre d'Élevage R. Janvier, Animaux de Laboratoire CERI, 53940 Le Genest St Isle, Frankreich, bezogen wurden.

Die Applikation humaner Fibrosarkomzellen der Linien HT1080 und HT1080-FAP wurde in *nu/nu* NMRI-Mäuse vorgenommen. Für diese Xenotransplantation wurden $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen in 100 µl 0,9 %-iger NaCl-Lösung resuspendiert und der betäubten Maus subkutan in die rechte Flanke injiziert. Zur Betäubung der Tiere

wurde eine Inhalationsnarkose mit Ethrane® (Abbott GmbH, Wiesbaden) vorgenommen. Die auf die Injektion der Tumorzellen folgende Behandlung der Mäuse ist im Ergebnisteil beschrieben. Zur Dokumentation des Wachstums wurden die zwei größten Durchmesser des Tumors d1 und d2 senkrecht zueinander mit einem Lineal gemessen und die Fläche nach der vereinfachten Formel $A = d1 \times d2$ berechnet. Darüber hinaus wurde das Tumorstadium auch photographisch festgehalten (Digitalkamera Nikon Coolpix 995). Tumortragende Mäuse wurden abgesetzt, sobald die Tumore eine Größe von 250 mm² erreichten, spätestens jedoch 4 Wochen nach Injektion der Tumorzellen. Das Töten der Mäuse wurde durch Inhalation von Kohlendioxid oder Ethrane® vorgenommen.

Die Untersuchungen zur systemischen Toxizität von scFv40-Flag-FasL wurden außer an *nu/nu* NMRI-Mäusen auch an CD1- und C57BL/6 x CBA/J-Mäusen durchgeführt. Dazu wurde die entsprechende Dosis scFv40-Flag-FasL intravenös in eine Schwanzvene injiziert und wo angegeben durch eine zweite Injektion mit anti-Flag M2, die innerhalb von 30 min nach der ersten appliziert wurde, nachträglich *in vivo* quervernetzt. Sämtliche Reagenzien wurden in einem Volumen von 100 µl intravenös injiziert, d.h. wo erforderlich wurde scFv40-Flag-FasL mit steriler TBS-Lösung bzw. anti-Flag M2 mit steriler 0,9 %-iger NaCl-Lösung verdünnt. Die Mäuse wurden die folgenden 48 h nach den Injektionen auf typische Krankheitsanzeichen hin beobachtet. Dabei wurde das Verhalten der behandelten Tiere qualitativ eingeschätzt und insbesondere auf Merkmale wie hochgradige Inaktivität, Reaktion auf äußere Reize, besondere Aggressivität, Körperhaltung, Atmung und Aufnahme von Futter und Wasser geachtet. Zur genaueren biochemischen und histologischen Analyse wurden außerdem Gruppen von Mäusen 45 min und 6 h nach der vorgenommenen Behandlung durch Inhalation von Kohlendioxid getötet. Für die Bestimmung der Aktivität von Alaninaminotransferase und Aspartataminotransferase im Blut als Zeichen schwerer Leberschäden wurde den Tieren durch Herzpunktion Blut entnommen und davon Plasma isoliert. Dazu wurde das Blut in Einmalspritzen, in die bereits vor der Punktion 80 µl Heparin vorgelegt worden war, aufgezogen und gemischt. Anschließend wurde die Suspension zur Abtrennung zellulärer Bestandteile abzentrifugiert (13000 rpm, 5 min, 4 °C), das Plasma abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert. Die Plasmaaktivität von Alanin- und Aspartataminotransferase wurde durch Messung über eine automatisierte Prozedur nach dem Protokoll von Bergmeyer bestimmt (Bergmeyer, 1984). Außerdem wurde

die makroskopische Schädigung der Leber photographisch dokumentiert und zur Bestimmung der Aktivität von Caspase-3 wurden Gewebeproben der Leber entnommen, die bis zur weiteren Untersuchung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt wurden. Das Lebergewebe wurde mit Lysispuffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 1 mM CHAPS, 1 mM DTT) homogenisiert (50 % w/w) und die Aktivierung von Caspase-3 mit einem kolorimetrischen „Caspase-3 Assay Kit“ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

6 Ergebnisse

6.1 Das Antikörperderivat scFv40-Flag-FasL:

Produktion und Aufreinigung

In über 90 % aller humanen Tumore epithelialen Ursprungs kann das Antigen FAP nachgewiesen werden, wobei die Expression innerhalb der Tumore auf die reaktiven stromalen Fibroblasten begrenzt ist (Park et al., 1999). In den meisten normalen adulten Geweben des Menschen ist FAP dagegen nicht nachweisbar (Park et al., 1999). Daher ist es ein besonders geeignetes Modellantigen für die Entwicklung stromaspezifischer Antikörper, die einerseits für die immunhistochemische Detektion von Tumorgewebe eingesetzt werden können, andererseits aber in Form von Immunkonjugaten spezielle, häufig zytotoxische Effekte auf Tumorzellen respektive stromale Fibroblasten ausüben können. Am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart wurde bereits an der Entwicklung und Produktion FAP-spezifischer Antikörper gearbeitet (Rippmann, 1999; Mersmann, 2000; Schmidt, 2000). Ein Hauptaugenmerk wurde unter anderem auf die Gewinnung von Antikörpern mit neuer Spezifität gerichtet, die ein breites Spektrum an FAP-Epitopen erkennen. Für diesen Zweck konstruierte Bodo Brocks mit Hilfe einer „FAP-knockout“-Maus, die mit rekombinatem, humanem FAP immunisiert wurde, eine murine „single chain fragment variable“ (scFv)-Bibliothek (Brocks, 1998). Daraus isolierte Frau Dr. Müller Szeraws mit Hilfe der „phage display“-Technologie murine FAP-spezifische scFv, die für die Gewinnung humaner scFv eingesetzt wurden (Müller Szeraws, 2002). Verschiedene murine FAP-spezifische V_L-Ketten dienten dabei als Leitketten für die sogenannte „guided selection“ eines humanen V_H-Kettenrepertoires (Müller Szeraws, 2002). Die chimären scFv wurden wiederum über „phage display“ auf Spezifität für FAP selektioniert und so konnte ein Klon mit geeigneter humaner V_H-Kette namens V_H40 isoliert werden. Für die Herstellung vollständig humaner scFv wurden in einem weiteren Schritt geeignete humane FAP-spezifische V_L-Ketten mit dieser V_H40-Kette kombiniert (Müller Szeraws, 2002). Dabei wurde das scFv-Derivat scFv40 identifiziert, das sowohl rekombinantes als auch membranständiges FAP entsprechend transfizierter HT1080-Zellen bindet (Müller Szeraws, 2002). Das scFv40-Fragment wurde mit den extrazellulären Domänen von TRAIL und FasL genetisch fusioniert, um Antikörperderivate mit

Effektorfunktionen herzustellen (Müller Szeraws, 2002). Dabei wurde das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Fusionsprotein scFv40-Flag-FasL konstruiert. Der Todesligand FasL zeichnet sich für die Konstruktion solcher Antikörperderivate dadurch besonders aus, daß er im Gegensatz zu beispielsweise TNF oder TRAIL in der löslichen, d. h. nicht membranständigen Form keine nachweisbare Aktivität besitzt (Schneider et al., 1998). Erst mit der Immobilisierung des löslichen scFv40-Flag-FasL durch Bindung an membranständiges FAP wird die Bioaktivität hergestellt und eine lokale Aktivierung des Rezeptors CD95/Fas induziert. Die antigenbindende Domäne am Aminoterminus dieses Antikörperderivates besteht aus den variablen Regionen V_H40 und V_Lphox, die miteinander über einen Peptidlinker verknüpft sind (Müller Szeraws, 2002). Eine geeignete Signalsequenz am äußersten aminoterminalen Ende des Fusionsproteins vermittelt die Sekretion in das Kulturmedium transfizierter Zellen. Am carboxyterminalen Ende ist die extrazelluläre Domäne von FasL angebracht (Müller Szeraws, 2002). Zwischen diesen beiden Domänen wurde das rekombinante Protein mit einem internen Flag-Epitop ausgestattet, das eine einfache Detektion im Western Blot ermöglicht und eine Aufreinigung über Affinitätschromatographie erlaubt. Zusätzlich kann das Fusionsprotein mit einem Flag-spezifischen monoklonalen Antikörper aggregiert werden, wodurch die zytotoxische Wirkung artifiziell aktiviert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden scFv40-Flag-FasL-produzierende HEK293-Zellen sequentiell an die Kultivierung in RPMI mit 0,5 % FCS angepaßt und während der Produktionsphase auf 20 große Zellkulturflaschen expandiert (siehe Abschnitt 5.1.6). Die Kulturüberstände wurden geerntet, gesammelt und der Gehalt an scFv40-Flag-FasL im Western Blot kontrolliert. Für die Abschätzung der Konzentration wurde bei diesen Analysen eine serielle Verdünnung des Überstandes mit einer Verdünnungsreihe des zuvor aufgereinigten Proteins verglichen. In Abbildung 1 A ist ein Beispiel für die Analyse der Zellkulturüberstände dargestellt. Das scFv40-Flag-FasL-Monomer besitzt theoretisch ein Molekulargewicht von 46,29 kDa und ein spezifisches Signal für das rekombinante Protein ganzer Länge wurde etwas oberhalb der 47,5 kDa großen Bande des Molekulargewichtsstandards detektiert. Des Weiteren konnten im Western Blot wiederholt spezifische Signale mit einer Größe von circa 30 kDa detektiert werden, die von Degradationsprodukten des rekombinanten Proteins herrührten. Die Intensität der Proteinbande von 40 ng aufgereinigtem scFv40-Flag-FasL entspricht etwa der Signalstärke von 3 µl

Zellkulturüberstand der hier analysierten Chargen 1 bis 3. Im Überstand waren somit circa 10 µg/ml scFv40-Flag-FasL enthalten. Vor der weiteren Aufreinigung wurde die Bioaktivität und FAP-abhängige Aktivierbarkeit von scFv40-Flag-FasL in Zytotoxizitätsassays mit HT1080- und HT1080-FAP-Zellen geprüft (Abb. 1 B).

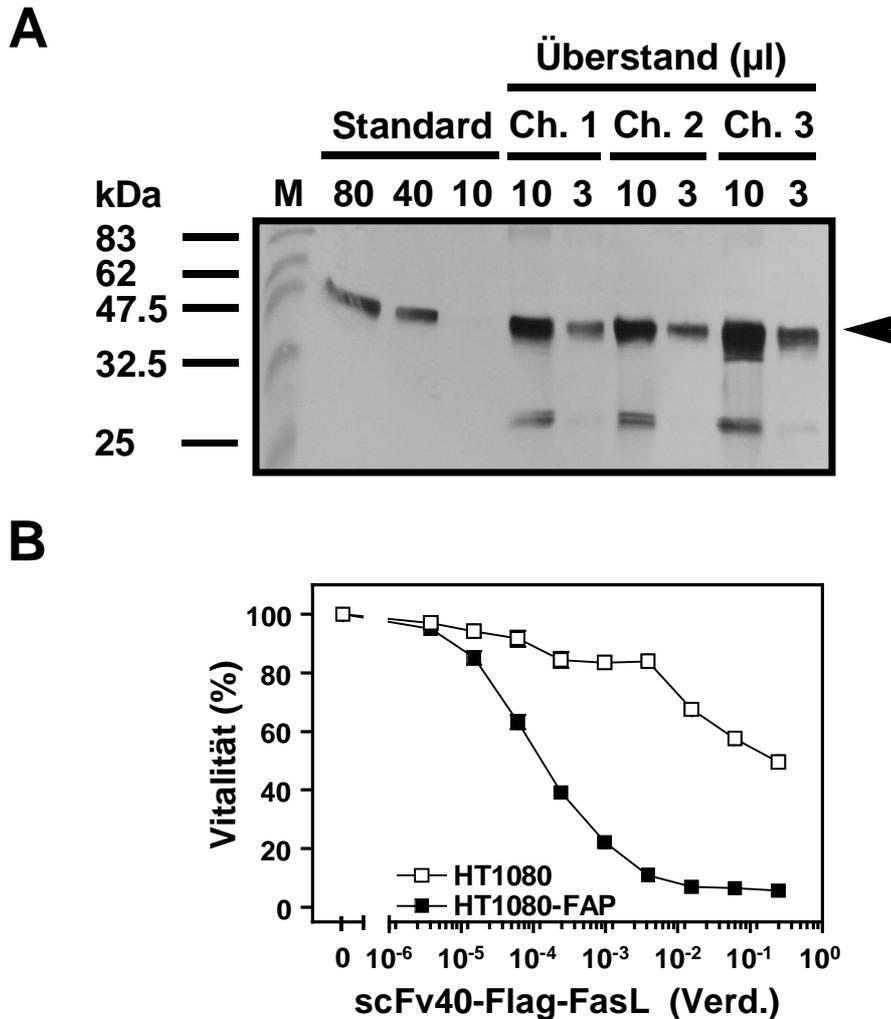


Abb. 1: Ermittlung der Konzentration (A) und Bioaktivität (B) von scFv40-Flag-FasL in Zellkulturüberständen. (A) Die angegebenen Mengen an aufgereinigtem scFv40-Flag-FasL (Standard in ng) bzw. Volumina an Zellkulturüberstand (µl) aus den Chargen 1 bis 3 wurden über SDS-PAGE in einem 13,5 %-igen Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem monoklonalen Antikörper anti-Flag M2 detektiert. Das monomere scFv40-Flag-FasL-Protein voller Länge ist mit einer Pfeilspitze markiert. (B) HT1080- und HT1080-FAP-Zellen wurden 16 h mit einer Titrationsreihe (1:4) des scFv40-Flag-FasL-haltigen Überstandes von Charge 1 beginnend bei Verdünnung 1:4 in Gegenwart von 2,5 µg/ml CHX stimuliert. Die Quantifizierung lebender Zellen erfolgte durch Färbung mit Kristallviolett.

Auf HT1080-FAP-Zellen ist nach der Titration des scFv40-Flag-FasL-enthaltenden Überstandes eine dosisabhängige zytotoxische Wirkung zu erkennen, die in dieser Form auf den parentalen HT1080-Zellen nicht zu beobachten ist (Abb. 1 B). Bei dem hier dargestellten, repräsentativen Experiment wirkt noch eine Verdünnung des

Überstandes um den Faktor 4000 auf etwas mehr als 50 % der HT1080-FAP-Zellen zytotoxisch, wohingegen die EC_{50} auf HT1080-Zellen bei einer Verdünnung von circa 1:4 liegt. Das therapeutische Fenster für die FAP-abhängige Zytotoxizität von scFv40-Flag-FasL auf HT1080-FAP-Zellen und der FAP-unabhängigen zytotoxischen Wirkung auf HT1080-Zellen beträgt daher circa den Faktor 1000.

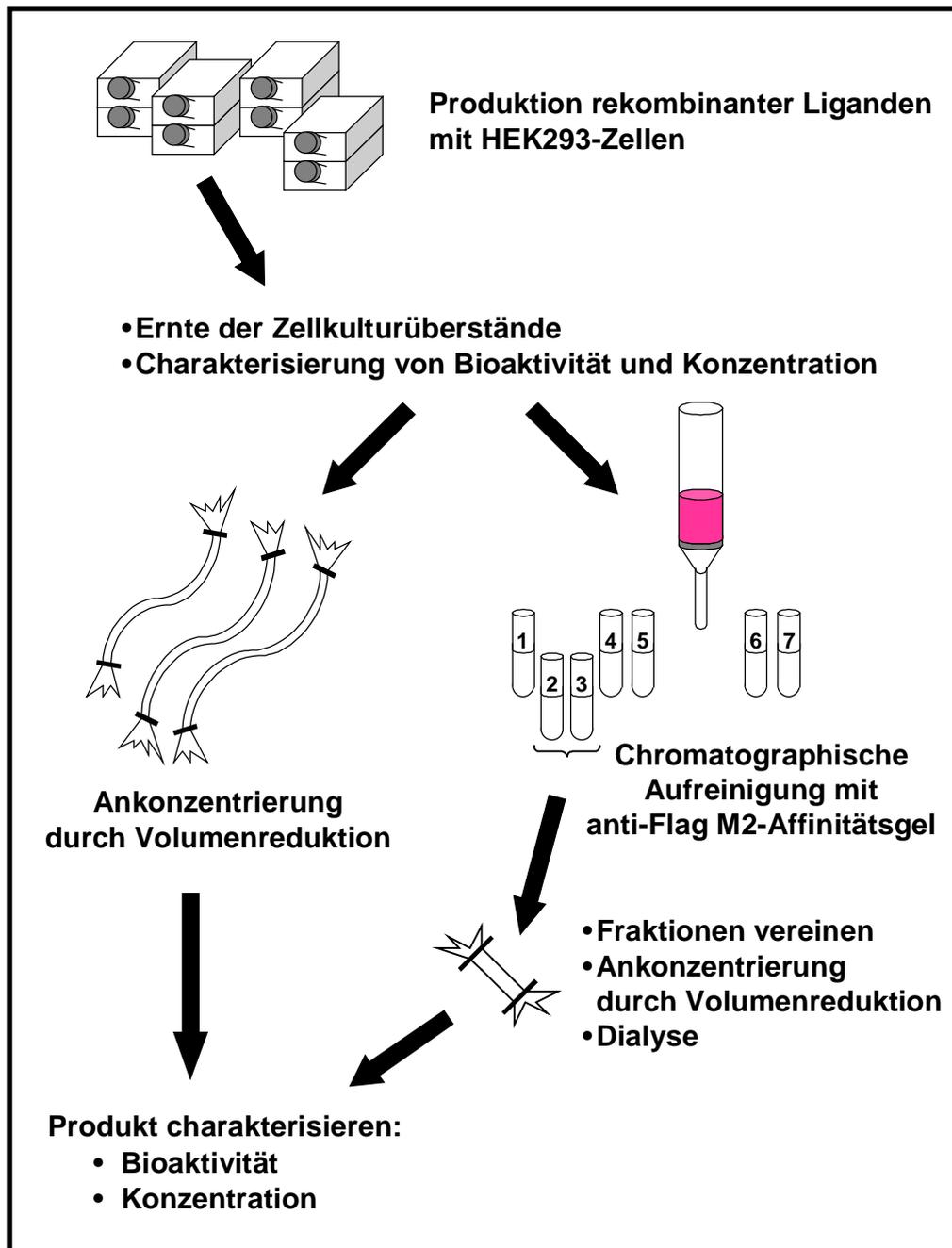


Abb. 2: Illustration der einzelnen Arbeitsschritte bei der Aufbereitung von scFv40-Flag-FasL-haltigen Überständen. Eine detaillierte Beschreibung dieser Arbeitsschritte ist in den Kapiteln 4 und 5 zu finden.

Um das rekombinante Antikörperderivat für die Untersuchungen in vivo verwenden zu können, wurde einerseits ein Teil des Überstandes ankonzentriert und andererseits eine Affinitätschromatographische Aufreinigung von scFv40-Flag-FasL mit darauffolgender Ankonzentrierung durchgeführt. Die unterschiedliche Vorgehensweise ist in Abbildung 2 in Form eines Flußdiagrammes zusammengefaßt. Durch eine sequentielle Reduktion des Flüssigkeitsvolumens um das 50-fache konnte die Konzentration von scFv40-Flag-FasL von etwa 10 µg/ml in purem Zellkulturüberstand auf etwa 400 µg/ml im Konzentrat gesteigert werden (Abb. 3 A). Aus dem Vergleich der Signale von 0,25 µl 50-fach Konzentrat A bzw. B mit der Bandenintensität des Proteinstandards bei 90 und 120 ng wird ersichtlich, daß in den aufgetragenen Volumina der Konzentrate jeweils circa 100 ng rekombinantes Protein enthalten war. Als geeignete Kontrolle für dieses Konzentrat wurde das konditionierte Kulturmedium von HEK293-Zellen gesammelt und ebenfalls durch Volumenreduktion ankonzentriert. Für die Herstellung dieses Kontrollüberstandes wurden HEK293-Zellen expandiert und an das Wachstum in RPMI mit 0,5 % FCS angepaßt. Die Produktion und Aufarbeitung wurde entsprechend dem Protokoll vorgenommen, das bereits für die Herstellung scFv40-Flag-FasL-haltiger Überstände und Konzentrate beschrieben wurde.

Die Vorgehensweise bei der Affinitätschromatographischen Aufreinigung von scFv40-Flag-FasL soll hier an einer repräsentativen Aufbereitung des Antikörperderivates nachvollzogen werden (siehe auch Abb. 2). Nach Angaben des Herstellers bindet 1 ml Affinitätsgel 6 bis 12 nmol Flag-markiertes Protein. Für ein Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 50 kDa entsprechen 6 nmol einer Menge von 300 µg Protein. In aller Regel wurden zur Aufreinigung 8 ml Affinitätsgel eingesetzt, das nach dieser Kalkulation circa 2,4 mg Protein binden kann. Auf die Säule dieser Größe wurden 300 ml Überstand mit einer Konzentration von 10 µg/ml scFv40-Flag-FasL aufgetragen, d. h. es wurde ein Überschuß von 25 % Protein eingesetzt. Nach der Elution des gebundenen scFv40-Flag-FasL wurden Proben der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE elektrophoretisch separiert und die Proteine anschließend durch Färbung mit „Coomassie Brilliant Blue“ oder im Western Blot detektiert (Abb. 3 B und C). Auf diese Weise konnten die Fraktionen identifiziert werden, die das gesuchte Protein enthielten.

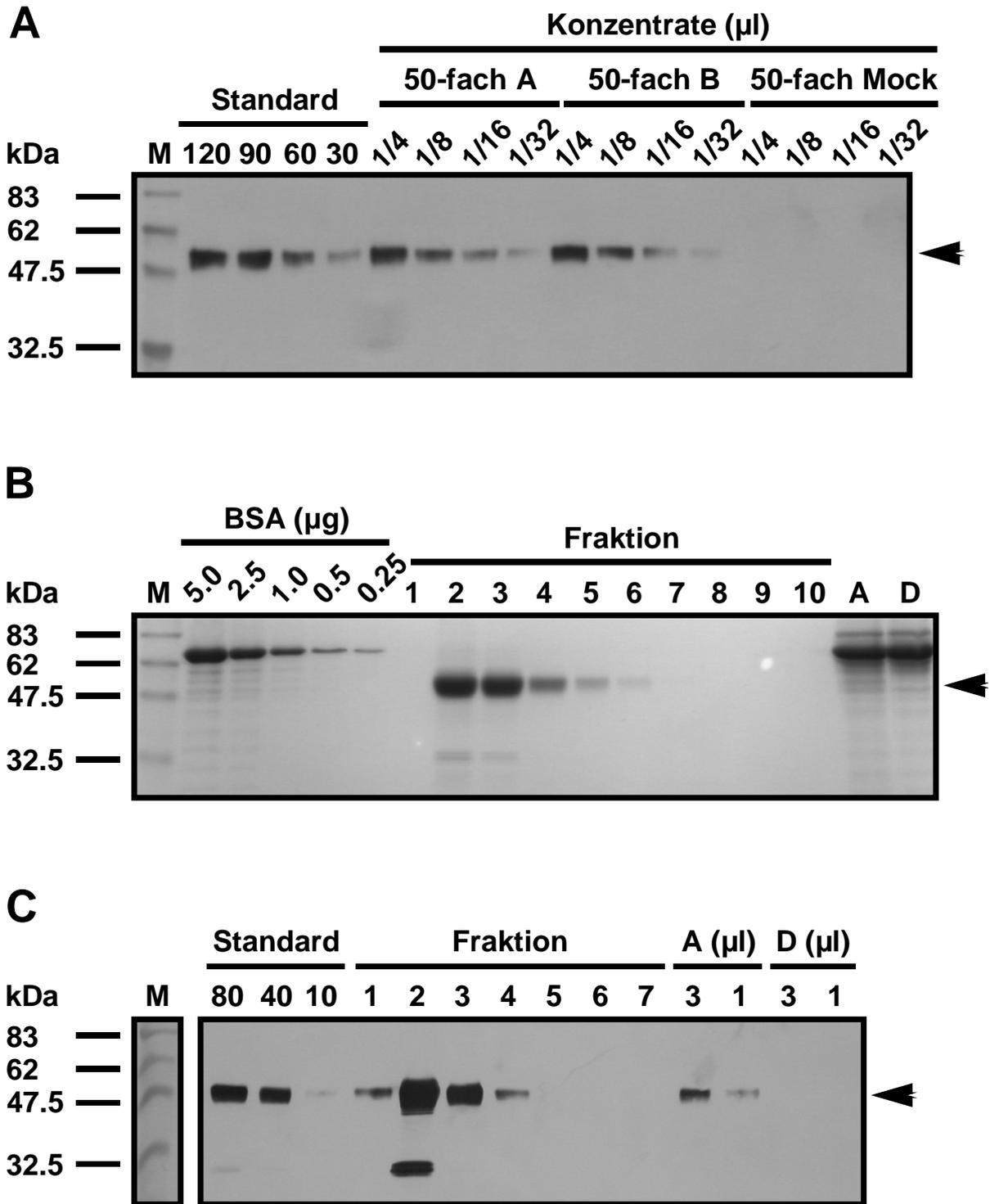


Abb. 3: Bestimmung der Konzentration von scFv40-Flag-FasL in ankonzentrierten Überständen (A) und Analyse der affinitätschromatographischen Aufreinigung von scFv40-Flag-FasL (B, C). (A) Die angegebenen Volumina (µl) der Konzentrate A und B, des ankonzentrierten, konditionierten Mediums (Mock) sowie eine serielle Verdünnung des scFv40-Flag-FasL-Proteinstandards (ng) wurden in einem 13,5 %-igen Gel über SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt. Das rekombinante Protein wurde im Western Blot mit dem Antikörper anti-Flag M2 detektiert. (B) Je 20 µl der Fraktionen 1 bis 10 sowie 20 µl des zur Aufreinigung verwendeten Überstandes (A) bzw. des Durchlaufs (D) wurden in einem 13,5 %-igen Gel mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Als Massenstandard wurde eine serielle Verdünnung von BSA verwendet. Die Proteine wurden im Gel mit „Coomassie Brilliant Blue“ angefärbt. Dargestellt ist die Analyse einer repräsentativen Aufreinigung, die nicht zu der im Text

beschriebenen Aufarbeitung gehört. **(C)** Von den Fraktionen 1 bis 7 wurden je 2 µl sowie die angegebenen Mengen scFv40-Flag-FasL-Proteinstandard (ng) und die angegebenen Volumina (µl) des zur Aufreinigung verwendeten Überstandes (A) bzw. des Durchlaufs (D) in einem 13,5 %-igen Gel mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt. Die Proteine wurden im Western Blot mit anti-Flag M2 detektiert. **Beachte:** Die in **(B)** und **(C)** analysierten Fraktionen stammen aus unterschiedlichen Aufreinigungen. **(A, B, C)** Das monomere scFv40-Flag-FasL-Protein voller Länge ist mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet.

Die Hauptmasse des gesuchten Antikörperderivates scFv40-Flag-FasL eluierte bei regelrecht durchgeführten Aufreinigungen stets in den Fraktionen 2 und 3 (Abb. 3 B und C). Kleinere Mengen des Fusionsproteins konnten in Fraktion 4 und Spuren in Fraktion 5 detektiert werden. Bei der in Fraktion 1 gesammelten Flüssigkeit handelte es sich hauptsächlich um das Totvolumen der Säule. Um eine weitere Konzentrierung des Proteins zu erzielen, wurden die Fraktionen 2 und 3 von vier aufeinanderfolgenden Aufreinigungen vereint und durch Dialyse gegen PEG 6000 um circa den Faktor 3,5 eingeeengt. Nach der Dialyse dieses Konzentrates gegen TBS-Lösung wurde die UV-Absorption bei 280 nm gemessen und eine Proteinkonzentration von 550 µg/ml ermittelt. Bei der hier vorgestellten Aufreinigung konnten insgesamt 10,45 mg scFv40-Flag-FasL isoliert werden (19 ml Konzentrat mit 550 µg/ml). Im ursprünglich eingesetzten Überstand waren 12 mg rekombinantes Protein enthalten, wovon 87 % aufgereinigt und gewonnen werden konnten.

Vor Gebrauch in vivo wurden die hergestellten Konzentrate und aufgereinigten scFv40-Flag-FasL-Präparationen auf deren Funktionalität in vitro untersucht. Für das scFv40-Flag-FasL-Konzentrat konnte ein Mittelwert für die EC₅₀ von 2,4 ng/ml und für aufgereinigtes scFv40-Flag-FasL von 2,3 ng/ml jeweils auf HT1080-FAP-Zellen bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Daher konnten beide scFv40-Flag-FasL-Präparationen hinsichtlich ihrer Bioaktivität als gleichwertig betrachtet werden. Die Experimente, die das zugrundeliegende mechanistische Prinzip der Aktivierung des zytotoxischen Potenzials von scFv40-Flag-FasL beschreiben, werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

6.2 In vitro Charakterisierung von scFv40-Flag-FasL

6.2.1 Proapoptotische Wirkungsweise von scFv40-Flag-FasL in vitro

Membranständiger FasL kann durch Metalloproteinasen proteolytisch innerhalb der extrazellulären Domäne prozessiert werden, was zur Freisetzung des löslichen FasL-Trimers führt (Schneider et al., 1998). Dieses lösliche FasL-Molekül besitzt im Vergleich zur membranständigen Variante eine um mehr als den Faktor 1000 reduzierte zytotoxische Wirkung. Durch Prozessierung des Liganden geht allerdings nicht die Fähigkeit zur Interaktion mit dem Rezeptor CD95/Fas verloren. Vielmehr läßt sich durch artifizielle Aggregation des löslichen Liganden mit quervernetzenden Antikörpern die zytotoxische Wirkung wieder herstellen (Schneider et al., 1998). Das Fusionsprotein scFv40-Flag-FasL zeigt sehr ähnliche funktionelle Eigenschaften hinsichtlich der zytotoxischen Wirkung in vitro. In löslichem, d. h. in nicht immobilisiertem Zustand weist das Fusionsprotein kaum eine zytotoxische Wirkung auf. Durch Bindung der „single chain“-Antikörperdomäne an das membranständige Antigen FAP wird das zytotoxische Potenzial aktiviert und in den Zielzellen oder direkt benachbarten Zellen wird Zelltod induziert.

Dieser Effekt läßt sich auf den Zell-Linien HT1080 und HeLa sowie den daraus abgeleiteten FAP-positiven Transfektanden beobachten und nachweisen. Die Expression des Tumorstromamarkers FAP auf diesen unterschiedlichen Zell-Linien wurde durch FACS-Analyse untersucht. Mit Hilfe des monoklonalen, FAP-spezifischen Antikörpers cF19γ1 konnte der Tumorstromamarker auf den entsprechend transfizierten Zell-Linien zweifelsfrei detektiert werden, wohingegen die parentalen Linien keine signifikante Expression von FAP aufwiesen (Abb. 4 A). Auch mit dem Fusionsprotein scFv40-Flag-FasL selbst ließ sich eine spezifische Färbung FAP-exprimierender Transfektanden vornehmen (Abb. 4 B), die auf den parentalen Linien nicht zu beobachten war. Diese Daten zeigen daher die spezifische Bindung des Fusionsproteins an das Oberflächenantigen FAP.

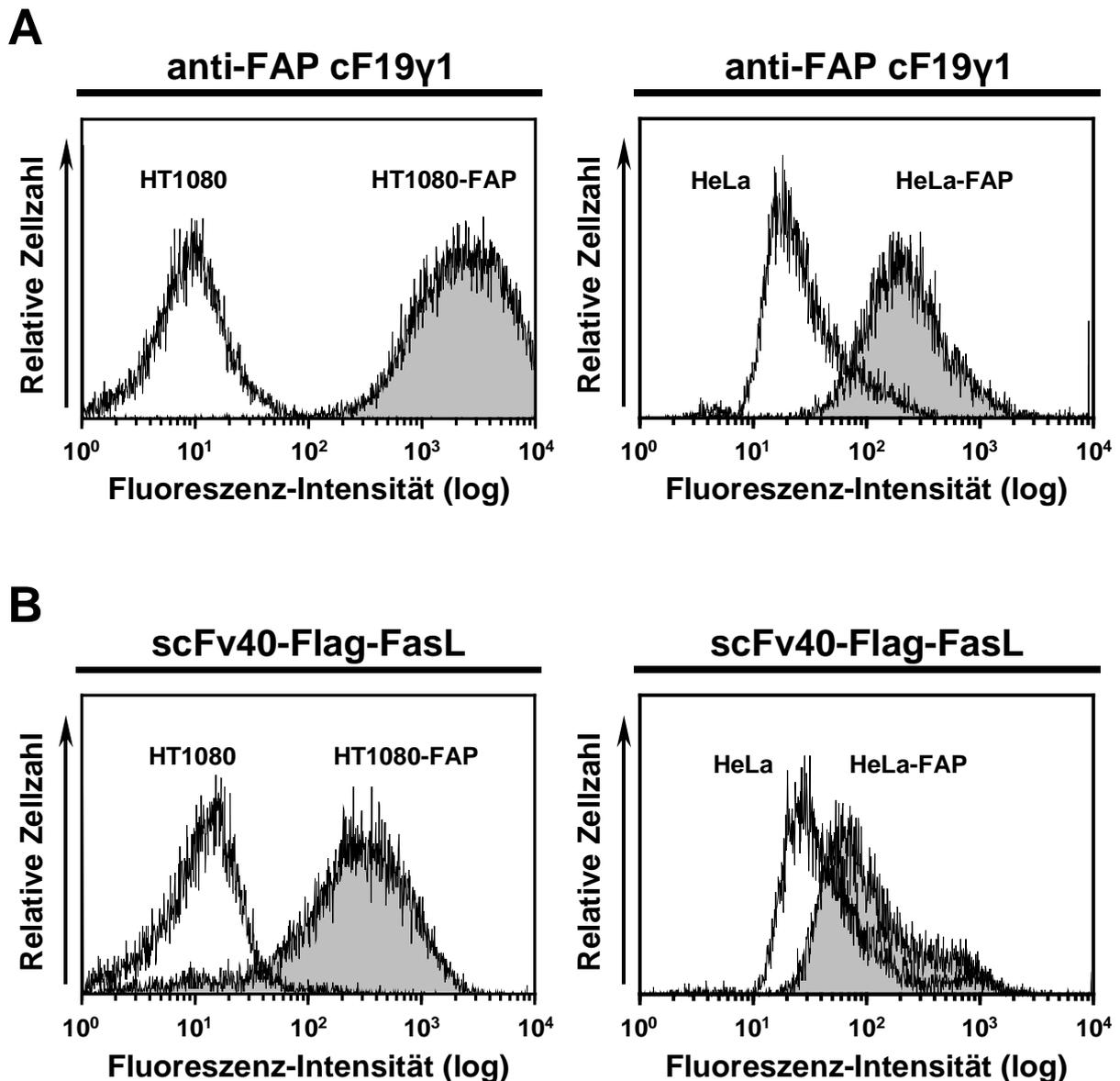


Abb. 4: Analyse der FAP-Expression in parentalen HT1080- und HeLa-Zellen sowie in den FAP-transfizierten Linien HT1080-FAP und HeLa-FAP. **(A)** Die Zellen wurden mit dem monoklonalen, FAP-spezifischen Antikörper cF19 γ 1 inkubiert. HT1080- und HT1080-FAP-Zellen wurden mit PE-markiertem und HeLa- bzw. HeLa-FAP-Zellen mit FITC-markiertem Zweitantikörper gefärbt. **(B)** Parentale respektive FAP-transfizierte Zellen wurden zunächst mit dem Fusionsprotein scFv40-Flag-FasL inkubiert. HT1080- und HT1080-FAP-Zellen wurden anschließend mit dem Komplex aus anti-Flag M2 und PE-markiertem anti-Maus-Serum und HeLa- bzw. HeLa-FAP-Zellen mit dem Komplex aus anti-Flag M2 und FITC-markiertem anti-Maus-Serum inkubiert. **(A, B)** Die Analyse der Fluoreszenzverteilung wurde im EPICS-Durchflußzytometer vorgenommen.

Für die Beurteilung der selektiven zytotoxischen Wirkung von scFv40-Flag-FasL, die sich nach spezifischer Immobilisierung an antigenpositiven Zellen einstellt, wurde zunächst die Fas-Sensitivität der parentalen Linien HT1080 bzw. HeLa mit der der FAP-exprimierenden Transfektanden HT1080-FAP und HeLa-FAP verglichen.

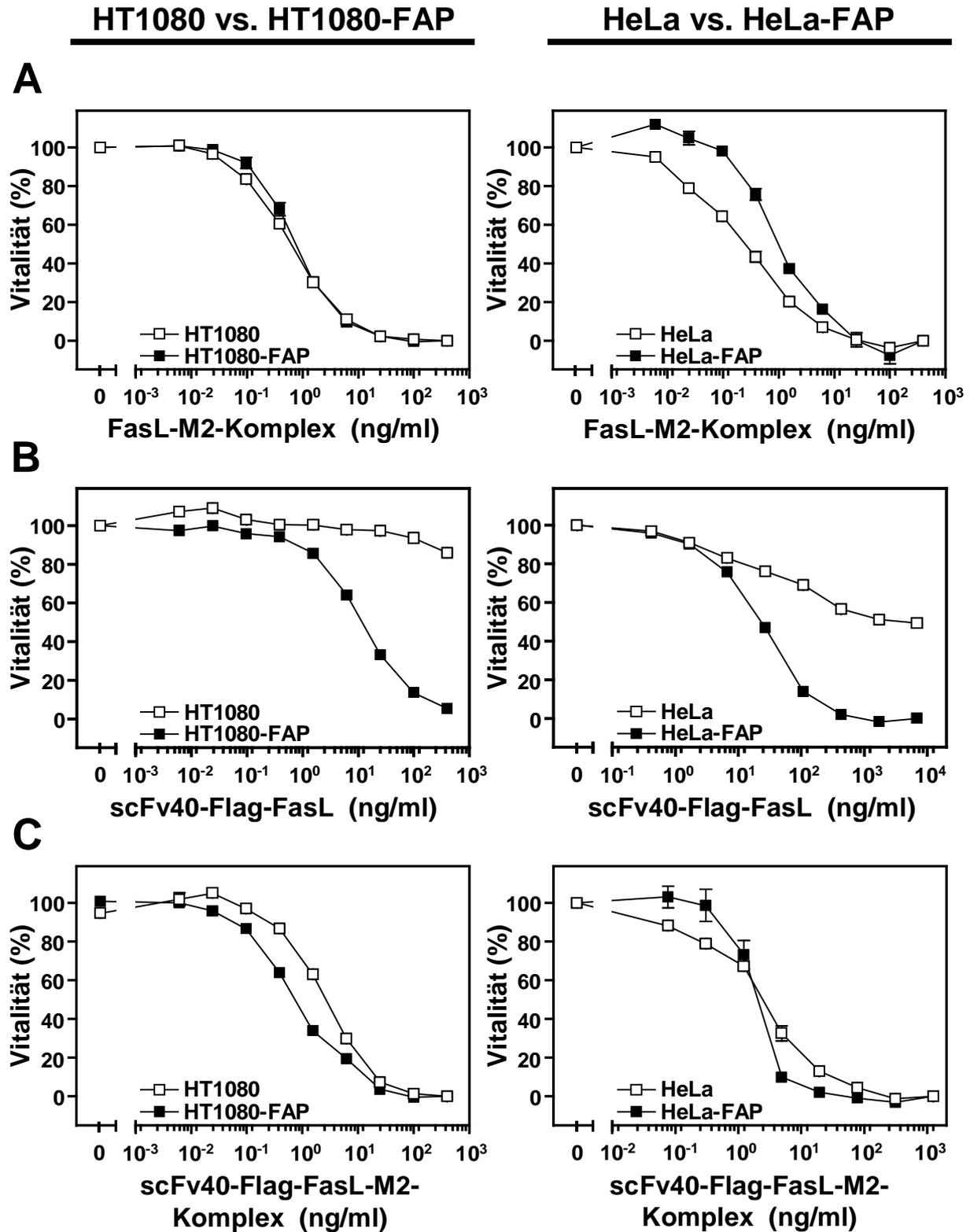


Abb. 5: Das Antikörperderivat scFv40-Flag-FasL induziert Fas-vermittelte Apoptose in Abhängigkeit von FAP. (A) HT1080- und HT1080-FAP-Zellen bzw. HeLa- und HeLa-FAP-Zellen wurden 16 h mit einer seriellen Verdünnung (1:4) von Flag-FasL beginnend bei 400 ng/ml behandelt. Flag-FasL wurde vor der Verwendung mit anti-Flag M2 (Endkonzentration 1 µg/ml) 1 h quervernetzt und bei gleichbleibender Konzentration von anti-Flag M2 austitriert. **(B)** HT1080- und HT1080-FAP-Zellen wurden 16 h mit einer Titrationsreihe (1:4) von scFv40-Flag-FasL beginnend bei 400 ng/ml stimuliert. HeLa- und HeLa-FAP-Zellen wurden 16 h mit einer seriellen Verdünnung (1:4) von scFv40-Flag-FasL beginnend bei 6,8 µg/ml behandelt. **(C)** HT1080- und HT1080-FAP-Zellen bzw. HeLa- und

HeLa-FAP-Zellen wurden 16 h mit einer Titrationsreihe (1:4) von aggregiertem scFv40-Flag-FasL beginnend bei 400 ng/ml respektive 1250 ng/ml behandelt. Vor der Verwendung wurde scFv40-Flag-FasL 1 h mit anti-Flag M2 (Endkonzentration 1 µg/ml) inkubiert und bei gleichbleibender Konzentration von anti-Flag M2 austitriert. **(A, B, C)** Die Stimulation der HT1080- und HT1080-FAP-Zellen wurde in Gegenwart von konstant 0,5 µg/ml CHX durchgeführt. HeLa- und HeLa-FAP-Zellen wurden bei konstant 2,5 µg/ml CHX stimuliert. Die Vitalität der Zellen wurde durch Färbung mit Kristallviolett bestimmt.

Für die parentalen HT1080-Zellen wurde eine EC_{50} für FasL-induzierten Zelltod von 0,5 ng/ml und für die FAP-positiven Transfektanden HT1080-FAP eine EC_{50} von 0,6 ng/ml ermittelt. Beide Zell-Linien wiesen somit eine vergleichbare Sensitivität für Fas-vermittelte Apoptose auf, wie aus den entsprechenden Dosis-Wirkungsdiagrammen ersichtlich wird (Abb. 5 A). Auch bei dem Zell-Paar HeLa und HeLa-FAP konnte eine vergleichbare Sensitivität für Fas-induzierten Zelltod beobachtet werden (Abb. 5 A). Für die parentalen HeLa-Zellen wurde eine EC_{50} von 1,6 ng/ml ermittelt und für die Transfektande HeLa-FAP eine EC_{50} von 1,5 ng/ml. Bei der Titration von scFv40-Flag-FasL wurde ein dramatischer Unterschied in der zytotoxischen Aktivität des Fusionsproteins auf die parentalen HT1080- und HeLa-Zellen bzw. auf die FAP-positiven Transfektanden deutlich. Obwohl eine vergleichbare Sensitivität der Zell-Linien für Fas-vermittelte Apoptose besteht, konnte eine umfassende zytotoxische Wirkung nur auf den FAP-positiven Transfektanden beobachtet werden, wohingegen scFv40-Flag-FasL auf die zugehörigen parentalen Linien nicht (HT1080) oder nur deutlich schlechter (HeLa) zytotoxisch wirkte (Abb. 5 B). Wurden allerdings sehr hohe Konzentrationen an scFv40-Flag-FasL eingesetzt, so konnte eine schwache zytotoxische Aktivität unabhängig von der Präsenz des Oberflächenmarkers FAP auf den stimulierten Zellen beobachtet werden (Abb. 5 B). Für HT1080-FAP-Zellen wurde eine EC_{50} von 4,0 ng/ml und für HeLa-FAP-Zellen von 24 ng/ml für scFv40-Flag-FasL-induzierten Zelltod ermittelt. Im Gegensatz dazu war scFv40-Flag-FasL erst ab einer Konzentration von 1300 ng/ml bzw. 1800 ng/ml für 50 % der parentalen HT1080- respektive HeLa-Zellen zytotoxisch (Daten nicht gezeigt und Abb. 5 B). Wurden die Zellen mit artifiziell quervernetztem scFv40-Flag-FasL stimuliert, so zeigte sich in Bezug auf die zytotoxische Wirkung das von quervernetztem löslichem FasL bekannte Muster (Abb. 5 C). Für die aggregierte Form wurde eine EC_{50} von 1,25 ng/ml auf HT1080 bzw. von 0,3 ng/ml auf HT1080-FAP-Zellen ermittelt. Die zugehörigen Werte für das Paar HeLa und HeLa-FAP sind in der Zusammenfassung aller EC_{50} -Werte in Tabelle 1 gegeben.

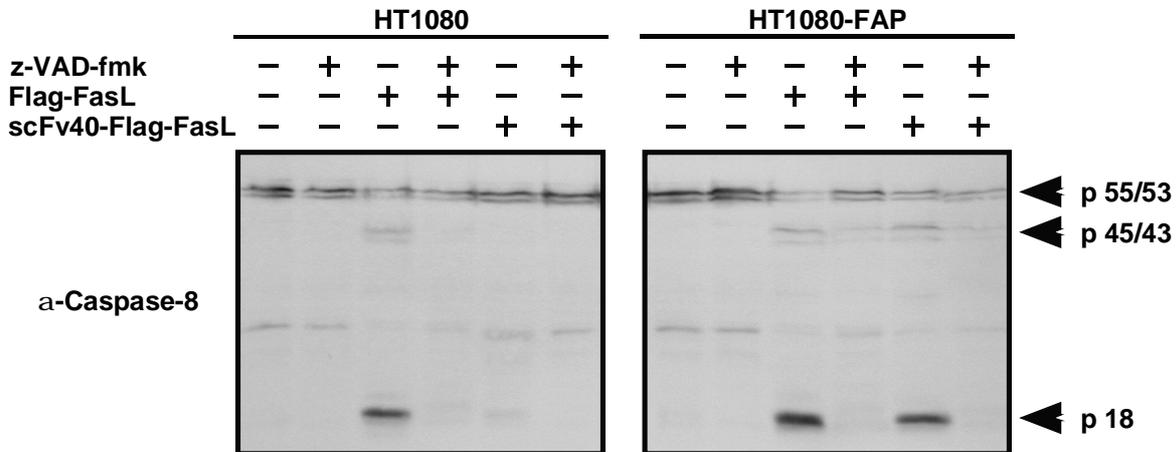
Tabelle 1: Zusammenfassung der EC₅₀-Werte von FasL und scFv40-Flag-FasL auf parentalen und FAP-transfizierten HT1080- bzw. HeLa-Zellen. Die angegebenen Mittelwerte beruhen im Falle der HT1080- und HT1080-FAP-Zellen auf den EC₅₀-Werten aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten. Die EC₅₀-Mittelwerte für HeLa- und HeLa-FAP-Zellen wurden aus den Daten von jeweils 2 unabhängigen Experimenten ermittelt. Alle angegebenen EC₅₀-Werte in ng/ml.

Zell-Linie	FasL-M2-Komplex	scFv40-Flag-FasL	scFv40-Flag-FasL-M2-Komplex
HT1080	0,5	1300	1,25
HT1080-FAP	0,6	4,0	0,3
HeLa	1,6	1800	3,8
HeLa-FAP	1,5	24	5,5

Mit Hilfe unterschiedlicher neutralisierender Reagenzien und Inhibitoren konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem scFv40-Flag-FasL-induzierten Zelltod tatsächlich um FAP-abhängige, Fas-vermittelte Apoptose handelt. Die ursprüngliche zytotoxische Wirkung des Fusionsproteins auf HT1080-FAP-Zellen konnte durch Vorinkubation von scFv40-Flag-FasL mit Fas-Fc um etwa 40 % reduziert werden (Abb. 6). Bei Fas-Fc handelt es sich um ein rekombinantes Protein, bei dem die extrazelluläre Domäne des Fas-Rezeptors genetisch mit dem Fc-Teil des Immunglobulin G₁ fusioniert wurde. Das Reagens Fas-Comp zeigte sich bei der Neutralisation der scFv40-Flag-FasL-induzierten Zytotoxizität noch effizienter: Wurde scFv40-Flag-FasL mit Fas-Comp vorinkubiert, konnte im Toxizitätsassay eine fast vollständige Aufhebung der zytotoxischen Wirkung beobachtet werden (Abb. 6). Die Inkubation von TRAIL-R2-Fc mit scFv40-Flag-FasL hatte im Gegensatz dazu keine signifikante Auswirkung auf den scFv40-Flag-FasL-induzierten Zelltod in HT1080-FAP-Zellen. Von Frau Dr. Müller Szeraws konnte in ähnlich durchgeführten Zytotoxizitätsassays bereits gezeigt werden, daß sich durch Vorinkubation der HT1080-FAP-Zellen mit Minibody-40 die spezifische Bindung von scFv40-Flag-FasL an FAP verhindern läßt und damit auch dessen zytotoxische Wirkung inhibiert wird (Müller Szeraws, 2002). Zusammenfassend unterstützen diese Ergebnisse daher die postulierte Modellvorstellung, entsprechend der das zytotoxische Potenzial des Antikörper-FasL-Fusionsproteins erst nach Bindung an den Tumorstromamarker FAP aktiviert wird.

induzierte Prozessierung von Caspase-8 auf die FAP-positive Linie beschränkt bleibt (Abb. 7 B).

A



B

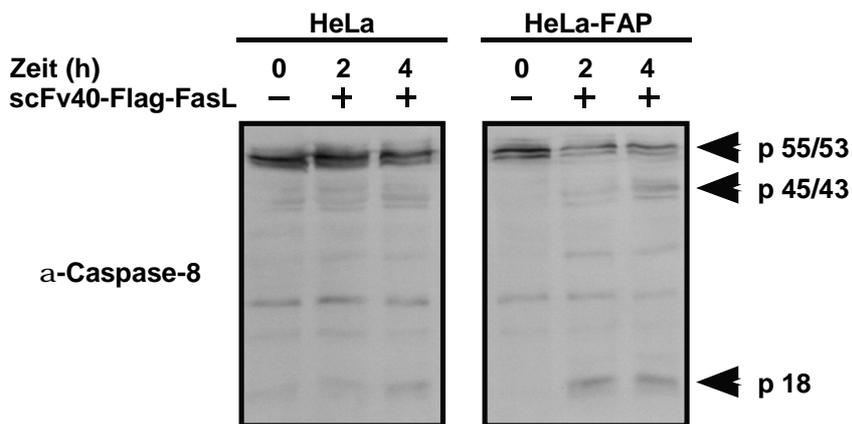


Abb. 7: Analyse der FasL- bzw. scFv40-Flag-FasL-induzierten Prozessierung von Caspase-8 in parentalen und FAP-exprimierenden HT1080-Zellen (A) und Analyse der scFv40-Flag-FasL-induzierten Caspase-8-Prozessierung in HeLa- sowie HeLa-FAP-Zellen (B). (A) HT1080- und HT1080-FAP-Zellen wurden 2 h mit 0,5 µg/ml CHX vorinkubiert und anschließend 7 h mit 100 ng/ml Flag-FasL, das separat 1 h vor Beginn des Experimentes mit anti-Flag M2 (1 µg/ml) quervernetzt wurde, behandelt bzw. 7 h allein mit 100 ng/ml scFv40-Flag-FasL stimuliert. Zur Inhibition der Caspaseprozessierung wurden die entsprechend gekennzeichneten Gruppen 1 h vor Zugabe der rekombinanten Todesliganden mit 20 µM z-VAD-fmk vorinkubiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Bradford-Assay wurden 80 µg Gesamtlysat pro Spur in einem 13,5 %-igen Gel mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Procaspase-8 sowie die zugehörigen Spaltprodukte wurden nach dem elektrophoretischen Transfer auf eine Nitrozellulosemembran im Western Blot detektiert. (B) HeLa- und HeLa-FAP-Zellen wurden für 3 h mit 2,5 µg/ml CHX vorinkubiert und anschließend für die jeweils angegebene Zeit mit 2 µg/ml scFv40-Flag-FasL behandelt. Pro Spur wurden wiederum 80 µg Gesamtlysat in einem 13,5 %-igen Gel separiert und die Detektion der gesuchten Proteine wurde wie zuvor durchgeführt.

Die Tatsache, daß die Spaltung von Caspase-Zymogenen während dem apoptotischen Prozeß mittels Western Blot nachgewiesen werden kann, beweist im strengen Sinne noch nicht, daß die entstehenden Caspasefragmente tatsächlich

enzymatische Aktivität besitzen (Blajeski und Kaufmann, 1999). Für diese Beweisführung wurde daher die Caspaseaktivität direkt untersucht, indem die Umsetzung eines fluorogenen Substrates verfolgt wurde. Die bereits im Western Blot auf die Prozessierung von Procaspase-8 hin untersuchten Lysate der HT1080- und HT1080-FAP-Zellen wurden daher für die Bestimmung der Aktivität von Caspase-3 eingesetzt.

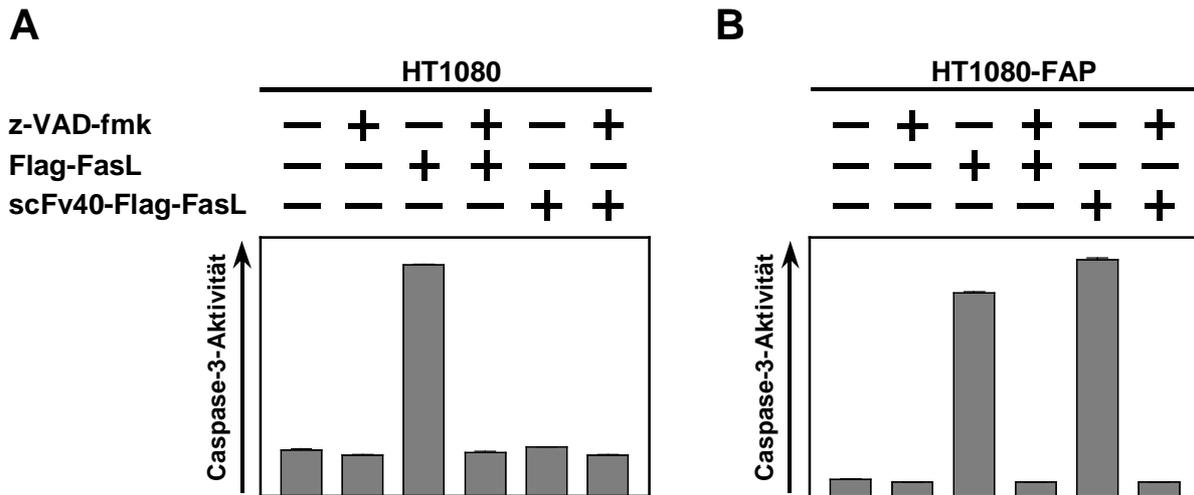


Abb. 8: Das Fusionsprotein scFv40-Flag-FasL induziert die Aktivierung von Caspase-3 exklusiv in FAP-exprimierenden Zellen. Analyse der Aktivität von Caspase-3 in HT1080- (A) und HT1080-FAP-Zellen (B) nach Stimulation mit Flag-FasL bzw. scFv40-Flag-FasL. Die Stimulation der Zellen ist in der Legende zu Abb. 7 im Detail erläutert. Die Messung der Caspase-Aktivität ist in Abschnitt 5.2.9 beschrieben.

Wie in Abbildung 8 dargestellt, konnte in HT1080-Zellen eine deutliche Caspase-3-Aktivität nach der Stimulation mit FasL-M2-Komplex nachgewiesen werden. Die Behandlung der Zellen mit z-VAD-fmk blockierte die FasL-induzierte Aktivität von Caspase-3. Dagegen führte eine Stimulation der HT1080-Zellen mit scFv40-Flag-FasL nicht zu einer Aktivierung von Caspase-3. In HT1080-FAP-Zellen konnte ein identisches Muster für die Aktivierung von Caspase-3 nach der Behandlung mit aggregiertem FasL beobachtet werden (Abb. 8 B). Im Gegensatz zu den parentalen Zellen ließ sich aber in HT1080-FAP-Zellen eine eindeutige Aktivierung von Caspase-3 nach Behandlung mit scFv40-Flag-FasL feststellen, die wiederum durch Präinkubation der Zellen mit z-VAD-fmk vollständig inhibiert werden konnte. Mit der Untersuchung der Prozessierung von Procaspase-8 und dem Nachweis der Aktivität einer Effektorcaspase nach Stimulation von FAP-positiven Zellen mit scFv40-Flag-FasL konnte die Richtigkeit der vorangehenden Experimente bestätigt werden.

Bei den bisher gezeigten Daten wurden sämtliche Zellen durch Präinkubation mit Cycloheximid (CHX) für die zytotoxische Wirkung von scFv40-Flag-FasL bzw. quervernetztem FasL sensitiviert. Die Wirkung von CHX beruht auf der Inhibition der Proteinsynthese. Die Todesrezeptor-vermittelte Induktion von Apoptose wird durch die Behandlung mit CHX hauptsächlich dadurch beeinflusst, daß die Expression von cFLIP, einem enzymatisch inaktiven Homolog von Caspase-8, deutlich reduziert wird (Kreuz, 2000; Kreuz et al., 2001) und so die Induktion des Fas-vermittelten Zelltodes entscheidend erleichtert wird. Im Hinblick auf die Untersuchung der Aktivität von scFv40-Flag-FasL in vivo war deshalb von Interesse, ob sich ohne vorherige Sensitivierung der HT1080- und HT1080-FAP-Zellen die zytotoxischen Effekte von scFv40-Flag-FasL in vitro ebenfalls erkennen lassen oder nicht. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse repräsentativer Zytotoxizitätsstudien dargestellt. Wie diese Resultate zeigen, war in vitro eine scFv40-Flag-FasL-vermittelte Induktion von Apoptose in HT1080-FAP-Zellen selbst ohne vorherige Sensitivierung mit CHX möglich. Allerdings wurden die Zellen bei diesen Studien 48 h mit der Titrationsreihe des rekombinanten Proteins inkubiert. Mit der Titration von quervernetztem FasL konnte weiterhin bestätigt werden, daß auch unter diesen Bedingungen grundsätzlich eine vergleichbare Sensitivität beider Zell-Linien gegenüber Fas-vermittelter Apoptose besteht (Abb. 9). Die zugehörigen EC₅₀-Werte von 10,5 ng/ml für HT1080- und 10,0 ng/ml für HT1080-FAP-Zellen machen das deutlich.

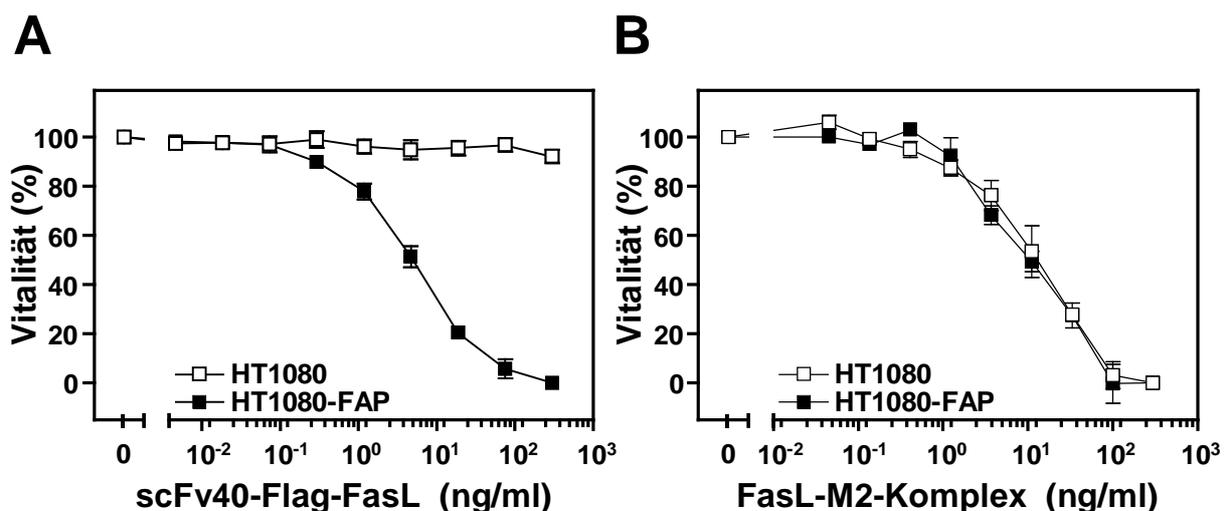


Abb. 9: In vitro kann die scFv40-Flag-FasL- bzw. FasL-vermittelte Apoptose in HT1080- und HT1080-FAP-Zellen ohne vorherige Sensitivierung der Zellen mit CHX induziert werden. In einer "96-well"-MTP wurden $1,0 \times 10^4$ HT1080- bzw. HT1080-FAP-Zellen pro "well" ausgesät und üN bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit einer seriellen Verdünnung von

scFv40-Flag-FasL (1:4) bzw. von Flag-FasL (1:3) beginnend bei jeweils 300 ng/ml stimuliert. Flag-FasL wurde 1 h vor der Verwendung mit anti-Flag M2 (Endkonzentration 1 µg/ml) quervernetzt und bei gleichbleibender Konzentration von anti-Flag M2 austitriert. Die Zytotoxizitätsassays wurden 48 h inkubiert und die Vitalität der Zellen anschließend durch Färbung mit Kristallviolett und Messung im Spektrophotometer quantifiziert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 3 durchgeführten Zytotoxizitätsassays.

6.2.2 Nichtapoptotische Wirkung von scFv40-Flag-FasL in vitro

In jüngerer Vergangenheit wird vermehrt von nichtapoptotischen Funktionen des FasL/Fas-Systems berichtet. So übt beispielsweise die Stimulation des Fas-Rezeptors eine proliferative Wirkung auf T-Zellen (Alderson et al., 1993) wie auch auf Fibroblasten (Freiberg et al., 1997) aus. Weiterhin konnten Julie Desbarats und Kollegen zeigen, daß die Stimulation des Rezeptors CD95/Fas in primären Neuronen das Wachstum von Neuriten anregt, da mit diesem Signal eine anhaltende Aktivierung des ERK-Signalweges gegeben ist (Desbarats et al., 2003). Neben den Wechselwirkungen des FasL/Fas-Systems mit den Mitgliedern der MAPK-Familie sind offenbar auch Verbindungen über die Adaptermoleküle FADD und TRAF2 vorhanden, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB führen (Wajant et al., 2000; Kreuz et al., 2004). Die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors induziert die Expression zahlreicher Zielgene (Pahl, 1999). Es ist daher anzunehmen, daß für die antitumorale Wirkung des Fusionsproteins scFv40-Flag-FasL in vivo nicht ausschließlich die proapoptotischen Fähigkeiten von Bedeutung sind, sondern darüber hinaus die geninduktiven Funktionen des Rezeptors CD95/Fas ausschlaggebend sind. Im Falle der Fas-vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB spielt dabei nicht allein die Induktion antiapoptotischer Zielgene eine Rolle, die den stimulierten Zellen selbst durch Eingriff dieser Moleküle in die proapoptotische Signalgebung Schutz bieten können, sondern weiterhin die Aktivierung und Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL1 oder IL6 und auch von Chemokinen wie MCP1 und IL8. Durch die Analyse der Produktion von IL8 im ELISA sollte daher zunächst in vitro geklärt werden, ob die Wechselwirkung des Fusionsproteins scFv40-Flag-FasL mit dem Oberflächenantigen FAP auf entsprechend transfizierten Zellen vergleichbare Fas-vermittelte Effekte auslösen kann wie quervernetztes FasL auf parentalen Zellen.

Die Stimulation von HT1080-Zellen mit aggregiertem FasL induzierte die Produktion von IL8. Dieser Effekt konnte durch Vorinkubation der Zellen mit z-VAD-fmk

beträchtlich gesteigert werden (Abb. 10 A). Eine Behandlung der parentalen Zellen mit dem Fusionsprotein allein konnte diesen Effekt nicht bewirken, ebensowenig förderte die Vorinkubation der Zellen mit z-VAD-fmk die scFv40-Flag-FasL-induzierte IL8-Expression. Erst durch die künstliche Aggregation des Fusionsproteins traten die geninduktiven Fähigkeiten in Erscheinung und konnten am deutlichsten gemessen werden, wenn die parentalen Zellen vor den ebenfalls wirksamen apoptotischen Eigenschaften durch Zugabe von z-VAD-fmk geschützt wurden (Abb. 10 A). Auch im Überstand der FAP-transfizierten HT1080-Zellen konnte IL8 nach Stimulation mit quervernetztem FasL nachgewiesen werden (Abb. 10 B). Die Inhibition der Caspasen mit z-VAD-fmk schützte diese Zellen ebenfalls und steigerte die Produktion von IL8. Wurden die HT1080-FAP-Zellen allein mit scFv40-Flag-FasL behandelt, konnte im Gegensatz zu den parentalen Zellen die Produktion von IL8 beobachtet werden, die sich wiederum durch Zugabe von z-VAD-fmk deutlich steigern ließ (Abb. 10 B). Eine zusätzliche Aggregation von scFv40-Flag-FasL konnte auf den HT1080-FAP-Zellen keine signifikante Steigerung der IL8-Produktion bewirken.

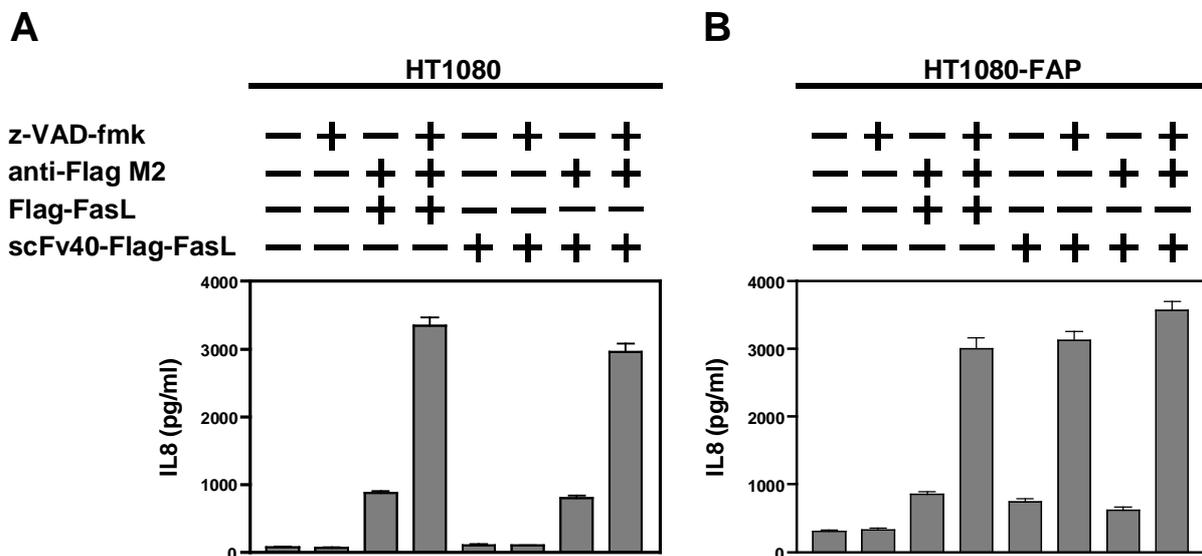


Abb. 10: Analyse der FasL- bzw. scFv40-Flag-FasL-vermittelten Induktion von IL8 in HT1080- (A) und HT1080-FAP-Zellen (B) mittels ELISA. HT1080- und HT1080-FAP-Zellen wurden in "96-well"-MTP kultiviert und am folgenden Tag stimuliert. Die Zellen wurden 8 h mit 200 ng/ml quervernetztem Flag-FasL bzw. 200 ng/ml scFv40-Flag-FasL inkubiert. Flag-FasL und wo angegeben scFv40-Flag-FasL wurde vor Verwendung 1 h mit anti-Flag M2 (1 µg/ml) vorinkubiert. Die Zellen derjenigen Gruppen, die durch Behandlung mit z-VAD-fmk vor Apoptose geschützt werden sollten, wurden 1 h vor Beginn der Stimulation mit dem Caspaseinhibitor (20 µM) präinkubiert. Die Kulturüberstände wurden nach 8 h Inkubation abgenommen und mit einem IL8-spezifischen ELISA-Kit analysiert (siehe Abschnitt 5.2.8). Die Umrechnung der im Spektrophotometer gemessenen Absorption in pg/ml wurde mit Hilfe einer IL8-Eichgeraden vorgenommen.

Es bleibt daher festzustellen, daß scFv40-Flag-FasL nach Immobilisierung nicht nur vergleichbare apoptotische Eigenschaften wie quervernetzter FasL induzieren kann, sondern auch dazu in der Lage ist, die antiapoptotischen Signalwege des Fas-Rezeptors zu aktivieren. Im Zusammenhang mit der erhofften antitumoralen Wirkung des Fusionsproteins in vivo spielt die Aktivierung von Chemokinen und Zytokinen eventuell eine zentrale Rolle.

6.3 Die systemische Applikation von scFv40-Flag-FasL induziert in vivo keine akut toxische Wirkung.

Die Anwendung von agonistischen Fas-spezifischen Antikörpern als therapeutisch wirksame Medikamente in der Krebstherapie ist aufgrund starker Nebenwirkungen nicht möglich (Timmer et al., 2002). So genügt zwar eine einzige intravenöse Injektion eines agonistischen Fas-Antikörpers, um in einem *nu/nu*-Mausmodell in vivo die Regression eines xenotransplantierten humanen B-Zell-Tumors zu induzieren (Trauth et al., 1989), eine solche Behandlung führt aber auch zu einer fatalen Schädigung der Leber, in der zahlreiche fokale Hämorrhagien und Nekrose beobachtet werden können (Ogasawara et al., 1993). In verschiedenen Publikationen wird davon berichtet, daß auch löslicher FasL, sowohl rekombinante Proteine als auch der auf natürliche Weise prozessierte Ligand, in Konzentrationen von weniger als 10 ng/ml Apoptose in murinen Zellen auslösen kann (Tanaka et al., 1995; Mariani et al., 1995; Kayagaki et al., 1995; Mariani et al., 1996). In Tierversuchen mit Mäusen führt nun die Verabreichung von rekombinantem FasL ebenfalls zu einer massiven Schädigung der Leber und zu einem schnellen Tod der behandelten Tiere, also zu denjenigen Auswirkungen, die für die agonistischen Fas-spezifischen Antikörper beschrieben wurden.

Die Struktur und insbesondere die Aktivität von natürlich prozessiertem und daher löslichem FasL wurde unter anderem von Pascal Schneider und Jürg Tschopp näher untersucht. Im Gegensatz zu den zuvor zitierten Arbeiten konnte von ihnen gezeigt werden, daß löslicher FasL nur eine schwache Bioaktivität aufweist (Schneider et al., 1998). Weiterhin wurde von diesen Autoren ein Modell vorgeschlagen, wonach die apoptotische Wirkung des membrangebundenen Liganden durch Prozessierung

verloren geht und im Blutkreislauf zirkulierender FasL daher keine systemischen Gewebeschäden verursacht (Schneider et al., 1998).

Frau Müller Szeraws konnte mittels Gelfiltrationschromatographie bereits zeigen, daß das scFv40-Flag-FasL-Konstrukt hauptsächlich als Trimer vorliegt und nicht zur Aggregation tendiert (Müller Szeraws, 2002). So konnte in Zytotoxizitätsassays erst bei hohen Konzentrationen eine Fas-induzierte Apoptose beobachtet werden, die nicht auf der spezifischen Interaktion des „single chain“-Anteils mit dem Oberflächenantigen FAP beruht. Diese Aktivität könnte durch Spuren von hochmolekularen Komplexen verursacht werden (siehe Abb. 5). Um systemische Nebenwirkungen, wie sie eingangs für die agonistischen Antikörper und die aktiven rekombinanten FasL-Varianten beschrieben wurden, zu erkennen, wurde die potenzielle Toxizität von scFv40-Flag-FasL in vivo untersucht. Hierzu wurde einer Gruppe von CD1-Mäusen einmalig scFv40-Flag-FasL (90 µg) in die Schwanzvene injiziert und weitere Gruppen wurden mit einer Reihe niedrig konzentrierter Injektionen von scFv40-Flag-FasL behandelt. In den Tieren der letztgenannten Gruppen wurde das scFv40-Flag-FasL-Konstrukt durch Gabe einer zweiten, innerhalb von 30 min auf die erste folgende Injektion von 25 µg Flag-spezifischem Antikörper in vivo quervernetzt. Mit diesen Gruppen sollte kontrolliert werden, ob sich der FasL-Teil des scFv40-Flag-FasL-Proteins nach Aggregation in vivo wie erwartet analog zu quervernetztem löslichem FasL verhält.

Eine Injektion von 2 µg scFv40-Flag-FasL, die durch eine anschließende Injektion von anti-Flag M2 aggregiert wurde, erwies sich als nicht toxisch. Aufgrund der Behandlung mit 4 µg Fusionsprotein in Kombination mit anti-Flag M2 starb ein Tier (1/6) und bei Injektion von 8 µg scFv40-Flag-FasL starben nach anschließender Quervernetzung bereits alle behandelten Mäuse (6/6). Die alleinige Injektion von 90 µg scFv40-Flag-FasL hingegen überlebten sämtliche Tiere ohne phänotypische Anzeichen von Krankheit oder Unwohlsein (Abb. 11).

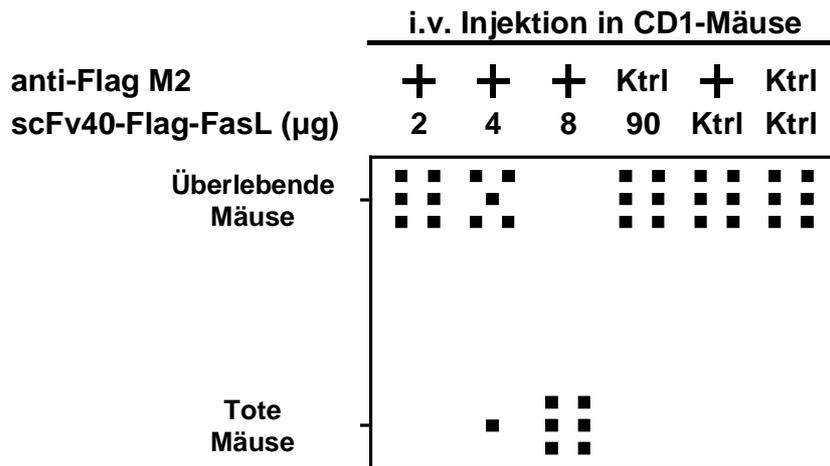


Abb. 11: Das scFv40-Flag-FasL-Konstrukt zeigt keine systemische Toxizität.

Die angegebene Dosis scFv40-Flag-FasL bzw. sterile TBS-Lösung (Kontrolle: Ktrl) wurde in weibliche CD1-Mäuse i.v. injiziert. Jede Gruppe umfaßte 6 Tiere. Innerhalb von 30 min nach der ersten Injektion wurden wo angegeben 25 µg anti-Flag M2 oder 0,9 %-ige NaCl-Lösung (Kontrolle: Ktrl) auf dieselbe Weise appliziert. Sämtliche Mäuse, die mit 8 µg scFv40-Flag-FasL und anti-Flag M2 behandelt wurden, starben innerhalb von 90 min, ebenso wie ein Tier, das mit 4 µg scFv40-Flag-FasL und anti-Flag M2 behandelt wurde. Den 5 anderen Tieren dieser Gruppe fügte diese Behandlung keine sichtbaren Schäden zu. Die alleinige Injektion von 90 µg scFv40-Flag-FasL oder 25 µg anti-Flag M2, von 2 µg scFv40-Flag-FasL und anti-Flag M2 wie auch die Behandlung mit TBS- und NaCl-Lösung führte nicht zu phänotypisch sichtbaren Krankheitsanzeichen oder gar zum Tod der Tiere.

In einem Folgeexperiment wurde untersucht, ob aggregiertes scFv40-Flag-FasL, wie für andere Fas-Agonisten beschrieben, eine Schädigung der Leber induziert. Hierfür wurden C57BL/6 x CBA/J-Mäuse mit den in Abbildung 12 angegebenen Kombinationen aus scFv40-Flag-FasL, Flag-spezifischem Antikörper bzw. konditioniertem Medium behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der letzten Injektion getötet. Zur Kontrolle wurden außerdem gänzlich unbehandelte C57BL/6 x CBA/J-Mäuse ebenfalls wie folgt untersucht: Allen Tieren wurde sofort nach Todeseintritt der Thorax geöffnet und durch Herzpunktion Blut zur Gewinnung von Plasma abgenommen. Die Leber wurde auf makroskopische Anzeichen massiver Schädigung wie Hämorrhagie untersucht und außerdem wurden von diesen Organen Gewebeproben entnommen, die später auf die Aktivierung von Caspase-3 untersucht wurden.

Eine massive zelluläre Schädigung der Leber ist mit der Freisetzung von Enzymen in den Blutkreislauf verbunden, deren Aktivität in einem gesunden Organismus typischerweise nur in der Leber nachgewiesen werden kann. Das isolierte Blutplasma wurde daher auf die Aktivität der Enzyme Alanin- und Aspartataminotransferase gemäß dem Protokoll von Bergmeyer untersucht (Bergmeyer, 1984). Die Analyse der Enzymaktivität von Alaninaminotransferase im

Plasma zeigte, daß eine alleinige intravenöse Injektion von scFv40-Flag-FasL nicht zu einer Freisetzung dieses typischen Leberenzym in den Blutkreislauf führt. Die gemessene Aktivität war 45 min nach der Behandlung vergleichbar mit der von unbehandelten Tieren und 6 h später nur marginal erhöht (Abb. 12 A). Das zytotoxische bzw. hepatotoxische Potenzial von scFv40-Flag-FasL konnte jedoch durch Injektion des Flag-spezifischen Antikörpers aktiviert werden und führte dann rasch zu Leberschäden, die sich in einer deutlich erhöhten Aktivität von Alaninaminotransferase im Plasma äußerten (Abb. 12 A).

Bei der Analyse der Plasmaaktivität von Aspartataminotransferase stellte sich ein ähnliches Muster dar. Eine exklusive Behandlung der Tiere mit scFv40-Flag-FasL ohne sekundäre Aggregation des Proteins in vivo induzierte lediglich minimal erhöhte Aktivitätswerte nach 45 min und 6 h im Vergleich zu den vollkommen unbehandelten Tieren (Abb. 12 B). Wiederum war ein starker Anstieg der Enzymaktivität im Plasma nach kombinierter Injektion von scFv40-Flag-FasL und anti-Flag M2 zu verzeichnen. Erstaunlicherweise ließ sich ebenfalls eine deutlich erhöhte Aktivität von Aspartataminotransferase 45 min nach Applikation von konditioniertem Medium und anti-Flag M2 im Plasma nachweisen (Abb. 12 B). Die spätere Messung 6 h nach der Injektion dieser Kombination zeigte immer noch eine leicht erhöhte Aktivität dieses Enzyms im Vergleich zu der Gruppe unbehandelter Tiere. Allerdings ist hier anzumerken, daß diese Tiere nach der erfolgten Behandlung keine Anzeichen von Krankheit oder Unwohlsein aufwiesen und daß keine Tiere verstarben.

Aktive Caspase-3 wurde ausschließlich nach der Applikation von scFv40-Flag-FasL und Flag-spezifischem Antikörper detektiert (Abb. 12 C). In sämtlichen anderen Gruppen inklusive der Tiere, die nach Behandlung mit konditioniertem Medium und anti-Flag M2 eine unerwartete Aktivität von Aspartataminotransferase aufwiesen, war keine aktive Caspase-3 detektierbar. Bei der Obduktion der Tiere wurde ebenfalls nur in den Mäusen, die mit scFv40-Flag-FasL und M2-Antikörper behandelt wurden, eine deutliche Hämorrhagie der Leber festgestellt (Abb. 13). Bei der Untersuchung der Tiere aller anderen Gruppen konnte keine schädliche Veränderung der Leber beobachtet werden (Abb. 13).

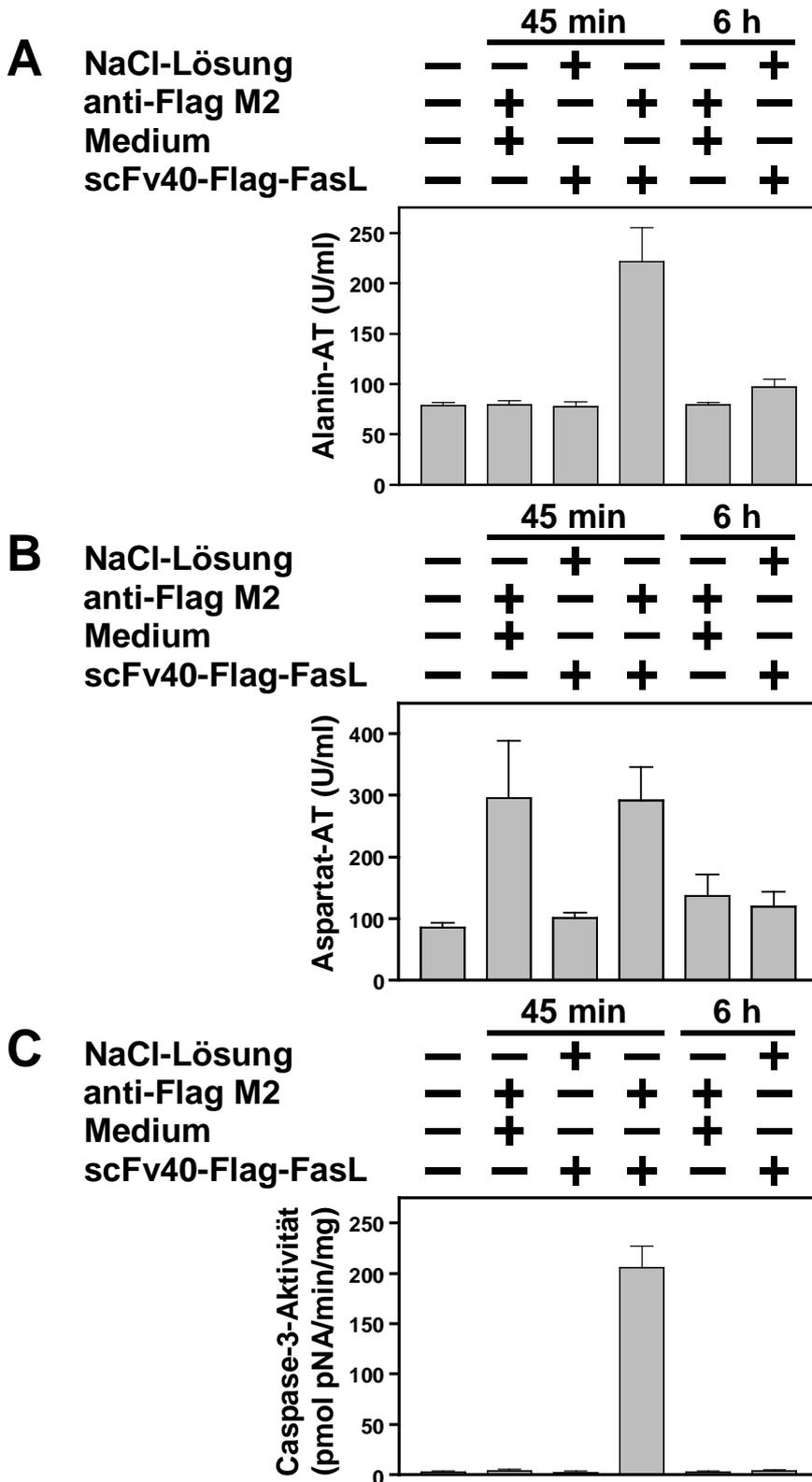


Abb. 12: Analyse der Enzymaktivität von Alanin- (A) und Aspartataminotransferase (B) sowie der Aktivierung von Caspase-3 (C) nach Applikation von scFv40-Flag-FasL. Gruppen bestehend aus jeweils 5 weiblichen C57BL/6 x CBA/J-Mäusen wurden mit den angegebenen Kombinationen aus scFv40-Flag-FasL (50 µg), anti-Flag M2 (10 µg), dem entsprechenden Volumen an konditioniertem Medium (125 µl) und 0,9 %-iger NaCl-Lösung (100 µl) behandelt oder verblieben vollkommen unbehandelt. Die Reagenzien wurden via zwei innerhalb von 30 min aufeinander folgende Injektionen intravenös appliziert. Wie angegeben wurden die Tiere 45 min bzw. 6 h nach der letzten Injektion getötet. Im isolierten Blutplasma wurde die enzymatische Aktivität von Alanin- (A) bzw.

Aspartataminotransferase (B) bestimmt. Des Weiteren wurde in Gewebeproben der Leber die Aktivität von Caspase-3 mit einem kolorimetrischen Assay bestimmt (C) (siehe Abschnitt 5.3).

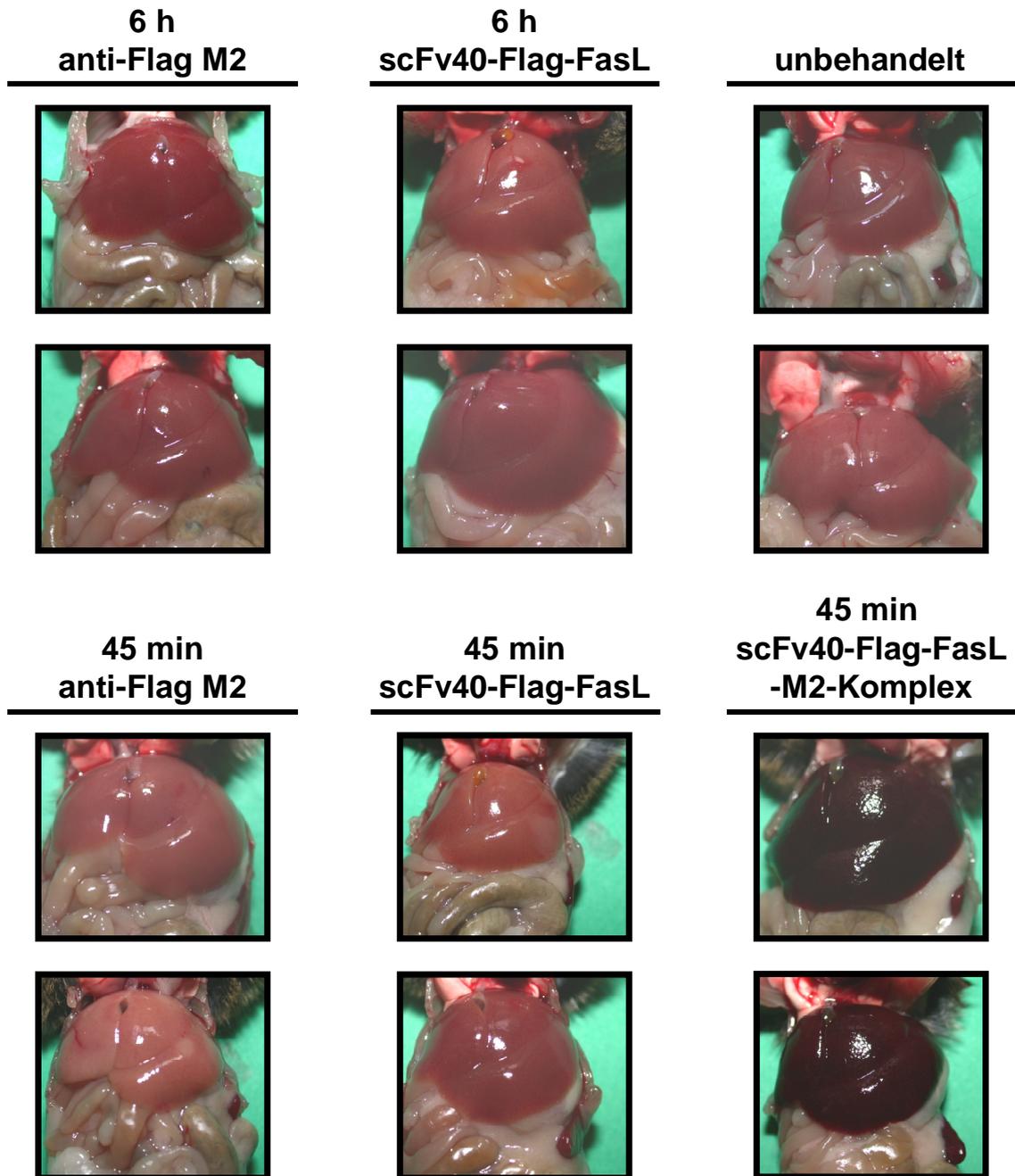


Abb. 13: Repräsentative Photographien der Leber unterschiedlich behandelter C57BL/6 x CBA/J-Mäuse. Die Stimulation der Tiere kann im Detail der Legende zu Abbildung 12 entnommen werden. Die Tiere wurden zu den angegebenen Zeitpunkten getötet und die Leber untersucht. Mäuse, die mit der Kombination aus scFv40-Flag-FasL und anti-Flag M2 behandelt wurden, konnten nicht 6 h nach Applikation der Reagenzien untersucht werden, da diese Behandlung innerhalb von 90 min zum Tod der Tiere führte (siehe Abb. 11).

Die potenzielle antitumorale Aktivität von scFv40-Flag-FasL wurde im weiteren Verlauf durch die Behandlung von xenotransplantierten FAP-positiven Tumoren studiert. Für diese Tierexperimente wurden *nu/nu* NMRI-Mäuse ausgewählt, da in diesem Stamm eine Abstossung xenogener Transplantate durch eine T-Zell-vermittelte Immunabwehr ausgeschlossen ist. Diese Inzuchtlinie unterscheidet sich bereits durch das geringere Gewicht der einzelnen Tiere von den vorherigen, so daß auch in diesen Mäusen zunächst die Verträglichkeit von scFv40-Flag-FasL in vivo untersucht wurde. Das Fusionsprotein scFv40-Flag-FasL wurde hierzu in unterschiedlichen Mengen (50, 5 und 1 µg) intravenös injiziert und durch eine zweite Injektion des Flag-spezifischen Antikörpers in vivo quervernetzt. Einer weiteren Gruppe von Tieren wurde die höchste Einzeldosis an scFv40-Flag-FasL appliziert und einer letzten Gruppe wurde konditioniertes Medium und anschließend Flag-spezifischer Antikörper injiziert. Die Injektion von 50 wie auch von 5 µg scFv40-Flag-FasL wirkte bei nachfolgender Aggregation auf die Tiere absolut tödlich (Tabelle 2). Keine Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes der Tiere war dagegen bei der Injektion von 1 µg scFv40-Flag-FasL und Flag-spezifischem Antikörper festzustellen. Auch die alleinige Applikation von scFv40-Flag-FasL in einer Dosis von 50 µg wurde von allen *nu/nu* NMRI-Mäusen gut vertragen. Bei keinem Tier waren Anzeichen von Krankheit oder Beschwerden erkennbar. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse wie auch die der vorangehenden Studie zur systemischen Toxizität von scFv40-Flag-FasL in CD1-Mäusen ist in Tabelle 2 gegeben.

Diese Daten zeigen, daß scFv40-Flag-FasL per se nicht aktiv ist und eine einzelne intravenöse Applikation vom murinen Organismus gut vertragen wird. Nach Quervernetzung des Fusionsproteins wird die latente proapoptotische und damit toxische Wirkung auf den Gesamtorganismus, welche die Anwendung konventioneller Fas-Agonisten begrenzt, offenbar.

Tabelle 2: Untersuchung der systemischen Toxizität von scFv40-Flag-FasL in vivo. Die alleinige intravenöse Applikation von scFv40-Flag-FasL in CD1- respektive *nu/nu* NMRI-Mäuse wirkt nicht letal. Die Tiere der verwendeten Mausstämmen unterscheiden sich unter anderem in ihrem durchschnittlichen Körpergewicht (CD1: 30-40 g; *nu/nu* NMRI: 20-30 g).

Dosis	Behandlung mit folgenden i.v. Injektionen		Mauslinie	Gesamtzahl behandelter Tiere	Überlebende Tiere	Tote Tiere (in 90 min)
	1. Injektion	2. Injektion				
2 µg	scFv40-Flag-FasL	anti-Flag M2	CD1	6	6	0
4 µg	scFv40-Flag-FasL	anti-Flag M2	CD1	6	5	1
8 µg	scFv40-Flag-FasL	anti-Flag M2	CD1	6	0	6
90 µg	scFv40-Flag-FasL	NaCl-Lösung	CD1	6	6	0
-	Medium	anti-Flag M2	CD1	6	6	0
-	Medium	NaCl-Lösung	CD1	6	6	0
1 µg	scFv40-Flag-FasL	anti-Flag M2	<i>nu/nu</i> NMRI	2	2	0
5 µg	scFv40-Flag-FasL	anti-Flag M2	<i>nu/nu</i> NMRI	2	0	2
50 µg	scFv40-Flag-FasL	anti-Flag M2	<i>nu/nu</i> NMRI	2	0	2
50 µg	scFv40-Flag-FasL	NaCl-Lösung	<i>nu/nu</i> NMRI	2	2	0
-	Medium	anti-Flag M2	<i>nu/nu</i> NMRI	2	2	0

6.4 Studium der antitumoralen Wirkung von scFv40-Flag-FasL in vivo

Das antitumorale Potenzial von scFv40-Flag-FasL wurde durch Behandlung implantierter HT1080-FAP-Tumorzellen in *nu/nu* NMRI-Mäusen untersucht. Da es sich bei der FAP-positiven Zell-Linie um ein humanes Fibrosarkom handelt, konnte die Transplantation nicht in immunkompetente Mäuse vorgenommen werden. Ein vollwertiges murines Immunsystem erkennt humane Zellen als fremd und leitet die Abstossung dieses xenogenen Transplantats ein. Die sogenannten *nu/nu* NMRI-Mäuse tragen einen Defekt im Gen des Transkriptionsfaktors Wnt, wodurch die Entstehung des Thymus verhindert und darüber hinaus die Entwicklung der Haare und daher des Fells beeinträchtigt wird (Janeway et al., 2000). Im Zusammenhang mit der Xenotransplantation ist das Fehlen der Thymusdrüse von besonderer

Bedeutung, weil dieses primäre lymphatische Organ für Reifung und Entwicklung der CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten unerlässlich ist. Den Nacktmäusen fehlt daher eine T-Zell-vermittelte Immunität und sie sind deshalb nicht zur Abstossung xenogener Transplantate in der Lage.

6.4.1 Die Behandlung mit scFv40-Flag-FasL und CHX inhibiert das Wachstum von HT1080-FAP-Tumorzellen in vivo.

In einem ersten Experiment wurde die Wirkung von scFv40-Flag-FasL in Verbindung mit CHX auf die Entwicklung xenotransplantierte Tumorzellen in vivo untersucht. Die FAP-exprimierenden HT1080-Zellen wurden *nu/nu* NMRI-Mäusen subkutan in die rechte Flanke injiziert und an den darauffolgenden Tagen 1 bis 4 sowie 6 und 8 mit einer Kombination aus scFv40-Flag-FasL und CHX oder mit CHX allein behandelt (Abb. 14 A). Innerhalb von 21 Tagen entwickelten sich in allen Tieren der Kontrollgruppe deutlich sicht- und tastbare Tumore. Im Gegensatz dazu genügte das hier angewandte Therapieschema von 6 einzelnen scFv40-Flag-FasL-Injektionen, um das Wachstum xenotransplantierte HT1080-FAP-Zellen in beiden verbliebenen Tieren zu unterbinden (Abb. 14 B). Diese Mäuse wurden in den folgenden 2 Monaten weiterhin eingehend beobachtet und auch während dieses Zeitraums kam es nicht zur Entwicklung von subkutan wachsenden Tumoren. Eine frühzeitige Behandlung mit wiederholten lokalen Injektionen von scFv40-Flag-FasL und CHX verhindert demnach wirksam und dauerhaft die Entstehung von Tumoren aus xenotransplantierte HT1080-FAP-Zellen.

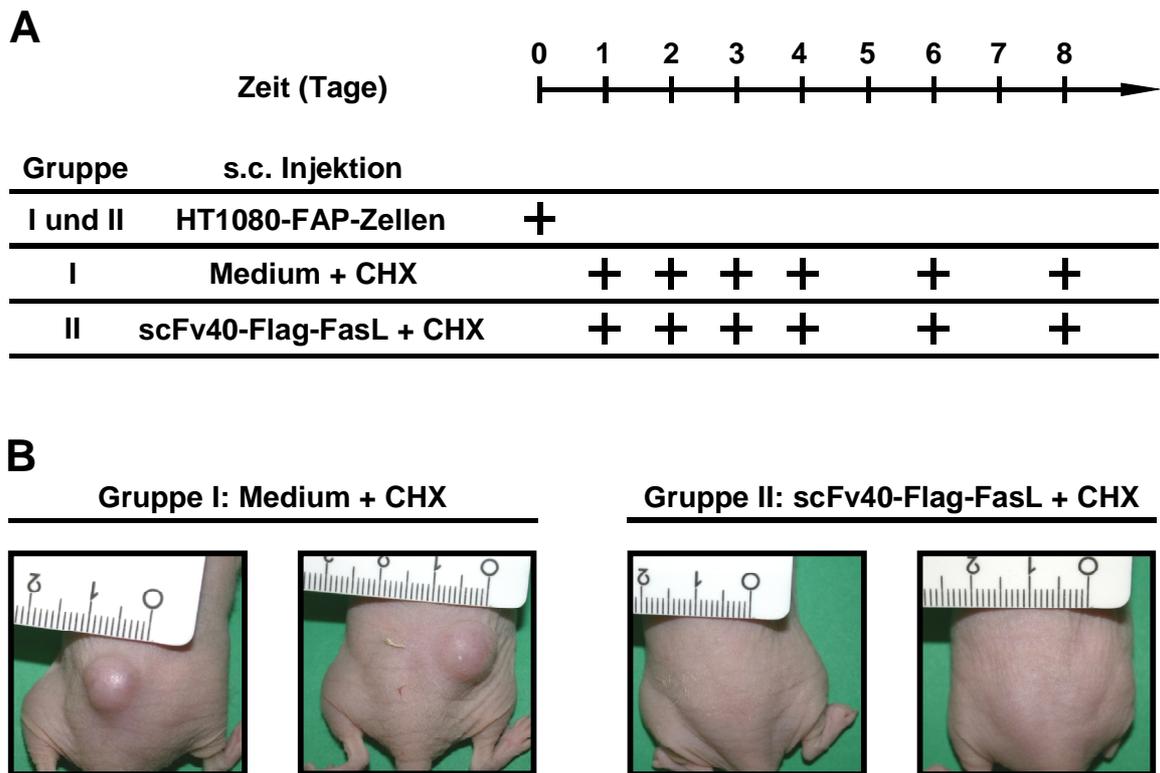


Abb. 14: Die Behandlung mit scFv40-Flag-FasL verhindert das Wachstum xenotransplanteder HT1080-FAP-Zellen in vivo. (A) An Tag 0 wurden $1,5 \times 10^6$ HT1080-FAP-Zellen je Tier subkutan in 8 *nu/nu* NMRI-Mäuse injiziert. Am folgenden Tag 1 wurde die Therapie einer Gruppe von 4 Mäusen mit einer Kombination aus 50 μg scFv40-Flag-FasL und 20 μg CHX durch lokale Administration nahe der Inokulationsstelle der Tumorzellen begonnen. Für diesen Zweck wurde ein scFv40-Flag-FasL-Konzentrat eingesetzt. Daher wurde eine zweite Gruppe von 4 Tieren am selben Tag mit einem äquivalenten Volumen an konditioniertem Medium und 20 μg CHX behandelt. Die Injektion der Reagenzien wurde in beiden Gruppen an den gekennzeichneten Tagen wiederholt, wobei während der Betäubung 1 Tier aus Gruppe I und 2 Tiere aus Gruppe II starben. Das Wachstum der Tumorzellen in den verbliebenen Tieren wurde in den folgenden 3 Wochen beobachtet und photographisch dokumentiert. (B) Dargestellt ist der Zustand von 2 Tieren jeder Gruppe am Ende des Beobachtungszeitraumes.

6.4.2 Die Kobehandlung mit Cycloheximid ist für die antitumorale

Wirkung von scFv40-Flag-FasL in vivo nicht zwingend erforderlich.

Mit den bereits vorgestellten Experimenten zur Charakterisierung der zytotoxischen Wirkung von scFv40-Flag-FasL konnte gezeigt werden, daß eine Vorinkubation der HT1080-FAP-Zellen mit CHX maßgeblich zu deren Sensitivierung gegenüber CD95/Fas-vermitteltem Zelltod in vitro beiträgt (Abschnitt 6.2). Dennoch kann scFv40-Flag-FasL in vitro auch ohne eine vorangehende Sensitivierung der Zellen mit CHX Apoptose induzieren (Abb. 9). Hierfür ist allerdings eine längere Stimulation der Zellen erforderlich. Darüber hinaus ist der Verzicht auf die Sensitivierung mit CHX verbunden mit einer moderaten Steigerung der EC_{50} von 1 ng/ml bei 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

CHX (Daten nicht gezeigt) auf 10,0 ng/ml in HT1080-FAP-Zellen ohne Behandlung mit CHX (Abb. 9).

Im Weiteren sollte geklärt werden, ob eine Sensitivierung der transplantierten HT1080-FAP-Zellen durch die zusätzliche Gabe von CHX den Behandlungserfolg in vivo merklich verbessert oder gar zwingend erforderlich ist. Außerdem wurde das Behandlungsschema in zusätzlichen Gruppen hinsichtlich Zahl und Zeitpunkt der Injektionen variiert. Die HT1080-FAP-Zellen wurden an Tag 0 subkutan in *nu/nu* NMRI-Mäuse injiziert. Die Mäuse der Gruppen I und II wurden an den Tagen 1 bis 4 sowie 6 und 8 täglich mit einer Injektion bestehend aus scFv40-Flag-FasL und CHX oder scFv40-Flag-FasL allein behandelt. Zur Kontrolle wurde den Tieren von Gruppe III an den selben Tagen konditioniertes Medium und CHX appliziert. Eine vierte und fünfte Gruppe von Tieren wurde an den Tagen 2, 4 und 6 bzw. 4, 6 und 8 mit scFv40-Flag-FasL und CHX behandelt. Den Tieren der Gruppen VI und VII wurde an den Tagen 6, 8 und 10 eine peritumorale Injektion mit scFv40-Flag-FasL und CHX bzw. mit konditioniertem Medium und CHX appliziert. Das Therapieschema ist in Abbildung 15 A im Überblick dargestellt. Die Entwicklung der Tumore wurde in den folgenden 3 Wochen nach Injektion der Zellen beobachtet, photographisch dokumentiert und das Größenwachstum gemessen.

Durch eine frühzeitig einsetzende Therapie konnte das Wachstum subkutan transplantierte Tumorzellen verhindert werden. Nach der Behandlung mit der Kombination aus scFv40-Flag-FasL und CHX an den angegebenen Tagen waren 4 von 6 Tieren aus Gruppe I nach dem Beobachtungszeitraum vollkommen tumorfrei (Abb. 15 B). Die Größe der Tumore der beiden nicht geheilten Mäuse entsprach allerdings der Tumorgöße der Tiere aus der Kontrollgruppe III. In dieser Gruppe trugen alle 6 Tiere Tumore mit einer Größe zwischen 100 und 150 mm². Die alleinige Therapie der Mäuse von Gruppe II mit scFv40-Flag-FasL war gleich wirksam bei der Inhibition des Wachstums der HT1080-FAP-Zellen, wie die kombinierte Behandlung der Tiere von Gruppe I mit scFv40-Flag-FasL und CHX zu den selben Zeitpunkten (Abb. 15 B). Tatsächlich waren in Gruppe II 4 von 6 Tieren nach demselben Zeitraum von 3 Wochen vollkommen tumorfrei und ein weiteres Tier trug einen Tumor mit einer Größe von nur 14 mm², d. h. dessen Wachstum wurde durch die Behandlung stark beeinträchtigt. Nur in einem Tier dieser Gruppe trat ein Tumor auf, dessen Entwicklung sich nicht durch die vorgenommene Behandlung beeinflusst zeigte (Abb. 15 B). Diese Ergebnisse unterstreichen die Funktionalität von scFv40-Flag-FasL in

vivo, die unter diesen Konditionen offenbar nicht wesentlich von einer Sensitivierung der Zellen mit CHX abhängig ist.

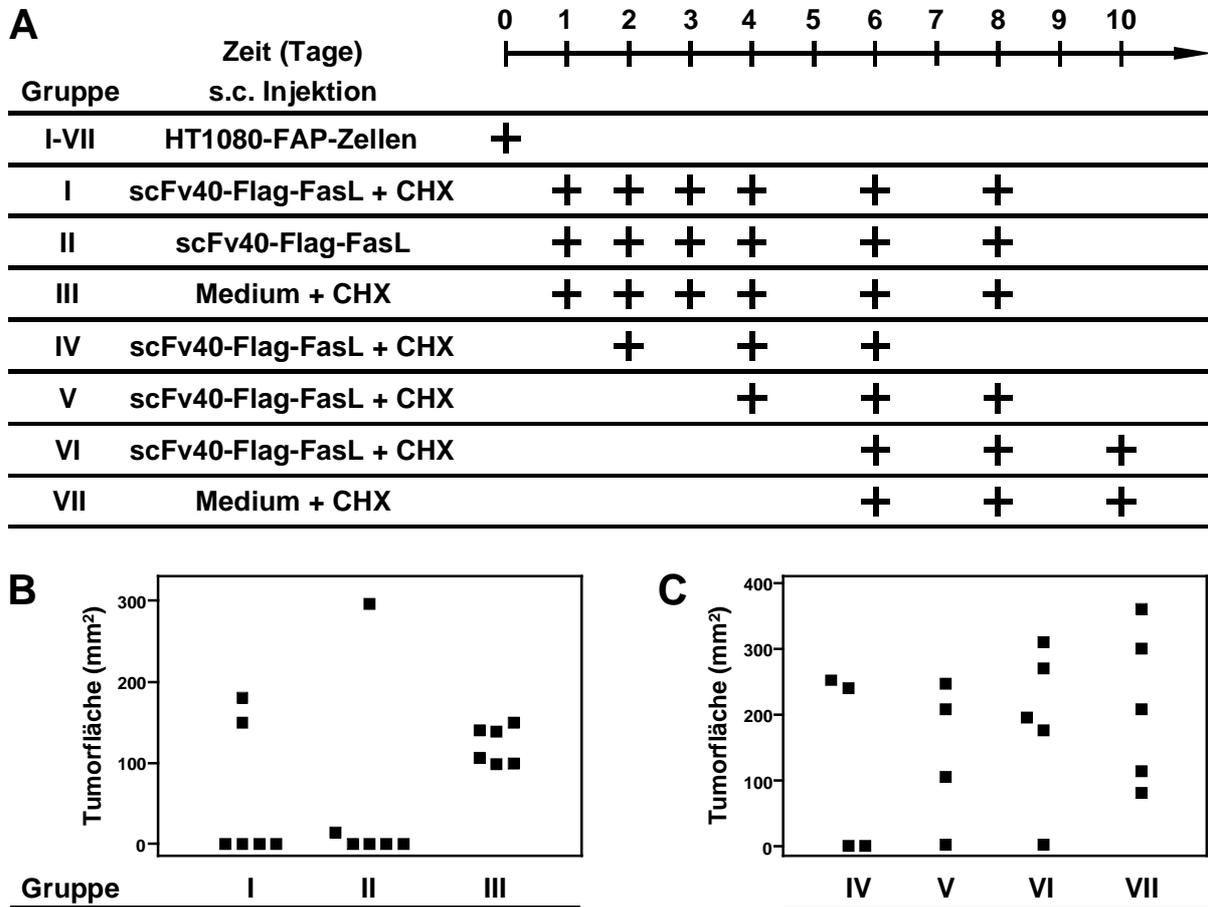


Abb. 15: Entwicklung von Tumoren aus xenotransplantierten HT1080-FAP-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Therapiestrategien. (A) Übersicht über die eingesetzten Behandlungsstrategien. An Tag 0 wurden den *nu/nu* NMRI-Mäusen aller Gruppen $1,5 \times 10^6$ HT1080-FAP-Zellen subkutan injiziert. Die Gruppen I bis III mit je 6 Tieren wurden mit 6 Injektionen an den angegebenen Tagen behandelt. Die Gruppen IV und V mit je 4 Tieren sowie VI und VII mit je 5 Tieren wurden mit 3 Injektionen an den gekennzeichneten Tagen therapiert. Jedes Tier wurde mit der angegebenen Kombination aus 50 μg scFv40-Flag-FasL (50-fach Konzentrat), 20 μg CHX bzw. konditioniertem Medium behandelt. Die Reagenzien wurden dazu in einem Gesamtvolumen von 150 μl subkutan nahe der Inokulationsstelle der Tumorzellen injiziert. **(B)** Dargestellt ist die Tumorfläche der einzelnen Tiere aus den Gruppen I bis III nach 3-wöchiger Beobachtungsphase. **(C)** Die Tumorfläche der Tiere aus den Gruppen IV bis VII wurde ebenfalls nach einer Beobachtungsphase von 3 Wochen ermittelt und aufgetragen. Die Behandlung der Gruppen IV bis VI unterscheidet sich im Zeitpunkt des Therapiebeginns.

Wie die Beobachtung der Tiere von Gruppe IV zeigte, war eine Behandlung, die erst an Tag 2 nach Transplantation der Tumorzellen begonnen wurde und insgesamt aus nur 3 einzelnen Injektionen bestand, immer noch ausreichend, um die Hälfte der Tiere vor der Entwicklung der Tumore zu schützen (Gruppe IV: 2/4; Abb. 15 C). Die anderen beiden Tiere dieser Gruppe trugen 3 Wochen nach Injektion der Zellen

Tumore mit einer Größe von circa 245 mm². Diese Größe war damit vergleichbar mit derjenigen der Tumore aus der Kontrollgruppe VII. In allen Tieren dieser Gruppe hatten sich Tumore mit einer Fläche von im Mittel 210 mm² entwickelt. Im Einzelnen unterschieden sich aber die Tumore der Tiere in Gruppe VII in ihrer Größe deutlich voneinander: Die Extremwerte betragen 80 bzw. 360 mm² (Abb. 15 C). In den verbleibenden Gruppen V und VI war jeweils noch ein Tier (Gruppe V: 1/4; Gruppe VI: 1/5) nach dem 3-wöchigen Beobachtungszeitraum vertreten, dessen Tumorgöße sich nahe der Detektionsgrenze von 2 mm² bewegte. Die Tumore der anderen Tiere aus Gruppe V (3/4) besaßen eine mittlere Fläche von 185 mm² und die der Tiere aus Gruppe VI (4/5) von 240 mm². Diese beiden Mittelwerte wurden nur aus den Werten der Tiere mit eindeutig palpierbaren Tumoren ermittelt. Aus dem Vergleich mit der mittleren Tumorfläche der Tiere aus der Kontrollgruppe (VII: 210 mm²) wird ersichtlich, daß die Therapie bei späterem Beginn und reduzierter Dosis an scFv40-Flag-FasL schnell an Wirkung verliert.

In den vollkommen tumorfreien Tieren aus Gruppe I und II entwickelten sich auch in den folgenden 2 Monaten nach Behandlungsende keine Tumore mehr. Der Tumor des Tieres aus Gruppe V, dessen Größe sich 2 Wochen nach Behandlungsende nahe der Detektionsgrenze bewegte, bildete sich in den folgenden Wochen vollkommen zurück, wohingegen sich derjenige des Tieres aus Gruppe VI umso stärker weiterentwickelte. In Abbildung 16 sind repräsentative Photographien von Tumoren dargestellt, die nach 3-wöchiger Beobachtung der Tiere gemacht wurden.

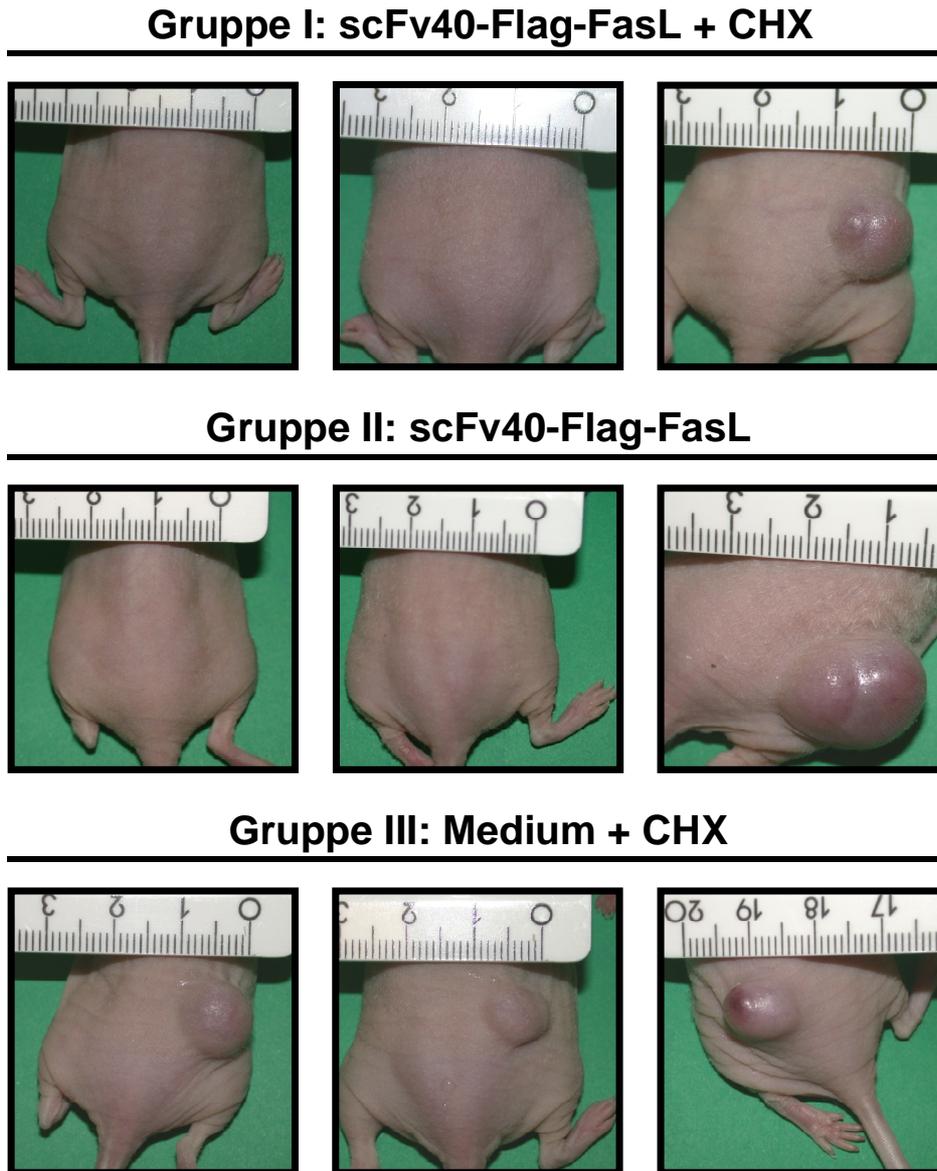


Abb. 16: Entwicklung von Tumoren aus subkutan transplantierten HT1080-FAP-Zellen nach erfolgter Behandlung in *nu/nu* NMRI-Mäusen. Aus den Gruppen I bis III sind die Photographien von jeweils 3 repräsentativen Tieren gezeigt. Zeitpunkt und Zahl der verabreichten Injektionen stimmen bei diesen Gruppen überein. In Abbildung 15 ist die Behandlungsstrategie dieser Tiere im Detail aufgeschlüsselt. Photographien von Tieren aus den Gruppen IV bis VII sind nicht dargestellt.

6.4.3 Die Therapie mit scFv40-Flag-FasL inhibiert in vivo exklusiv das Wachstum FAP-positiver Tumorzellen.

Mit den Experimenten aus Abschnitt 6.2 konnte gezeigt werden, daß das Fusionsprotein scFv40-Flag-FasL seine zytotoxische Wirkung in vitro selektiv auf FAP-positive Zellen ausübt. Die bisher vorgestellten tierexperimentellen Daten demonstrieren, daß das Wachstum subkutan injizierter, FAP-positiver HT1080-Zellen

durch wiederholte, lokale Administration von scFv40-Flag-FasL inhibiert werden kann. Die Modellvorstellung über das mechanistische Prinzip impliziert aber, daß das Fusionsprotein auch in vivo seine Wirkung erst nach Bindung an den Oberflächenmarker entfalten kann. Mit dem folgenden Tierexperiment sollte geprüft werden, ob in vivo die Interaktion von scFv40-Flag-FasL mit FAP ebenfalls für die beobachtete Wirkung erforderlich ist. Für diese Untersuchung wurden von der parental ebenso wie von der FAP-positiven Linie Zellen an Tag 0 subkutan in *nu/nu* NMRI-Mäuse injiziert. An den folgenden 4 Tagen wurde den Tieren gemäß der Einteilung in Gruppen täglich eine Injektion scFv40-Flag-FasL bzw. ein äquivalentes Volumen an konditioniertem Medium peritumoral appliziert (Abb. 17 A).

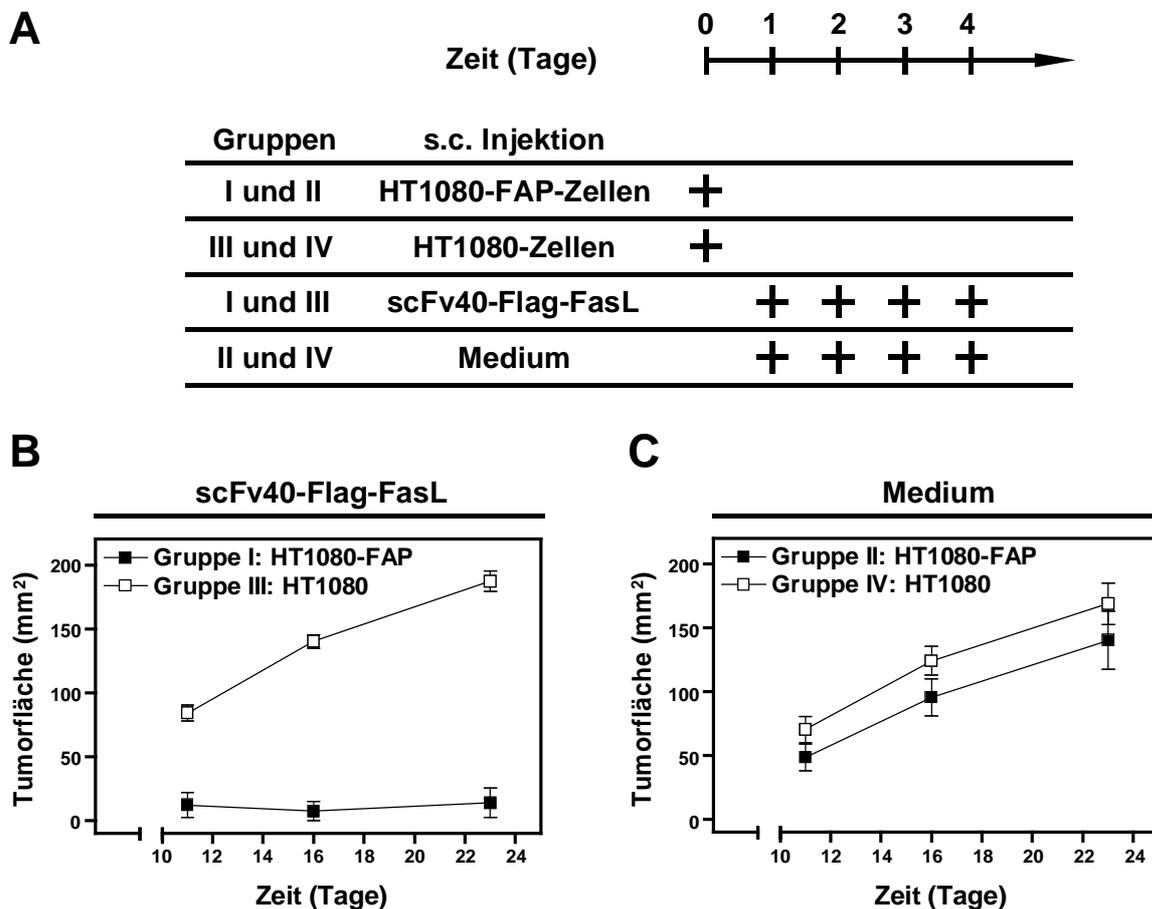


Abb. 17: In vivo kann die antitumorale Wirkung von scFv40-Flag-FasL exklusiv auf FAP-positiven HT1080-Zellen beobachtet werden. (A) Therapieschema. An Tag 0 wurden $1,5 \times 10^6$ HT1080-FAP-Zellen bzw. HT1080-Zellen subkutan in je 15 *nu/nu* NMRI-Mäuse injiziert. An den angegebenen Tagen wurde die Behandlung von Gruppe I und III mit je 9 Tieren durch lokale Injektion von 50 µg scFv40-Flag-FasL (50-fach Konzentrat) vorgenommen. Den jeweils 8 Tieren der Gruppen II und IV wurde an den gekennzeichneten Tagen ein äquivalentes Volumen an konditioniertem Medium subkutan appliziert. **(B, C)** In den folgenden 4 Wochen nach Abschluß der Behandlung wurden die Tiere regelmäßig untersucht und die Entwicklung der Tumore beobachtet (Photographien nicht gezeigt). An den Tagen 11, 16 und 23 wurde zusätzlich eine Messung der Tumorgroße vorgenommen. Ein Tier aus Gruppe IV verstarb während der Betäubung an Tag 16. Die Darstellungen zeigen für jede Gruppe einen Mittelwert, der aus den entsprechenden Einzelwerten aller Tiere dieser Gruppe berechnet wurde.

Wie aus Abbildung 17 B ersichtlich wird, konnte durch lokale Applikation von scFv40-Flag-FasL exklusiv das Wachstum FAP-positiver HT1080-Zellen inhibiert werden. Aus Gruppe I waren nach 4-wöchiger Beobachtung 75 % aller Tiere (7/9) vollkommen tumorfrei. Von den verbleibenden Tieren dieser Gruppe trug nur eines einen Tumor, der mit einer Größe von 104 mm² nicht durch die Behandlung im Wachstum beeinträchtigt wurde, wohingegen der andere Tumor eine Größe von lediglich 22 mm² besaß. Auf das Wachstum der parentalen HT1080-Zellen übte dagegen die Administration der scFv40-Flag-FasL-Präparation (Gruppe III) keine erkennbare Wirkung aus (Abb. 17 B). In sämtlichen Tieren dieser Gruppe hatten sich deutlich tast- und sichtbare Tumore mit einer durchschnittlichen Größe von 185 mm² entwickelt. Eine Behandlung der parentalen wie auch der FAP-positiven Zellen mit konditioniertem Medium wirkte sich erwartungsgemäß nicht auf die Entwicklung der subkutaner Tumore aus. Die mittlere Größe der Tumore aus HT1080-FAP-Zellen in Gruppe II betrug 140 mm² und die Tumore, die sich in Gruppe IV aus HT1080-Zellen entwickelten, besaßen eine durchschnittliche Größe von 155 mm² (Abb. 17 C). Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß auch in vivo die antitumorale Wirkung von scFv40-Flag-FasL spezifisch gegen FAP-positive Tumorzellen gerichtet ist. In den vollständig tumorfreien Tieren aus Gruppe I kam es auch in den folgenden 2 Monaten nicht zu einer erkennbaren Entwicklung subkutaner Tumore.

6.4.4 Etablierte Tumore lassen sich durch lokale Administration von scFv40-Flag-FasL behandeln.

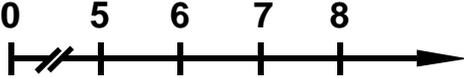
Mit den bisher durchgeführten Experimenten konnte in vivo gezeigt werden, daß das Wachstum FAP-positiver Tumorzellen durch lokale, subkutane Injektion von scFv40-Flag-FasL nahe der Implantationsstelle der Zellen inhibiert werden kann. In diesen Studien wurde stets eine frühzeitig einsetzende Behandlung mit dem proapoptotischen Fusionsprotein vorgenommen. Es gibt Anhaltspunkte dafür, daß die stabil FAP-transfizierten HT1080-Zellen in vivo das Antigen FAP schnell verlieren (J. Park und P. Garin-Chesa, persönliche Kommunikation). Der praktische Nutzen des hier am Beispiel von scFv40-Flag-FasL vorgestellten Therapieansatzes muß sich aber an der Fähigkeit messen lassen, daß sich durch eine systemische Administration solcher Fusionsproteine etablierte Tumore oder Metastasen erfolgreich behandeln lassen. In einer weiteren Näherung an diese Aufgabenstellung

wurde daher im folgenden Experiment untersucht, ob sich bereits palpierbare subkutane Tumore durch lokale Administration des FasL-Fusionsproteins behandeln lassen.

Für diesen experimentellen Ansatz wurden HT1080-FAP-Zellen subkutan in *nu/nu* NMRI-Mäuse implantiert und an den darauffolgenden 4 Tagen wurde nicht in Wachstum und Entwicklung der Zellen eingegriffen. Erst an Tag 5 wurde nach Einteilung der Tiere in Gruppen mit der Behandlung begonnen. In Abbildung 18 A ist die Zuordnung der Tiere in die einzelnen Gruppen dargestellt und die Therapie mit scFv40-Flag-FasL oder der Kombination von scFv40-Flag-FasL und CHX dokumentiert. Die zusätzliche Behandlung mit CHX sollte klären, ob eine Sensitivierung der Tumorzellen, die in diesem Modell 5 Tage zu einem palpierbaren Tumor heranwachsen konnten, entscheidende Vorteile für den Erfolg der Therapie bietet.

Wie Abbildung 18 B zu entnehmen ist, führte die Applikation von scFv40-Flag-FasL in 4 von 6 Tieren aus Gruppe II zur kompletten Regression der Tumore. Die Tumore der beiden Tiere, die durch die gegebene Behandlung nicht geheilt werden konnten, besaßen eine Größe von 126 mm² bzw. 168 mm². Interessanterweise handelte es sich bei diesen beiden Tieren um diejenigen, die zu Beginn der Behandlung mit 25 mm² bzw. 32 mm² die größten Tumore in Gruppe II trugen. Aus dem Verlauf des Tumorstadiums wird deutlich, daß die Tumormasse zunächst auf die gegebene Behandlung mit scFv40-Flag-FasL reagierte, aber daß das Tumorstadium nach deren Abschluß ungehindert fortschritt (Abb. 18 B). Vergleicht man die Wirkung von scFv40-Flag-FasL mit und ohne CHX-Kombibehandlung, wird ersichtlich, daß die zusätzliche Sensitivierung auch in dieser experimentellen Situation keine meßbaren Vorteile bot: In Gruppe IV konnten lediglich 3 von 6 Tieren vor der Entstehung subkutaner Tumore geschützt werden (Abb. 18 B und 19). Im Mittel beträgt die Tumorstadium bei den 3 tumortragenden Tieren dieser Gruppe 185 mm² und wiederum ist anzumerken, daß es sich dabei um die Tiere handelte, die zu Beginn der Therapie die größten Tumore mit 21, 26 und 33 mm² trugen. Weiterhin ist festzustellen, daß alle dauerhaft geheilten Tiere der Gruppen II und IV Tumore trugen, die eine Größe von nicht mehr als 20 mm² aufwiesen. Tatsächlich kam es in diesen Tieren in den folgenden 2 Monaten, die diese Tiere nach Absetzen der tumortragenden Tiere weiter beobachtet wurden, nicht mehr zur Entwicklung von Tumoren. In Abbildung 20 sind repräsentative Photographien von Tieren aus diesem Experiment dargestellt.

A

Zeit (Tage) 

Gruppe	s.c. Injektion				
I-IV	HT1080-FAP-Zellen	+			
I	Kontrolle	+	+	+	+
II	scFv40-Flag-FasL	+	+	+	+
III	CHX	+	+	+	+
IV	scFv40-Flag-FasL + CHX	+	+	+	+

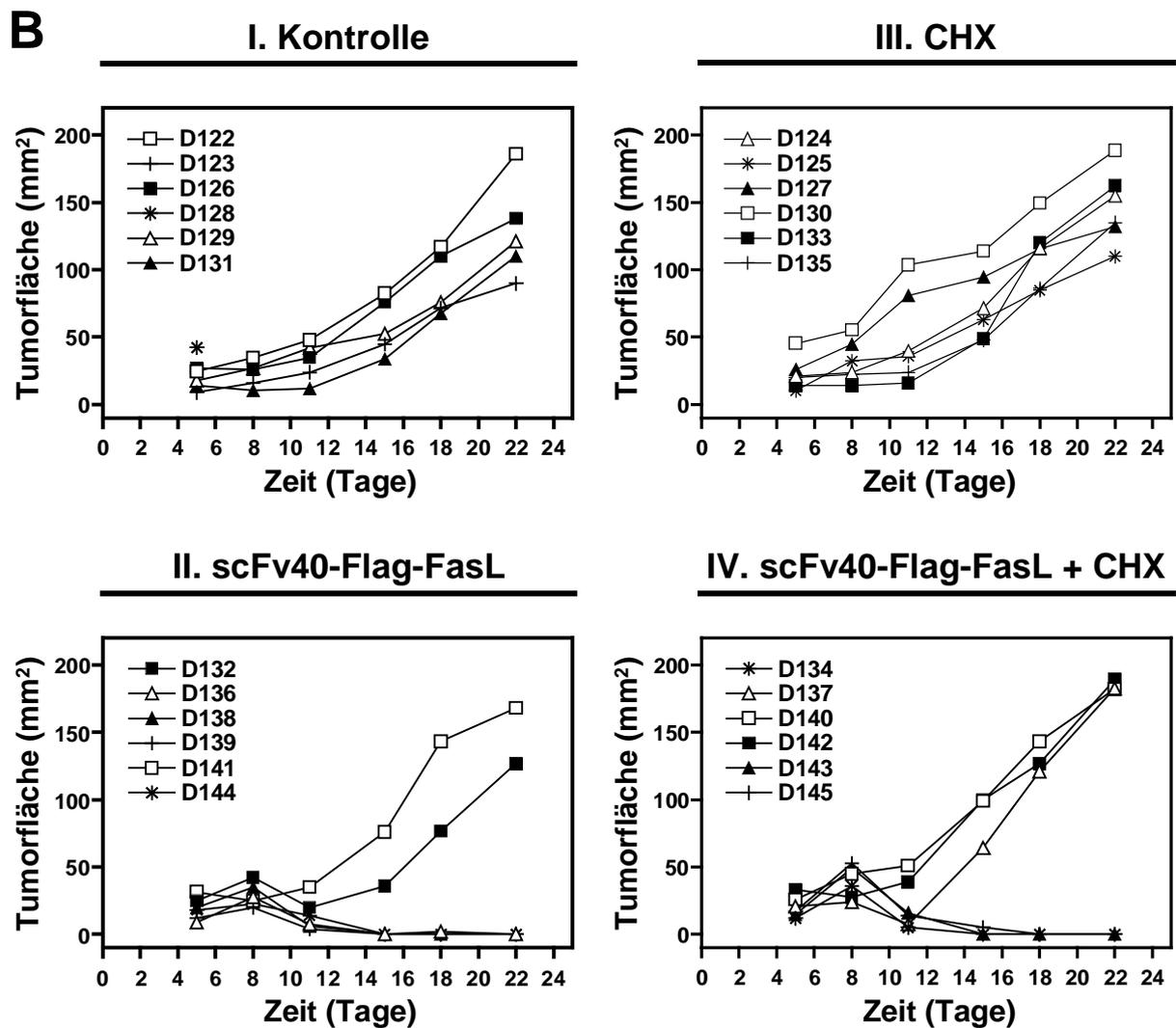


Abb. 18: Nach wiederholter peritumoraler Applikation von scFv40-Flag-FasL bilden sich etablierte, subkutane Tumore zurück. (A) Therapieschema. An Tag 0 wurden $1,5 \times 10^6$ HT1080-FAP-Zellen je Tier subkutan in 24 *nu/nu* NMRI-Mäuse injiziert. Die folgenden 4 Tage verblieben die Tiere unbehandelt und an Tag 5 wurde die Größe der Tumore gemessen. Die Mäuse wurden so in 4 Gruppen eingeteilt, daß in jeder Gruppe Tumore aller Größen gleichmäßig vertreten waren. An Tag 5 wurde die Behandlung durch lokale Injektion von 50 µg scFv40-Flag-FasL (Gruppe II), 20 µg CHX (Gruppe III) oder der entsprechenden Kombination davon (Gruppe IV) vorgenommen. Da bei diesem Experiment mittels Affinitätschromatographie aufgereinigtes Protein eingesetzt wurde, wurde den

Tieren aus Gruppe I ein äquivalentes Volumen an sterilem TBS (100 µl) subkutan appliziert. Die Behandlung wurde an den gekennzeichneten Tagen wiederholt. **(B)** In den folgenden 4 Wochen wurden die Tiere regelmäßig untersucht und an den Tagen 5, 8, 11, 15, 18 und 22 wurden die Durchmesser der Tumore bestimmt und die Fläche ermittelt. In den Graphen ist das Tumorwachstum der einzelnen Tiere jeder Gruppe gegen die Zeit aufgetragen. Aufgrund der für die Behandlung notwendigen Betäubung verstarb ein Tier (D128) aus Gruppe I an Tag 5. Das Tumorwachstum wurde zusätzlich photographisch dokumentiert. Weiterhin wurde zu denselben Zeitpunkten das Gewicht der einzelnen Tiere ermittelt.

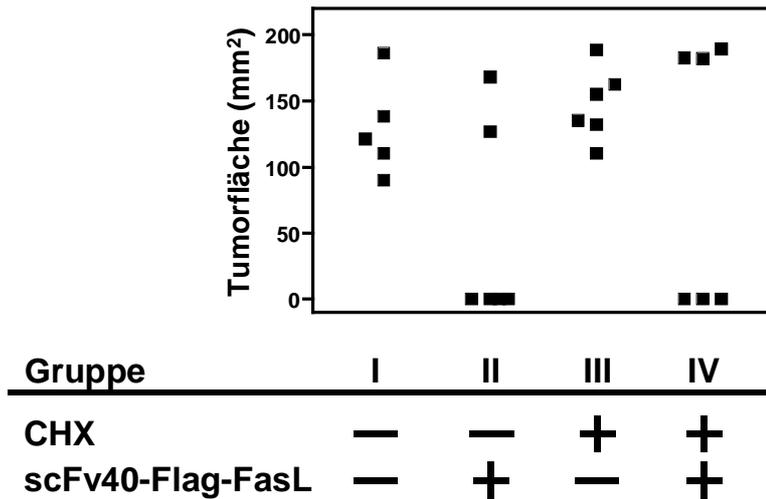
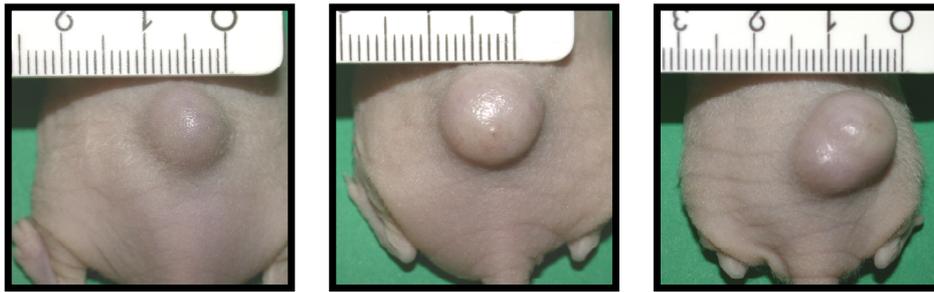


Abb. 19: Die Therapierbarkeit etablierter subkutaner Tumor mit scFv40-Flag-FasL wird durch Kobehandlung mit CHX nicht verbessert. Vergleichende Darstellung der Tumorgröße aller Tiere aus den Gruppen I bis IV an Tag 22. Die Behandlungsstrategie ist in Abbildung 18 und der zugehörigen Legende detailliert dargestellt.

Außerdem wurde während dieses Experimentes das Gewicht der einzelnen Tiere jeder Gruppe bestimmt, um Aussagen darüber machen zu können, ob die jeweilige Behandlung zu einer Beeinträchtigung des Stoffwechsels führt. Es konnten jedoch keine regelmäßigen Änderungen zwischen der jeweiligen Behandlung und dem Körpergewicht der Tiere erkannt werden (Daten nicht gezeigt). Offenbar beeinflusste die subkutane Injektion von scFv40-Flag-FasL oder CHX bzw. der entsprechenden Kombination davon den Metabolismus nicht derart, daß sich die Auswirkungen anhand dramatischer Änderungen des Körpergewichts bemerkbar hätten machen können.

Gruppe I: Kontrolle



Gruppe II: scFv40-Flag-FasL



Gruppe III: CHX



Gruppe IV: scFv40-Flag-FasL + CHX



Abb. 20: Entwicklung subkutaner Tumore aus xenotransplantierten HT1080-FAP-Zellen in *nu/nu* NMRI-Mäusen. Dargestellt sind repräsentative Photographien von je 3 Tieren jeder Gruppe, die an Tag 22 aufgenommen wurden. Das genaue Behandlungsschema ist Abbildung 18 zu entnehmen. Eine detaillierte Auswertung der Entwicklung dieser Tumore findet sich in den Abbildungen 18 sowie 19 und ist im Text näher erläutert.

7 Diskussion

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war zunächst die Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften des Antikörperkonstruktes scFv40-Flag-FasL in vitro. Darauf aufbauend wurde die Anwendungsmöglichkeit dieses rekombinanten Proteins für die Therapie xenotransplantierte Tumorzellen in vivo untersucht.

7.1 Produktion und Aufreinigung von scFv40-Flag-FasL

Die Herstellung des Antikörperderivates scFv40-Flag-FasL wurde im Labormaßstab mit adhärent wachsenden HEK293-Zellen durchgeführt. In der Praxis hat es sich als günstig erwiesen, diese Zellen sequentiell an die Kultivierung in RPMI mit niedriger FCS-Konzentration zu adaptieren. Um eine möglichst hohe Konzentration an rekombinantem Protein zu erzielen, wurden die Zellen mit einer Dichte von 12 bis 15 x 10⁶ Zellen in 50 ml Medium ausgesät und mindestens 9 Tage im Brutschrank inkubiert. Nach 5-6 Tagen wurde die Hälfte des Kulturmediums geerntet und durch frisches ersetzt. Mit dieser Prozedur konnten Kulturüberstände mit 10 µg/ml scFv40-Flag-FasL gewonnen werden (Abb. 1). Das rekombinante Fusionsprotein Fc:EDA1 wurde von O. Gaide und P. Schneider zur Behandlung des anhydriotischen Ektodermaldysplasie-Syndroms im Tiermodell entworfen und mit Hilfe von CHO-Zellen produziert (Gaide et al., 2003). Der stabil produzierende CHO-Einzelklon wurde mit einer Dichte von 100 x 10⁶ Zellen pro Liter in Rollerflaschen ausgesät und für 14 Tage kultiviert. Mit dieser Vorgehensweise konnten Ausbeuten von 6 mg Fc:EDA1-Protein pro Liter erzielt werden (Gaide et al., 2003). Ein weiteres Fusionsprotein namens scFvC54:sTRAIL, auf dessen Funktion später näher eingegangen wird, besteht aus dem humanen scFv-Antikörperfragment C54, das mit dem N-Terminus von humanem löslichem TRAIL genetisch fusioniert wurde (Bremer et al., 2004). Für die Herstellung wurden CHO-Zellen stabil mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transfiziert. Die Produktion wurde ebenfalls in Rollerflaschen vorgenommen und bei einer maximalen Zelldichte von 5,0 x 10⁶ Zellen/ml konnten Kulturüberstände mit 3,4 µg/ml scFvC54:sTRAIL gewonnen werden (Bremer et al., 2004). An diesen beiden Beispielen wird deutlich, daß mit der hier angewendeten Produktionsmethode vergleichbare Mengen an Protein hergestellt werden konnten.

Allerdings war diese Vorgehensweise mit erheblichem Arbeitsaufwand verbunden. Die Weiterentwicklung und Vereinfachung der Produktion dieses Antikörperkonstruktes wie auch den davon abgeleiteten Varianten ist von großer Bedeutung, da durch die begrenzte Verfügbarkeit die Möglichkeiten der experimentellen Untersuchung *in vitro* und *in vivo* erheblich eingeschränkt werden. Die Konzentrationsbestimmung von scFv40-Flag-FasL wurde durch Analyse der Kulturüberstände im Western Blot vorgenommen (Abb. 1 A). Das theoretische Molekulargewicht eines scFv40-Flag-FasL-Monomers beträgt 46,29 kDa und ein spezifisches Signal für scFv40-Flag-FasL konnte dementsprechend bei der 47,5 kDa großen Bande des Molekulargewichtsstandards detektiert werden. Außerdem wurde bei diesen Analysen ein Degradationsprodukt von scFv40-Flag-FasL nachgewiesen (Abb. 1 A und 3 C). Im Western Blot konnten die zugehörigen Signale als feine Doppelbande bei etwa 30 kDa spezifisch mit dem Primärantikörper anti-Flag M2 detektiert werden. Ein deutliches Signal dieser Größe war ebenfalls nach Färbung des aufgereinigten Proteins mit „Coomassie Brilliant Blue“ festzustellen (Abb. 3 B). In der molekularen Architektur des Antikörperderivates sind höchstwahrscheinlich die Peptidlinker zwischen den einzelnen globulären Domänen am anfälligsten gegenüber einer proteolytischen Spaltung oder einfachem hydrolytischem Zerfall. Da das Flag-Epitop offenbar noch intakt ist, ist eine Spaltung unmittelbar auf- oder abwärts dieses Epitops anzunehmen. Würde die extrazelluläre Domäne von FasL abgetrennt, verbliebe der „single chain“-Anteil mit Flag-Epitop am Carboxyterminus. Dieses Spaltprodukt besäße eine Größe von circa 25 kDa und die verbleibende FasL-Domäne ohne Flag-Epitop wäre im Western Blot mit dem Flag-spezifischen Antikörper nicht nachweisbar. Denkbar ist auch eine Spaltung im Peptidlinker zwischen beiden variablen Domänen des „single chain“-Anteils. Nach Verlust der V_H40-Domäne belief sich die Größe des verbleibenden Fragments aus V_Lphox und extrazellulärer FasL-Domäne auf circa 32 kDa. Weitere Analysen hierzu im Western Blot mit FasL-spezifischen Antikörpern brachten keine eindeutigen neuen Erkenntnisse (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis von Proteinen mit „Coomassie“- oder Silberfärbung ergab ebenfalls keinen Aufschluß über die exakte Identität dieses Spaltproduktes. Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß bei der Aufreinigung via Affinitätschromatographie das Fragment ohne Flag-Epitop verloren geht.

7.2 Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften von scFv40-Flag-FasL in vitro

Die konventionelle Behandlung von Tumoren mit Bestrahlung und Chemotherapie induziert in proliferierenden Zellen Schäden auf Ebene der DNA-Replikation und der Zellteilung. Als sekundäre Antwort auf diese Schäden wird der apoptotische Selbstmord der betroffenen Zellen über die Aktivierung des intrinsischen, mitochondriellen Signalweges unter essentieller Beteiligung des Tumorsuppressors p53 induziert (Ashkenazi, 2002). Mutationen in *TP53*, dem p53-codierenden Gen, sind in einigen Tumorarten verbreitet und führen zur Resistenz gegenüber Apoptose, was ein charakteristisches Merkmal der meisten wenn nicht gar aller Typen von Krebs ist (Hanahan und Weinberg, 2000). In der jüngeren Vergangenheit wurden zahlreiche Ansätze für die Krebstherapie entwickelt, die unter Ausnutzung biologischer Mechanismen diese Entwicklung von Resistenz umgehen können. Von besonderem Interesse sind dafür die Todesrezeptoren der TNF-Superfamilie, da diese Moleküle bei ihrer Aktivierung Apoptose via den extrinsischen Signalweg induzieren können (Hersey und Zhang, 2001). Problematisch bei der Anwendung der natürlichen Liganden zur Stimulation der Todesrezeptoren ist allerdings, daß sie schwere Nebenwirkungen auslösen können. Aufgrund seiner antitumoralen Wirkung in murinen Tumormodellen und der starken zytotoxischen Aktivität auf manche Tumorzellen wurde TNF anfänglich als vielversprechender Kandidat für die Tumorthherapie angesehen. Die Anwendung von TNF in therapeutisch wirksamer Dosierung im Menschen wird aber durch Nebenwirkungen, die von Grippe-ähnlichen Symptomen bis zur Entwicklung lebensbedrohlicher Schockzustände reichen können, in der Praxis außerordentlich erschwert (Wajant et al., 2003 a). Auch die Verwendung von rekombinantem löslichem FasL für die Tumorthherapie erschien ursprünglich in Frage gestellt. In einigen Veröffentlichungen wurde gezeigt, daß rekombinanter FasL oder Überstände FasL-überexprimierender Zellen äußerst bioaktiv sind (Rensing-Ehl et al., 1995). Wie eine Studie von Pascal Schneider und Mitarbeitern später zeigte, handelte es sich bei dieser rekombinanten Form von FasL nicht um den prozessierten Liganden, sondern um die membranständige Variante (Schneider et al., 1998). Die starke apoptotische Aktivität konnte darauf zurückgeführt werden, daß Neuro-2a-Zellen wenig bis keine prozessierenden Proteasen exprimieren und offenbar Membranfragmente oder Vesikel mit

membranständigem FasL in das Kulturmedium freisetzen. Die systemische Applikation solcher FasL-Präparationen ebenso wie die von agonistischen Antikörpern gegen CD95/Fas wird in vivo durch gefährliche Nebenwirkungen behindert (Timmer et al., 2002). So wirkt die intravenöse Applikation des agonistischen Antikörpers Jo2 in Mäusen aufgrund ausgeprägter Schädigung der Leber akut toxisch (Kakinuma et al., 1999). Die histopathologische Untersuchung anderer Organe zeigte darüber hinaus, daß Fas-vermittelte Apoptose auch in Milz, Thymus, Lymphknoten, Verdauungsorganen, Haut und zahlreichen weiteren Geweben nachzuweisen war (Kakinuma et al., 1999). Die proapoptotische Wirkung von „echtem“ löslichem FasL ist dagegen um den Faktor 1000 geringer als die der membranständigen Variante, weshalb selbst eine hochdosierte Injektion von rekombinantem löslichem FasL in Mäusen keine ernsthaften Leberschäden auslöst (Schneider et al., 1998).

Der therapeutische Wert von löslichem FasL kann nutzbar gemacht werden, wenn durch genetische Fusion der extrazellulären Domäne des Liganden mit einem Tumor- respektive Stroma-spezifischen Antikörperfragment eine selektive Bindung des Fusionsproteins und somit lokale Aktivierung der zytotoxischen Eigenschaften erreicht wird. Die hochaffine scFv40-Domäne des hier untersuchten scFv40-Flag-FasL bindet spezifisch an das Membranprotein FAP. Dies konnte mittels Analyse der Zell-Linien HT1080 und HeLa respektive der FAP-transfizierten Varianten im Durchflußzytometer demonstriert werden (Abb. 4). Mit diesen Zell-Linien wurde die proapoptotische Aktivität von scFv40-Flag-FasL in vitro näher untersucht. Das Fusionsprotein entfaltete seine zytotoxische Wirkung selektiv auf FAP-positiven HT1080-Zellen, obwohl gezeigt werden konnte, daß parentale HT1080- und HT1080-FAP-Zellen eine vergleichbare Sensitivität gegenüber FasL-vermittelter Apoptose aufweisen (Abb. 5 A und B). Die ermittelten EC_{50} -Werte für FasL-induzierten Zelltod sind mit 0,5 ng/ml für HT1080- und 0,6 ng/ml für HT1080-FAP-Zellen nahezu identisch. Das latente zytotoxische Potenzial von scFv40-Flag-FasL kann auch durch artifizielle Quervernetzung des Fusionsproteins aktiviert werden, wie die Behandlung der HT1080- und HT1080-FAP-Zellen mit dem scFv40-Flag-FasL-M2-Komplex demonstriert. Unter diesen Bedingungen ist die zytotoxische Wirkung des Fusionsproteins von der Bindung an FAP entkoppelt und es wirkt daher wie gewöhnlicher aggregierter FasL (Abb. 5 C). Die EC_{50} -Werte des scFv40-Flag-FasL-M2-Komplexes sind mit 1,25 ng/ml auf parentalen und 0,3 ng/ml auf FAP-positiven

HT1080-Zellen vergleichbar mit denen von aggregiertem FasL (Tabelle 1). Dieselben Befunde für die selektive zytotoxische Wirkung von scFv40-Flag-FasL konnten auch auf HeLa- und HeLa-FAP-Zellen festgestellt werden (Abb. 5). Weiterhin konnte demonstriert werden, daß die Zell-Linien HT1080 und HT1080-FAP ohne vorherige Behandlung mit CHX ebenfalls eine vergleichbare Sensitivität für FasL-induzierte Apoptose besitzen (Abb. 9). Die entsprechenden EC_{50} -Werte von 10,5 ng/ml für HT1080- und 10,0 ng/ml für HT1080-FAP-Zellen verdeutlichen dies. Auch unter diesen Bedingungen konnte eine selektive Zytotoxizität von scFv40-Flag-FasL beobachtet werden, die streng auf die FAP-positiven Zellen begrenzt blieb (Abb. 9). Mit Hilfe unterschiedlicher neutralisierender Reagenzien konnte im Zytotoxizitätsassay die Beteiligung der einzelnen Domänen des Fusionsproteins und deren postulierte Interaktionen mit Fas und FAP herausgearbeitet werden. Durch Präinkubation von scFv40-Flag-FasL mit löslichem Fas-Rezeptor ließ sich die Toxizität des Antikörperkonstruktes auf HT1080-FAP-Zellen um circa 40 % mindern (Abb. 6). Die Neutralisation von scFv40-Flag-FasL mit TRAIL-R2-Fc konnte erwartungsgemäß die zytotoxische Aktivität auf HT1080-FAP-Zellen nicht blockieren. Durch Anwendung von Fas-Comp wurde die Toxizität von scFv40-Flag-FasL beinahe vollständig inhibiert (Abb. 6). Wie Frau Dr. Müller Szeraws in ihrer Arbeit demonstrieren konnte, läßt sich durch Vorinkubation der HT1080-FAP-Zellen mit Minibody-40 die spezifische Bindung von scFv40-Flag-FasL an FAP verhindern und so wird dessen zytotoxische Wirkung inhibiert (Müller Szeraws, 2002).

Durch Vorinkubation mit zVAD-fmk konnten die HT1080-FAP-Zellen vor den zytotoxischen Auswirkungen des Fusionsproteins geschützt werden, was zeigt, daß scFv40-Flag-FasL und aggregierter FasL vergleichbare intrazelluläre Mechanismen induzieren müssen. Um dies zu demonstrieren, wurden als charakteristische Schlüsselereignisse, die sich nach Stimulation des Fas-Rezeptors einstellen, die Prozessierung von Procaspase-8 und die Aktivierung von Caspase-3 analysiert. Die Behandlung von HT1080- und HT1080-FAP-Zellen mit aggregiertem FasL induziert in beiden Zelltypen die Prozessierung von Procaspase-8 und führt zur Aktivierung von Caspase-3 (Abb. 7 und 8). Das Fusionsprotein scFv40-Flag-FasL konnte diese Ereignisse jedoch nur in FAP-transfizierten Zellen auslösen und zeigte in der parentalen Linie keine Wirkung (Abb. 7 und 8). Damit konnte bestätigt werden, daß mit scFv40-Flag-FasL eine zytotoxische Wirkung selektiv in FAP-positiven Zellen

induziert wird, die in ihrer Qualität und Ausprägung der von aggregiertem FasL vergleichbar ist.

Mit der Analyse der IL8-Produktion konnte weiterhin demonstriert werden, daß scFv40-Flag-FasL neben gleichwertigen apoptotischen Effekten auch die geninduktiven Eigenschaften des Rezeptors CD95/Fas ansprechen kann (Abb. 10). Nach Behandlung von HT1080- und HT1080-FAP-Zellen mit aggregiertem FasL konnte in beiden Linien die Produktion von IL8 nachgewiesen werden und durch Inhibition der Apoptose mit z-VAD-fmk konnte dieser Effekt enorm gesteigert werden (Abb. 10). Analog zur zytotoxischen Wirkung wurde die Produktion von IL8 nach der Stimulation mit scFv40-Flag-FasL selektiv in den FAP-transfizierten HT1080-Zellen beobachtet. Die Vorbehandlung der HT1080-FAP-Zellen mit z-VAD-fmk verdeutlichte, daß die Synthese von IL8 durch scFv40-Flag-FasL ebenso effektiv induziert werden kann wie durch aggregiertes FasL (Abb. 10). Zusammenfassend unterstreichen diese Ergebnisse, daß es mit der Konstruktion von scFv40-Flag-FasL gelungen ist, ein lösliches, per se inaktives FasL-Fusionsprotein herzustellen, das erst über die Antikörper-vermittelte Bindung an ein zelluläres Oberflächenantigen aktiviert wird. Durch die Interaktion zwischen dem scFv40-Fragment und dem Tumorstromamarker FAP wird eine effiziente Immobilisierung des Fusionsproteins auf der Zelloberfläche erreicht und die vollwertige „signaling“-Kapazität von membranständigem FasL hergestellt.

Die prinzipielle Funktionsfähigkeit dieses Konzeptes der Antikörper-vermittelten Immobilisierung von Liganden aus der TNF-Superfamilie wurde bereits mit anderen Fusionsproteinen demonstriert. Insbesondere TRAIL ist für die Konstruktion solcher rekombinanten Proteine geeignet, da dieser Ligand als ein Agens gilt, das im Hinblick auf Effizienz und Induktion von Zelltod eine echte Spezifität für Tumorzellen aufweist (Wang et al., 2003). TRAIL ist eines der wenigen Moleküle, die selektiv Apoptose in Tumorzellen und transformierten Zellen induzieren, wohingegen normale Zellen resistent gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose sind (Ashkenazi und Dixit, 1998). Von Harald Wajant und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, daß TRAIL sowohl in löslicher als auch membranständiger Form zur Aktivierung von TRAIL-R1/DR4 in der Lage ist, wohingegen TRAIL-R2/DR5 nur durch membranständiges oder durch lösliches TRAIL, das durch Antikörper sekundär quervernetzt wurde, aktiviert wird (Wajant et al., 2001 a). Durch genetische Fusion des löslichen TRAIL mit dem Antikörperderivat MBOS4 war es weiterhin möglich, die „signaling“-Fähigkeit

von membranständigem TRAIL vollständig herzustellen, da so eine Antigen-abhängige Immobilisierung des Fusionsproteins auf Zelloberflächen erreicht wird. Das rekombinante Antikörperderivat MBOS4 bindet ebenfalls an den Tumorstromamarker FAP und daher wirkt MBOS4-TRAIL auf HT1080-FAP-Zellen deutlich stärker toxisch als auf parentale HT1080-Zellen (Wajant et al., 2001 a). Durch Neutralisation der TRAIL-Rezeptoren mit spezifischen Fab-Fragmenten konnte nachgewiesen werden, daß die MBOS4-TRAIL-induzierte Apoptose nicht durch das lösliche Fusionsprotein induziert wird, sondern daß dieser Zelltod in erster Linie von TRAIL-R2 vermittelt wird und daher auf der selektiven Bindung und Immobilisierung von MBOS4-TRAIL auf FAP-positiven Zellen beruhen muß (Wajant et al., 2001 a). Für die Konstruktion trimerer FasL-Fusionsproteine wurden neben den scFv-Domänen von Antikörpern auch andere Proteindomänen eingesetzt, die zur selektiven Interaktion mit einer korrespondierenden membranständigen Domäne fähig sind. Beispielsweise wurde ein Fusionsprotein aus den extrazellulären Domänen von CD40 und FasL konstruiert, das selektiv an CD40L-positive Zellen, wie z. B. aktivierte T-Lymphozyten, bindet und dadurch „signaling“-kompetent wird (H. Wajant und C. Assouhou-Luty, persönliche Mitteilung). Über die Bindung der CD40-Domäne an CD40L-exprimierende T-Zellen wird das lösliche Fusionsprotein immobilisiert und aktiviert, so daß über die FasL-Fas-Interaktion Apoptose induziert werden kann. Anwendungsgebiete für dieses rekombinante Protein stellen Autoimmunkrankheiten und chronisch inflammatorische Erkrankungen dar, an deren Entstehung und Verlauf CD4⁺-T-Lymphozyten maßgeblich beteiligt sind, beispielsweise Typ-II-Diabetes, Multiple Sklerose oder rheumatoide Arthritis.

In der bereits angesprochenen Arbeit von Edwin Bremer und Mitarbeitern wurde aufgrund ähnlicher Überlegungen das EGP2/EpCAM-spezifische Antikörperfragment scFvC54 genetisch mit löslichem TRAIL fusioniert (Bremer et al., 2004). Das resultierende Fusionsprotein scFvC54:sTRAIL wurde ebenfalls so entworfen, daß die TRAIL-Rezeptor-vermittelte Apoptose erst nach spezifischer Bindung des Fusionsproteins an das membranständige Antigen EGP2/EpCAM eintritt. In mehreren unterschiedlichen EGP2-positiven Tumorzell-Linien konnte nach der Stimulation mit scFvC54:sTRAIL eine effiziente Induktion von Apoptose beobachtet werden (Bremer et al., 2004). Die zytotoxische Wirkung des Fusionsproteins konnte durch Präinkubation der Zellen mit einem EGP2-spezifischen monoklonalen Antikörper deutlich inhibiert werden, ebenso wie durch Behandlung von

scFvC54:sTRAIL mit einem TRAIL-neutralisierenden Antikörper. In weiteren Experimenten mit SW948-Zellen, die EGP2 und die beiden Rezeptoren DR4 und DR5 exprimieren, konnte gezeigt werden, daß diese Zellen durch Präinkubation mit dem blockierenden EGP2-Antikörper beinahe vollständig vor der zytotoxischen Wirkung von scFvC54:sTRAIL bewahrt werden können. Somit wird die TRAIL-induzierte Apoptose selbst in Anwesenheit von TRAIL-R1 in erster Linie von TRAIL-R2 vermittelt (Bremer et al., 2004). Diese Daten bestätigen somit von unabhängiger Seite die prinzipielle Funktionstüchtigkeit des Konzeptes der Antikörper-vermittelten Immobilisierung und lokalen Aktivierung zytotoxischer Liganden.

7.3 Untersuchung der Wirkung von scFv40-Flag-FasL nach systemischer Applikation in vivo

Um die Ungefährlichkeit von scFv40-Flag-FasL in vivo zu demonstrieren, wurde das Fusionsprotein intravenös in Mäuse verschiedener Stämme appliziert. Erste Untersuchungen mit CD1-Mäusen konnten zeigen, daß eine einzelne i.v. Injektion von 90 µg scFv40-Flag-FasL nicht letal auf die behandelten Tiere wirkt (Abb. 11). In Analogie zu der Arbeit von Pascal Schneider und Mitarbeitern, in der die Injektion von 12,5 µg aggregiertem FasL in allen BALBc-Mäusen tödlich wirkt (Schneider et al., 1998), konnte hier gezeigt werden, daß eine Injektion von 8 µg des Fusionsproteins erst nach Applikation von quervernetzendem Antikörper in allen Tieren zum Tod führt (Abb. 11). Dies bestätigt auch in vivo, daß das zytotoxische Potenzial von scFv40-Flag-FasL durch Aggregation mit einem Flag-spezifischem Antikörper artifiziell aktiviert werden kann und sich dann unspezifisch auf FasL-sensitiven Zellen entfaltet. In einem folgenden Tierexperiment wurde die Todesursache der behandelten Mäuse untersucht. Wie die Obduktion von C57BL/6 x CBA/J-Mäusen, die 45 min nach Applikation des quervernetzten Fusionsproteins getötet wurden, zeigte, ist die Leber stark hämorrhagisch (Abb. 13). Diese Organschädigung ist offensichtlich verantwortlich für den schnellen Eintritt des Todes. Die Injektion von scFv40-Flag-FasL oder Flag-spezifischem Antikörper allein induzierte keine makroskopische Verletzung des Lebergewebes (Abb. 13). Die Analyse von isoliertem Blutplasma auf die Aktivität von Leberenzymen, die bei der Schädigung von Hepatozyten in den Blutkreislauf freigesetzt werden, bestätigte

diese Ergebnisse. So war die Aktivität von Alaninaminotransferase im Blutplasma nur nach kombinierter Behandlung mit scFv40-Flag-FasL und anti-Flag M2 zu beobachten (Abb. 12 A). In diesen Tieren war ebenfalls eine makroskopische Schädigung der Leber festzustellen.

Die Analyse der Aktivität von Aspartataminotransferase ergab hinsichtlich der Wirkung von scFv40-Flag-FasL ein identisches Bild. Hier wurde allerdings die Freisetzung der Enzymaktivität nicht nur nach Behandlung mit aggregiertem scFv40-Flag-FasL beobachtet, sondern auch in der Kontrollgruppe (Abb. 12 B). Die Tiere dieser Gruppe verhielten sich aber vollkommen vital und später normalisierte sich dieser Wert wieder, wie die Untersuchung weiterer Tiere 6 h nach der Injektion zeigte. Höchstwahrscheinlich wurde diese Enzymaktivität mit dem konditionierten Medium appliziert, war aber in der korrespondierenden scFv40-Flag-FasL-Präparation nicht enthalten. Eine Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels Affinitätschromatographie ist daher der einfachen Ankonzentrierung von Kulturüberständen vorzuziehen. Die Analyse der Aktivität von Caspase-3 in Gewebeproben der Leber ergab nur ein eindeutiges Signal nach Behandlung der Tiere mit quervernetztem scFv40-Flag-FasL (Abb. 12 C). Folglich wird eine einzelne intravenöse Injektion von scFv40-Flag-FasL vom murinen Organismus gut toleriert. Dies konnte ebenfalls für Mäuse der Linie *nu/nu* NMRI gezeigt werden, in denen die antitumorale Wirkung von scFv40-Flag-FasL untersucht wurde (Tabelle 2). Eine systemische Applikation von scFv40-Flag-FasL löst daher keine ungewollten oder sogar tödlichen Komplikationen aus, die den Einsatz der herkömmlichen Fas-Agonisten erheblich einschränkte.

7.4 Die antitumorale Wirkung von scFv40-Flag-FasL in vivo

Um die antitumorale Wirkung von scFv40-Flag-FasL in vivo zu untersuchen, wurden subkutan transplantierte Tumore durch lokale Applikation des Fusionsproteins behandelt. Die hierzu verwendeten HT1080-FAP-Zellen tendieren in vivo schnell zum Verlust des Antigens FAP, weshalb eine frühzeitige Behandlungsstrategie eingesetzt wurde (J. Park und P. Garin-Chesa, persönliche Mitteilung). So konnte gezeigt werden, daß die frühzeitige Applikation von scFv40-Flag-FasL mit CHX das Wachstum der subkutan implantierten Tumorzellen inhibiert (Abb. 14). In den Tieren

der Kontrollgruppe entwickelten sich dagegen aus den HT1080-FAP-Zellen ungehindert subkutane Tumore. In einem folgenden Experiment konnte demonstriert werden, daß dabei auf die Kobehandlung mit CHX verzichtet werden kann (Abb 15 B). Nach einem Beobachtungszeitraum von insgesamt 11 Wochen sind ebenso viele Tiere (4/6), die mit scFv40-Flag-FasL und CHX behandelt wurden, komplett tumorfrei, wie allein mit scFv40-Flag-FasL behandelte Tiere (4/6). Die Reduktion der scFv40-Flag-FasL-Injektionen auf die Hälfte (3 statt 6) genügt bei frühzeitigem Behandlungsbeginn noch, um in 2 von 4 Tieren das Wachstum der transplantierten Tumorzellen zu inhibieren und dauerhaft der Entwicklung subkutaner Tumore vorzubeugen (Abb. 15 C). Die Effizienz dieser Therapie nimmt aber bei späterem Beginn rapide ab.

Mit der Behandlung parentaler, FAP-negativer HT1080-Zellen konnte weiterhin demonstriert werden, daß auch in vivo der für die Immobilisierung essentielle Interaktionspartner FAP von entscheidender Bedeutung für die Wirkung des Fusionsproteins ist. Die Applikation von scFv40-Flag-FasL inhibierte effektiv das Wachstum FAP-positiver Tumorzellen, konnte aber die Entwicklung subkutaner Tumore aus parentalen HT1080-Zellen nicht beeinträchtigen (Abb. 17). In der Praxis soll diese Art von Fusionsproteinen etablierte Tumore oder Metastasen im Wachstum inhibieren und möglichst deren Regression einleiten. Daher wurde in einem weiteren Schritt die Therapierbarkeit etablierter Tumore analysiert. In diesem Modell verblieben die Tumorzellen nach der Transplantation 5 Tage unbehandelt und im Anschluß wurde die Therapie begonnen. Durch die peritumorale Injektion von scFv40-Flag-FasL konnte in 4 von 6 Tieren eine vollkommene Regression der Tumormasse erreicht werden. Bei dieser Strategie konnte eine Kobehandlung mit CHX die Heilungsquote ebenfalls nicht verbessern. In der kobehandelten Gruppe blieben nur 3 von 6 Tieren dauerhaft tumorfrei (Abb. 18 und 19). In den Tieren aus den Kontrollgruppen, die mit steriler Pufferlösung mit und ohne CHX behandelt wurden, war keine Beeinträchtigung des Tumorwachstums zu erkennen. Das spezielle Aktivierungsprinzip des Fusionsproteins scFv40-Flag-FasL ermöglicht somit die lokale Nutzung der „signaling“-Fähigkeiten von FasL und verhindert die schädlichen Nebenwirkungen in vivo, die von konventionellen Fas-Agonisten her bekannt sind.

7.5 Die paradoxen Funktionen von FasL in der Immunbiologie

Die hier vorgestellten tierexperimentellen Untersuchungen konnten demonstrieren, daß scFv40-Flag-FasL in vivo selektiv das Wachstum subkutan transplantierte FAP-positiver Tumorzellen inhibiert. Daraus kann allerdings noch keine Aussage über den tatsächlichen Wirkungsmechanismus in vivo abgeleitet werden. Eine unmittelbare proapoptotische Wirkung von scFv40-Flag-FasL scheint naheliegend, da die eingesetzten Zellen HT1080-FAP auch in vitro sensitiv für Fas-induzierte Apoptose sind. Hiroshi Arai und Mitarbeiter haben ebenfalls die Eignung von FasL für die Tumorthherapie untersucht und in ihrem Therapieansatz subkutan inokulierte Tumorzellen mit einem adenoviralen FasL-Expressionsvektor transfiziert. So konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, daß eine in vitro Fas-sensitive Zell-Linie in einem syngenem Tiermodell auch in vivo durch direkte Induktion von Apoptose eliminiert wird (Arai et al., 1997). Weiterhin wurde von diesen Autoren beschrieben, daß stabil FasL-transfizierte CT26-Zellen nach syngener Transplantation in BALB/c-Mäuse ebenfalls abgestossen werden, obwohl sich diese Zell-Linie in vitro resistent gegenüber Stimulation mit FasL verhält. Diese Beobachtung wurde interessanterweise auch in den immundefizienten Mäusestämmen nude, SCID und SCID-beige gemacht: FasL-transfizierte CT26-Zellen wurden von allen immundefizienten Mäusen abgestossen, wohingegen sich aus den subkutan transplantierten Kontrollzellen CT26-neo stets Tumore entwickelten (Arai et al., 1997). Mit histologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß für die Eliminierung der Tumorzellen Neutrophile und Monozyten verantwortlich sind, die ausschließlich FasL-transfizierte Tumore infiltrieren und dort akkumulieren. Ähnliche Infiltrate aus inflammatorischen Zellen konnten auch in immunkompetenten Mäusen detektiert werden, so daß die Tumorregression offenbar nicht die Aktivierung von T-, B-, oder NK-Zellen erfordert, sondern durch inflammatorische Zellen von mononukleärem und granulozytärem Ursprung vermittelt wird (Arai et al., 1997).

In den letzten Jahren wurde im Rahmen der Transplantationsmedizin und -biologie ebenfalls die Anwendung von FasL zum Schutz allogener Transplantate vor Abstossung durch das Immunsystem des Rezipienten untersucht. Dieses Konzept basiert auf der Entdeckung, daß immunprivilegierte Organe, wie z. B. die Augen, ihren Status u. a. durch konstitutive Expression von FasL aufrecht erhalten (Green und Ferguson, 2001). Dementsprechend berichtete eine Arbeitsgruppe von der

erfolgreichen Kotransplantation Insulin-produzierender Inselzellen des Pankreas und FasL-exprimierender Myoblasten in allogene Rezipienten (Lau et al., 1996). Zahlreiche weitere Studien zu dieser Thematik berichteten aber stattdessen von einer beschleunigten Abstossung des Gewebes unter Entwicklung massiver inflammatorischer Prozesse (siehe Restifo, 2000). Beispielsweise wurde von Sang-Mo Kang und Mitarbeitern getestet, ob pankreatische Inselzellen durch ektopische Expression von FasL vor der Abstossung in allogenen Rezipienten bewahrt werden können. Überraschenderweise wurden die FasL-transfizierten Inselzellen bereits 4 Tage nach der Transplantation abgestossen, wohingegen die Kontrollzellen im Mittel 9 Tage in den Rezipienten überlebten (Kang et al., 1997). Auch bei der Transplantation der FasL-exprimierenden Inselzellen in SCID-Mäuse wurde eine beschleunigte Abstossung innerhalb von 4 Tagen beobachtet, die durch eine massive Infiltration mit Neutrophilen verursacht wurde.

Bei der Erforschung der Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Zellen des Immunsystems wurde beobachtet, daß manche Tumorzellen nicht nur ihrer Zerstörung durch Immunzellen entgehen, indem sie beispielsweise antiapoptotische Moleküle überexprimieren, sondern daß sie darüber hinaus auch FasL exprimieren. Somit könnten Tumorzellen potenziell aktiv Tumor-infiltrierende Lymphozyten töten und eine antitumorale Immunantwort unterdrücken. Dieses Phänomen bezeichnet man als „tumor counter-attack“. Die konstitutive oder durch Chemotherapeutika induzierte FasL-Expression in Fas-resistenten Tumorzellen konnte in zahlreichen Studien belegt werden (Igney et al., 2003). Solche Tumorzellen können in vitro Fas-sensitive Zellen töten: Beispielsweise wurden in Kokultorexperimenten Fas-sensitive Jurkat-T-Zellen von FasL-exprimierenden SW620-Colonkarzinomzellen getötet (O’Connell et al., 2001). Weiterhin konnte in situ Apoptose von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten in FasL-exprimierenden humanen Tumoren nachgewiesen werden (Igney et al., 2003). In vielen Arbeiten, die sich mit der „tumor counter-attack“-Hypothese beschäftigt haben, wurde beobachtet, daß die Überexpression von FasL das Wachstum Fas-resistenter muriner Tumorzellen in vitro nicht beeinträchtigt, jedoch nach der Transplantation dieser Zellen in vivo eine Abstossung vermittelt durch Neutrophile festzustellen ist (Igney et al., 2003). Daher wurde postuliert, daß für das Eintreten von Tumorabstossung oder „tumor counter-attack“ möglicherweise die Intensität und bzw. oder der Zeitpunkt der FasL-Expression verantwortlich ist. Eine Überexpression von FasL würde demnach eher die Abstossung der

Tumorzellen durch Neutrophile einleiten, wohingegen eine physiologische Expression nicht die Infiltration Neutrophiler induziert, aber für die Eliminierung antitumoraler Lymphozyten genügt. Diese Hypothese wurde von Frederik Igney und Mitarbeitern durch Transplantation der Apoptose-resistenten Lymphomzell-Linie LKC-CD95L in syngene nude-Mäuse näher untersucht. Sämtliche Klone dieser Zell-Linie, die sich in der Expressionsstärke von FasL unterschieden, wiesen nicht nur in vitro, sondern auch in vivo eine vergleichbare Wachstumsrate auf. Wie eine Analyse von entnommenem Tumorgewebe in Zytotoxizitätsassays demonstrierte, hatten interessanterweise alle Klone ihre zytotoxische Aktivität ex vivo verloren (Igney et al., 2003). Auch die Induktion der FasL-Expression in etablierten, Fas-resistenten Tumoren führte in NOD/SCID-Mäusen zu einer schnellen Abstossung der Tumore unter Beteiligung von Neutrophilen (Igney et al., 2003). Somit konnte weder die Expressionsstärke von FasL noch der Zeitpunkt als kritische Faktoren identifiziert werden, die ausschlaggebend für die Entwicklung einer „tumor counter-attack“ bzw. der Tumorabstossung sind. Es wurde allerdings deutlich, daß auch eine vergleichsweise niedrige FasL-Expression zu einem verzögerten Tumorwachstum in vivo führt und dies für einen Tumor als unvorteilhafte Eigenschaft angesehen werden muß, da die initiale FasL-Expression in vivo verlorengelht. Erst nach der Selektion FasL-negativer Zellen wachsen subkutane Tumore heran (Igney et al., 2003). In diesem Zusammenhang ist anzumerken, daß bei der Transplantation von FasL-exprimierenden Tumorzellen in syngene, immunkompetente Mäuse nicht nur von der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten berichtet wurde, sondern auch die Entstehung einer adaptiven, tumorspezifischen Immunität beruhend auf CD8⁺-T-Lymphozyten beobachtet wurde, die ebenfalls die Abstossung der parentalen, FasL-negativen Tumorzellen verursacht (Seino et al., 1997; Shimizu et al., 1999). Des Weiteren wurde in der Studie von Motomu Shimizu und Mitarbeitern davon berichtet, daß sich bei der Transplantation von FasL-positiven Tumorzellen in nude-Mäuse nach einer Latenzphase von 3 Wochen in 5 von 6 Tieren palpierbare Tumore entwickelten, so daß T-Zellen für eine komplette Abstossung der FasL-exprimierenden Tumorzellen offenbar unerläßlich sind (Shimizu et al., 1999). Dieser zentrale Punkt scheint in vielen Studien, in denen die Rolle von FasL in der „tumor counter-attack“ bzw. bei der Abstossung von Tumorzellen untersucht wurde, nur unzureichend studiert worden zu sein.

Die inflammatorischen Effekte von FasL wurden in den beschriebenen Studien darauf zurückgeführt, daß durch die Stimulation des Fas-Rezeptors in inflammatorischen oder somatischen Zellen des Rezipienten eine Caspasekaskade in Gang gesetzt wird, die neben der Induktion von Apoptose auch die Prozessierung und Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL1- β und IL18 über die Aktivierung von Caspase-1/ICE verursacht (Restifo, 2000; O'Connell et al., 2001). Außerdem kann FasL die Expression verschiedener Chemokine wie IL6, IL8, MCP1 und GRO1 induzieren, was zu einer Rekrutierung inflammatorischer Zellen führt (O'Connell et al., 2001). Diese Erkenntnisse ermöglichten aber bisher keine plausible Erklärung für den Zusammenhang von dominierender proapoptotischer und untergeordneter geninduktiver Signaltransduktion des Fas-Rezeptors. In einer jüngeren Arbeit von Dr. Sebastian Kreuz und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, daß in Zellen durch Stimulation mit FasL der NF κ B-Signalweg induziert wird, wenn diese mit z-VAD-fmk oder durch Überexpression von Bcl-2 vor den zytotoxischen Funktionen der Fas-Signaltransduktion geschützt wurden (Kreuz et al., 2004). Bei der Blockade der proapoptotischen Signaltransduktion von Fas wird der ursprünglich zytotoxische Stimulus in eine inflammatorische Antwort konvertiert, die in der Expression von Chemokinen und Zytokinen wie IL1- α und IL1- β , IL6, IL8, MCP1 und GM-CSF gipfelt und somit dem TNF-induzierten Zytokinmuster in wesentlichen Teilen gleicht (Kreuz et al., 2004). Anhand dieser Ergebnisse kann ein Modell postuliert werden, das eine physiologische Begründung für eine FasL-induzierte Inflammation bietet und die geschilderten tierexperimentellen Ergebnisse erklären kann. Aus Sicht einer Zelle ist das Molekül FasL eine Waffe, die von aktivierten zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen eingesetzt wird, um beispielsweise virusinfizierte Zellen zu eliminieren (Krammer, 2000). Bei einer erfolgreichen Exekution des apoptotischen Programms in der Zielzelle werden die verbleibenden Überreste, die sogenannten „apoptotic bodies“, von Phagozyten aufgenommen und entfernt, so daß die Immunantwort beendet werden kann. Das Gegenteil tritt bei einem Mißlingen ein: In der FasL-stimulierten, aber Apoptose-resistenten Zelle wird stattdessen die Sekretion proinflammatorischer Zytokine induziert und die Immunantwort wird amplifiziert. Der alternative, geninduktive Signalweg von CD95/Fas dient gewissermaßen als „failsafe“-Mechanismus, der das „stille“ Ausweichen einer Zielzelle ohne Ausführung des Zelltodes als geforderte Reaktion verhindern könnte. Diese Hypothese kann auf die unklare Situation bei der „tumor counter-attack“ und auf die Abstossung FasL-

positiver syngener Transplantate übertragen werden. Zur Expression von FasL dürfen aufgrund der zytotoxischen Wirkung nur bestimmte Zellen berechtigt sein, wie z. B. Zellen des Immunsystems. Die Expression von FasL durch eine bestimmte Zellpopulation bei gleichzeitiger Resistenz gegen Fas-induzierte Apoptose stellt für den Organismus eine gefährliche Situation dar, auf die das Immunsystem durch Induktion respektive Verstärkung der Immunantwort via eine proinflammatorische Signaltransduktion von Fas aufmerksam gemacht werden könnte. Dies setzt nicht zwangsläufig eine Interaktion von FasL-positiven Tumorzellen und Fas-exprimierenden Zellen des Rezipienten voraus, sondern es könnte sich auch um eine autokrine und parakrine Signaltransduktion innerhalb der entsprechenden Zellpopulation handeln. Bei der Produktion von rekombinantem FasL im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, daß die stabil produzierende Zell-Linie HEK293-Flag-FasL in vitro große Mengen IL8 synthetisiert. Auf diese Weise ist in vivo ebenfalls die Induktion einer Immunantwort gegen FasL-positive Transplantate bzw. Tumorzellen denkbar. Eine Population von FasL-exprimierenden, aber Apoptose-resistenten Tumorzellen wird daher die für sie schädlichen inflammatorischen Funktionen der Fas-Signaltransduktion zumindest teilweise deaktivieren, insbesondere diejenigen, die antitumorale Effektorfunktionen des Immunsystems induzieren. Entsprechend der „cancer immunosurveillance“-Hypothese schützt das Immunsystem nicht nur vor der Entwicklung von Tumoren, sondern modelliert und editiert durch den ausgeübten Selektionsdruck die Immunogenität der Tumorzellen und fördert so die Entstehung von Subpopulationen, die durch eine reduzierte Immunogenität der Immunüberwachung entgehen können (Dunn et al., 2004). In manchen Studien konnte so die Entwicklung palpierbarer Tumore aus transplantierten, FasL-exprimierenden Tumorzellen erst nach einer gewissen Latenzphase beobachtet werden (siehe Shimizu et al., 1999; Igney et al., 2003). Immunprivilegierten Regionen ist dagegen die Expression von FasL gestattet, da sie gleichzeitig auch immunsuppressive Faktoren wie TGF- β bilden, die den proinflammatorischen Zytokinen entgegenwirken (Green und Ferguson, 2001). Tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, daß die Kotransfektion von TGF- β mit FasL die inflammatorische Antwort auf ein allogenes Transplantat verhindert (O'Connell et al., 2001). Ein solcher Kontrollmechanismus, wie er hier für das CD95/Fas-System postuliert wurde, konnte kürzlich von Olivier Micheau und Jürg Tschopp für den Todesrezeptor TNF-R1 auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. In

deren Modell werden die vordergründig widersprüchlichen Funktionen des TNF-R1 sinnvoll zueinander in Beziehung gesetzt. Nach der Aktivierung des TNF-R1 durch den zugehörigen Liganden entsteht in kurzer Zeit ein membranständiger Komplex, der zügig die Aktivierung von NF κ B einleitet und so vielfältige zelluläre Antworten wie Differenzierung oder Proliferation moduliert (Micheau und Tschopp, 2003). Reagiert die TNF-stimulierte Zelle nicht in dieser Weise, kann sie ebenfalls nicht die Einleitung von Apoptose durch einen zytoplasmatischen Komplex verhindern, der aus dem initialen membranständigen Komplex hervorgegangen ist und die Aktivierung der proapoptotischen Initiatorcaspasen 8 und 10 vermittelt (Micheau und Tschopp, 2003). Die Zuverlässigkeit der TNF-vermittelten Geninduktion wird somit durch diesen intrinsischen Kontrollmechanismus geprüft und eine Zelle, die nicht oder mangelhaft mit der Expression antiapoptotischer Moleküle, insbesondere von FLIP_L, auf die Stimulation mit TNF reagiert, wird durch Induktion von Apoptose eliminiert. Die molekularen Mechanismen dieser Kontrollschleife wurden bereits in der Einleitung erläutert. Beim Fas-Rezeptor scheint dieser Mechanismus in umgekehrter Reihenfolge zu funktionieren: Eine Zelle, die nach Stimulation mit FasL nicht wie erwartet durch Fas-vermittelte Apoptose stirbt, sendet stattdessen Fas-induzierte inflammatorische Signale aus und meldet die ungenügende Reaktion dem Immunsystem. Obwohl dieser Kontrollmechanismus auf molekularer Ebene noch aufgeklärt und demonstriert werden muß, weisen doch die eingangs zitierten tierexperimentellen Daten deutlich auf dessen Existenz hin.

Das Fusionsprotein scFv40-Flag-FasL könnte dieser Hypothese entsprechend in den hier eingesetzten *nu/nu* NMRI-Mäusen beide Fas-vermittelten Antworten ansprechen. Auf *in vitro* Fas-sensitive Zellen wird die Behandlung mit scFv40-Flag-FasL auch *in vivo* eine direkte proapoptotische Reaktion auslösen. Fas-resistente Zellen reagieren dagegen auf eine scFv40-Flag-FasL-Stimulation mit der Produktion eines proinflammatorischen Zytokinmusters. Davon konnte *in vitro* bereits die Synthese von IL8 nachgewiesen werden und dieses Zytokinmuster sollte *in vivo* zumindest für eine zeitweise inflammative Suppression des Tumorwachstums oder eventuell für die komplette Abstossung dieser Zellen verantwortlich sein. Für die Aufklärung der zahlreichen, aufgeworfenen Fragestellungen ist die lokale Aktivierung von Fas durch ein Fusionsprotein wie scFv40-Flag-FasL sicherlich ein geeignetes Instrument. Von der Untersuchung der Fas-induzierten Signaltransduktion in zukünftigen Projekten sind im Hinblick auf den erläuterten Sachverhalt substantielle

Erkenntnisse zu erwarten, die von richtungsweisender Bedeutung für die Anwendung von FasL in der Transplantationsmedizin und Tumorthherapie sein können.

8 Summary

The main strategies for treatment of cancer beside surgical resection of tumor tissue comprise radiation and chemotherapy. The latter approaches induce irreparable serious damage at the level of DNA replication and cell division in proliferating cells, thereby leading to the activation of programmed cell death, which results in the elimination of damaged cells. The feasibility of these strategies is hampered by the emergence of therapy resistant tumor cells, that frequently arise because mutations inactivate key connections between the cell's damage sensors and the apoptotic machinery. Moreover, these methods induce severe side effects, as radiation and chemotherapeutic drugs cannot distinguish between malignant and non-malignant proliferating cells. In recent years several attempts have been made to develop therapeutical approaches based on biological mechanisms, that are able to overcome tumor resistance and attack tumor cells while causing only a minimum of toxic side effects. The stroma of solid tumors has been recognized as a promising target for treatment of cancer, as it displays several favourable features. Solid tumors of epithelial origin consist of up to 90 % of their total mass of reactive stromal fibroblasts, which are recruited by the tumor cells out of the surrounding non-malignant tissue. Therefore reactive stromal fibroblasts are genetically stable and moreover express a cell surface antigen named fibroblast activation protein (FAP), which is an almost unique marker for tumor stroma as it is not detected in normal adult human tissues except from granulation tissue of healing wounds and certain chronic inflammatory disorders.

Several projects done at the Institute of Immunology and Cellular Biology, University of Stuttgart, focused on development and production of different murine and human FAP-specific antibodies for use in immunohistochemical detection of tumor tissue and directing cytotoxic effects to tumor cells and stromal fibroblasts, respectively. In this context, Dr. Müller Szeraws constructed the FAP-specific immunoconjugate scFv40-Flag-FasL comprising the human single chain antibody fragment svFv40 genetically linked to the extracellular domain of human FasL. The aminoterminal scFv40-domain mediates specific binding to FAP thereby allowing antigen-dependent immobilization on FAP expressing cells. This interaction results in activation of the cytotoxic potential of the a priori inactive FasL fusion protein in a strictly target-selective manner. For this reason in the present work the functional capabilities of

scFv40-Flag-FasL were studied in more detail in vitro and the putative antitumoral effect was analysed by treatment of xenotransplanted tumor cells in vivo.

The recombinant fusion protein was produced in stably transfected HEK293 cells and supernatants containing scFv40-Flag-FasL were either concentrated by dialysis or scFv40-Flag-FasL was purified by affinity chromatography. Specific binding of scFv40-Flag-FasL to FAP-expressing cell lines HT1080-FAP and HeLa-FAP was demonstrated by FACS-analysis. Despite the fact that HT1080 and HT1080-FAP cells show comparable sensitivity to FasL-mediated cell death, scFv40-Flag-FasL induces cytotoxicity selectively in FAP-expressing HT1080 cells but not in antigen-negative parental cells. In cell death assays the cytotoxic effects of scFv40-Flag-FasL on HT1080-FAP cells could be blocked by neutralizing the FasL-domain of scFv40-Flag-FasL with recombinant soluble Fas-receptor or FasL-specific antibody. Furthermore, blocking the FAP antigen with the qualified antibody derivative Mb40 inhibited scFv40-Flag-FasL mediated cytotoxicity, demonstrating that scFv40-Flag-FasL-induced action is dependent on binding to FAP and is mediated by Fas. Treatment of cells with the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk completely abolishes cytotoxic effects of scFv40-Flag-FasL, arguing for induction of apoptosis. Western blot analysis further revealed, that scFv40-Flag-FasL induced processing of procaspase-8, an essential step in Fas-mediated apoptosis, selectively in HT1080-FAP cells, whereas it was not observed in parental HT1080 cells. In accordance with this result activity of caspase-3 was exclusively found in lysates of HT1080-FAP cells treated with scFv40-Flag-FasL but not in similar treated FAP-negative HT1080 cells. In principle these results could be also demonstrated in HeLa and HeLa-FAP cells, respectively. Beside the well established proapoptotic function of the FasL/Fas-system recent reports describe the existence of additional nonapoptotic functions of Fas. In this context production of IL8 after stimulation of Fas-receptor was analysed and it was shown, that scFv40-Flag-FasL is capable to induce synthesis of IL8 in HT1080-FAP cells, whereas similar effects in parental HT1080 cells can only be detected after secondary aggregation of scFv40-Flag-FasL by crosslinking antibodies. The production of chemokines or proinflammatory cytokines induced by scFv40-Flag-FasL might be of relevance for the antitumoral activity in vivo. In summary the results obtained in vitro demonstrate that the inactive soluble fusion protein scFv40-Flag-FasL can be converted into a fully signaling competent molecule

with local membrane FasL-like activity by cell-surface antigen-dependent immobilization.

Conventional Fas-agonists that were designed for anticancer therapy unfortunately cause severe liver injury after systemic administration *in vivo*, finally leading to death of treated animals. In an approach to test the *in vivo* toxicity of scFv40-Flag-FasL a single high dose of protein was injected intravenously in animals of different mouse strains and subsequent examination revealed no apparent signs of liver injury. All animals survived treatment with scFv40-Flag-FasL. Nevertheless, the lethal cytotoxic potential of scFv40-Flag-FasL can be activated *in vivo* by a second intravenous injection of crosslinking antibody causing death of treated animals within 90 minutes. Livers of these animals proved to be highly hemorrhagic and liver injury was accompanied by release of hepatic enzymes into the circulating blood, as analysis of isolated plasma revealed a strong increase in activity of alanine and aspartate aminotransferase. Furthermore, in homogenates of liver tissue a strong signal in activity of caspase-3 was detected under these circumstances, whereas in liver tissue samples of animals exclusively challenged with scFv40-Flag-FasL caspase-3 activity was not induced.

The antitumoral activity of scFv40-Flag-FasL was subsequently investigated *in vivo* by treatment of FAP-negative and -positive HT1080 tumor cells which were subcutaneously implanted in *nu/nu* NMRI-mice. Early initiated local application of scFv40-Flag-FasL in an area close to the tumor inoculation site efficiently inhibited growth of HT1080-FAP cells, but did not impair development of fibrosarcomas in animals transplanted with HT1080 cells. The combined treatment of transplanted tumor cells with scFv40-Flag-FasL and cycloheximide (CHX), which is a drug sensitizing cells for death receptor-induced apoptosis *in vitro*, did not increase efficiency of therapy nor did administration of CHX influence tumor burden. In an attempt to cure established subcutaneous tumors it was shown that administration of scFv40-Flag-FasL is sufficient to inhibit growth of HT1080-FAP cells in 66 % of treated animals. The underlying mechanism responsible for the observed antitumoral activity of scFv40-Flag-FasL *in vivo* might depend on a direct proapoptotic function on the tumor cells or involve recruitment of cellular effector functions of the innate immune system, which were also reported to inhibit growth of FasL-positive tumors in wild-type and T-cell-deficient mice. Nevertheless, the results described herein encourage to further investigate the applicability of this concept in cancer therapy.

9 Literaturverzeichnis

- ACEHAN, D., JIANG, X., MORGAN, D. G., HEUSER, J. E., WANG, X., AND AKEY, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Cell*, **9**, 423-432.
- ALDERSON, M. R., ARMITAGE, R. J., MARASKOVSKY, E., TOUGH, T. W., ROUX, E., SCHOOLEY, K., RAMSDELL, F., AND LYNCH, D. H. (1993). Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **178**, 2231-2235.
- APLIN, A. E., HOWE, A., ALAHARI, S. K., AND JULIANO, R. L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.*, **50**, 197-263.
- ARAI, H., GORDON, D., NABEL, E. G., AND NABEL, G. J. (1997). Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13862-13867.
- ASHKENAZI, A., AND DIXIT, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **281**, 1305-1308.
- ASHKENAZI, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 420-430.
- BAEHRECKE, E. H. (2002). How death shapes life during development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 779-786.
- BERGERS, G., AND BENJAMIN, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 401-410.
- BERGMEYER H. U. (ED) (1984). *Methods of enzymatic analysis*, Vol. 3, 3rd ed., pp.416-456, Wiley Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland.
- BLAJESKI, A. L., AND KAUFMANN, S. H. (1999). Methods for detecting proteolysis during apoptosis in intact cells., pp.215-238 in *Apoptosis – a practical approach*, Edited by G. P. Studzinski, Oxford University Press, Oxford, USA.
- BOATRIGHT, K. M., RENATUS, M., SCOTT, F. L., SPERANDIO, S., SHIN, H., PEDERSEN, I. M., RICCI, J.-E., EDRIS, W. A., SUTHERLIN, D. P., GREEN, D. R., AND SALVESEN, G. S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell*, **11**, 529-541.
- BOS, J. L. (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.*, **49**, 4682-4689.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.

- BREMER, E., KUIJLEN, J., SAMPLONIUS, D., WALCZAK, H., DE LEIJ, L., AND HELFRICH, W. (2004). Target cell-restricted and -enhanced apoptosis induction by a scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for the pancreatic carcinoma-associated antigen EGP2. *Int. J. Cancer*, **109**, 281-290.
- BROCKS, B. (1998). Murine Antikörper gegen das Tumorstroma-Antigen Fibroblast Activation Protein. Dissertation, Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart, Verlag Grauer, Beuren, Stuttgart, 1998.
- BROMBERG, J., AND DARNELL, J. E. (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*, **19**, 2468-2473.
- BRUBAKER, P. L., CRIVICI, A., IZZO, A., EHRLICH, P., TSAI, C. H., AND DRUCKER, D. J. (1997). Circulating and tissue forms of the intestinal growth factor, glucagon-like peptide-2. *Endocrinology*, **138**, 4837-4843.
- BRYAN, T. M., ENGLEZOU, A. GUPTA, J., BACCHETTI, S., AND REDDEL, R. R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.*, **14**, 4240-4248.
- BULL, H. A., BRICKELL, P. M., AND DOWD, P. M. (1994). Src-related protein tyrosine kinases are physically associated with the surface antigen CD36 in human dermal microvascular endothelial cells. *FEBS Lett.*, **351**, 41-44.
- CAMPISI, J. (2003). Cancer and ageing: rival demons? *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 339-349.
- CHAN, F. K., CHUN, H. J., ZHENG, L., SIEGEL, R. M., BUI, K. L., AND LENARDO, M. J. (2000 A). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, **288**, 2351-2354.
- CHAN, F. K.-M., SIEGEL, R. M., AND LENARDO, M. J. (2000 B). Signaling by the TNF receptor superfamily and T cell homeostasis. *Immunity*, **13**, 419-422.
- CHINNAIYAN, A. M., O'ROURKE, K., YU, G.-L., LYONS, R. H., GARG, M., DUAN, D. R., XING, L., GENTZ, R., NI, J., AND DIXIT, V. M. (1996). Signal transduction by DR3, a death domain containing receptor related to TNF-R1 and CD95. *Science*, **274**, 990-992.
- CHRISTOFORI, G., AND SEMB, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumor-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 73-76.
- CORDON-CARDO, C., AND PRIVES, C. (1999). At the crossroads of inflammation and tumorigenesis. *J. Exp. Med.*, **190**, 1367-1370.
- CORY, S., HUANG, D. C. S., ADAMS, J. M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, **22**, 8590-8607.
- COUNTER, C. M., AVILION, A. A., LEFEUVRE, C. E., STEWART, N. G., GREIDER, C. W., HARLEY, C. B., AND BACCHETTI, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.*, **11**, 1921-1929.

- COUSSENS, L. M., RAYMOND, W. W., BERGERS, G., LAIG-WEBSTER, M., BEHRENDTSEN, O., WERB, Z., CAUGHEY, G. H., AND HANAHAN, D. (1999). Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev.*, **13**, 1382-1397.
- COUSSENS, L. M., AND WERB, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, **420**, 860-867.
- DAMERON, K. M., VOLPERT, O. V., TAINSKY, M. A., AND BOUCK, N. (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 upregulation of thrombospondin-1. *Science*, **265**, 1582-1584.
- DATTA, S. R., BRUNET, A., AND GREENBERG, M. E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.*, **13**, 2905-2927.
- DEBATIN, K. M., AND KRAMMER, P. H. (2004). Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*, **23**, 2950-2966.
- DEGTEREV, A., BOYCE, M., AND YUAN, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, **22**, 8543-8567.
- DERUITER, N. D., BURGERING, B. M., AND BOS, J. L. (2001). Regulation of the forkhead transcription factor AFX by Ral-dependent phosphorylation of threonines 447 and 451. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 8225-8235.
- DESBARATS, J., BIRGE, R. B., MIMOUNI-RONGY, M., WEINSTEIN, D. E., PALERME, J. S., AND NEWELL, M. K. (2003). Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nature Cell Biol.*, **5**, 118-125.
- DIFIORE, P. P., PIERCE, J. H., KRAUS, M. H., SEGATTO, O., KING, C. R., AND AARONSON, S. A. (1987). *erbB-2* is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science*, **237**, 934-937.
- DOWNWARD, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 11-22.
- DRANOFF, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 11-22.
- DUNN, G. P., OLD, L. J., AND SCHREIBER, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, **21**, 137-148.
- ENARI, M., SAKAHIRA, H., YOKOYAMA, H., OKAWA, K., IWAMATSU, A., AND NAGATA, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, **391**, 43-50.
- ERNST, P. B. AND GOLD, B. D. (2000). The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**, 615-640.

- FEDI, P., TRONICK, S. R., AND AARONSON, S. A. (1997). Growth factors. In *Cancer Medicine*. Holland, J. F., Bast, R. C., Morton, D. L., Frei, E., Kufe, D. W., and Weichselbaum, R. R., eds. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins), 41-64.
- FOULDS, L. (1954). The experimental study of tumor progression. Volumes I-III. (London: Academic Press).
- FOLEY, K. P., AND EISENMAN, R. N. (1999). Two MAD tails: what the recent knockouts of Mad1 and Mxi1 tell us about the MYC/MAX/MAD network. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1423**, M37-47.
- FREIBERG, R. A., SPENCER, D. M., CHOATE, K. A., DUH, H. J., SCHREIBER, S. L., CRABTREE, G. R., AND KHAVARI, P. A. (1997). Fas signal transduction triggers either proliferation or apoptosis in human fibroblasts. *J. Invest. Dermat.*, **108**, 215-219.
- FYNAN, T. M. AND REISS, M. (1993). Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor β and its role in oncogenesis. *Crit. Rev. Oncog.*, **4**, 493-540.
- GAIDE, O., AND SCHNEIDER, P. (2003). Permanent correction of an inherited ectodermal dysplasia with recombinant EDA. *Nature Med.*, **9**, 614-618.
- GARIN-CHESA, OLD, L. J., AND RETTIG, W. J. (1990). Cell-surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7235-7239.
- GREEN, D. R., AND FERGUSON, T. A. (2001). The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 917-924.
- HANAHAN, D., AND WEINBERG, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- HAYFLICK, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry*, **62**, 1180-1190.
- HENGARTNER, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**, 770-776.
- HERSEY, P., AND ZHANG, X. D. (2001). How melanoma cells evade TRAIL-induced apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*, **1**, 142-150.
- HUDSON, J. D., SHOAIBI, M. A., MAESTRO, R., CARNERO, A., HANNON, G. J., AND BEACH, D. H. (1999). A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J. Exp. Med.*, **190**, 1375-1318.
- IGNEY, F. H., BEHRENS, C. K., AND KRAMMER, P. H. (2003). The influence of CD95L expression on tumor rejection in mice. *Eur. J. Immunol.*, **33**, 2811-2821.
- ITOH, N., YONEHARA, S., ISHII, A., YONEHARA, M., MIZUSHIMA, S., SAMESHIMA, M., HASE, A., SETO, Y., AND NAGATA, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, **66**, 233-243.

- JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M., AND CAPRA, J. D. (2000). Immunobiology. The immune system in health and disease. 4th Edition, Current Biology, Garland, Churchill Livingstone, USA.
- KAKINUMA, C., TAKAGAKI, K., YATOMI, T. ET AL. (1999). Acute toxicity of an anti-Fas antibody in mice. *Toxicol. Pathol.*, **27**, 412-420.
- KANG, S. M., SCHNEIDER, D. B., LIN, Z., HANAHAN, D., DICHEK, D. A., STOCK, P. G., BAEKKESKOV, S. (1997). Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. *Nature Med.*, **3**, 738-743.
- KAPLAN, D. H., SHANKARAN, V., DIGHE, A.S., STOCKERT, E., AGUET, M., OLD, L. J., AND SCHREIBER, R. D. (1998). Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7556-7561.
- KARRE, K. (2002). NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand. J. Immunol.*, **55**, 221-228.
- KAUFMANN, S. H., AND VAUX, D. L. (2003). Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene*, **22**, 7414-7430.
- KAYAGAKI, N., KAWASAKI, A., EBATA, T., OHMOTO, H., IKEDA, S., INOUE, S., YOSHINO, K., OKUMURA, K., AND YAGITA, H. (1995). Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J. Exp. Med.*, **182**, 1777-1783.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H., AND CURRIE, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257.
- KIM, K. J., LI, B., WINER, J., ARMANINI, M., GILLET, N., PHILIPPS, H. S., AND FERRARA, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature*, **362**, 841-844.
- KINZLER, K. W., AND VOGELSTEIN, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, **87**, 159-170.
- KORSMEYER, S. J., (1992). Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annu. Rev. Immunol.*, **10**, 785-807.
- KRAMMER, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, **407**, 789-795.
- KREUZ, S. (2000). NF κ B-inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide sensitive inhibitor of death receptor signaling. Diplomarbeit, Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart.
- KREUZ, S., SIEGMUND, D., SCHEURICH, P., AND WAJANT, H. (2001). NF κ B inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 3964-3973.

- KREUZ, S., SIEGMUND, D., RUMPF, J.-J., SAMEL, D., LEVERKUS, M., JANSSEN, O., HACKER, G., DITTRICH-BREIHZOLZ, O., KRACHT, M., SCHEURICH, P., AND WAJANT, H. (2004). NF κ B activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8 and RIP and is inhibited by FLIP. *J. Cell. Biol.*, **166**, 369-380.
- KUWANA, T., MACKEY, M. R., PERKINS, G., ELLISMAN, M. H., LATTERICH, M., SCHNEITER, R., GREEN, D. R., AND NEWMAYER, D. D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, **111**, 331-342.
- LAU, H. T., YU, M., FONTANA, A., AND STOECKERT, C. J. J. (1996). Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing FasL in mice. *Science*, **273**, 109-112.
- LIEPINSH, E., ILG, L. L., OTTING, G., AND IBANEZ, C. F. (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J.*, **16**, 4999-5005.
- LIN, E. Y., NGUYEN, A. V., RUSSELL, R. G., AND POLLARD, J. W. (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J. Exp. Med.*, **193**, 727-740.
- LISTON, P., FONG, W. G., AND KORNELUK, R. G. (2003). The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl-2. *Oncogene*, **22**, 8568-8580.
- LOCKSLEY, R. M., KILLEEN, N., AND LENARDO, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, **104**, 487-501.
- LUKASHEV, M. E. AND WERB, Z. (1998). ECM signaling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.*, **8**, 437-441.
- MAEDA, H., AND AKAIKE, T. (1998). Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry*, **63**, 854-865.
- MARIANI, S. M., MATIBA, B., BAUMLER, C., AND KRAMMER, P. H. (1995). Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur. J. Immunol.*, **25**, 2303-2307.
- MARIANI, S. M., MATIBA, B., SPARNA, T., AND KRAMMER, P. H. (1996). Expression of biologically active mouse and human CD95/Apo-1/Fas ligand in the baculovirus system. *J. Immunol. Methods.*, **193**, 63-70.
- MARKOWITZ, S., WANG, J., MEYEROFF, L., PARSONS, R., SUN, L., LUTTERBAUGH, J., FAN, R., ZBOROWSKA, E., KINZLER, K., VOGELSTEIN, B. ET AL. (1995). Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, **268**, 1336-1338.
- MASSAGUE, J. (2000). How cells read TGF- β signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 169-178.
- MATHON, N. F., AND LLOYD, A. C. (2001). Cell senescence and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **1**, 203-213.

- MEDEMA, R. H., AND BOS, J. L. (1993). The role of p21-ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit. Rev. Oncog.*, **4**, 615-661.
- MERSMANN, M. (2000). Humanisierung eines murinen Antikörpers gegen das Tumorstroma-spezifische Fibroblast Activation Protein mittels Phage Display. Dissertation, Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart, Verlag Grauer, Beuren, Stuttgart, 2000.
- MICHEAU, O., LENS, S., GAIDE, O., ALEVIZOPOULOS, K., AND TSCHOPP, J. (2001). NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 5299-5305.
- MICHEAU, O., AND TSCHOPP, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, **114**, 181-190.
- MUELLER, S. C., GHERSI, G., AKIYAMA, S. K., AMY SANG, Q.-X., HOWARD, L., PINEIRO-SANCHEZ, M., NAKAHARA, H., YEH, Y., AND CHEN, W.-T. (1999). A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. *J. Biol. Chem.*, **274**, 24947-24952.
- MÜLLER SZERAWS, D. L. (2002). Herstellung und Anwendung rekombinanter Antikörperderivate gegen das Fibroblast Activation Protein. Dissertation, Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart, Verlag Grauer, Beuren, Stuttgart, 2002.
- NAGATA, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell. Res.*, **256**, 12-18.
- NIEDERMEYER, J., ENENKEL, B., PARK, J. E., LENTER, M. C., RETTIG, W. J., DAMM, K., AND SCHNAPP, A. (1998). Mouse fibroblast activation protein: Conserved Fap gene organization and biochemical function as a serine protease. *Eur. J. Biochem.*, **254**, 650-654.
- NIEDERMEYER, J., KRIZ, M., HILBERG, F., GARIN-CHESA, P., BAMBERGER, U., LENTER, M. C., PARK, J., VIERTTEL, B., PÜSCHNER, H., MAUZ, M., RETTIG, W. J., AND SCHNAPP, A. (2000). Targeted disruption of mouse fibroblast activation protein. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 1089-1094.
- NOWELL, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, **194**, 23-28.
- O'CONNELL, J., HOUSTON, A., BENNETT, M. W., O'SULLIVAN, G. C., AND SHANAHAN, F. (2001). Immune privilege or inflammation? Insights into the Fas ligand enigma. *Nature Med.*, **7**, 271-274.
- OGASAWARA, J., WATANABE-FUKUNAGA, R., ADACHI, M., MATSUZAWA, A., KASUGAI, T., KITAMURA, Y., ITOH, N., SUDA, T., AND NAGATA, S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*, **364**, 806-809.
- ONO, M., TORISU, H., FUKUSHI, J., NISHIE, A., AND KUWANO, M. (1999). Biological implications of macrophage infiltration in human tumor angiogenesis. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **43**, S69-71.

- PAHL, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF κ B transcription factors. *Oncogene*, **18**, 6853-6866.
- PAN, G., O'ROURKE, K., CHINNAIYAN, A. M., GENTZ, R., EBNER, R., NI, J., AND DIXIT, V. M. (1997). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, **276**, 111-113.
- PAN, G., BAUER, H. J., HARIDAS, V., WANG, S., LIU, D., YU, G., VINCENZ, C., AGGARWAL, B. B., NI, J., AND DIXIT, V. M. (1998). Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain containing TNF receptor. *FEBS Lett.*, **431**, 351-356.
- PARK, J. E., LENTER, M. C., ZIMMERMANN, R. N., GARIN-CHESA, P., OLD, L. J., AND RETTIG, W. J. (1999). Fibroblast activation protein, a dual specificity serin protease expressed in human tumor stromal fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **274**, 36505-36512.
- PETER, M. E., AND KRAMMER P. H. (2003). The CD95(Apo-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Diff.*, **10**, 26-35.
- PROOST, P., DE MEESTER, I., SCHOLS, D., STRUYF, S., LAMBEIR, A. M., WUYTS, A., OPDENAKKER, G., DE CLERCQ, E., SCHARPE, S., AND VAN DAMME, J. (1998). Amino-terminal truncation of chemokines by CD26/dipeptidyl-peptidase IV. Conversion of RANTES into a potent inhibitor of monocyte chemotaxis and HIV-1-infection. *J. Biol. Chem.*, **273**, 7222-7227.
- PRUITT, K., AND DER, C. J. (2001). Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett.*, **171**, 1-10.
- QIN, Z., KIM, H. J., HEMME, J., AND BLANKENSTEIN, T. (2002). Inhibition of methylcholanthrene-induced carcinogenesis by an interferon γ receptor-dependent foreign body reaction. *J. Exp. Med.*, **195**, 1479-1490.
- RENSING-EHL, A., FREI, K., FLURY, R., MATIBA, B., MARIANI, S. M., WELLER, M., AEBISCHER, P., KRAMMER, P. H., AND FONTANA, A. (1995). Local Fas/APO-1 (CD95) ligand-mediated tumor cell killing in vivo. *Eur. J. Immunol.*, **25**, 2253-2258.
- RESTIFO, N. P. (2000). Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nature Med.*, **6**, 493-495.
- RETTIG, W. J., CHESA, P. G., BERESFORD, H. R., FEICKERT, H. J., JENNINGS, M. T., COHEN, J., OETTGEN, H. F., AND OLD, L. J. (1986). Differential expression of cell surface antigens and glial fibrillary acidic protein in human astrocytoma subsets. *Cancer Res.*, **46**, 6406-6412.
- RETTIG, W. J., SU, S. L., FORTUNATO, S. R., SCANLAN, M. J., RAJ, B. K., GARIN-CHESA, P., HEALEY, J. H., AND OLD, L. J. (1994). Fibroblast activation protein: purification, epitope mapping and induction by growth factors. *Int. J. Cancer*, **58**, 385-392.

- RIPPMANN, J. F. (1999). Bakterielle Produktion und Charakterisierung von tumorspezifischen Antikörperderivaten. Einkettige Antikörper und ihre Fusionsproteine mit einem Gerinnungsaktivator. Dissertation, Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart, Verlag Grauer, Beuren, Stuttgart, 1999.
- SAELENS, X., FESTJENS, N., VANDE WALLE, L., VAN GURP, M., VAN LOO, G., AND VANDENABEELE, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, **23**, 2861-2874.
- SALVESEN, G. S., AND DIXIT, V. M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10964-10967.
- SCANLAN, M. J., MOHAN RAJ, B. K., CALVO, B., GARIN-CHESA, P., PILAR SANZ-MONCASI, M., HEALEY, J. H., OLD, L. J., AND RETTIG, W. J. (1994). Molecular cloning of fibroblast activation protein α , a member of the serin protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5657-5661.
- SCHALL, T. J., LEWIS, M., KOLLER, K. J., LEE, A., RICE, G. C., WONG, G. H., GETANAGA, T., GRANGER, G. A., LENTZ, R., AND RAAB, H. (1990). Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell*, **61**, 361-370.
- SCHMIDT, A. (2000). Humane Antikörperderivate gegen das Tumorstroma-Antigen Fibroblast Activation Protein. Dissertation, Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart, Verlag Grauer, Beuren, Stuttgart, 2000.
- SCHNEIDER, P., HOLLER, H., BODMER, J.-L., HAHNE, M., FREI, K., FONTANA, A., AND TSCHOPP, J. (1998). Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J. Exp. Med.*, **187**, 1205-1213.
- SCHOPPMANN, S.F., BIRNER, P., STOCKL, J., KALT, R., ULLRICH, R., CAUCIG, C., KRIEHLER, E., NAGY, K., ALITALO, K., AND KERJASCHKI, D. (2002). Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.*, **161**, 947-956.
- SEINO, K., KAYAGAKI, N., OKUMURA, K., AND YAGITA, H. (1997). Antitumor effect of locally produced CD95 ligand. *Nature Med.*, **3**, 165-170.
- SHARPE, A. H., AND FREEMAN, G. J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.*, **2**, 116-126.
- SHERR, C. J. (2001). The *INK4a/ARF* network in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 731-737.
- SHI, Y., AND MASSAGUE, J. (2003). Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, **113**, 685-700.

- SHIMIZU, M., FONTANA, A., TAKEDA, Y., YAGITA, H., YOSHIMOTO, T., AND MATSUZAWA, A. (1999). Induction of antitumor immunity with Fas/APO-1 ligand (CD95L)-transfected Neuroblastoma Neuro-2a cells. *J. Immunol.*, **162**, 7350-7357.
- SKOBE, M., AND FUSENIG, N. E. (1998). Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1050-1055.
- SPORN, M. B. (1996). The war on cancer. *Lancet*, **347**, 1377-1381.
- STENNICKE, H. R. AND SALVESEN, G. S. (1999). Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Diff.*, **6**, 1054-1059.
- STETLER-STEVENSON, W. G. (1999). Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J. Clin. Invest.*, **103**, 1237-1241.
- STRASSER, A., HARRIS, A. W., BATH, M. L., AND CORY, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between *myc* and *bcl-2*. *Nature*, **348**, 331-333.
- STREET, S. E., CRETNEY, E., AND SMYTH, M. J. (2001). Perforin and interferon- γ activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*, **97**, 192-197.
- TANAKA, M., SUDA T., TAKAHASHI T., AND NAGATA, S. (1995). Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J.*, **14**, 1129-1135.
- TIMMER, T., DE VRIES, E. G. E., AND DE JONG, S. (2002). Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? *J. Pathol.*, **196**, 125-134.
- TORISU, H., ONO, M., KIRYU, H., FURUE, M., OHMOTO, Y., NAKAYAMA, J., NISHIOKA, Y., SONE, S., AND KUWANO, M. (2000). Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF- α and IL-1 α . *Int. J. Cancer*, **85**, 182-188.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. AND GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76(9)**, 4350-4354.
- TRAUTH, B. C., KLAS, C., PETERS, A. M., MATZKU, S., MOLLER, P., FALK, W., DEBATIN, K. M., AND KRAMMER, P. H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, **245**, 301-305.
- TSUNG, K., DOLAN, J. P., TSUNG Y. L., AND NORTON, J. A. (2002). Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection. *Cancer Res.*, **62**, 5069-5075.
- VARNER, J. A., AND CHERESH, D. A. (1996). Integrins and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 724-730.

- VEIKKOLA, T., AND ALITALO, K. (1999). VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin. Cancer Biol.*, **9**, 211-220.
- VIGNERON, N., OOMS, A., MOREL, S., DEGIOVANNI, G., AND VAN DEN EYNDE, B. (2002). Identification of a new peptide recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Cancer Immunity*, **2**, 9-19.
- VOGELSTEIN, B., LANE, D., AND LEVINE, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- WAHL, L. M., AND KLEINMAN, H. K. (1998). Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, **90**, 1583-1584.
- WAJANT, H., HAAS, E., SCHWENZER, R., MÜHLENBECK, F., KREUZ, S., SCHUBERT, G., GRELL, M., SMITH, C., AND SCHEURICH, P. (2000). Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J. Biol. Chem.*, **275**, 24357-24366.
- WAJANT, H., MOOSMAYER, D., WUEST, T., BARTKE, T., GERLACH, E., SCHÖNHERR, U., PETERS, N., SCHEURICH, P., AND PFIZENMAIER, K. (2001 A). Differential activation of TRAIL-R1 and -R2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene*, **20**, 4101-4106.
- WAJANT, H., HENKLER, F., AND SCHEURICH, P. (2001 B). The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cellular Signalling*, **13**, 389-400.
- WAJANT, H., PFIZENMAIER, K., AND SCHEURICH, P. (2003 A). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Diff.*, **10**, 45-65.
- WAJANT, H., PFIZENMAIER, K., AND SCHEURICH, P. (2003 B). Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine & Growth Factor Rev.*, **14**, 53-66.
- WALCZAK, H., DEGLI-ESPOSTI, M. A., JOHNSON, R. S., SMOLAK, P. J., WAUGH, J. Y., BOIANI, N., TIMOUR, M. S., GERHART, M. J., SCHOOLEY, K. A., SMITH, C. A., GOODWIN, R. G., AND RAUCH, C. T. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.*, **16**, 5389-5397.
- WANG, S., AND EL-DEIRY, W. S. (2003). TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene*, **22**, 8628-8633.
- WRIGHT, W. E., PEREIRA-SMITH, O. M., AND SHAY, J. W. (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 3088-3092.
- YAMANISHI, Y., BOYLE, D. L., ROSENGREN, S., GREEN, D. R., ZVAIFLER, N. J., AND FIRESTEIN, G. S. (2002). Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 10025-10030.

YORDI, J. S., AND MUISE-HELMERICKS, R. C. (2000). Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene*, **19**, 6503-6513.

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

SAMEL, D., MÜLLER, D., GERSPACH, J., ASSOHOU-LUTY, C., SASS, G., TIEGS, G., PFIZENMAIER, K., AND WAJANT, H. (2003). Generation of a FasL-based proapoptotic fusion protein devoid of systemic toxicity due to cell-surface antigen-restricted activation. *J. Biol. Chem.*, **278**, 32077-32082.

Weitere Veröffentlichungen:

KREUZ, S., SIEGMUND, D., RUMPF, J.-J., SAMEL, D., LEVERKUS, M., JANSSEN, O., HACKER, G., DITTRICH-BREIHZOLZ, O., KRACHT, M., SCHEURICH, P., AND WAJANT, H. (2004). NF κ B activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8 and RIP and is inhibited by FLIP. *J. Cell. Biol.*, **166**, 369-380.

FOTIN-MLECZEK, M., HENKLER, F., HAUSSER, A., GLAUNER, H., SAMEL, D., GRANESS, A., SCHEURICH, P., MAURI, D., AND WAJANT, H. (2004). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1 regulates CD40-induced TRAF2-mediated NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.*, **279**, 677-685.

FOTIN-MLECZEK, M., HENKLER, F., SAMEL, D., REICHWEIN, M., HAUSSER, A., PARMRYD, I., SCHEURICH, P., SCHMID, J. A., AND WAJANT, H. (2002). Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2 induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J. Cell Sci.*, **115**, 2757-70.

Hiermit versichere ich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Stuttgart, den 08.11.2004

Dierk Samel

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Bei Prof. Dr. Harald Wajant für die Bereitstellung des Promotionsthemas, für seine kompetente Betreuung und die engagierte Unterstützung meiner Arbeit.

Bei Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier und Prof. Dr. Peter Scheurich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Doktorarbeit an ihrem Institut.

Bei Dr. Dafne Müller Szeraws, die mir eine große Hilfe bei der Einarbeitung in die Thematik der „single chain“-Antikörper war, und bei Dr. Jeannette Gerspach für die praktische Einweisung in das Arbeiten mit Labormäusen und ihre tatkräftige Unterstützung bei den Tierexperimenten.

Bei allen anderen Kollegen des IZI für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Bei Heike, Iris und Sebastian, die mir mit ihrer guten Laune den Alltag im Labor verkürzt haben und bei denen ich auch in fachlichen Fragestellungen zuverlässige Ansprechpartner hatte.

Bei meiner Freundin Miriam, die stets Rücksicht auf meine Arbeit genommen hat, und bei meinen Eltern für ihre Liebe und uneingeschränkte Unterstützung.

Vielen Dank!

