

Neue TRAIL-Varianten für die zielgerichtete Tumorthherapie

Von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung.

Vorgelegt von
Britta Schneider
aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier
Mitberichter: Prof. Dr. Harald Wajant
Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2008

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Tumorentstehung	3
2.2 Tumorthherapie	4
2.2.1 Apoptose	4
2.2.2 Apoptose in der Tumorthherapie	6
2.2.3 TRAIL	8
2.2.4 TRAIL in der Tumorthherapie	9
2.2.5 Zielgerichtete Therapie	11
2.2.5.1 Zielantigene	13
2.3 Zielsetzung	16
3. Material und Methoden	18
3.1 Material	18
3.1.1 Chemikalien	18
3.1.2 Kits	19
3.1.3 Puffer und Lösungen	19
3.1.3.1 Puffer für Agarosegele	19
3.1.3.2 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE und die Western Blot Analyse	19
3.1.3.3 Puffer und Lösungen für die Zellkultur und Zytotoxizitätstests	20
3.1.3.4 Puffer für die FACS-Analyse	20
3.1.3.5 Puffer und Lösungen für die M2-Affinitätschromatographie	20
3.1.3.5 Puffer für die Zellyse	21
3.1.4 Zellkultur-Medien	21
3.1.5 Zellkultur-Zusätze	21
3.1.6 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur	21
3.1.7 DNA- und Proteinmarker	22
3.1.8 Enzyme	22
3.1.9 Antikörper	22
3.1.10 Oligonukleotide	23
3.1.11 Prokaryontische Zellen	23
3.1.12 Eukaryontische Zelllinien	24
3.1.13 Versuchstiere	24
3.2 Molekularbiologische Methoden zur Klonierung der TRAIL-Fusionsproteine	24
3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion	24
3.2.2 Restriktionsenzym-Verdau	24
3.2.3 Dephosphorylierung von DNA	25
3.2.4 Auffüllen von DNA	25
3.2.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	25
3.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten	26
3.2.7 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> XL-1 Blue Zellen ..	26
3.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	26
3.2.9 Klonierungsstrategien	26
3.2.9.1 pRESpuro3-leader-Flag-TRAIL	27
3.2.9.2 pRESpuro3-leader-Flag-scTRAIL	27
3.2.9.3 pRESpuro3-leader-scFV _{erbB2} -Flag-TRAIL	27

3.2.9.4	pRESpuro3-leader-scFv _{erbB2} -Flag-scTRAIL.....	28
3.2.9.5	pRESpuro3-leader-scFv36-Flag-TRAIL.....	28
3.2.9.6	pRESpuro3-leader-scFv36-Flag-scTRAIL	28
3.3	Zellbiologische Methoden	29
3.3.1	Kultivierung eukaryontischer Zelllinien	29
3.3.2	Expression der TRAIL-Fusionsproteine in eukaryontischen Zelllinien	29
3.3.2.1	Transiente Proteinexpression.....	29
3.3.2.2	Proteinexpression mit stabil transfizierten Produktions-Zelllinien ..	29
3.3.3	Zytotoxizitäts-Tests.....	30
3.3.3.1	Kristallviolett-Test	30
3.3.3.2	MTT-Test.....	31
3.3.4	Durchflusszytometrie	31
3.4	Proteinbiochemische Methoden zur Charakterisierung der TRAIL-Fusionsproteine	32
3.4.1	Affinitätschromatographie.....	32
3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
3.4.3	Western Blot Analyse	33
3.4.4	Größenausschlusschromatographie.....	34
3.4.5	Deglykosylierung der Proteine.....	34
3.4.6	Immunopräzipitation	34
3.5	Tierexperimentelle Methoden	35
3.5.1	Pharmakokinetik.....	35
3.5.2	Tumormodell	35
3.5.2.1	Subkutane Zellinjektion in Nacktmäuse.....	36
3.5.2.2	Ankonzentrieren der Zellkulturüberstände.....	36
3.5.2.3	Therapie	36
3.5.2.4	Monitoring des Tumorwachstums.....	37
4.	Ergebnisse	38
4.1	Vergleichende Charakterisierung von Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL	38
4.1.1	Expression in HEK293-Zellen.....	39
4.1.2	M2-Affinitätschromatographie der Flag-TRAIL-Moleküle.....	40
4.1.3	<i>in vitro</i> Bioaktivität.....	41
	a) Jurkat-Zellen.....	41
	b) HT1080-Zellen.....	42
	c) Colo205-Zellen	44
4.1.4	<i>in vitro</i> Serumstabilität	45
4.1.5	Pharmakokinetische Untersuchungen zur Ermittlung der Serumhalbwertszeit.....	48
4.2	Vergleichende Charakterisierung von Tumorantigen spezifischen scFv-Flag-TRAIL und scFv-Flag-scTRAIL-Fusionsproteinen	49
4.2.1	TRAIL-Fusionsproteine mit Spezifität für ErbB2	50
4.2.1.1	Expression in HEK293-Zellen.....	50
4.2.1.2	M2-Affinitätschromatographie der scFv _{erbB2} -Flag-TRAIL-Moleküle	51
4.2.1.3	Größenausschlusschromatographie.....	53
4.2.1.4	Glykosylierung von scFv _{erbB2} -F-TRAIL.....	54
4.2.1.5	Bindung auf Antigen-positiven Zellen	55
4.2.1.6	<i>in vitro</i> Bioaktivität.....	56
	a) Jurkat-Zellen.....	56

b) Antigen-abhängige Bioaktivität auf HT1080- und Colo205-Zellen	57
4.2.1.7 ErbB2-Aktivierung.....	61
4.2.1.9 TRAIL-R2-abhängige Bioaktivität auf HT1080- und Colo205-Zellen	62
4.2.1.10 <i>in vitro</i> Serumstabilität	65
4.2.1.11 Pharmakokinetische Untersuchungen zur Ermittlung der Serumhalbwertszeit.....	66
4.2.1.12 Antitumorale Aktivität <i>in vivo</i>	67
4.2.2 TRAIL-Fusionsproteine mit Spezifität für FAP	69
4.2.2.1 Expression in HEK293-Zellen.....	70
4.2.2.2 <i>in vitro</i> Bioaktivität.....	71
a) Jurkat-Zellen.....	71
b) Antigen-abhängige Bioaktivität auf HT1080-und HT1080-FAP-Zellen.....	72
4.2.2.2 TRAIL-R2-abhängige Bioaktivität	73
5. Diskussion.....	76
5.1 Charakterisierung der TRAIL-Varianten	77
5.1.1 <i>in vitro</i> Bioaktivität.....	77
5.1.2 Stabilität.....	82
5.1.3 Antitumorale Aktivität <i>in vivo</i>	84
5.2 Ausblick	85
6. Summary	88
7. Literaturverzeichnis.....	91

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat-p-toluidinsalz
Caspase	Cysteinyl-Aspartat-spezifische Protease
CHX	Cyclohexamid
CIAP	<i>Calf Intestine Alcalic Phosphatase</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DR	<i>death receptor</i>
EC ₅₀	<i>Half-maximal-effective Concentration</i>
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N-N-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	<i>et alii</i>
F	<i>Flag-Tag</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FAP	<i>Fibroblast Activation Protein</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLIP	<i>FLICE Inhibitory Protein</i>
<i>g</i>	Gravitationskonstante
h	<i>hora</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
l	Liter

M	Molar
mAK	Monoklonaler Antikörper
min	Minute(n)
ml	Milliliter
μ	Mikro-
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NBT	4-Nitrotetrazoliumblausäurechlorid
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RT	Raumtemperatur
sc	<i>single-chain</i>
scFv	<i>single-chain fragment variable</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNF-R	TNF-Rezeptor
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumenprozent, ml/100 ml Lösung)
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewichtsprozent, g/100 ml Lösung)

1. Zusammenfassung

Die zielgerichtete Apoptoseinduktion in Tumorzellen durch proapoptotische Liganden der TNF-Familie wie TNF, CD95L und TRAIL stellt einen wichtigen, neuen Ansatz in der Tumorthherapie dar. Da TRAIL wirksame Aktivität gegenüber Tumorzellen und nur minimale Effekte gegenüber nicht transformierten, normalen Zellen aufzeigt und die systemische Applikation gut verträglich ist, eignet sich dieser Ligand besonders für die Entwicklung eines neuen Behandlungskonzepts. Allerdings zeigen bestimmte rekombinant hergestellte TRAIL-Varianten neben ihrer antitumoralen Wirkung auch Wirkung auf Normalgewebe, z.B. hepatotoxische Aktivität, was mit dem Potential zur Bildung höhermolekularer TRAIL-Aggregate in Zusammenhang steht. Löslicher TRAIL in seiner trimeren Form weist dagegen tumorselektive Eigenschaften auf, ist aber auch durch eine relativ geringe zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen gekennzeichnet, da er nur über den TRAIL-R1 Apoptose induziert. TRAIL-R2 hingegen wird durch membrangebundenen TRAIL oder durch löslichen TRAIL, der durch Antikörper auf der Zellmembran sekundär quervernetzt wurde, aktiviert. Bedeutend ist, dass TRAIL-R2 bei vielen Tumoren der dominant exprimierte TRAIL Todesrezeptor zu sein scheint. Erste Daten klinischer Studien mit TRAIL sind zwar sehr vielversprechend, weisen aber auch darauf hin, dass eine weitere klinische Entwicklung möglicherweise in der Kombination mit anderen antitumoralen Behandlungskonzepten liegt. Da viele Tumoren TRAIL resistent sind, ist in diesem Zusammenhang eine Sensitivierung – durch beispielsweise Chemotherapeutika - gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose unumgänglich, die wiederum auch nicht-transformierte Zellen gegenüber einer TRAIL-Wirkung sensitivieren kann. Dies zeigt auf, dass eine Optimierung der TRAIL Reagenzien hinsichtlich einer Verbesserung der spezifischen, zielgerichteten Aktivität sehr wichtig ist.

Um die selektiven, antitumoralen Eigenschaften von TRAIL zu verbessern, wurden in dieser Arbeit - durch die gentechnische Fusion mit Tumor-spezifischen scFvs - TRAIL-Fusionsproteine mit Spezifität für ErbB2 und FAP generiert.

Des Weiteren wurde eine innovative Formatvariante des TRAIL, das so genannte (*single-chain*) scTRAIL hergestellt und charakterisiert. Der Vergleich des einzelkettigen scTRAIL zu konventionellem, homotrimerem TRAIL zeigte keine Unterschiede in der Bioaktivität und in der Stabilität (*in vitro* und *in vivo*) auf.

Die Charakterisierung der Antigen-spezifischen Fusionsproteine scFv_{ErbB2}-TRAIL und scFv_{ErbB2}-F-scTRAIL zeigte, dass diese neuen Fusionsproteine *in vitro* und in ersten

präklinischen Anwendungen die Anforderungen an ein zielgerichtetes Tumorthapeutikum erfüllten. Beide Proteine zeigten spezifische Bindung auf ErbB2-positiven Karzinomzelllinien (Colo205-Zellen) und zeigten *in vitro* eine erhöhte, Antigen-abhängige Bioaktivität, wobei sich das einzelkettige scFv_{erbB2}-scTRAIL-Molekül durch die höchste Aktivität auszeichnete. Es konnte ebenfalls *in vitro* gezeigt werden, dass über die ErbB2-spezifische Bindung an die Zielzellmembran das TRAIL-Fusionsprotein Membran-TRAIL Bioaktivität nachahmt, was über eine effiziente Aktivierung des TRAIL-R2 nachgewiesen werden konnte. Dieses Konzept der zielgerichteten Apoptoseinduktion konnte durch die *in vitro* Charakterisierung weiterer TRAIL-Fusionsproteine mit Spezifität für FAP unterlegt werden.

Im *in vivo* Xenotransplantationsmodell (humanes Kolonkarzinom205 in NMRI nu/nu Mäusen) wurden schließlich die verbesserten antitumoralen Eigenschaften der hier in der Arbeit entwickelten ErbB2-spezifischen TRAIL-Varianten unter Beweis gestellt. Auch in diesen *in vivo* Experimenten zeichnete sich das einzelkettige, ErbB2-spezifische TRAIL-Molekül durch die höchste Aktivität aus.

Zusammenfassend belegen diese „*proof of concept*“-Studien *in vitro* und *in vivo* die sehr gute antitumorale TRAIL-Aktivität, wobei die Apoptose-Induktion durch die Tumorantigen-spezifischen TRAIL-Varianten noch verstärkt werden konnte. Dementsprechend repräsentiert dieses Design-Konzept eine sehr vielversprechende Strategie zur Verbesserung der antitumoralen TRAIL-Wirkung bei gleichzeitiger Minimierung von potentiellen Nebenwirkungen gegenüber nicht-transformierten Zellen.

2. Einleitung

Weltweit erkranken jährlich 10 Millionen Menschen an Krebs. Einer Einschätzung der Verfasser des *World Cancer Reports*¹ 2003 nach, soll diese Zahl in den nächsten Jahren auf 15 Millionen Erkrankungen ansteigen. Allein in Deutschland haben wir nach Angaben des Deutschen Krebsforschungszentrums jährlich 340 000 Personen, die neu an Krebs erkranken und mehr als 210 000, die daran versterben.

Die bösartigen Neubildungen sind auch weiterhin, nach den Krankheiten des Kreislaufsystems, die zweithäufigste Todesursache für beide Geschlechter in Deutschland. Zurzeit stirbt ungefähr jeder Dritte an einer Krankheit des Kreislaufsystems und jeder Vierte an einer Tumorerkrankung. Da die Sterblichkeit an Krankheiten des Kreislaufsystems erheblich abgenommen hat, muss damit gerechnet werden, dass in etwa 15 – 20 Jahren Krebs zur häufigsten Todesursache in Deutschland wird².

2.1 Tumorentstehung

Die Tumorentstehung ist ein mehrstufiger Prozess, der von einer Vielzahl unterschiedlicher Schritte abhängig ist. Grundlage für die Entstehung von Tumoren bilden genetische Veränderungen in einer Zelle, die schließlich zur malignen Entartung und zum unkontrollierten Wachstum der betroffenen Zelle führen.

Die Zellen müssen intrinsische und extrinsische (immunologische) Barrieren für die Entstehung einer Tumorerkrankung überwinden. Hanahan und Weinberg beschrieben die sechs Zell-intrinsischen, die so genannten Zell-autonomen Kennzeichen der frühen Onkogenese. Danach stellen Krebszellen charakteristischerweise die eigenen Wachstumsfaktoren zur Verfügung, ignorieren Wachstums-inhibierende Signale und entgehen dem programmierten Zelltod. Des Weiteren zeigen Krebszellen ein unbegrenztes Replikationspotential, eine gesteigerte Expression und Freisetzung von proangiogenen Faktoren wie z.B. *vascular endothelial growth factor* (VEGF), welche eine anhaltende Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) fördern, und erlangen die Fähigkeit zur Gewebsinvasion und Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2000). Der Kontrollverlust der

¹ www.iarc.fr/WCR

² www.dkfz.de (Krebsatlas)

Krebszellen durch das Immunsystem, der so genannten *immunosurveillance*, stellt einen weiteren wichtigen Schritt in der Onkogenese dar (Dunn *et al.*, 2004a). Die transformierten Zellen entgehen dabei durch *immunoediting* (Selektion auf nicht-immunogene Krebszellvarianten) oder *immunosubversion* (aktive Unterdrückung der Immunantwort) der angeborenen und adaptiven Immunität (Dunn *et al.*, 2004b).

2.2 Tumorthherapie

Bis heute erfolgt die Behandlung primärer Tumoren überwiegend mit Kombinationen aus chirurgischer Tumorentfernung, Strahlentherapie und zytostatischer Chemotherapie. Dabei induziert die Behandlung mit Chemotherapie und Gamma-Strahlung in den Tumorzellen hauptsächlich Apoptose, die bekannteste und eindeutig definierte Form des programmierten Zelltods.

2.2.1 Apoptose

Die Apoptose ist ein regulierter Prozess zur Entfernung unerwünschter Zellen, der für die Embryonalentwicklung, die Funktionen des Immunsystems und die Erhaltung der Gewebshomöostase in multizellulären Organismen essenziell ist (Kerr *et al.*, 1972; Ellis *et al.*, 1991; Jacobson *et al.*, 1997). Es ist ein *multi-step, multi-pathway* Zelltodprogramm einer jeden Körperzelle, das zum kontrollierten Selbstmord führt.

Dabei gibt es zwei initiiierende Signalwege. Der so genannte ‚extrinsische Weg‘, vermittelt durch spezifische Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche und der so genannte ‚intrinsische Weg‘, vermittelt durch das Mitochondrium und ausgelöst durch den Verlust von Wachstumsfaktoren in embryonalen Geweben oder durch zellulären Stress wie DNA-Schäden (Krammer *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2000). Grundlage beider Signalwege ist die Aktivierung Aspartat-spezifischer Cystein-Proteasen, so genannter Caspasen, die zelluläre Substrate spalten. Dies resultiert in den biochemischen und morphologischen Veränderungen wie z.B. der Fragmentierung des Zellkerns und des Cytosols unter der Bildung apoptotischer Körperchen, die charakteristisch für die Apoptose sind.

Die Todesrezeptoren sind Mitglieder der Tumornekrosefaktor(TNF)-Rezeptor-Superfamilie. Dabei handelt es sich um Typ I Transmembranproteine, die durch eine

variierende Anzahl an cysteinreichen Subdomänen im extrazellulären Bereich (Smith *et al.*, 1994) und ein intrazelluläres 60 AS umfassendes Sequenzmotiv, das als Todesdomäne (*death domain/DD*) bezeichnet wird, gekennzeichnet sind. Diese charakteristische Todesdomäne, die essentiell für die Vermittlung der Apoptose ist, wurde bei CD95 bzw. Fas identifiziert (Itoh und Nagata, 1993). So genannte *Decoy* Rezeptoren sind eng verwandt mit den Todesrezeptoren, haben aber keine funktionelle Todesdomäne (Pitty *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1999). Durch Konkurrenz mit dem entsprechenden Liganden bzw. durch Heterodimerisierung mit dem relevanten Todesrezeptor können sie die Aktivität des Todesrezeptors negativ beeinflussen (Sheridan *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1997b; Clancy *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005). Todesrezeptoren werden durch ihre natürlichen Liganden, die TNF-Familie, aktiviert. Dies resultiert in der Homotrimerisierung der Rezeptoren. Dabei reicht die Homotrimerisierung zumindest bei löslichen Liganden nicht unbedingt für die Aktivierung aus - wie z.B. für CD95 beschrieben (Holler *et al.*, 2003) -, sondern erfordert eine sekundäre Multimerisierung der Ligand-Rezeptor-Komplexe.

Die Todesrezeptoren werden in zwei Gruppen unterteilt. Für die erste Gruppe, zu der CD95, TRAIL-R1 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand-R1*) und TRAIL-R2 gehören, gilt: Wenn die Liganden ihren jeweiligen Todesrezeptor binden und aktivieren, interagieren die Todesdomänen mit dem Adaptor-Protein FADD (*Fas-associated death domain protein*, auch bekannt als MORT1), welches seinerseits die inaktiven Pro-Formen bestimmter Mitglieder der Caspase-Protease-Familie rekrutiert. Caspasen, welche zu diesem *death-inducing signaling complex* (DISC) rekrutiert wurden – Caspase-8 und Caspase-10 – fungieren als ‚Initiator‘ Caspasen. Am DISC werden Pro-Caspase-8 und Pro-Caspase-10 gespalten und werden dadurch aktive ‚Initiator‘ Caspasen (Sprick *et al.*, 2000; Kischkel *et al.*, 1995; 2001). Zur zweiten Gruppe der Todesrezeptoren gehört TNF-R1, dessen Aktivierung in der Ausbildung zweier Komplexe resultiert und zusätzlich zur Apoptose (Komplex II) die Aktivierung von NF- κ B einleitet (Komplex I) (Micheau und Tschopp, 2003).

In einigen Zellen – so genannten Typ I Zellen – ist aktive Caspase-8 ausreichend, um die Apoptose direkt zu initiieren. In Typ II Zellen dagegen ist die Menge zu gering und die Mitochondrien dienen als ‚Verstärker‘ des apoptotischen Signals (Scaffidi *et al.*, 1998). Die Aktivierung der Mitochondrien wird durch das proapoptotische BCL2 Familienmitglied BID vermittelt. BID wird durch aktive Caspase-8 prozessiert und geht als *truncated* BID (tBID) zum Mitochondrium. Dort löst es die Permeabilisation

der äußeren mitochondrialen Membran aus. Dies resultiert in der Freisetzung von Cytochrom c (Green und Reed, 1998) und Smac (*second mitochondria-derived activator of caspases*) / DIABLO (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000) aus dem Intermembranraum der Mitochondrien. Im Cytosol bildet Cytochrom c einen Komplex mit APAF1 (*apoptotic protease activating factor-1*), dATP und der inaktiven ‚Initiator‘ Caspase Pro-Caspase-9. In diesem Komplex, dem so genannten Apoptosom, wird Caspase-9 aktiviert (Li *et al.*, 1997). Wenn die ‚Initiator‘ Caspasen aktiviert sind, prozessieren sie Effektor-Caspasen, hauptsächlich Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7. Durch die gegenseitige Spaltung der Effektor-Caspasen wird eine proteolytische Kaskade eingeleitet, die letztendlich zum Absterben der Zelle führt. Smac/ DIABLO binden *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs) wie XIAP, c-IAP1, c-IAP2 und Survivin und unterbinden so die inhibitorischen Interaktionen mit Caspasen.

2.2.2 Apoptose in der Tumorthherapie

Zytostatika sind unterteilt in DNA-schädigende Wirkstoffe, Antimetabolite, Mitosehemmer, Nukleotid-Analoga und Topoisomerasehemmer. Die Tumorbehandlung mit diesen Wirkstoffen oder mit Gamma-Strahlung induziert Zellstress, der zur Apoptose der Tumorzellen führt. Ein Schlüsselprotein in der Stress-induzierten Apoptose ist der Tumorsuppressor p53 (Levine, 1997).

Dabei ist die Eigenschaft als Transkriptionsfaktor wichtig für die pro-apoptotische Aktivität. p53 kann die Expression von Proteinen, die in den mitochondrialen Apoptoseweg involviert sind - BAX, NOXA, PUMA und p53AIP1 (Miyashita und Reed, 1995; Oda E. *et al.*, 2000; Nakano und Vousden 2001; Oda K. *et al.*, 2000) – und in den Todesrezeptor Signalweg wie CD95, TRAIL-R1 und TRAIL-R2, induzieren (Muller *et al.*, 1998; Guan *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 1997).

In vielen Krebszellen ist die Apoptose dereguliert. Dies hat gemeinsam mit anderen Faktoren ein unkontrolliertes Zellwachstum zur Folge und ist oft kausal mit Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika verbunden. Dabei gehört die Inaktivierung von p53 zu den häufigsten Mutationen. Sie tritt bei vielen Tumorentitäten in über der Hälfte der Erkrankungen auf und zählt somit zu den Schlüsselresistenzmechanismen, die Tumorzellen helfen, die Apoptose zu umgehen (Harris und Hollstein, 1993).

Da der extrinsische Signalweg unabhängig von p53 Apoptose auslöst - p53 reguliert hauptsächlich Gene, die in den mitochondrialen Apoptoseweg eingreifen - haben Strategien, die diesen Mechanismus aktivieren, ein großes Potential in der Tumorthherapie. Therapeutische Zielstrukturen dafür sind die Todesrezeptoren und Caspase-Inhibitoren. Dabei ist in jüngster Zeit die therapeutische Modulation von IAPs in den Fokus präklinischer Studien gerückt, da IAP-Genamplifikationen und Proteinüberexpressionen in vielen Tumoren beobachtet wurden (Vucic und Fairbrother, 2007). Für *small-molecule* IAP-Antagonisten - *smac mimetics* - wurden aktuell sehr viel versprechende Daten auch bezüglich ihres Einsatzes als Monotherapeutikum veröffentlicht (Petersen *et al.*, 2007; Varfolomeev *et al.*, 2007; Vince *et al.*, 2007). Die Aktivierung der Todesrezeptoren kann entweder durch deren natürliche Liganden bzw. Derivate davon oder agonistische Rezeptor-spezifische Antikörper erfolgen.

Die Stimulation des TNF-R1 durch TNF führt häufig über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zur Induktion proinflammatorischer Gene. Über seine Todesdomäne kann der TNF-R1 nach entsprechender Stimulation aber auch Apoptose vermitteln. Das therapeutische Potential des TNF wird durch seine signifikante Wirkung bei der Behandlung von Weichteilsarkomen und Melanomen der Extremitäten durch die isolierte Extremitäten-Perfusion (ILP/*isolated limb perfusion*) deutlich. Für diese speziellen Indikationen ist er ein zugelassenes Medikament (Lejeune *et al.*, 2006). Seine Wirkung zeigt er hier offenbar vorrangig durch Effekte auf die Endothelzellen der Tumervaskulatur (Grünhagen *et al.*, 2006). Tiermodelle zeigen neuerdings, dass zu einer anhaltenden und vollständigen Tumorregression auf TNF-Behandlung ein intaktes Immunsystem (T-Zell Antwort) erforderlich ist (Balza *et al.*, 2006). Aufgrund seines pleiotropen Wirkspektrums ist die systemische Gabe des TNF in therapeutisch wirksamen Dosen beim Mensch allerdings nicht möglich, da es hier zu schweren lebensbedrohlichen Nebenwirkungen kommt. Daher werden zahlreiche Ansätze mit dem Ziel der tumorgerichteten Wirkung durch die Entwicklung von TNF-Fusionsproteinen verfolgt (z.B. Xiang *et al.*, 1997; Wüest *et al.*, 2002; Borsi *et al.*, 2003), deren Nutzen in präklinischen bzw. klinischen Studien erst noch gezeigt werden muss.

Der proapoptotische Ligand CD95L zeigt als Multimer eine starke Zytotoxizität gegen eine Vielzahl von Tumorzelltypen, jedoch verhindern die starken hepatotoxischen Nebenwirkungen bislang den Einsatz als systemisch appliziertes

Tumorthérapeutikum (Ogasawara *et al.*, 1993). Es konnte aber gezeigt werden, dass ein lösliches, hexameres Molekül (MegaFasL) relativ niedrig dosiert das Wachstum von xenotransplantierten Ovarialkarzinomen nach lokaler Behandlung hemmen konnte. Es wurde eine reversible Lebertoxizität, aber keine schweren regionalen oder systemischen Nebenwirkungen beobachtet (Etter *et al.*, 2007).

Erste präklinische Studien zeigen allerdings, dass es möglich ist, gentechnisch veränderte Varianten des CD95L herzustellen, die selektive antitumorale Aktivität ohne offensichtliche systemische Nebenwirkungen aufweisen (s. unten).

Die Stimulation von TRAIL-R1 (DR4) und TRAIL-R2 (DR5) durch rekombinantes lösliches TRAIL oder antagonistische TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 Antikörper stellt einen weiteren therapeutischen Ansatz dar, der zurzeit klinisch geprüft wird. TRAIL zeigt *in vitro* wirksame Aktivität gegen Tumorzellen und nur minimale Effekte gegenüber nicht transformierten, normalen Zellen (Ashkenazy *et al.*, 1999; Lawrence *et al.*, 2001; Ganten *et al.*, 2006). Da TRAIL im Vergleich zu TNF und CD95L somit offenbar bereits intrinsische tumorselektive Eigenschaften aufweist, stellt die Aktivierung der TRAIL Todesrezeptoren ein sehr viel versprechendes Behandlungskonzept dar.

2.2.3 TRAIL

Apo2 Ligand (Apo2L) oder *tumor necrosis factor* (TNF)-*related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) wurde 1995 und 1996 von zwei unabhängigen Gruppen, auf Basis der Sequenzhomologie zu CD95L und TNF, identifiziert und kloniert (Pitty *et al.*, 1996; Wiley *et al.*, 1995). TRAIL besteht aus 281 AS und wird wie fast alle Liganden der TNF-Familie als Typ II Transmembranprotein - mit einer kurzen zytoplasmatischen N-terminalen Domäne und einer langen C-terminalen extrazellulären Rezeptorbindungsdomäne - exprimiert. Lösliches (*soluble*) sTRAIL entsteht durch die proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne von der Zelloberfläche (Mariani und Krammer, 1998). Kristallographische Studien zeigten, dass TRAIL - wie die meisten anderen TNF Familienmitglieder - eine homotrimere Struktur ausbildet, die drei Rezeptormoleküle bindet (Hymowitz *et al.*, 1999). Außerdem enthält TRAIL ein internes Zinkatom, das von den Cystein-Resten an Position 230 jeder Untereinheit gebunden wird und das für die Stabilität der Trimere und die biologische Aktivität sehr wichtig ist (Hymowitz *et al.*, 2000; Bodmer *et al.*, 2000).

TRAIL bindet spezifisch an zwei Todesdomänen-enthaltende, Apoptose-induzierende Rezeptoren TRAIL-R1 (DR4) und TRAIL-R2 (DR5), zwei ebenfalls membranständige Rezeptoren, die aber kein apoptotisches Signal vermitteln, TRAIL-R3 (DcR1) und TRAIL-R4 (DcR2) (auch *Decoy* Rezeptoren genannt) und einen löslichen Rezeptor, Osteoprotegerin genannt. Der erste TRAIL-Rezeptor, TRAIL-R1 wurde 1997 identifiziert (Pan *et al.*, 1997a). Noch im gleichen Jahr wurde ein weiterer Apoptose-induzierender Rezeptor für TRAIL beschrieben, TRAIL-R2 (Pan *et al.*, 1997b; Screaton *et al.*, 1997; Sheridan *et al.*, 1997; Walczak *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997). Beide Rezeptoren teilen eine Sequenzhomologie von 58 Prozent. Bis jetzt war es nicht möglich, eindeutig verschiedene Funktionen der beiden TRAIL-Todesrezeptoren aufzuzeigen.

Dabei kann die Bioaktivität des membranständigen und des davon abgeleiteten löslichen TRAIL variieren. So konnte gezeigt werden, dass der TRAIL-R1 durch beide Formen des Liganden, die lösliche und die membrangebundene Form, der TRAIL-R2 vor allem durch membrangebundenen TRAIL oder a priori aggregierte bzw. sekundär komplexierte, lösliche TRAIL-Moleküle aktiviert wird (Mühlenbeck *et al.*, 2000; Wajant *et al.*, 2001). Löslicher, rein homotrimerer TRAIL ist dagegen ein schlechter Agonist für TRAIL-R2. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für den TNF und CD95L beschrieben. Löslicher, trimerer TNF aktiviert bevorzugt den TNF-R1, membranständiger TNF dagegen beide TNF-Rezeptoren (Grell *et al.*, 1995; 1998). Gleichfalls zeigt löslicher CD95L trotz Bindung an CD95 keine oder nur sehr schwache Aktivität, während die membranständige Form des Liganden die Rezeptoraktivierung induziert (Schneider *et al.*, 1998). Für alle drei TNF-Liganden konnte gezeigt werden, dass ein artifizielles Quervernetzen der löslichen Liganden die biologischen Aktivitäten der jeweiligen membrangebundenen Formen imitiert (Schneider *et al.*, 1998; Wajant *et al.*, 2001).

2.2.4 TRAIL in der Tumorthherapie

Die o. g. Eigenschaften und erste Beweise, dass lösliches TRAIL *in vivo* Apoptose in Tumorzellen induziert (Ashkenazy *et al.*, 1999; Walczak *et al.*, 1999), rückten TRAIL in den Fokus vieler präklinischer Studien.

Diese belegen eine signifikante Wachstumshemmung und Zytotoxizität durch rekombinante humane TRAIL-Varianten (TRAIL, LZ-TRAIL und His-TRAIL) als

Monotherapeutikum in Mausmodellen gegen maligne Tumoren aus humanen Tumorzelllinien und Geweben wie beispielsweise Kolonkarzinom (Kelly *et al.*, 2001), Gliom (Pollack *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 1999) und Multiples Myelom (Mitsiades *et al.*, 2001). Ferner konnten – auch in Mausmodellen - synergistische Effekte bei Kombinationen von TRAIL mit konventionellen Tumorthérapien gezeigt werden. Dazu gehören beispielsweise die Kombinationsbehandlung des Kolonkarzinoms mit Chemotherapeutika wie 5-FU oder Irinotecan (Naka *et al.*, 2002; Gliniak *et al.*, 1999), des Prostatakarzinoms mit Paclitaxel, Vincristin, Vinblastin, Etoposide, Doxorubicin und Camptothecin (Shankar *et al.*, 2005), des Bronchialkarzinoms mit Carboplatin (Jin *et al.*, 2004) und Kombinationen von TRAIL mit Bestrahlung bei der Therapie von Mammakarzinom und Prostatakarzinom (Chinnaiyan *et al.*, 2000; Shankar *et al.*, 2004a; 2004b). Die Mechanismen, die diesen synergistischen Effekten zugrunde liegen, variieren zwischen den einzelnen Kombinationen, werden jedoch hauptsächlich der Caspase-Aktivierung beider Apoptose-Signalwege, dem extrinsischen als auch dem intrinsischen Weg (Mühlethaler-Mottet *et al.*, 2004) sowie der p53-abhängigen Hochregulation von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 zugeordnet. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass die Kombination aus TRAIL und Chemotherapie auch in p53 defizienten Zellen zu synergistischer, antitumoraler Aktivität führt (Ravi *et al.*, 2004).

Neben Kombinationen von TRAIL mit konventionellen Tumorthérapeutika wurden erfolgreich auch Kombinationen mit neuen Wirkstoffen *in vitro* getestet. Dazu gehören u. a. der Proteasomen Inhibitor Bortezomib (Brooks *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2005), der Bcl-2 Inhibitor BH3I-2' (Ray *et al.*, 2005), HDAC (Histon-Deacetylase) Inhibitoren (Nakata *et al.*, 2004) und IAP Antagonisten, bei denen die Wirksamkeit auch im Mausmodell bestätigt wurde (Fulda *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004).

Über diese präklinischen Studien hinaus liegen schon erste klinische Erfahrungen vor. So wurde 2006 in der FIH (*first-in-human*) Studie gezeigt, dass die intravenöse Gabe von rhApo2L/TRAIL (Amgen Inc. und Genentech, Inc.) sicher und bis zu einer Dosis von 15 mg/kg gut verträglich ist. Ferner gab diese Studie vorläufige Belege für eine Anti-Tumoraktivität (Herbst *et al.*, 2006).

Des Weiteren gibt es eine Reihe von Resultaten klinischer Studien (Phase I a, b und II) mit dem agonistischen TRAIL-R1 Antikörper Mapatumumab (HGS-ETR1) (Human Genome Sciences – HGS) (z.B. Tolcher *et al.*, 2007, Greco *et al.*, 2008) und den

agonistischen TRAIL-R2 Antikörpern Lexatumumab (HGS-ETR2) (z.B. Plummer *et al.*, 2007), AMG 655 (Amgen Inc.) (LoRusso *et al.*, 2007) und Apomab (Genentech, Inc.) (Camidge *et al.*, 2007), die auch eine generell gute Verträglichkeit und eine antitumorale Aktivität belegen. Die klinischen Studien mit rhApo2L/TRAIL und den agonistischen TRAIL-R Antikörpern als Monotherapeutikum weisen jedoch auch darauf hin, dass eine weitere, vielversprechendere klinische Entwicklung möglicherweise in der Kombination mit anderen antitumoralen Behandlungskonzepten liegt.

Allerdings zeigen aggregierte TRAIL-Varianten, wie His-TRAIL oder quervernetzter Flag-TRAIL, zwar gute antitumorale Wirkung, aber wirken z.B. auch hepatotoxisch. Löslicher TRAIL in seiner trimeren Form weist tumorselektive Eigenschaften auf, ist aber auch durch eine relativ geringe cytotoxische Wirkung auf Tumorzellen gekennzeichnet, was Kombinationstherapien zur Erhöhung der Apoptose-Sensitivität der Tumorzellen erforderlich macht (Koschny *et al.*, 2007). Chemotherapeutika wiederum können auch nicht-transformierte Zellen gegenüber einer TRAIL-Wirkung sensitivieren, wie das z.B. für Cisplatin und Bortezomib in hohen Dosen gezeigt werden konnte (Ganten *et al.*, 2006; Koschny *et al.*, 2007b), so dass auch hier eine tumorgerichtete Therapie von Vorteil zu sein scheint.

2.2.5 Zielgerichtete Therapie

Eines der wesentlichen Ziele in der Weiterentwicklung der Behandlung maligner Tumoren ist die Verbesserung der Selektivität antineoplastischer Therapeutika. Das resultiert in einer spezifischen Anreicherung des Therapeutikums am Tumor und führt somit zu einer wirkungsvolleren, zielgerichteteren Therapie, die auch eventuelle systemische Nebenwirkungen reduziert. Diese neue therapeutische Strategie basiert z.B. auf der Konjugation bzw. gentechnischen Fusion der jeweiligen Wirkstoffe – wie Zytostatika, Toxine, Radionuklide oder Zytokine - an tumorspezifische monoklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die Tumor-assoziierte Proteine auf der Zelloberfläche erkennen. Des Weiteren kommen auch Peptide zur Antigen-Erkennung zum Einsatz (Curnis *et al.*, 2000) oder aber z.B. Prodrugs, die sich tumorselektiv aktivieren lassen und keine Antigen-Bindungsdomäne aufweisen.

Den Grundstein hierfür legte die Entwicklung eines Vindesin-anti CEA (*carcinoembryonic antigen*) Konjugates (Johnson *et al.*, 1981). Es wurde gezeigt,

dass solche Chemo-Immunkonjugate tatsächlich Selektivität gegen Zellen, die das entsprechende Antigen exprimieren, aufweisen und monoklonale Antikörper somit als Vehikel für die zielgerichtete Applikation von Therapeutika wirksam eingesetzt werden können. Nach vielen Weiterentwicklungen dieses Prinzips ist bis heute ein Chemo-Immunkonjugat von der FDA (*U. S. Food and Drug Administration*) zugelassen. Gemtuzumab (Mylotarg[®]; Wyeth) besteht aus einem humanisierten anti-CD33 monoklonalen Antikörper verknüpft mit dem zytotoxischen Antibiotikum Ozogamicin (N-acetyl- γ Calicheamicin) (Bross *et al.*, 2001).

Neben Immunotoxinen wie beispielsweise ONTAK[®] (Denileukin Diftitox) – ein Fusionsprotein bestehend aus Interleukin-2 und Diphtherietoxinfragmenten – bilden die Antikörper-Zytokin-Fusionsproteine eine weitere wichtige Gruppe der Immunkonjugate in der zielgerichteten Tumorthherapie, da immunregulatorische Zytokine nachweislich die antitumorale Immunantwort verbessern (Rosenberg *et al.*, 1998). Dazu gehören die Antikörper-Interleukin-2-Fusionsproteine. Präklinischen Modelle zeigen eine wirkungsvolle Behandlung etablierter Tumoren und Metastasen (Becker *et al.*, 1996; Xiang *et al.*, 1997), EMD 273066 - Interleukin-2 konjugiert mit einem humanisiertem anti-EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) monoklonalen Antikörper - befindet sich bereits in der klinischen Prüfung.

Ein neuerer, in dieser Arbeit behandelte Ansatz zur zielgerichteten Zerstörung von Tumorzellen, ist die Fusion von Todesliganden der Zytokin-Familie - wie CD95L, TNF oder TRAIL - an Einzelkettenfragmente eines Antikörpers. Hierdurch sollen zwei Dinge erreicht werden; einerseits die selektive Anreicherung des Wirkstoffs am Tumor und andererseits die Imitierung der membrangebundenen Form der Liganden durch Bindung auf der Zellmembran Antigen-positiver Zellen. Ein solches Einzelkettenfragment (scFv – *single-chain fragment variable*) besteht aus der variablen Domäne einer schweren Kette (V_H) und einer leichten Kette (V_L) eines Antikörpermoleküls, die durch ein künstliches Peptidstück, einen so genannten Linker, verknüpft sind.

Dieses Konzept wurde bereits erfolgreich für CD95L angewandt. So zeigte der lösliche, homotrimere, biologisch inaktive CD95L durch Zelloberflächen-Immobilisierung mit Hilfe einer N-terminal platzierten scFv-Domäne, die spezifisch an das Tumorstroma-Antigen FAP bindet, selektive Aktivität auf FAP positiven Zellen, vergleichbar mit der Aktivität von sekundär quervernetztem CD95L (Samel *et al.*,

2003). Der Einsatz dieses anti-FAP-CD95L Fusionsproteins zeigte keine systemische Toxizität, konnte aber das Wachstum FAP-positiver Tumorzellen in einem xenogenen Tumormodell verhindern. Weitere scFv-CD95L-Fusionsproteine, die ebenfalls selektiv Apoptose induzieren sind scFvCD7-CD95L (Bremer *et al.*, 2006a) und scFvRituximab-CD95L (Bremer *et al.*, 2008b).

Das Potential einer TRAIL-Tumorthherapie konnte mit dieser Strategie ebenfalls verbessert werden. Viele Tumoren exprimieren mehr TRAIL-R2 als TRAIL-R1 (Bremer *et al.*, 2006b; Ashkenazi, 2002). Wie oben beschrieben wird TRAIL-R2 jedoch kaum durch löslichen TRAIL aktiviert. Es wurde ferner beschrieben, dass in einigen soliden Tumoren, die eine äquivalente Expression der beiden TRAIL-Todesrezeptoren aufweisen, Apoptose selektiv über den TRAIL-R2 induziert wird (Kelley *et al.*, 2001). Daraufhin konnte gezeigt werden, dass trimere scFv-TRAIL-Fusionsproteine, nach scFv-abhängiger Antigenbindung, TRAIL-R2 auf Antigen-positiven Zellen stärker aktivieren als auf Antigen-negativen Zellen, die äquivalente TRAIL-Sensitivität aufwiesen. Die TRAIL-R1 Aktivierung hingegen wurde nicht durch scFv-abhängige Antigenbindung beeinflusst (Wajant *et al.*, 2001; Bremer *et al.*, 2004a). Bezüglich des therapeutischen Potentials ist die Beobachtung, dass auf der Zelloberfläche immobilisierte scFv-TRAIL-Fusionsproteine auch Antigen-negative Nachbarzellen töten – der so genannte *bystander effect* - von großer Bedeutung (Bremer *et al.*, 2004b). Es konnte erfolgreich *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass die Behandlung mit scFv-TRAIL-Fusionsproteinen sowohl gegen solide Tumoren (Wajant *et al.*, 2001; Bremer *et al.*, 2004a; Bremer *et al.*, 2005a) als auch gegen Leukämie (Bremer *et al.*, 2005b; Stieglmaier *et al.*, 2008) antitumorale Wirkung aufweist, ohne oder mit minimaler Toxizität gegenüber nicht-transformierten Zellen.

2.2.5.1 Zielantigene

Für die zielgerichtete Therapie hämatologischer und solider Malignome wurde eine Vielzahl von Strukturen identifiziert, die entweder tumor-spezifisch oder stark überexprimiert im Tumorgewebe vorliegen. Dazu gehören unter anderen B-Zellmarker wie CD20 und CD22, CEA (*carcinoembryonic antigen*), EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*), die Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR (*epidermal growth factor receptor*, ErbB1) und ErbB2 sowie Tumorstromamarker wie FAP (*fibroblast*

activation protein). In der vorliegenden Arbeit sollen ErbB2 und FAP fokussiert werden.

ErbB2 auch bekannt als Her2/neu gehört zur EGF- oder ErbB-Familie der Typ I Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) (Coussens *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1986), die aus vier Mitgliedern besteht: EGFR, auch bezeichnet als ErbB1/Her1, ErbB2, ErbB3/Her3 und ErbB4/Her4. Alle Mitglieder haben eine extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne, eine hydrophobe Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Tyrosinkinase-Domäne. Die ErbB Rezeptoren werden in vielen Geweben epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Ursprungs exprimiert und spielen in der Entwicklung, Proliferation und Differenzierung eine wichtige Rolle. Zudem steht die deregulierte Expression der Rezeptoren, speziell EGFR und ErbB2, in Verbindung mit der Entstehung einer Vielzahl humaner Tumorerkrankungen. Die Ligandenbindung induziert die Ausbildung von Rezeptor Homo- und Heterodimeren. Die Dimerisierung stimuliert die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität der Rezeptoren und löst die Auto- bzw. Transphosphorylierung spezifischer Tyrosinreste der zytoplasmatischen Domäne aus. An diese phosphorylierten Tyrosine lagern sich Signalmoleküle an, die letztendlich die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden einleiten. Dabei gehören der MAPK- (*mitogen-activated protein kinase*) und der PI3K(*phosphatidylinositol 3-kinase*)-AKT-Signalweg zu den beiden Hauptsignalwegen, die durch diese Rezeptoren aktiviert werden.

Keiner der Liganden, die zur EGF Peptidfamilie gehören, bindet ErbB2. Dennoch ist ErbB2 ein sehr wichtiges Mitglied der ErbB-Familie, da es der bevorzugte Dimerisierungspartner der anderen, Ligand-bindenden Rezeptoren ist (Graus-Porta *et al.*, 1997). So konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass ErbB2 Liganden-induzierte Signale (Graus-Porta *et al.*, 1995) und biologische Aktivitäten wie Zellmigration und Zellinvasion (Spencer *et al.*, 2000) potenziert. ErbB2 ist in vielen soliden Tumoren wie Bronchial-, Pankreas-, Kolon-, Ösophagus-, Endometrium- und Zervixkarzinom überexprimiert. Beim Mammakarzinom ist sogar eine Überexpression durch Genamplifikation in 20-30 % der Erkrankungen beschrieben. Dies ist mit einer schlechten Prognose assoziiert und korreliert unter anderem mit Tumorgroße, Streuung des Tumors zu den Lymphknoten, Aneuploidie und dem Fehlen von Steroidhormonrezeptoren (Slamon *et al.*, 1987; Ross und Fletcher, 1998). Dabei löst die Überexpression von ErbB2 durch spontane Homodimerbildung eine Liganden-unabhängige Aktivierung der Kinasedomäne aus.

Aufgrund dieser Eigenschaften ist ErbB2 eine wichtige therapeutische Zielstruktur. Mit Trastuzumab (Herceptin®; Roche) einem humanisiertem, monoklonalen Antikörper gegen ErbB2, der die Proliferation von ErbB2 überexprimierenden Mammakarzinomzellen blockiert (Carter *et al.*, 1992), ist seit 1998 ein bereits vielfach eingesetztes zielgerichtetes Therapeutikum auf dem Markt. Allerdings ist nur bei einer Untergruppe der Mammakarzinompatientinnen klinische Wirksamkeit gegenüber diesem Medikament nachweisbar und die Auswirkung bezogen auf die Verlängerung der Überlebenszeit doch sehr gering, was die andauernde, intensive Suche nach besseren Therapeutika auch für diese Indikation rechtfertigt. Neben anderen isolierte auch die Gruppe um Nancy E. Hynes monoklonale Antikörper, die Epitope der extrazellulären Domäne des humanen ErbB2 Proteins erkennen (Harwerth *et al.*, 1992). Davon ausgehend wurde die scFv Domäne des ErbB2 spezifischen monoklonalen Antikörpers FRP5 rekombinant konstruiert (Wels *et al.*, 1992a) und ein scFv_{FRP5}-Exotoxin A Fusionsprotein generiert, das spezifisch an ErbB2 exprimierende Zellen bindet und *in vivo* - in einem xenogenen Mausmodell - das Tumorwachstum inhibierte (Wels *et al.*, 1992b). Dieser beschriebene scFv_{FRP5} wurde auch in dieser Arbeit zur Generierung zielgerichteter TRAIL-Fusionsproteine eingesetzt.

Die Tumor-Mikroumgebung, das so genannte Tumorstroma, leistet einen beträchtlichen Beitrag zur Entwicklung solider Tumoren und stellt daher eine wichtige Zielstruktur für die antitumorale Therapie dar. Während der Tumor selbst durch transformierte Zellen charakterisiert ist, beinhaltet das Tumorstroma vorwiegend Zelltypen mit genetischer Stabilität. Es setzt sich im Wesentlichen aus Komponenten der extrazellulären Matrix, Immunzellen, Fettzellen, Fibroblasten und Blutgefäßen zusammen und spielt sowohl bei der Nährstoff- und Sauerstoffversorgung als auch bei der Tumordinvasion und Metastasierung eine wichtige Rolle. Krebszellen können ihr angrenzendes Stroma – durch Stroma-modulierende Wachstumsfaktoren wie *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), EGFR-Liganden und *transforming growth factor-β* (TGFβ) und Proteasen - dahingehend verändern, dass es eine unterstützende Umgebung bildet, das so genannte ‚reaktive‘ Stroma. Diese Faktoren zerstören die normale Gewebshomöostase, ähnlich dem Prozess der Wundheilung (Werner und Grose, 2003), induzieren Angiogenese (Bergers und Benjamin, 2003)

und Inflammation (Coussens und Werb, 2002) und aktivieren umgebende Zellen wie Fibroblasten, glatte Muskelzellen und Fettzellen, was zur Sekretion zusätzlicher Wachstumsfaktoren und Proteasen führt. Aktivierte Fibroblasten im Stroma fördern die Tumorentwicklung sowohl durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren und pro-migratorischen extrazellulären Matrixkomponenten als auch durch die verstärkte Expression von Serin-Proteasen und Metalloproteinasen, welche die extrazelluläre Matrix abbauen und ummodellieren. Dazu gehört auch das *fibroblast activation protein (FAP)*, eine Serinprotease mit Dipeptidylpeptidase- und Kollagenaseaktivität (Park *et al.*, 1999). Dabei handelt es sich um ein Zelloberflächen-Antigen, das auf reaktiven Fibroblasten in über 90 % aller humanen epithelialen Tumoren wie beispielsweise Mamma-, Bronchial-, Ovarial- und Kolonkarzinom (Garin-Chesa *et al.*, 1990) und transient in normalem Gewebe während der Wundheilung und in fötalen mesenchymalen Geweben exprimiert wird. FAP wurde erstmals 1986 über den monoklonalen Antikörper F19 definiert (Rettig *et al.*, 1986) und ist ein glykosiliertes Typ II Membranprotein bestehend aus einer umfangreichen extrazellulären C-terminalen Domäne mit drei katalytischen Subdomänen, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer kurzen zytoplasmatischen N-terminalen Domäne (Scanlan *et al.*, 1994). Ausgehend davon wurde radioaktiv markierter F19 erfolgreich zur Detektion von Kolonkarzinom Metastasen eingesetzt (Welt *et al.*, 1994), was die systemische Zugänglichkeit des Tumorstromas und somit die Möglichkeit eines zielgerichteten, Antikörper-vermittelten Tumorstroma-Therapiekonzeptes unter Beweis stellte. Weiter isolierten Brocks *et al.* hochaffine, Spezies-kreuzreaktive, FAP-spezifische *single-chain* Fragmente – scFv MO33 und scFv MO36 - durch Phage Display Selektion (Brocks *et al.*, 2001). Dieser beschriebene scFv MO36 wurde auch in dieser Arbeit zur Generierung zielgerichteter TRAIL-Fusionsproteine eingesetzt.

2.3 Zielsetzung

Rekombinanten TRAIL-Varianten und agonistischen TRAIL-R1- (DR4) bzw. TRAIL-R2- (DR5) spezifischen Antikörpern wird ein großes antitumorales Potential zugeschrieben. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit neuen, gentechnisch modifizierten Varianten des TRAIL. Im ersten Teil wird konventionelles, lösliches TRAIL (Homotrimer) mit einem sogenannten (*single-chain*) scTRAIL verglichen. Bei dieser innovativen Formatvariante handelt es sich um ein kovalent verbundenes

Einzelkettenmolekül, das in Anlehnung an bereits beschriebene scTNF-Moleküle (Krippner-Heidenreich *et al.*, 2008) generiert wurde und dessen potentiell verbesserte Eigenschaften es zu beschreiben gilt.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden - im Hinblick auf die Weiterentwicklung zielgerichteter Tumorthapeutika - auf der Basis der beiden TRAIL-Varianten tumorgerichtete scFv-TRAIL- und scFv-scTRAIL-Fusionsproteine generiert und in unterschiedlichen *in vitro* und *in vivo* Modellen charakterisiert. Diese zielgerichteten Fusionsproteine besitzen aufgrund ihres molekularen Designs gegenüber normalen TRAIL-Molekülen das Potential zur Anreicherung am Tumor durch ihre hochaffine scFv-Komponente und aufgrund der Bindung an die Zielzellmembran das Potential die Membran-TRAIL Bioaktivität nachzuahmen, d.h. sich durch eine effiziente *in situ* Aktivierung von TRAIL-R2 auszuzeichnen. Als Modellantigene für die zu entwickelnden TRAIL-Fusionsproteine dienten dabei ErbB2 und *fibroblast activation protein* (FAP).

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid (30%)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agar Agar	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agarose	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
APS	Sigma-Aldrich, Steinheim
BCIP	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Essigsäure (Eisessig)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt
MTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumfluorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
NBT	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
NP-40 (Nonidet P40)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepton	Merck, Darmstadt
PMSF	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Polyethylenglycol 35000	Merck, Darmstadt
SDS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tween 80	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
ZnCl ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.1.2 Kits

NucleoSpin[®] Extract II

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

NucleoBond[®] Xtra Midi

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

3.1.3 Puffer und Lösungen

- **PBS (*Phosphate Buffered Saline*)**

8,0 g NaCl, 0,2 g KCL, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ auf 1 l ddH₂O, pH 7,4

3.1.3.1 Puffer für Agarosegele

- **1x TAE (Tris-Acetat-EDTA), pH 8,0**

40mM Tris Acetat, 1mM Eisessig, 1mM EDTA

- **6x DNA-Auftragspuffer**

0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 15% (w/v) Ficoll 400 in TE-Puffer

3.1.3.2 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE und die Western Blot Analyse

- **4x SDS-Auftragspuffer (Laemmli-Puffer) (reduzierend)**

250 mM Tris/HCL, pH 6.8, 20 % Glycerin, 8 % SDS, 0,04 % Bromphenolblau, 20 % Mercaptoethanol auf 100 ml mit ddH₂O

- **10x SDS-PAGE-Laufpuffer**

144 g Glycin, 30,3 g Tris, 10 g SDS auf 1 l ddH₂O, pH 8,3

- **Proteintransferpuffer**

192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 25 mM Tris auf 1 l ddH₂O, pH 8,3

- **Blockpuffer**

2 % Tween 80 in PBS

- **Waschpuffer (PBS-Tween)**

PBS + 0,05 % Tween 20

- **APS-Lösung**

10 % (w/v) Ammoniumpersulfat in ddH₂O

- **Färbepuffer für die alkalische Phosphatase-Reaktion**

100 mM Tris/HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂

- **BCIP-Lösung**

22,5 mg BCIP, 500 µl DMF (Dimethylformamid 100 %)

- **NBT-Lösung**

45 mg NBT, 500 µl DMF (70 %)

3.1.3.3 Puffer und Lösungen für die Zellkultur und Zytotoxizitätstests

- **0,4% Eosin-Lösung**

220 ml PBS, 25 ml FCS, 5 ml 20 % Eosin + 250 µl Na-Azid

- **Kristallviolettlösung**

0,5 % Kristallviolett, 20 % Methanol

- **MTT-Lösung**

Stocklösung (50 mg/ml in DMSO), mit PBS auf 5 mg/ml verdünnt

- **MTT-Lysepuffer**

15 % SDS, 50 % DMF, pH 4,5-5

3.1.3.4 Puffer für die FACS-Analyse

- **PFA (PBS-FCS-Azid)**

2 % FCS in 1 x PBS + 0,02 % Azid

3.1.3.5 Puffer und Lösungen für die M2-Agarose Affinitätschromatographie

- **1 x TBS (*Tris Buffered Saline*)**

25 mM Tris/HCl, pH 7,0, 150 mM NaCl

- **0,1 M Glycin HCl, pH 3,5**

3,75 g Glycin auf 500 ml ddH₂O

- **50 % Glycerin + 0,02 % Na-Azid**

50 % Glycerin in 1 x TBS + 0,02 % Na-Azid

- **Flag-Peptid-Lösung**

Flag-Peptid, verdünnt in TBS, pH 7,4 auf 100 mg/ml

3.1.3.5 Puffer für die Zellyse

- **Lyse-Puffer**

50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 20 mM β Glycero-P, 1 mM EDTA, 1 % NP40, 1 mM Na_3VO_4 , 0,5 mM PMSF + Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim)

3.1.4 Zellkultur-Medien

- **Kulturmedium**

RPMI 1640 + 5 % FCS

- **Selektionsmedium**

RPMI 1640 + 5 % FCS + 2 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin

- **Produktionsmedium**

Optimem + 50 μM ZnCl_2

3.1.5 Zellkultur-Zusätze

Cyclohexamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
FCS	PAA, Laboratories, Pasching, Österreich
Lipofectamin TM 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Optimem	Invitrogen, Karlsruhe
Puromycin	Invitrogen, Karlsruhe
G418 (Geneticin)	Calbiochem, Schwalbach
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (10x)	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.6 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

- **Luria-Bertani (LB)-Medium**

10g/l Pepton, 5g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl, pH 7,0

- **LB/Ampicillin-Platten**

15g/l Agar Agar, Ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$)

- **Ampicillin-Stammlösung**

100 mg/ml in ddH₂O

3.1.7 DNA- und Proteinmarker

High DNA Mass Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
O´GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
O´GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

3.1.8 Enzyme

CIAP (<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu Turbo Hot Start DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
PNGase F	New England Biolabs, Frankfurt

3.1.9 Antikörper

Spezifität	Ursprung	Hersteller
<i>Flag-Tag</i> (M2)	Maus	Sigma-Aldrich, Steinheim
Maus-IgG konjugiert mit Alkalischer Phosphatase	Ziege	Sigma-Aldrich, Steinheim
Maus-IgG, FITC-konjugiert	Ziege	Sigma-Aldrich, Steinheim
c-neu (Ab-5)	Maus	Oncogene Research Products, San Diego, CA, USA
Hu TRAIL Rezeptor 1 (huTR1-M271)	Maus	Amgen, Thousand Oaks, CA, USA
Hu TRAIL Rezeptor 2 (huTRAILR2-M413)	Maus	Amgen, Thousand Oaks, CA, USA
c-erbB2 Ab-1 (21N)	Kaninchen	Lab Vision, Fremont, CA, USA

c-erbB2 Ab-20 (L87+2ERB19)	Maus	Lab Vision, Fremont, CA, USA
Phospho-Tyrosin (P-Tyr-100)	Maus	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Maus, HRP-gekoppelt	Schaf	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK

3.1.10 Oligonukleotide

Bezeichnung	5'-3'-Sequenz
Jensseq	GGA GAC CCA AGC TTG GTA CCG
Jensrev	TGG CCC TCG CAG ACA GCG AAT T
EcoRI-sTRAIL-F	TAT AAT GAA TTC ACG CGT GGA ACC TCT GAG GAA ACC
TRAIL-BstB-Xba-R	TAA TAA TCT AGA TTC GAA TCA GCC AAC TAA AAA GGC CCC GA
XhoI-sc36-F	CCG CTC GAG CAG GTG CAG CTG AAG CAG
sc36-NotI-R	TTT TCC TTT TGC GGC CGC GGA TAC AGT TGG

Die Oligonukleotide wurden von Thermo Electron Corporation, Ulm und MWG Biotech AG, Ebersberg synthetisiert.

3.1.11 Prokaryontische Zellen

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> XL-1 blue	RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 RecA1 lac (F'proAB lac ^q ZDM15 Tn10 (Tet ^r))	Stratagene, La Jolla, CA, USA

3.1.12 Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
HEK293	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
HT1080	Dr. W. J. Rettig, Boehringer Ingelheim Pharma KG
HT1080FAP	Dr. W. J. Rettig, Boehringer Ingelheim Pharma KG
Colo205	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA , USA
Jurkat	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA , USA

3.1.13 Versuchstiere

Für die Pharmakokinetik-Experimente wurden Balb/c Mäuse (Janvier, Le Genest St Isle, Frankreich) eingesetzt und für das Tumormodellexperiment NMRI nu/nu Mäuse (Janvier, Le Genest St Isle, Frankreich). Die Haltung der Tiere und die Durchführung aller Experimente erfolgten unter Einhaltung des Deutschen Tierschutzgesetzes.

3.2 Molekularbiologische Methoden zur Klonierung der TRAIL-Fusionsproteine

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction/PCR*)

Die Amplifikation von DNA mittels PCR wurde in 50µl Ansätzen durchgeführt. Dabei wurde als Template 10 ng DNA eingesetzt. Des Weiteren beinhaltete der PCR-Ansatz je 10 pmol der Oligonukleotide, 1 µl dNTPs (10 mM), 5 µl Pfu Turbo 10 x Reaktionspuffer und 1,25 U Pfu Turbo Hot Start DNA Polymerase.

Die DNA-Amplifikation erfolgte in 25 Zyklen mit folgenden Parametern: 2 min 95°C (Denaturierung), 1 min 55°C (Anlagerung) und 2 min 72°C (Elongation).

3.2.2 Restriktionsenzym-Verdau

Für einen Restriktionsenzym-Verdau wurden 10 µg Plasmid-DNA bzw. der komplette aufgereinigte PCR-Ansatz mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und den dazugehörigen Puffern für 3 h bei der erforderlichen Temperatur inkubiert.

3.2.3 Dephosphorylierung von DNA

Beim Restriktionsenzym-Verdau eines Vektors mit nur einem Enzym entstehen zwei kompatible Enden, die wieder miteinander ligieren können. Durch Dephosphorylierung der Vektor-DNA kann diese Reaktion unterbunden werden. Die Dephosphorylierung von DNA durch das Enzym CIAP erfolgte nach Herstellerangaben.

3.2.4 Auffüllen von DNA

Überstehende Einzelstrang-Enden (sticky ends), die durch den Verdau bestimmter Restriktionsenzyme entstehen, können durch T4-DNA-Polymerase unter Zugabe von dNTPs zu glatten Enden (blunt-ends) aufgefüllt werden. Dies ist Voraussetzung für so genannte blunt-end Ligationen.

Das Auffüllen von DNA mit T4-DNA-Polymerase erfolgte nach Herstellerangaben.

3.2.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

PCR-Produkte sowie durch Restriktionsverdau gespaltene DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt anschließend durch interkaliertes Ethidiumbromid mittels eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht.

Die Agarosegelelektrophorese dient der Größenauftrennung von DNA-Fragmenten und somit der Überprüfung der PCR und der einzelnen Klonierungsschritte.

Dafür wurde Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Danach erfolgte die Zugabe von Ethidiumbromid (3 µl einer 1 %igen Stammlösung pro 100ml). Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde in 1 x TAE-Puffer bei einer Spannung von 100 V für ca. 30 min. durchgeführt.

Die gewünschte DNA-Bande wurde mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit dem NucleoSpin[®] Extract II-Kit entsprechend den Herstellerangaben aus dem Gel isoliert. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA erfolgte mittels

Agarosegelelektrophorese. Als Standard wurde der High DNA Mass Ladder von Invitrogen eingesetzt.

3.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren wurde T4-DNA-Ligase verwendet. Dabei enthielten die Ligationsansätze einen molekularen Überschuss an Insert-Fragmenten im Verhältnis 1:3 und 1:10 zum Vektor.

Die Ligationen mit T4-DNA-Ligase erfolgten nach Herstellerangaben.

3.2.7 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* XL-1 Blue Zellen

E. coli XL-1 Blue Zellen wurden auf Eis aufgetaut und zusammen mit der zu transformierenden DNA (Ligationsansatz etc.) für 15 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgt der Hitzeschock für 45 sec bei 42°C. Die Zellen wurden noch einmal kurz auf Eis gestellt und danach auf Selektionsplatten ausplattiert. Die hier verwendeten LB-Amp. Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Aus den Übernachtskulturen der selektierten und über Restriktionsverdau kontrollierten Bakterienklone wurde die Plasmid-DNA mit dem NucleoBond® Xtra Midi-Kit nach Hersteller-Protokoll isoliert.

3.2.9 Klonierungsstrategien

Expressionsvektor für sämtliche, in dieser Arbeit verwendeten, humanen TRAIL-Fusionsproteine war der pIRESpuro3-Vektor (BD Bioscience Clontech, Heidelberg). Durch Sequenzierung wurde die korrekte Insertsequenz der jeweiligen Konstrukte überprüft. Die Sequenzierungen wurden von der MWG Biotech AG, Ebersberg mit den Oligonukleotiden Jensseq und Jensrev durchgeführt.

Beim löslichen TRAIL handelt es sich um die extrazelluläre Domäne des humanen Liganden (AS 95-281).

Das Einzelketten (*single-chain*) TRAIL-Molekül (scTRAIL) wurde am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart kloniert und im Vektor pcDNA3-HA-Flag-scTRAIL zur Verfügung gestellt.

Der scFv_{erbB2} wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Winfried Wels (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) zur Verfügung gestellt, der scFv36 wurde am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart isoliert und in (Brocks *et al.*, 2001) beschrieben.

3.2.9.1 pIRESpuro3-leader-Flag-TRAIL

Als Ausgangskonstrukt diente pCR3-leader-scFv36-Flag-TRAIL.

Der Restriktionsenzym-Verdau mit XhoI und Sall und die anschließende Vektor-Religation resultierten im Zwischenkonstrukt pCR3-leader-Flag-TRAIL.

Für die Umklonierung in den pIRESpuro3-Vektor, wurde dieser Zielvektor zunächst mit dem Restriktionsenzym EcoRV geöffnet. Parallel dazu erfolgte der Restriktionsenzym-Verdau des Zwischenkonstruktes pCR3-leader-Flag-TRAIL mit BsiWI und XbaI. Das dabei entstandene Insert wurde - nach Auffüllen mit T4-DNA-Polymerase - blunt in den geöffneten und dephosphorylierten pIRESpuro3-Vektor ligiert.

3.2.9.2 pIRESpuro3-leader-Flag-scTRAIL

Als Ausgangskonstrukt diente pCR3-leader-scFv36-Flag-scTRAIL.

Der Restriktionsenzym-Verdau mit XhoI und Sall und die anschließende Vektor-Religation resultierten im Zwischenkonstrukt pCR3-leader-Flag-scTRAIL.

Die Umklonierung in den pIRESpuro3-Vektor erfolgte wie in 3.2.1.9 beschrieben.

3.2.9.3 pIRESpuro3-leader-scFv_{erbB2}-Flag-TRAIL

Als Ausgangskonstrukt diente pCR3-leader-scFv_{erbB2}-Flag-scTRAIL.

Durch den Restriktionsenzym-Verdau mit EcoRI und XbaI wurde scTRAIL aus dem Vektor herausgeschnitten. scTRAIL wurde ausgetauscht gegen TRAIL. Die Amplifikation von TRAIL erfolgte mit den Oligonukleotiden EcoRI-sTRAIL-F und

TRAIL-BstB-Xba-R. Als Template diente pCR3-leader-Flag-TRAIL. Die Ligation resultierte im Zwischenprodukt pCR3-leader-scFv_{erbB2}-Flag-TRAIL.

Die Umklonierung in den pRESpuro3-Vektor erfolgte wie in 3.2.1.9 beschrieben.

3.2.9.4 pRESpuro3-leader-scFv_{erbB2}-Flag-scTRAIL

Als Ausgangskonstrukt diente pCR3-leader-scFv36-Flag-scTRAIL.

Durch den Restriktionsenzym-Verdau mit NotI und XhoI wird die scFv36-Sequenz aus dem Konstrukt ausgeschnitten. Der scFv36 wurde durch den scFv_{erbB2} ersetzt, der ebenfalls durch Restriktionsenzym-Verdau mit NotI und XhoI aus dem Konstrukt pCR3-HA leader-scFv_{erbB2}-Flag-TRAIL herausgeschnitten wurde. Die Ligation resultierte im Zwischenprodukt pCR3-leader-scFv_{erbB2}-Flag-scTRAIL.

Die Umklonierung in den pRESpuro3-Vektor erfolgte wie in 3.2.1.9 beschrieben.

3.2.9.5 pRESpuro3-leader-scFv36-Flag-TRAIL

Als Ausgangskonstrukt diente pCR3-leader-scFv36-Flag-scTRAIL.

Durch den Restriktionsenzym-Verdau mit EcoRI und XbaI wurde scTRAIL aus dem Konstrukt herausgeschnitten. scTRAIL wurde ausgetauscht gegen TRAIL. Die Amplifikation von TRAIL erfolgte mit den Oligonukleotiden EcoRI-sTRAIL-F und TRAIL-BstB-Xba-R. Als Template diente pCR3-leader-Flag-TRAIL. Die Ligation resultierte im Zwischenprodukt pCR3-leader-sc36-Flag-TRAIL.

Die Umklonierung in den pRESpuro3-Vektor erfolgte wie in 3.2.1.9 beschrieben.

3.2.9.6 pRESpuro3-leader-scFv36-Flag-scTRAIL

Als Ausgangskonstrukte dienten pCR3-leader-scFv225-Flag-FasL und pcDNA3-HA-Flag-scTRAIL.

Durch Restriktionsenzym-Verdau der beiden Ausgangskonstrukte mit EcoRI und XbaI wurde FasL gegen scTRAIL ausgetauscht. Dabei erhielt man das erste Zwischenkonstrukt pCR3-leader-scFv225-Flag-scTRAIL.

Über XhoI und NotI wurde der scFv225 ausgeschnitten und durch den scFv36 ersetzt. Die Amplifikation des scFv36 erfolgte mit den Oligonukleotiden XhoI-sc36-F und sc36-NotI-R. Als Template diente pRESpuro3-scFv36-SGdelta. Die Ligation resultierte im zweiten Zwischenkonstrukt pCR3-leader-scFv36-Flag-scTRAIL.

Die Umklonierung in den pRESpuro3-Vektor erfolgte wie in 3.2.1.9 beschrieben.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium mit 5% hitzeinaktiviertem FCS unter Standardbedingungen (5% CO₂, 37°C) kultiviert. Die Verdünnung bzw. Ernte adhärent wachsender Zellen erfolgte durch Inkubation bei 37°C mit 1x Trypsin/EDTA-Lösung, welche die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) ablöste. Die vereinzelt Zellen wurden in Medium überführt, zentrifugiert (400 x g) und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in der gewünschten Zellzahl ausgesät. Dabei erfolgte die Bestimmung der Lebend-Zellzahl durch Farbstoffausschluss einer 0,4 % Eosin-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer.

3.3.2 Expression der TRAIL-Fusionsproteine in eukaryontischen Zelllinien

3.3.2.1 Transiente Proteinexpression

Die transiente Expression der TRAIL-Fusionsproteine erfolgte in HEK293-Zellen. Die Transfektion der Zellen wurde mittels LipofectaminTM 2000 nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Inkubation der Zellen mit DNA-Lipofectamin-Lösung für 6 bis 8 Stunden wurde das Transfektionsmedium abgenommen und gegen Optimem ersetzt. Der Zellkulturüberstand wurde 3 Tage nach der Transfektion abgenommen und bei 400 x g für 5 min abzentrifugiert, um eventuell abgelöste Zellen oder Zellfragmente zu entfernen. Die Analyse der Proteinexpression erfolgte anschließend mittels Western Blot.

3.3.2.2 Proteinexpression mit stabil transfizierten Produktions-Zelllinien

Als Expressionsvektor sämtlicher, in dieser Arbeit verwendeter, TRAIL-Fusionsproteine diente der pIRESpuro3-Vektor. Dieser Vektor enthält eine ECMV *internal ribosome entry site* (IRES), die die Translation zweier offener Leseraster einer mRNA ermöglicht, im vorliegenden Fall die Translation des gewünschten Genprodukts und des für die Selektion benötigten Resistenzgens.

Die Expressionskassette des pIRESpuro3-Vektors enthält unter anderem den CMV-Promotor zur Expression in eukaryontischen Zellen, die *multiple cloning site* (MCS) gefolgt von der ECMV IRES und dem Puromycin-Resistenzgen Puromycin-N-Acetyltransferase.

Die stabile Proteinexpression erfolgte ebenfalls in HEK293-Zellen. Die Transfektion der Zellen wurde mittels Lipofectamin™ 2000 nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Inkubation der Zellen mit DNA-Lipofectamin-Lösung in Optimem für 6 bis 8 Stunden wurde das Transfektionsmedium gegen Kulturmedium ersetzt. Die Selektion auf positive Transfektanten erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion mit Selektionsmedium (Kulturmedium + 2µg/ml Puromycin). Nach ca. 2-3 Wochen Selektionsdruck der transfizierten Zellen wurde der Zellkulturüberstand auf stabile Proteinexpression hin mittels Western Blot analysiert.

Zur Produktion der TRAIL-Fusionsproteine mit stabilen HEK293-Zellen wurden diese in Selektionsmedium expandiert. Ab einer Konfluenz von ca. 95% wurde das Selektionsmedium gegen Produktionsmedium (Optimen + 50µM ZnCl₂) ausgetauscht. Die Produktion erfolgte unter Zugabe von ZnCl₂, da Zink die homotrimere Struktur von TRAIL stabilisiert. Nach 3 Tagen wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und bei 3,000 x g für 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

3.3.3 Zytotoxizitäts-Tests

Um eine Aussage über die Bioaktivität, in diesem Fall das Apoptose-induzierende Potential der Proteine treffen zu können, ist die Bestimmung des EC₅₀-Wertes aus Dosis-Wirkungsdiagrammen von Zytotoxizitäts-Tests notwendig.

3.3.3.1 Kristallviolett-Test

Der Kristallviolett-Test ist nur bei adhären wachsenden Zellen anwendbar. Sterben solche Zellen ab, verlieren sie ihre Fähigkeit zur Adhärenz und werden vor dem Färben mit dem Medium verworfen. Alle verbliebenen Zellen werden anschließend unspezifisch mit Kristallviolett angefärbt. So korreliert die Stärke der Anfärbung mit der Anzahl an vitalen, adhären Zellen.

Dieser Test wurde für die Zytotoxizitätsbestimmungen bei HT1080- und HELA-Zellen eingesetzt. Dafür wurden jeweils 2×10^4 Zellen pro Well in eine 96-Well Flachboden-Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 16 Stunden in Anwesenheit von 2,5 µg/ml CHX mit den entsprechenden Proteinen stimuliert, mit Kristallviolett gefärbt, gewaschen und getrocknet. Zur Bestimmung der OD (optischen Dichte) wurde das Kristallviolett mit 100 µl Methanol bei Raumtemperatur gelöst und im ELISA Reader SpectraMax bei 550 nm gemessen.

3.3.3.2 MTT-Test

Zur Bestimmung der Zellvitalität von Suspensions- und Teilsuspensionszellen wurde der MTT-Test angewendet. Beim MTT-Test wurden die Zellen mit dem gelbem, wasserlöslichen Tetrazoliumsolt MTT inkubiert, das in vitalen Zellen durch membrangebundene, mitochondriale Enzyme der Atmungskette (Succinat-Dehydrogenasen) reduziert wird und wasserunlösliches, blau-violettes Formazan wird gebildet. Bei absterbenden Zellen werden die Mitochondrien geschädigt, so dass die Farbreaktion ausbleibt. Die Menge des gebildeten Formazans ist somit proportional zur Anzahl vitaler Zellen.

Dieser Test wurde für die Zytotoxizitätsbestimmungen bei Jurkat- und Colo 205-Zellen eingesetzt. Dafür wurden 1×10^5 bzw. 5×10^4 Zellen pro Well in eine 96-well Flachboden-Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 16 Stunden mit den entsprechenden Proteinen stimuliert. Nach Zugabe von 10 µl MTT-Lösung (5 mg/ml) pro Well und zweistündiger Inkubation bei 37°C, wurden 90 µl MTT-Lysepuffer pro Well zugegeben und die Platte über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Quantifizierung der Färbung erfolgt ebenfalls photometrisch im Elisa Reader SpectraMax bei 590 nm mit einer Referenzwellenlänge von 660 nm.

3.3.4 Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*/FACS)

Die Analyse der Expressionsprofile von Transmembranrezeptoren und der Antigen-abhängigen Bindung der TRAIL-Fusionsproteine auf Antigen-positiven Zellen wurde mittels FACS-Analyse durchgeführt.

Dazu wurden pro Ansatz 5×10^5 Zellen in einer 96-Well Spitzbodenplatte ausgesät und mit PFA gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C auf Eis durchgeführt. Es folgten die Inkubationschritte mit primärem Antikörper bzw. dem jeweiligen Molekül für 2 Stunden und sekundärem FITC-konjugierten Antikörper für 1 Stunde, jeweils gefolgt von drei Waschschrritten mit PFA. Die Messung erfolgte mit dem EPICS-Durchflusszytometer (Flow Cytometer EPICS XL-MCL, Beckman Coulter, Krefeld).

3.4 Proteinbiochemische Methoden zur Charakterisierung der TRAIL-Fusionsproteine

3.4.1 Affinitätschromatographie

Die Proteinaufreinigung wurde mittels einer speziellen Art der Affinitätschromatographie, der Immunochromatographie durchgeführt. Dafür wurde das *Anti-Flag M2 Affinity Gel* von Sigma-Aldrich, Steinheim eingesetzt. Das ist eine Agarosematrix, an welche der monoklonale Antikörper anti-Flag M2 über kovalente Bindung immobilisiert ist. Flag-Peptid enthaltende Fusionsproteine können somit selektiv an die Säulenmatrix gebunden und das gebundene Protein mit Flag-Peptid eluiert werden. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben.

Das Eluat wurde über Nacht in Tube-O-DialyzernTM (Genotech, St. Louis, MO, USA) nach Herstelleranleitung gegen PBS dialysiert und anschließend sterilfiltriert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels eines Nanodrop® ND-1000-UV/Vis Spectrophotometers (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen).

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen erfolgte unter reduzierenden Bedingungen mit einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970). Die so ermittelten Molekulargewichte beziehen sich auf Proteinmonomere.

Die SDS-PAGE wurde mit dem Elektrophorese-System von Phase, Lübeck durchgeführt. Nach Gießen des Trenngels in die entsprechend vorbereiteten Glasplatten, wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisierung des

Trenngels wurde das Isopropanol vollständig entfernt und mit einem 5 %igen Sammelgel überschichtet, in welches, vor Polymerisierung, der Kamm eingesetzt wurde. Die Proben wurden mit reduzierendem 4x SDS-Auftragspuffer (Laemmli-Puffer) versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert, kurz abzentrifugiert und auf Eis gekühlt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 50 mA für 1:20 h.

Zusammensetzung der SDS-Gele:

	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
H ₂ O	5,1 ml	3,4 ml
Acrylamid (30 %)	4,3 ml	0,83 ml
1,5 M Tris pH 8,8	3,3 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	0,63 ml
SDS (10 % w/v)	0,13 ml	0,05 ml
APS (10 % w/v)	0,13 ml	0,05 ml
TEMED	0,013 ml	0,005 ml

3.4.3 Western Blot Analyse

Die nach Towbin et al. (1979) modifiziert durchgeführte Methode der Immuno- oder Western Blot Analyse basiert auf einem Elektotransfer der Proteine vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Pall, Dreieich).

Die Membran wurde mit vier gleich großen Stücken Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) in Proteintransferpuffer äquilibriert. Dann wurde das Transfersandwich in der Blotkammer (Phase, Lübeck) wie folgt zusammengebaut: Kathode; 2 Filterpapiere; SDS-Gel; Nitrozellulosemembran; 2 Filterpapiere; Anode. Der Transfer erfolgte bei 1,5 mA x cm² Fläche für 1:10 h.

Für die Immunfärbung wurde die Membran zunächst 2 min mit Blockpuffer abgesättigt und mit dem entsprechenden primären Antikörper über Nacht bei 4 °C und dem entsprechenden sekundären Antikörper für 1 h bei RT inkubiert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte bei Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern mit einem chemilumineszenten Detektionssystem (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Bei Alkalische Phosphatase-gekoppelten sekundären Antikörpern erfolgte der Proteinnachweis durch eine Farbreaktion mit den Substraten BCIP und NBT.

3.4.4 Größenausschlusschromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*)

Die molekularen Massen der nativen Proteine wurden mittels HPLC Größenausschlusschromatographie (SEC) ermittelt. Die Analysen wurden mit der Säule BioSep-Sec-3000 (Phenomenex, Aschaffenburg) und einer HPLC-Anlage von Waters (Millipore Corp., Milford, MA, USA) durchgeführt. Als mobile Phase diente PBS mit einer Flussrate von 0,5 ml/min. Dabei wurden folgende Standardproteine eingesetzt: Thyroglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa), β -Amylase (200 kDa), BSA (66 kDa), Carbonanhydrase (29 kDa) und Cytochrom c (12.4 kDa).

3.4.5 Deglykosylierung der Proteine

Zur Identifizierung N-glycosylierter Proteine, wurden die gereinigten Proteine mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGaseF) verdaut. PNGaseF spaltet spezifisch N-Glykane von Asparaginresten des Proteins ab.

Die Deglykosylierung erfolgte nach Herstellerangaben (New England Biolabs, Frankfurt).

3.4.6 Immunopräzipitation

Die Analyse der ErbB2 Aktivierung in Zellen nach Stimulation mit scFV_{erbB2}-TRAIL-Fusionsproteinen erfolgte mittels Immunopräzipitation der Rezeptoren.

Dazu wurden die entsprechenden ErbB2 exprimierenden Zellen in eine 6-Well-Platte ausgesät und in Kulturmedium bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen wurden über Nacht in Medium + 0,1 % FCS bei 37°C inkubiert. Darauf folgte die Stimulation mit den entsprechenden Proteinen für 15 min bei 37°C. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Sofort nach der Stimulation erfolgte die Zellyse. Dazu wurden die Zellen in der 6-Well-Platte auf Eis gestellt, die Stimulationslösung abgesaugt, die Zellen mit eisgekühltem PBS gewaschen und mit 1 ml Lyse-Puffer (mit Phosphatase-Inhibitor) für 10 min inkubiert. Dann wurden die am Boden haftenden Zellen mit einem Zellschaber (Costar, Corning Inc., NY, USA) abgelöst und die Zellsuspension in

Eppendorfgefäße überführt. Durch Zentrifugation für 10 min bei 16,000 x *g* wurde das Gesamtlysate von den festen Zellbestandteilen getrennt.

Die Immunopräzipitation der Rezeptoren aus dem Gesamtlysate erfolgte für 2 Stunden mit dem Antikörper c-erbB2 Ab-1 (21N) (2,5 µg pro Ansatz) gefolgt von einer einstündigen Inkubation auf dem Roller mit Protein G Beads (30 µl pro Ansatz) (KPL, MD, USA) und drei Waschschritten mit 1 ml Lyse-Puffer, je 1 min bei 2,500 x *g*. Vor Gebrauch wurden die Protein G Beads, die in Ethanol gelagert wurden, mit PBS drei Mal 1 min bei 2,500 x *g* gewaschen. Die Quantifizierung der isolierten Proteine wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse visualisiert. Dabei wurden die immunopräzipitierten Rezeptoren mit den Antikörpern Phospho-Tyrosin (P-Tyr-100) und c-erbB2 Ab-20 (L87+2ERB19), welcher als Ladekontrolle diente, detektiert.

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Pharmakokinetik

Zur Bewertung der Pharmakokinetik der entsprechenden TRAIL-Fusionsproteine, wurden die Zeitverläufe der Proteinkonzentrationen im Serum von Balb/c Mäusen bestimmt.

Dazu wurde nach Injektion der Proteine in die Schwanzvene, nach definierten Zeitpunkten (2, 6-7, 20, 60, 120, 240, 360, 480 min) Blut entnommen. Es wurde ein kleiner Teil des Schwanzes abgekappt und das Blut tropfenweise entnommen. Pro Zeitwert wurden 50 µl Vollblut gewonnen und sofort auf Eis gestellt. Das Vollblut, zuvor 1:2 mit PBS verdünnt, wurde bei 4 °C für 10 min bei 16,000 x *g* zentrifugiert und das Serum bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

Die Ermittlungen der relativen TRAIL-Konzentrationen erfolgte mittels eines TRAIL-ELISAs (BD Biosciences; BD OptEIA Human TRAIL ELISA Set), der von der Arbeitsgruppe Prof. Harald Wajant, Abteilung für Molekulare Innere Medizin des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt wurde.

3.5.2 Tumormodell

Die Bewertung der antitumoralen Effekte ausgewählter TRAIL-Fusionsproteine *in vivo* wurde an einem humanen Kolonkarzinom-Modell in Nacktmäusen durchgeführt.

Für das Modell wurden weibliche Tiere der Linie NMRI nu/nu von der Firma Janvier (Le Genest St Isle, Frankreich) bezogen.

Das Experiment setzte sich aus 3 Behandlungsgruppen (n=7) und einer Kontrollgruppe (n=7) zusammen. Dabei wurden die Tumoren mit folgenden Proteinen behandelt: a) Flag-scTRAIL, b) scFv_{erbB2}-F-TRAIL und c) scFv_{erbB2}-F-scTRAIL.

3.5.2.1 Subkutane Zellinjektion in Nacktmäuse

Zur Applikation der humanen Kolonkarzinomzellen Colo205 wurden die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, gewaschen und in PBS aufgenommen. Dabei wurden 3×10^6 Zellen in 100 μ l PBS, dem mit Isolflo (Abott GmbH, Wiesbaden) narkotisierten Rezipiententier, subkutan injiziert.

3.5.2.2 Ankonzentrieren der Zellkulturüberstände

Da keine geeignete Reinigungsmethode für die TRAIL-Moleküle vorlag, erfolgte die Behandlung der Tumoren mit ankonzentrierten Zellkulturüberständen. Dazu wurden die Zellkulturüberstände in VISKING Dialysierschläuche (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) mit einer Ausschlussgrenze von 14 kDa gefüllt und in einer Schale vollständig mit PEG 35000 bedeckt. Die Dialysierschläuche wurden vor der Verwendung für 10 min in 30 g/l Na₂CO₃ in der Mikrowelle aufgekocht, mit Wasser gewaschen und in einer 1 mM EDTA-Lösung autoklaviert. Die bis zu 1250-fache Volumenreduktion erfolgte bei 4°C.

Als Kontrolle diente Zellkulturüberstand von Zellen, die stabil den Leervektor pIRESpuro3 exprimierten.

Die Proteinkonzentrate wurden in der Ultrazentrifuge zweimalig 1 Stunde bei 50,000 x g zentrifugiert, um die Sterilität der Proteine zu gewährleisten.

3.5.2.3 Therapie

Nachdem die subkutanen Tumoren eine Größe von durchschnittlich 25 mm² erreicht hatten (ca. 8 Tage nach der subkutanen Zellinjektion) und eine Tumervaskularisierung makroskopisch zu erkennen war, wurde mit der peritumoralen Behandlung begonnen.

Jedes Versuchstier erhielt an vier aufeinander folgenden Tagen eine tägliche Behandlung mit 10 μmol des entsprechenden Proteins in einem Volumen von 100 μl .

3.5.2.4 Monitoring des Tumorwachstums

Die Bestimmung der Tumorgröße erfolgte über die Ermittlung der Tumorfläche. Dazu wurde bis einschließlich 5 Tage nach Behandlungsbeginn täglich und ab diesem Zeitpunkt jeden zweiten Tag der längste Durchmesser sowie der dazu orthogonale Durchmesser mit einer Schieblehre bestimmt.

Die statistischen Auswertungen der Tumorgrößen wurden mit der Software GraphPad Prism4 durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. Die Signifikanzberechnung der Unterschiede im Tumorwachstum in den verschiedenen Experimentalgruppen erfolgte mittels des zweiseitigen t-Tests für ungepaarte Stichproben. Die Signifikanzgrenze für die berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit (p) wurde als $p < 0,05$ definiert.

4. Ergebnisse

TRAIL liegt in seiner bioaktiven Form als ein nichtkovalent verbundenes Homotrimer vor (Hymowitz *et al.*, 1999). Ein neues Proteindesignkonzept zur potentiellen Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften und der Bioaktivität ist die Herstellung rekombinanter Einzelketten (*single-chain*) TRAIL-Moleküle (scTRAIL). Dabei wird einerseits eine Stabilisierung der Trimere erreicht. Diese wurden in Anlehnung an bereits beschriebene scTNF-Varianten (Krippner-Heidenreich *et al.*, 2008) durch die Fusion dreier cDNA-TRAIL-Module über zwei Glycin-Serin-Linker generiert und im Vergleich zu konventionellen, homotrimeren TRAIL-Konstrukten charakterisiert. Andererseits bieten scTRAIL-Moleküle für die Herstellung von Antikörper-Zytokin-Fusionsproteinen eine neue Stöchiometrie der funktionellen Domänen und damit auch verringerte Gesamtmasse des Moleküls, was vielfältige Auswirkungen auf die Herstellung, pharmakokinetische und funktionelle Eigenschaften des Fusionsproteins haben kann. scTRAIL basierte Fusionsproteine wurden im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelt und mit konventionellen, homotrimeren Fusionsproteinen gleicher Spezifität verglichen.

4.1 Vergleichende Charakterisierung von Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL

Sowohl das homotrimere als auch das Einzelketten-TRAIL-Konstrukt verfügen über ein N-terminales Signalpeptid (L), das die Sezernierung des Proteins in den Zellkulturüberstand ermöglicht, gefolgt von einem *Flag-Tag* (F), zur Detektion und Reinigung der Proteine. C-terminal schließt sich beim Flag-TRAIL ein TRAIL-Modul, die lösliche extrazelluläre Domäne von humanem TRAIL (AS 95-281), und beim scTRAIL, das über (Gly₃Ser)₄-Linker verbundene TRAIL-Trimer an.

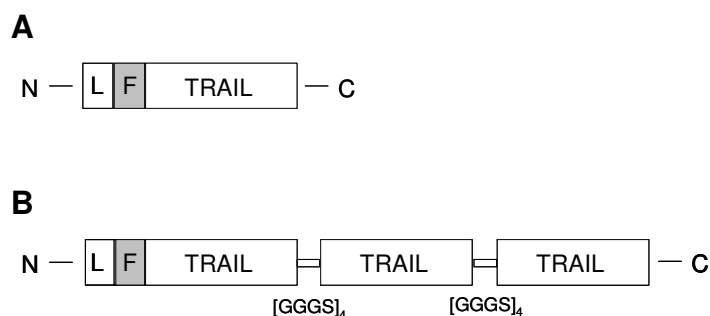


Abb. 1: Schematischer Aufbau von Flag-TRAIL (A) und Flag-scTRAIL (B).
L: Leader-Sequenz; F: *Flag-Tag*; humaner TRAIL: AS 95-281.

4.1.1 Expression in HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden pRESpuro3-leader-Flag-TRAIL und pRESpuro3-leader-Flag-scTRAIL transfiziert. Die Zellkulturüberstände mit den transient und stabil exprimierten Proteinen wurden mittels Western Blot analysiert und verglichen. Da die Expression in den stabilen Zelllinien sehr schwach ($< 0,5 \mu\text{g/ml}$) war, wurden die Proteine nachfolgend transient exprimiert. Die Konzentrationsabschätzung der transient produzierten Proteine erfolgte mittels Western Blot unter reduzierenden Bedingungen gegen das Referenzprotein mo33-Flag-FasL (Abb. 2). Das Molekulargewicht von 22 kDa für Flag-TRAIL entsprach dem kalkulierten Molekulargewicht des löslichen TRAIL-Monomers. Die Proteinbande für Flag-scTRAIL entsprach ebenso dem kalkulierten Molekulargewicht von 71 kDa. Sowohl für Flag-TRAIL als auch für Flag-scTRAIL wurde eine mittlere Konzentration von 30 nM ermittelt. Dabei wurde berücksichtigt, dass ein monomeres scTRAIL-Molekül, welches formal ein trimeres TRAIL-Molekül darstellt, mit nur einem Flag-Peptid versehen ist, wohingegen homotrimerer TRAIL drei Flag-Peptide enthält.

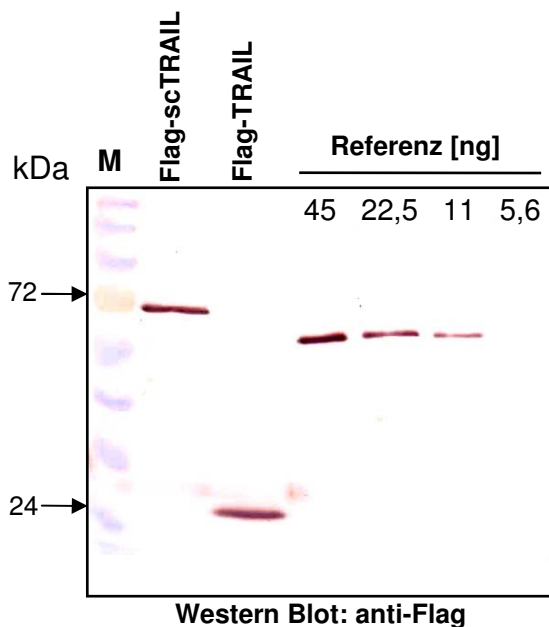


Abb. 2: Western Blot Analyse der transienten Produktion von Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL zur Proteinkonzentrationsabschätzung. HEK293-Zellen wurden wie unter 3.3.2.1 beschrieben transfiziert und die entsprechenden Zellkulturüberstände mittels SDS-Gelelektrophorese (10 %, reduzierend) und Western Blot analysiert. Es wurden jeweils 30 μl Überstand aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit anti-Flag M2 mAk und einem AP-konjugierten anti-Maus-IgG mAk. M = Marker.

4.1.2 M2-Affinitätschromatographie der Flag-TRAIL-Moleküle

Die Auftrennung von Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL aus dem Zellkulturüberstand erfolgte mittels M2 (anti-Flag)-Agarose Affinitätschromatographie wie unter 3.4.1 beschrieben. Zur Analyse der Auftrennung wurden eine SDS-Gelelektrophorese und ein Western Blot durchgeführt (Abb. 3). Dieser zeigte, dass bei der Auftrennung beider TRAIL-Moleküle Protein im Durchlauf war, d. h. nicht das gesamte Protein des Überstands an die Säule gebunden hatte. Eine eingeschränkte Bindungskapazität des Säulenmaterials konnte dabei ausgeschlossen werden. Weiter zeigte die Analyse, dass nach der Elution jeweils noch ein großer Teil beider Proteine im sauren Waschschrift zu detektieren war. Aufgrund der Instabilität im sauren pH-Bereich konnten die in dieser Fraktion enthaltenen Proteine nicht verwendet werden, wodurch die Proteinausbeute weiter verringert wurde. Die Proteinkonzentrationsbestimmung für Flag-TRAIL ergab nur eine Konzentration von 35 µg/ml und für Flag-scTRAIL nur eine Konzentration von 40 µg/ml. Die Gesamtausbeute aus 300 ml Zellkulturüberstand betrug somit nur 175 µg für Flag-TRAIL und 200 µg für Flag-scTRAIL. Die Aufreinigung der beiden TRAIL-Moleküle über die M2-Affinitätschromatographie erwies sich daher zwar für proteinanalytische Methoden als ausreichend, aber für umfangreiche, funktionelle Studien, insbesondere tierexperimentelle Studien, als wenig geeignet. Da alternative Aufreinigungsmethoden wie Protein L-Affinitätschromatographie, Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC), Hydroxyapatit, Ionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose, DEAE-Sepharose) und Hydrophobe Interaktionschromatographie (Phenyl-Sepharose), die für die Tumorantigen-spezifischen TRAIL-Varianten ausgetestet wurden, ebenfalls zu hohen Proteinverlusten führten oder nicht die gewünschte Reinheit der Proteine lieferten, wurden die folgenden Experimente zur Proteincharakterisierung hauptsächlich mit Zellkulturüberstand durchgeführt.

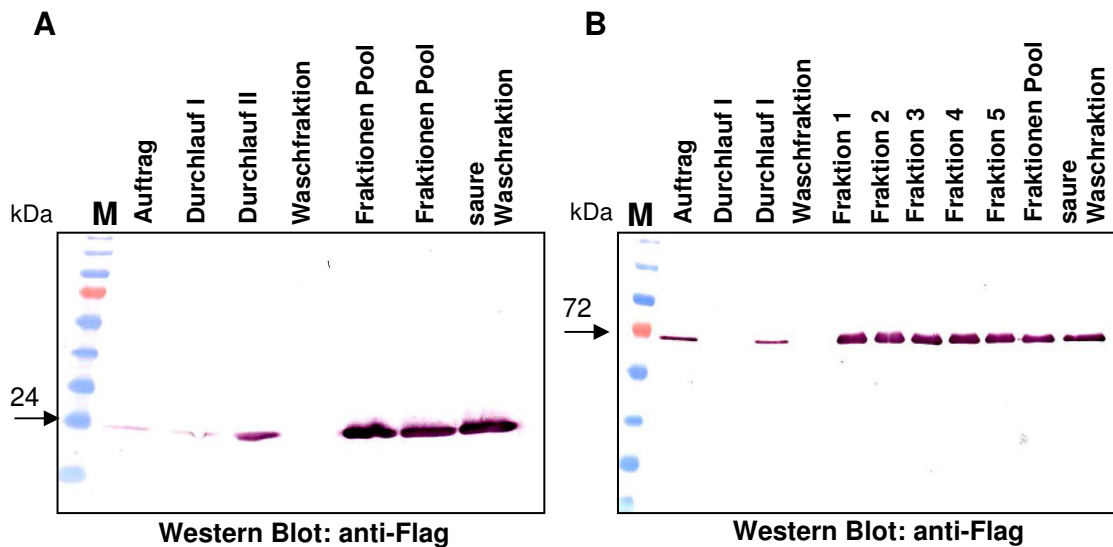


Abb. 3: Western Blot Analyse der Flag-TRAIL- (A) und Flag-scTRAIL-M2-Affinitätschromatographie (B). Die Auftrennungen wurden wie unter 3.4.1 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden jeweils 300 ml Zellkulturüberstand über eine 1 ml Säule aufgetrennt. Die gebundenen Proteine wurden mit 100 µg/ml Flag-Peptid eluiert. Es wurden jeweils 30 µl Probe der einzelnen Auftrennungsschritte aufgetragen und mittels SDS-Gelelektrophorese (10 %, reduzierend) und Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit anti-Flag M2 mAk und einem AP-konjugierten anti-Maus-IgG mAk. M = Marker.

4.1.3 *in vitro* Bioaktivität

Die *in vitro* Bioaktivitäten von Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL wurden auf Jurkat-, HT1080-, und Colo205-Zellen untersucht. Diese Zelllinien zeigten eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber TRAIL, welche u. a. auf die unterschiedlichen Expressionsprofile der beiden Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 zurückzuführen ist (s. Tab. 5, S. 56).

a) Jurkat-Zellen

Jurkat-Zellen exprimieren nur den TRAIL-R2 (Tab. 5, S. 56), der durch die lösliche Form des TRAIL kaum aktiviert wird. Membrangebundener TRAIL oder aber sekundär quervernetzter löslicher TRAIL führt dagegen zu einer effizienten Aktivierung des TRAIL-R2 und somit zur Induktion der Apoptose auf Jurkat-Zellen (Schneider *et al.*, 1998; Mühlenbeck *et al.*, 2000; Wajant *et al.*, 2001). Beide TRAIL-Moleküle zeigten fast keine Bioaktivität auf Jurkat-Zellen (Abb. 4A). Abbildung 4B zeigt dagegen die Bioaktivität beider Proteine nach Quervernetzung mit dem anti-Flag M2 mAk. Dabei hatte das konventionelle, homotrimere TRAIL-Molekül unter diesen speziellen Versuchsbedingungen eine um den Faktor 25 höhere Bioaktivität

im Vergleich zum einzelkettigen scTRAIL. Die mittleren EC₅₀-Werte und die Standardabweichungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Wie erwartet deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass beide Moleküle als bioaktive Trimere vorlagen, da wie oben beschrieben Trimere keine Bioaktivität auf TRAIL-R1/R2⁺-Zellen zeigen dürfen und die Moleküle nach Quervernetzung in höhermolekularen Anordnungen wie erwartet Bioaktivität über den TRAIL-R2 aufwiesen.

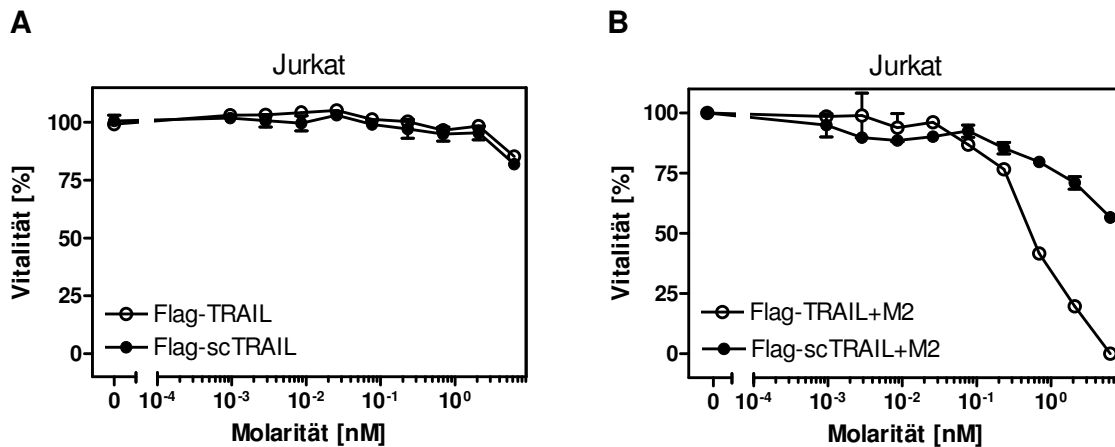


Abb. 4: (A) Keine Bioaktivität von Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL auf Jurkat-Zellen. 1×10^5 Jurkat-Zellen/*well* wurden in eine 96-*well*-Flachboden-Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 16 Stunden mit den TRAIL-Molekülen stimuliert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels der MTT-Methode. **(B) Bioaktivität auf Jurkat-Zellen nach Quervernetzung mit dem anti-Flag M2 mAk.** Durchführung der Zytotoxizitäts-Tests wie in (A) in Anwesenheit des anti-Flag M2 mAks (2,5 µg/ml). Abgebildet sind die Mittelwerte +/- SD eines repräsentativen Experiments (mit Doppelwerten) von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 1: EC₅₀-Werte von Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL auf Jurkat-Zellen.

	EC ₅₀ -Werte [nM]			MW +/- SD [nM]
Flag-TRAIL	> 6,25	> 6,25	> 6,25	-
Flag-scTRAIL	> 6,25	> 6,25	> 6,25	-
Flag-TRAIL +M2	0,4	0,3	0,1	0,26 +/- 0,15
Flag-scTRAIL +M2	> 6,25	> 6,25	> 6,25	-

Die angegebenen EC₅₀-Werte wurden aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Doppelwerten ermittelt.

b) HT1080-Zellen

HT1080-Zellen exprimieren den TRAIL-R1 und den TRAIL-R2 (Tab. 5, S. 56) und induzieren – nach Sensitivierung mit Cyclohexamid – Apoptose über diese beiden TRAIL-Rezeptoren, wobei der TRAIL-R2 hierbei eine größere Rolle zu spielen scheint (Kelley *et al.*, 2005).

Die Stimulation von HT1080-Zellen mit Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL ergab eine annähernd vergleichbare Bioaktivität der rekombinanten Proteine (Abb. 5A). Der EC_{50} -Wert für Flag-TRAIL auf HT1080-Zellen lag bei $1,33 \pm 0,58$ nM und für Flag-scTRAIL bei $5,33 \pm 0,58$ nM. Dagegen führte die Quervernetzung mit dem anti-Flag M2 mAk nicht nur zu einer Steigerung der Bioaktivität an sich, sondern auch zu einem Aktivitätsunterschied der beiden Proteine. So zeigte das konventionelle, homotrimere TRAIL-Molekül eine um den Faktor 50 höhere Bioaktivität im Vergleich zum einzelkettigen scTRAIL (Abb. 5B). Die mittleren EC_{50} -Werte und die Standardabweichungen sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Dies deutete, wie bereits auf Jurkat-Zellen, auf eine deutlich verminderte Aktivität des quervernetzten Flag-scTRAILs gegenüber TRAIL-R2. Möglich wäre aber auch, dass Flag-TRAIL wegen der höheren Anzahl an Flag-Peptiden einfach nur besser quervernetzt werden kann.

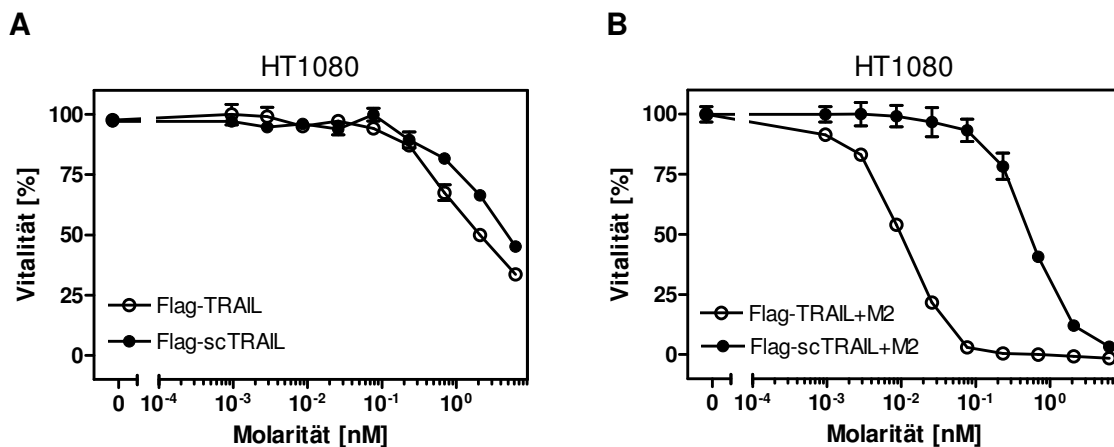


Abb. 5: (A) Vergleichbare Bioaktivität von Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL auf HT1080-Zellen. 2×10^4 HT1080-Zellen/well wurden in eine 96-well-Flachboden-Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit CHX (2,5 µg/ml) vorbehandelt und für 16 Stunden mit den TRAIL-Molekülen stimuliert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels Kristallviolett-Färbung. **(B) Höhere Bioaktivität von Flag-TRAIL auf HT1080-Zellen nach Quervernetzung mit dem anti-Flag M2 mAk.** Durchführung der Zytotoxizitäts-Tests wie in (A) in Anwesenheit des anti-Flag M2 mAks (2,5 µg/ml). Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Experiments (mit Doppelwerten) von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 2: EC₅₀-Werte von Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL auf HT1080-Zellen.

	EC ₅₀ -Werte [nM]			MW +/- SD [nM]
Flag-TRAIL	2,0	1,0	1,0	1,33 +/- 0,58
Flag-scTRAIL	5,0	6,0	5,0	5,33 +/- 0,58
Flag-TRAIL +M2	0,01	0,01	0,009	0,009 +/- 0,001
Flag-scTRAIL +M2	0,5	0,5	0,5	0,5 +/- 0,00

Die angegebenen EC₅₀-Werte wurden aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Doppelwerten ermittelt.

c) Colo205-Zellen

Colo205-Zellen exprimieren den TRAIL-R1 und den TRAIL-R2 (Tab. 5, S. 56) und sind als TRAIL-sensitiv beschrieben (Ashkenazy *et al.*, 1999; Walczak *et al.*, 1999). Da bei den hier verwendeten Colo205-Zellen erst relativ hohe TRAIL-Konzentrationen zytotoxisch wirkten, wurden diese Zellen ebenfalls mit Cyclohexamid sensitiviert. Dabei zeigte die Stimulation der Colo205-Zellen mit Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL eine annähernd vergleichbare Bioaktivität der beiden rekombinanten Proteine auf. Wie in Abbildung 6A dargestellt lag die Bioaktivität von Flag-TRAIL weniger als um den Faktor 2 unter der Bioaktivität von Flag-scTRAIL. Die Quervernetzung mit dem anti-Flag M2 mAk resultierte in einer Steigerung der Bioaktivität beider Moleküle. So sank der EC₅₀-Wert von Flag-TRAIL ungefähr um den Faktor 35 und von Flag-scTRAIL um den Faktor 6 (Abb. 6B). Die mittleren EC₅₀-Werte und die Standardabweichungen sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Obwohl auch hier, wie bereits auf Jurkat- und HT1080-Zellen, die Aktivitätssteigerung nach Quervernetzen mit dem anti-Flag M2 mAk für Flag-TRAIL höher ausfiel als für Flag-scTRAIL, waren die Bioaktivitäten der beiden Moleküle ohne bzw. mit Quervernetzen jeweils annähernd vergleichbar.

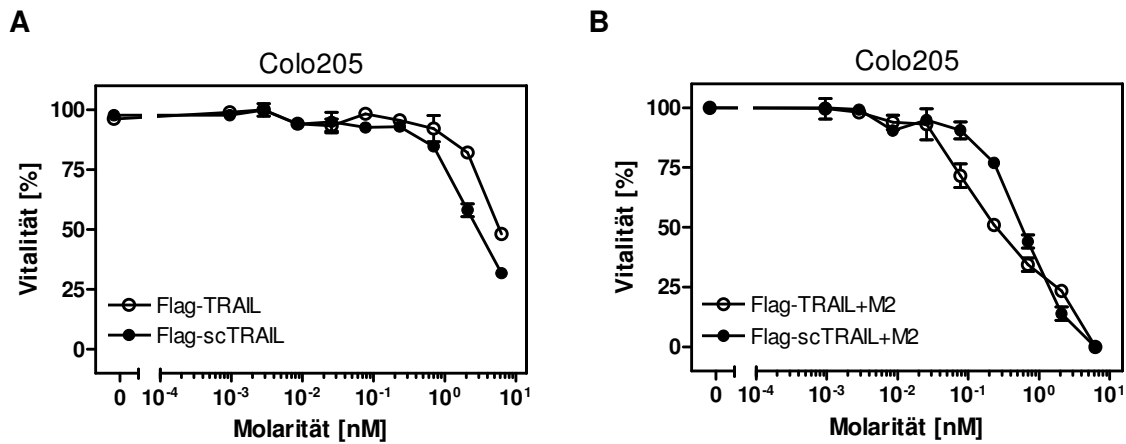


Abb. 6: (A) Vergleichbare Bioaktivität von Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL auf Colo205-Zellen. (A) 5×10^4 Colo205-Zellen/*well* wurden in eine 96-*well*-Flachboden-Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit CHX (2,5 µg/ml) vorbehandelt und für 16 Stunden mit den TRAIL-Molekülen stimuliert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels der MTT-Methode. **(B) Vergleichbare Bioaktivität von Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL auf Colo205-Zellen nach Quervernetzung mit dem anti-Flag M2 mAk.** Durchführung der Zytotoxizitäts-Tests wie in (A) in Anwesenheit des anti-Flag M2 mAks (2,5 µg/ml). Abgebildet sind die Mittelwerte +/- SD eines repräsentativen Experiments (mit Doppelwerten) von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 3: EC₅₀-Werte von Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL auf Colo205-Zellen.

	EC ₅₀ -Werte [nM]			MW +/- SD [nM]
Flag-TRAIL	6,0	6,0	6,25	6,08 +/- 0,14
Flag-scTRAIL	3,0	4,0	4,0	3,66 +/- 0,58
Flag-TRAIL +M2	0,1	0,2	0,2	0,17 +/- 0,06
Flag-scTRAIL +M2	0,7	0,6	0,6	0,63 +/- 0,06

Die angegebenen EC₅₀-Werte wurden aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Doppelwerten ermittelt.

4.1.4 *in vitro* Stabilität

Für löslichen TNF und scTNF wurden bereits unterschiedliche Eigenschaften beschrieben (Krippner-Heidenreich *et al.*, 2008). So resultierte die Konstruktion des scTNF z. B. in einer verbesserten *in vitro* Stabilität.

Die *in vitro* Stabilität von Flag-TRAIL im Vergleich zu Flag-scTRAIL - im Zellkulturüberstand unter der Zugabe von 10 % FCS (hitzeinaktiviert) - wurde in Konzentrationen von 1 µg/ml bis 1 ng/ml bei 37°C über einen Zeitraum von 7 Tagen verfolgt. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurde die Stabilität der Moleküle durch die verbliebene Bioaktivität auf HT1080-Zellen demonstriert. Flag-TRAIL (Abb. 7, A-D) ebenso wie Flag-scTRAIL (Abb.7, E-H) zeigten keinen Aktivitätsverlust. Das bedeutete, dass das konventionelle, homotrimere Protein nicht

in Monomere dissoziierte und das Einzelketten-Proteindesign unter den gewählten *in vitro* Bedingungen in keinem offensichtlichen Stabilitätsvorteil resultierte.

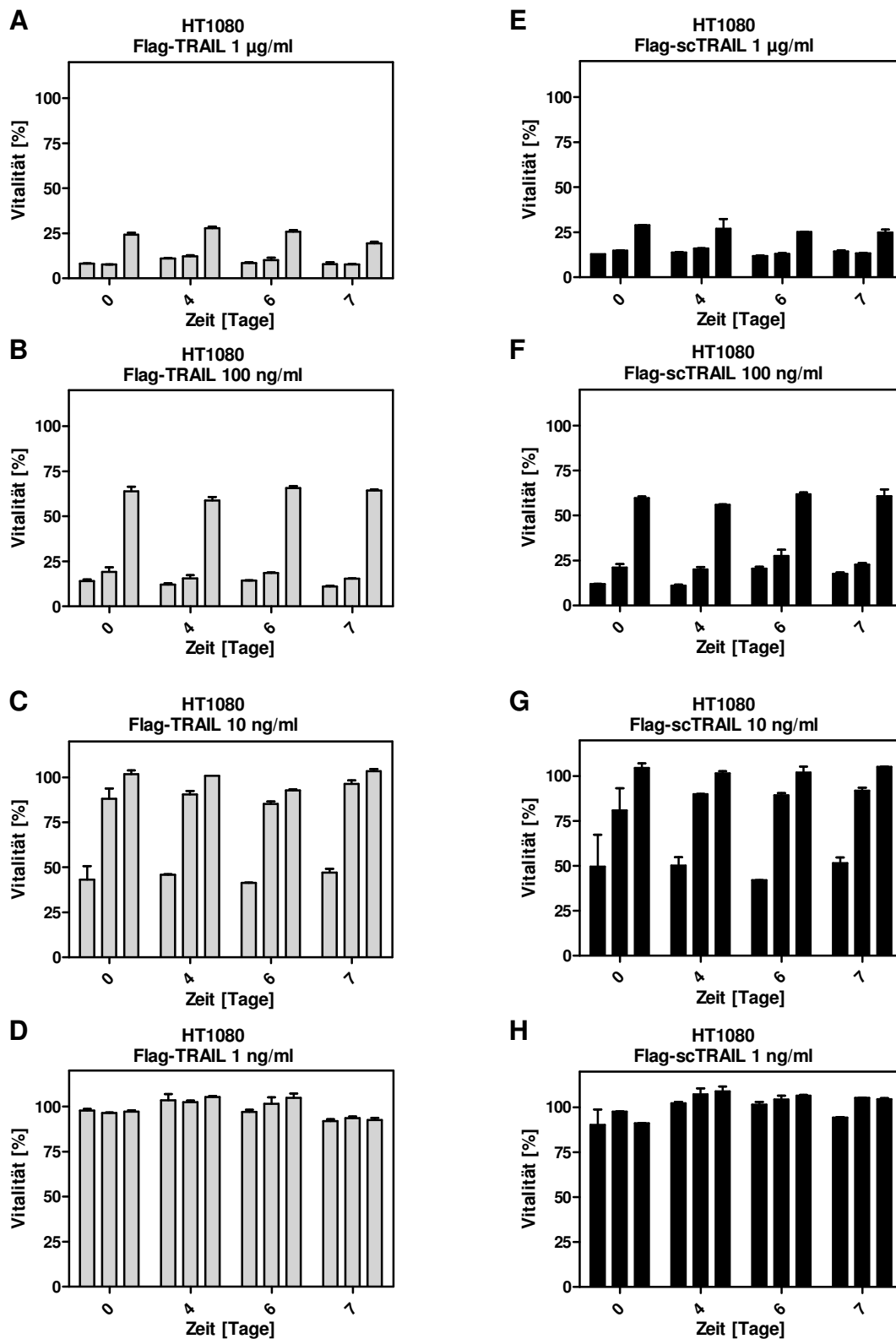


Abb. 7: *In vitro* Stabilität von Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL. Flag-TRAIL (A-D) und Flag-scTRAIL (E-H) wurden in den entsprechenden Proteinkonzentrationen in Anwesenheit von 10 % FCS (hitzeinaktiviert) für die angegebenen Zeiträume bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf HT1080-Zellen titriert wurden (pro Zeitwert: angegebene Konzentration 1:2 (linker Balken), 1:8 (mittlerer Balken) und 1:32 (rechter Balken) verdünnt). 2×10^4 HT1080-Zellen/well wurden in eine 96-well-Flachboden-Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit CHX (2,5 µg/ml) vorbehandelt und für 16 Stunden mit den TRAIL-Molekülen stimuliert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels Kristallviolett-Färbung. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Experiments (mit Doppelwerten) von zwei unabhängigen Experimenten.

4.1.5 Pharmakokinetische Untersuchungen zur Ermittlung der Serumhalbwertszeit

Für TRAIL wurden bereits pharmakokinetische Studien in Mäusen, Javaneraffen und Schimpansen durchgeführt. Diese ergaben eine schnelle Elimination aus dem Serum in allen untersuchten Spezies. Die ermittelten Halbwertszeiten für TRAIL liegen bei ungefähr 5 min in Nagern und 30 min in nichthumanen Primaten (Kelley *et al.* 2001). In dieser Arbeit sollte das pharmakokinetische Profil des konventionellen, homotrimeren Flag-TRAIL-Moleküls im Vergleich zum einzelkettigen Flag-scTRAIL-Molekül über einen Zeitraum von 480 min erstellt werden. Diese Untersuchungen wurden auch schon für TNF im Vergleich zu scTNF durchgeführt und zeigten hier eine schnellere Elimination des homotrimeren TNFs, vermutlich aufgrund der Dissoziation in seine monomeren Untereinheiten (Krippner-Heidenreich *et al.*, 2008). Die Serumkonzentrationen der TRAIL-Moleküle wurden nach i. v. Injektion einer einmaligen Dosis von 1 μmol in Abhängigkeit der Zeit in Balb/c Mäusen bestimmt. Die beiden Moleküle zeigten dabei über einen Zeitraum von 480 min eine annähernd vergleichbare Reduktion der Serumkonzentrationen (Abb. 8). Es wurde ein schneller Abfall der Serumspiegel um 20-30 % beider Proteine zwischen den ersten beiden Zeitpunkten beobachtet. Möglicherweise wurden die Proteine sehr schnell absorbiert. Nach 120 min war Flag-TRAIL auf ungefähr 40 % und Flag-scTRAIL auf ungefähr 20 % seiner Ausgangskonzentration reduziert. Nach 240 min waren die beiden Moleküle zu ungefähr 90 % aus der Zirkulation ausgeschieden. Demnach war Flag-TRAIL *in vitro* über den angegebenen Zeitraum überraschenderweise etwas stabiler als Flag-scTRAIL. Die entsprechenden AUC-Werte sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

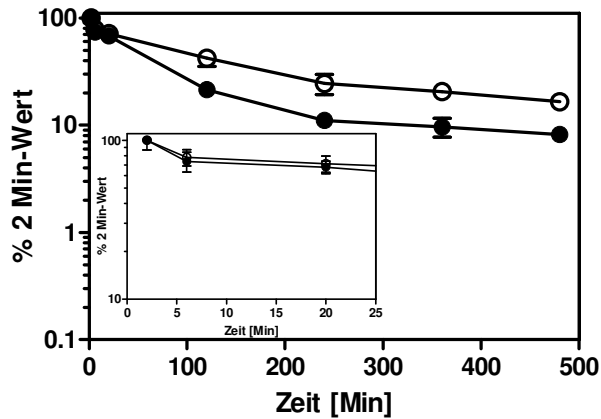


Abb. 8: *In vivo* Serumstabilität von Flag-TRAIL (○) und Flag-scTRAIL (●). 1 µmol/Molekül wurde i. v. in Balb/c Mäuse ($n=3$) injiziert. Die Serumkonzentrationen der TRAIL-Moleküle wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten mittels ELISA bestimmt. Die Daten wurden normalisiert wobei der erste Zeitpunkt (2 Min) als maximale Konzentration angenommen wurde. Abgebildet sind die Mittelwerte +/- SEM eines repräsentativen Experiments (mit Dreifachwerten) von zwei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 4: AUC (*area under the curve*) der TRAIL-Moleküle.

	AUC (2-480 min) [% x min]
Flag-TRAIL	15 980 +/- 813
Flag-scTRAIL	10 061 +/- 1102

Die angegebenen AUC-Werte wurden aus jeweils einem Experiment mit Dreifachwerten ermittelt.

4.2 Vergleichende Charakterisierung von Tumorantigen spezifischen scFv-Flag-TRAIL und scFv-Flag-scTRAIL-Fusionsproteinen

Im Vergleich zu normalen, nicht transformierten Zellen zeichnen sich Tumorzellen durch ein qualitativ und/oder quantitativ unterschiedliches Repertoire an Zell-Oberflächenmolekülen aus, die als Zielstrukturen für eine selektive Tumorthherapie dienen können.

So konnte z. B. gezeigt werden, dass die tumorselektive Bindung und somit auch die Bioaktivität von löslichem TRAIL durch Fusion mit einem tumorspezifischen Antikörperfragment erhöht werden kann, da dieses durch die Bindung an das Antigen Membran-TRAIL-ähnliche Eigenschaften erlangt (Wajant *et al.*, 2001; Bremer *et al.*, 2004a).

4.2.1 TRAIL-Fusionsproteine mit Spezifität für ErbB2

Ausgehend von den in Abschnitt 4.1 charakterisierten, rekombinanten TRAIL Molekülen wurden TRAIL-Fusionsproteine mit Spezifität für das humane Oberflächenantigen ErbB2 - durch Fusion mit einem ErbB2-spezifischen scFv - konstruiert. ErbB2 auch bekannt als Her2/neu gehört zur EGFR- oder ErbB-Familie der Typ I Rezeptor-Tyrosinkinase (RTKs) (Coussens *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1986) und ist in vielen soliden Tumoren überexprimiert.

Beide Moleküle verfügen über ein N-terminales Signalpeptid (L), gefolgt von einem scFv (scFv_{erbB2}), der spezifisch das FRP5-Epitop der extrazellulären ErbB2 Domäne erkennt (Harwerth *et al.*, 1992; Wels *et al.*, 1992a). Daran schließt sich ein *Flag-Tag* und beim scFv_{erbB2}-F-TRAIL ein TRAIL-Modul an (Abb. 9A). Beim scFv_{erbB2}-F-scTRAIL wurde C-terminal das scTRAIL, das über (Gly₃Ser)₄-Linker verbundene TRAIL-Trimer, angehängt (Abb. 9B).

A



B

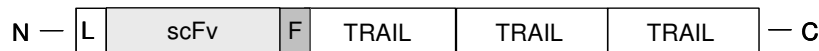


Abb. 9: Schematischer Aufbau von scFv-Flag-TRAIL (A) und scFv-Flag-scTRAIL (B).

L: Leader-Sequenz; scFv: *single-chain variable fragment*; F: *Flag-Tag*; humaner TRAIL: AS 95-281.

4.2.1.1 Expression in HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden pIRESpuro3-leader-scFv_{erbB2}-Flag-TRAIL und pIRESpuro3-leader-scFv_{erbB2}-Flag-scTRAIL wie unter 3.3.2.2 beschrieben transfiziert, um die Proteine stabil zu exprimieren. Die Selektion erfolgte bei einer Puromycinkonzentration von 2 µg/ml. Die Konzentrationsabschätzung der stabil produzierten Proteine erfolgte mittels Western Blot unter reduzierenden Bedingungen gegen das Referenzprotein scFv36-F-scmuTNF (Abb. 10). Die kalkulierten Molekulargewichte von 98 kDa für scFv_{erbB2}-F-scTRAIL und von 50 kDa für scFv_{erbB2}-F-TRAIL entsprachen den im Western Blot ermittelten Größen der jeweiligen Monomere gut. Aufgrund dieser Analyse, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Anzahl von Flag-Peptiden (wie in 4.1.1 beschrieben), wurden die

Proteinkonzentrationen für intaktes scFv_{erbB2}-F-TRAIL auf 10,6 nM und für scFv_{erbB2}-F-scTRAIL auf 16 nM abgeschätzt. Weiter wurden im Western Blot des scFv_{erbB2}-F-scTRAIL niedermolekulare Banden von ungefähr 71 kDa und, weniger ausgeprägt, bei ungefähr 50 kDa mit dem anti-Flag M2 mAk festgestellt. Dies könnte von der Masse verschiedenen Spaltprodukten des komplexen Fusionsproteins entsprechen, bei dem das scFv-Modul (Bande bei 71 kDa) bzw. die zwei C-terminalen TRAIL-Module (Bande bei 50 kDa) abgespalten wurden. Beim scFv_{erbB2}-F-TRAIL-Fusionsprotein dominierte eine Doppelbande bei 50/55 kDa, dies wurde unter 4.2.1.4 näher untersucht.

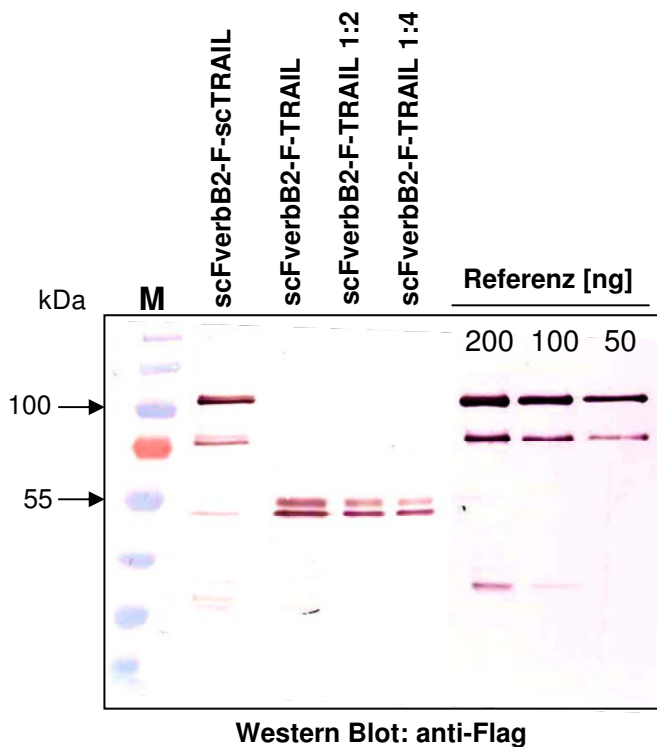


Abb. 10: Western Blot Analyse der stabilen Produktion von scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL zur Proteinkonzentrationsabschätzung. HEK293-Zellen wurden wie unter 3.3.2.2 beschrieben transfiziert und die entsprechenden Zellkulturüberstände mittels SDS-Gelelektrophorese (10 %, reduzierend) und Western Blot analysiert. Es wurden jeweils 30 µl Überstand aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit anti-Flag M2 mAk und einem AP-konjugierten anti-Maus-IgG mAk. M = Marker.

4.2.1.2 M2-Affinitätschromatographie der scFv_{erbB2}-Flag-TRAIL-Moleküle

Die Auftrennung von scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL aus dem Zellkulturüberstand erfolgte mittels M2 (anti-Flag)-Agarose Affinitätschromatographie wie unter 3.4.1 beschrieben. Zur Analyse der Auftrennung wurden eine SDS-

Gelelektrophorese und ein Western Blot durchgeführt (Abb. 11). Dieser zeigte, dass bei der Auftrennung beider Moleküle Protein im Durchlauf war, d. h. nicht das gesamte Protein des Überstands an die Säule gebunden hatte. Eine eingeschränkte Bindungskapazität des Säulenmaterials konnte dabei ausgeschlossen werden. Weiter zeigte die Analyse, dass nach der Elution jeweils noch ein Teil beider Proteine im sauren Waschschrift zu detektieren war. Aufgrund der Instabilität im sauren pH-Bereich konnten die in dieser Fraktion enthaltenen Proteine nicht verwendet werden, wodurch die Proteinausbeute weiter verringert wurde. Die Proteinkonzentrationsbestimmung für scFv_{erbB2}-F-TRAIL ergab nur eine Konzentration von 45 µg/ml und für scFv_{erbB2}-F-scTRAIL nur eine Konzentration von 35 µg/ml. Die Gesamtausbeute aus 300 ml Zellkulturüberstand betrug somit nur 225 µg für scFv_{erbB2}-F-TRAIL und 175 µg für scFv_{erbB2}-F-scTRAIL. Die Aufreinigung der beiden scFv_{erbB2}-TRAIL-Moleküle über die M2-Affinitätschromatographie erwies sich daher zwar für proteinanalytische Methoden als ausreichend, aber für umfangreiche, funktionelle Studien, insbesondere tierexperimentelle Studien, als wenig geeignet. Da alternative Aufreinigungsmethoden wie Protein L-Affinitätschromatographie, Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC), Hydroxyapatit, Ionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose, DEAE-Sepharose) und Hydrophobe Interaktionschromatographie (Phenyl-Sepharose) ebenfalls zu hohen Proteinverlusten führten oder nicht die gewünschte Reinheit der Proteine lieferten, wurden die folgenden Experimente zur Proteincharakterisierung hauptsächlich mit Zellkulturüberstand durchgeführt.

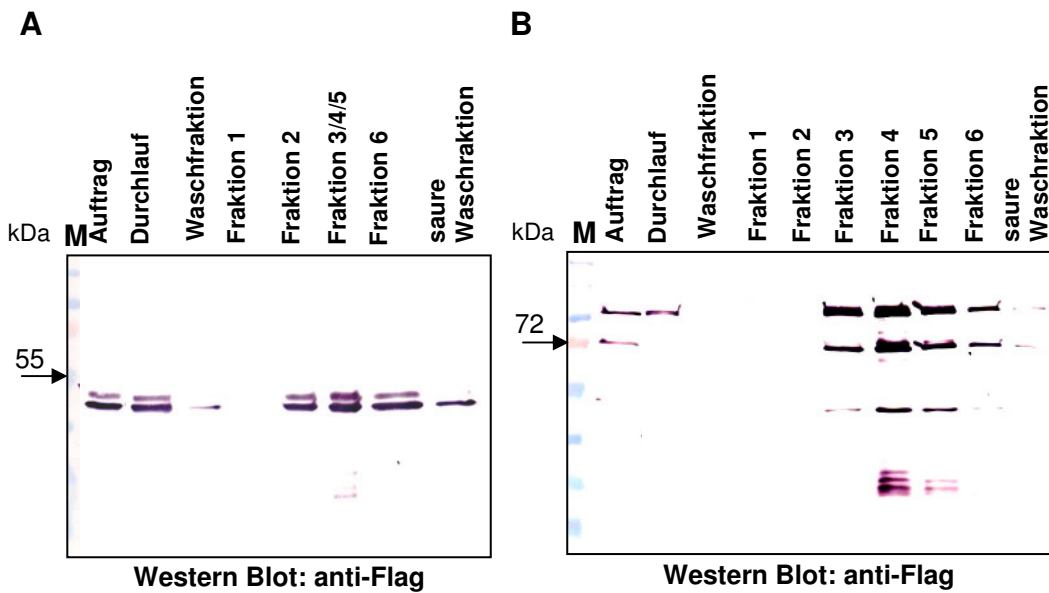


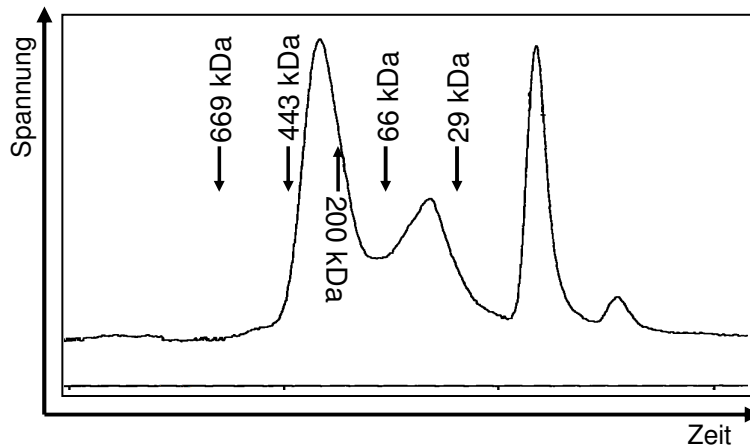
Abb. 11: Western Blot Analyse der scFv_{erbB2}-F-TRAIL- (A) und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL-M2-Affinitätschromatographie (B). Die Auftrennungen wurden wie unter 3.4.1 durchgeführt. Dazu wurden jeweils 300 ml Zellkulturüberstand über eine 1 ml Säule aufgetrennt. Die gebundenen Proteine wurden mit 100 µg/ml Flag-Peptid eluiert. Es wurden jeweils 30 µl Probe der einzelnen Auftrennungsschritte aufgetragen und mittels SDS-Gelelektrophorese (10 %, reduzierend) und Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit anti-Flag M2 mAk und einem AP-konjugierten anti-Maus-IgG mAk. M = Marker.

4.2.1.3 Größenausschlusschromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*)

Um die molekularen Massen von scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL unter nativen Bedingungen zu ermitteln, wurden die über die M2-Affinitätschromatographie gereinigten (Fraktionen 3/4/5), dialysierten und ankonzentrierten Proteine mittels HPLC Größenausschlusschromatographie (SEC) analysiert. Abbildung 12A zeigt das Elutionsprofil von scFv_{erbB2}-F-TRAIL. Dabei eluierte das Fusionsprotein bei 15,8 min. Im Vergleich zu Kalibrierstandards entsprach das einer Masse von ungefähr 300 kDa und somit einer hexameren Anordnung des Proteins. Der kleinere Peak bei 40-50 kDa deutete möglicherweise auf einen monomeren Anteil des Proteins hin. Abbildung 12B zeigt das Elutionsprofil von scFv_{erbB2}-F-scTRAIL. Dabei eluierte das Fusionsprotein mit einem Hauptpeak bei 16,8 min. Im Vergleich zu Kalibrierstandards entsprach das einer Masse von ungefähr 100 kDa und somit einer monomeren Anordnung des Proteins. Der Nebenpeak bestätigt das Vorkommen von den schon im Western Blot feststellbaren Fragmenten des Fusionsproteins, die aufgrund des vorhandenen *Flag-Tags* mitgereinigt werden. Beide Analysen zeigten einen weiteren Peak bei 20,8 min. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um Flag-Peptid, das aus

der aufgereinigten Proteinlösung durch Dialyse nicht vollständig entfernt werden konnte.

A



B

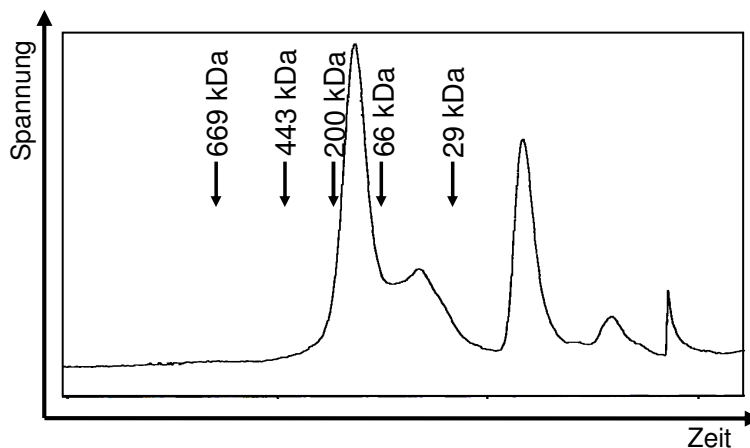


Abb. 12: SEC-Analysen von scFv_{erbB2}-F-TRAIL (A) und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL (B). Die TRAIL-Moleküle wurden mit der Säule BioSep-Sec-3000 analysiert und die molekularen Massen im Vergleich zu Kalibrierstandards ermittelt. Als mobile Phase diente PBS mit einer Flussrate von 0,5 ml/min.

4.2.1.4 Glykosylierung von scFv_{erbB2}-F-TRAIL

Die Western Blot Analyse zeigte, im Unterschied zu scFv_{erbB2}-F-scTRAIL, für scFv_{erbB2}-F-TRAIL eine klare Doppelbande (Abb.13). Die langsamer migrierende Bande könnte einer glykosylierten Form des Fusionsproteins entsprechen. Um dies abzuklären, wurde das Protein wie unter 3.4.5 beschrieben mittels Peptid-N-Glykosidase F (PNGaseF) verdaut. Die Western Blot Analyse zeigte nach dieser Behandlung nur noch eine Proteinbande in der Höhe des kalkulierten Molekulargewichts des intakten Fusionsproteins. Demzufolge liegt das

Fusionsprotein scFv_{erbB2}-F-TRAIL sowohl in N-glykosylierter als auch in nicht N-glykosylierter Form vor. Weiter wurde im Western Blot eine niedermolekulare Bande von ungefähr 30 kDa mit dem anti-Flag M2 mAk festgestellt. Dies könnte von der Masse einem Spaltprodukt des komplexen Fusionsproteins entsprechen, bei dem das scFv-Modul oder das TRAIL-Modul abgespalten wurde.

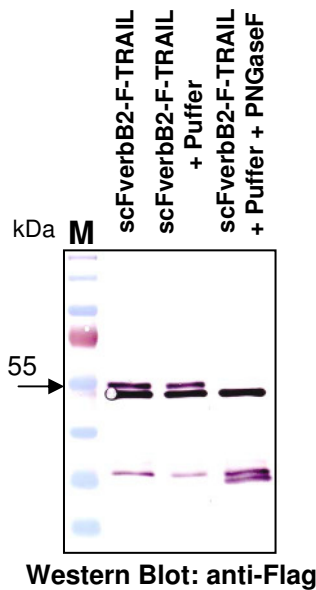


Abb. 13: Western Blot Analyse der Deglykosylierung von scFv_{erbB2}-F-TRAIL. 100 ng des aufgereinigten Proteins wurden 3 h bei 37 °C mit Deglykosylierungspuffern oder mit Deglykosylierungspuffern und PNGaseF inkubiert. Es wurden jeweils 100 ng Protein aufgetragen und mittels SDS-Gelelektrophorese (10 %, reduzierend) und Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit anti-Flag M2 mAk und einem AP-konjugierten anti-Maus-IgG mAk. M = Marker.

4.2.1.5 Bindung auf Antigen-positiven Zellen

Aufgrund der Unterschiede in der Multimerisierung der Fusionsproteine scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL wurden auch Unterschiede bezüglich der Antigenbindung erwartet. Wie in Abbildung 14A gezeigt, liegt scFv_{erbB2}-F-TRAIL vermutlich als Hexamer vor, es hat also sechs scFvs gegenüber einem scFv für scFv_{erbB2}-F-scTRAIL, das als Monomer vorliegt (Abb. 14B). Abbildung 14 zeigt die konzentrationsabhängige Bindung beider Fusionsproteine auf ErbB2-positiven Colo205-Zellen (Tab. 5, S. 56). Die Zelloberflächen-Bindung der Moleküle über die TRAIL-Domäne war minimal. Dies konnte mit der Bindung von F-TRAIL und F-scTRAIL auf Colo205-Zellen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Bindungsstudie demonstrierte eine um den Faktor 10 stärkere Bindung an Antigen-

positive Zellen für das hexamere Fusionsprotein scFv_{erbB2}-F-TRAIL im Vergleich zum monomeren Fusionsprotein scFv_{erbB2}-F-scTRAIL.

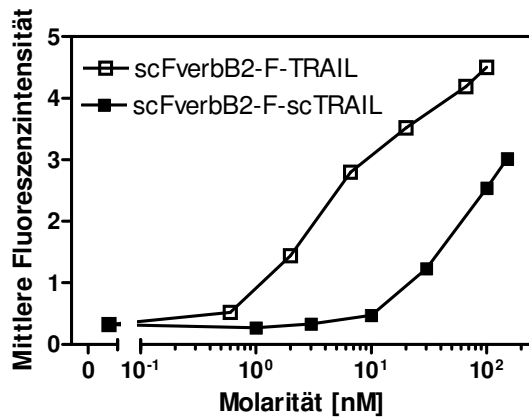


Abb. 14: Stärkere Bindung von scFv_{erbB2}-F-TRAIL an ErbB2. Für die Durchflusszytometrie-Analyse wurden 5×10^5 ErbB2-positive Colo205-Zellen mit den jeweiligen Konzentrationen der Fusionsproteine scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL für 2 h auf Eis inkubiert. Die Detektion erfolgte mit anti-Flag M2 mAk und einem anti-Maus FITC-konjugierten mAk.

4.2.1.6 *in vitro* Bioaktivität

Die *in vitro* Bioaktivitäten von scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL wurden auf Jurkat-, HT1080-, und Colo205-Zellen untersucht, die unterschiedliche Expressionsprofile der TRAIL-Rezeptoren und ErbB2 aufwiesen (Tab. 5).

Tabelle 5: Expressionsprofile von TRAIL-R1, TRAIL-R2 und ErbB2 auf Zelllinien.

Zelllinie	TRAIL-R1 ^a	TRAIL-R2 ^a	ErbB2 ^a
Jurkat	-	2,1	-
HT1080	1,13	7,5	1,5
Colo205	3,9	6,8	22,4

Die ErbB2 Expression der hier verwendeten Zelllinien wurde mittels Durchflusszytometrie-Analyse, nach Färbung mit einem anti-c-neu (Ab-5) mAk (1µg/ml) und einem anti-Maus FITC-konjugierten mAk, ermittelt. Die Expression der TRAIL-Rezeptoren wurde nach Färbung mit den entsprechenden Rezeptor-spezifischen mAks und einem anti-Maus FITC-konjugierten mAk ermittelt.

^a Mittlere Fluoreszenzintensität relativ zur Kontrolle.

- Mittlere Fluoreszenzintensität relativ zur Kontrolle < 1.

a) Jurkat-Zellen

Jurkat Zellen sind antigennegativ bezüglich ErbB2 und exprimieren TRAIL-R2, aber nicht TRAIL-R1.

Die Fusionsproteine scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL zeigten in den eingesetzten Konzentrationen keine Bioaktivität auf den ErbB2-negativen und TRAIL-R2-positiven Jurkat-Zellen (Abb. 15A). In Anwesenheit des quervernetzenden anti-Flag M2 mAks zeigten beide Moleküle mit zunehmender Konzentration eine steigende zytotoxische Wirkung, die für das scFv_{erbB2}-F-TRAIL-Molekül etwas stärker ausfiel als für das scFv_{erbB2}-F-scTRAIL-Molekül (Abb. 15B). Allerdings konnten mit den eingesetzten Konzentrationen EC₅₀-Werte experimentell nicht ermittelt werden. Die scheinbar abnehmende Aktivität des scFv_{erbB2}-F-TRAIL in den beiden höchsten Konzentrationen ließ sich auf ein suboptimales Verhältnis von Protein und Antikörper zurückführen, da durch die Zugabe von mehr anti-Flag M2 mAk die Aktivität gesteigert werden konnte.

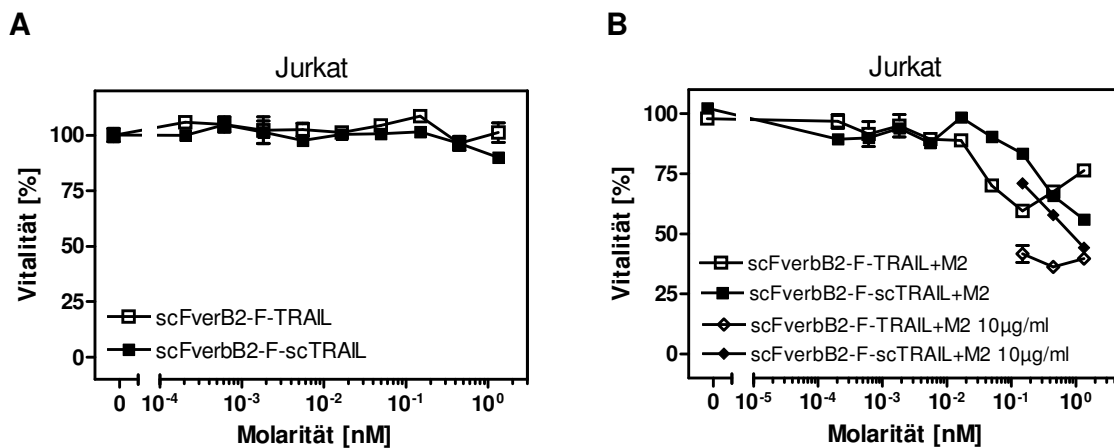


Abb. 15: (A) Keine Bioaktivität von scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL auf Jurkat-Zellen. 1 x 10⁵ Jurkat-Zellen/well wurden in eine 96-well-Flachboden-Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 16 Stunden mit den TRAIL-Molekülen stimuliert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels der MTT-Methode. **(B) Bioaktivität von scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL auf Jurkat-Zellen nach Quervernetzung mit dem anti-Flag M2 mAk.** Durchführung der Zytotoxizitäts-Tests wie in (A) in Anwesenheit des anti-Flag M2 mAks (2,5 µg/ml). Abgebildet sind die Mittelwerte +/- SD eines repräsentativen Experiments (mit Doppelwerten) von drei unabhängigen Experimenten.

b) Antigen-abhängige Bioaktivität auf HT1080- und Colo205-Zellen

Die ErbB2-abhängige Bioaktivität der ErbB2-spezifischen TRAIL-Fusionsproteine wurde auf HT1080-Zellen mit einer relativ geringen ErbB2-Expression und auf Colo205-Zellen, die eine ungefähr 15 mal höhere ErbB2-Expression aufwiesen (Tabelle 5, S. 56), analysiert.

Dabei zeigte die Stimulation von HT1080-Zellen mit den Fusionsproteinen scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL annähernd vergleichbare Bioaktivitäten (Abb 16A).

Im Gegensatz zu den entsprechenden Molekülen ohne scFv-Domäne (Abb. 5B) resultierte die Quervernetzung mit dem anti-Flag M2 mAk in einer vergleichbaren Steigerung der Bioaktivität um den Faktor 10 für beide Fusionsproteine (Abb. 16B). Die mittleren EC₅₀-Werte und die Standardabweichungen sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

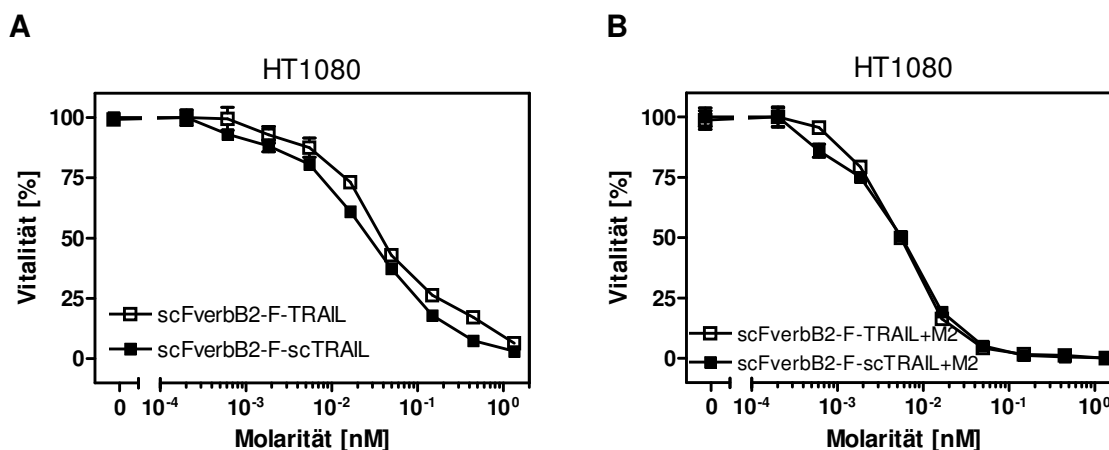


Abb. 16: (A) Vergleichbare Bioaktivität von scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL auf HT1080-Zellen. 2 x 10⁴ HT1080-Zellen/well wurden in eine 96-well-Flachboden-Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit CHX (2,5 µg/ml) vorbehandelt und für 16 Stunden mit den TRAIL-Molekülen stimuliert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels Kristallviolett-Färbung. **(B) Vergleichbare Bioaktivität von scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL auf HT1080-Zellen nach Quervernetzung mit dem anti-Flag M2 mAk.** Durchführung der Zytotoxizitäts-Tests wie in (A) in Anwesenheit des anti-Flag M2 mAks (2,5 µg/ml). Abgebildet sind die Mittelwerte +/- SD eines repräsentativen Experiments (mit Doppelwerten) von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 6: EC₅₀-Werte von scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL auf HT1080-Zellen.

	EC ₅₀ -Werte [nM]			MW +/- SD [nM]
scFv _{erbB2} -F-TRAIL	0,04	0,04	0,04	0,04 +/- 0,00
scFv _{erbB2} -F-scTRAIL	0,02	0,03	0,02	0,02 +/- 0,006
scFv _{erbB2} -F-TRAIL +M2	0,006	0,006	0,006	0,006 +/- 0,00
scFv _{erbB2} -F-scTRAIL +M2	0,006	0,002	0,003	0,003 +/- 0,002

Die angegebenen EC₅₀-Werte wurden aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Doppelwerten ermittelt.

Die Stimulation von Colo205-Zellen mit scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL zeigte dagegen Unterschiede in den Bioaktivitäten auf. Wie in Abbildung 17A dargestellt, zeigte scFv_{erbB2}-F-scTRAIL eine um den Faktor 20 höhere Bioaktivität. Die Quervernetzung mit dem anti-Flag M2 mAk resultierte in einer Steigerung der Bioaktivität beider Fusionsproteine. So sank der EC₅₀-Wert von scFv_{erbB2}-F-TRAIL um den Faktor 570 und von scFv_{erbB2}-F-scTRAIL um den Faktor 30 (Abb. 17B). Das

fürte zu ähnlichen Aktivitäten der beiden Fusionsproteine nach Quervernetzung. Die mittleren EC_{50} -Werte und die Standardabweichungen sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

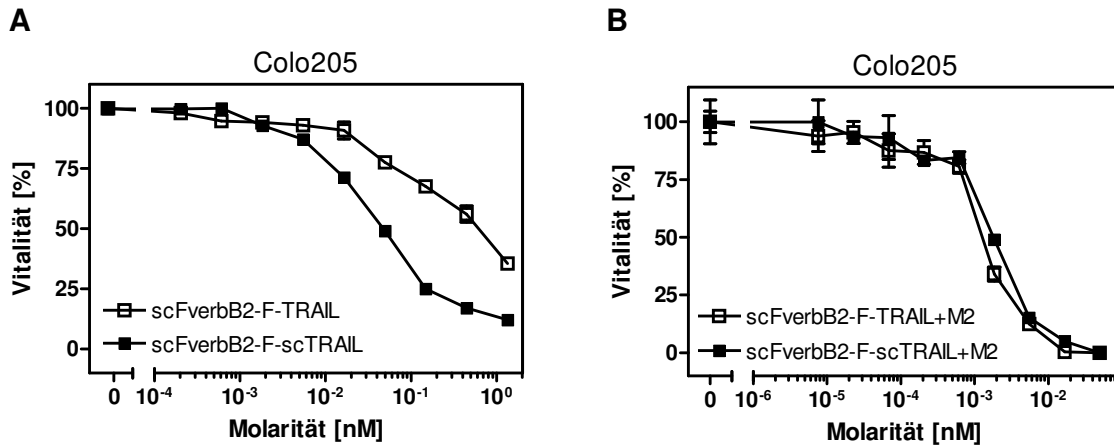


Abb. 17: (A) Höhere Bioaktivität von $scFv_{erbB2}$ -F-scTRAIL auf Colo205-Zellen. 5×10^4 Colo205-Zellen/well wurden in eine 96-well-Flachboden-Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit CHX (2,5 µg/ml) vorbehandelt und für 16 Stunden mit den TRAIL-Molekülen stimuliert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels der MTT-Methode. **(B) Vergleichbare Bioaktivität von $scFv_{erbB2}$ -F-TRAIL und $scFv_{erbB2}$ -F-scTRAIL auf Colo205-Zellen nach Quervernetzung mit dem anti-Flag M2 mAk.** Durchführung der Zytotoxizitäts-Tests wie in (A) in Anwesenheit des anti-Flag M2 mAks (2,5 µg/ml). Abgebildet sind die Mittelwerte +/- SD eines repräsentativen Experiments (mit Doppelwerten) von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 7: EC_{50} -Werte von $scFv_{erbB2}$ -F-TRAIL und $scFv_{erbB2}$ -F-scTRAIL auf Colo205-Zellen.

	EC_{50} -Werte [nM]			MW +/- SD [nM]
$scFv_{erbB2}$ -F-TRAIL	0,7	0,3	0,7	0,57 +/- 0,23
$scFv_{erbB2}$ -F-scTRAIL	0,05	0,02	0,01	0,03 +/- 0,02
$scFv_{erbB2}$ -F-TRAIL +M2	0,001	0,002	0,001	0,001 +/- 0,0006
$scFv_{erbB2}$ -F-scTRAIL +M2	0,001	0,001	0,001	0,001 +/- 0,00

Die angegebenen EC_{50} -Werte wurden aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Doppelwerten ermittelt.

Wie in den Abbildungen 18/19 dargestellt, konnte die Bioaktivität der ErbB2-spezifischen TRAIL-Fusionsproteine auf HT1080-Zellen (Abb. 18) bzw. Colo205-Zellen (Abb. 19) durch die Vorinkubation mit einem rekombinanten ErbB2-Peptid (Prof. Dr. Winfried Wels; Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) im Überschuss, welches wie der $scFv_{erbB2}$ auch für das FRP5-Epitop (Wels *et al.*, 1992a) spezifisch ist, reduziert werden. Dies bestätigte die Antigen-abhängige Bioaktivität auf beiden ErbB2-positiven Zelllinien. Es scheint allerdings, dass das $scFv_{erbB2}$ -F-scTRAIL-Molekül auf den HT1080-Zellen eine stärkere Antigen-unabhängige Bioaktivität aufwies als das

scFv_{erbB2}-F-TRAIL-Molekül. Auf den Colo205-Zellen war dagegen kein Unterschied zwischen den beiden Molekülen zu sehen.

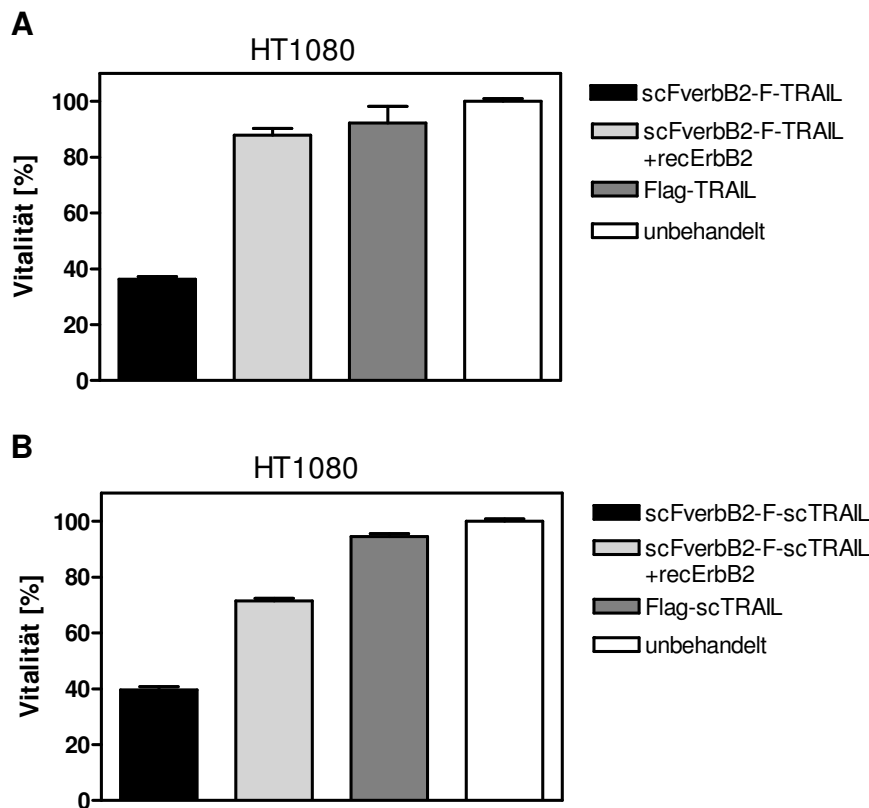


Abb. 18: ErbB2-abhängige Bioaktivität von scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL auf HT1080-Zellen. 2×10^4 HT1080-Zellen/well wurden in eine 96-well-Flachboden-Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit CHX (2,5 µg/ml) vorbehandelt und für 16 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von recErbB2 (10 µg/ml) mit den TRAIL-Molekülen scFv_{erbB2}-F-TRAIL (0,2 nM) im Vergleich zu Flag-TRAIL (0,2 nM) (**A**) oder scFv_{erbB2}-F-scTRAIL (0,05nM) im Vergleich zu Flag-scTRAIL (0,05 nM) (**B**) stimuliert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels Kristallviolett-Färbung. Abgebildet sind die Mittelwerte +/- SD eines repräsentativen Experiments (mit Doppelwerten) von zwei unabhängigen Experimenten.

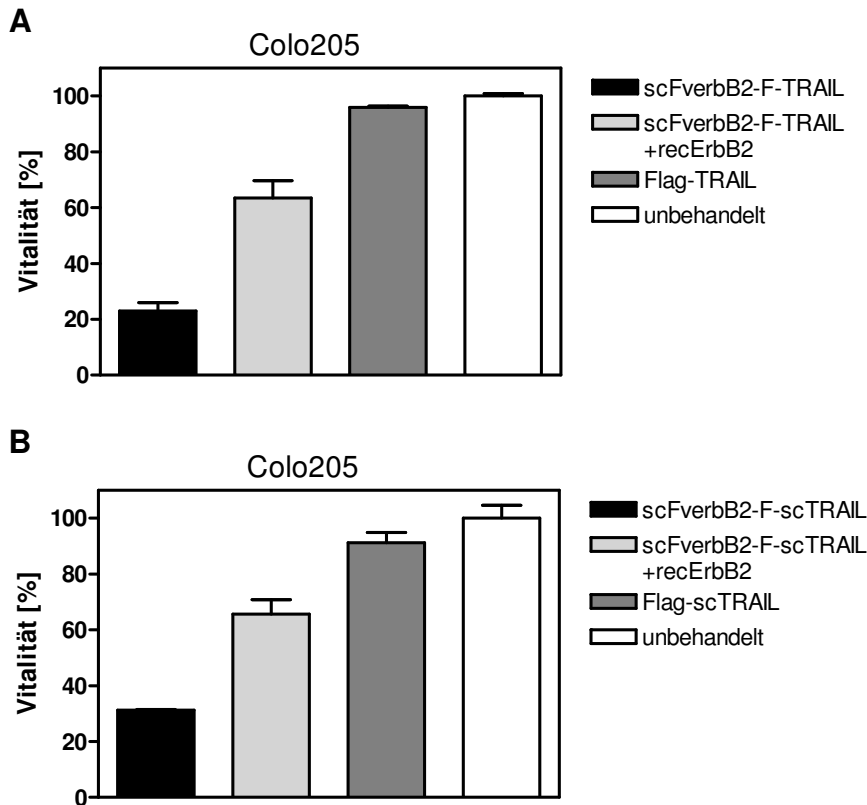


Abb. 19: ErbB2-abhängige Bioaktivität von scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL auf Colo205-Zellen. 5×10^4 Colo205-Zellen/well wurden in eine 96-well-Flachboden-Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit CHX (2,5 µg/ml) vorbehandelt und für 16 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von recErbB2 (10 µg/ml) mit den TRAIL-Molekülen scFv_{erbB2}-F-TRAIL (0,2 nM) im Vergleich zu Flag-TRAIL (0,2 nM) (**A**) oder scFv_{erbB2}-F-scTRAIL (0,05nM) im Vergleich zu Flag-scTRAIL (0,05 nM) (**B**) stimuliert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels der MTT-Methode. Abgebildet sind die Mittelwerte +/- SD eines repräsentativen Experiments (mit Doppelwerten) von zwei unabhängigen Experimenten.

4.2.1.7 ErbB2-Aktivierung

Da ErbB2 in Verbindung mit der Aktivierung proliferationsfördernder Signalwege – hauptsächlich des MAPK- (*mitogen-activated protein kinase*) und des PI3K(*phosphatidylinositol 3-kinase*)-AKT-Signalweges (Brazil und Hemmings, 2001; Scheid und Woodgett, 2001) - steht, wurde analysiert, ob die Bindung der ErbB2 spezifischen TRAIL-Fusionsproteine an ErbB2-positive Zellen zu einer Rezeptoraktivierung führt. Dazu wurden Colo205-Zellen, wie unter 3.4.6 beschrieben, stimuliert und die Rezeptoren immunopräzipitiert. Mittels eines anti-Phospho-Tyrosin Antikörpers wurde analysiert, ob die ErbB2-Rezeptoren phosphoryliert und somit aktiviert vorlagen. Wie in Abbildung 20A durch die Western Blot Analyse und in Abbildung 20B durch die Darstellung der relativen Intensitäten dargestellt, führte die Stimulation mit scFv_{erbB2}-F-TRAIL mit und ohne Quervernetzung zu einer sehr starken ErbB2-Aktivierung. Im Gegensatz dazu steht eine geringere ErbB2-

Aktivierung durch scFv_{erbB2}-F-scTRAIL, die vergleichbar der Aktivierung durch EGF ist. Dabei konnte die ErbB2-Aktivierung spezifisch durch einen EGF/ErbB2-Inhibitor (Calbiochem) blockiert werden (Daten nicht gezeigt).

In einer Analyse mit HT1080-Zellen ergaben sich ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

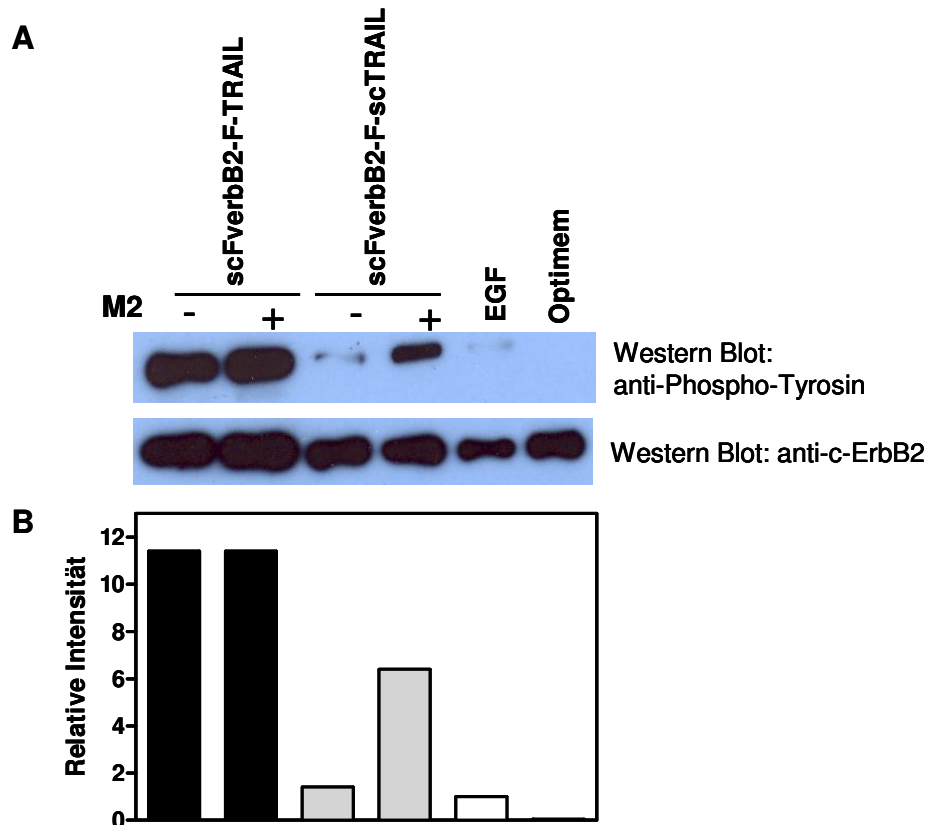


Abb. 20: Starke ErbB2-Aktivierung durch scFv_{erbB2}-F-TRAIL. (A) Western Blot Analyse der ErbB2 Aktivierung durch scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL. Colo205-Zellen wurden mit äquivalenten Molaritäten beider Fusionsproteine (10 nmol) mit und ohne Quervernetzung mit dem anti-Flag M2 mAk stimuliert. EGF (50 ng/ml) und Medium (Optimem) dienten als Positiv- und Negativkontrolle. ErbB2 wurde aus den Zelllysaten immunpräzipitiert und auf Tyrosin-Phosphorylierung mittels eines anti-Phospho-Tyrosin mAks analysiert. Die ErbB2 Quantifizierung erfolgte mittels anti-c-erbB2 Ab-20. (B) Phospho-Tyrosin-Intensitäten relativ zur Ladekontrolle.

4.2.1.9 TRAIL-R2-abhängige Bioaktivität auf HT1080- und Colo205-Zellen

Die scFv-Flag-TRAIL und scFv-Flag-scTRAIL-Fusionsproteine sollten sich durch Mimikrie von Membran-TRAIL in Antigen-gebundener Form an der Zelle und damit *in situ* Aktivierung von TRAIL-R2 auszeichnen. Um dies zu beweisen, wurden Neutralisations-Experimente mit TRAIL-R2 spezifischen Fabs (Prof. Harald Wajant;

Abteilung für Molekulare Innere Medizin des Universitätsklinikums Würzburg) auf HT1080- und Colo205-Zellen durchgeführt.

Wie in Abbildung 21 dargestellt, inhibierten die eingesetzten TRAIL-R2 spezifischen Fabs die zytotoxischen Eigenschaften von quervernetztem Flag-TRAIL auf Jurkat-Zellen wie erwartet.

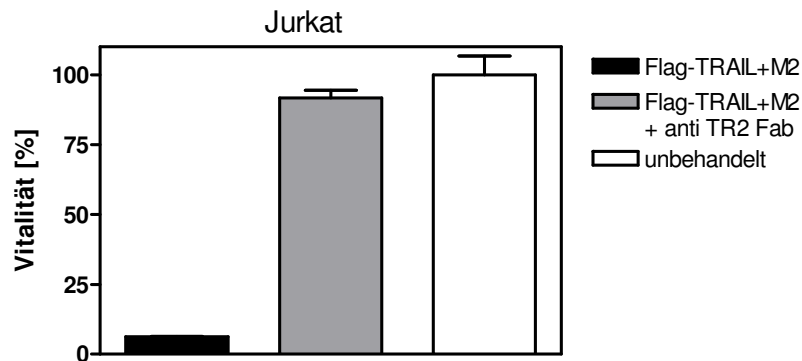


Abb. 21: Inhibition von TRAIL-R2 auf Jurkat-Zellen. 1×10^5 Jurkat-Zellen/well wurden in eine 96-well-Flachboden-Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 16 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von TRAIL-R2 Fab (50 µg/ml) mit Flag-TRAIL (6,25 nM) stimuliert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels der MTT-Methode. Abgebildet sind die Mittelwerte +/- SD eines repräsentativen Experiments (mit Doppelwerten) von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Neutralisations-Experimente mit TRAIL-R2 spezifischen Fabs auf HT1080- und Colo205-Zellen zeigten einen dominanten TRAIL-R2 abhängigen Zelltod der ErbB2-spezifischen TRAIL-Fusionsproteine auf ErbB2-positiven Zellen (Abb. 22/23). Diese Experimente deuteten auch darauf hin, dass scFv_{erbB2}-F-scTRAIL (Abb. 22B, 23B) auf beiden Zelllinien eine etwas stärkere TRAIL-R2 Aktivierung initiierte als scFv_{erbB2}-F-TRAIL (Abb. 22A, 23A). In Tabelle 8/9 sind die Anteile der TRAIL-Rezeptoren - bezogen auf die maximale Inhibition - zusammengestellt. Möglicherweise ist der TRAIL-R2-Anteil bezogen auf die maximale Inhibition tatsächlich noch größer, da wie in Abbildung 21 dargestellt, mit den eingesetzten anti-TRAIL-R2 Fabs keine 100 %ige Inhibition erreicht werden konnte.

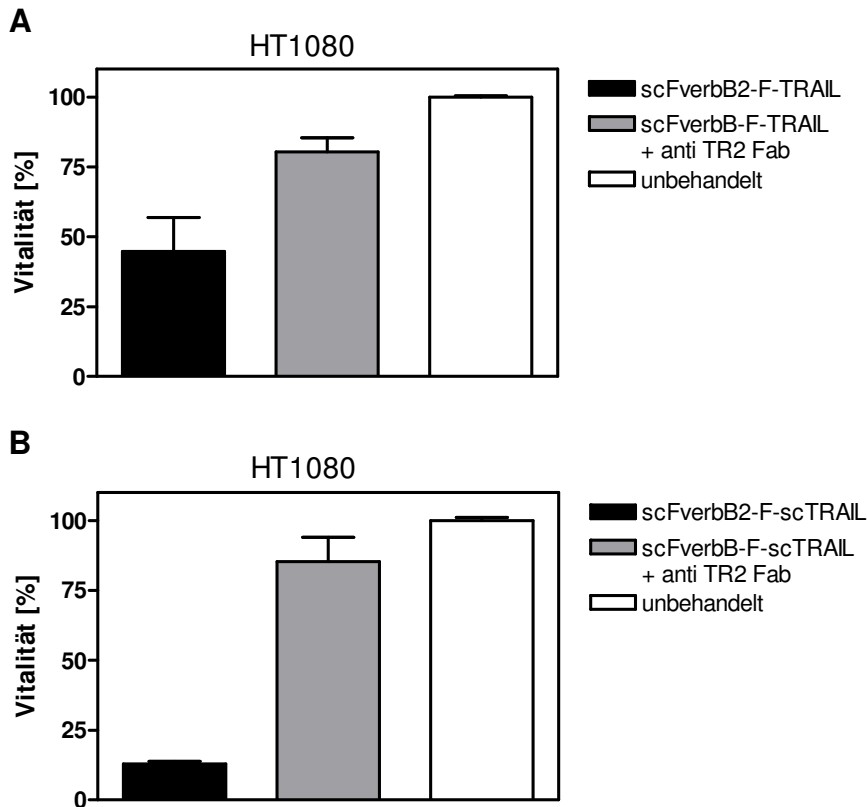


Abb. 22: TRAIL-R2-abhängige Bioaktivität von scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL auf HT1080-Zellen. 2×10^4 HT1080-Zellen/well wurden in eine 96-well-Flachboden-Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit CHX (2,5 µg/ml) vorbehandelt und für 16 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von TRAIL-R2 Fab (50 µg/ml) mit scFv_{erbB2}-F-TRAIL (0,25 nM) (**A**) oder scFv_{erbB2}-F-scTRAIL (0,4 nM) (**B**) stimuliert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels Kristallviolett-Färbung. Abgebildet sind die Mittelwerte +/- SD von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils Doppelwerten.

Tabelle 8: TRAIL-R2 abhängige Bioaktivität auf HT1080-Zellen.

	Vitalität	+ anti TR2	Anteil TR1	Anteil TR2	max. Inhib.	Rel.Anteil TR1	Rel.Anteil TR2
scFv _{erbB2} -F-TRAIL	44 %	80 %	20 %	36 %	56 %	36 %	64 %
scFv _{erbB2} -F-scTRAIL	13 %	85 %	15 %	72 %	87 %	17 %	83 %

Die angegebenen Werte wurden aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils Doppelwerten ermittelt.

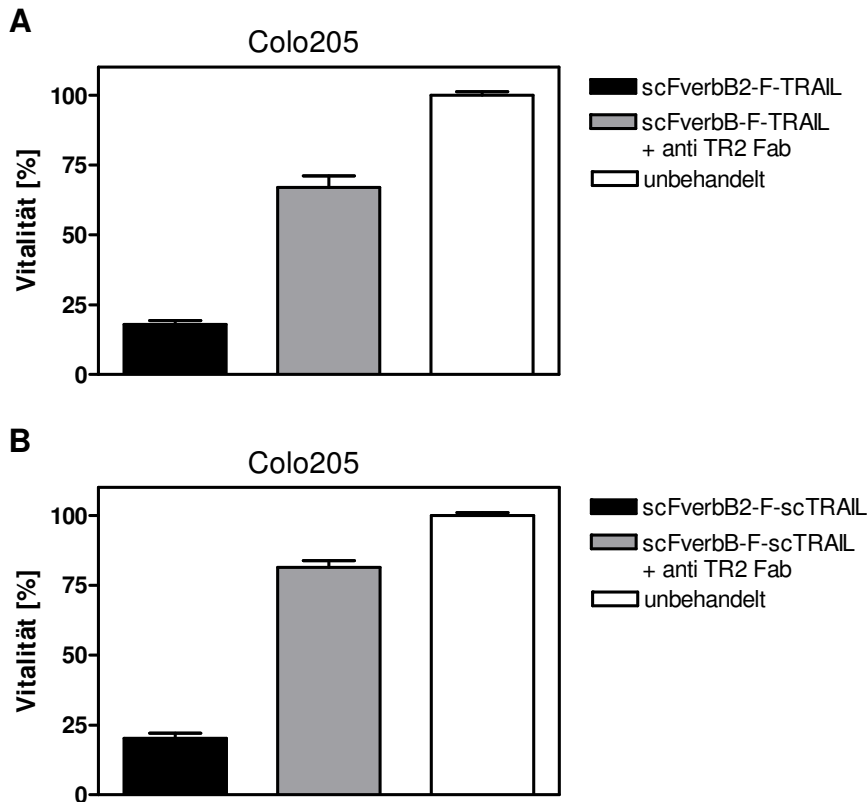


Abb. 23: TRAIL-R2-abhängige Bioaktivität von scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL auf Colo205-Zellen. 5×10^4 Colo205-Zellen/well wurden in eine 96-well-Flachboden-Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit CHX (2,5 µg/ml) vorbehandelt und für 16 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von TRAIL-R2 Fab (50 µg/ml) mit scFv_{erbB2}-F-TRAIL (1,3 nM) (A) oder scFv_{erbB2}-F-scTRAIL (1,3 nM) (B) stimuliert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels der MTT-Methode. Abgebildet sind die Mittelwerte +/- SD von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils Doppelwerten.

Tabelle 9: TRAIL-R2 abhängige Bioaktivität auf Colo205-Zellen.

	Vitalität	+ anti TR2	Anteil TR1	Anteil TR2	max. Inhib.	Rel.Anteil TR1	Rel.Anteil TR2
scFv _{erbB2} -F-TRAIL	17 %	67 %	33 %	50 %	83 %	40 %	60 %
scFv _{erbB2} -F-scTRAIL	20 %	81 %	19 %	61 %	80 %	24 %	76 %

Die angegebenen Werte wurden aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils Doppelwerten ermittelt.

4.2.1.10 *in vitro* Stabilität

Die *in vitro* Stabilität von scFv_{erbB2}-F-TRAIL im Vergleich zu scFv_{erbB2}-F-scTRAIL - im Zellkulturüberstand unter der Zugabe von 10 % FCS (hitzeinaktiviert) - wurde über einen Zeitraum von 72 Stunden verfolgt. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurde die Stabilität der Fusionsproteine durch die verbliebene Bioaktivität auf HT1080-Zellen demonstriert. scFv_{erbB2}-F-TRAIL (Abb. 24A) ebenso wie scFv_{erbB2}-F-scTRAIL (Abb. 24B) zeigten keinen Aktivitätsverlust. Daher resultierte

TRAIL: Hexamer; scFv_{erbB2}-F-scTRAIL: Trimer). In Tabelle 10 sind die entsprechenden AUC-Werte, die sich nicht signifikant unterscheiden ($p = 0,4581$; $p < 0,05$ (*) *t*-Test (zweiseitig) für ungepaarte Stichproben), zusammengestellt.

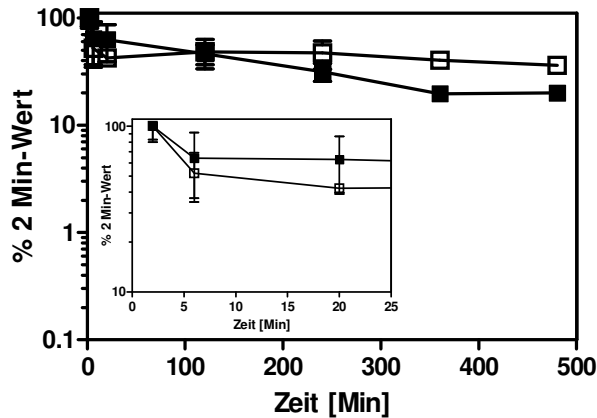


Abb. 25: *In vivo* Serumstabilität von scFv_{erbB2}-F-TRAIL (□) und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL (■). 1 µmol/Molekül wurde i. v. in Balb/c Mäuse ($n=3$) injiziert. Die Serumkonzentrationen der TRAIL-Moleküle wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten mittels ELISA bestimmt. Die Daten wurden normalisiert wobei der erste Zeitpunkt (2 Min) als maximale Konzentration angenommen wurde. Abgebildet sind die Mittelwerte +/- SEM eines repräsentativen Experiments (mit Dreifachwerten) von zwei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 10: AUC (*area under the curve*) der TRAIL-Moleküle.

	AUC (2-480 min) [% x min]
scFv _{erbB2} -F-TRAIL	21 597 +/- 8395
scFv _{erbB2} -F-scTRAIL	16 787 +/- 5714

Die angegebenen AUC-Werte wurden jeweils aus einem Experiment mit Dreifachwerten ermittelt.

4.2.1.12 Antitumorale Aktivität *in vivo*

Die Bewertung der antitumoralen Aktivität *in vivo* erfolgte in einem humanen Kolonkarzinom-Modell in NMRI nu/nu Mäusen. Nachdem bei den Tumoren - 8 Tage nach der subkutanen Zellinjektion von Colo205-Zellen – makroskopisch eine Vaskularisierung zu erkennen war, wurde mit der peritumoralen Behandlung begonnen. Aufgrund großer Proteinverluste bei der Aufreinigung wurden die Tiere (wie unter 3.5.2.2 beschrieben) mit ankonzentrierten Zellkulturüberständen behandelt. Als Kontrolle diente konzentrierter Zellkulturüberstand von Zellen, die den Leervektor pIRESpuro3 der hier eingesetzten Konstrukte exprimierten. Die Behandlung erfolgte täglich, an vier aufeinanderfolgenden Tagen, mit jeweils 10 µmol Flag-scTRAIL,

scFV_{erbB2}-F-TRAIL bzw. scFV_{erbB2}-F-scTRAIL und die Verlaufsbeobachtungen des Tumorstadiums erfolgte über 17 Tage wie unter 3.5.2.4 beschrieben.

Wie in Abbildung 26A dargestellt, konnte eine Reduzierung der relativen Tumorgößen in allen mit TRAIL-Molekülen behandelten Gruppen bis einen Tag über den Behandlungszeitraum hinaus erzielt werden. Die Tumoren der Kontrollgruppe zeigten hingegen eine kontinuierliche Zunahme der Tumorgöße. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit scFV_{erbB2}-F-scTRAIL in der größten antitumoralen Aktivität *in vivo* resultierte. In einem Zeitraum von 4-11 Tagen nach Behandlungsbeginn wurde ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der Tumorgößen im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Gruppe mit Flag-scTRAIL beobachtet. Innerhalb 4 und 11 Tagen nach Behandlungsbeginn konnte sogar im Vergleich zur Gruppe mit scFV_{erbB2}-F-TRAIL ein signifikanter Unterschied der relativen Tumorgößen beobachtet werden. Abbildung 26B zeigt als Beispiel hierfür Tag 11. In einem weiteren unabhängigen Experiment ergaben sich ähnliche Ergebnisse (Abb. 27). So konnte auch dort durch das einzelkettige, ErbB2-spezifische TRAIL-Molekül die größte antitumorale Aktivität erzielt werden.

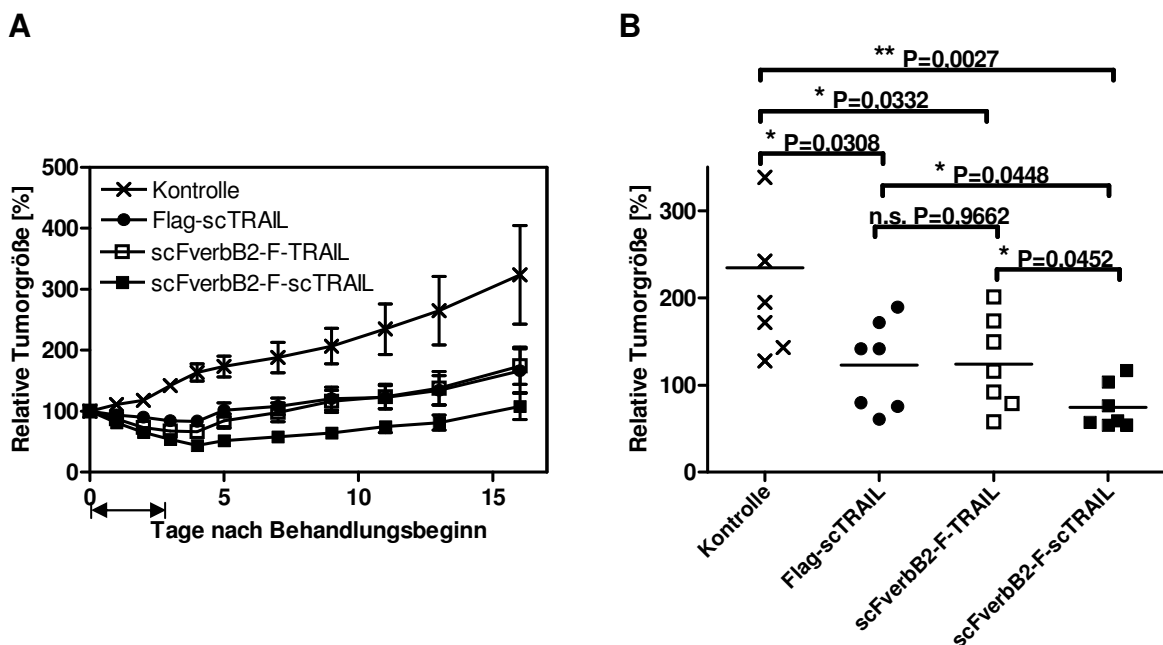


Abb. 26: Antitumorale Aktivität von Flag-scTRAIL, scFV_{erbB2}-F-TRAIL und scFV_{erbB2}-F-scTRAIL *in vivo*. NMRI nu/nu Mäusen wurden subkutan 3×10^6 Colo205-Zellen injiziert. Nachdem die Tumoren eine Größe von ca. 25 mm^2 erreicht hatten erhielt jedes Versuchstier an vier aufeinanderfolgenden Tagen eine tägliche, peritumorale Behandlung mit $10 \mu\text{mol}$ des entsprechenden Proteins. (Der Pfeil indiziert den Behandlungszeitraum). Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen Tumorgößen der vier Behandlungsgruppen ($n=7$) (A) und die relativen Tumorgößen der einzelnen Tiere an Tag 11 ($p < 0,05$ (*); *t*-Test (zweiseitig) für ungepaarte Stichproben). Der Mittelwert ist jeweils durch einen Balken dargestellt (B).

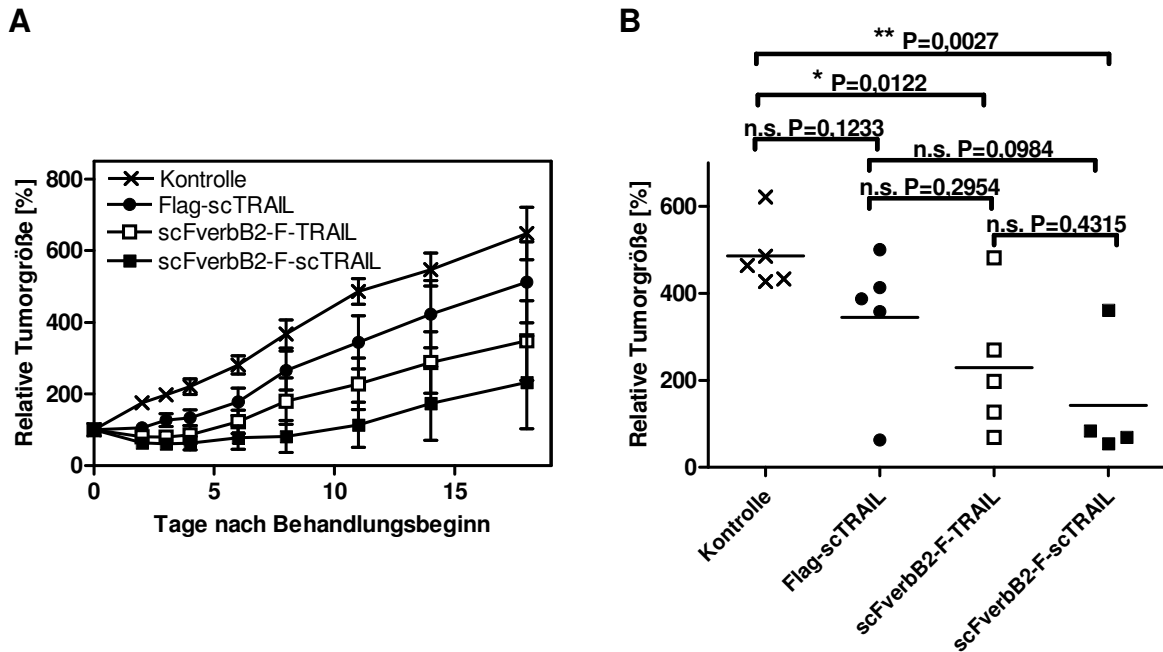


Abb. 27: Antitumorale Aktivität von Flag-scTRAIL, scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL *in vivo*. NMRI nu/nu Mäusen wurden subkutan 3×10^6 Colo205-Zellen injiziert. Nachdem die Tumoren eine Größe von ca. 25 mm² erreicht hatten erhielt jedes Versuchstier an vier aufeinanderfolgenden Tagen eine tägliche, peritumorale Behandlung mit 10 µmol des entsprechenden Proteins. (Der Pfeil indiziert den Behandlungszeitraum). Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen Tumorgößen der vier Behandlungsgruppen (n=5) (A) und die relativen Tumorgößen der einzelnen Tiere an Tag 11 ($p < 0,05$ (*); *t*-Test (zweiseitig) für ungepaarte Stichproben). Der Mittelwert ist jeweils durch einen Balken dargestellt. (■: n=4. Tod eines Tiers an Tag vier nach Behandlungsbeginn aus ungeklärten, wahrscheinlich nicht auf das Reagenz zurückzuführenden Gründen.) (B).

4.2.2 TRAIL-Fusionsproteine mit Spezifität für FAP

Ausgehend von den in Abschnitt 4.1 charakterisierten, rekombinanten TRAIL-Molekülen wurden TRAIL-Fusionsproteine mit Spezifität für humanes, als auch murines *fibroblast activation protein* (FAP) konstruiert. Dabei handelt es sich um ein Zelloberflächen-Antigen, das auf reaktiven Fibroblasten des Stromas in über 90 % aller humanen epithelialen Tumoren exprimiert wird (Garin-Chesa *et al.*, 1990).

Beide FAP-spezifischen Moleküle verfügen über ein N-terminales Signalpeptid (L), gefolgt von einem Spezies-kreuzreaktiven, FAP-spezifischen *single-chain* Fragment, basierend auf dem scFv Mo36 (Brocks *et al.*, 2001). Daran schließt sich ein *Flag-Tag* und beim scFv36-F-TRAIL ein TRAIL-Modul an (Abb. 9A). Beim scFv36-F-scTRAIL wurde C-terminal das scTRAIL, das über (Gly₃Ser)₄-Linker verbundene TRAIL-Trimer, angefügt (Abb. 9B).

4.2.2.1 Expression in HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden pIRESpuro3-leader-scFv36-Flag-TRAIL und pIRESpuro3-leader-scFv36-Flag-scTRAIL transfiziert. Es wurden die Zellkulturüberstände transient und stabil exprimierter Proteine mittels Western Blot analysiert und verglichen. Da die Expression in den stabilen Zelllinien sehr schwach ($< 0,5 \mu\text{g/ml}$) war, wurden die Proteine nachfolgend transient exprimiert. Die Konzentrationsabschätzung der transient produzierten Proteine erfolgte mittels Western Blot unter reduzierenden Bedingungen gegen das Referenzprotein scFv36-F-scmuTNF (Abb. 28). Die Molekulargewichte von ca. 55 kDa für scFv36-F-TRAIL und von ca. 110 kDa für scFv36-F-scTRAIL entsprechen den kalkulierten Größen (53 kDa für scFv36-F-TRAIL; 100 kDa für scFv36-F-scTRAIL) der jeweiligen Monomere. Aufgrund dieser Analyse – unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Anzahl von Flag-Peptiden (wie in 4.1.1 beschrieben) - wurden die Proteinkonzentrationen für scFv36-F-TRAIL auf 22 nM und für scFv36-F-scTRAIL auf 33 nM abgeschätzt.

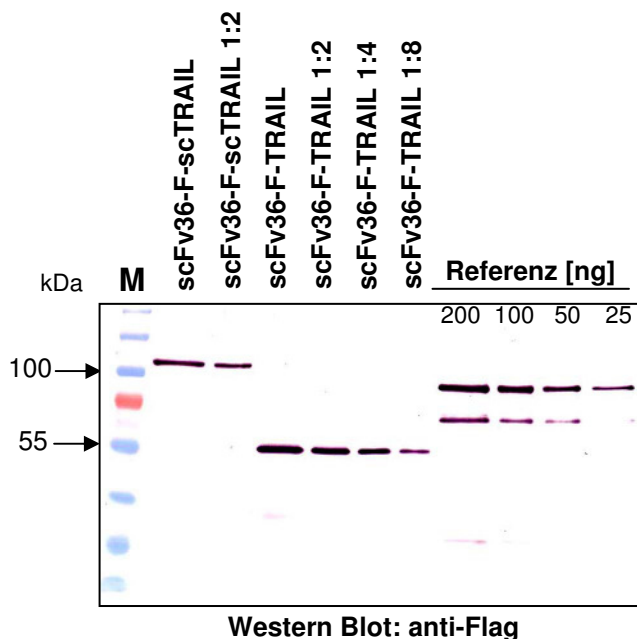


Abb. 28: Western Blot Analyse der transienten Produktion von scFv36-F-TRAIL und scFv36-F-scTRAIL zur Proteinkonzentrationsabschätzung. HEK293-Zellen wurden wie unter 3.3.2.1 beschrieben transfiziert und die entsprechenden Zellkulturüberstände mittels SDS-Gelelektrophorese (10 %, reduzierend) und Western Blot analysiert. Es wurden jeweils 30 μl Überstand aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit anti-Flag M2 mAk und einem AP-konjugierten anti-Maus-IgG mAk. M = Marker.

4.2.2.2 *in vitro* Bioaktivität

a) Jurkat-Zellen

Die Fusionsproteine scFv36-F-TRAIL und scFv36-F-scTRAIL zeigten in den eingesetzten Konzentrationen keine Bioaktivität auf den FAP-negativen, TRAIL-R2-positiven Jurkat-Zellen (Abb. 29A). In Anwesenheit des quervernetzenden anti-Flag M2 mAks konnte mit zunehmender Konzentration des scFv36-F-TRAIL nicht aber des sc36Fv-F-scTRAIL eine zytotoxische Wirkung beobachtet werden (Abb. 29B). Dies deutete auf eine verminderte Aktivität des quervernetzten scFv36-F-scTRAILs gegenüber dem TRAIL-R2. Möglich wäre aber auch, dass scFv36-F-TRAIL wegen der höheren Anzahl an Flag-Peptiden einfach nur besser quervernetzt werden kann. Allerdings konnten mit den eingesetzten Konzentrationen EC_{50} -Werte experimentell nicht ermittelt werden. Die Aktivität besonders des scFv36-F-TRAIL in den drei höchsten Konzentrationen ließ sich durch Zugabe von mehr anti-Flag M2 mAks steigern.

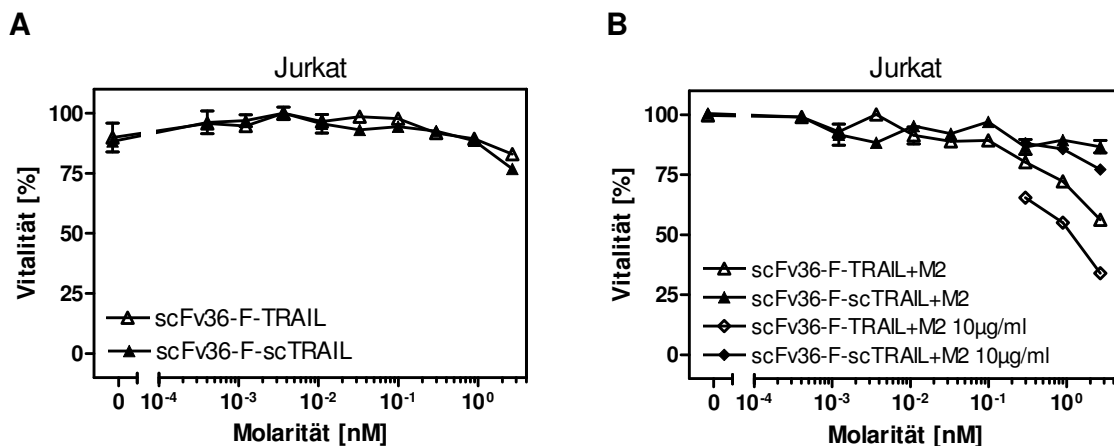


Abb. 29: (A) Keine Bioaktivität von scFv36-F-TRAIL und scFv36-F-scTRAIL auf Jurkat-Zellen. 1×10^5 Jurkat-Zellen/well wurden in eine 96-well-Flachboden-Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 16 Stunden mit den TRAIL-Molekülen stimuliert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels der MTT-Methode. **(B) Bioaktivität von scFv36-F-TRAIL und scFv36-F-scTRAIL auf Jurkat-Zellen nach Quervernetzung mit dem anti-Flag M2 mAb.** Durchführung der Zytotoxizitäts-Tests wie in (A) in Anwesenheit des anti-Flag M2 mAks (2,5 µg/ml). Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Experiments (mit Doppelwerten) von drei unabhängigen Experimenten.

b) Antigen-abhängige Bioaktivität auf HT1080- und HT1080-FAP-Zellen

Zusätzlich zu den FAP-negativen HT1080-Zellen (TRAIL-R1- und TRAIL-R2-positiv; s. Tab. 5, S. 56) standen stabil mit FAP transfizierte HT1080-Zellen zur Verfügung (HT1080FAP-Zellen). So konnte die Antigen-abhängige Bioaktivität der Moleküle im direkten Vergleich der Bioaktivitäten auf beiden Zelllinien ermittelt werden. Dabei zeigte die Stimulation von HT1080-Zellen mit den Fusionsproteinen scFv36-F-TRAIL und scFv36-F-scTRAIL eine vergleichbare Bioaktivität (Abb. 30A). Die Stimulation von antigenpositiven HT1080FAP-Zellen resultierte in einer Steigerung der Bioaktivität um einen Faktor von ca. 4000 für scFv36-F-TRAIL und ca. 2000 für scFv36-F-scTRAIL (Abb. 30B). Das demonstrierte die Steigerung der Bioaktivität durch Antigen-spezifische Bindung. Die mittleren EC₅₀-Werte und die Standardabweichungen sind in den Tabellen 11 und 12 zusammengestellt.

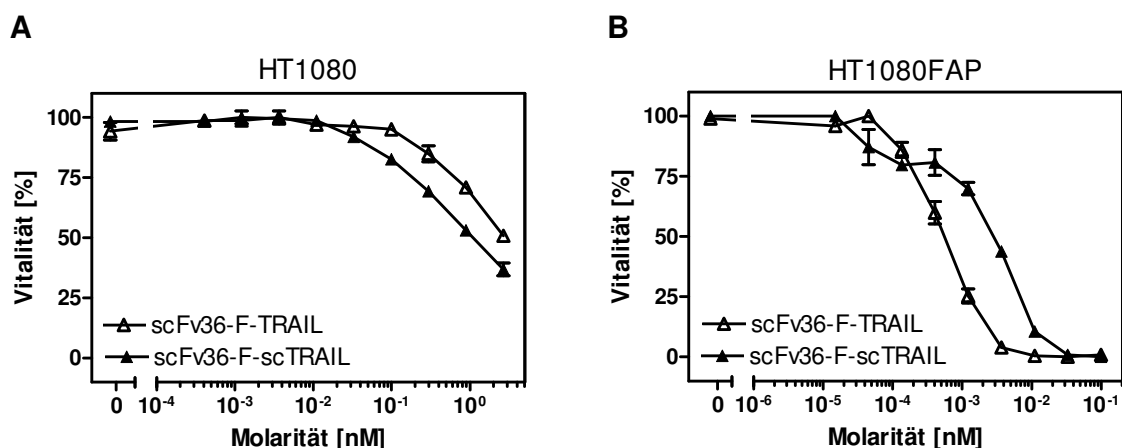


Abb. 30: Bioaktivität von scFv36-F-TRAIL und scFv36-F-scTRAIL ist Antigen-abhängig. 2×10^4 HT1080-Zellen/well (A) und HT1080FAP-Zellen/well (B) wurden in eine 96-well-Flachboden-Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit CHX (2,5 µg/ml) vorbehandelt und für 16 Stunden mit den TRAIL-Molekülen stimuliert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels Kristallviolett-Färbung. Abgebildet sind die Mittelwerte +/- SD eines repräsentativen Experiments (mit Doppelwerten) von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 11: EC₅₀-Werte von scFv36-F-TRAIL und scFv36-F-scTRAIL auf HT1080-Zellen.

	EC ₅₀ -Werte [nM]			MW +/- SD [nM]
	> 2,6	> 2,6	2,6	
scFv36-F-TRAIL	> 2,6	> 2,6	2,6	-
scFv36-F-scTRAIL	2,0	2,0	1,0	1,67 +/- 0,58

Die angegebenen EC₅₀-Werte wurden aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Doppelwerten ermittelt.

Tabelle 12: EC₅₀-Werte von scFv36-F-TRAIL und scFv36-F-scTRAIL auf HT1080FAP-Zellen.

	EC ₅₀ -Werte [nM]			MW +/- SD [nM]
scFv36-F-TRAIL	0,0004	0,0008	0,0008	0,0006 +/- 0,0002
scFv36-F-scTRAIL	0,001	0,0008	0,001	0,0009 +/- 0,0001

Die angegebenen EC₅₀-Werte wurden aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Doppelwerten ermittelt.

4.2.2.2 TRAIL-R2-abhängige Bioaktivität

Die scFv36-Flag-TRAIL und scFv36-Flag-scTRAIL-Fusionsproteine sollten sich durch Mimikrie von Membran-TRAIL in Antigen-gebundener Form an der Zelle und damit *in situ* Aktivierung von TRAIL-R2 auszeichnen. Um dies zu beweisen, wurden Neutralisations-Experimente mit TRAIL-R2 spezifischen Fabs auf HT1080- und HT1080FAP-Zellen durchgeführt.

Die Neutralisations-Experimente auf FAP-positiven Zellen zeigten einen dominanten TRAIL-R2-abhängigen Zelltod beider FAP-spezifischen TRAIL-Fusionsproteine (Abb. 31A, B). Möglicherweise ist der TRAIL-R2-Anteil bezogen auf die maximale Inhibition (Tab. 13) tatsächlich noch größer, da wie in Abbildung 21 dargestellt, mit den eingesetzten anti-TRAIL-R2 Fabs keine 100 %ige Inhibition erreicht werden konnte. Auf den Antigen-negativen HT1080-Zellen wiesen die Moleküle in den eingesetzten Konzentrationen keine Bioaktivität auf (Abb. 31C, D). Dies bewies die stark Antigen-abhängige Bioaktivität.

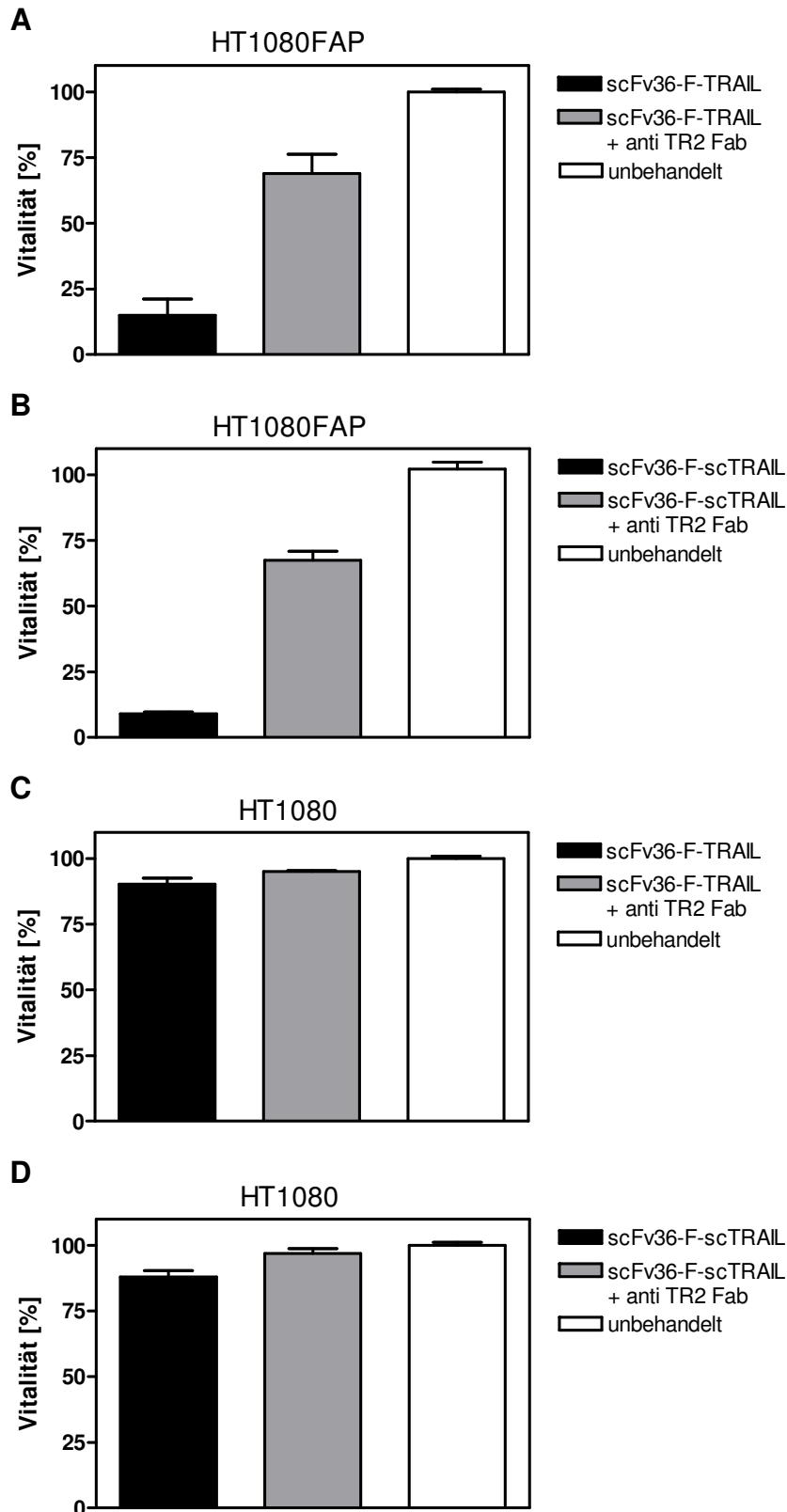


Abb. 31: TRAIL-R2-abhängige Bioaktivität von scFv36-F-TRAIL und scFv36-F-scTRAIL auf HT1080- und HT1080FAP-Zellen. 2×10^4 HT1080FAP-Zellen/well (**A, B**) oder HT1080-Zellen /well (**C, D**) wurden in eine 96-well-Flachboden-Mikrotiter-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit CHX (2,5 µg/ml) vorbehandelt und für 16 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von TRAIL-R2 Fab (50 µg/ml) mit scFv36-F-TRAIL (0,09 nM) (**A, C**) oder scFv36-F-scTRAIL (0,09 nM) (**B, D**) stimuliert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels Kristallviolett-Färbung. Abgebildet sind die Mittelwerte +/- SD von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils Doppelwerten.

Tabelle 13: TRAIL-R2 abhängige Bioaktivität auf HT1080FAP-Zellen.

	Vitalität	+ anti TR2	Anteil TR1	Anteil TR2	max. Inhib.	Rel.Anteil TR1	Rel.Anteil TR2
scFv36-F-TRAIL	15 %	69 %	31 %	54 %	85 %	36 %	64 %
scFv36-F-scTRAIL	9 %	67 %	33 %	58 %	91 %	36 %	64 %

Die angegebenen Werte wurden aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils Doppelwerten ermittelt.

5. Diskussion

Die Todesliganden der TNF-Familie weisen ein großes Potential als antitumorale therapeutische Agenzien auf, indem sie, durch ihre protektiven Funktionen innerhalb des Immunsystems, auf die Tumorzellen oder das den Tumor umgebende Gewebe zielen. Dabei hängt die Funktionalität sowohl der Liganden als auch der zugehörigen Rezeptoren der TNF-Familie von der obligatorischen 3-fach Symmetrie ab, welche die grundlegende Signal-induzierende Struktur darstellt (Locksley *et al.*, 2001). Die Liganden werden als trimere Typ II Transmembranproteine exprimiert und werden häufig zu löslichen Varianten prozessiert, die auch als Trimere organisiert sind. Diese löslichen trimeren Varianten zeigen aber in bestimmten Fällen keine oder nur marginale Bioaktivität. So wurde z.B. beschrieben, dass löslicher CD95L zwar mit CD95 interagiert, dennoch kein oder nur ein sehr schwaches Signal über diesen Rezeptor induzieren kann (Schneider *et al.*, 1998). Ähnliches gilt für TNF/TNF-R2 und TRAIL/TRAIL-R2, obwohl die löslichen Liganden den jeweiligen Rezeptor 1 (TNF/TNF-R1 bzw. TRAIL/TRAIL-R1) effizient aktivieren können (Grell *et al.*, 1995; Wajant *et al.*, 2001). Die inaktiven bzw. schlecht bioaktiven, löslichen TNF Liganden können in hoch aktive Moleküle umgewandelt werden, welche ähnliche Eigenschaften besitzen wie ihre membranständigen Formen. Dies kann beispielsweise bei Liganden, die mit einem *Flag-Tag* fusioniert wurden, durch die Quervernetzung mit dem anti-Flag M2 mAk oder durch die gentechnische Fusion mit Multimerisierungsdomänen erreicht werden. Für CD95L und TRAIL gilt allerdings, dass solche in Form von Aggregaten vorliegenden Varianten aufgrund ihrer lebertoxischen Eigenschaften für eine systemische Behandlung unbrauchbar sind. Für eine systemische Anwendung muss das Ziel verfolgt werden, die starken apoptoseinduzierenden Eigenschaften erst vor Ort, d.h. im Tumorgewebe zur Entfaltung kommen zu lassen. Dies kann beispielweise durch die gentechnische Fusion der Liganden mit Antikörper-Derivaten erfolgen. So konnte gezeigt werden, dass die Antigen-abhängige Immobilisierung der Fusionsproteine auf der Zelloberfläche zur Imitierung der Eigenschaften der membranständigen Liganden und somit zur Aktivierung des relevanten Rezeptors führt (Wajant *et al.*, 2001; Samel *et al.*, 2003; Bremer *et al.*, 2004a; 2005a). Dieser Ansatz findet auch in der vorliegenden Arbeit für TRAIL-Fusionsproteine zur Verbesserung der antitumoralen Eigenschaften Anwendung. So konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden,

dass die biologischen Aktivitäten (*in vivo* und *in vitro*), von den auch in dieser Arbeit charakterisierten TRAIL-Varianten Flag-TRAIL und dem einzelkettigen Flag-scTRAIL, durch die Fusion mit tumorspezifischen Antikörperfragmenten gegen ErbB2 und FAP erhöht werden konnte und dass die Antigen-gebundenen Fusionsproteine, bezüglich der Aktivierung des TRAIL-R2, Membran-TRAIL-ähnliche Eigenschaften besitzen.

5.1 Charakterisierung der TRAIL-Varianten

5.1.1 *in vitro* Bioaktivität

In Anlehnung an einzelkettige TNF-Varianten, die eine Verbesserung bezüglich der Stabilität und der antitumoralen Aktivität zeigten (Krippner-Heidenreich *et al.*, 2008), wurden in dieser Arbeit die Eigenschaften eines entsprechenden einzelkettigen TRAIL-Moleküls (Flag-scTRAIL) mit denen des konventionellen, homotrimeren löslichen Liganden (Flag-TRAIL) verglichen.

Die *in vitro* Bioaktivitäten von Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL wurden auf Jurkat-, HT1080- und Colo205-Zellen analysiert.

Die Zytotoxizitäts-Tests auf Jurkat-Zellen, die nur den TRAIL-R2 exprimieren (Tab. 5), der durch membranständigen oder sekundär quervernetzten, löslichen TRAIL aktiviert wird (Schneider *et al.*, 1998; Mühlenbeck *et al.*, 2000; Wajant *et al.*, 2001), gaben Aufschluss über eine eventuelle Multimerisierung der TRAIL-Varianten und die TRAIL-R2-Aktivierung nach Quervernetzen. Beide Moleküle zeigten bis zu einer maximal eingesetzten Konzentration von 6,25 nM kaum Bioaktivität auf Jurkat-Zellen (Abb. 4A). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass beide Liganden in Form von Trimeren und nicht höher molekularen Komplexen vorlagen. Die geringe Zytotoxizität, die sich bei relativ hohen Konzentrationen zeigte, könnte auf Spuren von Aggregaten im Zellkultur-Überstand zurückzuführen sein. Wie erwartet konnte für Flag-TRAIL gezeigt werden, dass die Quervernetzung mit dem anti-Flag M2 mAk zur Bioaktivität auf Jurkat-Zellen führte. Für das scTRAIL-Molekül fiel die Steigerung in der Bioaktivität allerdings deutlich geringer aus (Abb. 4B). Dies deutet zunächst darauf hin, dass die TRAIL-Variante im Einzelkettenformat nach entsprechender sekundärer Aggregation den TRAIL-R2 schlechter aktiviert. Ein Flag-scTRAIL Molekül verfügt nur über ein Flag-Peptid, ein homotrimeres Flag-TRAIL Molekül enthält im Vergleich dazu drei Flag-Peptide. Obwohl nicht völlig ausgeschlossen

werden kann, dass die geringere Aktivität gegenüber dem TRAIL-R2 auf das Einzelketten-Format an sich zurückzuführen ist, scheint es doch näherliegend, dass der anti-Flag M2 mAk nur maximal zwei Flag-scTRAIL-Moleküle, und somit formal zwei Trimere, quervernetzen kann. Aufgrund der höheren Anzahl an Flag-Peptiden ist beim homotrimeren Flag-TRAIL dagegen die Möglichkeit der Ausbildung hochmolekularer TRAIL-Trimer-Komplexe gegeben, die potentiell eine stärkere Kapazität zur Rezeptor-Aktivierung besitzen. Unterschiede in den Bioaktivitäten von TRAIL-Varianten könnten auch durch eine fehlerhafte Zink Einordnung und die Ausbildung von partiell oxidierten, Disulfid-verbundenen TRAIL-Spezies erklärt werden (Lawrence *et al.*, 2001). Für das hier charakterisierte Flag-scTRAIL-Molekül scheint das in Anbetracht der Zytotoxizität auf anderen Zelllinien aber eher als unwahrscheinlich.

Die Zytotoxizitäts-Tests auf HT1080- und Colo205-Zellen, die beide den TRAIL-R1 und den TRAIL-R2 exprimieren (Tab. 5), gaben Aufschluss über das Verhalten der TRAIL-Varianten gegenüber beiden TRAIL-Todesrezeptoren. Die Moleküle zeigten auf beiden Zelllinien eine annähernd vergleichbare Bioaktivität, welche der Aktivierung des TRAIL-R1 zugeordnet wurde (Abb. 5A, 6A). Dagegen wurden nach Quervernetzen auf den beiden Zelllinien unterschiedliche Ergebnisse beobachtet (Abb. 5B, 6B). Auf HT1080-Zellen resultierte das Quervernetzen in einer Steigerung der Bioaktivität für beide Moleküle, die allerdings für Flag-TRAIL weitaus höher ausfiel (EC_{50} -Wert: 0,009 +/- 0,001 nM für Flag-TRAIL; 0,5 +/- 0,00 nM für Flag-scTRAIL). Dies könnte, ähnlich wie bei den Jurkat-Zellen, durch die besseren QuervernetzungsKapazitäten des Flag-TRAILs erklärt werden. Auf Colo205-Zellen resultierte das Quervernetzen auch in einer größeren Aktivitätssteigerung für Flag-TRAIL, jedoch waren die Bioaktivitäten beider Moleküle noch annähernd vergleichbar (EC_{50} -Wert: 0,17 +/- 0,06 nM für Flag-TRAIL; 0,63 +/- 0,06 nM für Flag-scTRAIL). Die voneinander abweichenden Aktivitäten der Moleküle nach Quervernetzung auf diesen beiden Zelllinien könnten durch die Unterschiede in den Expressionsprofilen der TRAIL-Rezeptoren erklärt werden. Die Expression von TRAIL-R2 ist vergleichbar, jedoch exprimieren Colo205-Zellen ungefähr viermal mehr TRAIL-R1 als HT1080-Zellen. Möglicherweise kompetiert der TRAIL-R1 mit dem TRAIL-R2 um quervernetzte Liganden, was in einer verminderten TRAIL-Sensitivität im Vergleich zu HT1080-Zellen resultiert, da der TRAIL-R2 bei der Apoptoseinduktion eine größere Rolle zu spielen scheint (Kelley *et al.*, 2005). Die TRAIL-Sensitivität könnte aber auch

durch die mögliche Heteromerbildung der Rezeptoren oder durch intrazelluläre Unterschiede der beiden Zelllinien, beispielsweise in der Expression von Apoptose-regulierenden Proteinen wie FLIP oder Smac/DIABLO, denen eine Modulation der TRAIL-Sensitivität zugeschrieben wird (Griffith *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001), beeinflusst werden. Zusätzlich kann die O-Glykosylierung von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 zur Liganden-induzierten Vernetzung der Rezeptoren und somit zur Caspase-8 Aktivierung beitragen (Wagner *et al.*, 2007).

Das Rezeptorsystem der TRAIL-Rezeptoren scheint ein sehr komplexes System zu sein. Hauptsächlich bedingt durch das Vorhandensein zweier Todesrezeptoren und zusätzlichen Decoy-Rezeptoren, die - unabhängig von der Ligandenbindung - untereinander Heterokomplexe bilden können (Lee *et al.*, 2005; Clancy *et al.*, 2005). Das kann die Interpretation der Rezeptor-spezifischen Aktivität erschweren. Auch Bremer und Kollegen konnten bei der Charakterisierung einer TRAIL-Mutante die Frage der TRAIL-Rezeptor Spezifität, speziell des TRAIL-R1, nicht lösen (Bremer *et al.*, 2008a).

Beide hier charakterisierten TRAIL-Varianten sollten also wie erwartet als bioaktive Trimere vorliegen, die in löslicher Form hauptsächlich den TRAIL-R1 und nach Quervernetzung den TRAIL-R1 und den TRAIL-R2 aktivieren.

Auf der Basis dieser TRAIL-Varianten wurden scFvTRAIL- und scFvscTRAIL-Fusionsproteine generiert, die spezifisch das FRP5-Epitop der extrazellulären ErbB2 Domäne erkennen (Harwerth *et al.*, 1992; Wels *et al.*, 1992a). Durch Unterschiede in den molekularen Anordnungen der beiden Proteine (scFv_{erbB2}-F-TRAIL: Hexamer; scFv_{erbB2}-F-scTRAIL: Monomer in Bezug auf das Antikörper-Modul, Trimer in Bezug auf TRAIL) (Abb. 12), also durch Aviditätseffekte lässt sich die überproportional bessere Bindung des hexameren Moleküls auf Colo205-Zellen im Vergleich zum einzelkettigen, monomeren Molekül gut erklären (Abb. 14).

Wie beeinflusst die stärkere Antigenbindung von scFv_{erbB2}-F-TRAIL die Bioaktivität auf ErbB2-positiven Zellen? Auf antigennegativen Jurkat-Zellen zeigten beide Moleküle in den eingesetzten Konzentrationen keine Bioaktivität (Abb. 15A). Für das hexamere scFv_{erbB2}-F-TRAIL würde man bei höheren Konzentrationen eine Bioaktivität erwarten, da ein hexamerer Ligand als die minimale signalinduzierende Einheit für Rezeptoren der TNF-Familie angesehen wird (Holler *et al.*, 2003). Die etwas höhere Bioaktivität von scFv_{erbB2}-F-TRAIL nach Quervernetzung im Vergleich

zu scFv_{erbB2}-F-scTRAIL (Abb. 15B) lässt sich – wie schon für Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL diskutiert – durch die besseren QuervernetzungsKapazitäten des konventionellen, homotrimeren Moleküls erklären. Die Antigen-abhängige Bioaktivität zeigt sich deutlich auf HT1080- und Colo205-Zellen. Auffällig ist der große Antigen-abhängige Aktivitätsgewinn der einzelkettigen TRAIL-Variante im Vergleich zur homotrimeren TRAIL-Variante. So sinken die EC₅₀-Werte von Flag-TRAIL durch das *targeting* auf HT1080-Zellen ungefähr um den Faktor 30 und auf Colo205-Zellen um den Faktor 15. Hingegen sinken die EC₅₀-Werte von Flag-scTRAIL auf HT1080-Zellen ungefähr um den Faktor 260 und auf Colo205-Zellen um den Faktor 120, wenn das Protein mit einem scFv_{erbB2} fusioniert ist (Tab. 2, 3, 6, 7). Diese gesteigerte Bioaktivität ist auf beiden Zelllinien Antigen-abhängig, da sie durch Kompetierung mit einem rekombinanten ErbB2-Peptid, welches wie der scFv_{erbB2} auch für das FRP5-Epitop spezifisch ist, reduziert werden konnte (Abb. 18, 19).

Dienen mögliche agonistische Wirkungen des scFv_{erbB2} als Erklärung für die Unterschiede in der Antigen-abhängigen Aktivitätssteigerung? Da ErbB2 in Verbindung mit der Aktivierung proliferationsfördernder Signalwege – hauptsächlich des MAPK- und des PI3K-AKT-Signalweges (Brazil und Hemmings, 2001; Scheid und Woodgett, 2001) – steht, könnten diese Mechanismen der TRAIL-induzierten Apoptose entgegenwirken. Eine wichtige Funktion der aktivierten PI3K in Zellen ist die Inhibition der Apoptose (Yao und Cooper, 1995), wobei Akt ein bedeutender Kandidat für die Ausführung dieses PI3K-abhängigen Überlebenssignals ist. So wurde Akt unter anderem mit der c-FLIP Expression (Panka *et al.*, 2001) und der Caspase-9 Inhibierung (Cardone *et al.*, 1998) in Verbindung gebracht. In diesem Zusammenhang konnten Fulda und Kollegen auch zeigen, dass die PI3K-Inhibition Glioblastomzellen gegenüber Todesrezeptor- und Chemotherapie-induzierter Apoptose sensitiviert. Die Analyse der Apoptose-Signalwege zeigte, dass die PI3K-Inhibition mit TRAIL oder Doxorubicin zusammenarbeitet und die Permeabilisation der Mitochondrienmembran, Caspase Aktivierungen und die Caspase-abhängige Apoptose steuert (Opel *et al.*, 2008).

Es konnte hier gezeigt werden, dass die Stimulation von Colo205-Zellen mit den ErbB2-spezifischen TRAIL-Varianten zu einer Rezeptoraktivierung führte. Dabei resultierte die Stimulation mit scFv_{erbB2}-F-TRAIL in einer sehr starken Phosphorylierung, wohingegen durch scFv_{erbB2}-F-scTRAIL kaum Aktivierung hervorgerufen wurde (Abb. 20). Das könnte die deutlich bessere Bioaktivität des

einzelkettigen Moleküls auf Colo205-Zellen (Abb. 17A) und die dazu annähernd vergleichbare Bioaktivität der beiden Moleküle auf HT1080-Zellen (Abb. 16A) erklären, da Colo205-Zellen auch ungefähr 15 mal mehr ErbB2 exprimieren. Nach Quervernetzung scheint das Apoptose-induzierende Signal zu überwiegen, was sich in der gleichen Aktivität der Moleküle widerspiegelt (Abb. 16B, 17B).

Die Steigerung der Bioaktivität wird auch durch die Mimikrie von Membran-TRAIL in Antigen-gebundener Form an der Zelle und damit *in situ* Aktivierung von TRAIL-R2 erreicht. Dies wurde erfolgreich für beide ErbB2-spezifischen TRAIL-Varianten auf HT1080- und Colo205-Zellen gezeigt (Abb. 22, 23). Dabei fällt auf, dass das einzelkettige Molekül (rel. Anteil TRAIL-R2: HT1080-Zellen 83 %; Colo205-Zellen 76 %) etwas stärker TRAIL-R2 Aktivierung initiierte als das konventionelle, homotrimere (hexamere) Molekül (rel. Anteil TRAIL-R2: HT1080-Zellen 64 %; Colo205-Zellen 60 %). Dies ist weder durch Unterschiede in der molekularen Anordnung noch durch Unterschiede in der ErbB2-Aktivierung zu erklären. Das Ergebnis fügt sich dennoch gut in die größere Antigen-abhängige Aktivitätssteigerung der einzelkettigen TRAIL-Variante ein.

Das Konzept der TRAIL-Fusionsproteine zur antitumoralen Aktivitätssteigerung durch die zielgerichtete Tumorthherapie konnte mit der Herstellung der TRAIL-Varianten scFv36-F-TRAIL und scFv36-F-scTRAIL mit Spezifität für FAP für ein weiteres Oberflächenantigen bewiesen werden.

Beide Proteine zeigten in ihrer löslichen Form keine Bioaktivität auf Jurkat-Zellen, was höhermolekulare Aggregate ausschließen lässt (Abb. 29A).

Die Antigen-abhängige Bioaktivität zeigte sich deutlich durch den direkten Vergleich der Zytotoxizität auf HT1080- und HT1080FAP-Zellen. So resultierte die Stimulation von antigenpositiven HT1080FAP-Zellen in einer Steigerung der Bioaktivität um einen Faktor von ca. 4000 für das konventionelle, homotrimere scFv36-F-TRAIL und ca. 2000 für das einzelkettige scFv36-F-scTRAIL (Abb. 30). Der Vergleich mit den ErbB2-spezifischen TRAIL-Varianten zeigt, dass die Antigen-abhängige Bioaktivität für die FAP-spezifischen TRAIL-Varianten deutlich höher ausfiel. Dies ist möglicherweise durch die weitaus höhere Antigendichte auf den HT1080FAP-Zellen im Vergleich zu ErbB2 zu erklären. Die Antigen-abhängige Aktivität war sogar höher als die Bioaktivität der quervernetzten Moleküle auf den FAP-negativen HT1080-

Zellen (Daten nicht gezeigt) und höher als die der quervernetzten, ErbB2-gebundenen Moleküle auf den ErbB2-positiven HT1080-Zellen (Abb. 16B).

Im Vergleich zu den hier charakterisierten FAP-spezifischen Molekülen zeigte MBOS4-TRAIL, ein FAP-spezifischer Minibody fusioniert mit einem TRAIL-Modul, auf antigenpositiven HT1080FAP-Zellen nur eine Steigerung der Bioaktivität um einen Faktor von 30 im Vergleich zu antigennegativen HT1080-Zellen (Wajant *et al.*, 2001), was bei vergleichbarer Affinität der Antikörpermodule eher auf das andere Designprinzip oder konstruktsspezifische Eigenschaften zurückgeführt werden kann. Eine weitere Anforderung an das Konzept – die TRAIL-R2 abhängige Bioaktivität – wurde auch durch die FAP-spezifischen TRAIL-Varianten erfüllt. Neutralisations-Experimente mit TRAIL-R2 spezifischen Fabs demonstrierten auf HT1080FAP-Zellen einen dominanten TRAIL-R2-abhängigen Zelltod beider FAP-spezifischen TRAIL-Fusionsproteine (Abb. 31A, B). Auf antigennegativen HT1080-Zellen konnte in den eingesetzten Konzentrationen keine Bioaktivität nachgewiesen werden, was nochmals die Antigen-abhängige Bioaktivität verdeutlichte (Abb. 31C, D).

5.1.2 Stabilität

Für löslichen TNF ist eine Dissoziation in Monomere beschrieben (Alzani *et al.*, 1995) und freie Monomere unterliegen in geringen Konzentrationen einer schnellen Denaturierung (Corti *et al.*, 1992). Um dies zu verhindern, wurden Einzelketten Derivate von TNF (scTNF) konstruiert, die sich beispielsweise durch verbesserte *in vitro* und *in vivo* Stabilität auszeichnen (Krippner-Heidenreich *et al.*, 2008). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten pharmakokinetischen Studien für Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL ergaben keine nennenswerten Unterschiede der beiden TRAIL Varianten in der *in vitro* und in der *in vivo* Stabilität (Abb. 7, 8), was im Lichte der Befunde mit scTNF sehr überraschend war. So resultierte das Einzelketten-Proteindesign in keinem erkennbaren Stabilitätsvorteil gegenüber dem konventionellen, homotrimeren löslichen Liganden. Die Stabilisierung des TRAIL-N-Terminus durch die Trimerisierungsdomäne TNC erhöht die Aktivität gegenüber dem TRAIL-R2 erheblich, ohne eine Aggregation der Proteine zu induzieren (Berg *et al.*, 2007). Möglicherweise kann die Verknüpfung der TRAIL-Module über Linker ähnliches bewirken. Bei dem hier charakterisierten scTRAIL sind die verknüpfenden

Linker eventuell zu lang, um eine Fixierung zu bewirken. Für TNF konnte gezeigt werden, dass ein GGGGS-Linker ausreicht (mündliche Referenz K. Pfizenmaier). Es wurde ein schneller Abfall der Serumspiegel um 20-30 % beider Proteine in den ersten sechs Minuten beobachtet. Möglicherweise werden die Proteine sehr schnell absorbiert. Dies könnte über eine Analyse der Organverteilung mit radioaktiv markierten Molekülen geklärt werden. Die Kinetik über den folgenden Zeitraum, abgesehen von den zwei initialen Zeitpunkten, war linear. Dieser lineare Verlauf der Kinetik für TRAIL wurde auch schon von Kelley *et al.* beobachtet. Er wurde darauf zurückgeführt, dass im Falle des TRAIL die Rezeptor-vermittelte Elimination keine signifikante Rolle zu spielen scheint (Kelley *et al.*, 2001). Die publizierte Serumhalbwertszeit für TRAIL in Nagern liegt bei ungefähr 5 min. Interessanterweise, ist diese rasche Elimination charakteristisch für 20 kDa Proteine (Clark *et al.*, 1996), was der Größe einer monomeren TRAIL-Untereinheit entspricht. Die Autoren gehen aber davon aus, dass der in der Zirkulation gemessene TRAIL in seiner trimeren Form vorliegt und dass TRAIL möglicherweise in der Niere dissoziiert, was eine rasche Filtration ermöglicht (Kelley *et al.*, 2001). Die hier ermittelten pharmakokinetischen Profile weisen jedoch im Unterschied dazu aus ungeklärten Gründen auf eine größere Stabilität der TRAIL-Varianten hin, was zumindest für das untersuchte Flag-TRAIL überraschend war.

Die durchgeführten pharmakokinetischen Studien für die ErbB2-spezifischen TRAIL-Varianten ergaben auch keine nennenswerten Unterschiede in der *in vitro* und in der *in vivo* Stabilität (Abb. 24, 25). scFv_{erbB2}-F-TRAIL war *in vivo* über den angegebenen Zeitraum etwas, jedoch nicht signifikant stabiler als scFv_{erbB2}-F-scTRAIL, was sich durch die Unterschiede in den molekularen Größen erklären lässt (scFv_{erbB2}-F-TRAIL: Hexamer; scFv_{erbB2}-F-scTRAIL: Trimer). Der Verlauf der pharmakokinetischen Profile war vergleichbar zu den oben beschriebenen Varianten. Unter der Betrachtung der AUC-Werte für Flag-TRAIL und Flag-scTRAIL (Tab. 4) im Vergleich zu den AUC-Werten für scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL (Tab. 10), führte die Fusion der TRAIL-Varianten mit einem scFv zu einem *in vivo* Stabilitätsvorteil, der durch die molekulare Größe bedingt sein kann. Helfrich und Kollegen konnten unter ähnlichen Bedingungen bei Untersuchungen zur *in vitro* Serumstabilität eines scFv-TRAIL-Fusionsproteins ebenfalls eine hohe apoptotische Aktivität nach über 72 h Inkubation in Serum bei 37 °C feststellen (Stieglmaier *et al.*, 2008).

5.1.3 Antitumorale Aktivität *in vivo*

Die Bewertung der Übertragbarkeit der in *in vitro* Daten und der antitumoralen Aktivität *in vivo* erfolgte in einem humanen Kolonkarzinom-Modell in NMRI nu/nu Mäusen. Übereinstimmend mit *in vitro* Ergebnissen wurde bereits häufig gezeigt, dass Colo205-Tumoren *in vivo* eine hohe TRAIL-Sensitivität aufweisen (Walczak *et al.*, 1999; Ashkenazy *et al.*, 1999; Gliniak und Le, 1999; Kelley *et al.*, 2001; Naka *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2006). Die Behandlung erfolgte peritumoral mit ankonzentriertem Zellkulturüberstand der entsprechenden Moleküle. In diesem Zusammenhang ist es für die geplanten „*proof of concept*“-Studien nicht zwingend notwendig aufgereinigtes Protein einzusetzen, da bereits erfolgreiche *in vivo* Behandlungen mit Zellkulturüberständen durchgeführt wurden (Stieglmaier *et al.*, 2008). Wie in Abbildung 26A dargestellt, konnte eine Reduzierung der relativen Tumorgrößen in den mit Flag-scTRAIL, scFv_{erbB2}-F-TRAIL und scFv_{erbB2}-F-scTRAIL behandelten Gruppen bis einen Tag über den Behandlungszeitraum hinaus erzielt werden. Der direkte Vergleich Flag-scTRAIL versus scFv_{erbB2}-F-scTRAIL bestätigte den antitumoralen Aktivitätsgewinn *in vivo* durch zielgerichtete TRAIL-Varianten. Weiter zeigte der Vergleich der beiden ErbB2-spezifischen TRAIL-Varianten einen signifikanten Unterschied der Tumorgrößen auch nach Absetzen der Behandlung (Tag 4 bis 11) (Abb. 26B). Die Behandlung mit scFv_{erbB2}-F-scTRAIL wies die größte antitumorale Aktivität auf. Diese Tendenz zeichnete sich auch schon für die *in vitro* Aktivität ab. Im Mausmodell ist dieser Aktivitätsunterschied sicherlich durch die molekularen Größen, welche die Tumordinfiltration beeinflussen, mitbedingt. Das hexamere scFv_{erbB2}-F-TRAIL mit 300 kDa scheint in diesem Zusammenhang eher ungeeignet zu sein, wohingegen sich das monomere scFv_{erbB2}-F-scTRAIL mit 100 kDa durch eine optimale Größe auszeichnet (Holliger und Hudson, 2005). Nach Behandlungsende war, wie auch schon häufig in der Literatur beschrieben (z.B. Naka *et al.*, 2002), ein Wiedereinsetzen des Tumorwachstums bei allen Tumoren zu beobachten. Um mit dieser Monobehandlung eine komplette Remission zu erhalten, müssten der Behandlungszeitraum ausgedehnt werden und die Behandlungsdosen möglicherweise erhöht werden. Die in der Literatur beschriebenen Kolonkarzinom-Modelle wurden - im Vergleich zu den hier eingesetzten Mengen (Flag-scTRAIL 2,4 mg/kg/Tag; scFv_{erbB2}-F-TRAIL 6 mg/kg/Tag; scFv_{erbB2}-F-scTRAIL 4 mg/kg/Tag) - mit weitaus höheren TRAIL-Dosen behandelt. Die kleinste publizierte Dosis liegt bei 3

mg/kg/Tag (i.p. Behandlung) und zeigt nur marginale Effekte (Ashkenazy *et al.*, 1999). Dabei reichen die eingesetzten TRAIL-Dosen von 10 bis 120 mg/kg/Tag (i.p. / i.v. Behandlungen) und die Behandlungszeiträume variieren von 4 bis zu 28 Tagen, wobei in erwarteter Weise Dosis-abhängige Effekte zu sehen sind (Ashkenazy *et al.*, 1999; Walczak *et al.*, 1999; Gliniak und Le, 1999; Kelley *et al.*, 2001). Die in der vorliegenden Arbeit durch die zielgerichtete Behandlung erzielten Ergebnisse sind in diesem Kontext noch viel versprechender, da klare antitumorale Wirkung mit vergleichsweise geringen TRAIL-Dosen erreicht wurde.

5.3 Ausblick

Nach wie vor gibt es einen großen Bedarf an sicheren und noch effektiveren antineoplastischen Therapeutika. Dabei richtet sich der Fokus auch auf neue proapoptotische Agenzien. Die erfolgreichen *in vitro* Resultate und die präklinischen Daten dieser vorliegenden Arbeit rechtfertigen eine Weiterentwicklung dieser viel versprechenden TRAIL-Varianten. Da die Tumorbehandlung *in vivo* wie erwartet zu keinen Nebenwirkungen führte, die Moleküle in der Monotherapie deutliche antitumorale Effekte zeigten und die selektiv hohe Wirksamkeit der einzelkettigen ErbB2-spezifischen TRAIL-Variante *in vivo* bestätigt werden konnte, werden diese TRAIL-Varianten als Basis für eine Kombinationstherapie dienen. Präklinische Daten bestätigen sehr wirkungsvolle Kombinationen von TRAIL mit Chemotherapeutika, welche die Apoptose-Sensitivität der Tumorzellen erhöhen und damit signifikante klinische Effekte erzielen können.

Im Rahmen der Weiterentwicklung dieses Behandlungskonzeptes könnte beispielsweise eine Therapie in Kombination mit 5-Fluorouracil (5-FU) oder Irinotecan (Camptosar[®]) in Erwägung gezogen werden. Irinotecan gehört zu der Gruppe der Topoisomerase-Hemmer (Hsiang *et al.*, 1988) und bei 5-FU handelt es sich um einen antineoplastischen Metaboliten, welcher in der Behandlung von metastasierendem Kolorektalkarzinom das am häufigsten eingesetzte Medikament ist (Longley *et al.*, 2003). Präklinische Studien an Kolonkarzinomen bestätigten die Effizienz dieser TRAIL-Kombinationstherapien. Mit der Kombination aus TRAIL und Irinotecan konnten synergistische Behandlungseffekte gegenüber Colo205-Tumoren gezeigt werden, die abhängig von der initialen Tumorgröße zu einer kompletten Remission führten (Gliniak und Le, 1999). Naka und Kollegen bestätigten, dass

durch die Kombination mit 5-FU oder Irinotecan verstärkte antitumorale Effekte erzielt werden können, bei denen 50 % der Tiere durch die Kombination mit Irinotecan eine komplette Remission erreichen. Hierbei ist die Sensitivierung gegenüber TRAIL durch die Irinotecan-induzierte Hochregulierung von TRAIL-R2 bedingt (Naka *et al.*, 2002). Diese Beobachtungen konnten auch bei einem Xenotransplantat-Mausmodell mit primärem humanem Kolonkarzinomgewebe gemacht werden. Hier zeigte die Kombinationsbehandlung von TRAIL mit Irinotecan auch synergistische Effekte, bedingt durch die Hochregulierung der TRAIL-Todesrezeptoren (TRAIL-R1 und TRAIL-R2) und des proapoptotischen Proteins Bax (Sugamura *et al.*, 2008).

Alternativ könnten auch Kombinationsbehandlungen mit Smac-Mimetika in Betracht gezogen werden. Diese *small molecules* zeigten synergistische antitumorale Effekte in der Kombination mit TRAIL beim Glio- und Neuroblastom, Melanom, Pankreaskarzinom und bei der Leukämie *in vitro* (Li *et al.*, 2004; Fulda *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2002) und erhöhten nachhaltig die antitumorale Aktivität von TRAIL in einem intrakraniellen Gliom-Xenotransplantat-Modell (Fulda *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Daten, wäre es sehr interessant die Kombinationseffekte im Kolonkarzinom-Modell zu studieren.

Auf der Basis der hier hergestellten und charakterisierten Formatvarianten ließen sich TRAIL-Fusionsproteine mit Spezifität für weitere Antigene - speziell auch für Tumorstammzellmarker - generieren, um das Spektrum der zielgerichteten Tumortherapie zu erweitern. Neue Befunde zeigen, dass Tumoren eine heterogene Zellmasse darstellen und Krebsstammzellen beim Ursprung, beim Erhalt und bei der Metastasierung von Tumoren eine wichtige Rolle spielen können (Reya *et al.*, 2001; Wang und Dick, 2005). Das wurde in diesem Zusammenhang für Leukämien (z.B. Bonnet und Dick, 1997; Lapidot *et al.*, 1994) und solide Tumoren wie beispielsweise dem Glio- und Medulloblastom (Singh *et al.*, 2004) und dem Kolonkarzinom (O'Brien *et al.*, 2007; Ricci-Vitiani *et al.*, 2007) beschrieben. Da sich Krebsstammzellen oft in einem Ruhezustand in Stammzellnischen befinden (Guan *et al.*, 2003), werden sie von Therapien, die sich gegen schnell teilende Zellen richten, nicht erfasst. Außerdem verfügen sie über effektive DNA-Reparatursysteme (Bao *et al.*, 2006) und exprimieren ABC-Transporter (Hirschmann-Jax *et al.*, 2004), die sie gegen Strahlen- und Chemotherapie schützen. Dies könnte erklären, weshalb viele Tumoren zunächst auf konventionelle Therapien ansprechen, später aber Rezidive und Metastasen auftreten, die häufig therapieresistent sind. Neben Strategien, die die

Selbsterneuerung von Krebsstammzellen - durch die Identifizierung und Hemmung spezifischer, von der Stammzellnische ausgesendeter Signale – regulieren, könnten Tumorstammzellmarker wie CD133 als Zielstrukturen für die zielgerichtete Apoptoseinduktion dienen. Bis jetzt kann aber keiner der in diesem Zusammenhang beschriebenen Oberflächenmarker ausschließlich den Tumorstammzellen zugeordnet werden. Mit der Identifizierung definierterer Marker, aber auch dem *targeting* von bisher akzeptierten Tumorstammzellmarkern könnte dieser neue Ansatz der zielgerichteten Tumorthherapie auch hier möglicherweise einen wichtigen therapeutischen Beitrag leisten.

Die Chancen und Grenzen der zielgerichteten Tumorbehandlung durch proapoptotische Liganden der TNF-Familie werden in den kommenden Jahren durch intensive Forschung und Weiterentwicklungen genauer definiert werden können.

6. Summary

Cancer is the second leading cause of death in Germany and for most solid tumors and hematologic cancers, current therapy is inadequate. Hence, there is an unmet medical need for novel treatments. In recent years, a major task in clinical cancer research has been to develop more selective, biologic mechanism-based approaches that can specifically target tumors while minimizing undesirable toxic effects. Targeting the apoptotic machinery of malignant cells is one attractive concept, which is currently exploited for the proapoptotic members of the TNF-ligand-family - TNF, CD95L and TRAIL - at various stages of preclinical and clinical development. TRAIL is probably the best candidate of a death ligand for systemic application because the administration of trimeric, soluble TRAIL is well tolerated (Ashkenazy *et al.*, 1999; Walczak *et al.*, 1999), and a variety of tumor cell lines and primary tumor samples are TRAIL sensitive *in vivo*. Although early clinical trials are promising, it is important to recognize that the utility of TRAIL therapies is limited to patients with TRAIL-sensitive tumors. The high frequency of primarily TRAIL-resistant tumor cells requires strategies to sensitize tumor but not normal cells for TRAIL-induced apoptosis. Pre- and cotreatment with different chemotherapeutic drugs as well as irradiation lead to TRAIL sensitization of tumor cell lines. Concurrently, this faces the potential problem that under such combined treatment options normal cells might also be sensitized. Altogether, the presently published knowledge about TRAIL's clinical performance points to the need of a further optimization of TRAIL reagents. Thus, the aim of this thesis was the improvement of specific activity and *in vivo* stability, and the combination of TRAIL function with tumor targeting.

In an attempt to further improve TRAIL's tumor selective activity new TRAIL fusion proteins comprising antibody fragments (scFvs) for targeting ErbB2 and FAP were generated to circumvent some limiting characteristics of both the TRAIL receptor system and TRAIL: the widespread expression of the various TRAIL receptors throughout the human body; second, the differential binding affinities and crosslinking requirements of the agonistic receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2. TRAIL-R1 becomes activated by both the soluble and the membrane-bound form of the ligand, whereas TRAIL-R2 becomes only activated by membrane TRAIL or soluble TRAIL secondarily cross-linked on the cell surface by antibodies (Wajant *et al.*, 2001). And

third, the solubility of TRAIL reagents, given that some of the genetically engineered TRAIL variants are particularly prone to aggregation.

Further, in analogy to the recently described single-chain TNF molecule, an innovative TRAIL variant was designed, where TRAIL was expressed as a single polypeptide chain (scTRAIL), and compared to conventional, homotrimeric TRAIL. These two TRAIL variants showed similar eukaryotic expression rates and equivalent apoptotic activity on Jurkat, HT1080, and Colo205 cells. Stability *in vitro* and *in vivo* of the scTRAIL and the homotrimeric TRAIL molecules were found to be equal. This finding was unexpected in the light of superior plasma half lives of scTNF as compared to TNF molecules.

The main topic of this thesis was the characterization of the ErbB2 specific fusion proteins: the conventional, homotrimeric scFv_{erbB2}-F-TRAIL in comparison to the scTRAIL-based scFv_{erbB2}-F-scTRAIL. The high-affinity scFv_{erbB2} domain specifically recognized ErbB2, an established cell surface target antigen that is highly overexpressed on a variety of human solid tumors. Specific binding of both TRAIL molecules to ErbB2 positive Colo205 cells was demonstrated by flow cytometry, with the homotrimeric scFv_{erbB2}-F-TRAIL molecule showing stronger antigen-binding compared to the scTRAIL fusion protein. This was in accordance with the molecular masses of the proteins (scFv_{erbB2}-F-TRAIL: hexamer; scFv_{erbB2}-F-scTRAIL: monomer), and therefore could be explained with avidity effects. Further, the influence of antigen-binding on bioactivity was studied. Interestingly, among the tested TRAIL molecules, the tumor antigen targeted scTRAIL fusion protein showed highest apoptotic activity *in vitro* on ErbB2 positive Colo205 cells. There is some evidence that high ErbB2 activation via scFv_{erbB2}-F-TRAIL could counteract apoptosis induction. More important, apoptosis induction of both ErbB2 specific TRAIL molecules was target-antigen-dependent, since preincubation with a competing ErbB2 peptide restored cell viability to a significant extent. Moreover, target-antigen binding converted the soluble fusion proteins into functional equivalents of membrane-bound ligands that were capable of efficiently signalling apoptosis via TRAIL-R2, the predominant TRAIL induced apoptosis pathway in the cell lines under study. Accordingly, receptor binding and therefore apoptosis induction could be blocked by a TRAIL-R2-neutralizing monovalent antibody fragment (Fab). Pharmacokinetic studies with these tumor targeted TRAIL fusion proteins revealed an increased *in vivo* half life and thus extended bioavailability of these molecules as compared to

non-targeted TRAIL variants. Again, as with TRAIL versus scTRAIL, no significant differences in pharmacokinetic properties between the two design formats of antigen targeted TRAIL fusion proteins were observed. Tumoricidal effects on pre-existing human colon carcinomas in nude-mice were subsequently analyzed. Mice bearing Colo205 tumors were treated with PBS for negative control, F-scTRAIL, scFV_{erbB2}-F-TRAIL and scFV_{erbB2}-F-scTRAIL for 4 days (10 µM/day; p.t.). Decreases in tumor size were observed in all three TRAIL groups after initiation of treatment, compared with those in control mice ($p < 0,05$ in all cases). Moreover, data pointed to the highest antitumor activity for the ErbB2 specific scTRAIL ($p < 0,05$ compared to all groups). Additional *in vitro* data obtained with TRAIL fusion proteins comprising scFVs for targeting the tumor stroma antigen FAP corroborated these findings of enhanced TRAIL activity upon target cell-restricted apoptosis induction.

In conclusion, these data together are proof of concept *in vitro* and *in vivo* of superior anti tumoral TRAIL activity via enforced apoptosis induction of targeted TRAIL molecules. Accordingly, this design concept represents a promising strategy to improve TRAIL's anti-tumoral action and to minimize potential non-targeted, unwanted actions on normal tissues, evidence for which already exists in few examples but will become more apparent with the presently ongoing clinical studies on TRAIL combination therapy. Therefore, it will be interesting to see whether the superior action of the targeted TRAIL molecules as evident from single agent treatment studies performed in this work will hold up or even become more prominent in future studies exploiting usefulness of TRAIL combination with conventional chemotherapies in the treatment of cancer.

7. Literaturverzeichnis

Alzani R., Cozzi E., Corti A., Temponi M., Trizio D., Gigli M., Rizzo V. (1995). Mechanism of suramin-induced deoligomerization of tumor necrosis factor alpha. *Biochemistry* 34: 6344-6350.

Ashkenazi A., Pai R. C., Fong S., Leung S., Lawrence D. A., Marsters S. A., Blackie C., Chang L., McMurtrey A. E., Hebert A., DeForge L., Koumenis I. L., Lewis D., Harris L., Bussiere J., Koeppen H., Shahrokhi Z., Schwall R. H. (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.* 104: 155-162.

Ashkenazi A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer* 2: 420-430.

Balza E., Mortara L., Sassi F., Monteghirfo S., Carnemolla B., Castellani P., Neri D., Accolla R. S., Zardi L., Borsi L. (2006). Targeted delivery of tumor necrosis factor-alpha to tumor vessels induce a therapeutic T cell-mediated immune response that protects the host against syngenic tumors of different histologic origin. *Clin. Cancer Res.* 12: 2575-2582.

Bao S., Wu Q., McLendon R. E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A. B., Dewhirst M. W., Bigner D. D., Rich J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of DNA damage response. *Nature* 444: 756-760.

Becker J. C., Pancook J. D., Gillies S. D., Furukawa K., Reisfeld R. A. (1996). T cell-mediated eradication of murine metastatic melanoma induced by targeted interleukin 2 therapy. *J. Exp. Med.* 183: 2361-2366.

Berg D., Lehne M., Müller N., Siegmund D., Münkler S., Sebald W., Pfizenmaier K., Wajant H. (2007). Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L. *Cell Death Differ.* 14: 2021-2034.

Bergers G., Benjamin L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 3: 401-410.

Bodmer J. L., Meier P., Tschopp J., Schneider P. (2000). Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 275: 20632-20637.

Bonnet D. and Dick J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3: 730-737.

Borsi L., Balza E., Carnemolla B., Sassi F., Castellani P., Berndt A., Kosmehl H., Biro A., Siri A., Orecchia P., Grassi J., Neri D., Zardi L. (2003). Selective targeted delivery of TNFalpha to tumor blood vessels. *Blood* 102: 4384-4392.

Brazil D. P., Hemmings B. A. (2001). Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem. Sci.* 26: 657-664.

Bremer E., Kuijlen J., Samplonius D., Walczak H., de Leij L., Helfrich W. (2004a). Target cell-restricted and –enhanced apoptosis induction by a scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for the pancarcinoma-associated antigen EGP2. *Int. J. Cancer* 109: 281-290.

Bremer E., Samplonius D., Kroesen B. J., van Genne L., de Leij L., Helfrich W. (2004b). Exceptional potent anti-tumor bystander activity of an scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for EGP2 toward target antigen-negative tumor cells. *Neoplasia* 6: 636-645.

Bremer E., Samplonius D. F., van Genne L., Dijkstra M. H., Kroesen B. J., de Leij L. F., Helfrich W. (2005a). Simultaneous inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) signalling and enhanced activation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor mediated apoptosis induction by an scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for human EGFR. *J. Biol. Chem.* 18: 10025-10033.

Bremer E., Samplonius D. F., Peipp M., van Genne L., Kroesen B. J., Fey G. H., Gramatzki M., de Leij L. F., Helfrich W. (2005b). Target cell-restricted apoptosis induction of acute leukemic T cells by a recombinant tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand fusion protein with specificity for human CD7. *Cancer Res.* 65: 3380-3388.

Bremer E., ten Cate B., Samplonius D. F., de Leif L. F., Helfrich W. (2006a). CD7-restricted activation of Fas-mediated apoptosis: a novel therapeutic approach for acute T-cell leukemia. *Blood* 107: 2863-2870.

Bremer E., van Dam G., Kroesen B. J., de Leij L., Helfrich W. (2006b). Targeted induction of apoptosis for cancer therapy: current progress and prospects. *Trends Mol. Med.* 12: 382-393.

Bremer E., de Bruyn M., Samplonius D. F., Bijma T., Ten Cate B., de Leij L. F., Helfrich W. (2008a). Targeted delivery of a designed sTRAIL mutant results in superior apoptotic activity towards EGFR-positive tumor cells. *J. Mol. Med.* 86: 909-924.

Bremer E., ten Cate B., Samplonius D. F., Mueller N., Wajant H., Stel A. J., Chamuleau M., van de Loosdrecht A. A., Stieglmaier J., Fey G. H., Helfrich W. (2008b). Superior activity of fusion protein scFvRit:sFasL over cotreatment with rituximab and Fas agonists. *Cancer Res.* 68: 597-604.

Brocks B., Garin-Chesa P., Behrle E., Park J. E., Rettig W. J., Pfizenmaier K., Moosmayer D. (2001). Species-crossreactive scFv against tumor stroma marker “fibroblast activation protein“ selected by phage display from an immunized FAP^{-/-} knock-out mouse. *Mol. Med.* 7: 461-469.

Brooks A. D., Ramirez T., Toh U., Onksen J., Elliott P. J., Murphy W. J., Sayers T. J. (2005). The proteasome inhibitor bortezomib (Velcade) sensitizes some human tumor cells to Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1059: 160-167.

Bross P. F., Beitz J., Chen G., Chen X. H., Duffy E., Kieffer I., Roy S., Sridhara R., Raham A., Williams G., Pazdur R. (2001). Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapse acute myeloid leukaemia. *Clin. Cancer Res.* 7: 1490-1496.

Camidge D., Herbst R. S., Gordon M., Eckhardt S., Kurzroc R., Durbin B., Ing J., Ling J., Sager J., Mendelson D. (2007). A phase I safety and pharmacokinetic study of apomab, a human DR5 agonist antibody, in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* 25: 3582.

Cardone M. H., Roy N., Stennicke H. R., Salvesen G. S., Franke T. F., Stanbridge E., Frisch S., Reed J. C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282: 1318-1321.

Carter P., Presta L., Gorman C. M., Ridgway J. B., Henner D., Wong W. L., Rowland A. M., Kotts C., Carver M. E., Shepard H. M. (1992). Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285-4289.

Chinnaiyan A. M., Prasad U., Shankar S., Hamstra D. A., Shanaiah M., Chenervert T. L., Ross B. D., Rehemtulla A. (2000). Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1754-1759.

Clancy L., Mruk K., Archer K., Woelfel M., Mongkolsapaya J., Screatton G., Lenardo M. J., Chan F. K. (2005). Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 18099-18104.

Clark R., Olson K., Fuh G., Marian M., Mortensen D., Teshima G., Chang S., Chu H., Mukku V., Canova-Davis E., Somers T., Cronin M., Winkler M., Wells J. A. (1996). Long-acting growth hormones produced by conjugation with polyethylene glycol. *J. Biol. Chem.* 271: 21969-21977.

Colcher D., Bird R., Roselli M., Hardmann K. D., Johnson S., Pope S., Dodd S. W., Pantoliano M. W., Milenic D. E., Schlom J. (1990). In vivo tumor targeting of a recombinant single-chain antigen-binding protein. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1191-1197.

Corti A., Fassina G., Marucci F., Barbanti E., Cassani G. (1992). Oligomeric tumour necrosis factor alpha slowly converts into inactive forms at bioactive levels. *Biochem. J.* 284: 905-910.

Coussens L., Yang-Feng T. L., Liao Y. C., Chen E., Gray A., McGrath J., Seeburg P. H., Libermann T. A., Schlessinger J., Francke U., Levinson A., Ullrich A. (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptors shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230: 1132-1139.

Coussens L. M., Werb Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-867.

Cullen K. J., Smith H. S., Hill S., Rosen N., Lippman M. E. (1991). Growth factor messenger RNA expression by human breast fibroblasts from benign and malignant lesions. *Cancer Res.* 51: 4978-4985.

Curnis F., Sacchi A., Borgna L., Magni F., Gasparri A., Corti A. (2000). Enhancement of tumor necrosis factor alpha antitumor immunotherapeutic properties by targeted delivery to aminopeptidase N (CD13). *Nat. Biotechnol.* 18: 1185-1190.

Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42.

Dunn G. P., Old L. J., Schreiber R. D. (2004a). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21: 137-148.

Dunn G. P., Old L. J., Schreiber R. D. (2004b). The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 329-360.

Ellis R. E., Yuan J. Y., Horvitz H. R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 663-698.

Etter A. L., Bassi I., Germain S., Delaloye J. F., Tschopp J., Sordat B., Dupuis M. (2007). The combination of chemotherapy and intraperitoneal MegaFas Ligand improves treatment of ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 107: 14-21.

Fulda S., Wick W., Weller M., Debatin. (2002). Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat. Med.* 8: 808-815.

Ganten T. M., Koschny R., Sykora J., Schulze-Bergkamen H., Büchler P., Haas T. L., Schader M. B., Untergasser A., Stremmel W., Walczak H. (2006). Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs. *Clin. Cancer Res.* 12: 2640-2646.

Garin-Chesa P., Old L. J., 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.

Gliniak B., Le T. (1999). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand's antitumor activity in vivo is enhanced by the chemotherapeutic agent CPT-11. *Cancer Res.* 59: 6153-6158.

Gong J., Yang D., Kohanim S., Humphreys R., Broemeling L., Kurzrock R. (2006). Novel in vivo imaging shows up-regulation of death receptors by paclitaxel and correlates with enhanced antitumor effects of receptor agonist antibodies. *Mol. Cancer Ther.* 5: 2991-3000.

Graus-Porta D., Beerli R. R., Hynes N. E. (1995). Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol. Cell Biol.* 15: 1182-1191.

Graus-Porta D., Beerli R. R., Daly J. M., Hynes N. E. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* 16: 1647-1655.

Greco F. A., Bonomi P., Crawford J., Kelly K., Oh Y., Halpern W., Lo L., Gallant G., Klein J. (2008). Phase 2 study of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody which targets and activates the TRAIL receptor-1, in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 61: 82-90.

Green D. R. and Reed J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312.

Grell M., Douni E., Wajant H., Löhden M., Clauss M., Maxeiner B., Georgopoulos S., Lesslauer W., Kollias G., Pfizenmaier K., Scheurich P. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83: 793-802.

Grell M., Wajant H., Zimmermann G., Scheurich P. (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 570-575.

Griffith T. S., Chin W. A., Jackson G. C., Lynch D. H., Kubin M. Z. (1998). Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J. Immunol.* 161: 2833-2840.

Grünhagen D. J., de Wilt J. H., ten Hagen T. L., Eggermont A. M. (2006). Technology insight: Utility of TNF-alpha-based isolated limb perfusion to avoid amputation of irresectable tumors of the extremities. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 3: 94-103.

Guan B., Yue P., Clayman G. L., Sun S. Y. (2001). Evidence that the death receptor DR4 is a DNA damage-inducible, p53-regulated gene. *J. Cell Physiol.* 188: 98-105.

Guan Y., Gerhard B., Hogge D. E. (2003). Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 101: 3142-3149.

Guo F., Nimmanapalli R., Paranawithana S., Wittman S., Griffin D., Bali P., O'Bryan E., Fumero C., Wang H. G., Bhalla K. (2002). Ectopic overexpression of second mitochondria-derived activator of caspases (Smac/DIABLO) or cotreatment with N-terminus of Smac/DIABLO peptide potentiates epothilone B derivative-(BMS 247550) and Apo-2L/TRAIL-induced apoptosis. *Blood* 99: 3419-3426.

Hanahan D. and Weinberg R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

Harris C. C. and Hollstein M. (1993). Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N. Engl. J. Med.* 329: 1318-1327.

Harwerth I. M., Wels W., Marte B. M., Hynes N. E. (1992). Monoclonal antibodies against the extracellular domain of the erbB-2 receptor function as partial ligand agonists. *J. Biol. Chem.* 267: 15160-15167.

Herbst R. S., Mendolson D. S., Ebbinghaus S., Gordon M. S., O'Dwyer P., Liebermann G., Ing J., Kurzrock R., Novotny W., Eckhardt G. (2006). A phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant Apo2L/TRAIL, an apoptosis-inducing protein in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* 24: 3013.

Hirschmann-Jax C., Foster A. E., Wulf G. G., Nuchtern J.G., Jax T. W., Gobel U., Goodell M. A., Brenner M. K. (2004). A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 14228-14233.

Holler N., Tardivel A., Kovacsics-Bankowski M., Hertig S., Gaide O., Martinon F., Tinel A., Deperthes D., Calderara S., Schulthess T., Engel J., Schneider P., Tschopp J. (2003). Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signalling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol. Cell Bio.* 23: 1428-1440.

Holliger P. and Hudson P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* 23: 1126-1136.

Hsiang Y. H., Liu L. F. (1988). Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Res.* 48: 1722-1726.

Hymowitz S. G., Christinger H. W., Fuh G., Ultsch M., O'Connell M., Kelley R. F., Ashkenazi A., de Vos A. M. (1999). Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol. Cell* 4: 563-571.

Hymowitz S. G., O'Connell M., Ultsch M., Hurst A., Totpal K., Ashkenazi A., de Vos A. M. (2000). A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* 39: 633-640.

Itoh N. and Nagata S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 268: 10932-10937.

Jacobson M. D., Weil M., Raff M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347-354.

Jin H., Yang R., Fong S., Totpal K., Lawrence D., Zheng Z., Ross J., Koeppen H., Schwall R., Ashkenazi A. (2004). Apo2 ligand/ tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand cooperates with chemotherapy to inhibit orthotopic lung tumor growth and improve survival. *Cancer Res.* 64: 4900-4905.

Johnson J. R., Ford C. H., Newman C. E., Woodhouse C. S., Rowland G. F., Simmonds R. G. (1981). A vindesine-anti-CEA conjugate cytotoxic for human cancer cells in vitro. *Br. J. Cancer* 44: 472-475.

Johnson T. R., Stone K., Nikrad M., Yeh T., Zong W. X., Thompson C. B., Nesterov A., Kraft A. S. (2003). The proteasome inhibitor PS-341 overcomes TRAIL resistance in Bax and caspase 9-negative or Bcl-xL overexpressing cells. *Oncogene* 22: 4953-4963.

Kelley S. K., Harris L. A., Xie D., Deforge L., Totpal K., Bussiere J., Fox J. A. (2001). Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/ tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterisation of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299: 31-38.

- Kelley R. F., Totpal K., Lindstrom S. H., Mathieu M., Billeci K., Deforge L., Pai R., Hymowitz S. G., Ashkenazi A. (2005). Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signalling. *J. Biol. Chem.* 280: 2205-2212.
- Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.
- Kim K., Fisher M. J., Xu S. Q., el-Deiry W. S. (2000). Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 6: 335-346.
- Kischkel F. C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P. H., Peter M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14: 5579-5588.
- Kischkel F. C., Lawrence D. A., Tinel A., LeBlanc H., Virmani A., Schow P., Gazdar A., Blenis J., Arnott D., Ashkenazi A. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 276: 46639-46646.
- Koschny R., Walczak H., Ganten T. M. (2007). The promise of TRAIL—potential and risks of a novel anticancer therapy. *J. Mol. Med.* 85: 923-935.
- Koschny R., Ganten T. M., Sykora J., Haas T. L., Sprick M. R., Kolb A., Stremmel W., Walczak H. (2007b). TRAIL/bortezomib cotreatment is potentially hepatotoxic but induces cancer-specific apoptosis in a therapeutic window. *Hepatology* 45: 649-658.
- Krammer P. H. (1999). CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol.* 71: 163-210.
- Krippner-Heidenreich A., Grunwald I., Zimmermann G., Kühnle M., Gerspach J., Sterns T., Shnyder S. D., Gill J. H., Männel D. N., Pfizenmaier K., Scheurich P. (2008). Single-chain TNF, a TNF derivate with enhanced stability and antitumoral activity. *J. Immunol.* 180: 8176-8183.
- Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuri M. A., Dick J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367: 645-648.
- Lawrence D., Shahrokh Z., Marsters S., Achilles K., Shih D., Mounho B., Hillan K., Totpal K., DeForge L., Schow P., Hooley J., Sherwood S., Pai R., Leung S., Khan L., Gliniak B., Bussiere J., Smith C. A., Strom S. S., Kelley S., Thomas D., Askenazi A. (2001). Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat. Med.* 7: 383-385.

- Lee H. W., Lee S. H., Lee H. W., Ryu Y. W., Kwon M. H., Kim Y. S. (2005). Homotrimeric and heteromeric interactions of the extracellular domains of death receptors and death decoy receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330: 1205-1212.
- Lejeune F. J., Liénard D., Matter M., Rüegg C. (2006). Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy. *Cancer Immun.* 22:6.
- Levine J. L. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331.
- Li L., Thomas R. M., Suzuki H., De Brabander J. K., Wang X., Harran P. G. (2004). A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNF α -mediated cell death. *Science* 305: 1471-1474.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E. S., Wang X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 479-489.
- Locksley R. M., Killeen N., Lenardo M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487-501.
- LoRusso P., Hong D., Heath E., Kurzrock R., Wang D., Hsu M., Goyal L., Wiezorek J., Storgard C., Herbst R. (2007). First-in-human study of AMG 655, a pro-apoptotic TRAIL receptor-2 agonist, in adult patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 25: 3534.
- Mariani S. M. and Krammer P. H. (1998). Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur. J. Immunol.* 28: 973-982.
- Micheau O., Tschopp J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signalling complexes. *Cell* 114: 181-190.
- Mitsiades C. S., Treon S. P., Mitsiades N., Shima Y., Richardson P., Schlossman R., Hideshima T., Anderson K. C. (2001). TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 98: 795-804.
- Miyashita T. and Reed J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of human bax gene. *Cell* 80: 293-299.
- Mühlenbeck F., Schneider P., Bodmer J. L., Schwenzer R., Hauser A., Schubert G., Scheurich P., Moss Mayer D., Tschopp J., Wajant H. (2000). The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK activation. *J. Biol. Chem.* 275: 32208-32213.

Mühlethaler-Mottet A., Bouldouk K. B., Auderset K., Joseph J. M., Gross N. (2004). Drug-mediated sensitization to TRAIL-induced apoptosis in caspase-8-complemented neuroblastoma cells proceeds via activation of intrinsic and extrinsic pathways and caspase-dependent cleavage of XIAP, Bcl-xL and RIP. *Oncogene* 23: 5415-5425.

Müller M., Wilder S., Bannasch D., Israeli D., Lehlbach K., Li-Weber M., Friedman S. L., Galle P. R., Stremmel W., Oren M., Krammer P. H. (1998). p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J. Exp. Med.* 188: 2033-2045.

Naka T., Sugamura K., Hylander B. L., Widmer M. B., Rustum Y. M., Repasky E. A. (2002). Effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand alone and in combination with chemotherapeutic agents on patients' colon tumors grown in SCID mice. *Cancer Res.* 62: 5800-5806.

Nakano K. and Vousden K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* 7: 683-694.

Nakata S., Yoshida T., Horinaka M., Shiraishi T., Wakada M., Sakai T. (2004). Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis by TRAIL/Apo2-L in human malignant tumor cells. *Oncogene* 23: 6261-6271.

O'Brien C. A., Pollett A., Gallinger S., Dick J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445: 106-110.

Oda E., Ohki R., Murasawa H., Nemoto J., Shibue T., Yamashita T., Tokino T., Taniguchi T., Tanaka N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288: 1053-1058.

Oda K., Arakawa H., Tanaka T., Matsuda K., Tanikawa C., Mori T., Nishimori H., Tamai K., Tokino T., Nakamura Y., Taya Y. (2000). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102: 849-862.

Ogasawara J., Watanabe-Fukunaga R., Adachi M., Matsuzawa, A., Kasugai T., Kitamura Y., Itoh N., Suda T., Nagata S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364: 806-809.

Opel D., Westhoff M. A., Bender A., Braun V., Debatin K. M., Fulda S. (2008). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition broadly sensitizes glioblastoma cells to death receptor- and drug-induced apoptosis. *Cancer Res.* 68: 6271-6280.

Pan G., O'Rourke K., Chinnaiyan A. M., Gentz R., Ebner R., Ni J., Dixit V. M. (1997a). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276: 111-113.

Pan G., Ni J., Wie Y. F., Yu G., Gentz R., Dixit V. M. (1997b). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277: 815-818.

Pan G., Ni J., Yu G., Wei Y. F., Dixit V. M. (1998). TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS Lett.* 424: 41-45.

Panka D. J., Mano T., Suhara T., Walsh K., Mier J. W. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 276: 6893-6896.

Park J. E., Lenter M. C., Zimmermann R. N., Garin-Chesa P., Old L. J., Rettig W. J. (1999). Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 274: 36505-36512.

Petersen S. L., Wang L., Yalcin-Chin A., Li L., Peyton M., Minna J., Harran P., Wang X. (2007). Autocrine TNF α signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis. *Cancer Cell* 12: 445-456.

Pitty R. M., Marsters S. A., Ruppert S., Donahue C. J., Moore A., Ashkenazi A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.* 271: 12687-12690.

Pitty R. M., Marsters S. A., Lawrence D. A., Roy M., Kischkel F. C., Dowd P., Huang A., Donahue C. J., Sherwood S. W., Baldwin D. T., Godowski P. J., Wood W. I., Gurney A. L., Hillan K. J., Cohen R. L., Goddard A. D., Botstein D., Ashkenazi A. (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396: 699-703.

Plummer R., Attard G., Pacey S., Li L., Razak A., Perrett R., Barrett M., Judson I., Kaye S., Fox N. L., Halpern W., Corey A., Calvert A., de Bono J. (2007). Phase 1 and pharmacokinetic study of lexatumumab in patients with advanced cancers. *Clin. Cancer Res.* 13: 6187-6194.

Pollack I. F., Erff M., Ashkenazi A. (2001). Direct stimulation of apoptotic signaling by soluble Apo2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand leads to selective killing of glioma cells. *Clin. Cancer Res.* 7: 1362-1369.

Ravi R., Jain A. J., Schulick R. D., Pham V., Prouser T. S., Allen H., Mayer E. G., Yu H., Pardoll D. M., Ashkenazi A., Bedi A. (2004). Elimination of hepatic metastases of colon cancer cells via p53-independent cross-talk between irinotecan and Apo2 ligand/TRAIL. *Cancer Res.* 64: 9105-9114.

Ray S., Bucur O., Almasan A. (2005). Sensitization of prostate carcinoma cells to Apo2L/TRAIL by a Bcl-2 family protein inhibitor. *Apoptosis* 10: 1411-1418.

Rettig W. J., Chesa P. G., Beresford H. R., Feickert H. J., Jennings M. T., Cohen J., Oettgen H. F., Old L. J. (1986). Differential expression of cell surface antigens and glial fibrillary acidic protein in human astrocytoma subsets. *Cancer Res.* 46: 6406-6412.

Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissmann I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111.

Ricci-Vitiani L., Lombardi D. G., Pilozzi E., Biffoni M., Todaro M., Peschle C., De Maria R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445: 111-115.

Rosenberg S. A., Yang J. C., White D. E., Steinberg S. M. (1998). Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann. Surg.* 228: 307-319.

Ross J. S., Fletcher J. A. (1998). The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* 16: 413-428.

Roth W., Isenmann S., Naumann U., Kügler S., Bähr M., Dichgans J., Ashkenazi A., Weller M. (1999). Locoregional Apo2L/TRAIL eradicates intracranial human malignant glioma xenografts in athymic mice in the absence of neurotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265: 479-483.

Samel D., Muller D., Gerspach J., Assouhou-Luty C., Sass G., Tiegs G., Pfizenmaier K., Wajant H. (2003). Generation of a FasL-based fusion protein devoid of systemic toxicity due to cell-surface antigen-restricted activation. *J. Biol. Chem.* 278: 32077-32082.

Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K. J., Debatin K. M., Krammer P. H., Peter M. E. (1998). Two CD95 (Apo-1/Fas) signalling pathways. *EMBO J.* 17: 1675-1687.

Scanlan M. J., Raj B. K., Calvo B., Garin-Chesa P., Sanz-Moncasi M. P., Healey J. H., Old L. J., Rettig W. J. (1994). Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5657-5661.

Scheid M. P., Woodgett J. R. (2001). PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 760-768.

Schmitz I., Kirchhoff S., Krammer P. H. (2000). Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32: 1123-1136.

Schneider P., Holler N., Bodmer J. L., Hahne M., Frei K., Fontana A., 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.

Screaton G. R., Mongkolsapaya J., Xu X. N., Cowper A. E., McMichael A. J., Bell J. I. (1997). TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr. Biol.* 7: 693-696.

Shankar S., Singh T. R., Chen X., Thakkar H., Firnin J., Srivastava R. K. (2004a). The sequential treatment with ionizing radiation followed by TRAIL/Apo-2L reduces tumor growth and induces apoptosis of breast tumor xenografts in nude mice. *Int. J. Oncol.* 24: 1133-1140.

Shankar S., Singh T. R., Srivastava R. K. (2004b). Ionizing radiation enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer in vitro and in vivo: Intracellular mechanisms. *Prostate* 61: 35-49.

Shankar S., Chen X., Srivastava R. K. (2005). Effects of sequential treatments with chemotherapeutic drugs followed by TRAIL on prostate cancer in vitro and in vivo. *Prostate* 62: 165-186.

Sheridan J. P., Marsters S. A., Pitty R. M., Gurney A., Skubatch M., Baldwin D., Ramakrishnan L., Gray C. L., Baker K., Wood W. I., Goddard A. D., Godowski P., Ashkenazi A. (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signalling and decoy receptors. *Science* 277: 818-821.

Singh S. K., Hawkins C., Clarke I. D., Squire J. A., Bayani J., Hide T., Henkelman R. M., Cusimano M. D., Dirks P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432: 396-401.

Slamon D. J., Clark G. M., Wong S. G., Levin W. J., Ullrich A., McGuire W. L. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/neu oncogene. *Science* 235: 177-182.

Smith C. A., Farrah T., Goodwin R. G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell* 76: 959-962.

Spencer K. S., Graus-Porta D., Leng J., Hynes N. E., Klemke R. L. (2000). ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J. Cell Biol.* 148: 385-397.

Sprick M. R., Weigand M. A., Rieser E., Rauch C. T., Juo P., Blenis J., Krammer P. H., Walczak H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 12: 599-609.

Stieglmaier J., Bremer E., Kellner C., Liebig T. M., ten Cate B., Peipp M., Schulze-Koops H., Pfeiffer M., Bühring H. J., Greil J., Oduncu F., Emmerich B., Fey G. H., Helfrich W. (2008). Selective induction of apoptosis in leukemic B-lymphoid cells by a CD19-specific TRAIL fusion protein. *Cancer Immunol. Immunother.* 57: 233-246.

Sugamura K., Gibbs J. F., Belicha-Villanueva A., Andrews C., Repasky E. A., Hylander B. L. (2008). Synergism of CPT-11 and Apo2L/TRAIL against two differentially sensitive human colon tumor xenografts. *Oncology* 74: 188-197.

Tolcher A. W., Mita M., Meropol N. J., von Mehren M., Patnaik A., Padavic K., Hill M., Mays T., McCoy T., Fox N. L., Halpern W., Corey A., Cohen R. B. (2007). Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1. *J. Clin. Oncol.* 25: 1390-1395.

Varfolomeev E., Blankenship J. W., Wayson S. M., Fedorova A. V., Kayagaki N., Garg P., Zobel K., Dynek J. N., Elliott L. O., Wallweber H. J., Flygare J. A., Fairbrother W. J., Deshayes K., Dixit V. M., Vucic D. (2007). IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* 131: 669-681.

Verhagen A. M., Ekert P. G., Pakusch M., Silke J., Connolly L. M., Reid G. E., Moritz R. L., Simpson R. J., Vaux D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102: 43-53.

Vince J. E., Wong W. W., Khan N., Feltham R., Chau D., Ahmed A. U., Benetatos C. A., Chunduru S. K., Condon S. M., McKinlay M., Brink R., Leverkus M., Tergaonkar V., Schneider P., Callus B. A., Koentgen F., Vaux D. L., Silke J. (2007). IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* 131: 682-693.

Vucic D. and Fairbrother W. J. (2007). The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer. *Clin. Cancer Res.* 13: 5995-6000.

Wagner K. W., Punnoose E. A., Januario T., Lawrence D. A., Pitty R. M., Lancaster K., Lee D., von Goetz M., Yee S. F., Totpal K., Huw L., Katta V., Cavet G., Hymowitz S. G., Amler L., Ashkenazi A. (2007). Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat. Med.* 13: 1070-1077.

Wajant H., Moosmayer D., Wüest T., Bartke T., Gerlach E., Schönherr U., Peters N., Scheurich P., Pfizenmaier K. (2001). Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by soluble TRAIL derivative. *Oncogene* 20: 4101-4106.

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., Rauch C. T. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* 16: 5386-5397.

Walczak H., Miller R. E., Ariail K., Gliniak B., Griffith T. S., Kubin M., Chin W., Jones J., Woodward A., Le T., Smith C., Smolak P., Goodwin R. G., Rauch C. T., Schuh J. C., Lynch D. H. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* 5: 157-163.

Wang J. C. and Dick J. E. (2005). Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol.* 15: 494-501.

Wels W., Harwerth I. M., Zwickl M., Hardmann N., Groner B., Hynes N. E. (1992a). Construction, bacterial expression and characterization of a bifunctional single-chain antibody-phosphatase fusion protein to erbB-2 receptor. *Biotechnology* 10: 1128-1132.

Wels W., Harwerth I. M., Mueller M., Groner B., Hynes N. E. (1992b). Selective inhibition of tumor cell growth by a recombinant single-chain antibody-toxin specific for the erbB-2 receptor. *Cancer Res.* 52: 6310-6317.

- Welt S., Divigi C. R., Scott A. M., Garin-Chesa P., Finn R. D., Graham M., Carswell E. A., Cohen A., Larson S. M., Old L. J. (1994). Antibody targeting in metastatic colon cancer: a phase I study of monoclonal antibody F19 against a cell-surface protein of reactive tumor stromal fibroblasts. *J. Clin. Oncol.* 12: 1193-1203.
- Werner S., Grose R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 83: 835-870.
- Wiley S. R., Schooley K., Smolak P. J., Din W. S., Huang C. P., Nicholl J. K., Sutherland G. F., Smith T. D., Rauch I. C., Goodwin R. G. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3: 673-682.
- Wu G. S., Burns T. F., McDonald E. R. III, Jiang W., Meng R., Krantz I. D., Kao G., Gan D. D., Zhou J. Y., Muschel R., Hamilton S. R., Spinner N. B., Markowitz S., Wu G., el-Deiry W. S. (1997). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat. Genet.* 17: 141-143.
- Wüest T., Gerlach E., Banerjee D., Gerspach J., Moosmayer D., Pfizenmaier K. (2002). TNF-Selektokine: a novel prodrug generated for tumor targeting and site-specific activation of tumor necrosis factor. *Oncogene* 21: 4257-4265.
- Xiang J., Moyana T., Qi Y. (1997). Genetic engineering of a recombinant fusion possessing anti-tumor F(ab')₂ and tumor necrosis factor. *J. Biotechnol.* 53: 3-12.
- Xiang R., Lode H. N., Dolman C. S., Dreier T., Varki N. M., Qian X., Lo K. M., Lan Y., Super M., Gillies S. D., Reisfeld R. A. (1997). Elimination of established murine colon carcinoma metastases by antibody-interleukin 2 fusion protein therapy. *Cancer Res.* 57: 4948-4955.
- Yamamoto T., Ikawa S., Akiyama T., Semba K., Nomura N., Miyajima N., Saito T., Toyoshima K. (1986). Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 319: 230-234.
- Yao R., Cooper G. M. (1995). Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267: 2003-2006
- Yokota T., Milenic D. E., Whitlow M., Schlom J. (1992). Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res.* 52: 3402-3408.
- Yu K. Y., Kwon B., Ni J., Zhai Y., Ebner R., Kwon B. S. (1999). A newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274: 13733-13736.
- Zhang X. D., Zhang X. Y., Gray C. P., Nguyen T., Hersey P. (2001). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of human melanoma is regulated by smac/DIABLO release from mitochondria. *Cancer Res.* 61: 7339-7348.

Zhu H., Guo W., Zhang L., Wu S., Teraishi F., Davis J. J., Dong F., Fang B. (2005). Proteasome inhibitors-mediated TRAIL resensitization and Bik accumulation. *Cancer Biol. Ther.* 4: 781-786.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Klaus Pfizenmaier für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart durchführen zu können, aber auch für die wertvollen Anregungen und Ratschläge, die permanente Bereitschaft die Ergebnisse zu diskutieren und folglich neue Ideen zu entwickeln, die Förderung von internationalen Kongressteilnahmen, sowie für die sehr gute Ausbildung während des gesamten Zeitrahmens.

Prof. Harald Wajant von der Abteilung für Molekulare Innere Medizin des Universitätsklinikums Würzburg danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, die sehr gute Kooperation und die vielen interessanten Ideen, Denkanstöße und ergiebigen Diskussionen.

Dr. Jeannette Gerspach-Joner danke ich für die gute fachliche Betreuung, die Einführung in viele wichtige Methoden und Techniken, das große Interesse an meiner Arbeit und die vielen konstruktiven Besprechungen.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die gute Zusammenarbeit. Ein besonderes Dankeschön geht an meine ehemaligen Kollegen Dr. Iris Watermann, Dr. Marcus Branschädel und Dr. Jens Neumeyer für die schöne Zeit, die wir gemeinsam im Labor verbracht haben.

Ebenso an meine beiden Schwestern, meine Oma und meine besten Freundinnen Uli und Laura ein herzliches Dankeschön für ihre liebe Unterstützung.

Vor allem aber möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre großzügige und liebevolle Unterstützung, für ihre Geduld und ihr Vertrauen bedanken. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

Lebenslauf

Britta Schneider

geboren am 22.05.1979 in Stuttgart

Schulbildung

- | | |
|-----------|--|
| 1985-1989 | Grundschule in Esslingen |
| 1989-1998 | Schelztor-Gymnasium in Esslingen
Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife |

Studium

- | | |
|------------------|---|
| 1998 | Beginn des Studiums der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen |
| 2001 | Vorprüfung zur Diplomprüfung in Biologie |
| 2001-2004 | Hauptstudium
Vertiefung: Humangenetik, Zellbiologie |
| 10/2002-01/2003 | Praktikum am Institut für Medizinische Genetik der Charité in Berlin - Abteilung Molekulargenetik - |
| 11/2003- 08/2004 | Diplomarbeit am Institut für Medizinische Genetik des Universitätsklinikums Tübingen
Titel: <i>Analyse von Pathogenesestoffwechselnetzwerken des Morbus Parkinson mittels der RNA-Interferenz- und Chip-Technologie.</i> |
| 2004 | Abschluss Diplom |

Promotion

- | | |
|-----------|--|
| 2005-2008 | Promotion am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart
Titel der Dissertation: <i>Neue TRAIL-Varianten für die zielgerichtete Tumorthherapie.</i> |
|-----------|--|

Wissenschaftliche Veröffentlichung:

Watermann I., Gerspach J., Lehne M., Seufert J., Schneider B., Pfizenmaier K., Wajant H. (2007). Activation of CD95L fusion protein prodrugs by tumor-associated proteases. *Cell Death Differ.* 14: 765-774.