

**Die Zeta-Kette des T-Zell-Rezeptors:
Zielstruktur für die Rekrutierung
humaner Effektorzellen
durch bispezifische Antikörper**

Dissertation

der Fakultät für Biologie der Ludwig-
Maximilians-Universität in München zur
Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.),
angefertigt am Institut für Immunologie
Vorstand: Prof. Dr. G. Riethmüller



vorgelegt von
Ralf Lutterbüse
aus Lippstadt
Oktober 2000



Dissertation eingereicht: 05.10.2000

Erster Berichterstatter: Frau Prof. Kahmann
Zweiter Berichterstatter: Herr Prof. Gutensohn
Sonderberichterstatter: Herr Prof. Rietmüller

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.2001

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Antikörper-basierte Immuntherapie von Krebserkrankungen	1
1.2	Bispezifische Antikörper	5
1.3	Rekrutierung lymphozytärer Effektorzellen mit Hilfe bispezifischer Antikörper	7
1.3.1	<i>Das Antigen auf Tumorzellen</i>	7
1.3.2	<i>Aktivierungsmoleküle auf Effektorzellen</i>	7
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	14
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Enzyme, Chemikalien, Antikörper	16
2.2	Puffer und Medien	18
2.2.1	<i>Medien für die prokaryontische Zellkultur</i>	18
2.2.2	<i>Medien für die eukaryontische Zellkultur</i>	19
2.3	Zellbiologische Methoden	20
2.3.1	<i>Isolation von peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut</i>	20
2.3.2	<i>Isolation von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten aus PBMCs</i>	20
2.3.3	<i>Isolation von CD56⁺ NK-Zellen aus PBMCs</i>	21
2.3.4	<i>Subkultivierung und Kryokonservierung von Kulturzellen</i>	21
2.3.5	<i>Herstellung monoklonaler Antikörper</i>	22
2.3.6	<i>Durchflußzytometrischer Bindungsnachweis von Antikörpern</i>	23
2.3.7	<i>Proliferationstest von T- und NK-Zellen nach Antikörper-Stimulation</i>	24
2.3.8	<i>Analyse der Antikörper im SDS-Polyacrylamidgel</i>	24
2.3.9	<i>Antigen-Nachweis durch Immunoblotting</i>	25
2.3.10	<i>Expression von rekombinaten Antikörpern im eukaryontischen System</i>	27
2.3.11	<i>Antikörper-Bindungstest gegen immobilisiertes Antigen im ELISA</i>	29
2.3.12	<i>Produktion und Aufreinigung rekombinanter Antikörper</i>	30
2.3.13	<i>Zytotoxizitätstests mit bispezifischen Antikörpern</i>	30
2.4	Molekularbiologische Methoden	31
2.4.1	<i>Isolierung der Gesamt-RNA</i>	31
2.4.2	<i>Reverse Transkription</i>	33
2.4.3	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion</i>	34
2.4.4	<i>Enzymatischer Verdau von dsDNA und cDNA-Fragmenten</i>	36
2.4.5	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	36
2.4.6	<i>Isolation der DNA aus Agarose-Gelen</i>	37
2.4.7	<i>Präparation kompetenter Escherichia coli K12 XL I Blue</i>	37
2.4.8	<i>Ligation</i>	38
2.4.9	<i>Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Escherichia coli</i>	39
2.4.10	<i>Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien</i>	39
2.4.11	<i>Sequenzierung mit der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger</i>	40
2.4.12	<i>Die Generierung von Antikörperspezifitäten mittels Phage-Display</i>	40
2.4.13	<i>Identifizierung und Isolierung Antigen-bindender Fab-Klone</i>	44
2.4.14	<i>Isolierung N-terminal bindender scFv-Fragmente mittels Phage-Display</i>	45
2.4.15	<i>Klonierung der variablen Regionen des Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers</i>	46
2.4.16	<i>Konstruktion bispezifischer single-chain Antikörper</i>	47

3	ERGEBNISSE	48
3.1	Isolierung eines Zeta-Ketten spezifischen Antikörpers mit Hilfe eines murinen Hybridoms	48
3.1.1	<i>Herstellung des Zeta-Ketten-Carrier-Konjugats</i>	48
3.1.2	<i>Generierung muriner monoklonaler Antikörper gegen die Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette</i>	48
3.1.3	<i>FACS-Analyse der Zellkulturüberstände der murinen Anti-Zeta-Ketten-Hybridome</i>	49
3.2	In vitro-Selektion von Anti-Zeta-Ketten-Antikörpern aus einer murinen Antikörperfragment-Bibliothek mittels Phage-Display	49
3.3	Generierung eines Ratten-Hybridoms gegen die Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette.....	53
3.4	Kompetitive Blockade der Antikörperbindung auf zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen.....	54
3.5	Charakterisierung des 2-B-5 Antigens durch Immunoblotting.....	56
3.6	Rezeptor-Komplex-Internalisierung nach Bindung des Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers 2-B-5	57
3.7	Proliferation von T-Lymphozyten und NK-Zellen nach Stimulation durch den Anti-Zeta-Ketten-Antikörper 2-B-5.....	59
3.8	Isolierung in C-terminaler Position bindender scFv-Fragmente mittels Phage-Display	61
3.9	Klonierung der variablen Regionen des Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers	64
3.10	Konstruktion eines bispezifischen Single-Chain Antikörpers Anti-Zeta-Kette/anti-EpCAM.....	66
3.11	Produktion des bispezifischen Anti-Zeta-Ketten/anti-EpCAM Antikörpers im eukaryontischen Expressionssystem.....	68
3.12	Analyse des bispezifischen Antikörpers mittels SDS-PAGE.....	69
3.13	Rekrutierung der Zytotoxizität von CTL und NK-Zellen durch den bispezifischen Anti-Zeta-Kette/Anti-EpCAM-Antikörper	71
4	DISKUSSION	74
4.1	Isolierung eines Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers.....	74
4.2	Spezifität des Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers	75
4.3	Charakterisierung des gebundenen Antigens	77
4.4	Rezeptorinternalisierung nach Antikörperbindung.....	78
4.5	Antikörper-induzierte Proliferation.....	79
4.6	N-Terminus-Blockade im Phage-Display zur Isolierung von scFv-Fragmenten	81
4.7	Zeta-Ketten-basierte bispezifische Antikörper.....	82
4.8	Zeta-Ketten basierte bispezifische Antikörper als Alternative zu chimären Rezeptoren auf T-Lymphozyten	83
4.9	Verringerte Zeta-Ketten-Expression bei Karzinomen.....	84
4.10	Ausblick.....	85
5	ZUSAMMENFASSUNG	89
6	ANHANG	89
7	LITERATURVERZEICHNIS	
8	DANKSAGUNG	
9	LEBENS LAUF	

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Formelgrößen wurden mit den international gebräuchlichen SI-Einheiten, Aminosäuren wurden entsprechend ihres Einbuchstabenkodes und Elemente in chemischen Verbindungen gemäß ihrer Bezeichnung im Periodensystem abgekürzt. Für die Abkürzung gebräuchlicher Wörter der deutschen Sprache wurde gemäß Duden verfahren.

AK	Antikörper	Ig	Immunglobulin
AS	Aminosäure	kb	Kilobasenpaar(e)
Bp	Paasenpaar(e)	KLH	„Keyhole Limpet Haemocyanin“
BSA	Bovines Serumalbumin	MHC	Haupthistokompatibilitäts- komplex
bsp	Bispezifisch(er Antikörper)	N	Nukelotid(e)
cDNA	Komplementäre DNA	NK	Natürliche Killer(zellen)
CDR	„Complementarity Determining Region“	o/n	über Nacht
cfU	„colony forming Units“	OD	optische Dichte
⁵¹ Cr	radioaktives Chromisotop	PBL	Periphere Blutlymphozyten
CL/CH	Konstante leichte/schwere Kette	PBMC	Pheriphere Blut Mononukleäre Zellen
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten	PBS	Phosphat-Saline-Puffer
Da	Dalton	PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure(n)	pfU	„plaque forming Units“
ds	doppelsträngig	RNA	Ribonukleinsäure(n)
ELISA	„Enzyme-Linked Immuo- Sorbent Assay“	rpm	Umdrehungen pro Minute
EtBr	Ethidiumbromid	RT	Raumtemperatur
EtOH	Ethanol	scFv	„single-chain Fragment variable“
FACS	Fluoreszenz-Aktivierte Zell Sortierung	U.	Enzymeinheit
FCS	Fötales Kälberserum	v/v	Volumen pro Volumen
FITC	Fluorecinisothiocyant	VL/VH	Variable Leichte/Schwere Kette
g	x-fache Erdbeschleunigung	w/v	Gewicht pro Volumen
HRP	Merretich-Peroxidase		

1 Einleitung

In den Industrienationen steht Krebs als Todesursache nach Herz-Kreislaufkrankungen an zweiter Stelle. Der bedrohlichste Aspekt der Krebserkrankung, die Metastasierung, ist ein wichtiger Bereich der heutigen Krebsforschung. Obwohl eine frühe Krebsdiagnose es ermöglicht, die Tumore häufiger in einem operablen Stadium zu erfassen, und die chirurgische Entfernung der Neoplasie heute besser gelingt, bleibt die Mortalität von Krebs weiterhin hoch. So belief sich die Zahl der Krebsneuerkrankungen 1997 allein in Deutschland auf rund 340.000; im gleichen Zeitraum verstarben rund 210.000 Patienten an ihren Malignomen (Angaben des Statistischen Bundesamts). Als Hauptursache für die hohe Zahl krebsbezogener Todesfälle muß die Entwicklung von Metastasen gelten, d.h. Tochtergeschwülsten in sekundären Organen, die eine schlechte Prognose für den Patienten mit sich bringt. Die okkulte systemische Streuung (Disseminierung) einzelner Tumorzellen aus denen sich später solide sekundäre Tumoren entwickeln können, ist ein Vorgang, der zum Zeitpunkt der operativen Entfernung des Primärtumors meist schon stattgefunden hat (Riethmüller und Johnson, 1992). Dieses Stadium wird als minimal residuale Krebserkrankung bezeichnet; sie stellt als Folge von früher Tumorzell-disseminierung (Mikrometastasierung) die eigentliche Ursache für die nach wie vor hohe krebsbedingte Mortalität dar (Pantel et al., 1993).

1.1 Antikörper-basierte Immuntherapie von Krebserkrankungen

Ein bislang unerreichtes Ziel der heutigen Medizin besteht darin, die hohe Anzahl der Krebstoten durch die Anwendung verschiedenster Therapieansätze zu senken. Neben konventionellen Ansätzen wie Operation, Bestrahlung und Chemotherapie werden zunehmend alternative Formen wie die Immuntherapie zur Behandlung der Patienten eingesetzt. Nachfolgend soll ein kurzer Überblick über diesen speziellen Bereich der Tumorimmunologie gegeben werden. Die Immuntherapie zielt darauf ab, die Spezifität und Sensitivität des Immunsystems für die Zerstörung der körpereigenen Tumorzellen auszunutzen. Tumorimmunologische Ansätze zur Behandlung von Patienten mit soliden Tumoren und ihren Metastasen, die hier im Vordergrund stehen sollen, sind nach zwei unterschiedlichen Prinzipien angelegt:

- Bei der aktiven Immuntherapie geht es darum, z.B. die Immunreaktionen des Patienten gegen seinen eigenen Tumor zu stimulieren, indem isolierte Tumorzellen *ex vivo* modifiziert und anschließend wieder in den Patienten zu Immunisierung reinfundiert werden. Die auf diese Weise induzierte Immunantwort soll sich dann auch gegen die im Patienten verbliebenen unmodifizierten Tumorzellen richten.
- Bei der passiven Immuntherapie hingegen soll durch die Gabe von Antikörpern bzw. Antikörperderivaten oder spezifischen Immunzellen die Elimination des Tumors bewirkt werden.

Die Analogie dieser beiden Ansätze zu Therapieverfahren, die seit langem erfolgreich gegen Infektionskrankheiten eingesetzt werden, ist offensichtlich und kann als Versuch gelten, ein etabliertes therapeutisches Konzept auf ein neues Gebiet zu übertragen. Diese Einleitung beschränkt sich auf die Antikörper-basierte Immuntherapie, deren Konzept bzw. Wirkungsweisen in Abbildung 1 schematisch dargestellt sind.

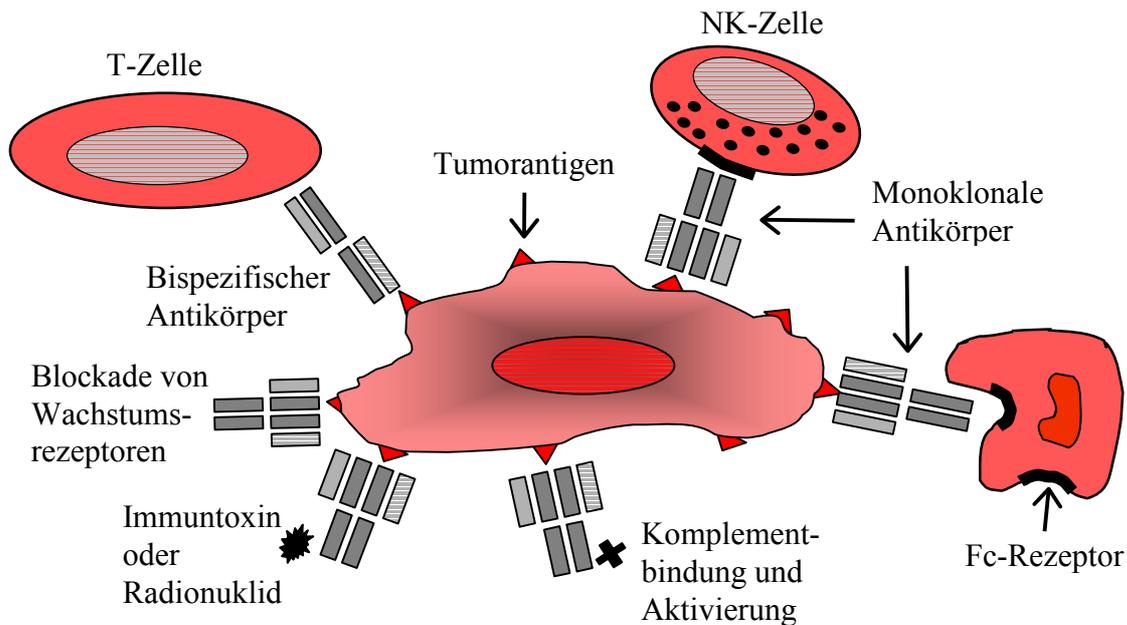


Abb. 1: Mechanismen der Tumorzellelimination durch Antikörper bzw. -derivate mit Spezifität für ein Tumorantigen bzw. tumorassoziiertes Antigen (Modifiziert nach Gemsa et al., 1997).

Wie die Abbildung 1 zeigt, existieren mehrere Möglichkeiten um Tumorzellen mit Hilfe von Antikörpern zu attackieren. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) stellen eine wichtige Effektorpopulation dar, die mit Antikörpern markierte (Tumor-) Zellen zu erkennen und anschließend zu lysieren vermag (ADCC = Antibody dependent cellmediated cytotoxicity). NK-Zellen exprimieren zur Erkennung der konstanten Region (Fc) von IgG1- und IgG3-Antikörpern einen niedrigaffinen Rezeptor (FcγRIIIA = CD16) auf ihrer Zelloberfläche. Über diesen Rezeptor werden die Antikörper gebunden, und nach deren Bindung an die das Antigen exprimierenden Tumorzellen werden die NK-Zellen aktiviert. NK-Zellen, die zu den großen lymphoiden Zellen gehören, weisen intrazelluläre Vesikel auf, die mit Effektormolekülen wie Perforinen oder Granzymen gefüllt sind. Diese werden nach Aktivierung durch Degranulation der Vesikel freisetzen und üben so die zytotoxische Attacke aus. Auch mononukleäre Phagozyten wie Monozyten und Makrophagen weisen auf ihrer Zelloberfläche mehrere Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität für Immunglobuline auf: FcγRI (CD64), FcγRIIA, FcγRIIB2 (beide CD32) und FcγRIIIA (CD16). Durch die Antikörper-Bindung an Tumorzellen werden diese opsoniert, d.h. die „Attraktivität“ der Tumorzellen für Phagozyten wird gesteigert und die Phagozytose-Rate erhöht.

Eine weitere Komponente der Antikörper-abhängigen Immunabwehr bildet das Komplementsystem (CDC = complement dependent cytotoxicity). Es besteht aus einem Set von Plasmaproteinen, die in Form einer kaskadenartigen Reaktion zusammenwirken und letztlich einen porenformierenden „membrane attack complex“ in der Membran der Zielzellen bilden und sie damit osmotisch destabilisieren. Die Initiation der Komplementkaskade findet an mit Antikörpern markierten Zielzellen statt und führt vor Ausbildung des "membrane attack complex" bereits zu einer Opsonierung der markierten Zellen und zur anschließenden Phagozytose. Wichtig im Zusammenhang mit dieser Behandlungsstrategie ist ferner die Tatsache, daß humane Komplementfaktoren auch an murine Antikörper binden können, so daß auch in einer solchen Situation die Komplementkaskade ablaufen kann.

Darüber hinaus lassen sich murine Antikörper auch dahingehend modifizieren, daß ihr Fc-Teil mit Radionukliden wie ^{131}J markiert wird. Auf diese Weise werden die Radionuklide an Tumorzellen angereichert und entfalten dort ihre Radiotoxizität.

Als weiteres therapeutisches Konzept ist die Blockade onkogener Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie z.B. Her2/Neu zu nennen. Dadurch sollen Tumorzellen von proliferationsinduzierenden Faktoren abgeschirmt werden. Der Anti-Tumor-Effekt bispezifischer Antikörper wird im weiteren Verlauf der Einleitung erklärt.

Limitationen der Antikörper-basierten Behandlung von Krebserkrankungen

Folgende Bedingungen beschränken den therapeutischen Einsatz von Antikörpern beim Menschen:

- Die Immunreaktion des Patienten auf speziesfremde Proteine führt z.B. im Fall muriner Therapieantikörper zur Bildung von neutralisierenden Anti-Maus-Antikörpern (human anti mouse antibodies, HAMA). Somit wird nach wiederholter Verabreichung die mittlere Halbwertszeit der infundierten murinen Therapieantikörper verkürzt (Lamers et al., 1995; Reynolds et al., 1989). Die aus Therapieantikörper und HAMAs entstehenden Antikörperkomplexe können bei dem behandelten Patienten im Extremfall im Sinne einer Immun-Komplex-Erkrankung zu Nierenversagen führen; Therapieregime mit sich häufig wiederholenden Antikörperinfusionen werden damit praktisch unmöglich. In der Chimärisierung und Humanisierung solcher Therapieantikörper ist der Versuch zu sehen, diesem Phänomen zu begegnen. Unter der Chimärisierung eines Antikörpers wird der Austausch konstanter Domänen der schweren und leichten Ketten gegen humane konstante Regionen verstanden. Die Humanisierung geht noch einen Schritt weiter: Hier werden zusätzlich diejenigen Bereiche der murinen variablen Regionen gegen humane ausgetauscht, die nicht zur Antigenerkennung beitragen, sondern diesen Bereich lediglich stabilisieren (framework regions). Durch die beiden genannten Maßnahmen wird die Immunogenität deutlich verringert; es kommt damit nur noch zu abgeschwächten Immunreaktion gegen den/die Therapieantikörper (Winter et al, 1994)
- Eine weitere Hürde bei der Behandlung solider Tumoren stellt die Zugänglichkeit des Tumors für Antikörper dar. Aufgrund eines im Vergleich zum umgebenden Gewebe deutlich erhöhten Interstitialdrucks im Tumor entsteht ein Druckgradient von zentral nach peripher, der zu einer Flüssigkeitsströmung führt. Intravenös applizierte Antikörper, die über den Blutstrom ins Tumorrinnere gelangen, werden damit zur Tumorperipherie transportiert. Antikörper hingegen, die sich im tumorangrenzenden Gewebe befinden, gelangen nicht zur Peripherie oder ins Tumorrinnere (Sevick et al., 1989; Boucher et al., 1990; Jain et al.,1988). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß die Wirksamkeit dieser Therapieansätze entscheidend durch die Größe der zu therapierenden Tumore limitiert ist. Ein möglichst früher Therapiebeginn könnte so verbesserte Erfolge mit sich bringen. Ein solcher Zeitpunkt ist das Stadium der minimalen residualen Krebserkrankung, in dem nach Resektion des Primärtumors mit kurativer Zielsetzung lediglich eine sehr kleine Zahl von vereinzelt Tumorzellen oder kleinen Mikroaggregaten vorliegt. Diese sogenannten Mikrometastasen werden mit den bildgebenden Diagnoseverfahren der modernen Medizin nicht erfaßt und können zu einem späteren Zeitpunkt ihre fatale systemische Zerstörung entfalten. Je nach Tumortyp befinden sich 20 bis 50 % der Patienten in diesem Stadium (Riethmüller et al., 1992; August et al., 1984; Merrie et al., 1999).

Ein Beleg für die Vorteile, die eine Antikörpertherapie während dieses Stadiums – als adjuvante Therapie mit klinisch nicht nachweisbarer Tumorlast - mit sich bringt, ist die im folgenden kurz vorgestellte klinische Studie (Riethmüller et al., 1998). In dieser randomisierten Studie wurden bei 189

Patienten mit Kolorektalkarzinom im Stadium Dukes C, das heißt mit Primärtumor und lokalem Lymphknotenbefall aber ohne klinisch evidente Fernmetastasen, der Primärtumor und die lokalen Lymphknoten rezidiert. 99 der 189 Patienten wurde insgesamt 900 mg des inzwischen als Arzneimittel zugelassenen murinen Therapieantikörpers Panorex (auch Edrecolomab oder 17-1A Antikörper genannt) intravenös infundiert. Die restlichen Patienten stellten die Kontrollgruppe ohne adjuvante Antikörperbehandlung dar. Das tumorassoziierte Antigen 17-1A (synonym verwendete Bezeichnungen: EpCAM, EGP-2, EGP40 und KSA), das der Panorex-Antikörper erkennt, ist ein glykosyliertes Zelladhäsionsmolekül von etwa 34 kDa Größe, welches auf vielen epithelialen Geweben und sich daraus ableitenden Tumoren exprimiert wird (Göttlinger et al., 1986). Es handelt sich bei diesem Therapieantikörper um einen unmodifizierten Maus IgG2a-Antikörper moderater Affinität, der, wie sich in der Studie zeigte, auch die Bildung von HAMA-Antikörpern induzierte. Nach einem mittleren Beobachtungszeitraum von sieben Jahren konnten in der Therapiegruppe eine signifikante Abnahme der Gesamtmortalität um 32% und eine Verringerung der Rückfallrate um 23% erreicht werden. Während die Zahl der Fernmetastasen signifikant reduziert war, zeigte sich die Zahl der lokalen Rezidive unverändert. Das Ergebnis dieser Studie wurde als Beleg der Hypothese gewertet, daß bei Patienten mit soliden Tumoren die minimal residuale Krebserkrankung so häufig auftritt, daß eine Indikation für eine Antikörpertherapie gegeben ist und eine Antikörpertherapie auch wirksam sein kann (Riethmüller et al., 1998).

In den letzten zwei Jahren wurden weitere monoklonale Antikörper zur Behandlung von verschiedenen Krebserkrankungen bis zum zugelassenen Medikament entwickelt. Dabei handelt es sich um einen Antikörper der zweiten Generation, den chimärisierten Maus Antikörper Rituxan (Rituximab), der gegen das Oberflächenmolekül CD20 zur Behandlung von B-Zell-Lymphomen eingesetzt wird. Der chimärisierte Antikörper des Isotyps IgG1 wird bei Therapie-refraktären Patienten verwendet und entfaltet seine Wirkung über ADCC, CDC und Apoptose (Grillo-Lopez et al., 1999). Eine mit dem Radioisotop ¹³¹J markierte Variante des Anti-CD20 Antikörpers (Bexxar) zielt hingegen auf die Beseitigung der Tumorlast durch die hohe lokalisierte Bestrahlung der Tumorzellen (Webber et al., 1998). Ein Antikörper der dritten Generation befindet sich seit Ende 1998 bei der Behandlung von metastasiertem Brustkrebs im Einsatz. Der humanisierte Antikörper Herceptin (Trastuzumab) bindet das Oncogen HER2/neu, einen Rezeptor, der mit dem EGF-Rezeptor verwandt ist. Bei Patientinnen, deren Tumor HER2/neu überexprimiert, wird dieser Antikörper in Kombination mit einem Chemotherapeutikum verabreicht. Diese Ansätze belegen eindeutig den Wert der Antikörper-basierten Immuntherapie in der Behandlung von Krebserkrankungen, zeigen aber auch ihre Grenzen auf, wie das nur partielle Ansprechen auf die verschiedenen Antikörper belegt. (11,6% Ansprechrates des Herceptin-Antikörpers (Baselga et al., 1996) und 6% Komplettremission bei B-Zell-Lymphomen durch Rituxan (Grillo-Lopez et al., 1999)). Das Handicap der Krebstherapie mit monoklonalen Antikörpern scheint ihr variables und häufig niedriges zytotoxisches Potential zu sein (Renner et al., 2000).

1.2 Bispezifische Antikörper

Der Wunsch nach verbesserter klinischer Effizienz führte schon 1983 (Milstein et al.) und 1989 (Menard et al.) zu Ansätzen, bei denen die Spezifität monoklonaler Antikörper für bestimmte Tumorantigene mit der hohen Zytotoxizität verschiedener immunologischer Effektorzellen kombiniert wurde. Diese Ansätze verfolgten das Konzept der bispezifischen Antikörper. Während konventionelle Antikörper monospezifisch und bi- bis decavalent sind, weisen diese Antikörper in einem einzigen Proteinmolekül jeweils eine Spezifität für die Tumorzelle und eine für die Effektorzelle auf. Auf diesem Wege sind bispezifische Antikörper in der Lage, dem Immunsystem durch die künstliche Kombination humoraler (Antikörper-basierter) und zellulärer Komponenten neue Aspekte hinzuzufügen.

Die Herstellung dieser Hybrid-Moleküle kann grundsätzlich auf mehreren Wegen erfolgen, so daß sich die resultierenden bispezifischen Antikörper stark in ihrer Struktur und ihrer Größe unterscheiden (Abbildung 2):

- Die Hybrid-Herstellung erfolgt durch eine chemische Kopplung zweier verschiedener monoklonaler Antikörper (nicht abgebildet). Aufgrund der meist ungerichteten Kopplungsreaktion entsteht dabei ein wenig definiertes Gemisch aus Homodimeren, Trimeren und größeren Aggregaten. Zur Trennung dieses heterogenen Gemisches bedarf es einer aufwendigen Reinigungsprozedur, die die Ausbeute der auf diese Weise produzierten Konjugate stark einschränkt (Greenman et al., 1992; Karpovsky et al., 1984).

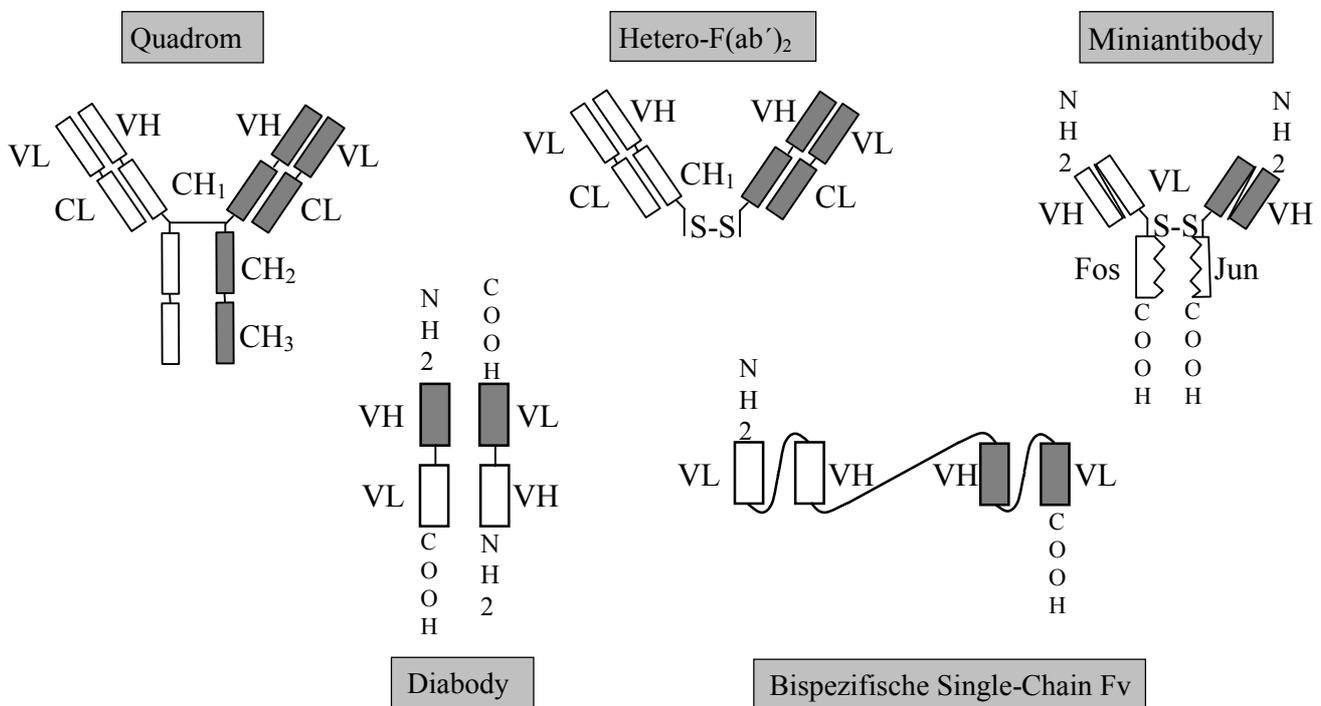


Abb. 2: Zusammenfassende Darstellung verschiedener Formate bispezifischer Antikörper. Symbolisierung der verschiedenen Regionen der zwei Antikörper bzw. deren VL/VH-Ketten durch unterschiedliche Farben. (VL/VH variable leichte/schwere Kette; CL/CH konstante leichte/schwere Kette; Fv [Fragment variable]; NH₂ Amino-Terminus; COOH Carboxy-Terminus)

- Die Fusion zweier Hybridomzelllinien führt zu einem sogenannten Hybrid-Hybridom oder Quadrom (Menard et al., 1989). Das resultierende Hybridom sekretiert eine Mischung der parentalen Antikörper, eine größere Population verschiedener VL- und VH-Kombinationen und den gewünschten bispezifischen Antikörper. Die zufallsgesteuerte Paarung von zwei schweren mit zwei leichten Ketten kann somit zehn verschiedene Immunglobulin-Spezies entstehen lassen. Diese unerwünschten, schwer voneinander zu trennenden Nebenprodukte stellen auch hier eine starke Limitation dar. Eine sich anschließende Proteolyse durch Pepsin ermöglicht die Herstellung bispezifischer Antikörper ohne den konstanten Fc-Bereich. Die resultierenden antigenbindenden Fragmente werden als Hetero-F(ab')₂ (= Fragment antigen binding) bezeichnet und bestehen aus kompletten leichten Ketten und den N-terminalen Hälften der schweren Ketten, die durch Disulfidbrückenbindungen zusammengehalten werden (Foglesong et al., 1989).
- Die gentechnische Einführung von Oligomerisierungsstrukturen in die Nukleotidsequenz der zu kombinierenden Spezifitäten, z.B. die Sequenzen von *jun* und *fos* (Kostelny et al., 1992; Pack et al., 1992), führte zu sogenannten Miniantibodies. *jun* und *fos* sind Transkriptionsfaktoren mit „Leucin-Zipper“-Anteilen, deren geregelte Leucin-Abfolge eine Dimerisierung der kurzen Carboxy-terminalen Peptide verursacht, wobei die Tendenz zur Homodimerisierung gering ist. Wird also die *jun*-Sequenz an die erste Spezifität und die *fos*-Sequenz an die zweite Spezifität kloniert, können diese nach Expression der Proteinketten *in vivo* oder *in vitro* dimerisiert werden. Dieses Format ermöglicht die Herstellung sowohl von F(ab')₂-Konstrukten als auch von verbundenen Single-chain-Fragmenten (scFv), bei denen die variablen Domänen der schweren und der leichten Kette direkt über einen Linker miteinander verbunden sind (Pack und Pluckthun, 1992).
- Diabodies sind bispezifische Antikörper, die durch die Koexpression der folgenden zwei Tandempolypeptid-Ketten aus insgesamt vier variablen Domänen in Bakterien produziert werden: VH(A) – VL(B) und VL(A) – VH(B) (A und B stellen die zwei verschiedenen Spezifitäten dar). Die kurzen Linker (5 AS) zwischen den VL- und VH-Domänen unterschiedlicher Spezifität verhindern eine intramolekulare Paarung variabler Regionen, geben aber die notwendige Flexibilität zur Paarung der komplementären Domänen beider Peptidketten (Holliger et al., 1993). Fehlpaarungen oder Dissoziationen der beiden Konstrukte sind nicht ausgeschlossen, so daß Aufreinigungsschritte wie die Affinitätschromatographie notwendig sind.
- Bispezifische Single-Chain Antikörper werden rekombinant durch die Fusion der VL/VH-Domänen (scFv-Fragment) zweier Spezifitäten hergestellt und vereinen damit die vier Bindungsdomänen auf einer einzigen Peptidkette (De Jonge et al., 1995; Kurucz et al., 1995; Mack et al., 1995). Die Verbindung der vier Domänen wird durch die Einführung von Linkersequenzen erreicht, die die Zusammenlagerung der leichten und schweren Ketten der jeweiligen Spezifität ermöglicht. Eine solche Peptidkette hat damit z.B. die Domänenfolge VL(A)-VH(A)-VH(B)-VL(B). Die funktionelle Expression eines solchen Konstrukts ist in eukaryontischen Expressionssystemen möglich. Der Vorteil dieses Formats liegt in der guten Definiertheit des Produkts; Nebenprodukte, eine proteolytische Entfernung der konstanten Regionen (CH₂-CH₃) wie bei kompletten Antikörpern oder aufwendige Aufreinigungsschritte entfallen.

In den vorangegangenen Abschnitten wurden sowohl die Intention als auch erste Erfolge der Antikörperbasierten Tumorthherapie beschrieben sowie eine knappe Einführung zu den verschiedenen Formaten bispezifischer Antikörperkonstrukte gegeben. In den folgenden Abschnitten werden die grundlegenden Funktionsmechanismen von bispezifischen Antikörpern und die damit rekrutierten Effektorzellen anhand von Beispielen vorgestellt.

1.3 Rekrutierung lymphozytärer Effektorzellen mit Hilfe bispezifischer Antikörper

1.3.1 Das Antigen auf Tumorzellen

Bispezifische Antikörper zielen auf eine Kreuzvernetzung von Effektorzellen des Immunsystems mit Tumorzellen. Auf den Tumorzellen muß dazu ein Epitop erkannt werden, das entweder tumorzellspezifisch exprimiert wird oder als Tumor-assoziiertes Antigen auf Tumorzellen überexprimiert ist. Grundvoraussetzung für ein geeignetes Ziel-Antigen ist seine starke, aber auch homogene Expression auf den Tumorzellen und den sich daraus ableitenden Metastasen. Eine weitere Voraussetzung ist die Membranständigkeit des Antigens; eine lösliche Variante des Antigens im Serum sollte nach Möglichkeit nicht existieren. Ein gut untersuchtes tumorassoziiertes Antigen ist das EpCAM oder 17-1A Antigen, das bei Kolorektalkarzinomen überexprimiert wird, aber auch auf anderen nicht malignen Epithelien vorhanden ist. Da es nicht in löslicher Form im Serum vorliegt (Steplewski et al., 1991) und auf vielen weiteren Karzinomen homogen exprimiert ist (Kolorektal-, Magen- und Pankreas-Karzinomen), erfüllt dieses Antigen die oben aufgestellten Bedingungen (Göttlinger et al., 1986). Dieses 17-1A-Antigen wurde bereits von Mack et al. (1995) als Zielantigen für die Konstruktion eines bispezifischen Single-Chain-Antikörpers gewählt und soll auch in dieser Arbeit als Modelltumorantigen eingesetzt werden. Die zahlreichen Aspekte, die mit der Wahl von EpCAM als Tumor-assoziiertes Antigen zusammenhängen, werden in dieser Arbeit nur in soweit angesprochen, wie es für das unmittelbare Verständnis erforderlich ist.

1.3.2 Aktivierungsmoleküle auf Effektorzellen

Neben der rein physischen Verbindung von Tumor- und Effektorzelle muß auf der Seite der Effektorzelle zusätzlich eine Aktivierung der zytotoxischen Wirkmechanismen stattfinden, die zur Lyse der Zielzellen führt. Das Immunsystem bietet zu diesem Zweck eine Reihe von verschiedenen Effektorzellen mit diversen bereits gut untersuchten Aktivierungsmolekülen, die im folgenden beschrieben werden.

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL)

Zellen, die intrazellulär prozessiertes Fremdanigen, wie z. B. Viruspartikel in Form kurzer Oligopeptide im MHC-I-Kontext auf der Zelloberfläche präsentieren, können von zytotoxischen T-Lymphozyten in antigenspezifischer Weise durch den klonotypischen T-Zell-Rezeptor (TCR) erkannt werden. Zusätzlich zu dieser ersten Bindung werden weitere stimulatorische Rezeptor-Liganden-Interaktionen benötigt. Diese Interaktionen lösen einen komplexen Reaktionsablauf aus, bei dem neben der Aktivierung der T-Zelle Granula freigesetzt werden, die porenformierende Proteine – Perforine – und Serinesterasen – Granzyme A-H – enthalten. Perforine zeigen strukturelle Ähnlichkeiten mit „späten“ Komplement-Proteinen. Sie polymerisieren in der Membran der Zielzelle und bohren transmembranöse Kanäle in die Zielzelle. Der so eingeleitete Lysevorgang wird durch die in die attackierte Zelle eindringenden Serinesterasen vollendet, die eine DNA-Fragmentierung verursachen.

Der erwähnte TCR-Komplex auf reifen T-Lymphozyten ist ein Multiproteinkomplex, der aus klonotypisch variablen antigenbindenden Ketten, den α/β - oder γ/δ -Heterodimeren, und den invarianten akzessorischen Ketten des CD3-Komplexes besteht (siehe Abbildung 3) (Weis et al, 1992). Die α/β - (oder γ/δ -) Ketten des T-Zell-Rezeptors erkennen Peptidantigene im MHC-Kontext, transduzieren jedoch selbst keine Signale ins Zellinnere. Die invarianten Ketten des CD3-Komplexes liegen als Heterodimere – $CD3\gamma/\epsilon$, $CD3\delta/\epsilon$ – vor und sind des weiteren mit einem Zeta-Ketten Homodimer ($\zeta\text{-}\zeta$) oder einem Heterodimer ($\zeta\text{-}\eta$) vergesellschaftet, wobei die Eta-Kette eine alternative Splice-Variante der Zeta-Kette darstellt (Jin et al., 1990). Der CD3-Zeta-Komplex wird sowohl für die Initiation der Signaltransduktion nach erfolgter Antigenbindung an den TCR-Komplex als auch für den Zusammenbau, den Transport und die korrekte Oberflächenexpression des Gesamtkomplexes benötigt (Clevers et al., 1988). Die intrazelluläre Signaltransduktion führt zur Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren, in deren Folge neue Gene exprimiert und andere Gene abgeschaltet werden, die typisch für einen ruhenden T-Lymphozyten sind. Die Signaltransduktion ist von einer Aminosäuresequenz abhängig, die als „Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif“ (ITAM) bezeichnet wird (Cambier et al., 1995). Dieses Motiv trägt seinen Namen aufgrund der zwei benachbarten Tyrosine innerhalb der Aminosäuresequenz $YXX[L/V]X_{8-11}YXX[L/V]$ (Y = Tyrosin; L = Leuzin; V = Valin; X = nichtkonservierte AS) und wegen der Rolle, die die Tyrosine im Aktivierungsprozeß einnehmen. Die Phosphorylierung der Tyrosine durch Protein Tyrosin-Kinasen (PTK) der Src-Familie nach der TCR-Ligation leitet die Phosphorylierung weiterer Signalproteine wie ZAP 70 (= Zeta-assoziiertes Protein, 70 kDa) ein, die stromabwärts die weitere Signaltransduktion vermitteln (Straus et al., 1992; Van Oers et al., 1996). Wie in der obigen Abbildung angedeutet, weisen die α/β - Ketten keine, die Ketten γ , δ , ϵ jeweils eine ITAM-Sequenz auf, während die ζ -Ketten jeweils drei ITAM-Motive besitzen.

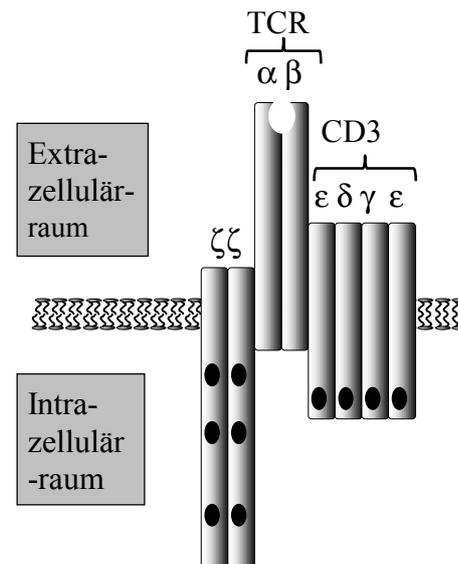


Abb. 3: Schematische Darstellung des TCR-CD3 Komplexes auf T-Zellen. Die schwarzen Ovale symbolisieren ITAMs.

Bei den Rezeptoren, die zur Rekrutierung von T-Lymphozyten mit Hilfe bispezifischer Antikörper eingesetzt wurden, kommt dem CD3-Komplex und insbesondere der Epsilon-Kette eine besondere Bedeutung zu. Bispezifische Anti-CD3/anti-Tumor-Antikörper imitieren die TCR-MHC-Interaktion, indem sie eine Kette des CD3-Komplexes direkt mit dem Antigen auf der Zielzelle verbinden. Auf diese Weise wird die Spezifität des T-Zell-Rezeptors umgangen und durch die Anti-Tumorzell-Spezifität des bispezifischen Antikörpers ersetzt. Ein wichtiger Vorteil dieser Art von Aktivierung und Rekrutierung der lytischen Mechanismen von Effektorzellen besteht in der Unabhängigkeit von MHC-I-restringierter Antigenpräsentation und -erkennung, die im Falle der physiologischen T-Zell-Rekrutierung die Grundvoraussetzung für eine zelluläre Immunantwort darstellt. Der Selektionsdruck des Immunsystems führt jedoch häufig zu veränderten Tumorzellen, die sich durch Mutationen der Immunüberwachung entziehen. So kann eine Vielzahl von Faktoren dazu führen, daß Tumorpeptide nicht im MHC-I-Kontext

auf der Tumorzelloberfläche präsentiert werden; so z.B. eine reduzierte Aktivität der Transportermoleküle, die mit der Antigenprozessierung assoziiert sind (TAP-1 und TAP-2; Monaco et al., 1990 und Powis et al., 1992), oder eine reduzierte Anzahl von MHC-I-Molekülen an sich (Kaklamanis et al., 1995).

Die dominante Position von CD3 als Aktivierungsmolekül zur Rekrutierung von T-Lymphozyten mit Hilfe bispezifischer Antikörper wird durch zahlreiche Mausmodelle und auch bereits durch klinische Studien belegt:

- *In vivo* Tumorversuche werden häufig in Nackt- oder SCID-Mäusen (Severe combined immune deficiency) durchgeführt. Während Nacktmäuse aufgrund eines nichtfunktionellen Thymus keine reifen T-Lymphozyten haben, fehlen den SCID-Mäusen aufgrund eines Defekts der V(D)J-Rekombinase sowohl B-, als auch T-Lymphozyten. Aus diesen Gründen eignen sich diese Tiermodelle gut, um den Effekt von bispezifischen Antikörpern auf transplantierte humane Tumore *in vivo* zu untersuchen nachdem den Tieren humane T-Lymphozyten als Effektorzellen infundiert wurden. So konnten z.B. SCID-Mäuse durch die kombinierte Gabe von Anti-CD3/anti-CD30- und kostimulatorisch wirkenden Anti-CD28/anti-CD30-Antikörpern von etablierten CD30⁺-Hodgkin-Lymphomen geheilt werden (Renner et al., 1995).
- In syngenem Tiermodellen werden in immunkompetenten Mäusen Tumore induziert oder syngene murine Tumore implantiert, die nicht spontan abgestoßen, sondern erst nach Zugabe von bispezifischen Antikörpern durch murine Effektorzellen attackiert werden. Der Vorteil solcher Tiermodelle besteht in einem weniger artifiziellen Ansatz und der damit verbundenen besseren Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Behandlung humaner Tumorerkrankungen. Da sich das murine CD3 vom humanen CD3 unterscheidet, muß allerdings ein auf die murinen Verhältnisse angepaßtes Konstrukt hergestellt werden. De Jonge et al. konnten in einem solchen Ansatz, bei dem ein syngenes Non-Hodgkin-B-Zell-Lymphom durch die Gabe eines bispezifischen Anti-CD3/anti-Idiotyp-Antikörpers behandelt wurde, zeigen, daß ein verlängertes Gesamtüberleben bzw. die Elimination des Tumors erreicht werden kann (De Jonge et al., 1998). Vergleichbare Ansätze von Weiner und Mitarbeitern (1992) zeigten ebenfalls einen signifikanten Therapieerfolg in bezug auf verringertes Tumorwachstum und verlängerte Überlebenszeit.
- Eine kleine Zahl bispezifischer Antikörper, die CD3⁺-T-Lymphozyten gegen verschiedene Krebserkrankungen rekrutieren, sind bis zur klinische Erprobung an Krebspatienten vorgedrungen: Canevari et al. (1995) behandelten Ovarialkarzinom-Patientinnen intraperitoneal mit einem Hetero-F(ab')₂ Anti-CD3/anti-OC (einem Antigen auf Ovarialkarzinomzellen) und erreichten in einigen Fällen lokale Antitumoreffekte; die systemische Komponente der Krebserkrankung konnte allerdings nicht zufriedenstellend behandelt werden. In Kooperation mit dem Max-Delbrück-Zentrum Berlin entstand in der Arbeitsgruppe Kufer ein bispezifischer Antikörper im Single-Chain-Format mit der Domänenfolge VL_{CD19}-VH_{CD19}-VH_{CD3}-VL_{CD3} gegen CD19⁺ Non-Hodgkin-Lymphome (Löffler et al., 2000). Dieser Antikörper zeigte *in vitro* signifikante lytische Aktivität bei Konzentrationen von 10 bis 100 pg/ml und einem Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis von 2:1. In einem ersten klinischen Heilversuch, an dem zwei Patienten mit B-Zell-Tumoren teilnahmen, zeigte sich bei beiden Patienten eine deutliche Verringerung der Tumorlast. Eine klinische Studie Phase I ist in Planung und beginnt im Ende 2000/Anfang 2001.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

NK-Zellen gehören zu den großen granulären Lymphozyten und machen etwa 10 bis 15% der peripheren Blutlymphozyten (PBL) aus. NK-Zellen lassen sich funktionell so definieren, daß sie *in vitro* ohne vorherige Stimulierung oder Immunisierung bestimmte Tumorzellen (z.B. Zellen der Linie K-562, isoliert aus einer Patientin mit chronisch myeloischer Leukämie) und virusinfizierte Zellen in einer MHC-unrestringierten Art lysieren. (Ritz et al., 1988; Trinchieri et al., 1993). Wegen ihrer Eigenschaften werden NK-Zellen deshalb zur angeborenen Immunabwehr gezählt, die dem Individuum vor dem Einsetzen der Antigen-spezifischen, erworbenen Immunantwort Schutz verleiht. Die molekularen Mechanismen, die NK-Zellen davon abhalten, ohne Unterscheidung im Rahmen ihrer "natürlichen Zytotoxizität" auch normale Zellen zu lysieren, sind durch eine Balance aus inhibierenden und aktivierenden Signalen reguliert (Bakker et al., 2000). So wurden verschiedene inhibierende Rezeptoren identifiziert, die zwischen den unterschiedlichen allelen Varianten von HLA-A, -B und -C differenzieren und auch deren Abwesenheit oder Niederregulation detektieren können. Kommt es zu einer Rezeptor-Bindung an MHC-I-Moleküle, so wird die NK-Zell-vermittelte Lyse inhibiert (Moretta & Moretta, 1997). Während diese inhibierenden Rezeptoren („Killer cell inhibitory receptors“, KIRs) schon länger bekannt sind, wurden erst in jüngerer Zeit die Mechanismen aufgeklärt, die in MHC-I-Abwesenheit NK-Zellen aktivieren und die Lyse der Zielzellen auslösen. Für die Induktion der NK-Zellyse werden drei neue NK-Zell-spezifische Aktivierungsmoleküle verantwortlich gemacht – NKp46, NKp44 und NKp30 – (Bottino et al., 2000). Diese drei Rezeptoren bilden die ersten Mitglieder einer neuen Rezeptor-Klasse, die als „Natural Cytotoxicity Receptors“ (NCRs) bezeichnet wird. Die Intrazellulärdomäne der NCRs fällt mit ungefähr 30 Aminosäuren kurz aus und weist keine typischen aktivierenden Sequenzmotive auf, die die Signalkaskade innerhalb der Zelle weiterleiten könnten (Abbildung 4). Stattdessen sind NKp46 und NKp30 mit der TCR-Zeta-Kette und/oder der Gamma-Kette von Fc ϵ RI assoziiert, die als Signaltransduktionsmodule fungieren. Diese Ketten werden von einer Genfamilie kodiert, die erstmals im Zusammenhang mit dem TCR-CD3-Komplex bzw. dem hochaffinen Fc-Rezeptor für IgE (Fc ϵ RI) beschrieben wurde (Kinet et al., 1992; Moingeon et al., 1992). Die beiden integralen Transmembranproteine weisen jeweils eine sehr kurze Extrazellulärdomäne von nur 9 (Zeta) bzw. 4 Aminosäuren (Gamma) auf, besitzen dafür aber einen langen intrazytoplasmatischen Anteil, mit einer einfachen (Gamma) bzw. einer dreifachen Wiederholung (Zeta) der ITAM-Motive.

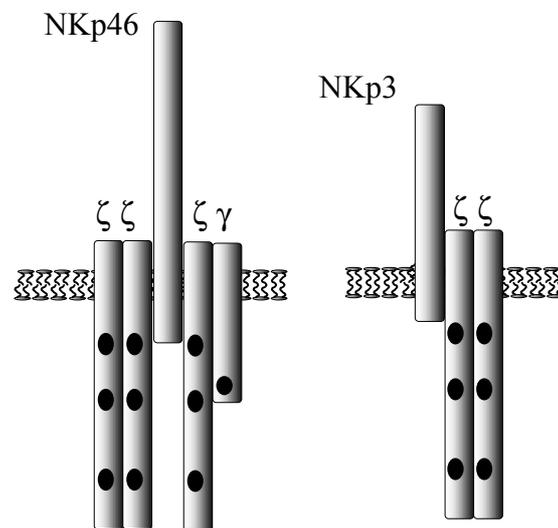


Abb. 4: Schematische Darstellung der "Natürlichen Zytotoxizitäts Rezeptoren" (NCRs) NKp46 und NKp30, die beide mit der Zeta-Kette assoziiert sind. NKp46 weist extrazellulär 2 Immunglobulin-Domänen auf, während NKp30 nur eine Ig-Domäne besitzt, die mit den MHC-Molekülen interagiert.

NK-Zellen weisen neben der natürlichen Zytotoxizität auch die Fähigkeit zur antikörperabhängigen Zytotoxizität (ADCC) auf, die eingangs schon kurz beschrieben wurde: Mit Hilfe niedrigaffiner Fc-Rezeptoren (Fc γ IIIa, siehe Abbildung 5), die sie auf ihrer Oberfläche exprimieren, binden NK-Zellen an Antikörper-markierte Tumorzellen und lysieren diese. Der Fc γ IIIa-Rezeptor-Komplex besteht neben der ca. 60 kDa großen Ligand-bindenden CD16-Kette, die eine lange Extrazellulärdomäne und einen kurzen zytoplasmatischen Anteil aufweist, auch aus Homo- und Heterodimeren der Zeta- und Gamma-Kette (Anderson et al., 1990). Im Rahmen der CD16-vermittelten Aktivierung von NK-Zellen werden die Tyrosin-Reste der ITAM-Motive phosphoryliert und so die Signaltransduktion ins Zellinnere induziert (Letourneur et al., 1991; Vivier et al., 1991). Die Zeta- und Gamma-Ketten sind für die Expression und die Signalfunktion des Fc γ IIIa-Rezeptors essentiell und weisen in diesem Punkt starke Parallelen zum TCR-CD3-Komplex auf (Orloff et al., 1990; Anderson et al., 1992).

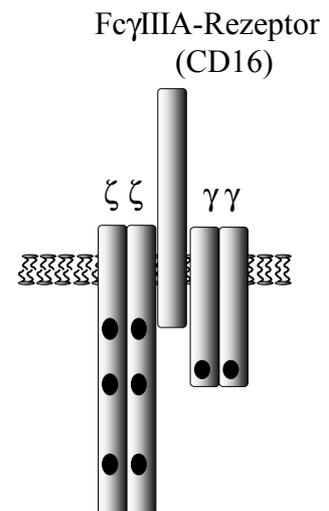


Abb. 5: Schematische Darstellung des CD16-Kontextes auf NK-Zellen

Konventionelle Ansätze zur Rekrutierung von NK-Zellen mit Hilfe bispezifischer Antikörper verwenden Fc γ IIIa-Rezeptoren (CD16) als Aktivierungsmolekül. Dieses wurde bisher in zwei klinischen Studien mit verschiedenen Tumorepitopen kombiniert.

- Hartmann/Renner et al. (1997 & 2000) kombinierten die CD16-Spezifität mit der gegen das CD30-Antigen auf Hodgkin-Lymphomen. Bei 15 therapierefraktären Hodgkin-Patienten wurde eine Dosiseskaltungsstudie mit dem murinen Anti-CD16/anti-CD30 Quadromantikörper durchgeführt. Als Ergebnis zeigten sich jeweils eine komplette und eine partielle Remission sowie drei weitere kleinere Reaktionen für Zeiträume von 1 bis 11 Monaten, was einer 30%igen Ansprechrates entspricht. Aufgrund der Verabreichung eines komplett murinen bispezifischen Antikörpers bildeten sich in 6 von 13 Patienten humane-anti-Maus-Antikörper (HAMA), die eine wiederholte und verlängerte Verabreichung verhinderten.
- Weiner et al. (1995) setzten einen murinen bispezifischen Anti-Her2/anti-CD16 Quadromantikörper bei 15 Patienten ein, deren Tumore Her2/Neu überexprimierten. Die klinischen Ergebnisse dieser Studie variierten von kleineren Reaktionen bis hin zur Auflösung von Pleuraergüssen und malignen Aszites oder zum Verschwinden einzelner Lebermetastasen in drei Patienten mit metastasierten Kolonkarzinomen für einen Zeitraum von bis zu drei Monaten.

Die oben aufgeführten Studien zeigen prinzipiell die Erfolgsmöglichkeiten mit bispezifischen Antikörpern bei der Behandlung von Tumorerkrankungen. Die Limitiertheit der Therapieerfolge mag zum Teil ähnliche Ursachen haben, wie sie schon von den Tumorthherapieansätzen mit konventionellen monoklonalen Antikörpern bekannt sind. So stellt sich auch bei bispezifischen Antikörpern das Problem der Immunogenität speisefremder Proteine mit der daraus resultierenden Immunantwort (HAMA). Um diesem Problem zu begegnen, werden auch bispezifische Antikörper humanisiert oder im Diabody- und Single-Chain-Format – beide dürften weniger immunogen sein – produziert. Eine weitere Frage, die angesprochen werden muß, ist die nach dem geeigneten Aktivierungsmolekül zur Rekrutierung der

Effektorzellpopulationen. De Gast erklärte 1997 in einem Review, daß bis jetzt noch nicht klar sei, welche Immunzellen am effektivsten sind, und stellte die Frage nach einer Abhängigkeit vom Tumortyp (hämatologische oder solide Tumore) und vom letztlichen Ziel (direkter Antitumor-Effekt oder Entwicklung einer auf T-Zellen basierenden Immunität gegen den Tumor). Bei hämatologischen Tumoren und im speziellen bei B-Zell-Malignomen, sollten T-Zellen als Effektorzellen wegen zahlreicher physiologischer Interaktionen mit den Zielzellen besonders effektiv sein. Zur Behandlung solider Tumore hingegen könnten NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten eine bessere Wahl darstellen. De Gast stellte weiterhin fest, daß NK-Zellen und Granulozyten einen eher direkten Anti-Tumor-Effekt haben, während T-Zellen und Makrophagen/Dendritische Zellen effektiver sein dürften um eine Anti-Tumor-Immunität zu induzieren. Erwies sich diese Hypothese als zutreffend, wäre eine sequenzielle Verabreichung bispezifischer Antikörper, die verschiedene Effektorpopulationen rekrutieren sinnvoll (De Gast et al., 1997). Solch eine umfassende Strategie würde beinhalten, daß zunächst ein erster bispezifischer Antikörper verabreicht werden müßte, der durch NK-Zell-basierte Lyse einen direkten Anti-Tumor-Effekt bewirken würde, um dann einen zweiten T-Zellen-rekrutierenden bispezifischen Antikörper zu infundieren, der eine Anti-Tumor-Immunität induziert.

Die Zeta-Kette: Ein Aktivierungsmolekül auf T-Lymphozyten und NK-Zellen

Eine Alternative zu den bereits vorgestellten Ansätzen könnte ein bispezifischer Antikörper sein, der beide Effektorpopulationen gleichzeitig zu rekrutieren vermag. So ist eine komplimentierende Wirkung durch die Rekrutierung der beiden Effektorpopulationen mit einem einzigen bispezifischen Antikörper gegen ein Tumorepitop vorstellbar. Der T-Zell-Rezeptor-Komplex, der niedrigaffine IgG-Fc-Rezeptor, FcγIIIa, und die NCRs NKp46 und NKp30 teilen die gemeinsame Struktur, in der die Rezeptor-Ketten, die für die Liganden-Erkennung verantwortlich sind, mit Proteinen assoziiert sind, deren vornehmliche Rolle in der Signaltransduktion zu sehen ist (Davis et al., 1988; Clevers et al., 1988; Ravetch et al., 1991). Allen gemeinsam ist die Zeta-Kette, entweder als Homodimer von 32 kDa oder als Heterodimer Zeta-Eta von 38 kDa Größe. Die Zeta-Kette gehört zu den Typ-I-Transmembranproteinen (mit extrazellulärem N-Terminus), wobei der Extrazellularanteil mit nur 9 Aminosäuren extrem kurz ist. Die Extrazellulärdomäne und der Transmembranteil mit 21 Aminosäuren der Zeta-Kette sind identisch mit denen der Eta-Kette und zeigen sich über mehrere Spezies hinweg stark konserviert (Tabelle 1).

Spezies	Accession Nr.*	Referenz
<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	NP000725	Weissman et al., 1988a
<i>Mus musculus</i> (Maus)	A40104	Weissman et al., 1988b
<i>Rattus norvegicus</i> (Ratte)	BAA02753	Itoh et al., 1993
<i>Ovis aries</i> (Hausschaf)	CAA78312	Hein et al., 1993
<i>Bos taurus</i> (Rind)	AAC48548	Hagens et al., 1996

Tab. 1: Exemplarische Aufzählung der Spezies, in denen die Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette identisch sind. * „Accession-Number“ der Proteindatenbank des NATIONAL CENTER for BIOTECHNOLOGY INFORMATION (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>)

Die zytoplasmatische Domäne der Zeta-Kette weist mit 113 Aminosäuren hingegen einen Längenunterschied zur Splicevariante Eta mit 155 Aminosäuren auf. Das Homodimer $\zeta\zeta$ wird nach Untersuchungen von Clayton et al. (1991) im Vergleich zum Heterodimer $\zeta\eta$ dominant auf T-Lymphozyten exprimiert (90%). Die Notwendigkeit einer funktionalen Zeta-Kette im Zusammenhang mit T-Zell-Rezeptor-vermittelter Signaltransduktion wurde erstmal durch Sussman et al. (1988) gezeigt, der durch Untersuchungen an einer Zeta-Ketten-negativen T-Zell-Lymphom-Mutante belegte, daß diese Mutante außerstande war, auf einen Antigenstimulus oder auf Rezeptorkreuzvernetzung durch einen CD3-Antikörper zu reagieren. Durch Rekonstitutionsexperimente an der erwähnten Mutante durch transfizierte Zeta-Ketten konnte die Fähigkeit, auf Antigenstimuli zu reagieren, wiedererlangt werden (Weissman et al., 1989). Diese Experimente dokumentieren die wichtige, wenn nicht gar grundlegende Rolle der Zeta-Kette im Rahmen der Signaltransduktion.

Chimäre Rezeptoren basierend auf der Intrazellulärdomäne der Zeta-Kette

Weitere Belege für die dominante Position der Zeta-Kette bei der Signaltransduktion stellen die im folgenden kurz vorgestellten Studien dar. Dazu wurden rekombinant hergestellte chimäre Rezeptoren, in denen die Zeta-Ketten die intrazytoplasmatische Signaltransduktion übernehmen, für Therapieansätze bei HIV-Infektionen oder Tumorerkrankungen eingesetzt. Im Rahmen dieser Experimente wurde der zytoplasmatische Anteil der Zeta-Kette an verschiedene extrazelluläre Rezeptoren gekoppelt und in verschiedene Zellen transfiziert, um die Signaltransduktion durch diese chimären Rezeptoren zu untersuchen:

- Irving und Weis (1991) stellten ein chimäres Protein her, das die Extrazellulär- und Transmembrandomäne vom Oberflächenrezeptor CD8 mit der zytoplasmatischen Domäne der Zeta-Kette verband. Nach Transfektion des Konstrukts in die T-Zell-Leukämie-Zelllinie Jurkat konnten durch Inkubation mit Anti-CD8-Antikörpern Zeichen für die Signaltransduktion wie Tyrosinphosphorylierung und IL2-Sekretion nachgewiesen werden. Aufgrund der Abwesenheit solcher Komponenten wie CD3- γ , - δ , und - ϵ wurde auf die wichtige Rolle der Zeta-Kette in Verbindung mit der intrazellulären Signaltransduktion geschlossen.
- Romeo und Seed (1991) fusionierten die extrazelluläre Domäne von CD4 mit der Transmembran- und Intrazellulärdomäne der Zeta-Kette zu einem chimären Rezeptor, der in CD8⁺-zytotoxische T-Lymphozyten transfiziert wurde. T-Lymphozyten, die auf ihrer Oberfläche diesen Rezeptor exprimierten, bedingten eine deutliche Lyse von Zielzellen, die das HIV-Protein gp120 aufwiesen. Tran et al. (1995) zeigten in einem vergleichbaren Ansatz, daß es auch in NK-Zellen, die mit einem chimären CD4:Zeta-Rezeptor ausgestattet wurden, zur Tyrosin-phosphorylierung der chimären Zeta-Kette kam und gp120-positive Zellen lysiert wurden.
- Romeo et al. führten 1992 eine Versuchsreihe mit verschiedenen Deletionsmutanten einer chimären CD16:Zeta-Kette durch, die im Bereich der Zeta-Ketten-Sequenz mutiert waren, um Informationen über den Modus der Zytotoxizitätsinduktion durch die Zeta-Kette zu erhalten. Durch sukzessive Verkürzung des zytoplasmatischen Anteils der Zeta-Kette im Rahmen dieses chimären Rezeptors konnte so die dominante 18 Aminosäuren lange, für die Aktivierung hauptsächlich verantwortliche ITAM-Sequenz identifiziert werden. Das ITAM-Motiv löste eine effiziente Lyse von Hybridomzellen aus, wenn diese membranständige Anti-CD16 Antikörper exprimierten.

- Stancovski et al. (1993) beschrieben ein Anti-Her2/Neu:Zeta-Ketten-Konstrukt mit einem scFv-Fragment, das in ein CTL-Hybridom transfiziert wurde und effizient Her2/Neu-positive Fibroblasten lysierte. Weitere Details werden in der Diskussion (4.9) beschrieben.
- Jensen et al. (1998) konstruierten ein chimäres Antigen-Rezeptor-Konstrukt zur Behandlung von CD20⁺-Non-Hodgkin-Lymphomen, indem sie ein Anti-CD20-Single-Chain-Fragment (scFv) über eine C_{H2}/C_{H3} Domäne mit der Intrazellulärdomäne der Zeta-Kette verknüpften (Abbildung 6). Ein CTL-Klon, der dieses Konstrukt homogen auf seiner Oberfläche exprimierte, zeigte erwartungsgemäß eine CD20-spezifische Zytotoxizität gegen humane Lymphomzellen *in vitro*.

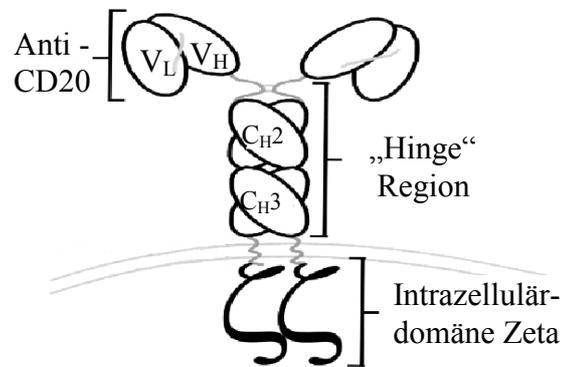


Abb. 6: Schematische Darstellung der CD20-spezifischen scFv : Zeta-Chimäre auf transfizierten zytotoxischen T-Lymphozyten (nach Jensen et al., 1998, modifiziert)

Diese Untersuchungen belegen eindeutig das Potential der Zeta-Kette, extrazelluläre Ereignisse wie verschiedene Liganden-Rezeptor-Interaktionen ins Zellinnere zu signalisieren. Die Phosphorylierung der dreifach vorhandenen Tyrosin-Motive führt dabei zu einer deutlichen Signalamplifikation und unterstreicht damit – im Vergleich zu den singulären ITAM-Motiven der invarianten Ketten des CD3-Komplexes – die Bedeutung der Zeta-Ketten bedingten Signaltransduktion (Irving et al., 1993).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Der erfolgversprechende Ansatz bispezifische Antikörper für die Behandlung von Tumorerkrankungen wurde in vielen Tiermodellen und einigen klinischen Studien evaluiert. Der Vorteil dieses speziellen Antikörperformats liegt in der artifizientlichen Kombination zweier verschiedener Antikörperspezifitäten, die auf diese Weise Effektorzellen des Immunsystems mit Tumorzellen vernetzen können, die Immunzellen aktiviert und letztlich zur Lyse des Tumors führt. Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften wird bispezifischen Antikörpern für die Zukunft eine wichtige Rolle in der Antikörper-basierten Tumorthherapie beigemessen (De Gast et al., 1997). Die Rekrutierung der Effektorzellpopulationen gelingt derzeit über aktivierende Oberflächenmoleküle wie die CD3-Epsilon-Kette auf T-Lymphozyten oder CD16 auf NK-Zellen. Ein auf beiden Zellpopulationen exprimiertes Transmembran-Protein, die Zeta-Kette, dient zur Signaltransduktion der Rezeptor-Liganden-Interaktionen ins Zellinnere. Die Zeta-Kette stellt damit ein potentiell Aktivierungsantigen für bispezifische Antikörper dar, mit dem es gelingen könnte, beide Effektorpopulationen gleichzeitig zu rekrutieren und so die Effektivität der Antikörper-vermittelten Tumorzelllyse zu erhöhen. Die besondere Schwierigkeit bei einem solchen Ansatz besteht darin als Bindungsmodul für ein bispezifisches Antikörperkonstrukt einen monoklonalen Antikörper zu identifizieren, der die extrem kurze Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette (9 Aminosäuren) auf intakten T- und NK-Zellen erkennt.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand in der Generierung und Charakterisierung eines solchen Zeta-reaktiven Antikörpers. Die Charakterisierung umfaßte neben den Untersuchungen zur Bindungsspezifität auch funktionelle Assays, die mögliche aktivierende Effekte der Antikörperbindung an die beiden Effektorzellpopulationen aufklären sollten. Des weiteren sollte untersucht werden, ob ein bispezifischer Antikörper, der die Anti-Zeta-Ketten-Spezifität enthält, die Rekrutierung beider Effektorzellpopulationen ermöglicht. Der Konstruktion eines solchen bispezifischen Antikörpers gingen die Isolierung der spezifitätsbestimmenden Domänen aus dem Antikörper-produzierenden Hybridom und die Umklonierung der Anti-Zeta-Spezifität in das Single-Chain-Format voraus. Eine zusätzliche Aufgabe bei der Generierung eines funktionellen bispezifischen Antikörpers bestand darin, ein modifiziertes Phage-Display-Verfahren zur Isolierung von Single-Chain-Fragmenten zu erproben, die ohne Verlust des Bindungspotentials eine C-terminale Positionierung im Rahmen eines bispezifischen Antikörpers tolerieren.

2 Material und Methoden

2.1 Enzyme, Chemikalien, Antikörper

Enzyme	EC	Bezugsquelle
Dnase 1, RNase-frei	3.1.21.1	Roche
Reverse Transcriptase	2.7.7.49	Gibco BRL
Taq DNA-Polymerase	2.7.7.7	Roche
Expand High Fidelity	2.7.7.7	Roche
Trypsin / EDTA	3.4.21.4	Gibco BRL
Restriktionsendonukleasen		
EcoRI, NheI, NotI, SacI, SalI, SpeI, XbaI, XhoI		Roche
Bsu36I, ClaI, NdeI		New England Biolabs
Kits		Bezugsquelle
Plasmid-Präparationskit (Midi, Mega)		Qiagen
Plasmid-Präparationskit (Mini)		Biorad
RNA-Präparationskit (Rneasy Mini Kit)		Qiagen
Agarosegel-Extraktionskit (QIAquick Gel Extraction Kit)		Qiagen
DNA-Reinigungs kit (QIAquick PCR Purification Kit)		Qiagen
CTL-Isolierungs kit (Human T Cell CD8 Subset Column Kit)		R&D Systems
NK-Zellen-Isolierungs kit (NK Cell Isolation Kit)		Miltenyi Biotec
Antikörper		Bezugsquelle
Kanninchen-Anti-Maus-Antikörper F(ab') ₂ -Fragment (IgG) FITC		Becton Dickinson
Maus-Anti-His-Tag- Antikörper		Dianova
Maus-Anti-human CD3-Antikörper FITC		Pharmingen
Maus-Anti-human CD3-Antikörper OKT3 (Isotype IgG2a)		Ortho mune-Reagents
Maus-Anti-human CD56-Antikörper PE		Becton Dickinson
Maus-Anti-human CD8-Antikörper Tricolor		Becton Dickinson
Maus-Anti-human CD8-Antikörper unkonjugiert		Caltac Lab
Ratte-Anti-human CD3-Antikörper (IgG2B; Klon 26-II 6-5)		Dr. Kremmer, GSF, München
Maus-Anti-Zeta-Ketten Antikörper 6B10		Santa Cruz Biotec
Ziege-Anti-Maus-Antikörper F(ab') ₂ -Fragment (IgG + IgM)		Pierce
Ziege-Anti-Ratte-Antikörper F(ab') ₂ -Fragment (IgG + IgM) FITC		Dianova/Jackson
Panorex (Maus-Anti-EpCAM-Antikörper)		Glaxo Welcome

Chemikalien

4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure (HEPES); Caesiumchlorid; Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris) lieferte **Biomol, Hamburg**.

Folgende Chemikalien wurden durch die Firma **Merck, Darmstadt** bezogen:

Ammoniumchlorid, Ammoniumperoxodisulfat (APS), Borsäure, Dichlordimethylsilan (Merck-Schuchardt), Dimethylsulfoxid (DMSO), Dinatriumhydrogenphosphat, EDTA Triplex III, Ethanol (absolut, 99 %), Isopronanol, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydrogencarbonat, Kaliumhydroxid, Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Natriumacetat (wasserfrei), Natriumchlorid, Natriumcitrat-Dihydrat, Natriumnitrit

Folgende Chemikalien wurden durch die Firma **Sigma, Deisenhofen** bezogen:

β -Mercaptoethanol, Chloroform, Dimethylformamid, Ethidiumbromid, Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Levamisol, Mineralöl, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), N,N'-Methylenbisacrylamid, N-Laurylsarcosin, Naphtol-AS-BI-Phosphat, Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 : 24 : 1), Tris ultrarein 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenz-Thiazolin)-6-Sulfonsäure (ABTS); Albumin aus Rinderserum (BSA); Diethylpyrocarbonat (DEPC); Glycerin, 87 %; N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin (TEMED); Natriumnitroprussid; o-Dianisidin; Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20), Tetracyclin

L-Glutamin, Penicilin - Streptomycin (2%), RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin), Agarose ultra pure (Electrophoresis grade) und eine Ein-kb-Leiter mit DNA-Fragmenten in einem Größenbereich von 75 - 100 bp wurden von der Firma **Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein** geliefert.

Folgende Chemikalien wurden durch die Firma **Serva, Heidelberg** bezogen:

Acrylamid (2 x), Natriumdodecylsulfat, Neufuchsin, Trypanblau

Folgende Agenzien wurden durch die Firma **Roche, Mannheim** bezogen:

Hexamer Nucleotide Mix, Bovines-Serum-Albumin (BSA), Glykogen (20 mg/ml), Insulin, Transferrin

Ein dNTP - Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und Ficoll-Paque (1,077 g/ mol) wurde durch die Firma **Pharmacia, Uppsala, Schweden** bezogen.

Methanol, Seakem LE und GTG Agarose sowie das Acrylamid-/Bisacrylamidgemisch 37,5:1 lieferte **Biozym, Hess. Oldendorf**

Die Firma **Fluka, Buchs** lieferte Ammoniumperoxodisulfat, Calciumchlorid Dihydrat, Chloroform, Di-Kaliumhydrogenphosphat, Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Essigsäure, Ethanol, absolut, Isoamylalkohol, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Milchpulver für die Mikrobiologie, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumlaurylsulfat (SDS), Polyethylenglycol 8000, Salzsäure, 37 %, Wasser (p.A.), Wasserstoffperoxid, 30 %; 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS); Ammoniumacetat; Borsäure; Bromphenolblau; D-(+)-Glucose-Monohydrat; Di-Natriumethylendiamintetraacetat-Dihydrat (EDTA); Ethidiumbromid; Glycin; Guanidine Thiocyanat (GT); Isopropanol; Kaliumdihydrogenphosphat; Magnesiumchlorid Hexahydrat; Magnesiumsulfat-Heptahydrat; Natriumazid; Natriumcitrat Dihydrat; Xylencyanol; Zitronensäure Monohydrat

Die Firma **Roth, Karlsruhe** lieferte Carbenicillin; Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG); Natriumhydrogencarbonat; Phenol, Tris-gesättigt ;Saures Phenol (Aqua-Rothi-Phenol).

2.2 Puffer und Medien

<u>PBS</u> (Phosphate buffered Saline)	NaCl	150	mM	
	Na ₂ HPO ₄	10	mM	
	KH ₂ PO ₄	2	mM	
	mit 5 N NaOH auf pH 7,4 einstellen			
<u>PBST</u>	PBS plus 0,05 % Tween 20			
<u>10 x TBE:</u>	Tris base	0,89	M	
	Borsäure	0,89	M	
	EDTA	0,02	M	
<u>10 x TBS:</u>	Tris pH 7,4	0,25	M	
	NaCl	0,5	M	
	KCl	25	mM	
<u>TBST</u>	TBS plus 0,05 % Tween 20			
<u>Erythrozytenlysepuffer</u>	NH ₄ Cl	0,15	M	
	KHCO ₃	5,0	mM	
	EDTA	0,1	mM	
	mit 5 N KOH auf pH 7,4 einstellen			
<u>Zehnfach PCR-Puffer</u>	Tris-HCl pH 8,3	100	mM	
	KCl	500	mM	
	MgCl ₂	10	mM	
<u>TfB I (Sterilfiltriert)</u>	KAc	30	mM	
	MnCl ₂	50	mM	
	KCl	100	mM	
	CaCl ₂	10	mM	
	Glycerol	15	% (w/v)	
<u>TfB II (Sterilfiltriert)</u>	Na-MOPS	10	mM	pH 7,0
	CaCl ₂	50	mM	
	KCl	10	mM	
	Glycerol	15	% (w/v)	

2.2.1 Medien für die prokaryontische Zellkultur

<u>LB-Medium</u>	Bacto-Trypton	1,0	% (w/v)
	Bacto-Hefeextrakt	0,5	% (w/v)
	NaCl	0,5	% (w/v)
<u>SB-Medium</u>	Bacto-Trypton	3,0	% (w/v)
	Bacto-Hefeextrakt	2,0	% (w/v)
	MOPS	1,0	% (w/v)

<u>TYM Broth</u>	Bacto-Trypton	2,0	% (w/v)
	Bacto-Hefeextrakt	0,5	% (w/v)
	NaCl	0,1	M
	MgCl ₂ *	10	mM
	Glucose *	20	mM

SOC-Medium:

Bacto-Trypton	2,0	% (w/v)
Bacto-Hefeextrakt	0,5	% (w/v)
NaCl	10	mM
KCl	25	mM
MgCl ₂ *	10	mM
MgSO ₄ *	10	mM
Glucose *	20	mM

* Die autoklavierten MgCl₂-, MgSO₄- und die sterilfiltrierten Glucoselösungen erst kurz vor Gebrauch zugeben.

Zur Kultivierung von Bakterien auf Platten wird zu den oben aufgeführten Flüssigmedien 1,5 % Agar (Difco) zugegeben und kurz aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 50°C können ggf. Antibiotika zugegeben werden.

Stammlösungen der Antibiotika:

	Stamm- konzentration	Endkonzentration in Flüssigmedium	Endkonzentration in Agarplatten
Ampicilin	50 mg / ml	50 µg / ml	50 µg / ml
Kanamycin	10 mg / ml	70 µg / ml	--
Carbenicillin	100 mg / ml	20 µg / ml	100 µg / ml
Tetracyclin	5 mg / ml	10 µg / ml	--

2.2.2 Medien für die eukaryontische Zellkultur

RPMI 1640 und α MEM wurden von Pan Systems, Aidenbach bezogen und mit folgenden Supplementen versetzt: Penicillin/Streptomycinlösung (je 10000 U/ml); L-Glutaminlösung (200 mM); dialysiertes und undialysiertes fötales Rinderserum (FCS). Bei dem FCS wurden enthaltene Komplementfaktoren vor dem ersten Einsatz durch Erhitzen auf 56°C für 20 Minuten inaktiviert.

RPMI-Medium(+++):

RPMI 1640 mit:
10 % FCS
2 mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin
100 U/ml Streptomycin

 α MEM-Medium (+++):

α MEM mit:
10 % dFCS
2 mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin
100 U/ml Streptomycin
0,5 % 200 x Nukleoside

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Isolation von peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut

Die im folgenden beschriebenen Aufarbeitungsschritte werden durchgeführt, damit die im peripheren Blut enthaltenen mononukleären Lymphozyten von Erythrozyten und Granulozyten getrennt werden und somit für eine Reihe von Folgeexperimenten genutzt werden können. In der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation werden mononukleäre Blutzellen in der entstehenden Interphase angereichert, während Erythrozyten und Granulozyten pelletieren. Die zellhaltige Interphase wird abgezogen und die gewonnenen Zellen werden mittels Vitalfärbung auf die Anzahl der lebenden Zellen hin untersucht. Wahlweise kann die Aufarbeitung mit unverdünntem Vollblut oder mit einem mit Natriumchlorid verdünnten Leukozytenkonzentrat (buffy coat) durchgeführt werden.

Die Durchführung der einzelnen Versuchsschritte wird im folgenden detailliert beschrieben:

- 15 ml Ficoll in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vorlegen und mit 15 – 30 ml Vollblut bzw. verdünntem Leukozytenkonzentrat langsam überschichten
- 30 Minuten bei 1500 rpm (\cong 800 g) zentrifugieren (Hettich Rotixa/RP)
- Interphase abnehmen und mit PBS (pH 7,4) auf 50 ml auffüllen
- Für 10 Minuten mit 1200 rpm (\cong 600 g) zentrifugieren
- Überstand abdekantieren, Sediment resuspendieren und bei bestehender Verunreinigung mit Erythrozyten 2 – 10 ml Erythrozytenlysepuffer zugeben (ca. 3 Minuten)
- Erneut waschen, Überstand dekantieren
- Sediment resuspendieren und auf ca. 2 ml mit PBS auffüllen
- Lebend-Zellzahl in Neubauer Zählkammer ermitteln :
Dazu 10 μ l Testansatz in einem Well einer ELISA Platte mit 10 μ l Trypanblau mischen, anschließend in die Zählkammer einfüllen und die nicht angefärbten Zellen auszählen
Gesamtzahl = Zellzahl in Kammer \times Volumen (in ml) im Tube $\times 2 \times 10^4$
- Lagerung der gewonnenen PBMCs je nach Folgeversuch bei Raumtemperatur oder auf Eis. Die Zahl der isolierten PBMCs lag pro 450 ml Vollblut bei ca. 400 – 500 Millionen Zellen.

2.3.2 Isolation von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten aus PBMCs

Zur Isolation von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten aus einer Population von mononukleären Zellen des peripheren Bluts kommt die indirekte negative Selektion zum Einsatz. Dazu wird die Leukozyten-Suspension mit einer Mixtur monoklonaler Antikörper inkubiert und anschließend auf eine Depletionssäule aufgetragen. B-Lymphozyten und CD4⁺ Lymphozyten werden dabei über Anti-Immunglobulin-gekoppelte Glaskügelchen gebunden. Monozyten hingegen binden über ihre Fc-Rezeptoren an Immunglobulin-gekoppelte Glaskügelchen. Das resultierende Eluat enthält eine hoch angereicherte T-Zell-Subpopulation, die weitestgehend frei von B-, CD4⁺ T- Zellen und Monozyten ist.

Mit dieser Methode können aus bis zu 2×10^8 markierten Zellen die gewünschten CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten isoliert werden. Zur Durchführung dieses Versuches wird das "Human T-cell CD8 Subset Column Kit" von R&D Systems (Cat-No: HCD8C-1000). Das Verhältnis von eingesetzten CD8-Zellen

zu isolierten CD8-Zellen liegt bei etwa 3:1. Auf diesem Wege isolierte Zellen sind auf Grund der antikörperbasierten Depletion von ungewünschten Zellen frei von jeglicher Antikörperbindung und werden als unberührt und nicht-aktiviert eingestuft.

2.3.3 Isolation von CD56⁺ NK-Zellen aus PBMCs

Die Isolation von NK-Zellen wird ebenfalls auf indirekte Weise durchgeführt. Im Gegensatz zur Isolation der zytotoxischen T-Lymphozyten erfolgt die Depletion allerdings auf magnetischem Wege, so daß von Antikörpern "unberührte" NK-Zellen erhalten werden. Zur Depletion werden die PBMCs mit einem Cocktail von Hapten-konjugierten Antikörpern (CD3, CD14, CD19, CD36 und anti-IgE) inkubiert, gewaschen und in einem zweiten Schritt mit Anti-Hapten-konjugierten Magnetpartikeln markiert. Die so magnetisch markierten "Nicht-NK-Zellen" werden anschließend mit einem starken Magnetfeld in einer Säule zurückgehalten; die NK-Zellen hingegen können eluiert werden.

Die Durchführung dieser Isolation basiert auf den Angaben des Kit-Herstellers MiltenyiBiotec: NK Cell Isolation Kit (Order No. 465-02) und kann wahlweise im MidiMACS oder im VarioMACS-Format eingesetzt werden.

2.3.4 Subkultivierung und Kryokonservierung von Kulturzellen

Adhärente Zellen werden beim Erreichen der Konfluenz vom Flaschenboden ab-gelöst. Die erhaltenen Zellen können direkt weiterverarbeitet werden bzw. für Folgeexperimente verwendet, zur weiteren Expansion in eine zweite Flasche passagiert (Subkultivierung) oder zur Lagerung bei -196°C eingefroren werden.

Bei einem enzymatischen Verfahren dient eine Protease zur Ablösung der Zellen, die die Adhäsionsproteine zu durchschneiden vermag. Die geringe Gefahr einer Schädigung anderer membranständiger Proteine bei zu langer Verdauung kann bei exakter Handhabung ausgeschlossen werden. Konkret erfolgt die Ablösung der Zellen mit Trypsin (EC 3.4.21.4), einer Peptidase, die aus dem Pankreas gewonnen wird. Die Spaltung der Peptidbindungen erfolgt spezifisch auf der Carboxylseite von Lysin- und Argininresten. Das EDTA komplexiert im Restmedium enthaltene Mg²⁺- und Ca²⁺-Ionen, welche die Wirkung von Trypsin stark beeinträchtigen würden. Nach ausreichend langer Inkubation mit dem Enzym werden die Zellen vom Flaschenboden heruntergeklopft und der Verdau durch Zugabe von PBS und FCS gestoppt. Nach einem Waschschrift erfolgen die Aufkonzentration mittels Zentrifugation und das Auszählen der Lebendzellzahl.

Im weiteren werden die einzelnen Versuchsschritte erklärt, die zur Passagierung der Kulturzellen notwendig sind:

- Zellkulturmedium verwerfen, Abwaschen der nicht adhärenen Zellen mit 3 ml PBS
- Trypsinisieren mit 5 – 10 ml Trypsin / EDTA-Lösung, Inkubation für 5 Minuten im Brutschrank bei 37°C.
- Zellen vom Flaschenboden abklopfen, Zugabe von 10 ml des jeweiligen konditionierten Mediums zum Beenden des Verdaus
- Überführen der Zellsuspension in ein steriles 50 ml Röhrchen

- 10 ml zum Spülen der Kulturflasche zugeben und anschließend ins 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen
- Zentrifugation der Zellen bei 1200 rpm (\cong 600 g) für 8 Minuten bei RT (Hettich Rotixa/RP)
- Überstand dekantieren, Pellet in verbliebener Flüssigkeit resuspendieren, Zugabe von 1,5 ml PBS
- Ermittlung des Gesamtvolumens und Auszählung der Lebend-Zellzahl
- Zwischen 200.000 und 400.000 Zellen werden zur weiteren Kultivierung in die Kulturflasche zurückgegeben, um ein schnelles Nachwachsen sicherzustellen

Für die Langzeitlagerung von Zellen bei -196°C (Flüssigphase von Flüssigstickstoff) oder bei -150°C bis -160°C (Gasphase vom flüssigem Stickstoff), die zur Sicherung der Linie erfolgen soll, sind einige Zusatzschritte notwendig, wie der Zusatz eines Gefrierschutzmittels zum Schutz der Zellen vor Eiskristallen. In dieser Arbeit kommt Dimethylsulfoxid (DMSO) zum Einsatz, daß nach Auftauen der Zellen auf Grund seiner Zelltoxizität umgehend durch Waschen entfernt werden muß. Die zusätzlichen Schritte umfassen:

- CHO-Zellen oder Tumorzelllinien in einem adäquaten Volumen aufnehmen, sodaß etwa eine Konzentration von ca. 2×10^6 Zellen / ml Einfriermedium (Kulturmedium mit 50 % FCS und 10 % DMSO) erhalten wird
- Lagerung der Tubes für bis zu 5 Tagen bei -80°C in Styroporschachteln, die zum verzögerten Durchfrieren führen. Überführen der Tubes nach spätestens 5 Tagen in Flüssigstickstoffbehälter
- Rekultivierung der Zellen erfolgt im 37°C Wasserbad und sofort nach Verflüssigung werden die Zellen in 20 ml Medium gewaschen. Kultivierung der Zellen in einem der Amplifikationsstufe entsprechendem Medium.

2.3.5 Herstellung monoklonaler Antikörper

Hochspezifische Antikörper gegen ein gewünschtes Antigen können mit dem heutigen Wissen routinemäßig durch die Fusion immunisierter B-Zellen mit immortalen Myelomzellen zu einem Hybridom gewonnen werden. Da B-Lymphozyten in Kultur natürlicherweise eine begrenzte Lebensdauer haben, werden Antikörper sezernierende B-Zellen aus der Milz einer immunisierten Maus mit Zellen aus immortalen B-Lymphozyten-Tumoren fusioniert, die keine Antikörperproduktion aufweisen. Aus der entstandenen heterogenen Mischung von Hybridzellen werden diejenigen Hybridome selektioniert, die die beiden gewünschten Eigenschaften– Immortalität und Sekretion der gewünschten Antikörperspezifität – in sich vereinigen (Köhler et al,1976).

Auf die Hybridomtechnik wird an dieser Stelle nur insoweit eingegangen, es im Rahmen dieser Arbeit angemessen erscheint. Vollständige und detaillierte Arbeitsanweisungen sind z.B. dem Werk "Current protocols in immunology", Grene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, 1992 zu entnehmen. Die Ergebnisse dieses Abschnitts entstanden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Elisabeth Kremmer, GSF, München.

- Immunisierung von 10 Wochen alten F1-Mäusen einer balb/c x C57 black Kreuzung mit einem Zeta-Peptid-KLH-Konjugat (Jerini Bio Tools, Berlin). Das Peptid mit der Aminosäuresequenz QSFGLDPKLC (N-terminale Sequenz der Extracellulärdomäne der Zeta-Kette) wurde direkt an das mit Maleinimid aktivierte KLH (Keyhole limpet haematocyanin = Hämatozyanin der Schlüsselbohrschnecke als Trägerpeptid) mit der Mercaptogruppe des C-terminalen Cysteins gekoppelt. Lösung des Konjugates in 0,9% Natriumchlorid bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$. Emulgation der Lösung direkt vor der intraperitonealen Injektion 1:2 mit komplettem Freundschens Adjuvans (50 μl)

- Booster-Injektionen nach 4 und 8 Wochen mit inkomplettem Freundschens Adjuvans.
- Euthanasierung der Maus 3 Tagen nach der zweiten Boosterung, Fusion der Milz-Zellen mit P3X63Ag8.653 Zellen (ATCC CRL-1580) nach bekannten Protokollen
- Aussaat von 100.000 Zellen pro Well in Mikrotiterplatten in 200µl RPMI 1640, supplementiert mit 10% FCS, 300 U./ml rhuIL6 und HAT-Additiven zur Selektion
- Austestung der Überstände mit geeignetem ELISA für die Bindung an das Zeta-Ketten-BSA-Konjugat.

In einem zweiten Ansatz wird von dem oben beschriebenen Schema in einem Punkt abgewichen: Anstelle der gekreuzten Mäuse kommen Spargue-Dawley-Ratten zur Verwendung, die zuvor mit einer intraperitonealen Injektion von 10^7 Zellen der humanen T-Zelllinie Jurkat (ATCC TIB-152) präimmunisiert wurden.

2.3.6 Durchflußzytometrischer Bindungsnachweis von Antikörpern

Zum Nachweis der Bindung eines Antikörpers an Oberflächenantigene auf Zellsuspensionen eignet sich besonders die Durchfluß-Zytometrie. Diese Technik erlaubt die Charakterisierung der Zellen durch mehrere auf der Oberfläche gebundene, fluoreszenzmarkierte Antikörper auf Einzelzellenebene. Der Nachweis erfolgt durch Anregung der Fluorescine mittels Laserstrahl und Detektion der dadurch angeregten Streustrahlung in verschiedenen Wellenlängen. Die Analyse der Ergebnisse erfolgt computerunterstützt. Je nach Applikation und Versuchansatz kommen Ein- bis Dreifachfluoreszenzanalysen zum Einsatz.

Der Versuchsablauf ist im wesentlichen folgender:

- Isolation von PBMCs aus Frischblut oder Buffy Coat gemäß Abschnitt 2.3.2
- Inkubation von 10^6 PBMC für 30 Minuten auf Eis mit adäquat verdünntem Antikörper (10 µg/ml gereinigter monoklonaler Antikörper) oder Zellkulturüberstand verschiedener Klone (Endvolumen 20 – 40 µl) in Mikrotiterplatten
- Zweimaliges Waschen der Zellen mit kaltem PBS
- Detektion der Primärantikörper mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifisch gegen die Spezies des Erstantikörpers. Inkubation der Zellen für 30 Minuten auf Eis im abgedunkelten Zustand
- Zweimaliges Waschen der Zellen mit kaltem PBS
- Ggf. Inkubation mit 1:10 verdünntem Mausserum, um freie Valenzen des Sekundär-Antikörpers abzusättigen
- Zweimaliges Waschen der Zellen mit kaltem PBS; Fixierung der Zellen in 200 µl PBS/1% PFA
- Ggf. Inkubation mit einem zweiten Sekundärantikörper mit einer zweiten bzw. dritten Fluoreszenz
- Analyse der Zellfärbung mittels Durchflußzytometrie am FACScan (Becton Dickinson) Auswertesoftware: Cellquest Version: 3.1f

Die Auswertung erfolgt nach Prinzipien, die in "Current protocols in immunology ", Grene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, 1992 beschrieben sind.

2.3.7 Proliferationstest von T- und NK-Zellen nach Antikörper-Stimulation

Als Folge eines antikörpervermittelten Stimulus von Aktivierungsmolekülen auf Immunzellen kann Zellproliferation beobachtet werden. Dieses Zellwachstum wird durch einen colorimetrischen Immunoassay quantifiziert, der auf der Messung von Thymidin-Analog Bromodeoxyuridin (BrdU)-Inkorporation während der DNA-Synthese basiert. Da Zellproliferation die Replikation von zellulärer DNA mit sich bringt, ist die Beobachtung der DNA-Synthese eine mögliche Methode zur Quantifizierung der Proliferation. Die klassische Methode, die sich den [³H]-Thymidin Einbau in neu synthetisierte DNA zunutze macht, wird hier durch einen nicht-radioaktiven Ansatz ersetzt, indem das Thymidin-Analogon BrdU an Stelle von [³H]-Thymidin verwendet wird. Nach einer initialen Proliferationsphase des Ansatzes wird durch BrdU-Zugabe die Inkorporation in die DNA ermöglicht; nach Fixierung der Zellen 2 – 24 Stunden später erfolgt dann die Detektion des BrdUs mittels Substratumsetzung durch einen Peroxidase-konjugierten Anti-BrdU-Antikörper mit einem ELISA-Reader. Ein wichtiger Bestandteil eines Proliferationstests ist es, neben dem zu testenden Antikörper auch geeignete Isotypkontrollen während des kompletten Tests mitzuführen, um die Spezifität der Antikörper-vermittelten Proliferation zu überprüfen.

Die verwendeten Reagenzien für die Durchführung des Proliferationsassays und die detaillierte Versuchsbeschreibung sind dem Kit-Manual von Boehringer Mannheim zu entnehmen (Ca. No. 1647229). Der Versuchsteil, der die Stimulation der separierten Zellpopulationen durch die unterschiedlichen Antikörper erläutert, wird wie folgt durchgeführt:

- Immobilisation der folgenden Antikörper an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte durch Inkubation mehrerer Antikörperverdünnungen o/n bei 4°C:
 Anti-Zeta-Ketten Antikörper (Ratte IgM) 2-B-5, 1,25 - 10 µg/ml
 Isotyp-Kontrolle (Ratte IgM) mit irrelevanter Spezifität, 1,25 - 10 µg/ml
 Anti-CD3-Antikörper (OKT3 Isotype IgG2a), 1 µg/ml
 Isotyp-Kontrolle (IgG2a) mit irrelevanter Spezifität, 1 µg/ml
- Dreimaliges Waschen zur Entfernung des ungebundenen Antikörpers
- Aussaat von jeweils 100.000 CD8⁺ T-Lymphozyten, NK-Zellen und unseparierten PBMC in Triplikaten. Zusätzlich werden eine Leer-Kontrolle (Wells ohne Zellen) und eine Hintergrund-Kontrolle (Wells ohne BrdU-Zugabe) mitgeführt. Inkubation der Multititerplatten für 3 Tage bei 37°C und 6% CO₂
- Zugabe von BrdU-Lösung zu jedem Ansatz für 24 h.
- Entfernung des Mediums, Trocknung der Zellen
- Durchführung der Detektion des inkorporierten BrdUs nach Manual des Kit-Herstellers
- Messung des Farbumschlags bei 450 nm mit dem ELISA-Reader EAR 400AT (SLT Labinstruments Austria).

2.3.8 Analyse der Antikörper im SDS-Polyacrylamidgel

Die analytische Gelelektrophorese von Proteinen ist ein Standardinstrument zur Bestimmung der Proteinreinheit und -größe. Hierzu wird ein Polyacrylamidgel geeigneter Dichte unter Verwendung des amphiphilen Detergens Natrium-Dodecylsulfat (SDS) eingesetzt. Das zuvor mit β-Mercaptoethanol reduzierte und durch Hitze und SDS denaturierte Protein bindet SDS und erhält dadurch eine negative Ladung, so daß die sequenzabhängige Proteineigenladung im Verhältnis zur Gesamtladung vernachlässigbar ist. Da die SDS-Menge, die das Protein bindet, damit nahezu proportional zur Pro-

teingröße ist und folglich ein konstantes Verhältnis zwischen Ladung und Proteingröße besteht, kann die Überprüfung des Molekulargewichts anhand geeigneter Größenstandards durchgeführt werden. Im elektrischen Feld hängt somit die Migrationsgeschwindigkeit der Proteine im wesentlichen von deren Größe ab. Die Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems und eines Sammel- und Trenngels erhöht die Auflösungseigenschaften der vertikalen Gelelektrophorese nach Laemmli et al, 1970 .

– Gelrezeptur:

	Trenngel (10 % v/v)	Trenngel (12,5 % v/v)	Sammelgel
30% w/v Acrylamid-Fertiglsg. (mit 0,8 % w/v Bisacrylamid)	3,3 ml	4,3 ml	0,67 ml
Tris (1,5 M; pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	--
Tris (0,5 M; pH 6,8)	--	--	1,25 ml
SDS (10% w/v)	0,1 ml	0,1 ml	0,05 ml
H ₂ O	4,0 ml	3,0 ml	3,0 ml
APS (10% w/v) Ammoniumperoxidisulfat	0,1 ml	0,1 ml	0,05 ml
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethyl-Ethylendiamin)	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml

- Einsetzen des polymerisierten Gels in die Gelelektrophoreseapparatur mit anschließendem Einfüllen des Laufpuffers (Tris/Glycin/SDS-Puffer (0,3 % w/v Tris base, 1,44 % w/v Glycin, 0,1 % w/v SDS)
- Ziehen des Kammes und Erhitzen der vorbereiteten Proben (ca. 1 - 10 µg in max. 15 µl/Tasche) und des Größenstandards (Rainbowmarker, high molecular weight range 14,3 – 220 kDa, Amersham-Pharmacia) für 3 Minuten auf 95°C.
- Vermischen der Proben mit einem 5 x Probenpuffer (0,125 M Tris pH 6,8; 4 % SDS; 20 % Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau) ggf. mit 5 x reduzierendem Probenpuffer (wie oben, jedoch mit zusätzlich 10 % β-Mercaptoethanol),
- Durchführen der Gelelektrophorese bei 120 V und 20 mA für 1 bis 3 h
- Nach beendetem Lauf das Gel der Apparatur entnehmen und in 50 ml Proteinfärbelösung (Roti blue, BioRad) über Nacht färben.
- Mehrfaches Waschen des Gels in 25 % v/v wäßrigem Methanol
- Analyse des resultierenden blauen Bandenmusters anhand des Größenstandards
- Einscannen des Gels zur Dokumentation.

Alternativ zu dieser Färbung können die nach Größe aufgetrennten Proteine durch einen Western Blot mit Sekundärantikörpern weitergehend untersucht werden.

2.3.9 Antigen-Nachweis durch Immunoblotting

Western- oder auch Immunoblotting ist eine schnelle und sensitive Methode zur Detektion und Charakterisierung von Proteinen. Diese Arbeit beschränkt sich darauf, mit Hilfe dieser Methode die Spezifität des Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers 2-B-5 zu überprüfen. Zu diesem Zweck wird ein mit

Sepharose konjugierter 2-B-5 Antikörper mit verschiedenen Zellysaten inkubiert, die sowohl aus der humanen T-Zelllinie Jurkat (ATCC TIB-152) als auch auf isolierten NK-Zellen gewonnen wurden. Nach Entfernung der ungebundenen Bestandteile des komplexen Zellysats, wird die gebundene Fraktion durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (12,5% (v/v) Acrylamidgel) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Der Übertragung auf eine hydrophobe PVDF-Membran folgt eine Inkubation mit einem Antikörper, der spezifisch den intrazellulären Anteil der Zeta-Kette erkennt. Im folgenden wird dieser durch einen mit Peroxidase-konjugierten Anti-Fc-gamma-spezifischen Antikörper in Verbindung mit einer Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen. Die Chemilumineszenz-Detektion basiert auf der Oxidation von Luminol in Gegenwart von Peroxid, welches durch die Peroxidase katalysiert wird. Die Oxidation von Luminol emittiert Licht, das durch die Exposition des Blots auf einem Röntgenfilm detektiert wird. Auf diesem Wege werden gleichzeitig Informationen über die Spezifität des präzipitierenden Antikörpers wie auch über die Größe des Proteins, das vom Antikörper erkannt wird, gewonnen.

Im folgenden werden die Arbeitsschritte zur Durchführung dieses Experiments beschrieben:

- Generierung der Zellysate aus je $1,0 \times 10^7$ Zellen der humanen T-Zelllinie Jurkat (ATCC TIB-152) und isolierten NK Zellen durch Inkubation für 30 Minuten bei 4°C in 1% Digoxigenin; 20 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 50 mM NaF; 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 1 mM NaVO_4 in Gegenwart von Protease-Inhibitoren (Kit Cat No 1206893, Roche, Mannheim)
- Inkubation von 40 μl des Zellysats mit 40 μl des Sepharose-konjugierten 2-B-5 Antikörpers für 30 Minuten unter fortwährender Rotation
- 2 x waschen mit 800 μl PBS bei 5000 g
- Proben in einem Volumen von 15 μl resuspendieren, Zugabe von 4 μl reduzierendem Gelauftragepuffer. Durchführung der Polyacrylamidgelelektrophorese wie in Abschnitt 2.3.8 beschrieben
- Nach Beendigung der Gelelektrophorese Übertragen des Gels auf eine Polyvinyliden-Fluorid (PVDF)-Membran. PVDF-Membran kurz in absolutem Methanol aktivieren und mit Gel zwischen zwei mit Blotting-Puffer (1,5 g Tris, 7 g Glycin und 250 ml Methanol pro Liter) benetzte Whatman-MM-Papiere (Schleicher und Schuell) platzieren und in die mit Puffer gefüllte Blotting-Apparatur einspannen
- Blotting im elektrischen Feld von 400 mA für 1,5 h unter Kühlung
- Markieren der Gelposition relativ zur PVDF-Membran zur späteren Orientierung
- Blockade der unbesetzten Membranregionen mit 2 % Milchpulver in PBS für 30 Minuten bei RT
- Inkubation der Membranstücke mit jeweils einem der zu untersuchenden Antikörper (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS/1 % Milchpulver) unter Schütteln bei RT für 30 Minuten
- Waschen mit PBST (3 x) für insgesamt 20 Minuten
- Inkubation der Membranen für 45 Minuten mit einem Peroxidase-markierten Immungloboulin spezifisch gegen die Fc-Teil des ersten Nachweisantikörpers (verdünnt in PBS/1 % Milchpulver)
- Viermaliges Waschen mit PBS
- Inkubation mit dem Substrat zur Chemilumineszenz-Detektion laut Herstellerangaben (Amersham Life Science RPN 2106) für 1 Minuten
- Detektion der Chemolumineszenz mit Hilfe eines Röntgenfilms (Kodak Biomax ML Cat. No 8194540) mit anschließender Entwicklung im Automaten (Entwicklungsmaschine Compact 35, Protec)
- Relokalisation des Röntgenfilms auf die PVDF Membran, um mit Markerbanden einen Größenvergleich durchzuführen. Der Röntgenfilm kann zu Dokumentationszwecken eingescannt werden.

2.3.10 Expression von rekombinaten Antikörpern im eukaryontischen System

Von Kaufman et al. wurde 1990 ein eukaryontisches Expressionssystem beschrieben, in welchem eukaryontische Expressionsvektoren mit dem Selektionsmarker Dihydrofolatreduktase (DHFR) in CHO-Zellen (Chinese Hamsters Ovary cells) stabil transfiziert werden können. Zusätzlich kann das Expressionsniveau durch Amplifikation wesentlich gesteigert werden. Die Grundlage dieses Verfahrens ist ein Vektor, bei dem, von einem Promotor gesteuert, ein mRNA-Transkript abgelesen wird, welches für das „Protein von Interesse“, gefolgt von einem Selektionsmarker, kodiert. Diese bei Bakterien und einigen Viren übliche bicistronische Expressionsweise ist natürlicherweise bei eukaryontischen Zellen nicht zu finden. Die bicistronische Expression mit dem Vektor im eukaryontischen System wird die Einführung einer Virus-Sequenz für eine ribosomale Reinitiiierung möglich, die zwischen die DNA-Sequenzen der beiden Proteine eingefügt wurde. So überleben in einem geeigneten Selektionsmedium nur Zellen, die nach der Transfektion den Vektor inklusive Selektionsmarker enthalten. Der Expressionsvektor wird im Verlauf von Replikation und Zellteilung zufällig in das Genom der Zelle integriert und so bei Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Wird nun während der Amplifikationsschritte ein erhöhter Selektionsdruck auf hohe Produktion des Selektionsmarkers hin angelegt, findet in manchen Zellen eine Amplifikation des Selektionsmarkers – und gleichzeitig des Gens für das „Protein des Interesses“ – im Genom der Zelle und damit auch eine Amplifikation des zu produzierenden Protein durch die bicistronische Produktionseinheit statt (Schimke et al. 1984).

Der eukaryontische Expressionsvektor pEF-DHFR (Mack et al. 1995) ist ein Derivat des Expressionsvektors pMT2PC (Kaufman 1990, Wood et al. 1990). Der 5,8 kb große pEF-DHFR verfügt über eine bicistronische Transkriptionseinheit, bestehend aus dem Promotor für den Elongationsfaktor 1 α (EF), gefolgt von einem Polylinker für die Aufnahme des zu exprimierenden Gens (Restriktionsenzymstellen PstI, EcoRI, SmaI, XbaI, SalI), einer ribosomalen Reinitiiierungsstelle POL (Kaufman 1990, Pelletier & Sonneberg 1988), dem murinen Dihydrofolatreduktase-Gen (DHFR) als Selektions- und Amplifikationsmarker und schließlich der Polyadenylierungsstelle der frühen SV40 mRNA (SV40 poly(A)). (Abb. 7)

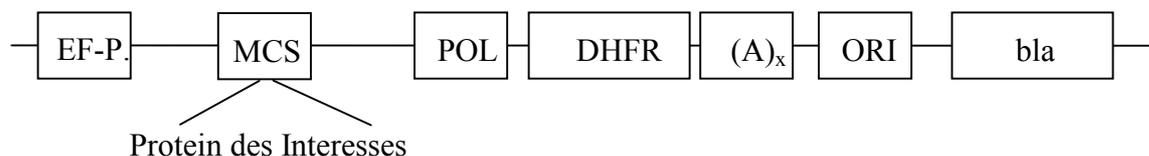


Abb. 7: Der eukaryontische Expressionsvektor pEF-DHFR. Unter der Kontrolle des EF-Promotors befindet sich eine Klonierungsstelle, gefolgt von einer ribosomalen Reinitiiierungsstelle POL, dem DHFR-Genabschnitt und einer Polyadenylierungsstelle (A)_x. Zusätzlich kodierende Abschnitte bilden den Ursprung der bakteriellen Replikation (ORI) und kodieren für die Penicillinderivat-Resistenz (bla).

Für die Amplifikation des Plasmids in Bakterien zu Klonierungszwecken trägt der Vektor pEF-DHFR den bakteriellen Replikationsursprung (ORI) und das bla-Gen, welches für die Resistenz gegen Penicillinderivate wie Ampicillin und Carbenicillin kodiert.

Das Prinzip der stabilen Transfektion von CHO-Zellen:

Der Selektionsmarker Dihydrofolatreduktase

Für die Transfektion werden DHFR-defiziente CHO K1-Zellen verwendet (ATCC CCL-61). Bei diesen Zellen ist sowohl die Purinbiosynthese als auch die Synthese von Glycin aus Serin und von dTTP aus dUTP blockiert. Glycin, Thymidin und eine Purinquelle (Adenosin und Deoxyadenosin) mußten diesen Zellen vor einer Transfektion folglich als Supplemente im Rahmen eines entsprechenden Vollmediums angeboten werden. CHO-Zellen, die nach chemischer Mutagenese in der DHFR-Expression defizient sind (Urlaub et al., 1980) sind daher so lange unfähig, in nukleosidfreiem Medium zu wachsen, bis eine Komplementation mit einem funktionellen DHFR-Gen durch Plasmid-Transfektion erfolgt. Zur Transfektion wird hier die Elektroporation eingesetzt, ein kurzer Hochspannungspuls, dem die Zellen in einer Küvette ausgesetzt werden und der zu einer kurzzeitigen Formation von Poren im Nanometer-Durchmesser in der Zellmembran führt. Die linearisierte Plasmid-DNA wird direkt in das Cytoplasma aufgenommen und dann zufallsgesteuert an einer oder mehreren Stellen in das Genom integriert (Lurquin, 1997 und Weaver, 1995). Nach dem Entzug des Vollmediums und einem Ersatz durch ein nukleosidfreies Selektionsmedium können nur Zellen überleben und proliferieren, die entweder transient Teile des transfizierten Plasmids in Form von selbständig replikationsfähigen extrachromosomalen Einheiten, sogenannten Double Minutes, enthalten oder stabil das bicistronische Konstrukt im Chromosom integrieren konnten (Schimke et al., 1984; Hussain et al., 1992). Eine stabile Integration läßt sich unter Umständen als verlängerter chromosomaler Bereich erkennen, der homogen anfärbbar ist (homogeneously staining region, HSR).

Wachsende Transfektanten können in einem oder mehreren Schritten unter erneuten Selektionsdruck gebracht werden, damit es zur erneuten Integration weiterer Genkopien des Tandems – "Protein des Interesses" & DHFR – kommen kann und damit nach der "Gen - Dosis Abhängigkeit" zur Amplifikation der Expression des gewünschten Proteins kommt. Dazu bietet sich erneut das DHFR-Genprodukt an, das die Konversion von Folat zu Tetrahydrofolat katalysiert, welches einen Katalysator für die Purinbiosynthese darstellt. Der schrittweise zu steigende Einsatz von Methotrexat (MTX) als ein Folat-Analogon (Antifolat) inhibiert die Reduktase stöchiometrisch und zwingt die Zellen auf diese Weise, Genrearrangements zu unternehmen, um dem wachsendem Selektionsdruck zu entkommen. Mehrere Runden mit steigenden MTX-Konzentrationen können somit zu Zellpopulationen führen, die mehrere hundert Kopien des DHFR-Gens enthalten (Kaufman et al., 1990).

Die Versuchsdurchführung für die Selektion stellt sich wie folgt dar:

- 100 µg zu transfizierender DNA mit 100 U. ClaI oder NdeI verdauen (in Abhängigkeit von zusätzlichen Schnittstellen einer der beiden genannten Restriktionsenzyme im Protein des Interesses); Auftrennung eines kleinen Aliquots im Agarosegel zur Kontrolle der Vollständigkeit des Verdaus
- Phenolisieren des Rests, Präzipitieren, Waschen des Pellets und Resuspendieren in 800 µl PBS (Ca²⁺-, Mg²⁺-frei)
- Konfluent gewachsene CHO-Zellen einer 75 cm² Kulturflasche (bis zu 2 x 10⁷) mittels 10 ml PBS/0,05 % Trypsin (Pan Systems) 10 Minuten bei 37°C ablösen, mit 20 ml Medium versetzen, durch Abschlagen resuspendieren und in ein geeignetes Zentrifugationsgefäß überführen
- Zentrifugation bei RT für 5 Minuten und 500 x g; Zellpellet zweimal in 20 ml PBS (Ca²⁺-, Mg²⁺-frei) waschen. Vor dem zweiten Zentrifugationsschritt Zellen zu 5 x 10⁶ aliquotieren.

- Zellpellet im PBS/DNA-Lösung resuspendieren, Überführung der Lösung in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Eurogentech) und Inkubation für 5 Minuten auf Eis.
- Transfektion erfolgt mittels Genepulser (BioRad, 260 V, 960 μ F). Die mittlere Zeitkonstante für die Entladung der Kondensatoren liegt für CHO-Zellen charakteristischerweise bei 0,2 ms.
- Überführung der Zellen in eine 75 cm² Kulturflasche und Inkubation für 24 h in 30 ml Vollmedium
- Selektionsbeginn durch einen Waschschrift mit 20 ml PBS und anschließender Kultivierung ohne Nukleosidsupplementierung bei 37°C, 6 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit.

Die Amplifikation kann durch folgende Schritte erreicht werden:

- Überführung von 1/10 bis 1/5 der Zellen, die nach Selektionbeginn erneut konfluent den Flaschenboden bewachsen, in eine 75 cm² Kulturflasche
- Zugabe von MTX zum Selektionsmedium in Endkonzentration von 20 nM
- Bei Konfluenz der Zellen Kontrolle des Expressionsniveaus mit geeignetem ELISA
- Bei Bedarf kann die Amplifikation mit 100 und 500 nM MTX erneut durchgeführt werden

2.3.11 Antikörper-Bindungstest gegen immobilisiertes Antigen im ELISA

Zur Evaluation der Affinität und Spezifität von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen kommen häufig sehr flexibel einsetzbare ELISAs (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay) zum Einsatz. Das Spektrum dieser Untersuchungen reicht von indirekten, direkt kompetitiven, Antikörper-Sandwich- bis hin zu doppelten Sandwich-Ansätzen, die je nach Intention bei unterschiedlichen Fragestellungen angewandt werden können. An dieser Stelle erfolgt eine Beschränkung auf die Beschreibung einer Konstellation, in der Hybridomüberstände oder Periplasma-Fab-Fragment-Präparationen auf die Existenz von spezifisch bindenden Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten gegen ein gegebenes lösliches Antigen untersucht werden sollen:

- Beschichtung einer Rundboden ELISA-Platte (Nunc, U96 Maxisorb 449824) mit löslichen Zeta-Ketten-BSA-Konjugat (40 μ g/ml, 50 μ l/Well) o/n bei 4°C
- Dekantieren des Konjugats und Blocken mit PBS/3% BSA bei RT für mindestens 1 h
- Waschen mit PBST und Inkubation mit 50 μ l/Well Periplasmaüberstand oder entsprechende Positiv- und Negativkontrollen für 1 – 2 h bei RT
- Dreimaliges Waschen; Inkubation mit 50 μ l eines mit Peroxidase markierten Detektionsantikörpers (1 μ g/ml) für 1 h bei RT
- Peroxidase-konjugiertes F(ab')₂ Fragment eines Ziege-Anti-Maus IgG- & IgM-Antikörpers (0,16 μ g/ml) Pierce, Rockford, USA, Prod. No. 311448 zur Detektion der murinen Ketten im Fab-Fragment; muriner IgG1 Anti-His-tag Antikörper (Prod. No. 1965 085 Boehringer Mannheim, Mannheim) zur Detektion des 6 Histidin-Tags an bispezifischen Antikörperkonstrukten
- Viermaliges Waschen mit PBST; Zugabe von 50 μ l ABTS-Substratlösung (Boehringer Mannheim, Mannheim, Cat-No. 1682008)
- Absorptionmessung nach ausreichender Substratumsetzung bei 405 nm Wellenlänge mit ELISA-Meßgerät

2.3.12 Produktion und Aufreinigung rekombinanter Antikörper

Die Durchführung weitergehender Versuche macht die Isolation und Aufkonzentration des bispezifischen Antikörpers aus dem Zellkulturmedium notwendig. Aus diesem Grund wird zunächst in größerem Maßstab produziert, damit für die nachfolgende Aufreinigung genügend Ausgangsmaterial vorhanden ist. Die Produktion größerer Mengen erfolgt nicht mehr in stationärer Kultur, sondern in Oberflächenvergrößerten Rollerflaschen. Diese Rollerflaschen liegen in einer speziellen Drehvorrichtung, die die Flaschen um ihre Längsrichtung rotieren lassen. Der Vorteil dieser speziellen Kultivierungsform liegt in einem geringeren Mediumverbrauch und einer daraus resultierenden höheren Anfangskonzentration des Konstrukts im Medium. Der Übergang von der konventionellen, stationären Zellkultur zu Rollerflaschen wird im folgenden beschrieben:

- Transfizierte CHO-Zellen, die nachweislich das gewünschte Konstrukt produzieren, werden kultiviert, bis in einer 150 cm² Kulturflasche der Boden konfluent bewachsen ist.
- Ablösen und waschen der Zellen, Aussaat in 500-ml-Rollerflaschen (Expanded Surface Roller Bottle, Falcon Prod-No. 3069, 850 cm²) entsprechend supplementiertes Kulturmedium; Kultivierung bis zum konfluenten Bewuchs der Oberfläche; Mediumwechsel alle 3 - 5 Tage für 4 - 5 Kultivierungszyklen
- Zentrifugation des frisch geernteten Kulturmediums bei 500 g; Aufbewahrung des zellfreien Mediums bei 4°C bis zur Proteinreinigung.

Das bispezifische Konstrukt weist in C-terminaler Position eine zusätzliche Nukleotidsequenz kodierend für 6 Histidine auf, die keine Funktion im Rahmen der Antigenerkennung hat, sondern zur Aufreinigung des Proteins angefügt wurde. Diese ermöglicht eine Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen wie Co²⁺ oder Ni²⁺. Als Säulenmaterial wurde an NTA (nitrilo-tri-acetic acid) immobilisiertes Ni²⁺ der Firma Qiagen verwendet, das eine Affinitätskonstante von 10-13 zu der verwendeten Histidinkette besitzt. In Vorbereitung dieses Selektionsschrittes wird eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt, die eine Vorreinigung der zugefügten Mediumproteine und eine Volumenreduktion mit sich bringt. Eine abschließende Gelfiltration, die zur Entfernung von Aggregaten und Fragmenten eingesetzt wird, erlaubt zusätzlich die Bestätigung des Molekulargewichts. Mit Hilfe dieser drei Verfahren kann der rekombinante Antikörper aus dem Zellkulturmedium in hochreiner und konzentrierter Form isoliert werden.

2.3.13 Zytotoxizitätstests mit bispezifischen Antikörpern

Zur Bestimmung der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) wird der ⁵¹Cr-Freisetzung-Ansatz eingesetzt. Dabei werden zuerst die PBMCs aus dem „buffy coat“ eines humanen Spenders mittels Ficoll-Dichtezentrifugation gewonnen (siehe Abschnitt 2.3.1). Nach Inkubation der Zielzellen mit dem radioaktiven ⁵¹Cr-Isotop und einem zusätzlichen Waschschrift werden verschiedene Verdünnungen von Effektorzellen zu unterschiedlichen Konzentrationen des bispezifischen Antikörpers zugegeben. Nach 4 und 18 Stunden wird ein Teil des Überstandes auf im Gamma-Counter freigesetztes Chrom hin untersucht. Die dabei erhaltenen absoluten Zerfälle werden mit spontaner Chrom-Freisetzung der Zielzellen ohne Beisein von Effektorzellen oder Antikörper verglichen. Um Schwankungen in den Ansätzen zu erfassen, werden jeweils Triplikate angelegt und die Mittelwerte ausgewertet.

Die dazu genutzte Formel lautet:

$$\text{Relative spezifische Lyse} = \frac{(\text{cpm exp. } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}) - (\text{cpm spont. spezifische } ^{51}\text{Cr-Freisetzung})}{(\text{cpm maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}) - (\text{cpm spont. } ^{51}\text{Cr-Freisetzung})}$$

Der genaue Ansatz des Experiments verläuft wie im folgendem beschrieben:

- Target-Zellen möglichst schonend ernten (siehe 2.3.4), ca. 1×10^6 Zellen in Medium mit 50 - 100 μl reinen FCS in ein Redcap überführen
- Im Radioaktivbereich Zugabe von 50 - 100 μl des in RPMI verdünnten Natriumchromats (^{51}Cr -Isotop, 0,1 mCi am Kalibrationstag)
- Inkubation für ca. 45 Minuten bei 37°C ; zweimaliges Waschen in RPMI; Ermittlung der Zellzahl und Verdünnung auf 100.000 Zellen pro ml
- Unstimulierte PBMCs bzw. daraus isolierte CTLs oder NK-Zellen in verschiedenen Konzentrationen ($2 \times 10^6/\text{ml}$; $1 \times 10^6/\text{ml}$; $5 \times 10^5/\text{ml}$) in je 100 μl RPMI-Medium in die Wells einer Rundboden-Mikrotiterplatte verteilen
- Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen des bispezifischen Antikörpers (5000 ng/ml; 1000 ng/ml; 200 ng/ml; 50 ng/ml 10 ng/ml) in 50 μl Medium (Konzentration hochgerechnet auf 250 μl Medium)
- Inkubation der Ansätze bei 37°C und 6 % CO_2 für 4 -18 h
- Abnahme von 50 μl des Überstandes pro Well und Überführung in eine geeignetes Zählrohr für den Gamma-Counter (1480 Wizard 3'', Software Version 3.4 von Wallac, Freiburg). Die enthaltene Radioaktivität im Überstand für die Dauer einer Minute messen (counts per minute, cpm). Als Spontanwert dient der Wert des Wells ohne Antikörper; als Maximalwert werden 50 μl Überstand mit 0,5 % Triton lysierter Zellen eingesetzt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Grundlage für die Durchführung des Phage Displays oder für die Isolation der variablen Ketten einer gegebenen Antikörperspezifität ist die Isolierung der RNA aus der Milz der immunisierten Maus bzw. aus dem gewünschten Hybridom. Um undegradierete RNA aus diesem Material isolieren zu können, ist es unbedingt notwendig, die in den Zellen enthaltenen Ribonukleasen (RNasen) schnell und effizient zu inhibieren. Des weiteren muß die RNA von der ebenfalls vorhandenen genomischen DNA getrennt werden, um ausschließlich auf die aktuell exprimierte Erbinformation zurückzugreifen.

RNasen sind in allen Zellen vorhanden, werden durch die Zerstörung der Zelle während der Präparation aus ihren natürlichen Kompartimenten freigesetzt und können die vorhandene RNA degradieren. Auf Grund ihrer hohen Stabilität gegenüber Hitze (z.B. beim Autoklavieren) und Unempfindlichkeit bezüglich des pH-Werts sind RNasen nahezu auf allen Oberflächen und Gegenständen persistent, auf welche sie von natürlichen Quellen wie Haut oder Bakterien übertragen wurden. Wegen dieses hohen Kontaminationspotentials sind eine schnelle Inhibition der vorhanden RNasen und eine sterile RNase-freie Arbeitsweise essentiell.

Die Ein-Schritt-Methode zur RNA-Isolierung aus Zellen nach Chomczynski et al. (1987) nutzt hierzu die Guanidinium Thiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion. Guanidinium Thiocyanat (GT) ist wegen seiner sehr effektiven Protein-denaturierenden Wirkung ein starker RNase-Inhibitor. Phenol wird zu Deproteinierungszwecken der wässrigen Phase eingesetzt. Außerdem erfolgt die Trennung von DNA und RNA durch die Festlegung des pH-Werts der hydrophoben Phase, da DNA in der hydrophoben Phase und Interphase bei einem pH-Wert von 5 - 6 zurückgehalten wird. Der Einsatz von Chloroform unterstützt die Trennung von DNA und RNA zusätzlich. β -Mercaptoethanol dient zur Reduktion vorhandener Disulfidbrücken in Proteinen. Nach Zugabe von Natriumacetat (pH 4) zu den obengenannten Reagenzien und Durchführung eines weiteren Phenolisierungsschrittes wird die RNA bei hoher Salzkonzentration in Gegenwart von Isopropanol bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation und Pelletierung vorhandener RNA erfolgt ein Waschschriff mit 70% Ethanol zur Entfernung der Salze. Das so gereinigte Pellet wird in einer geeigneten Menge Wasser oder TE aufgelöst.

Die RNA-Isolierung nach Chomczynski wird im folgenden beschrieben:

- Volumen mit gewünschter Zellzahl (2×10^5 - 5×10^6) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß füllen
- Zentrifugation bei 3600 rpm ($\cong 1400$ g) für 5 Minuten (Eppendorf Zentrifuge 5417)
- Überstand verwerfen. Reaktionsgefäß mit Pellet auf Eis stellen, damit die RNA-Stabilität verlängert wird
- 1 ml GT Mix + 7 μl Mercaptoethanol (zusammen Solution D) in einem Reaktionsgefäß mischen
- Mit 300 μl Solution D pro Probe das Pellet mittels gründlichem vortexen resuspendieren
- Zugabe von 30 μl 2 M Natriumacetat (pH 4,0)
- 300 μl Saures Phenol (Aqua Rothi Phenol) zugeben und vortexen
- 90 μl Chloroform vorsichtig dazupipettieren und vortexen
- Reaktionsgefäße zur Phasentrennung 15 Minuten auf Eis stellen
- In der Zwischenzeit werden pro Probe 3 Reaktionsgefäße vorbereitet:
 - Gefäß 1 : 300 μl Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 : 24 : 1)
 - Gefäß 2 : 300 μl Chloroform
 - Gefäß 3 : 300 μl Isopropanol
 - 40 μl 3 M Natriumacetat (pH 5,0)
 - 1 μl Glykogen
- Zentrifugation bei 14000 rpm ($\cong 20800$ g) für 10 Minuten
- Oberste Phase (wässrig) qualitativ abnehmen und in Reaktionsgefäß 1 überführen. Die bestehende Interphase (mit der genomischen DNA) verbleibt im Reaktionsgefäß
- Zentrifugation bei 14000 rpm für 2 Minuten Es sollte keine Interphase entstehen
- Wässrige Phase abziehen in Reaktionsgefäß 2 überführen
- Zentrifugation bei 14000 rpm für 2 Minuten Dieser Schritt dient zur Phenol-Extraktion der wässrigen Phase
- Wässrige Phase in Reaktionsgefäß 3 zur Fällung der RNA durch hohe Salzkonzentration (NaAc) überführen. Die Glykogenzugabe erfolgt zur besseren Sichtbarkeit des Pellets
- Inkubation o/n bei -20°C
- 15 Minuten zentrifugieren bei 14000 rpm zur Pelletierung der RNA
- Wässrige Phase abziehen, Pellet mit 800 μl 70% (v/v) EtOH waschen
- Pellet markieren und im geöffnetem Reaktionsgefäß trocknen
- Pellet in 5 - 10 μl H_2O oder TE lösen. Die RNA wird bei -80°C gelagert
- Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung wird 1 μl RNA in 800 μl H_2O verdünnt. Anschließend wird die optische Dichte (OD) sowohl bei 260 nm als auch 280 nm in einer Quarzküvette photometrisch gemessen (Hitachi U3200 Spectrophotometer). Der OD_{260} -Wert erlaubt die Berechnung der enthaltenen RNA Menge, wobei eine $\text{OD}_{260} = 1$ einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ entspricht. Der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ gibt Auskunft über die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Sambrook et al., 1989)

2.4.2 Reverse Transkription

Die gereinigte Gesamt-RNA muß für den nächsten Schritt, die PCR, in DNA umgeschrieben werden, um als Substrat für die DNA-abhängige Taq-Polymerase zur Verfügung zu stehen. Die reverse Transkription wird durch die Reverse Transkriptase (RTase), eine RNA abhängige DNA-Polymerase, katalysiert.

Die RTase ist eine Desoxynukleotidyltransferase (EC 2.7.7.49), die aus einem *E. coli* Stamm isoliert wird. Dieser Stamm enthält eine klonierte Kopie des RTase-Gens aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV). In Retroviren dient dieses der Transkription der Erbinformation, die in Form von RNA vorliegt, damit diese vom Wirtsorganismus in Proteine umgesetzt werden kann. Diese 5' → 3' Polymerase katalysiert die Veresterung vom 3'OH-Ende der DNA-Kette mit dem 5' Phosphat-Ende eines Nukleotidtriphosphates unter Abspaltung eines Pyrophosphates. Die RNA dient als Matrize, zu der ein komplementärer DNA- (cDNA-) Strang gebildet wird. Die Synthese der cDNA kann nicht *de novo* begonnen werden, sondern benötigt einen Oligonukleotidprimer mit 15 bis 25 Basenpaaren (bp), welcher das für den Polymerisationsstart notwendige erste 3'OH-Ende aufweist. Alternativ zu diesem spezifischen cDNA-Primer kann auch ein Hexanucleotide-Mix mit allen möglichen Nukleotid-Kombinationen zur Initiation des Polymerisationsprozesses eingesetzt werden.

Nach Ansetzen des Reaktionsmixes (ohne RTase) erfolgt ein Inkubationsschritt bei 70°C für 5 Minuten um störende Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Zur Stabilisierung der Enzymfunktion ist dem RT-Puffer neben Tris zur pH-Pufferung und Magnesiumchlorid als Kofaktor auch Dithiothreitol, das die Sulfhydryl-Gruppen des Proteins vor Reduktion schützt, zugesetzt. Vor der RTase-Zugabe wird die Probe auf 37°C abgekühlt, um eine Hitzedenaturierung des Enzyms zu vermeiden und eine Anlagerung des Primers an die RNA zu ermöglichen. Nach Zugabe des Enzyms und einer Reaktionszeit von 60 Minuten wird die Transkription bei 70°C für 5 Minuten beendet.

Im weiteren werden die einzelnen Versuchsschritte eingehend erklärt:

- Die gereinigte RNA wird auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl mit DEPC-H₂O verdünnt
- Die folgenden Mengeangaben beziehen sich auf jeweils einen Ansatz:
Mastermix bei RT erstellen

	Volumen
H ₂ O	1 µl
5 x Puffer	1 µl
DTT (100 mM)	0,5 µl
N ₆ Hexamere (10 x)	0,5 µl
Σ	3 µl

- Zu den vorgelegten 3 MasterMix werden 2 µl RNA zugegeben
- Proben für 5 Minuten bei 70°C, anschließend auf für 5 Minuten bei 37°C inkubieren

- MasterMix auf Eis ansetzen und zum Annealing-Ansatz zugeben

	Volumen
H ₂ O	2 µl
5 x Puffer	1 µl
DTT (100 mM)	0,5 µl
dNTP (25 µM)	0,5 µl
Reverse Transkriptase 200 U/µl (Superscript II)	1 µl
Σ	5 µl

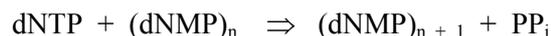
- Inkubation der Ansätze für 1 h bei 37°C
- cDNA mit 10 µl H₂O verdünnen
- Reaktion durch Hitzedenaturierung des Enzyms für 5 Minuten bei 95°C gestoppen
- Reaktionsgefäße kurz zentrifugieren, um das Kondensat zu sammeln
- Die cDNA bei -20°C bis zur weiteren Verwendung einfrieren

2.4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (**polymerase chain reaction = PCR**) erlaubt die selektive *in vitro* Amplifikation von bestimmten DNA-Regionen, indem das Phänomen der *in vivo* DNA-Replikation simuliert wird (Mullis et al, 1987).

Für diese Reaktionsabläufe werden folgende Agenzien benötigt:

- Template-DNA oder cDNA, die während der Reaktion als Vorlage für die komplementär einzubauenden Nukleotide dient
- Taq Polymerase isoliert aus *Thermus aquaticus*, eine hitzestabile DNA-abhängige DNA Polymerase (EC 2.7.7.7), die den Nukleotidtriphosphaten im Rahmen der Reaktion ein Pyrophosphat abspaltet. Die aus der Abspaltung gewonnene Energie wird zur Veresterung zwischen dem 3' Hydroxylende der bestehenden Nukleotidkette und dem einzubauenden Desoxynukleotidmonophosphat genutzt
- Zwei Oligonukleotidprimer (normalerweise 15 bis 25 Nukleotide), die an eine komplementäre Region der Template-DNA binden und damit die Polymerisationsreaktion des dazwischen liegenden Bereichs ermöglichen, da eine *de novo* Synthese nicht stattfindet
- Die Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs), die dem Enzym als Substrat dienen und nach folgender Reaktionsgleichung eingebaut werden :



- Der Puffer, der durch seine Zusammensetzung die Reaktionsbedingungen einstellt, unter denen die Polymerisation im Hinblick auf Edukte und Enzymprozessivität optimal abläuft

Der Ablauf eines Amplifikationsschrittes ist dreigeteilt. Zunächst wird die DNA bei 93 bis 95°C denaturiert. Das heißt, die Doppelstränge werden getrennt (Denaturierungsschritt). Im zweiten Schritt wird die Temperatur auf 50 bis 65°C gesenkt, damit sich die Oligonukleotidprimer, die das zu vervielfältigende DNA-Fragment in seiner Länge definieren, anlagern können (Annealingschritt). Die genaue Temperatur hängt von der Primer-Schmelztemperatur (T_m) ab, die durch die Länge und das Verhältnis (G + C) : (A + T) der Primersequenz determiniert wird. Im dritten Schritt findet bei 72°C, dem

Temperaturoptimum der Taq Polymerase, beginnend an den Primern die Elongation statt, bei der so ein Strang synthetisiert wird, der komplementär zur Original-DNA ist. Die Reaktionszeit dieses Schrittes richtet sich nach der Länge des PCR-Produktes, wobei die Prozessivität, d.h. die Inkorporationsrate der Taq Polymerase bei 150 bis 300 Nukleotide je Sekunde und Enzymmolekül liegt (Innis et al., 1988).

Diese drei Schritte stellen einen Zyklus dar, der je nach Anwendung 25 bis 50 mal wiederholt werden kann und somit in einer theoretisch exponentiellen Amplifikation der Ausgangs-DNA resultiert. Damit lassen sich beispielsweise in 30 Zyklen aus einem einzigen DNA-Molekül rein rechnerisch 10^9 Kopien erstellen. Sowohl zu Beginn als auch zu Ende der eigentlichen PCR-Reaktion wird von dem oben erklärten Zyklusschema abgewichen. Im ersten Zyklus wird die Denaturierungszeit von ca. 40 Sekunden auf 4 bis 8 Minuten verlängert, um eine vollständige Auflösung aller Sekundärstrukturen innerhalb der Ziel-DNA zu gewährleisten, die ansonsten dem Anlagerungsprozeß der Primer im Weg stünden. Im letzten Schritt wird die Elongationsphase von ca. 30 Sekunden auf 5 bis 15 Minuten verlängert, um angefangene Amplifikate bis zur vollen Länge zu elongieren.

Der biochemische Ansatz, gezielt erwünschte DNA bzw. cDNA selektiv mit Hilfe von Oligonukleotidprimern zu amplifizieren und dabei ggf. gleichzeitig Restriktionsenzymkennungssequenzen mit in die Amplifikate einzuführen, die anschließend ein gerichtetes Klonieren in entsprechend präparierte Vektoren erleichtern, macht diese Methode zu einem vielseitigen und unverzichtbaren Teil des molekularbiologischen Arbeitens. Neben diesem präparativen Ansatz wird die PCR auch zu analytischen Zwecken genutzt, wobei die Existenz eines Inserts im Vektor nach erfolgtem Klonierungsschritt untersucht wurde. Da meist eine größere Anzahl von Transformatenkolonien vorhanden ist, sollte die Gewinnung der Plasmid-DNA möglichst einfach gestaltet werden. Aus diesem Grund wird die Plasmid-DNA vor der PCR nicht isoliert; die DNA aus den Bakterien wird bei der initialen Denaturierung bei 94°C für 4 Minuten freigesetzt.

Die Versuchsdurchführung wird im folgenden detailliert aufgeführt:

- Erstellen des Mastermix (die angegebenen Volumina entsprechen einer Probe):

	Volumen
dNTP (25 μ M)	0,16 μ l
BSA (20 mg/ml)	0,5 μ l
5' Primer (8 μ M)	0,5 μ l
3' Primer (8 μ M)	0,5 μ l
10 x PCR Puffer	2,0 μ l
H ₂ O	14,1 μ l
Taq Polymerase (5 U/ μ l)	0,2 μ l
Σ	18,0 μ l

- Verteilen des Mastermix auf die Reaktionsreaktionsgefäße
- Überschichtung des Reaktionsansatzes mit 10 μ l Mineralöl
- Zugabe von 2,0 μ l cDNA/10 ng Plasmid/1 μ l einer in LB-Medium verflüssigten Kolonie als Template-DNA

- Die PCR wird wahlweise im Hybaid-Thermalreaktor oder im Hybaid-Touchdown Cycler durchgeführt

Folgendes PCR-Schema kann je nach Erfordernis des zu amplifizierenden DNA-Templates modifiziert werden:

1.1	94°C	6 min.	
2.1	94°C	30 sec.	40 Zyklen
2.2	56°C	1 min.	
2.3	72°C	30 sec.	
3.1	72°C	5 min.	
3.2	30°C	1 min.	

- Amplifikate sofort für die Agarose-Gelelektrophorese einsetzen oder bei -20°C einfrieren

2.4.4 Enzymatischer Verdau von dsDNA und cDNA-Fragmenten

Zum Schneiden von dsDNA im Rahmen von Klonierungen wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II (Arber et al., 1978) verwendet. Bei diesen handelt es sich um bakterielle Enzyme, welche bestimmte palindromische Sequenzabschnitte mit einer Länge von 4 bis 8 bp spezifisch erkennen und innerhalb dieser Erkennungssequenzen den DNA-Strang hydrolysieren. Dabei können glatte Enden, 5'- oder 3'-überstehende Enden entstehen, wobei die Länge der Enden Enzym-spezifisch variabel sein kann. In dieser Arbeit kommen Restriktionsendonukleasen sowohl zur Digestion von Plasmid-DNA im Rahmen von Umklonierungsschritten als auch von cDNA zum Einsatz, bei denen mit der PCR eingeführte Restriktionserkennungssequenzen zur gerichteten Klonierung in entsprechend präparierte Plasmide genutzt werden.

In H₂O gelöste DNA wird (2 – 10 µg) in adäquatem 10 x Puffer auf den für das jeweilige Restriktionsenzym optimalen pH und Salzkonzentration eingestellt. Nach Zugabe ausreichender Mengen an Enzym (mindestens 1 U. pro µg DNA) wird der Ansatz 1 - 2 h beim Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms inkubiert. Beenden des Verdaus durch Zugabe von EDTA-haltigem Auftragspuffer für die Agarose-Gelelektrophorese. Zur Erfolgskontrolle des Verdaus werden die DNA-Fragmente zu analytischen oder präparativen Zwecken elektrophoretisch aufgetrennt.

2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Standardmethode zur Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrem Molekulargewicht ist die horizontale Gelelektrophorese unter Verwendung von Agarose-Gelen. Im Rahmen der Dissertation kommt sie sowohl als präparatives als auch als analytisches Werkzeug zur Erfolgskontrolle nach Klonierungsschritten oder nach Amplifikationen zum Einsatz.

Agarose-Gele machen im Gegensatz zu Polyacrylamid-Gelen eine schnelle Auswertung nach der Auftrennung der DNA möglich. Die Visualisierung der DNA – in den meisten Fällen PCR-Produkte – erfolgt durch die Zugabe von Ethidiumbromid zu dem Gel. Dieses interkaliert in doppelsträngige DNA und fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm. Die Größe der aufgetrennten

DNA-Banden kann durch Vergleich mit einem geeigneten Größenstandard ermittelt werden. Zur Dokumentation der Ergebnisse wird das Gel mit einer Polaroid-Kamera fotografiert oder mit einem Videodokumentationssystem festgehalten.

Die Standardgelelektrophorese hat folgenden Ablauf, der je nach Versuchsanforderungen variiert werden kann:

- 100 ml 10 x TBE auf 1 l verdünnen, Zugabe von 20 µl Etidiumbromid (10 mg/ml, Endkonzentration 0,2 µg/ml)
- 0,8 - 1,5% (w/v) Agarose in verdünntem 1 x TBE-Puffer aufkochen
- Die auf etwa 60°C abgekühlte Agarose in einen Gelträger gießen. Die Geltaschen werden durch einen eingesetzten Kamm geformt, der nach Erstarren des Gel entfernt wird
- Überschichten des Gels mit 1 x TBE. Vermischen der DNA mit 3 µl Gellaufpuffer (10 mg Orange G in 50 ml 25% Ficoll) und Auftragen der Lösung (Horizon 11•14, Gibco BRL)
- Durchführen der Elektrophorese bei 100 - 150 V für 30 - 60 Minuten (je nach gewünschter Auftrennung)
- Plazieren des Gels auf UV-Transilluminator ($\lambda = 302 \text{ nm}$) und fotografieren mit einer Polaroid-Kamera (Film: Polaroid 667) oder Ausdrucken mittels Videoauswertesystem (Digi store Duo, Intas, Göttingen).

2.4.6 Isolation der DNA aus Agarose-Gelen

Nach erfolgter Gelelektrophorese werden die aufgetrennten DNA-Fragmente aus dem Gel isoliert, um nur das gewünschte Produkt in die folgende Ligation einzusetzen. Fragmente abweichender Größe werden so ausgeschlossen. Durch diese Vorgehensweise wird eine spezifische Klonierung und somit eine Minimierung falscher Sequenzen erreicht.

Die Gelelektrophorese wird wie bereits beschrieben durchgeführt, für das Gel selbst wird eine Low-Melt Agarose eingesetzt. Die gewünschte Bande wird unter UV-Beobachtung mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit einem chaotrophen Salz solubilisiert. Nach Bindung an eine Silica-Membran und zwei Waschschritten erfolgt die Elution mit destilliertem Wasser in geeignetem Volumen. Die genaue Durchführung ist dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen zu entnehmen.

2.4.7 Präparation kompetenter *Escherichia coli* K12 XL I Blue

Bakterien besitzen die Fähigkeit, freie DNA wie z.B. Plasmide aus dem umgebenden Medium aufzunehmen. Diese Eigenschaft wird als Kompetenz bezeichnet. Dabei unterscheidet man zwei Typen, die natürliche Kompetenz, wie sie beispielsweise bei *Bazillus subtilis* vorkommt, und die vermittelte Kompetenz, bei der Bakterien erst durch besondere Wachstumsbedingungen zur Aufnahme von DNA befähigt werden. Die induzierte Kompetenz kommt in dieser Arbeit mit *E. coli* als Bakterienspezies zur Anwendung.

In dieser Arbeit wird die, auf der ursprünglichen CaCl_2 -Methode (Cohen et. al. 1972) basierende, leicht variierte Präparation nach Kushner (1978) angewandt, bei der die Bakterien während des Wachstums zweiwertigen Kationen wie Mg^{2+} ausgesetzt werden. Diese Wachstumsbedingungen induzieren bei den

Bakterien die transiente Fähigkeit, DNA aus dem Medium aufzunehmen. Der Prozeß der Kompetenzinduktion ist weitestgehend unbekannt, basiert aber möglicherweise auf ioneninduzierten Membrankanälen.

Genotypische Charakterisierung von *Escherichia coli* XL 1 Blue (Bullock et al., 1987):

supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'[proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10(tet^r)]

Der detaillierte Versuchsablauf für die Erzeugung kompetenter *E. coli* wird im folgenden aufgelistet:

- Inokulation von 5 ml LB-Flüssigmedium (oder wahlweise TYM Broth) mit einer Kolonie des gewünschten Bakterienstammes inokuliert und inkubieren über Nacht bei 37°C auf dem Rotationsschüttler
- Animpfen von 100 ml LB-Flüssigmedium, das mit 1 ml 1 M MgCl₂ supplementiert wurde, mit 10 % der Übernachtskultur
- Die Kultur bis zu einer O.D.₅₅₀ = 0,6 - 0,8 wachsen lassen, anschließend zentrifugieren bei 3000 rpm für 8 Minuten bei 4°C (Sorvall Instruments RC-3B, Rotor H600A) Die folgenden Arbeitsschritte werden möglichst zügig und auf Eis durchgeführt.
- Überstand schnell dekantieren, das Bakterienpellet im Rücklauf resuspendieren
- Zugabe von 40 ml Tfb I (eisgekühlt) pro 100 ml Starterkultur
- Inkubation für 10 Minuten auf Eis
- Zentrifugation (3000 rpm, 8 Minuten, 4°C)
- Überstand dekantieren, Resuspension im Rücklauf. Zugabe von 4 ml gekühltem Tfb II Medium pro 100 ml Kultur
- Kompetente Bakterienzellen zu 100 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße aufteilen
- Schockgefrieren der Aliquots in einem Trockeneis-Methanol-Bad und Lagerung bei -80°C

2.4.8 Ligation

Zur Ligation der cDNA respektive DNA-Fragmente in verschiedene Vektoren wird die T4-Ligase verwendet. Dieses ATP-abhängige Enzym katalysiert die Veresterung zwischen dem 3'-Hydroxy-Ende und dem 5'-Phosphat-Ende zweier DNA-Fragmente. Um eine Rezirkularisierung des Vektors ohne Insert zu verhindern, werden doppelte Restriktionsverdäue durchgeführt, die zu inkompatiblen Enden innerhalb des Vektors führen.

Die Ligationsreaktion wird wie folgt durchgeführt:

- Reaktionsgefäße mit Vektor zum Sammeln der Flüssigkeit kurz zentrifugieren
- Ansetzen der Ligations-Reaktion :

PCR-Produkt	1 µl
10 x Ligationspuffer	1 µl
Vektor (1 µg/µl)	2 µl
H ₂ O	5 µl
T4 Ligase (4 Weiss Units)	1 µl
Σ	10 µl

Anmerkung : Im allgemeinen ist ein Volumen von 0,5 - 1 µl PCR-Produkt bei einer Größe von 300 bis 700 bp ausreichend, damit ein Verhältnis Vektor : Insert von 1 : 1 vorliegt. Die Effizienz der Ligation ist beim äquimolaren Verhältnis am höchsten. Bei einem größeren Volumen des PCR-Produkts würde die T4-Ligase durch die Puffersalze der PCR-Reaktion inhibiert werden.

- Inkubation der Ligationsreaktion von 2 Stunden bis o/n bei 14°C (LKB 2209 Multitemp). Nach Beendigung der Reaktion wird das Plasmid direkt transformiert oder bei -20°C gelagert

2.4.9 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *Escherichia coli*

Kompetente Bakterien können zugegebene Plasmide aus dem Medium aufnehmen. Die Plasmid-DNA lagert sich während einer fünfminütigen Inkubation an die Bakterien an. Nach einem kurzen Hitzeschock bei 37°C und der daraus resultierenden Transformation werden die Bakterien zur Ausprägung des plasmidvermittelten Phänotyps eine Stunde ohne Selektionsbedingungen inkubiert.

Die Transformationsreaktion wird nach dem folgenden Beispiel durchgeführt:

- Ggf. 40 µl X-Gal (20 mg/ml in N,N-Dimethylformamid) auf LB_{amp} Platten (Endkonzentration 100 µg/ml) ausplattieren, antrocknen lassen und bei 37°C inkubieren. Es werden je zwei Platten pro Transformation eingesetzt
- Auftauen eines Reaktionsgefäß mit kompetenten Zellen, die anschließend direkt auf Eis gelagert werden
- Anzentrifugieren der Ligationsreaktionen
- Zugabe von 5 µl Ligationsreaktion pro Gefäß. Der verbleibende Restansatz wird bei -20°C weggefroren
- Für 5 Minuten Gefäße auf Eis inkubieren
- Gefäße für genau 5 Minuten ins 37°C Wasserbad
- Zugabe von 450 µl LB-Flüssigmedium (RT)
- Gefäße im Thermoschüttler bei 37°C und ca. 225 rpm für 1 h inkubieren.
- Ausplattieren von 50 bzw 350 µl der Bakteriensuspension auf LB_{amp}-Platten mittels Drygalski-Spatel
- Inkubation der Platten o/n im 37°C Wärmeschrank.

2.4.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Bakterien, welche die Plasmide mit einem Insert richtiger Größe aufweisen, werden vermehrt. Anschließend werden daraus die Plasmide isoliert, um das Insert sequenzieren zu können. Die dafür in dieser Arbeit eingesetzte Qiagen-Midi-Präparation stellt eine Routinemethode zur Plasmid-Isolierung aus Bakterien dar.

Die Methode beruht auf der Vorschrift von Birnboim et al. (1979), die zu verwendenden Reagenzien und Lösungen werden von der Firma Qiagen geliefert. Nach vollständiger Lyse der Zellmembranen mit Hilfe von SDS unter alkalischen Bedingungen wird die enthaltene RNA durch RNase A hydrolysiert, während die chromosomale DNA, die an die Zellwände gebunden ist, mit den Zellbruchstücken abzentrifugiert werden kann. Die Plasmid-DNA wird freigesetzt und befindet sich dann im Überstand. Durch Absenken des pH-Werts renaturiert die Plasmid-DNA und wird anschließend an eine Tip-100-Ionenaustauschersäule gebunden. RNA, Proteine und Zellreste werden nicht gebunden und daher eluiert. Die gebundene doppelsträngige Plasmid-DNA wird erst unter hoher Ionenkonzentrationen von 1,25 M

NaCl (pH 8,2) eluiert. Es folgt eine Entsalzung und Aufkonzentrierung der Proben mit 70% EtOH. Die so gewonnene Plasmid-DNA wird in 50 - 500 µl Wasser gelöst.

Die Plasmidisolierung wird gemäß den Herstellerangaben in Abhängigkeit von der gewünschten Plasmidmenge durchgeführt (Siehe Qiagen Plasmid Purification Handbook).

2.4.11 Sequenzierung mit der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger

Das Sequenzieren von DNA-Fragmenten wurde mittels Strangabbruchmethode (Sanger et al. 1977) und Vier-Farben-Cycle-Sequencing (Perkin Elmer) in Auftragsarbeit von der Firma SequiServe, Vaterstetten durchgeführt.

2.4.12 Die Generierung von Antikörperspezifitäten mittels Phage-Display

Seit Beginn der neunziger Jahre entwickelte sich die Technik des sogenannten Phage-Display kombinatorischer Antikörperfragment-Repertoires zu einer Alternative zur konventionellen Hybridomtechnologie. Dieses Verfahren erlaubt die gezielte *in vitro* Selektion sowohl humaner als auch muriner Antikörperfragmente für beliebige Antigene *in vitro*. Die Expression von Antikörperfragmenten auf filamentösen M13-Phagen (Phage-Display) und die Anreicherung Antigen-bindender Spezifitäten aus kombinatorischen Antikörperbibliotheken wurden im wesentlichen erst in letzten Jahrzehnt entwickelt (Hoogenboom et al. 1998, Hoogenboom 1997, Abelson 1996, Burton 1995, Winter et al. 1994, Burton & Barbas 1993, Barbas 1993b).

Technische Grundlagen zur Selektion von Antikörperspezifitäten mittels Phage Display

Zu Beginn werden aus der Milz einer mit dem Zeta-KLH-Konjugat immunisierten Maus mittels RT-PCR die kodierenden DNA-Fragmente für die Bindungsregionen der enthaltenen rearrangierten Antikörper amplifiziert (Winter & Milstein 1991). Abhängig vom anschließend zu verwendenden Format werden für scFv-Antikörperfragmente nur die V-Regionen der leichten und der schweren Ketten, für Fab-Antikörperfragmente die gesamte leichte Kette und das Fd-Fragment (VH+CH1) der schweren Kette amplifiziert. Das amplifizierte leichte Ketten- und das Fd-Fragment-Repertoire werden dann nacheinander in einen Phagmid-Vektor subkloniert. Der in dieser Arbeit verwendete Phagmid-Vektor pComb3H ist die weiterentwickelte Version des ursprünglich konstruierten pComb (Barbas et al. 1991). Das Phagmid pComb3H wurde so konzipiert, daß hinter einem lacZ-Promotor und einem Operator die Klonierungsstellen sowohl für die leichte Kette als auch für das Schwere-Ketten-Fd-Fragment liegen. Die leichte Kette liegt dabei im 3'-Bereich der ompA-Leadersequenz aus *E. coli*; das Schwere-Ketten-Fd-Fragment im 3'-Bereich der pelB-Leadersequenz aus *Erwinia carotovora*s.

Der Transformation des Plasmids in *E. coli* folgt die Expression beider Antikörperteile und der Export in das Periplasma, in dessen oxidierender Umgebung sich die leichte Kette mit dem Fd-Fragment zu einem funktionellen Fab-Fragment zusammenlagert. Um dieses Fab-Fragment auf der Oberfläche eines filamentösen Phagen (M13) zu exprimieren, ist die Klonierungsstelle für das Schwere-Ketten-Fd-DNA-Fragment als Translationsfusion vor einen DNA-Abschnitt gesetzt, welcher für die Aminosäuren 196 bis 406 des M13-Phagen Hüllproteins III kodiert (Gen III). Das vollständige Phagen Hüllprotein III bzw. Gen III-Produkt befindet sich in drei bis fünf Kopien an einem Ende des filamentösen M13-Phagen und ist für die Infektion von *E. coli* notwendig. Die trunke Variante des Hüllproteins III (Δ Protein III), wie sie in der Translationsfusion vorliegt, ist zur Infektion von *E. coli* nicht mehr befähigt und dient nur der Verankerung des Antikörperfragments auf dem Phagen. Zur Expression vollständiger Phagen, die sowohl das an Δ Protein III gekoppelte Antikörperfragment als auch das Infektions-kompetente vollständige Hüllprotein III auf ihrer Oberfläche tragen, werden die *E. coli*-Zellen zusätzlich mit einem filamentösen Helferphagen infiziert, der die für die Verpackung vollständiger M13-Phagen notwendigen Strukturproteine bereitstellt; als Helferphage wurde in der vorliegenden Arbeit VCSM13 verwendet. Von den Phagmid-transformierten und mit dem Helferphagen infizierten Bakterienzellen werden je 200 bis 2000 Kopien der Antikörperfragment-tragenden Fab- oder scFv-Phagen pro Zelle exprimiert. Jeder dieser Antikörperfragment-tragenden Phagen kodiert in seinem Genom mit einer einzelsträngige DNA-Kopie eines Phagmid-Klons für den Phänotyp einer Antikörperspezifität, der auf der Oberfläche exprimiert wird (Abb. 8).

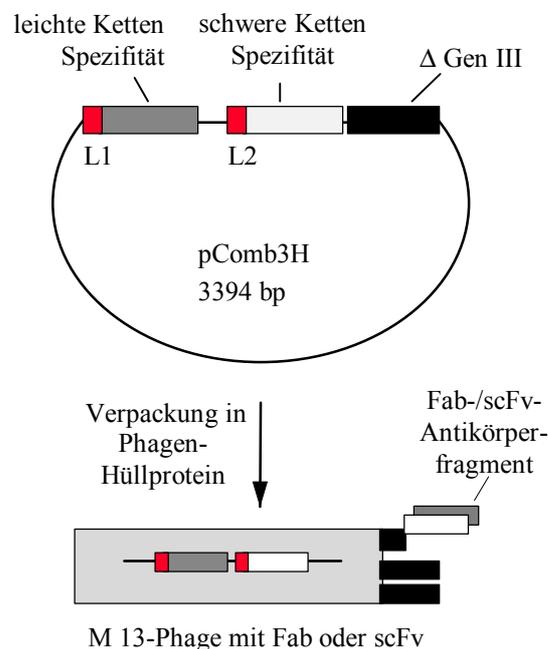


Abb. 8: Die Kopplung von Genotyp eines in pComb3H subklonierten Antikörperfragments und seines Phänotyps auf der Oberfläche des M13-Phagen (Phage Display). Das Antikörperfragment (scFv- oder Fab-Fragment) ist translational an das nicht-infektiöse Δ Protein III gekoppelt. Das zur Infektion benötigte vollständige Protein III wird wie andere Phagenproteine vom Helferphagen VCSM13 geliefert. L1 bezeichnet die *ompA*-, L2 die *pelB*-Leadersequenz zum Transport in das Periplasma der Wirtszelle.

Der weitere Ablauf der *in vitro* Selektion von Antikörperfragmenten ist in Abb. 9 schematisch dargestellt. Die Spezifitäten eines vielfältigen Leichte-Ketten-Repertoires und eines vielfältigen Schwere-Ketten-Repertoires werden zusammen in pComb3H subkloniert und durch Elektroporation in *E. coli* transformiert. Bei der anschließenden Infektion der so entstandenen *E. coli*-Bibliothek mit Hilfe des Helferphagen VCSM13 wird eine Vielzahl von Phagenpartikeln gebildet, welche verschiedene Kombinationen leichter und schwerer Ketten als funktionelle Antikörperfragmente (kombinatorische Antikörperfragment-Bibliothek) auf ihrer Oberfläche präsentieren (Phage Display).

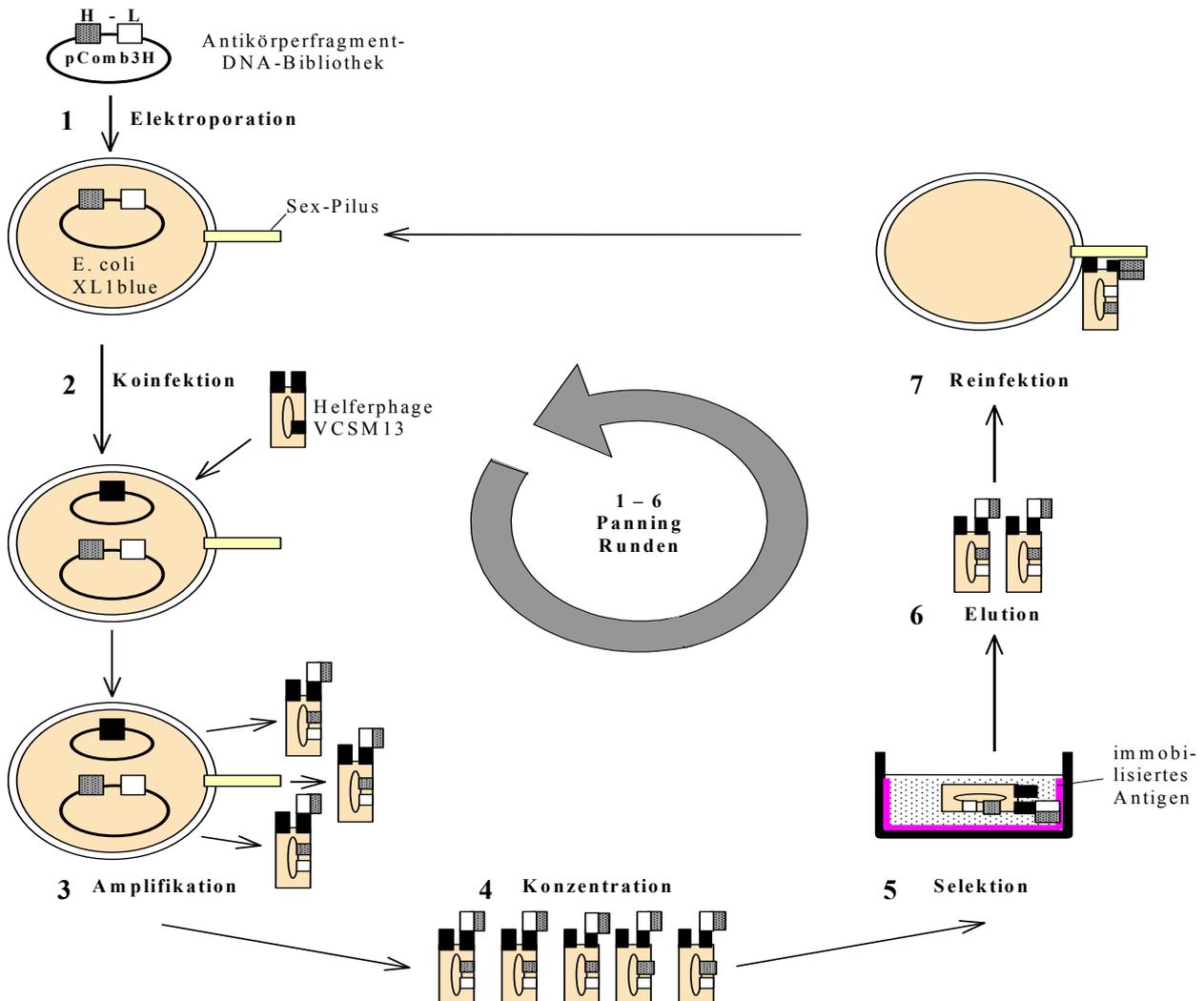


Abb. 9: Schematische Darstellung einer *in vitro* Selektionsrunde. 1) Elektroporation der in pComb3H subklonierten Antikörperbibliothek in *E. coli*XL1blue-Zellen; 2) Koinfektion mit dem Helferphagen VCSM13; 3) Expression und klonale Vermehrung Antikörperfragment-tragender Phagen; 4) Ernte und Konzentration der Phagen aus dem Medium; 5) Inkubation der Phagen auf Antigen und Entfernung ungebundener Phagen (Panning); 6) Elution gebundener Phagen und Infektion von *E. coli*XL1blue (7).

In einer hypothetisch beliebig großen, auf Phagen exprimierten Antikörperfragment-Bibliothek werden theoretisch Spezifitäten gegen jedes beliebige Antigen auftreten. Immune Repertoires enthalten bei gleicher Größe in der Regel eine wesentlich größere Anzahl bindender Spezifitäten gegen das entsprechende Antigen als naive Repertoires. Auf Grund dieser Tatsache wurde kein naives, sondern ein bereits immunisiertes Repertoire gewählt.

Das Repertoire Antikörperfragment-exprimierender M13-Phagen (Fab-Phagen oder scFv-Phagen) wird anschließend mit dem Antigen inkubiert, gegen das die gewünschte Spezifität gerichtet sein soll. Dieses Antigen ist entweder durch direkte Kopplung an eine ELISA-Platte gebunden, indirekt über Biotin und Avidin immobilisiert oder auf ganzen Zellen exprimiert. Gegen das Antigen gerichtete Antikörperfragment-tragende Phagen binden während der Inkubation spezifisch an das Antigen. Mittels geeigneter Waschschriffe werden unspezifische Fab/scFv-Phagen des Repertoires entfernt und die spezifisch gebundenen Fab/scFv-Phagen vom Antigen eluiert. Diese eluierten Fab/scFv-Phagen werden zur Neuinfektion von *E. coli*-Zellen verwendet, mittels Helferphagen erneut exprimiert und somit klonal vermehrt. Diese spezifischen Fab/scFv-Phagen werden sukzessive in mehreren "Panning-Runden" angereichert, bis im günstigsten Fall das resultierende Phagenkollektiv zahlenmäßig von hochspezifischen bindenden Phagen dominiert wird.

Der Versuchslauf läßt sich wie folgt beschreiben:

- Isolation der Gesamt-RNA aus der Milz einer mit dem Zeta-KLH-Konjugat immunisierten Maus nach der Ein-Schritt-Methode von Chomczynski et al. (1987) (siehe Abschnitt 2.4.1)
- Reverse Transkription der RNA zu cDNA gemäß Abschnitt 2.4.2
- Amplifikation von Fd-Fragmenten (VH und CH1) der schweren Immunglobulinkette bzw der kappa leichten Ketten mittel der Primersets aus Abschnitt I im Anhang. (24 Primerkombinationen für die schwere Kette; 7 Kombinationen für die leichte Kette). Die PCR-Ansätze wurden gemäß Abschnitt 2.4.3 erstellt
- Klonierung der folgender Amplifikate mittels Restriktionsverdau: 450 ng des Kappa-Leichte-Ketten-Fragmentes (SacI – XbaI verdaut) in 1400 ng entsprechend präparierten Phagmid-Vektor pComb3H (Barbas et al, 1991) gemäß den Abschnitten 2.4.4 und 2.4.8
- Transformation der resultierenden Leichte-Ketten-Bibliothek in 300 µl elektrokompenter *E. coli* XL1 Blue (Statagene) mittels Elektroporation (2,5 kV; 0,2 cm Küvette; 25 Fd; 200; Biorad Genepulser I)
- Kultivierung der Bakterien zunächst eine Stunde ohne, dann mit Carbenicillin (Endkonzentration 20 µg / ml) in 100 ml SB-Medium o/n.
- Isolation der Plasmid-DNA gemäß Abschnitt 2.4.10
- Klonierung von 900 ng der Schwere-Ketten-Fd-Bibliothek (XhoI – SpeI Verdau) in 2800 ng der korrespondierend gespaltenen Leichten-Ketten-Bibliothek mittels Restriktionsverdau gemäß den Abschnitten 2.4.4 und 2.4.8
- Transformation und Kultivierung wie oben beschrieben
- Infektion mit 10^{12} Helferphagen VCSM13 nach einer Stunde, Kultivierung o/n
- Ernte der infizierten Bakterien und enthaltener Plasmidbibliothek durch Zentrifugation (2200 x g; 20 Minuten; 4°C)
- Ernte der Phagen-Bibliothek mittel PEG8000/NaCl Zentrifugation (11000 x g, 15 Minuten)
- Resuspension in TBS / 1 % BSA bzw RPMI 1640
- Inkubation der Phagen alternativ mit zuvor auf Mikrotiterplatten immobilisiertem Zeta-Ketten-BSA-Konjugat oder zuvor isolierten $CD8^+$ - oder NK-Zellen nach folgendem Schema:

Tag 1 – 2: Zeta-Kette-BSA-Konjugat

Tag 3: $CD8^+$ -Zellen

Tag 4: $CD56^+$ NK Zellen

Tag 5: Zeta-Kette-BSA-Konjugat

Tag 6: $CD8^+$ -Zellen

Tag 7: $CD56^+$ -NK-Zellen

Prozedere zur Selektion mittels Zeta-Kette-BSA-Konjugat:

- Inkubation einer Mikrotiterplatte o/n mit 50 µl Zeta-Kette-BSA-Konjugat (1 mg/ml) bei 4°C
- Blocken unabgesättigter Oberfläche mit 200 µl TBS / 3 % BSA für 1 h bei 37°C
- Verteilen der resuspendierten Phagen (500 µl) auf zuvor beladene Wells und Inkubation für weitere 2 h bei 37°C.
- Elution der ungebundenen Phagen mit 150 µl TBST mit sukzessiver Steigerung der Waschstringenz (Tag 1 einmal waschen; Tag 2 fünfmal waschen; Tag 3 zehnmal waschen)
- Elution der gebundenen Phagen mit 50 µl HCl-Glycin / 1mg/ml BSA für 10 Minuten
- Neutralisation des Eluats nach Überführung in ein neues Reaktionsgefäß mit 30 µl basischer Tris-Lösung (2 M)
- Infektion von *E. coli* XL1 Blue ($OD_{600} = 1$) mit dem neutralisierten Eluat für 15 Minuten, Kultivierung für 1 h in 10 ml SB-Medium mit Tetracyclin (10 µg/ml) und Carbenicillin (20µg/ml);
- Koinfektion mit 10^{12} Helferphagen VCSM13 und Zugabe von 90 ml SB-Medium mit Tetracyclin (10 µg/ml) und Carbenicillin (50 µg/ml); nach weiteren 2 h Zugabe von Kanamycin (Endkonzentration 70 µg/ml) und Kultivierung o/n.
- Beginn der nächsten Panning-Runde mit Isolation der Plasmid-DNA gemäß Abschnitt 2.4.10.

Prozedere zur Selektion mit CD8⁺- bzw. CD56⁺-NK-Zellen:

- Isolation der PBMCs aus Vollblut gemäß Abschnitt 2.3.1
- Isolation der gewünschten Subpopulation gemäß Abschnitt 2.3.2 bzw. 2.3.3
- Inkubation der aufgereinigten Zellpopulation mit in RPMI 1640 resuspendierten Phagen aus Vorrunde für 2 h bei 4°C unter fortwährender Rotation
- Zwei- bis fünfmaliges Waschen (2200 x g; 5 Minuten; 4°C) der Zellen zur Entfernung nichtgebundener Phagen
- Denaturierung der Phagenbindung durch Zugabe von 500 µl HCl-Glycin für 10 Minuten bei RT
- Zugabe von 30 µl Tris/Base zur Neutralisation der Phagen; sofortige Zugabe von 2 ml Bakterien $OD_{600} = 1$ für 15 Minuten
- Kultivierung für 1 h in 10 ml SB-Medium mit Tetracyclin (10 µg/ml) und Carbenicillin (20µg/ml);
- Koinfektion mit 10^{12} Helferphagen VCSM13 und Zugabe von 90 ml SB-Medium mit Tetracyclin (10 µg/ml) und Carbenicillin (50 µg/ml); nach weiteren 2 h Zugabe von Kanamycin (Endkonzentration 70 µg/ml) und Kultivierung o/n.
- Beginn der nächsten Panning-Runde mit Isolation der Plasmid-DNA gemäß Abschnitt 2.4.10

2.4.13 Identifizierung und Isolierung Antigen-bindender Fab-Klone

Die angereicherten spezifisch bindenden Fab-Phagen dominieren zwar das Phagenkollektiv; ein kleinerer Teil besteht allerdings in unspezifischen bindenden Phagen, so daß eine Überprüfung einzelner gepickter Klone notwendig ist. Zu diesem Zweck wird die nach jeder Panning-Runde gewonnene Plasmid-DNA, in der sich die Diversität der Phagenbibliothek widerspiegelt, präpariert und zur Überprüfung der Anreicherung mittels Produktion löslicher Fab-Fragmente im Periplasma von *E. coli* eingesetzt. Für diese Produktion wird das Gen-III-DNA-Fragment aus der Plasmid-Bibliothek ausgeschnitten, wodurch die translationale Fusion des Fab-Segments mit dem Gen III Protein zerstört wird. Nach Religation wird der Pool der Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* XL1 Blue zur periplasmatischen Expression transformiert. Die Expression des Fab-Fragmentes wird bei Einzelkolonien mit IPTG-Gabe durch den lac-Promotor induziert und bis zu fünffach gesteigert. Die exprimierten Fab-Fragmente werden mittels mehrerer Gefrier/Auftau-Zyklen aus dem Periplasma isoliert. Die Bindungsstärke der einzelnen Klone wird abschließend in einem ELISA auf Zeta-Ketten-BSA-Konjugat getestet. Die dabei erhaltenen relativen

Absorptionen werden ins Verhältnis gesetzt, indem positive Klone der letzten Panning-Runden mit Klone vor der ersten Selektion verglichen werden.

Versuchsablauf:

- Doppelverdau von 2 µg Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen SpeI/NheI und Auftrennung im Agarosegel gemäß Abschnitt 2.4.4 und 2.4.5
- Isolation der etwa 3600 bp großen Bande und Religation gemäß Abschnitte 2.4.6 und 2.4.8
- Transformation und Ausplattieren auf Carbenicillin-LB-Platten; Inkubation o/n bei 37°C
- Einzelkolonien picken und in 100 µl LB-Medium resuspendieren.
- Inokulation von 10 ml SB Medium (50 µg/ml Carbenicillin, 20 mM MgCl₂) mit 10 µl dieser Bakteriensuspension; Inkubation für 6 h bei 37°C unter Schütteln
- Induktion des lac-Promotors mit Isothiogalaktopyranosid (IPTG) Endkonzentration: 1 mM; Inkubation o/n bei 30°C.
- Abzentrifugieren der Übernachtskulturen bei 2000 x g und 4°C für 20 Minuten
- Resuspendieren des Zellpellets in 1 ml PBS; viermaliges Einfrieren/Auftauen für jeweils 5 Minuten bei -70°C respektive +36°C
- Abzentrifugieren und Überstand als Periplasmaisolat für geeigneten ELISA bei -20°C aufbewahren.

2.4.14 Isolierung N-terminal bindender scFv-Fragmente mittels Phage-Display

Konstruktionsbedingt bringen bispezifische Antikörper eine N- und C-terminale Position im single-chain-Format mit sich. Nicht alle antigenbindenden single-chain-Fragmente tolerieren eine Blockade ihres N-Terminus. Aus diesem Grund wird eine Surrogat-Domäne N-terminal vor die variablen Domänen des Antikörpers kloniert, um schon im Rahmen des Pannings single-chain-Fragmente zu erhalten, die ihre Bindungseigenschaften trotz blockierten N-Terminus beibehalten (Abbildung 10). Die Klonierung der Surrogat-Domäne N2 des Gen-III-Produkts erfolgt PCR-basiert mit Primern, die die DNA-Sequenz der Aminosäuren 87-217 (Beck et al., 1981) aus mit M13-Phagen infizierten *E.colis* amplifizieren.

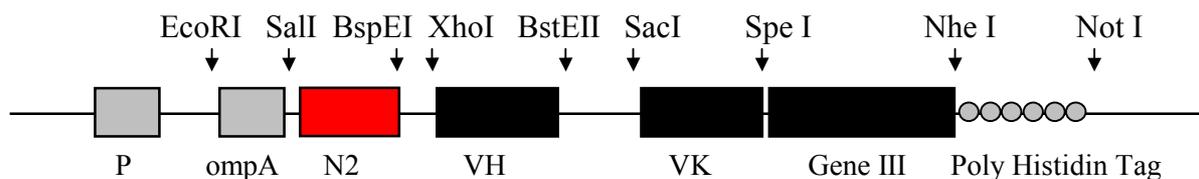


Abb. 10: Schematische Darstellung der Klonierkassette des neuen Phage-Display Phagemids pComb3H5BHis mit wichtigen Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen.

Herstellung des pComb3H5BHis Phagemids:

- Einführung einer DNA-Sequenz, die für 6 Histidine, mittels Ligation eines phosphorylierten Doppelstrangoligonukleotids (His6s und His6as) kodiert; Subklonierung unter Ausnutzung der NheI-Schnittstellen im Oligonukleotid in pComb3H; Sequenzierung des neuen Phagemids pComb3HHis
- Einführung der N2-Domäne in pComb3HHis mittels gerichteter PCR-Subklonierung des mit den Primern 5'N2SalI und 3'N2BspEI generierten N2-Amplifikats; Sequenzierung des neuen Phagemids pComb3H5BHis.

Das so modifizierte Phagemid kann damit zur Selektion eines scFv-Fragmentes aus einem präimmunisierten Repertoires eingesetzt werden. Die Generierung eines immunen Repertoires gegen das tumorassoziierte Antigen 17-1A (EpCAM) erfolgt durch die Injektion von löslichem 17-1A Antigen in eine 10 Wochen alte F1-Maus einer balb/c x C57 black Kreuzung und ist in Abschnitt 2.3.5 beschrieben. Die Vorgehensweise bei dem sich anschließenden Phage Display ist identisch mit der in Abschnitt 2.4.12. Die Identifikation der trotz N-terminaler Blockade bindenden scFv-Fragmente erfolgt mit einem ELISA, der an löslichem EpCAM-Antigen gebundene, aus Periplasma isolierte scFv-Fragmente nachweist (gemäß Abschnitt 2.4.13).

2.4.15 Klonierung der variablen Regionen des Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers

Die Hintergründe und die Beschreibung der Klonierung der variablen Regionen des Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers wird im Ergebnisteil (Abschnitt 3.9) beschrieben. An dieser Stelle wird lediglich das experimentelle Vorgehen abgehandelt.

Versuchsablauf:

- Isolation der Gesamt-RNA des 2-B-5 Hybridoms aus 5×10^6 Zellen gemäß Abschnitt 2.4.1
- Spezifische reverse Transkription der RNA getrennt für die mu-Kette und kappa-Kette mit zwei cDNA-Primern ratcmuRT bzw ratckRT gemäß Abschnitt 2.4.2
- Denaturierung der cDNA bei 94°C für 4 Minuten
- Addition des poly-G-Schwanzes zur cDNA durch folgenden Ansatz:

	Volumen
CDNA	10 μ l
MgCl ₂ (40 mM)	2 μ l
DTT (2 mM)	2 μ l
DGTP (2 mM)	2 μ l
KH ₂ PO ₄ (200 mM)	1 μ l
Σ	17 μ l

- Abkühlung des Ansatzes auf 37°C; Zugabe von 3 μ l TdT (5 U./ μ l); Inkubation für 25 Minuten bei 37°C; Denaturierung des Enzyms für 5 Minuten bei 70°C
- Amplifikation der Ansätze per PCR mit folgenden Primern:
 - für die konstante Region der mu-Kette: 5'-AncTail und 3'ratcmu
 - für die konstante Region der kappa-Kette: 5'-AncTail und 3'ratek
- unter Standardbedingungen gemäß Abschnitt 2.4.3
- Subklonierung der Amplifikate in entsprechend präparierten Bluescript KS Plasmid-Vektor (Genebank Accession No X52327) mit Restriktionsverdau (Abschnitt 2.4.4), Ligation (Abschnitt 2.4.8) und Transformation (Abschnitt 2.4.9):
 - für die konstante Region der mu-Kette: *EcoRI/SpeI*
 - für die konstante Region der kappa-Kette: *EcoRI/XbaI*
- Analyse der resultierenden Bakterien-Kolonien mittels PCR; Plasmid-Präparation ausgewählter Klone (Abschnitt 2.4.10); Isolierung und Sequenzierung einzelner Plasmide (Abschnitt 2.4.11)

- Amplifikation geeigneter Klone in einem zweiten PCR-Ansatz mit folgenden Primern:
 - für die konstante Region der mu-Kette: 5'-RVHZZhoI und 3'-ratemu
 - für die konstante Region der kappa-Kette: 5'-RVKZSacI und 3'-ratek
- Subklonierung der Amplifikate in entsprechend präparierten Bluescript KS Plasmid-Vektor mit Restriktionsverdau, Ligation und Transformation:
 - für die konstante Region der mu-Kette: *XhoI/SpeI*
 - für die konstante Region der kappa-Kette: *SacI/XbaI*
- Analyse der resultierenden Bakterien-Kolonien mittels PCR; Plasmid-Präparation ausgewählter Klone; Sequenzierung einzelner Plasmide
- Expression funktionell erscheinender Sequenzen im bakteriellen Expressionssystem gemäß Abschnitt 2.4.13 und Kontrolle der Bindungsfunktion im ELISA gemäß Abschnitt 2.3.8.

2.4.16 Konstruktion bispezifischer single-chain Antikörper

Da die Konstruktion des bispezifischen single-chain Antikörpers anti-zeta-Kette/anti EpCAM ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist, wird hier nur die experimentelle Vorgehensweise dargestellt. Die Klonierungsstrategie ist in Abschnitt 3.10 des Ergebnisteils beschrieben.

Versuchsbeschreibung:

- PCR-Amplifikation der VL- und VH-Sequenzen der 2-B-5 Spezifität mit den Plasmid-Vektoren als Template unter Verwendung folgender Primer:
 - Für die Anti-Zeta-Ketten VL-Domäne: 5'VL2B5BsrGI-EcoRV und 3'VL2B5GS15
 - Für die Anti-Zeta-Ketten VH-Domäne: 5'VH2B5GS15 und 3'VH2B5BspEI,
 Fusions-PCR der beiden Amplifikate mit den äußeren Primern (5'VL2B5BsrGI-EcoRV und 3'VH2B5BspEI), Subklonierung des EcoRV/BspEI-verdauten Amplifikats in entsprechend präparierten pBluescript Vektor, der zusätzlich eine Leadersequenz zur Sekretion enthält.
- Analyse der resultierenden Bakterien-Kolonien mittels PCR; Plasmid-Präparation ausgewählter Klone (Abschnitt 2.4.10); Sequenzierung einzelner Plasmide (Abschnitt 2.4.11)
- Einführung einer DNA-Sequenz als Polylinker (mit Schnittstellen für die Enzyme EcoRI, EcoRV, BspEI, XhoI, NotI, Sall) für nachfolgende Subklonierungen mittels Ligation eines phosphorylierten Doppelstrangoligonukleotids (NS3s EcoRI und NS3as Sall); Subklonierung unter Ausnutzung der EcoRI- und Sall-Schnittstellen im Oligonukleotid in den Vektor pBluescript KS; Sequenzierung des neuen Plasmids BS-NS3
- Erneute Umklonierung mit EcoRI/BspEI inklusive des Leaders in das Plasmid BS-NS3; Sequenzierung des neuen Plasmids BS-NS3-L-VLVH2B5
- Analyse der resultierenden Bakterien-Kolonien mittels PCR; Plasmid-Präparation ausgewählter Klone (Abschnitt 2.4.10); Sequenzierung einzelner Plasmide (Abschnitt 2.4.11)
- Umklonierung der DNA-Sequenz eines stark EpCAM-bindenden Klons, der die N-terminale Blockade toleriert mit BspEI/NotI in das das scFv-Fragment enthaltende Bluescript Plasmid BS-NS3-L-VLVH2B5.
- Umklonierung der kompletten Sequenz des bispezifischen scFv Antikörpers mit EcoRI / Sal I in den entsprechend präparierten eukaryontischen Expressionsvektor pEF-DHFR.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung eines Zeta-Ketten spezifischen Antikörpers mit Hilfe eines murinen Hybridoms

3.1.1 Herstellung des Zeta-Ketten-Carrier-Konjugats

Die Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette, die aus 9 Aminosäuren besteht, wurde an zwei unterschiedliche hochmolekulare Proteine gekoppelt, die als Trägermoleküle (sogenannte Carrier) fungieren. Als Carrier wurden bovines Serum-Albumin (BSA) und das Hämocyanin (Keyhole limpet haemocyanin = KLH) der Schlüssellocknapfschnecke *Megathura crenulata* gewählt. Diese Carrier werden bei Immunisierungen eingesetzt, da sie in fast allen Wirbeltieren eine ausgeprägte Immunantwort hervorrufen können, die sich gleichzeitig gegen das angekoppelte niedermolekulare Peptid richtet. Es wurden zwei sich stark unterscheidende Carrier aus phylogenetisch weit entfernten Spezies gewählt, um als einzige gemeinsame antigene Determinante die Zeta-Kette zu erhalten. Diese Vorgehensweise erlaubt die Immunisierung mit dem Zeta-Ketten-KLH-Konjugat und einen sich anschließenden Detektionsschritt zur Selektion des spezifisch bindenden Hybridoms, bei dem das Zeta-Ketten-BSA-Konjugat eingesetzt wird. Durch den Wechsel des Carriers sollen vornehmlich Antikörper detektiert werden, die die Zeta-Kette als gemeinsame antigene Determinante aufweisen; falsch-positive Ergebnisse, bei dem Antikörper detektiert werden, die sich gegen den Carrier richten, sollen dagegen weitgehend eliminiert werden.

Zusätzlich zu den 9 Aminosäuren der Extrazellulärdomäne wurden zwei weitere Aminosäuren der Transmembrandomäne hinzugenommen, da sich an Position 11 ein Cystein befindet, dessen Mercapto-gruppe eine gerichtete Kopplung in korrekter Orientierung an das Maleinimid-aktivierte KLH- bzw. BSA-Konjugat ermöglicht. Die letztendlich zur Kopplung verwendete Sequenz lautet damit im Ein-Buchstaben-Kode: QSFGLDPKLC (vom N- zum C-Terminus gelesen). Die Kopplung wurde in einer Auftragsarbeit bei der Firma Jerini Bio Tools in Berlin durchgeführt.

3.1.2 Generierung muriner monoklonaler Antikörper gegen die Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette

In einem ersten Ansatz wurde das Zeta-Ketten-KLH-Konjugat zur Immunisierung von drei F1-Mäusen einer balb/c x C57-black-Kreuzung mit komplettem Freundschens Adjuvans (Mineralöl, Lanolin und abgetötete Mykobakterien) emulgiert und intraperitoneal injiziert. Die Verwendung von komplettem Freundschens Adjuvans bei der Erstimmunisierung im Gegensatz zu inkomplettem Adjuvans (wie oben, jedoch ohne Mykobakterien) bei Zweit- (sogenannten Booster-) Immunisierungen dient der Steigerung der Immunogenität der Injektion, die eine verbesserte Immunantwort hervorrufen soll. Zur Erfolgskontrolle der Immunisierung wurden die Serumtiter von immunisierten mit denen von unimmunisierten Mäusen per ELISA auf immobilisiertem Zeta-Ketten-BSA-Konjugat verglichen. Der Farbumschlag des Substrats, der durch den Peroxidase-konjugierten Anti-Maus-Sekundärantikörper katalysiert wurde, zeigt einen vergleichsweise 1000-fach höheren Titer im Serum der immunisierten

Mäuse. Daraufhin wurden die Mäuse nach der zweiten Boosterung euthanasiert, die Milz entnommen, die Milzzellen vereinzelt und anschließend mit P3X63Ag8.653-Zellen, einem nicht-Antikörperproduzierenden Myelom fusioniert. Die Fusion erfolgte nach üblichen Routineprotokollen, und die fusionierten Zellen wurden in zehn 96-Well-Platten mit HAT-Medium unter Selektionsbedingungen ausgesät. Die Zellkulturüberstände von erfolgreich fusionierten Zellen wurden anschließend auf die Existenz von Zeta-Ketten-reaktiven Antikörpern mit Zeta-Ketten-BSA-Konjugat getestet. Die Versuche zur Hybridomgenerierung wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Dr. E. Kremmer, GSF, München durchgeführt.

In 150 auf diese Weise getesteten Zellkulturüberständen zeigten sich unterschiedlich stark positive ELISA-Signale (Daten nicht gezeigt). Die Überstände der positiven Klone wurde in einem weiteren Versuch daraufhin untersucht, ob sie in der FACS-Analyse an zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und NK-Zellen binden.

3.1.3 FACS-Analyse der Zellkulturüberstände der murinen Anti-Zeta-Ketten-Hybridome

Die Bindung der Anti-Zeta-Ketten Hybridomüberstände an CTL und NK-Zellen erfolgte per FACS-Analyse mit Hilfe einer Dreifach-Fluoreszenz-Markierung. Die Bindungsaktivität der Hybridomüberstände wurde durch die Inkubation von isolierten PBMCs mit unverdünntem Überstand getestet; gebundene Antikörper wurden durch einen FITC-konjugierten Kaninchen Anti-Maus-Antikörper nachgewiesen. Um die beiden Zellpopulationen sicher unterscheiden zu können, wurden zwei Fluoreszenzen zur Definition der Populationen verwandt. Die Definition der zytotoxischen T-Lymphozyten erfolgte über einen Tricolor-konjugierten Anti-CD8-Antikörper, Kontaminationen durch NKT-Zellen (Bendelac et al., 1997; Slifka et al., 2000), wurden durch einen PE-konjugierten Anti-CD16-Antikörper eliminiert. Die Population der NK-Zellen wurde mit Hilfe eines PE-konjugierten Anti-CD56-Antikörper definiert, T-Zell-Kontaminationen wurden durch einen Tricolor-konjugierten Anti-CD3-Antikörper ausgeschlossen.

Die anschließende Auswertung der einzelnen FACS-Ergebnisse zeigte, daß keiner der 150 Hybridomüberstände beide Zellpopulationen gleichzeitig anzufärben vermochte (Daten nicht gezeigt).

3.2 *In vitro*-Selektion von Anti-Zeta-Ketten-Antikörpern aus einer murinen kombinatorischen Antikörperfragment-Bibliothek mittels Phage-Display

In einem zweiten Versuch, einen Zeta-Ketten-spezifischen Antikörper zu isolieren, wurde eine *in vitro*-Selektionsmethode angewandt, die es ermöglicht, ein großes Repertoire von leichten und schweren Antikörper-Ketten miteinander zu kombinieren und auf der Oberfläche filamentöser M13-Phagen zu exprimieren. Eine Anreicherung Antigen-bindender Spezifitäten aus dieser kombinatorischen Antikörperbibliothek wurde durch eine wiederholte Selektion mit dem Antigen erreicht, indem nicht-bindende Phagen eliminiert und bindende Phagen expandiert wurden (Hoogenboom et al. 1998, Hoogenboom 1997, Abelson 1996, Burton 1995, Winter et al. 1994, Burton & Barbas 1993). Diese Technik ermöglicht die Selektion auch seltener Antikörperfragmente entweder aus dem naiven

Antikörper-Repertoire nicht-immunisierter Tiere oder menschlicher Spender sowie auch aus präimmunisierten Versuchstieren.

Für die Isolation Zeta-Ketten-spezifischer Antikörperfragmente mit der Phage-Display-Methode wurden Mäuse mit dem Zeta-Ketten-KLH-Konjugat immunisiert und nach nachgewiesenem Serumtiteranstieg euthanasiert. Nach Entnahme der Milz und Zellvereinzellung wurde die Gesamt-RNA dieser Zellen isoliert und zur Amplifikation von Fd-Fragmenten schwerer Ketten bzw. von leichten Ketten mittels RT-PCR eingesetzt. Nach der reversen Transkription der mRNA in cDNA wurden vier subklassenspezifische 3'-Primer des Immunglobulin-Isotyps Gamma (IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3) mit jeweils acht 5'-Primern, die an die verschiedenen Subfamilien der variablen Regionen der schweren Kette binden, zur Amplifikation miteinander kombiniert. Auf diese Weise wurde ein möglichst breites Spektrum der aktuellen Immunantwort abgedeckt. 95% der murinen leichten Ketten gehören der Kappa-Subklasse an, so daß ein Kappa-spezifischer 3'-Primer mit sieben Subfamilien-spezifischen 5'-Primern für die variablen Regionen der Kappa-leichten-Ketten kombiniert wurde, um diesen Teil des Repertoires abzudecken. Bei der anschließenden Subklonierung des Leichte-Ketten-Repertoires in den Phagemid-Vektor wurden alle so amplifizierten Subfamilien äquimolar eingesetzt, um eine zahlenmäßig ausgewogene Repräsentation der einzelnen Subfamilien am Gesamtpool zu gewährleisten. Nach der Ligation wurde die entstandene Leichte-Ketten-Bibliothek in *E.coli* XL1 blue elektroporiert und durch Inkulturnahme über Nacht vermehrt. Die Vektor-Präparation dieser Leichte-Ketten-Bibliothek erfolgte unter quantitativen Gesichtspunkten, damit durch die nun folgende Kombination mit dem Schwere-Ketten-Repertoire eine möglichst große Ausgangsbibliothek entstehen konnte. Daraus wurden dann durch das Panning mit dem Antigen diejenigen Kombinationen aus leichten und schweren Antikörperketten mit der höchsten Affinität isoliert. Die Bestimmung der Phagentiter nach Elektroporation sowohl der leichten Ketten allein als auch nach der Klonierung der schweren Ketten in *E.coli* XL1 blue ergab eine Gesamtgröße der Ausgangsphagenbibliothek von 2×10^8 unabhängigen Klonen, die bereits durch die Präimmunisierung der Mäuse ein fokussiertes Antikörperrepertoire aufweisen sollten.

Mit Hilfe des Helferphagen VCSM13 wurden die plasmidal vorliegenden Genotypen aller Fab-Phagen der Bibliothek von den *E.coli*-Zellen auf Phagenpartikel exprimiert und in das Kulturmedium sezerniert. Im Rahmen einer solchen Übernachtskultur kommt es zu einer Amplifikation jedes Fab-Phagens durchschnittlich um den Faktor 1000 (Barbas et al., 1991). Nach dieser Amplifikationsphase wurden diese durch Fällen aus dem Medium geerntet, wieder gelöst, der Titer bestimmt („input“ in die folgende Panning-Runde) und alternierend entweder mit immobilisiertem Zeta-Ketten-BSA-Konjugat oder mit intakten CTL bzw. NK-Zellen inkubiert. Durch Waschschrte wurde dann der Anteil nicht-gebundener Fab-Phagen verringert. Gebundene Phagen hingegen wurden sauer eluiert und anschließend sofort neutralisiert. Nach dieser Selektion potentiell Antigen-bindender Fab-Phagen wurden uninfizierte *E.coli*-Zellen in hohem Überschuß mit den selektierten Phagen quantitativ infiziert. Ein kleines Zellaliquot wurde nach der Infektion entnommen und es wurde die Gesamtzahl der selektierten Phagen, der sogenannte „output“ einer Panning-Runde bestimmt. Nach der Reinfektion wurden die selektierten Fab-Phagen wieder mit Hilfe des Helferphagen exprimiert, amplifiziert, geerntet, auf Antigen bzw. Zellen selektiert, mit den „output“-Phagen erneut *E.coli*-Zellen reinfiziert und so fort. Im Grunde besteht also jede Panning-Runde aus dem Ernten der amplifizierten Fab-Phagen, der Selektion bindender Fab-Phagen auf dem Antigen, der Reinfektion und der anschließenden Expression und Vermehrung. Durch Aneinanderreihen mehrerer Panning-Runden sollte so eine dominante Selektion Antigen-bindender

Fab-Klone erreicht werden. Der schematisierte Versuchsablauf einer Panning-Runde ist in Abbildung 9 im Methodenteil dargestellt. Als ein Zeichen für das dominante Auftreten bindender Fab-Phagen sollte auch das Ansteigen des Output-Titers über den normalen Hintergrund von etwa 10^5 bis 10^6 pfu gewertet werden. Beim vorliegenden Panning zeigte sich der in Tab. 2 aufgeführte Verlauf der In- und Outputtiter.

Tab. 2: In- und Output-Titer des Pannings auf die Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette, die alternierend auf BSA, auf CTL und NK-Zelloberfläche präsentiert wurde.

Panning-runde	Antigen-präsentation auf	Input-Titer (pfu)	Output-Titer (pfu)
1	BSA	3×10^{11}	7×10^5
2	BSA	5×10^{11}	3×10^6
3	BSA	5×10^{11}	2×10^7
4	CTL	2×10^{11}	7×10^6
5	NK	1×10^{11}	5×10^6
6	BSA	2×10^{11}	2×10^8
7	CTL	3×10^{11}	1×10^9
8	NK	1×10^{11}	2×10^8

Zur Identifizierung von an die Zeta-Kette bindenden Klonen wurde der Plasmidpool aus den Fab-Phagenproduzierenden *E.coli*-Zellen nach der achten Runde präpariert. Diese Plasmidpräparation enthielt die Summe der genetischen Information aller bis zu diesem Zeitpunkt selektierten und amplifizierten Fab-Phagen in plasmidaler Form, wobei das Fd-Fragment der jeweiligen schweren Kette an die trunkierte GenIII-Variante gekoppelt ist. Zur Produktion löslicher Fab-Fragmente wurde das GenIII-DNA-Fragment aus dem Plasmidpool ausgeschnitten. Die Plasmide anschließend durch Ligation rezirkularisiert. Nach Transformation in *E.coli* wurden Einzelkolonien ausgewählt, die jeweils ein Fab-kodierendes Plasmid enthielten. Diese Einzelklone wurden dann kultiviert, die Fab-Produktion in das Periplasma induziert und das Fab-Fragment-haltige Periplasma präpariert. Die Periplasma-Präparationen dieser Klone wurden im ELISA auf ihre Reaktivität mit dem Zeta-Ketten-BSA-Konjugat getestet, um Bakterienklone, die funktionelle Antigen-bindende Fab-Fragmente produzieren, zu identifizieren. Die Detektion der gebundenen Fab-Fragmente erfolgte über einen Peroxidase-konjugierten Ziege-Anti-Maus-IgG + IgM-Antikörper, der einen Farbumschlag des Substrats durch die Peroxidase katalysierte, der bei 405 nm mit einem Photometer gemessen wurde.

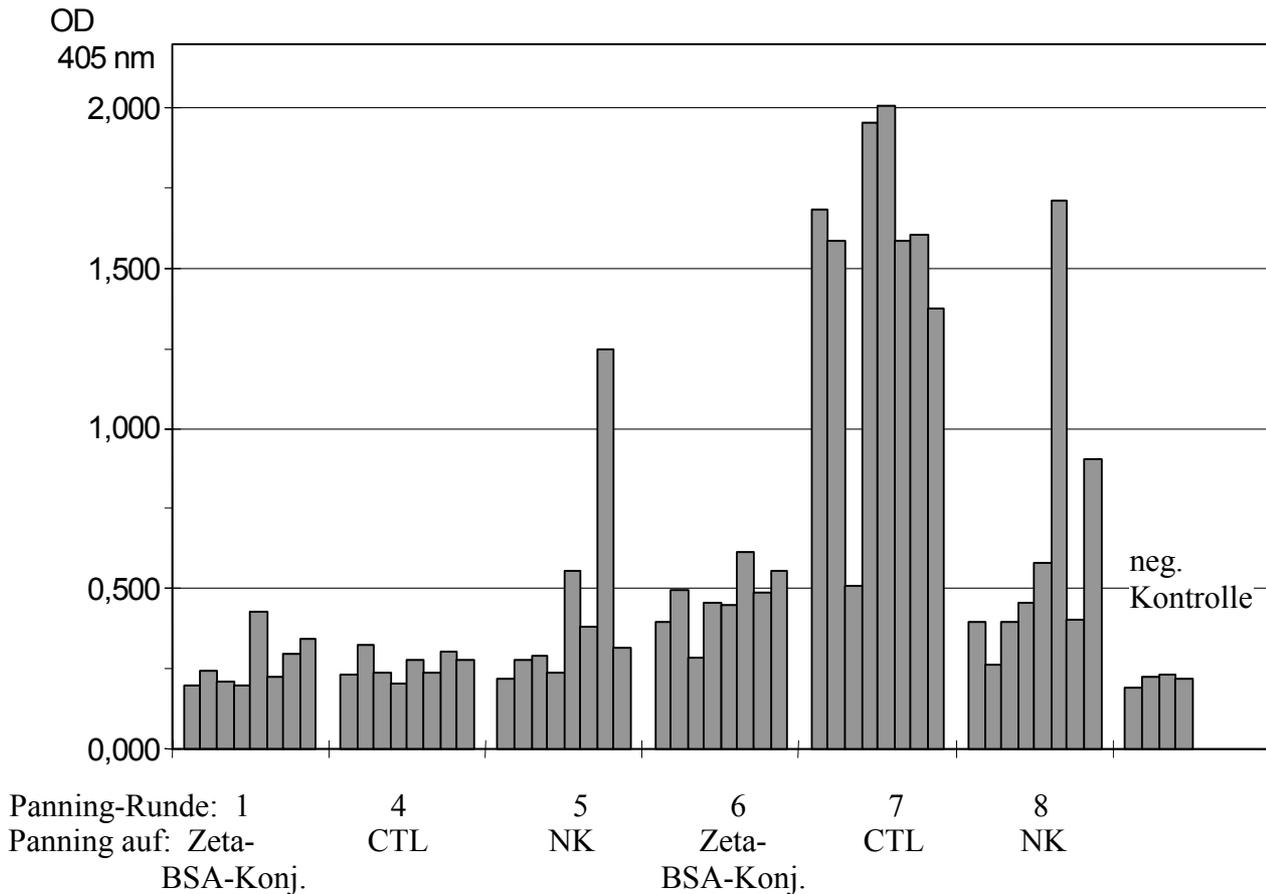


Abb. 11: ELISA-Analyse der murinen Fab-Fragmente, die mittels Phage Display für die Bindung an die Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette auf Konjugat bzw. auf Zellen selektiert wurden. Inkubation der Periplasma-Präparationen der löslichen, in *E.coli* exprimierten Fab-Fragmente mit immobilisiertem Zeta-Ketten-BSA-Konjugat und Detektion mit einem Peroxidase-konjugierten Anti-Maus-Antikörper. Darstellung der Absorptionswerte bei 405 nm. Als Negativkontrolle fand anstelle des Periplamaisolats PBS Verwendung.

Im Gegensatz zu den Klonen, die aus der Bibliothek vor der *in vitro*-Selektion gewonnen wurden, konnten Klone, die nach ansteigender Panning-Rundenzahl isoliert wurden, deutlich positive ELISA-Signale erzeugen (Abb. 11). Ein auffälliger Frequenzanstieg von bindenden Fab-Klonen konnte in der siebten Panning-Runde beobachtet werden, bei der die Phagen auf isolierten zytotoxischen T-Lymphozyten selektiert wurden. Sieben von acht Klonen, die exemplarisch präpariert wurden, zeigten eine große Affinität zum immobilisierten Zeta-Ketten-BSA-Konjugat. In der darauffolgenden Panning-Runde, die auf isolierten NK-Zellen durchgeführt wurde, veränderte sich die Anzahl positiver Klone drastisch: Nur einer (Klon 90) von acht Klonen vermochte noch ein deutlich positives ELISA-Signal zu erzeugen. Eine Vergrößerung der Stichprobe um weitere 48 Fab-Klone ergab keinen weiteren positiven Klon.

Zur Überprüfung dieser ELISA-Ergebnisse wurde eine durchflußzytometrische Bindungsanalyse der Fab-Fragmente auf PBMCs – wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben – durchgeführt, bei der zwischen CTL und NK-Zellen diskriminiert wurde. Die gebundenen Fab-Fragmente wurden mit einem FITC-konjugiertem F(ab')₂-Fragment eines Ziege-Anti-Maus-IgG + IgM-Antikörpers detektiert. Als Negativkontrolle wurde ein periplasmatisch exprimiertes Fab-Fragment mit irrelevanter Spezifität mitgeführt; unkonjugierte murine Anti-CD16- und Anti-CD6-Antikörper dienten als Positivkontrollen für die FITC-basierte

Detektion der Fab-Fragmente. Unter Verwendung dieses Protokolls wurden 60 verschiedene Zeta-Ketten-BSA-Konjugat-reaktive Klone auf ihre Bindung an PBMCs analysiert. Trotz eindeutiger Bindung der Positivkontrollen vermochte keine der isolierten Periplasma-Präparationen auf der Oberfläche von zytotoxischen T-Lymphozyten oder NK-Zellen zu binden.

Die Sequenzierung der variablen Regionen von acht ausgewählten Klonen aus den Panningrunden 7 und 8 mit den stärksten ELISA-Signalen, darunter auch Klon 90, ergaben nur eine einzige Sequenzwiederholung (zwei Klone erwiesen sich in ihrer Sequenz als identisch) neben sechs weiteren verschiedenen VL- und VH-Sequenzen. Die Analyse der hypervariablen Bereiche, die nach Kabat et al. (1979) definiert wurden, ergab keine erkennbaren, sich wiederholenden Sequenzmotive auf Aminosäureebene (Sequenzen nicht aufgelistet).

3.3 Generierung eines Ratten-Hybridoms gegen die Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette

Die Generierung eines Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers wurde alternativ zum Maus-Hybridom mittels eines Ratten-Hybridoms durch die Immunisierung von Spargue-Dawley-Ratten versucht. Dieser Ansatz wurde – bis auf eine Modifikation – analog dem der Mäuse-Immunisierung durchgeführt. Die Änderung beruhte auf einer Präimmunisierung der Tiere mit 10^7 intraperitoneal injizierten Zellen der humanen T-Zelllinie Jurkat. Nach einer Zweitimmunisierung mit dem Zeta-Ketten-KLH-Konjugat wurde eine ELISA-basierte Erfolgskontrolle durchgeführt. Dazu wurde Ratten-Serum vor und nach der Immunisierung gewonnen und mit immobilisiertem Zeta-Ketten-BSA-Konjugat inkubiert. Im Serum vorhandene Konjugat-reaktive Antikörper wurden anschließend mit einem Peroxidase-konjugierten Anti-Ratten-Antikörper nachgewiesen. Dabei zeigte sich ein vergleichsweise 800-fach stärkeres Signal nach der Immunisierung, so daß diese als erfolgreich eingestuft wurde. Das weitere Vorgehen ist mit dem der Herstellung des Mäuse-Hybridoms (Abschnitt 3.1.2) identisch und wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Dr. E. Kremmer, GSF, München durchgeführt.

Die Zellkulturüberstände von 45 Ratten-Hybridom-Klonen zeigte im ELISA auf immobilisiertem Zeta-Ketten-BSA-Konjugat starke Signale und wurde aus diesem Grund für eine eingehendere durchflußzytometrische Bindungsanalyse auf CTL und NK-Zellen ausgewählt. Das Nachweisverfahren für die Detektion von auf der Zelloberfläche gebundenen Ratten-Antikörpern war mit dem bei dem Mäuse-Hybridom eingesetzten deckungsgleich. Lediglich der verwendete Sekundärantikörper wurde der Spezies Ratte angepaßt; so kam ein FITC-konjugierter Ziege-Anti-Ratten-Antikörper (IgG + IgM) zum Einsatz. Von den 45 untersuchten Ratten-Hybridom-Klonen war lediglich der Antikörper des Klons 2-B-5 in der Lage, auf beiden Zielpopulationen zu binden. Diese Antikörper besitzen den IgM-Isotyp. Die zwei Fluoreszenzen, die die Zugehörigkeit zu den relevanten Zellpopulationen (Phänotyp der CTLs: $CD8^+ CD16^-$; Phänotyp der NK-Zellen: $CD56^+ CD3^-$) definieren, sind in der Abbildung 12 ausgeblendet; die Abbildung wurde somit auf die relevante Fluoreszenz beschränkt, so daß die Bindung der Anti-Zeta-Ketten-Antikörper in einem Histogramm-Blot darstellbar ist. Als Isotypkontrolle wurde ein Ratten-Antikörper mit irrelevanter Spezifität eingesetzt. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Färbung von zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen bei zwei gesunden Spendern (Abbildung 12).

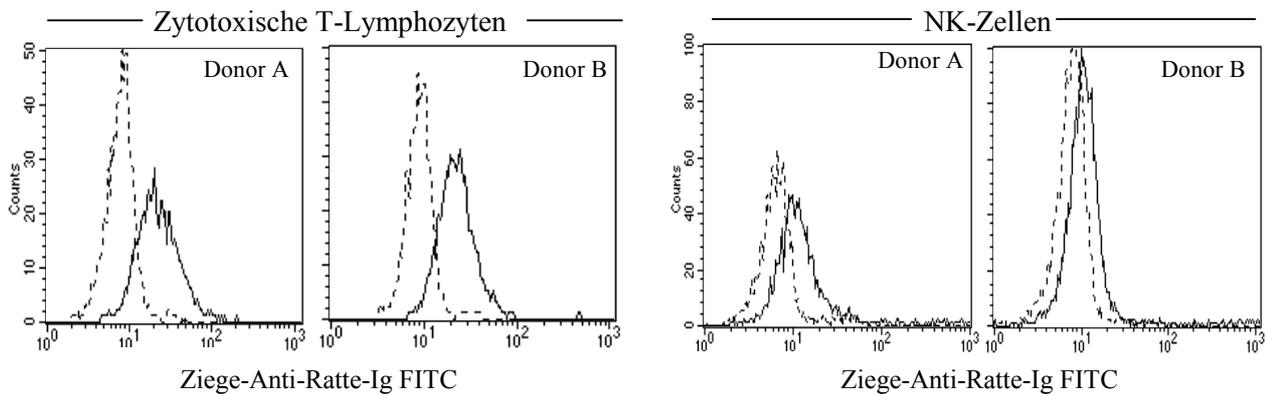


Abb. 12: Durchflußzytometrische Bindungsanalyse des Zeta-Ketten-spezifischen Antikörpers 2-B-5 auf der Zelloberfläche von zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen. Inkubation 100.000 PBMCs zweier gesunder Donoren mit unverdünntem Zellkulturüberstand des Rattenhybridom-Klons 2-B-5. Detektion gebundener Antikörper mit einem FITC-konjugierten Ziege-Anti-Ratte-Ig (IgG + IgM)-Antikörper. Die fluoreszenz-basierte Diskriminierung der CTLs ($CD8^+$ $CD16^-$) und der NK-Zellen ($CD56^+$ $CD3^-$) ist in der Abbildung nicht dargestellt. Eine Isotypkontrolle (gestrichelte Linie) mit irrelevanter Spezifität wurde mitgeführt.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigen eine deutliche Anfärbung der zytotoxischen T-Lymphozyten beider Donoren durch den 2-B-5 Antikörper. Die Anfärbung der NK-Zellen mit dem 2-B-5 Antikörper erweist sich als schwächer und zeigt sich donorabhängig. Diese FACS-Analyse wurde darüber hinaus mit zehn weiteren Donoren durchgeführt; die hier dargestellten Anfärbungen sind repräsentativ für die gewonnenen Ergebnisse.

3.4 Kompetitive Blockade der Antikörperbindung auf zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen

Eine einfache Methode, die Spezifität der Antikörperbindung auf Zellen nachzuweisen und damit gleichzeitig unspezifische oder Fc-Teil-vermittelte Bindungen des Antikörpers auszuschließen, ist der kompetitive Inhibitionsansatz. Werden durch eine Inkubation des Antikörpers mit dem zur Immunisierung eingesetzten Antigen alle Valenzen des Antikörpers abgesättigt und anschließend mit den relevanten Zellen inkubiert, ist zu erwarten, daß sich die Anfärbung der Zellen durch den Antikörper vollständig inhibieren läßt. Der Nachweis der Bindungsspezifität des Ratten-Antikörpers 2-B-5 wurde durch die gleichzeitige Inkubation des Antikörpers mit dem löslichen Antigen in Form des Zeta-Ketten-BSA-Konjugats durchgeführt. Der anschließende Färbeansatz auf Zellen wurde analog zu dem in Abschnitt 3.3 beschriebenen durchgeführt. Das Ergebnis der Fluoreszenz-Färbung ist in Abbildung 13 dargestellt.

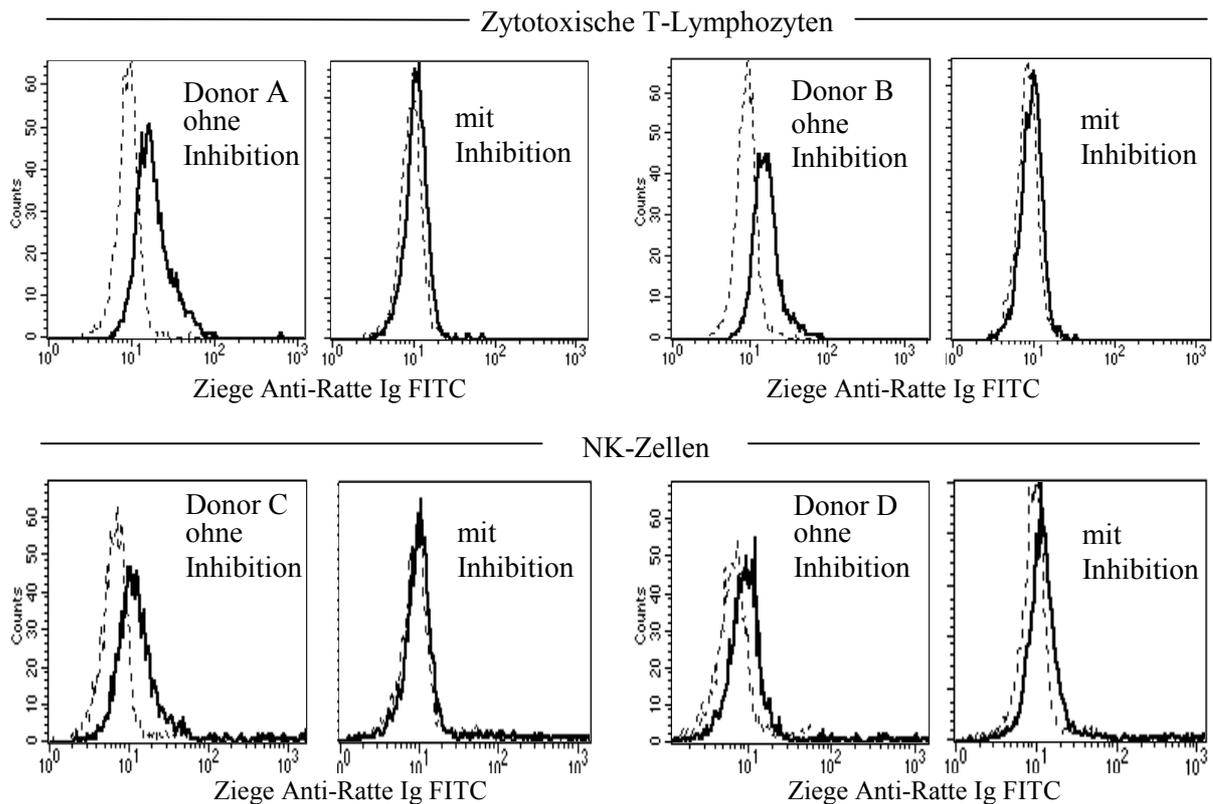


Abb. 13: FACS-Analyse der Bindung des 2-B-5 Antikörpers (schwarze solide Linie) auf zytotoxischen T-Lymphozyten ($CD8^+ CD16^-$) und NK-Zellen ($CD56^+ CD3^-$) verschiedener Spender in An- und Abwesenheit des inhibitorischen Zeta-Ketten-BSA-Konjugats. Die Isotypkontrolle ist mit gestrichelter Linie eingezeichnet.

Der nicht-inhibierte Färbeansatz zeigt bei den Spendern auf den zytotoxischen T-Lymphozyten ein deutliches Signal, das sich gut von der mitgeführten Isotypkontrolle irrelevanter Spezifität (gestrichelte Linie) abgrenzt. Der durch die Gegenwart des Zeta-Ketten-BSA-Konjugats inhibierte Färbeansatz weist hingegen keinen Unterschied zur Isotypkontrolle auf; die Färbung ist also als negativ zu betrachten. Die Anfärbung der Zeta-Ketten auf NK-Zellen läßt sich ebenfalls mit Zeta-Ketten-BSA-Konjugat inhibieren, wobei dieser Effekt nicht so deutlich ausfällt, da die positive Färbung in Abwesenheit des Konjugats weniger stark ausgeprägt ist. Das Epitop des zur Immunisierung genutzten Zeta-Ketten-BSA-Konjugats scheint folglich mit dem auf zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen vorhandenen natürlichen Epitop identisch zu sein; die Spezifität der 2-B-5 Antikörperbindung ist damit belegt.

3.5 Charakterisierung des 2-B-5 Antigens durch Immunoblotting

Immunoblotting ist eine Kombination aus Immunopräzipitation und Gelelektrophorese, gefolgt von einem Westernblot, und dient zur Identifizierung des spezifischen Antigens, das durch einen gewählten Antikörper auf Zellen erkannt wird. Der schematische Versuchsablauf ist in Abbildung 14 dargestellt.

Ziel dieses Versuches war es, das Antigen, das vom 2-B-5 Antikörper auf der Zelloberfläche erkannt wird, zu isolieren und zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden Zellen der humanen T-Zelllinie Jurkat mit dem nichtionischen Detergenz Digitonin lysiert und anschließend mit Sepharose-konjugiertem 2-B-5 Antikörper inkubiert. Des Weiteren wurde neben dem Anti-Zeta-Ketten-Antikörper noch ein Epsilon-Ketten-spezifischer Anti-CD3 Antikörper als interne Kontrolle an Sepharose gekoppelt. Diese Kopplung der Antikörper an Sepharose als Trägermolekül ermöglicht eine Separation des gebundenen Antigens von ungebundenen Proteinen des Zellysats durch einfache Zentrifugation. Das Immunopräzipitat wurde nach mehrmaligem Waschen in Gegenwart von reduzierendem Mercaptoethanol hitzedenaturiert, so daß der zur Präzipitation eingesetzte Antikörper das Antigen freigab. Die so präparierten Proben wurden durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Größe entsprechend aufgetrennt und anschließend durch den Transfer der Proteine mittels eines elektrischen Feldes auf eine PVDF-Membran abgeschlossen. Der nun folgenden Charakterisierung des präzipitierten und transferierten Antigens wurde eine Absättigung der freien Protein-Bindungsstellen der Membran durch Inkubation in verdünntem Milchpulver vorausgeschickt. Nach Inkubation mit dem murinen Primärantikörper 6B10, der die Aminosäuren 144-163 der intrazytoplasmatischen Domäne nahe dem Carboxy-Terminus der Zeta-Kette erkennt, erfolgte die Detektion mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Ziege-Anti-Maus-Antikörper. Dieser katalysiert eine Chemilumineszenz-Reaktion und führt so zur Visualisierung des Ergebnisses auf dem Röntgenfilm. Das Ergebnis in Form eines Röntgenfilms zeigt die Abbildung 15.

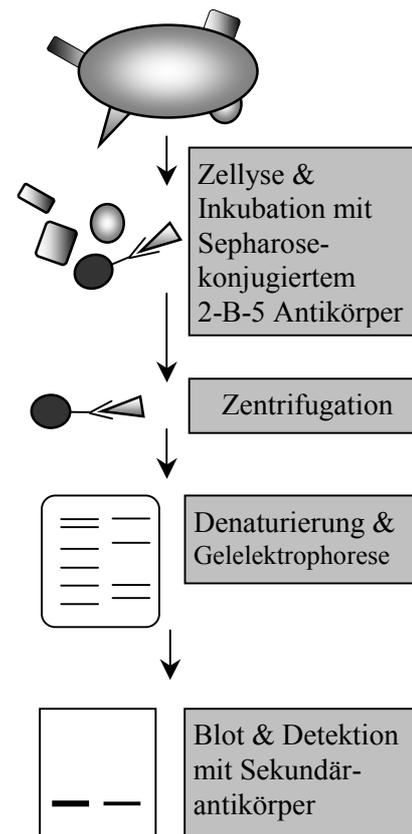


Abb 14: Schematisierter Versuchsablauf des Immunoblottings

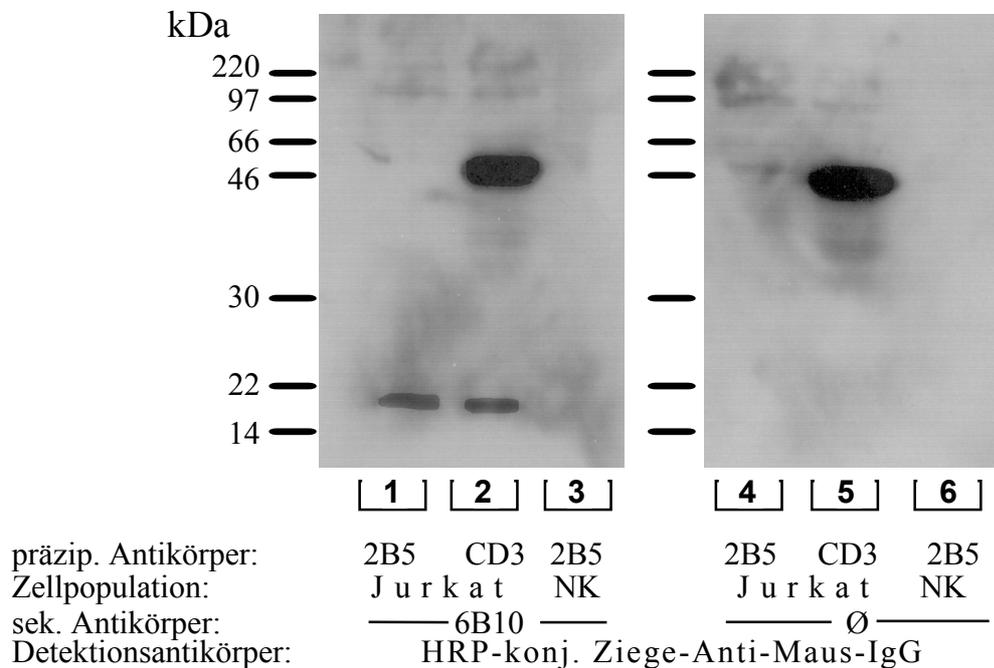


Abb. 15: Immunoblotting des durch den 2-B-5 Antikörper präzipitierten Antigens im Vergleich mit einem Sepharose-konjugierten Anti-CD3-Antikörper zur Präzipitation des Lysats der T-Zelllinie Jurkat und isolierter NK-Zellen. Nachweis des Zeta-Ketten Proteins auf der Membran durch den murinen C-terminal-bindenden Anti-Zeta-Antikörper 6B10. Antikörper-Detektion durch einen Anti-Maus-Antikörper und Visualisierung mittels Chemolumineszenz. Kontrollansatz (rechter Blot) unter Wegfall des Sekundärantikörpers. Größenangaben des mitgeführten Proteinstandards in kDalton.

Ein Vergleich der erhaltenen Banden beider Immunoblotting-Ansätze zeigt eine konsistent starke Bande der Größe 50 kDa in den Spuren 2 und 5 des mit dem murinen Anti-CD3 Antikörper präzipitierten Antigens. Die Verwendung eines Anti-Maus-IgG-Detektionsantikörpers legt nahe, daß es sich hier um Fragmente des zur Präzipitation eingesetzten Maus-Antikörpers handelt. Des weiteren finden sich im Gegensatz zur Kontrolle zwei Banden (Spur 1 und 2) nur auf dem Blot, der mit dem Anti-Zeta-spezifischen Antikörper 6B10 inkubiert wurde. Die beiden Banden der Größe 16 bis 18 kDa finden sich nur im Zellysat der T-Zelllinie Jurkat, jedoch nicht in der Spur 3 des NK-Zellysats.

3.6 Rezeptor-Komplex-Internalisierung nach Bindung des Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers 2-B-5

Für viele Rezeptoren folgt nach einer Aktivierung durch ihren Liganden die Rezeptorinternalisierung. Belege für dieses Phänomen wurden schon früh von Telerman et al. (1987) und Boyer et al. (1991) erbracht. Im speziellen wurde die rasche Internalisierung des T-Zell-Rezeptor-Komplexes auf T-Zellen nach der Bindung von Anti-CD3-Antikörpern beobachtet. Die Internalisierung des Komplexes wird mit

der Signaltransduktion ins Zellinnere nach Aktivierung der Proteinkinase-C bzw. der Protein-Tyrosin-Kinase in Verbindung gebracht. Kann durch die Bindung des 2-B-5 Antikörpers an die Zeta-Kette ebenfalls eine Internalisierung induziert werden, wäre dies ein starker Hinweis auf die biologische Aktivität des 2-B-5 Antikörpers im Hinblick auf sein Signaltransduktionspotential.

Die Induktion der Rezeptorinternalisierung wurde experimentell durch die Inkubation von isolierten PBMCs mit dem 2-B-5 Antikörper bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Nach einer halbstündigen Inkubation der PBMCs mit dem Antikörper unter permissiven Bedingungen bei 37°C wurde mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper das Vorhandensein des Anti-Zeta-Antikörpers auf der Zelloberfläche der Lymphozyten untersucht. Bei einer nicht permissiven Temperatur von 4°C wurde die 2-B-5 Antikörperbindung nachgewiesen, eine Internalisierung hingegen verhindert. Zur Verifikation dieser Resultate mit den publizierten Ergebnissen wurde ein Parallelansatz durchgeführt, bei dem anstelle des 2-B-5 Antikörpers ein Anti-CD3 ϵ -Antikörper eingesetzt wurde. Zu diesem Zweck wurden 200.000 isolierte PBMCs eines gesunden Donors mit Antikörpern gegen die Zeta-Kette bzw. CD3 (je 1 μ g/ml) bei 4°C oder 37°C für 30 Minuten inkubiert. Der Internalisierungsprozeß wurde durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem PBS beendet. Der indirekte Nachweis der Internalisierung wurde durch die nachfolgende Inkubation mit einem FITC-konjugierten Ziege-Anti-Ratten-IgG erreicht. Eine Negativkontrolle, die in der Inkubation der PBMCs nur mit dem Sekundärantikörper bestand, wurde ebenfalls mitgeführt. Die Analyse der Oberflächenfärbung erfolgte mit einem Durchflußzytometer, die Ergebnisse sind in Abbildung 16 als Histogramm dargestellt.

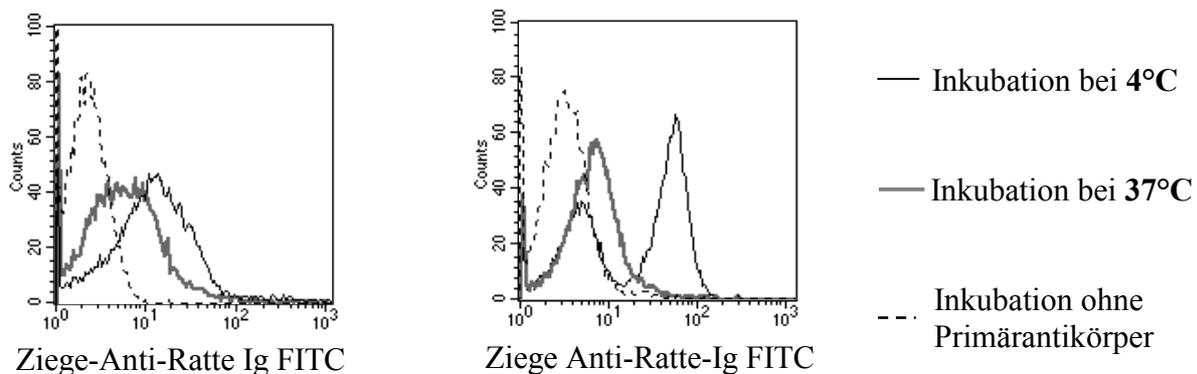


Abb. 16: FACS-Analyse der Rezeptorinternalisierung nach Bindung der Antikörper 2-B-5 bzw. CD3 bei 4°C und 37°C nach 30 Minuten. Detektion der Primärantikörper mittels eines FITC-konjugierten Ziege-Anti-Ratten-Antikörpers.

Die Ergebnisse zeigen deutlich eine Abschwächung der Färbung nach Inkubation der PBMCs mit dem 2-B-5 Antikörper bei 37°C, verglichen mit der Fluoreszenzintensität der Färbung bei 4°C Inkubationstemperatur. Die zu Vergleichszwecken durchgeführte CD3-induzierte Internalisierung zeigt einen ähnlichen Effekt, wenn auch mit einer noch stärkeren Abschwächung der Signalintensität.

3.7 Proliferation von T-Lymphozyten und NK-Zellen nach Stimulation durch den Anti-Zeta-Ketten-Antikörper 2-B-5

Die Aktivierung bzw. Verstärkung einer zellularen Immunantwort geht gewöhnlich mit der Proliferation bestimmter Subpopulationen von Lymphozyten einher, die sich normalerweise im Ruhezustand befinden. So reagieren Lymphozyten auf unterschiedlichste Stimuli mit Proliferation wie z. B. auf Antigen, Superantigen, Cytokine und stimulierende Antikörper. Proliferationsassays geben u.a. Auskunft über die Signaltransduktion via Rezeptoren ins Zellinnere. Zellproliferation als Folge von Stimulation der T-Zellen durch Antikörper, die mit dem T-Zell-Rezeptor Komplex interagieren, ist ein Phänomen, das schon früh beschrieben wurde (Geppert et al., 1986 & 1988). Proliferationsuntersuchungen nach Stimulation mit an Mikrotiterplatten immobilisierten Antikörpern ermöglichen Aussagen über das immunologische Stimulationspotential der eingesetzten Antikörper und bieten damit eine zusätzliche Analysemöglichkeit, die biologischen Effekte des Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers 2-B-5 im Vergleich mit bekannten Antikörpern zu untersuchen, die andere Komponenten des TCR-Komplexes erkennen. Ferner besteht die Möglichkeit, nach Reinigung der beiden Effektorpopulationen das Stimulationspotential des Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers in Bezug auf die getrennten Populationen (CD8⁺ T-Lymphozyten und NK-Zellen) zu untersuchen.

Der erste Schritt des durchgeführten Proliferationsassays bestand in der Immobilisierung der zu untersuchenden Antikörper in verschiedenen Konzentrationen an die Oberfläche von Mikrotiterplatten, in denen die Lymphozytensubpopulationen anschließend kultiviert wurden. Ein wichtiger Bestandteil eines solchen Tests sind, neben dem zu charakterisierenden Antikörper auch geeignete Isotypkontrollen, um die Spezifität der antikörpervermittelten Proliferation zu überprüfen. So wurden neben dem 2-B-5 Antikörper und dem CD3-epsilon-Antikörper als Positivkontrolle auch die jeweiligen Isotypen mit irrelevanter Spezifität mitgeführt. Je 100.000 CD8⁺-T-Lymphozyten, NK-Zellen und unseparierte PBMCs wurden in die mit Antikörpern beschichteten Kavitäten der Mikrotiterplatten ausgesät, für 72 Stunden inkubiert und anschließend die Proliferation der einzelnen Lymphozytensubpopulationen untersucht. Zu diesem Zweck kam ein colorimetrischer Immunoassay zum Einsatz, der auf der Messung der Inkorporation des Thymidin-Analog Bromodeoxyuridin (BrdU) während der DNA-Synthese basiert. Da Zellproliferation die Replikation von zellulärer DNA mit sich bringt, ist die Beobachtung der DNA-Synthese eine mögliche Methode zur Quantifizierung der Proliferation. Die klassische Methode, die sich den [3H]-Thymidin-Einbau in neu synthetisierte DNA zunutze macht, wurde hier durch einen nicht-radioaktiven Ansatz ersetzt, indem das Thymidin-Analogon BrdU anstelle von [3H]-Thymidin verwendet wird. Nach einer initialen Proliferationsphase des Ansatzes wurde durch BrdU-Zugabe die Inkorporation des Analogons in die DNA ermöglicht; 24 Stunden später – nach Fixierung der Zellen – erfolgte dann die Detektion des BrdUs mittels Substratumsetzung durch einen Peroxidase-konjugierten Anti-BrdU-Antikörper mit einem ELISA-Reader. Neben Isotypkontrollen wurden auch Leerwerte (Ansätze ohne Zellen) und systembedingte Hintergrundwerte (Ansätze ohne BrdU-Zugabe) bestimmt. Die in Abbildung 17 dargestellten OD-Werte sind die Mittelwerte des in Triplikaten durchgeführten Tests.

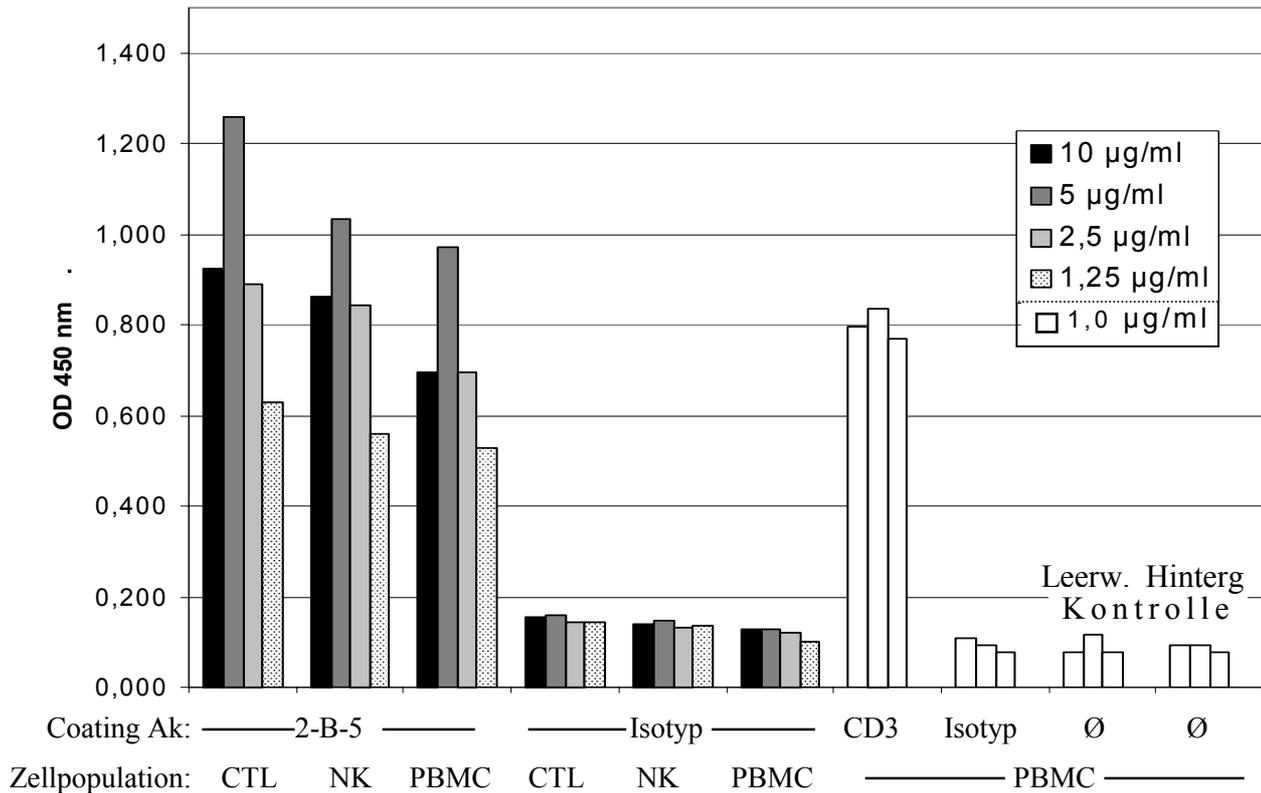


Abb. 17: ELISA-basierter Proliferationsassay zum Nachweis des Stimulationspotentials des Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers 2-B-5 bei $CD8^+$ -T-Zellen, NK-Zellen und unseparierten PBMCs. Beschichtung der Wells mit den Antikörpern 2-B-5 und CD3 sowie deren Isotypkontrollen in angegebenen Konzentrationen und Inkubation von je 100.000 Zellen pro Well für 72 Stunden. Nachweis der Proliferation nach 24 stündiger BrdU-Zugabe durch Detektion des in die DNA inkorporierten BrdUs mit einem Peroxidase-konjugierten Anti-BrdU-Antikörper. Messung des Peroxidase-katalysierten Farbumschlags des Substrats bei 450 nm. Interne Kontrollen bestanden in Leerwerten und Hintergrundkontrollen. Darstellung der Mittelwerte der Triplikatsätze.

Das Ergebnis des Assays zeigt deutlich eine durch den 2-B-5 Antikörper induzierte Proliferation sowohl der unseparierten PBMCs als auch der beiden isolierten Subpopulationen. Des weiteren zeigt sich eine Konzentrationsabhängigkeit von dem zur Beschichtung der Mikrotiterplatten eingesetzten Antikörper; so fallen die Proliferationswerte der Subpopulationen mit sinkenden 2-B-5 Antikörperkonzentrationen von 5 bis 1,25 µg/ml stetig ab. Lediglich die höchste Coating-Konzentration von 10 µg/ml fällt mit seinen niedrigeren Proliferationswerten aus dieser Abhängigkeit heraus. Im Gegensatz dazu bleibt bei einer Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem Ratten-IgM-Isotypantikörper die Proliferation der drei Populationen im Bereich der Negativkontrollen. Eine durch einen irrelevanten Ratten IgM-Antikörpers induzierte Stimulation findet somit nicht statt. Auch eine durch den Prozeß der Separation in zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen induzierte unspezifische Proliferation kann ausgeschlossen werden. Die durch den epsilon-Ketten-spezifischen CD3-Antikörper induzierte Proliferation als Referenz zeigt sich ebenfalls im Vergleich mit der Isotypkontrolle als spezifisch. Das Stimulationspotential des für die Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette spezifischen Antikörpers konnte damit deutlich gezeigt werden.

3.8 Isolierung in C-terminaler Position bindender scFv-Fragmente mittels Phage-Display

Das Format der bispezifischen Single-Chain-Antikörper bringt konstruktionsbedingt eine N- und eine C-terminale Position der antigenbindenden Single-Chain-Fv-Fragmente (scFv) mit sich (Abbildung 18). Mit den Arbeiten von Mack et al. (1995) und Löffler et al. (2000) konnte gezeigt werden, daß scFv-Fragmente prinzipiell im Kontext eines bispezifischen Single-Chain-Konstrukts in der Lage sind, sowohl in N- als auch in C-terminaler Position funktionell ihr Antigen zu binden. In mehreren Fällen zeigte sich allerdings, daß funktionelle scFv-Fragmente ihre Bindungsaktivität in C-terminaler Position innerhalb eines bispezifischen Konstrukts einbüßen (Dissertation F. Zettl). Ein Lösungsansatz für das Problem, nämlich scFv-Fragmente zu identifizieren, an deren N-Terminus eine weitere Antigenbindungsdomäne mit ihrem C-Terminus ohne Verlust der Bindungsaktivität fusioniert werden kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit Dr. Tobias Raum entwickelt. Die Methode bedient sich der Phage-Display-Technologie, da sich die Bedingungen der N-terminalen

Blockade eines scFv-Fragments gut simulieren läßt und ein funktioneller Bindungstest in diesem System leicht durchführbar ist. Vermag ein scFv-Fragment trotz der Blockade sein Antigen zu binden, wird es im Laufe mehrerer Panning-Runden angereichert, bis es gegen Ende der Selektion zahlenmäßig die scFv-Bibliothek dominiert. Experimentell wird die N-terminale Blockade durch die Klonierung der DNA-Sequenz der N2-Domäne des GenIII-Phagenproteins vor die VH-Sequenz innerhalb der Klonierkassette des Phage-Display-Phagemids pComb3H5Bhis erreicht. Die N2-Domäne hat beim Infektionsvorgang mit Wildtyp-Phagen die Funktion der Bindung des Phagen an den Sex-Pilus der F⁺ *E.coli*-Stämme (Krebber et al, 1995); im Rahmen des modifizierten Phagemids hingegen dient sie nur als nicht-infektionskompetente Surrogat-Domäne, die nach erfolgreicher Selektion der bindenden scFv-Fragmente durch antigenbindende Domänen im Rahmen eines bispezifischen Antikörpers ersetzt wird. Das trunkierte GenIII-Protein (CT) verankert das Fusionsprotein N2-VH-VL an der Phagenoberfläche (Manuskript in Präparation). Die Abbildung 19 zeigt schematisch den modifizierten Phagen.

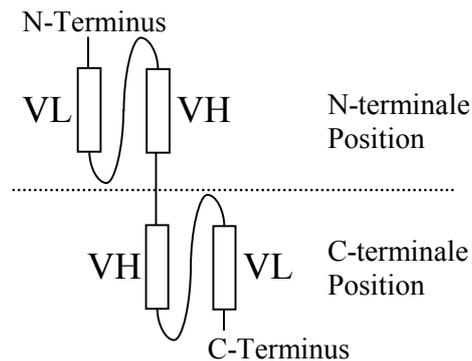


Abb.18: Schematische Darstellung eines bispezifischen scFv-Fragmentes mit Angabe der Positionen und Termini

Blockade eines scFv-Fragments gut simulieren läßt und ein funktioneller Bindungstest in diesem System leicht durchführbar ist. Vermag ein scFv-Fragment trotz der Blockade sein Antigen zu binden, wird es im Laufe mehrerer Panning-Runden angereichert, bis es gegen Ende der Selektion zahlenmäßig die scFv-Bibliothek dominiert. Experimentell wird die N-terminale Blockade durch die Klonierung der DNA-Sequenz der N2-Domäne des GenIII-Phagenproteins vor die VH-Sequenz innerhalb der Klonierkassette des Phage-Display-Phagemids pComb3H5Bhis erreicht. Die N2-Domäne hat beim Infektionsvorgang mit Wildtyp-Phagen die Funktion der Bindung des Phagen an den Sex-Pilus der F⁺ *E.coli*-Stämme (Krebber et al, 1995); im Rahmen des modifizierten Phagemids hingegen dient sie nur als nicht-infektionskompetente Surrogat-Domäne, die nach erfolgreicher Selektion der bindenden scFv-Fragmente durch antigenbindende Domänen im Rahmen eines bispezifischen Antikörpers ersetzt wird. Das trunkierte GenIII-Protein (CT) verankert das Fusionsprotein N2-VH-VL an der Phagenoberfläche (Manuskript in Präparation). Die Abbildung 19 zeigt schematisch den modifizierten Phagen.

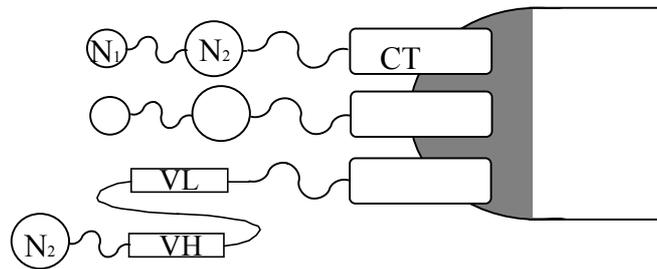


Abb. 19: Schematische Darstellung des modifizierten filamentösen Phagen M13. Durch das Phagemid pComb3H5Bhis wird apikal anstelle der Wildtyp-Konstellation in ein oder zwei Kopien die Konstellation des N-Terminus blockierten Display-Phagen exprimiert. Der obere Abbildungsteil zeigt die Wildtyp-Konstellation mit der N1-Domäne zur Penetration/Infektion, der N2-Domäne zur Phagenbindung an Pilus-tragende Bakterien und der CT-Domäne zur Verankerung an Hüllproteine. Der untere Abbildungsteil zeigt den modifizierten Display-Phagen mit einer N2-Domäne als nicht-infektiöse Blockade-Domäne, der VH-VL-Domäne zur Antigenbindung und der CT-Domäne zur Verankerung der Antikörperfragmente an Phagenhüllproteine.

Der Versuchsablauf des eigentlichen Experiments ist mit dem in Abschnitt 3.2 beschriebenen bis auf wenige Änderungen identisch. Zur Erstimmunisierung der F1-Maus einer balb/c x C57black-Kreuzung wurde 25 µg lösliches EpCAM-Antigen in inkompletten Freundschens Adjuvans eingesetzt; auch zur Zweitimmunisierung wurde inkomplettes Freundsches Adjuvans verwendet. Die Isolierung der RNA, das Anlegen der scFv-Bibliothek und die Expansion der Phagen unterscheiden sich hingegen nicht von der zuvor beschriebenen Vorgehensweise. Das Panning allerdings wurde in diesem Fall auf immobilisiertem EpCAM-Antigen durchgeführt. Durch erhöhte Waschstringenz wurden bindende von nichtbindenden Phagen mit zunehmender Rundenzahl getrennt. Anschließend an die fünfte Runde der Phagenproduktion und Selektion wurde die Plasmid-DNA der *E.coli*-Kulturen aus den Panning-Runden 3, 4 und 5 isoliert. Nach der Produktion und Präparation der löslichen scFv-Antikörperfragmente wurde die Detektion der N2-scFv-Fragmente über einen Peroxidase-konjugierten Anti-Histidin-Tag-Antikörper durchgeführt, der die an das immobilisierte Antigen gebundenen Antikörperfragmente erkennt. Der durch die Peroxidase katalysierte Farbumschlag des Substrats wurde mit einem ELISA-Photometer bei 405 nm gemessen und ist in Abbildung 20 dargestellt.

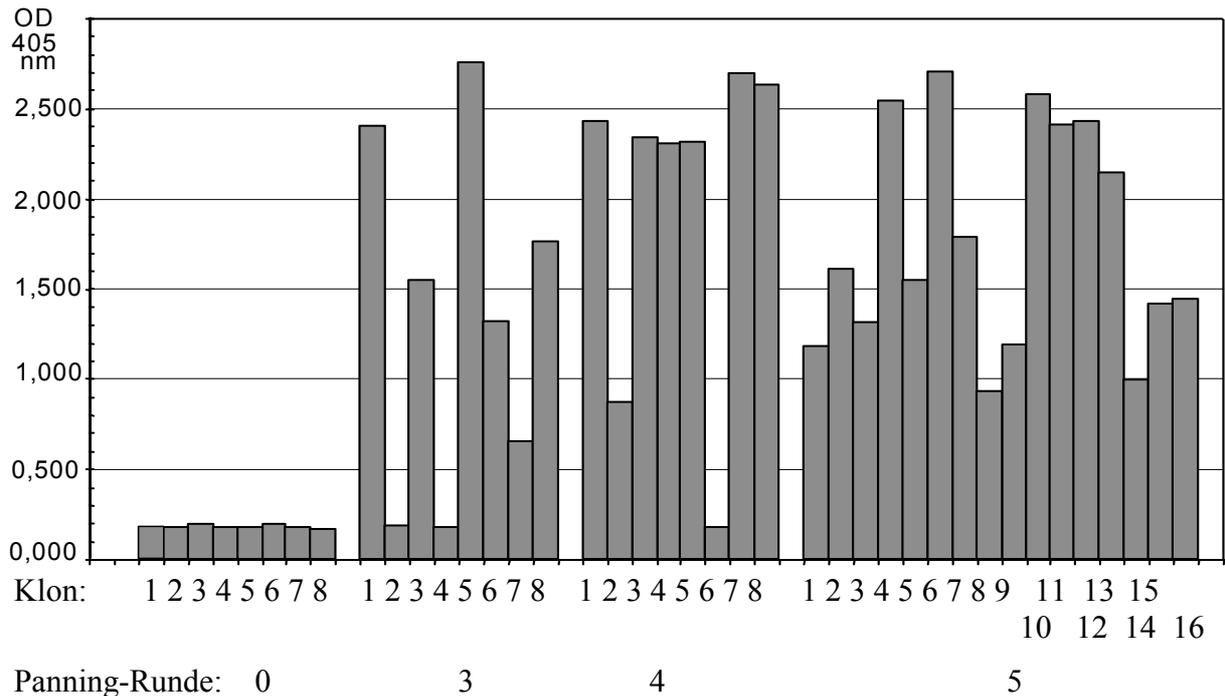


Abb. 20: ELISA-Analyse der murinen scFv-Fragmente, die mittels Phage-Display für die Bindung an EpCAM-Antigen trotz N-terminaler Blockade selektiert wurden. Inkubation der Periplasma-Präparationen der löslichen, in *E.coli* exprimierten scFv-Fragmente mit immobilisiertem EpCAM-Antigen und Detektion der Fragmente mit einem Peroxidase-konjugierten Anti-His-Tag-Antikörper.

Im Kontrast zu den Klonen vor der Antigenselektion (Panning-Runde 0) zeigen viele Klone der Panning-Runden 3, 4 und 5 eine ausgeprägte EpCAM-Bindungsaktivität. Je 3 Klone mit starken Detektionssignalen aus den Panning-Runden 3, 4 und 5 wurden ausgewählt (3-1, 3-5, 3-8; 4-1, 4-4, 4-7; 5-3, 5-10 und 5-13) (Sequenz-Daten nicht aufgelistet) und die DNA-Sequenzen der V-Regionen ermittelt. Dabei zeigte sich, daß keiner der Klone eine identische Kombination VH- und Vkappa kodierender DNA-Sequenzen aufwies. In weiterführenden Experimentreihen, auf die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher eingegangen wird (da diese Versuche nicht zum Kernthema der Dissertation gehören), wurde nach Umklonierung der jeweiligen scFv-Fragmentsequenzen in den eukaryontischen Expressionsvektor pEF-DHFR untersucht, welche der neun VH/Vkappa-Kombinationen die stärkste Bindung im Rahmen eines bispezifischen Antikörpers beibehält. Die Auswertung dieser Experimente zeigte, daß die Sequenzkombination des Klons 4-7 in C-terminaler Position bei N-terminaler Blockade durch eine antigenbindende scFv-Domäne ihre Bindungsaffinität beibehält und sich damit auch gut für die Konstruktion eines bispezifischen Antikörpers in Kombination mit dem scFv-Fragment des Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers 2-B-5 eignen würde. Die Nukleotidsequenz des scFv-Fragments 4-7 ist im Anhang aufgelistet.

3.9 Klonierung der variablen Regionen des Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers

Die Konstruktion eines bispezifischen Single-Chain-Antikörpers, der zur Rekrutierung lymphozytärer Effektorzellen die Bindungsspezifität des Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers 2-B-5 trägt, setzt die Klonierung der variablen Regionen des 2-B-5 Antikörpers voraus (Abb. 20). Dazu wurde im ersten Schritt die Gesamt-RNA aus dem 2-B-5 Hybridom isoliert. Anschließend wurde jeweils eine spezifische reverse Transkription beginnend in der konstanten Region der IgM-schweren-Kette, bzw. im 3'-untranslatierten Bereich der Kappa-Leichten-Kette durchgeführt, um eine für die nachfolgende PCR geeignete Matrize zu erhalten. Die zum Design der Oligonukleotide benötigte Sequenzinformation lieferten folgende Einträge in der Genbank-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>): Für die IgM-Schwere-Kette: Parker, K.E., Accession No. X68312; für die Kappa-Kette: Shepard und Gutman, Accession No. J02574. Die cDNA-Primer wurden ungefähr 70 bp stromabwärts der Grenze der IgM-CH1-Domäne bzw. der konstanten Region der Kappa-Leichten-Kette positioniert.

Der folgende Versuchsablauf ist exemplarisch für die Kappa-Leichte-Kette in Abbildung 21 dargestellt. Zur Durchführung der PCR werden zwei bekannte Sequenzabschnitte benötigt, die die Primerbindung ermöglichen. Ein Primer lag innerhalb der Nukleotidsequenz, die für den C-Terminus der konstanten Region der Kappa-Leichten-Kette bzw. der IgM-CH1-Domäne kodiert, und war daher bekannt. Eine zweite Sequenz war zunächst nicht bekannt, sie mußte also künstlich eingeführt werden. Die Einführung einer solchen Sequenz in die cDNA wurde durch den Einsatz der Terminalen Transferase erreicht, mit deren Hilfe ein Poly-G-Schwanz angefügt wurde. Ein zu dieser Sequenz komplementärer Primer, also eine kurze Poly-C-Sequenz mit einer zusätzlichen Sequenz für eine Restriktionsschnittstelle, ermöglichte den PCR-Ansatz und zugleich das gerichtete Klonieren des entstandenen Amplifikats in ein Plasmid (Anctail-Primer in Anlehnung an Gilliland et al. 1996). Nach Sequenzierung der Plasmidinserts und Identifikation jeweils einer funktionellen VH- und VL-Region wurden in einem zweiten Schritt die 5'-Primer so gewählt, daß sie am reifen N-Terminus der jeweiligen Kette lagen. Der Primersequenz wurde zusätzlich jeweils eine Restriktionsschnittstelle hinzugefügt, die ein gezieltes Klonieren im Leserahmen der jeweiligen variablen Domäne erlaubte. Nach PCR-Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung erfolgte zur Verifikation der erhaltenen Sequenzen die Bestätigung der Funktionalität durch bakterielle Periplasma-Expression des Fab-Fragments und einen indirekten ELISA auf immobilisiertem Zeta-Ketten-KLH-Konjugat. Die hier nicht dargestellten ELISA-Ergebnisse belegten sowohl die Funktionalität als auch die Zeta-Ketten-Spezifität der isolierten Sequenzen, die im Anhang aufgelistet sind. Die Spezifität der isolierten Anti-Zeta-Ketten-Sequenz wird im bispezifischen Anti-Zeta-Kette/anti-EpCAM Antikörper demonstriert.

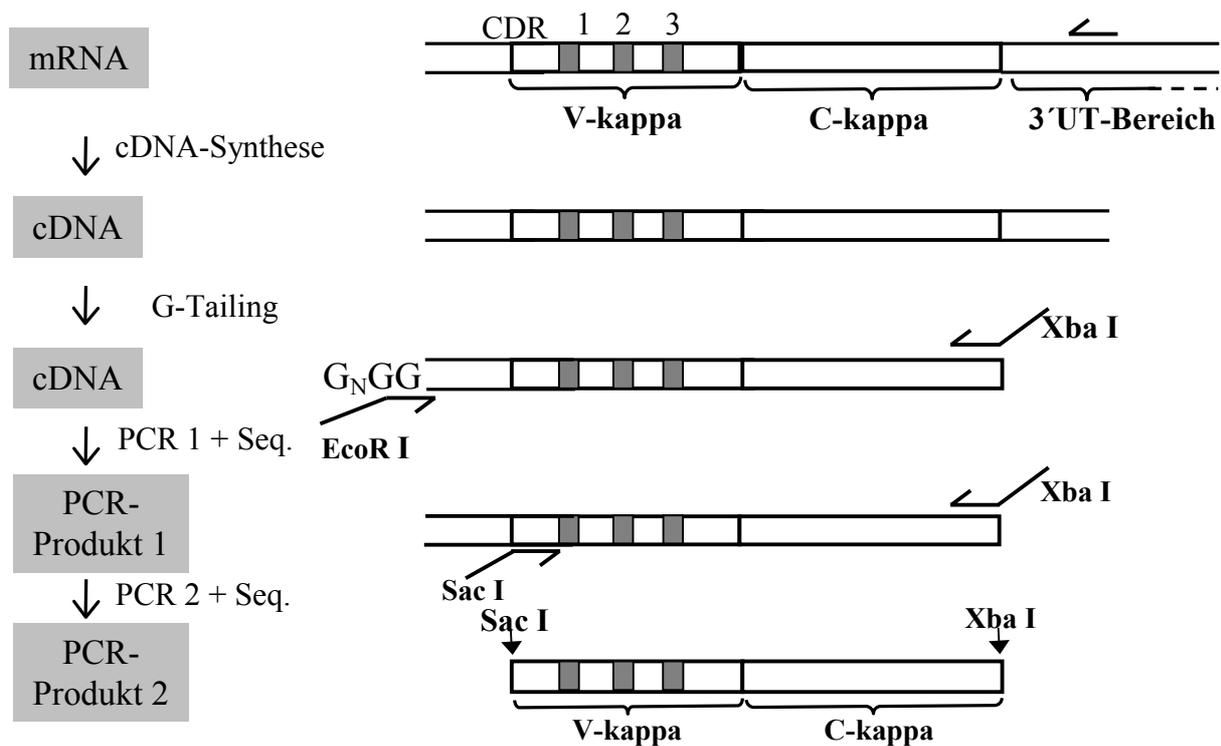


Abb. 21: Klonierschema für die Isolation der Kappa-Leichte-Ketten-Sequenz. Linkerhand: Format der Erbinformation und korrespondierende Arbeitsschritte; rechterhand: Schematische Darstellung der Primer (Pfeile) mit Angabe der jeweils angefügten Restriktionsenzymerserkennungssequenzen. Abkürzungen: CDR Complementarity Determining Region; 3'-UT-Bereich untranslatierter Bereich der RNA; V-kappa variable Domäne der leichten Kette; C-Kappa konstante Domäne der leichten Kette; EcoR I, Xba I, Sac I Restriktionsenzymerserkennungssequenzen; Seq. Sequenzierung

3.10 Konstruktion eines bispezifischen Single-Chain Antikörpers Anti-Zeta-Kette/anti-EpCAM

Nach der Klonierung der spezifitätsbestimmenden Sequenzen aus dem Anti-Zeta-Ketten Hybridom 2-B-5 und der Isolierung eines EpCAM-bindenden scFv Fragmentes, das die N-Terminus-Blockade toleriert, galt es die erhaltenen Spezifitäten miteinander zu einem bispezifischen Single-Chain- Antikörpers (bsc scFv AK) zu fusionieren. Diese Antikörper-Konstrukte bestehen aus vier auf einer Proteinkette angeordneten variablen Immunglobulindomänen. Eine funktionelle Antigenbindungsstelle in einem solchen Konstrukt entsteht, wenn sich die leichte und die schwere variable Domäne einer Spezifität in der richtigen Quartärstruktur zusammenlagern. In natürlich vorkommenden Antikörpermolekülen tragen dazu zwei Faktoren bei. Zum einen bestehen zwischen den variablen Teilen der leichten und der schweren Kette nicht-kovalente Wechselwirkungen, und zum anderen sind die beiden variablen Domänen über die C_H1 bzw. c-Kappa Domänen durch weitere nichtkovalente Wechselwirkungen sowie kovalent durch Disulfidbrücken verbunden. In bispezifischen Single-Chain-Antikörpern sind nur nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den variablen Domänen vorhanden. Ihr Zustandekommen wird durch die räumliche Nähe der variablen Domänen unterstützt, die durch einen flexiblen Aminosäurelinker garantiert wird. Die Aminosäurelinker zwischen den VL- und den VH-Domänen bzw. zwischen den zwei Spezifitäten weisen durch eine unterschiedliche Anzahl an Aminosäuren verschiedene Längen auf. Für die Linker zwischen den zusammengesetzten VL- und der VH-Domänen wird eine Länge (15 AS) gewählt, die die funktionelle Assoziation der Domänen erlaubt, während der Linker zwischen den VH-Domänen kurz ausfällt (5 AS), damit ein Fehlarrangement zuverlässig sterisch verhindert wird (Mack et al., 1995). Für die Komposition des Linkers hat sich die Aminosäuresequenz Gly-Gly-Gly-Gly-Ser bzw. eine dreifache Wiederholung dieses Motivs als günstig herausgestellt (Monoclonal antibodies, Hedy Zola, Scientific Publishers Limited 1995, Seite 185). Während die Glycin-Reste für die notwendige Flexibilität sorgen, verhindert der hydrophile Serin-Rest die Assoziation mit den hydrophoben V-Domänen.

Um die kodierende Nukleotidsequenz für das scFv-Fragment des 2-B-5-Antikörpers zusammensetzen, dienten die Plasmide BS-rat-Vkappa und BS-rat-Vmu, die die Sequenzen für die variablen Bereiche der schweren und der leichten Kette des 2-B-5 Antikörpers enthalten, als Matrizen für die Fusions-PCR (Abb. 22). Insgesamt kamen dafür vier Oligonukleotid-Primer (5'VL2B5BsrGI/EcoRV; 3'VL2B5GS15; 5'VH2B5GS15; 3'VH2B5BspEI; Sequenzen im Anhang) zum Einsatz, die Restriktionsenzym-schnittstellen bzw. Linker-kodierende Nukleotide enthalten. Nach der ersten PCR entstanden so Amplifikate, die 3' der VL-Sequenz und 5' der VH-Sequenz Nukleotidsequenzen aufwiesen, die für den flexiblen Glycin-Serin-Linker [(G₄S₁)₃] kodieren. Diese Amplifikate wurden zusammen in der Fusions-PCR eingesetzt, bei der nur die externen Primer verwendet wurden, die die Restriktionsenzym-schnittstellen mitbringen. Im Verlauf der zweiten PCR kommt es zur Aneinanderlagerung der komplementären Linkersequenzen und damit zum Entstehen eines großen Amplifikats mit der Domänenanordnung der Konstellation VL-[(G₄S₁)₃]-VH, das von den Restriktionsenzym-schnittstellen EcoRV und BspEI flankiert wird.

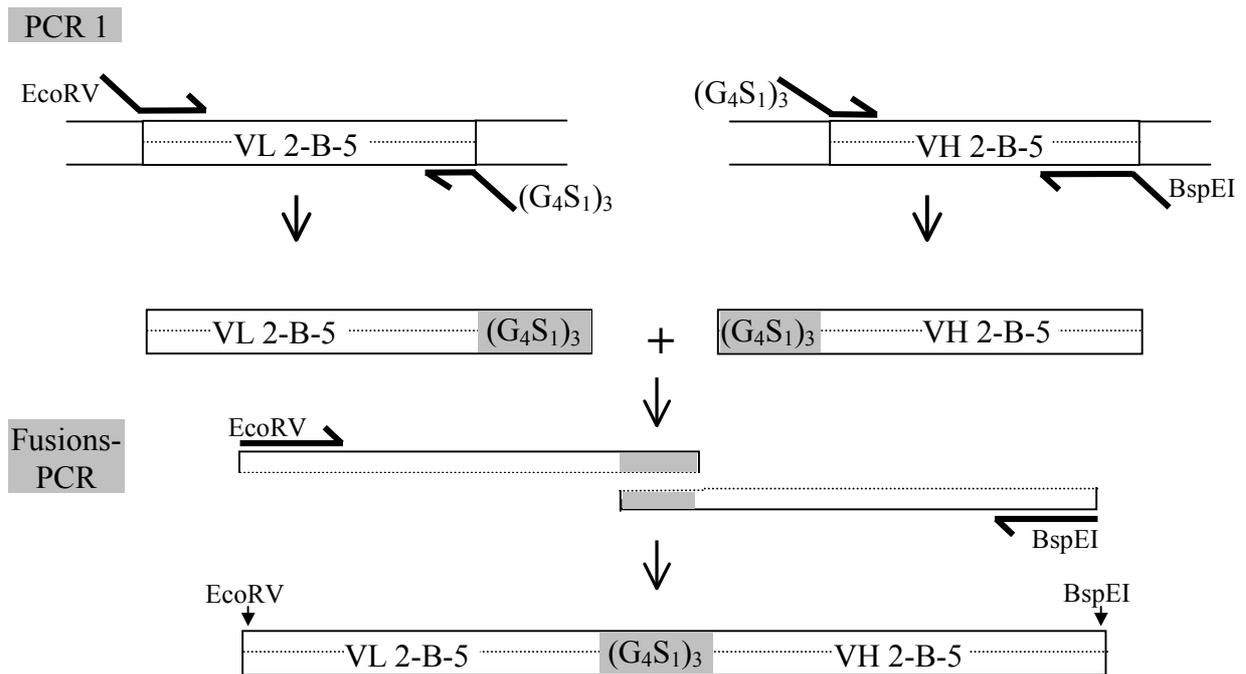


Abb. 22: Schematische Darstellung der PCR-basierten Generierung eines scFv-Fragmentes aus den variablen schweren und leichten Ketten des Rattenhybridoms 2-B-5. Primer-vermittelte Einführung der Glycin-Serin-Linker kodierenden Sequenzen ((G₄S₁)₃) und zweier Restriktionsenzymkennungsschnittstellen. Einsatz der Amplifikate in eine Fusions-PCR, bei der durch Verwendung nur der externen Primer und Aneinanderlagerung der komplementären Glycin-Serin-DNA-Sequenzen ein großes scFv-Fragment in VH-VL Orientierung entsteht.

Dieses 2-B-5 scFv-Fragment wurde nach einer Kontrollsequenzierung in ein Bluescript Plasmid mit Hilfe eines EcoRV/BspEI-Doppelverdaus kloniert, das neben der zur eukaryontischen Expression benötigten Leadersequenz zur Sekretion das EpCAM-spezifische scFv-Fragment 4-7 enthielt. Ein weiterer Vektorbestandteil war eine Nukleotidsequenz für einen C-terminalen Histidin-Tag, der aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinen besteht und zur Reinigung des rekombinanten Proteins aus dem Zellkulturüberstand Verwendung findet. Die Abbildung 23 zeigt schematisch die Anordnung der variablen Domänen des bispezifischen Antikörpers Anti-Zeta-Kette/anti-EpCAM.

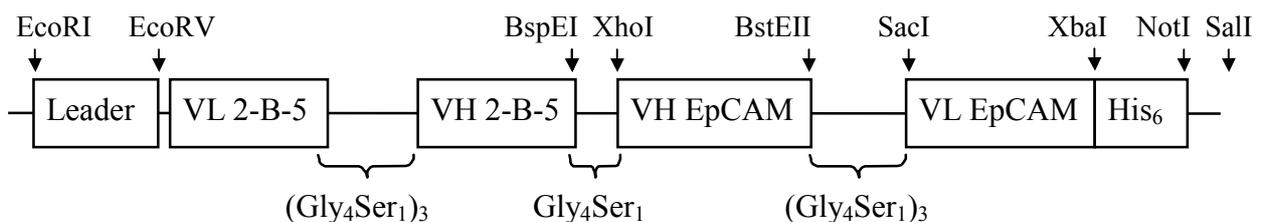


Abb. 23: Schematische Darstellung der Domänenfolge des bispezifischen Antikörpers Anti-Zeta-Kette/Anti-EpCAM mit relevanten Restriktionsenzymkennungsschnittstellen auf Nukelotidebene für die durchgeführten Klonierungsschritte.

3.11 Produktion des bispezifischen Anti-Zeta-Ketten/anti-EpCAM Antikörpers im eukaryontischen Expressionssystem

Für eine erste Analyse der Spezifität sind die in *E.coli* erzeugbaren Mengen der einzelnen scFv-Fragmente ausreichend. Die zwei großen Vorteile der bakteriellen Expression sind die Einfachheit und die Geschwindigkeit der Produktion und Isolation der periplasmatisch exprimierten scFv-Fragmente. Eine Produktion von Antikörpern bzw. deren Fragmenten im eukaryontischen Expressionssystem hingegen bietet gegenüber dem prokaryontischen System folgende Vorteile: a) Wegfall der Renaturierung der zunächst inaktiven bispezifischen Moleküle, die in „Inclusionbodies“ akkumulieren, b) Wegfall der aufwendigen Antigen-spezifischen Affinitätsaufreinigung der bakteriell produzierten Antikörper zur Trennung der inaktiven bzw. partiell aktiven Antikörper von der Fraktion der vollständig aktiven Form, c) aufgrund der einfachen Faltungs- und Sekretionsmechanismen der Prokaryonten kann in Bakterien – im Gegensatz zu eukaryontischen Systemen – die Faltung des Proteins bzw. dessen Sekretion und Glykosylierung nicht oder nur mangelhaft durchgeführt werden. Die komplexe Struktur des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparats in Eukaryonten hingegen gewährleistet die Faltung durch Chaperone und die vollständige Glykosylierung.

Bereits im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführte Versuche zeigten des Weiteren, daß die Antikörperkonstrukte, bei denen mehr als zwei Immunglobulinodomänen zu einer Proteinkette verbunden wurden, bakteriell nicht in funktioneller Form exprimierbar sind (Mack et al. 1995). Aus diesen Gründen wurde das auf CHO-Zellen basierende eukaryontische Expressionssystem zur Produktion des bispezifischen Antikörpers gewählt. Wie in Abschnitt 2.3.10 detailliert ausgeführt, beschrieben Kaufman et al. 1990 ein eukaryontisches Expressionssystem, in dem Expressionsvektoren mit dem Selektionsmarker Dihydrofolatreduktase (DHFR) in CHO-Zellen (Chinese Hamsters Ovary cells) stabil transfiziert werden und zusätzlich das Expressionsniveau durch Gen-Amplifikation sekundär wesentlich gesteigert werden kann. Dazu wurde der in Abschnitt 3.10 beschriebene bispezifische Antikörper in den eukaryontischen Expressionsvektor pEF-DHFR (Material und Methodenteil 2.3.10) umkloniert (mit EcoRI und SalI). Der entstandene Vektor pEF-DHFR-2B5x4-7 (siehe Abbildung 24) wurde anschließend in großer Menge produziert und vor der Transfektion mittels eines Nde I-Verdau in DHFR-defiziente CHO-Zellen linearisiert. Die Transfektion und Selektion der CHO-Zellen, die den Vektor stabil ins Genom integriert hatten, wurden gemäß der in Abschnitt 2.3.10 beschriebenen Prozedur durchgeführt. Das Expressionsniveau der CHO-Zellen in den verschiedenen Amplifikationsstufen wurde mit einem Sandwich-ELISA bestimmt, der die Quantität des bispezifischen Antikörpers im Zellkulturüberstand detektiert. Verglichen wurde die Quantität des bispezifischen Antikörpers nach der stabilen Transfektion und in den Amplifikationsstufen mit 20 und 100 nM des DHFR-Inhibitors Methotrexat (MTX). Es zeigte sich, daß bereits nach der ersten Amplifikationsstufe mit 20 nM MTX das maximale Expressionsniveau erreicht war. Aufgrund der bicistronisch konzipierten Expressionskassette (Abb. 6 im Methodenteil Abschnitt 2.3.10 und Abb. 24) sollte ein lineares Verhältnis zwischen der Menge der exprimierten Dihydrofolat-Reduktase und der Menge des produzierten Antikörperkonstrukts bestehen. Der Theorie entsprechend müßte somit bei 100 nM MTX ein höheres Expressionsniveau erreicht werden als bei 20 nM. Die Realität zeigte aber, daß der stark erhöhte Selektionsdruck durch die fünffache MTX-Konzentration zu einer Entkopplung von bispezifischem Antikörper und Selektionsmarker führte und damit Zellklone überleben konnten, die aufgrund von Genrearrangements nur noch die Dihydrofolat-

Reduktase in ausreichenden Mengen produzierten. Eine negative Selektion führt somit zur Abreicherung von Klonen, die beide Proteine exprimieren und damit einen Selektionsnachteil gegenüber „entkoppelten“ DHFR-produzierenden Klonen hatten. Als Folge dessen sinkt das Expressionsniveau.

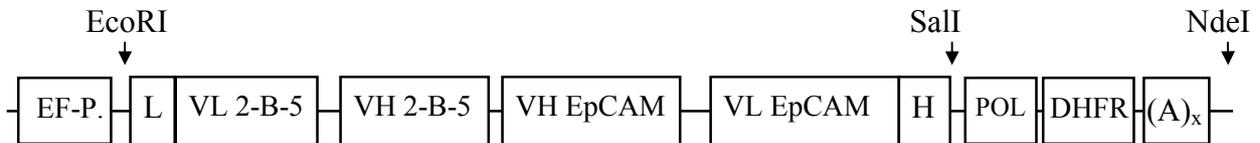


Abb. 24: Schematische Darstellung des bispezifischen Antikörpers Anti-Zeta/Anti-EpCAM im eukaryontischen Expressionsvektor pEF-DHFR. Unter der Kontrolle des EF-Promotors (EF-P.) befindet sich hinter dem Sekretionssignal (L) die eigentliche Nukleotidsequenz des bispezifischen Antikörpers, gefolgt von einem Histidin-Schwanz (H) und einem Stop-Kodon. Es schließen sich die Nukleotidsequenzen für eine ribosomale Reinitiationsstelle (POL), für die Dihydrofolatreduktase (DHFR) und für eine Polyadenylierungsstelle (A)_x an. Die zur Umklonierung in den Expressionsvektor benötigten Restriktionsenzymerschnittstellen (EcoRI und Sall) sowie die zur Linearisierung des Vektors (NdeI) sind aufgeführt.

Nach Feststellung der optimalen Methotrexat-Konzentration zur Produktion des Anti-Zeta-Ketten/anti-EpCAM-Antikörpers wurde zunächst die CHO-Zellzahl expandiert, bevor die Umsetzung der Zellen in Rollerflaschen erfolgte. Die Produktion größerer Konstrukt-Mengen erfolgte nicht mehr in stationärer Kultur, sondern in Oberflächen-vergrößerten Rollerflaschen. Zu Detektionszwecken als auch zur erleichterten Aufreinigung weist das bispezifische Konstrukt in C-terminaler Position einen Polyhistidin-Tag. Dieser ermöglichte eine Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen wie Co²⁺ oder Ni²⁺. Eine sich anschließende präparative Gelfiltration, die zur Entfernung von Aggregaten und Degradationsprodukten eingesetzt wurde, erlaubte zusätzlich die Überprüfung des Molekulargewichts. Die durch Druck-Dialyse eingegengten Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

3.12 Analyse des bispezifischen Antikörpers mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die analytische Gelelektrophorese von Proteinen ist ein Standardinstrument zur Bestimmung der Proteinreinheit und -größe. Nach Auftrennung der Proben erfolgte ein Färbeschritt mit Coomassie-Blau zur Detektion des Proteins. Das in Abbildung 24 dokumentierte Ergebnis zeigt den aufgereinigten bispezifischen Antikörper mit einer Hauptbande, die unterhalb des Größenstandards von 66 kDa verläuft (Abb. 25, Spur 2 und 3, je 8 µg Protein). Verglichen mit dem Protein-Größenstandard zeigt der bispezifische Antikörper ein Laufverhalten, das dem eines Protein der Größe 55 – 60 kDa entspricht. Wird das Molekulargewicht des bispezifischen Antikörpers anhand der Nukleotidsequenz mit Hilfe einer Software (DNAsis 2.5) errechnet, ergibt sich ein Wert von 54.800 Da. Diese theoretisch errechnete Größe stimmt also dem experimentell ermittelten Wert gut überein. Des Weiteren ist erkennbar, daß beide Fraktionen relativ frei von Kontaminationen mit anderen Zellproteinen sind.

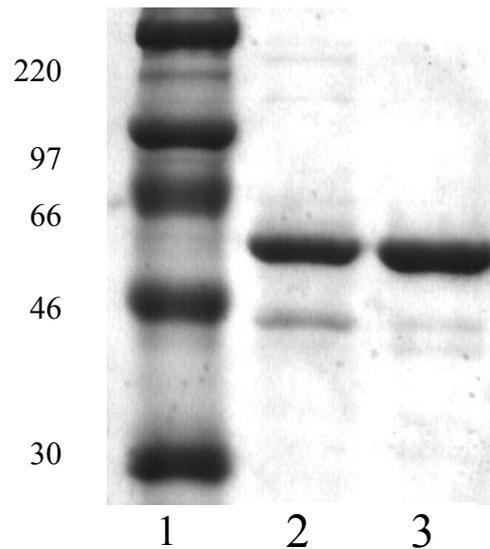
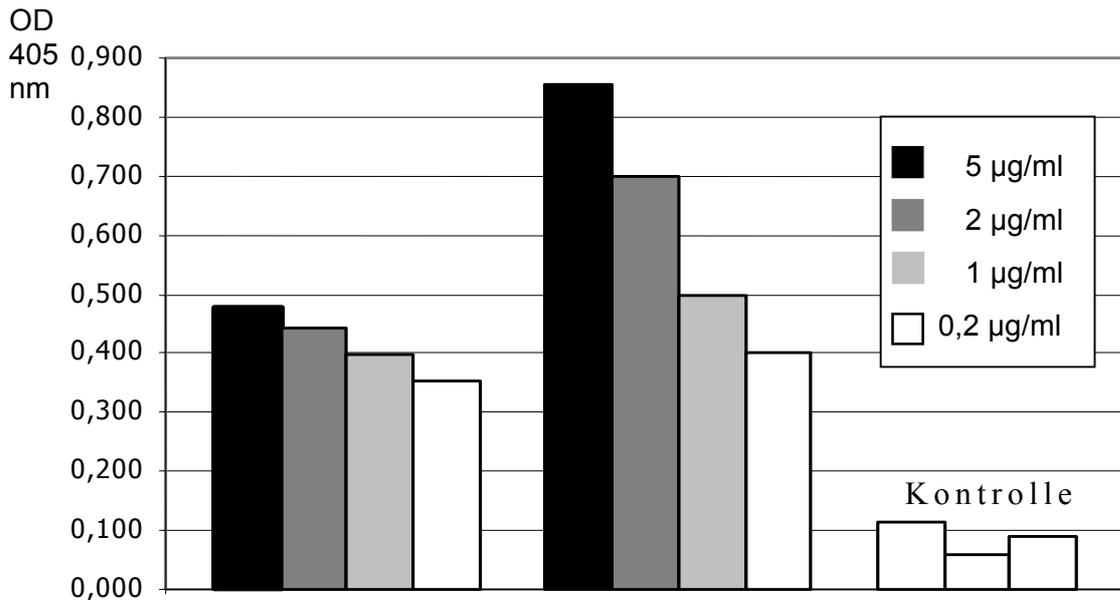


Abb. 25: Analytische SDS-PAGE mit 2 Fraktionen des durch Gelfiltration aufgereinigten bispezifischen Antikörpers 2-B-5x4-7. Auftrennung von je 8 μ g Protein auf einem 10% Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen, anschließend Färbung mit Coomassie-Blau. Spur 2: Fraktion III des Antikörpers; Spur 3: Fraktion IV des Antikörpers; Spur 1: Rainbow Proteinstandard, Größenangaben in kDa.

Die Funktionalität dieser Fraktionen in bezug auf die Antigenbindung wurde mit Hilfe von zwei Sandwich-ELISAs bestätigt (Abb. 26). Dazu wurde die Bindung des bispezifischen Antikörpers an die beiden zuvor immobilisierten Antigene – das Zeta-Ketten-KLH-Konjugat bzw. lösliches EpCAM – untersucht. Der Bindungsnachweis erfolgte über die Detektion des bispezifischen Antikörpers durch einen Peroxidase-markierten Anti-Histidin-Tag-Antikörper. Der Farbumschlag des durch die Peroxidase umgesetzten Substrats wurde bei 405 nm mit dem ELISA-Reader gemessen.

Der ELISA zeigte die spezifische Bindung des bispezifischen Antikörpers an beide Antigene, eine unspezifische Bindung ohne Antigen konnte nicht nachgewiesen werden. Des weiteren war eine Abhängigkeit der Signalintensität von der eingesetzten Konzentration des bispezifischen Antikörpers beobachtbar.



Immobil. Antigen: Zeta-Ketten-KLH-Konj. — EpCAM — — Ø —
 Detektions-AK: — HRP konj. Maus-Anti-Histidin-Tag-Antikörper —

Abb. 26: ELISA-Analyse der Bindung des bispezifischen Antikörpers Anti-Zeta-Kette/anti-EpCAM in verschiedenen Konzentrationen an das Zeta-Ketten-KLH-Konjugat und an das EpCAM-Antigen. Es wurden jeweils 5 µg/ml der Antigene an Oberfläche einer Mikrotiterplatten immobilisiert. Die Detektion des bispezifischen Antikörpers erfolgte über den Peroxidase-konjugierten Anti-Histidin-Tag-Antikörpers. Als Negativkontrolle wurde anstelle der Antigene nur mit PBS inkubiert.

3.13 Rekrutierung der Zytotoxizität von CTL und NK-Zellen durch den bispezifischen Anti-Zeta-Kette/Anti-EpCAM Antikörper

Die durch konventionelle oder bispezifische Antikörper vermittelte Zytotoxizität wird durch den ^{51}Cr -Freisetzung-Assay erfaßt. Dazu wurden die Zielzellen, EpCAM-positive Zellen der Magenkarzinom-Zelllinie Kato III, für eine Stunde mit radioaktiven Natriumchromat inkubiert und anschließend sowohl mit mononukleären Zellen des peripheren Bluts als auch mit den zwei isolierten Effektorzellpopulationen in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des bispezifischen Antikörpers (5 µg/ml – 0,04 µg/ml) kokultiviert. Das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen (E:T-Ratio) betrug 10:1 (100.000 Effektoren zu 10.000 Zielzellen), die Inkubationszeit lag bei den unseparierten PBMCs und den isolierten CTLs bei 18 Stunden. Bei den gereinigten NK-Zellen wurde die Lyse bereits nach 4 Stunden bestimmt. Die Quantifizierung des freigesetzten Chroms erfolgte durch Abnahme von 50 µl Zellkulturüberstand und Messung der freigesetzten Radioaktivität im Gamma-Zähler. Die absolute Zahl radioaktiver Zerfälle pro Minute für jede einzelne Probe wurden ins Verhältnis zur spontanen Lyserate der Zellen (Freigesetzte Radioaktivität in Abwesenheit von Antikörper und Effektorzellen) und zur Maximallyse (Lyse der Zielzellen durch 0,5% Triton zur Bestimmung der maximal aufgenommenen Radioaktivität) gesetzt. Die erhaltenen Werte werden als prozentuale spezifische Lyse ausgedrückt und ergeben sich aus dem Mittelwert von Triplikatansätzen (Abb. 27).

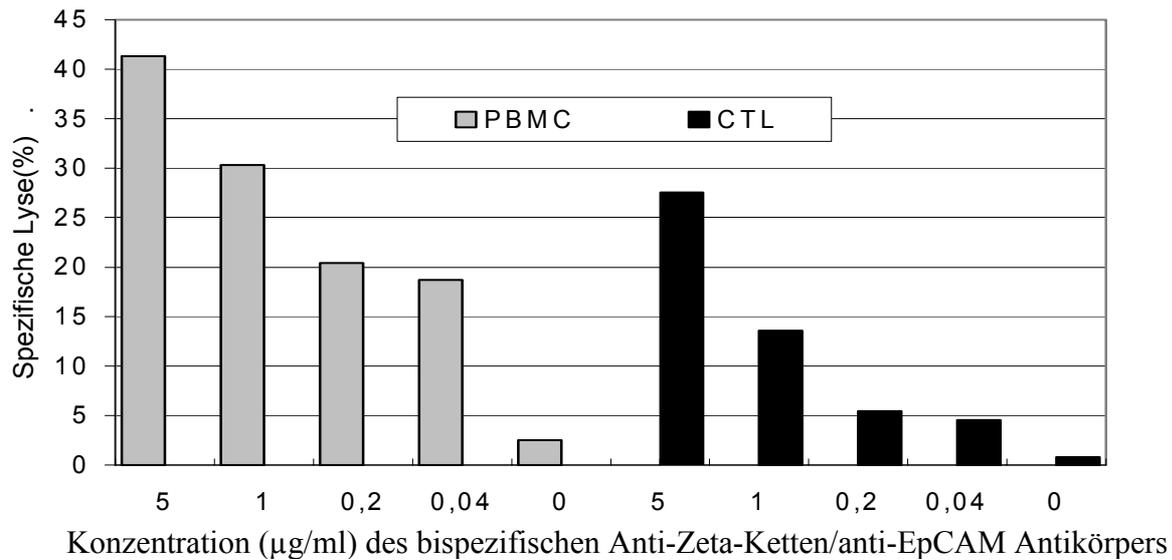


Abb. 27: Rekrutierung der Zytotoxizität von PBMC und CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten gegen EpCAM-positive Kato-Zellen durch den Anti-Zeta-Ketten/anti-EpCAM Antikörper. Bestimmung der spezifischen Lyse nach 18 Stunden und bei einer E:T-Ratio von 10:1.

Die Lyse der EpCAM-positiven Zielzellen durch die unseparierten PBMCs zeigt sich nach 18-stündiger Inkubation deutlich von der Konzentration des bispezifischen Anti-Zeta-Ketten/anti-EpCAM-Antikörpers abhängig. In Abwesenheit des bispezifischen Antikörpers (0 µg/ml) ist die Zielzellyse verschwindend gering; sie unterschreitet die 3% Marke. Die Spezifität der Zellyse wurde durch Verwendung von EpCAM-negativen Zellen der Hybridomzelllinie X63 belegt, die eine Lyserate von nur 5% bei der höchsten Antikörperkonzentration von 5 µg/ml zeigte. Auch die isolierten zytotoxischen T-Lymphozyten zeigten eine deutliche Lyse der Zielzellen, die allerdings geringer als die PBMC-Lyseraten ausfiel. Die hier dargestellten Werte wurden in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert und können als repräsentativ gelten. Die Rekrutierung der NK-zellvermittelten Zytotoxizität durch den bispezifischen Antikörper wurde in einem vierstündigen Assay ermittelt und ebenfalls bei einem Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis von 10:1 durchgeführt. Die exemplarischen Ergebnisse mit NK-Zellen von drei verschiedenen Donoren sind in Abbildung 28 dargestellt.

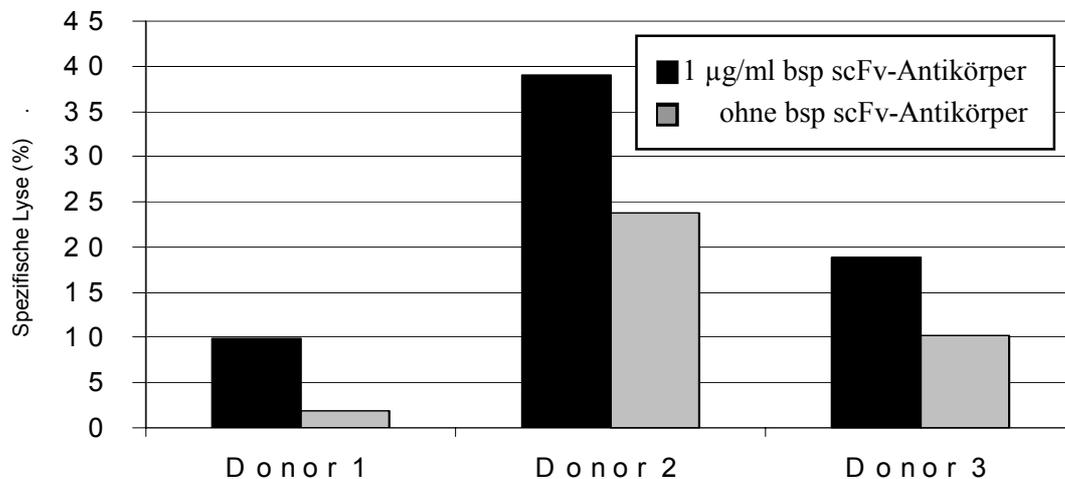


Abb. 28: Rekrutierung der Zytotoxizität von NK-Zellen gegen EpCAM-positive Kato Zellen durch den Anti-Zeta-Ketten/anti-EpCAM Antikörper. Bestimmung der spezifischen Lyse nach 4 Stunden und bei einer E:T-Ratio von 10:1.

Die Ergebnisse der Antikörper-vermittelten Zytotoxizität durch die Rekrutierung der NK-Zellpopulation fielen uneinheitlich und deutlich donorabhängig aus. Der Effekt des bispezifischen Antikörpers auf die Tumorzellyse wurde hier durch den direkten Vergleich in Anwesenheit (1 µg/ml) und Abwesenheit des Antikörpers ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, daß die teilweise hohe nicht-Antikörper-vermittelte Lyse der Tumorzellen, wie z.B. 24% Lyse bei Donor 2 in Abwesenheit des Antikörpers von der Lyserate in Höhe von 39% in Anwesenheit des Antikörpers (1 µg/ml) übertroffen wird. Der Vergleich mit den beiden weiteren Donoren zeigt dieselbe Tendenz: Die Zellyse in Abwesenheit des bispezifischen Antikörpers wurde jeweils durch die Antikörper-vermittelte Zytotoxizität übertroffen, wobei das Niveau der Zellyse donorabhängig schwankt, die Proportion zwischen den beiden Lyserate aber annähernd gewahrt bleibt.

4 Diskussion

4.1 Isolierung eines Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers

Die erste Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand in der Isolierung eines Antikörpers, der an die Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette bindet, die auf zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert ist. Die Generierung von spezifischen monoklonalen Antikörpern mit der von Milstein & Köhler 1976 entwickelten Hybridomtechnik gehört heute zu den Standards der Immunologie. So wurde zunächst die Isolierung eines Zeta-Ketten-spezifischen Antikörpers aus einem konventionellen Maus-Hybridom versucht. Die Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette ist sowohl bei Mensch und Maus als auch bei der Ratte in ihrer Sequenz identisch und hat eine Länge von 9 Aminosäuren. Die phylogenetische Konservierung bringt es mit sich, daß der zu erzeugende Antikörper sowohl in der Maus, als auch in der Ratte ein Selbstantigen erkennen soll und damit einen Autoantikörper darstellt. Die Sequenzidentität der Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette legt daher nahe, daß B-Zellen, die einen solchen Autoantikörper exprimieren in den Versuchstieren Maus und Ratte sehr selten sind. Die fehlgeschlagenen Isolierungsversuche sowohl auf konventionelle Art mit einem murinen Hybridom, als auch auf rekombinante Weise mit Hilfe der Phage-Display-Methode unterstreichen diese Aussage. Keiner der 150 getesteten Hybridom-Klone vermochte sowohl auf zytotoxischen T-Lymphozyten als auch auf NK-Zellen an die humane Zeta-Kette zu binden. Der Einsatz der Phage-Display-Technik, mit der eine murine VL/VH-Bibliothek von 2×10^8 unabhängigen Klonen auf spezifische Bindung an die Zeta-Kette durchsucht wurde, wies einen Output-Titeranstieg in der 7. Panning-Runde auf, in der auf zytotoxischen T-Lymphozyten selektiert wurde. Auch die ELISA-Analyse der aus Einzelklonen präparierten Periplasmaisolate zeigte eine große Anzahl von Fab-Fragmenten, die an das Zeta-Ketten-KLH-Konjugat banden. Ein solcher Panning-Verlauf könnte durch die Anreicherung von Fab-Fragmenten erklärt werden, die die Zeta-Kette im T-Zell-Kontext erkennen. Ein zahlenmäßig deutlicher Einbruch an positiven Klonen war dagegen in der 8. Panning-Runde, bei der das Panning auf NK-Zellen durchgeführt wurde, festzustellen. Dieser Panning-Verlauf kann auf eine unterschiedliche Zugänglichkeit des Antigens auf den beiden Zellpopulationen zurückzuführen sein (Dieser Erklärungsansatz wird im Abschnitt 4.2 der Diskussion weiter erläutert). Des Weiteren liegt die Vermutung nahe, daß im Immunglobulin-Repertoire der Maus Antikörper, die die Zeta-Kette erkennen, generell nicht vorkommen, so daß selbst im Phage-Display-Verfahren, mit dem eine VL/VH-Bibliothek in der Größe von 2×10^8 Klonen durchsucht wurde, keine spezifisch an die Zeta-Kette bindenden Klone isoliert werden konnten.

Unreife B-Zellen, die ausschließlich membranständiges IgM exprimieren sowie reife naive IgM⁺- und IgD⁺-B-Zellen, die mit multivalenten zellgebundenen Autoantigenen konfrontiert werden, werden durch Apoptose klonal deletiert oder im Falle von löslichen Antigenen anergisiert (Cornall et al., 1995; MacLennan et al., 1990). Diese Immuntoleranzmechanismen erschweren es dabei erheblich Zeta-Ketten-reaktive Antikörper aus Versuchstieren zu isolieren, die mit einem Autoantigen, wie es der Extrazellulärteil der Zeta-Kette darstellt, immunisiert werden. Des Weiteren ist das Epitop, welches der Anti-Zeta-Ketten-Antikörper erkennen soll, mit seinen 9 Aminosäuren extrem kurz. Die Angaben bezüglich der minimalen bzw. üblichen Epitopgröße, die von Antikörpern erkannt werden, schwanken

mit 6 bzw. 15 bis 22 Aminosäuren in der Fachliteratur stark (Hebbes et al., 1989; Kuby, 1997). Die Zugänglichkeit des Epitops könnte für einen Antikörper zusätzlich durch die räumliche Nähe zur Zellmembran und durch die Einbettung der Zeta-Kette in den TCR-CD3-Komplex mit den großen Extrazellulärdomänen der TCR α - und β -Kette sowie der CD3-Ketten bzw. in den Fc γ RIII-Komplex mit der großen Extrazellulärdomäne von CD16 sowie NKp46 und NKp30 sterisch erschwert sein.

Erst mit einem Wechsel der Versuchstierspezies hin zur Ratte gelang es mit Hilfe der Hybridomtechnik einen einzigen Zeta-Ketten-reaktiven IgM-Antikörper, den Klon 2-B-5, zu isolieren. Der Grund für den Erfolg in der Ratte, könnte in dem von der Maus verschiedenen Antikörper-Repertoire zu finden sein, das im Gegensatz zur Maus offensichtlich auch solche VL/VH-Kombinationen enthält, die eine spezifische Bindung an die kurze Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette auf intakten Zellen trotz der schwierigen sterischen Bedingungen erlauben. Darüberhinaus ist vorstellbar, daß Zeta-Ketten-reaktive B-Zellen aus unbekanntem Gründen in der Ratte unter einem geringeren negativen Selektionsdruck durch Immuntoleranzmechanismen stehen als in der Maus. Möglicherweise hat auch die moderate Affinität des autoreaktiven IgM-Antikörpers dazu beigetragen die B-Zelle, auf die das 2-B-5-Hybridom zurückgeht, vor Anergisierung und Depletion zu bewahren. Höheraffine Antikörper des IgG-Isotyps konnten vermutlich aus diesem Grund nicht isoliert werden, da B-Zellen, die höheraffines Zeta-Ketten-reaktives IgG exprimieren, mit wesentlich größerer Wahrscheinlichkeit als autoreaktiv erkannt und eliminiert werden.

4.2 Spezifität des Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers

Die Durchflußzytometrie eignet sich gut zur schnellen und quantitativen Multiparameter-Analyse von Einzelzellen auf Basis der Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper. Diese Technik wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Identifikation von Hybridomüberständen genutzt, die die Zeta-Kette auf zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen erkennen. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Anfärbung der Zeta-Kette auf zytotoxischen T-Lymphozyten zweier verschiedener Donoren durch den Kulturüberstand des Rattenhybridoms 2-B-5 im Vergleich zur Anfärbung mit einer irrelevanten Isotypkontrolle. Die Anfärbung der NK-Zellen durch den 2-B-5 Antikörper fiel dagegen insgesamt schwächer aus, war jedoch von der Isotypkontrolle abzugrenzen. Im Vergleich zu den eher homogenen Anfärbungen der Zeta-Kette auf zytotoxischen T-Lymphozyten verschiedener Donoren zeigten sich die Anfärbungen der Zeta-Kette auf NK-Zellen donorabhängig.

Für die unterschiedlich ausfallenden Färbeergebnisse des 2-B-5 Antikörpers auf den NK-Zellen können verschiedene Gründe angeführt werden. Der Erstellung des Rattenhybridoms ging eine Präimmunisierung mit intakten Zellen der T-Zelllinie Jurkat voraus, gefolgt von der Immunisierung des Zeta-Ketten-KLH-Konjugats. Durch die Präfokussierung des B-Zell-Repertoires auf T-Zell-Antigene mit einer sich anschließenden Einengung auf das Antigen „Zeta-Kette“ könnte eine Präferenz für die Erkennung der Zeta-Kette im Kontext der T-Zelloberfläche entstanden sein. Diese Präferenz könnte die konsistent höheren Färbeintensitäten auf zytotoxischen T-Lymphozyten erklären.

Die heterogene Anfärbbarkeit der Zeta-Kette auf NK-Zellen kann außerdem durch eine donorabhängige variable Zahl der Fc γ RIII-Rezeptoren (CD16) auf der Zelloberfläche bedingt sein. So berichteten Carson

und Mitarbeiter (1997) z.B. von einer altersabhängigen CD16-Expression auf NK-Zellen. Während reife NK-Zellen CD56 schwach und CD16 stark exprimieren, weisen die am wenigsten differenzierten NK-Zellen ein umgekehrtes Expressionsmuster auf. Wird diese Aussage mit den Ergebnissen von Lanier, der die CD16-Assoziation mit der Zeta-Kette erstmals beschrieb (Lanier et al., 1989), logisch verbunden, so kann eine donorabhängige CD16-assoziierte Expression der Zeta-Kette auf NK-Zellen angenommen werden. Auch die beiden „Natural Cytotoxicity Receptors“ (NCRs) NKp46 und NKp30, die ebenfalls mit der Zeta-Kette assoziiert sind, weisen eine donorabhängige Expression auf der NK-Zelloberfläche auf (Sivori et al., 1999; Pende et al., 1999). Die beiden Rezeptoren zeigten in den Untersuchungen von Sivori und Pende ein paralleles Expressionsverhalten auf NK-Zellen: NK-Zellen mit einem „NKp46^{stark}“ oder „NKp46^{schwach}“-Phänotyp sind ebenfalls durch einen „NKp30^{stark}“ oder „NKp30^{schwach}“-Phänotyp charakterisierbar. Des Weiteren wurde gezeigt, daß eine niedrige NCR-Expression mit einer schwach ausgeprägten Zytotoxizität verbunden ist. Da NKp30 und NKp46 mit der Zeta-Kette assoziiert sind, läßt sich daraus auf eine donorabhängige Zeta-Ketten-Expression auf der NK-Zell-Oberfläche schließen. Zusammen mit der vom Alter der NK-Zellen abhängigen CD16-Expression könnte sich daraus eine deutlich variabelere Expressionsstärke der Zeta-Kette auf NK-Zellen ergeben, die sich auch in den FACS-Färbungen mit dem Anti-Zeta-Ketten-Antikörper 2-B-5 widerspiegeln dürfte. Ferner kann nicht ausgeschlossen werden, daß der 2-B-5 Antikörper die Zeta-Kette in Assoziation mit einem oder sogar zwei der drei relevanten NK-Rezeptoren (CD16, NKp46 und NKp30) aus sterischen Gründen nicht oder nur sehr schwach erkennt. Das gleiche gilt für die Assoziation der Zeta-Kette an NKp46 und NKp30.

Ein weiterer Erklärungsansatz kann auf Ergebnissen von Zhang und Mitarbeitern (1998) aufbauen. In ihrer Arbeit konnte eine T-Zell-Rezeptor-unabhängige Expression von CD3 $\delta\epsilon$ und CD3 $\gamma\epsilon$ sowie auch der Zeta-Kette auf der Zelloberfläche von unreifen T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Geht man davon aus, daß die Zeta-Kette zu einem gewissen Prozentsatz nicht mit dem TCR-CD3-Komplex assoziiert vorliegt, so würde daraus eine bessere Zugänglichkeit für die Antikörperbindung resultieren, die die bessere Anfärbung der Zeta-Kette auf T-Lymphozyten in der Durchflußzytometrie erklären könnte. Eine CD16-unabhängige Zeta-Ketten-Expression auf NK-Zellen, die ebenfalls eine erleichterte Antikörperbindung zur Folge haben könnte, ist in der Literatur dagegen nicht beschrieben.

Mit Hilfe kompetitiver Inhibition konnte die Antikörperbindungsspezifität auf der Oberfläche von der T- und NK-Zellen überprüft werden. Werden die Antikörperparatope durch lösliches Antigen abgesättigt und ist eine spezifische Antikörperbindung damit nicht mehr möglich, werden unspezifische Antikörperbindungen wie Fc-Teil vermittelte Bindungen sichtbar. Der Vergleich der FACS-Färbungen in Gegenwart und Abwesenheit des löslichen Antigens zeigten eindeutig die erwartete quantitative Inhibition der Bindung des 2-B-5 Antikörpers auf zytotoxischen T-Lymphozyten. Eine unspezifische Bindung des 2-B-5 Antikörpers an zytotoxische T-Lymphozyten konnte damit ausgeschlossen werden. Die Inhibierbarkeit der Antikörperbindung auf NK-Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden, wenn auch die Differenz zwischen der Isotypkontrolle und der positiven Antikörperfärbung geringer ausfiel. Die Ergebnisse der Inhibitionstests ermöglichen damit die Schlußfolgerung, daß der Ratten-Hybridom-Antikörper 2-B-5 an die Zeta-Kette auf T- und NK-Zellen bindet.

4.3 Charakterisierung des gebundenen Antigens

Immuno- oder Westernblotting ermöglicht die schnelle und sensitive Charakterisierung von Proteinen unter Ausnutzung der spezifischen Antigen-Antikörper-Erkennung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe dieses Assays das durch den Ratten-Antikörper 2-B-5 erkannte Antigen bestimmt werden.

Bei der Auswertung des Immunoblots fielen zunächst zwei dominante Banden mit einer Größe von 50 kDa auf, die sowohl auf dem mit Sekundärantikörper inkubierten Blot als auch auf dem Kontrollblot ohne Sekundärantikörper zu finden sind. Die Banden befanden sich jeweils in den Spuren, in denen das mit dem Anti-CD3 ϵ Antikörper präzipitierte Zellysate aufgetrennt wurde. Dieser Sepharose-konjugierte murine Antikörper wurde als Positivkontrolle eingesetzt, da er neben der Epsilon-Kette des CD3-Komplexes die Zeta-Kette kopräzipitiert (Baniyash, et al., 1988). Zur Detektion des gebundenen murinen Anti-Zeta-Ketten Antikörpers 6B10, der die Aminosäuren 36 bis 54 der intrazellulären Domäne der Zeta-Kette erkennt, kam ein Peroxidase-konjugierter Ziege-Anti-Maus-Antikörper zum Einsatz. Die Detektion der 50-kDa-Bande im Kontrollblot ohne Sekundärantikörper legt nahe, daß hier keine Zeta-Ketten-Proteine, sondern Teile des zur Präzipitation eingesetzten murinen Anti-CD3 ϵ Antikörpers nachgewiesen wurden. Die Größe von 50 kDa ist ein Indiz dafür, daß es sich um die leichten Ketten des murinen Präzipitationsantikörpers handelt. Unter den reduzierenden und denaturierenden Bedingungen der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese lösten sich die leichten von den schweren Ketten und wurden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und detektiert.

Die zwei weniger dominanten Protein-Banden, die deutlich unterhalb des 22-kDa-Größenstandards laufen, wurden nur durch den intrazellulär-bindenden Anti-Zeta-Ketten Antikörper 6B10 detektiert, der Kontrollblot wies diese Banden nicht auf. Aus dem Zellysate der T-Zelllinie Jurkat ließ sich diese Bande sowohl mit dem zu charakterisierenden Ratten-Antikörper 2-B-5, als auch mit dem Anti-CD3 ϵ Antikörper präzipitieren. Das publizierte Molekulargewicht der Zeta-Kette liegt bei 16 kDa und stimmt folglich mit dem präzipitierten und durch den Anti-Zeta Antikörper 6B10 nachgewiesenen Protein gut überein (Weissman et al., 1986; Orloff et al., 1989). Der Nachweis der Zeta-Kette im Präzipitat, das durch Verwendung des Sepharose-konjugierten Anti-CD3 ϵ -Antikörpers erhalten wurde, entspricht den Erwartungen und deckt sich mit den Ergebnissen von Baniyash et al., 1988. Die Auswertung dieses Ergebnisses läßt den eindeutigen Schluß zu, daß der 2-B-5 Antikörper auf der T-Zelllinie Jurkat eine Domäne der Zeta-Kette als Antigen bindet. Daß es sich hierbei um die Extrazellulärdomäne handeln muß, läßt sich aus den Ergebnissen der Durchflußzytometrie, der Rezeptorinternalisierung und der Proliferationsassays ableiten, da bei diesen Ansätzen jeweils intakte vitale Zellen verwendet wurden, bei denen nur die Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette zugänglich war.

Die Ursache für das Fehlen der Zeta-Ketten-Bande im NK-Zellpräzipitat ist hingegen unklar. Zur Erklärung kann ggf. eine zu geringe Sensitivität des Immunoblot-Verfahrens bei einem verglichen mit T-Zellen deutlich geringeren Expressionsniveau der vom 2-B-5 Antikörper erkennbaren Zeta-Kette dienen. Die Sensitivität der Methode hängt dabei stark von dem zur Präzipitation eingesetzten Antikörper ab. Die Affinität des Ratten-IgM-Antikörpers ist mit Sicherheit niedrig anzusetzen, da IgM-Antikörper von B-Zellen produziert werden, die keine Affinitätsreifung durchlaufen haben. Diese Affinitätsschwäche wird

durch die Multivalenz des IgM-Isotyps basierend auf seiner pentameren Struktur mit 10 Valenzen und dem daraus resultierenden Aviditätsgewinn kompensiert. Dies kann jedoch nicht die Bindung des IgM-Antikörpers an monovalente Antigene wie z.B. im Zellysat vereinzelt Zeta-Ketten verstärken, da hier keine multivalente Interaktion möglich ist; d.h. nur größere Proteinkomplexe, die mehrere Zeta-Ketten-Moleküle enthalten, würden durch den IgM-Antikörper stärker gebunden. Gerade aber die Avidität des IgM-Antikörpers kann nach Kopplung an Sepharose auf Grund der chemischen Modifikation und der sterischen Behinderung herabgesetzt sein.

Die Unterschiede in der FACS-Färbeintensität des 2-B-5 Antikörpers auf den PBMCs zeigten eine bessere Anfärbung der zytotoxischen T-Lymphozyten im Vergleich zu den NK-Zellen an. Werden diese Färbeunterschiede aus den FACS-Versuchen auf die Fähigkeit des 2-B-5-Antikörpers zur Antigenpräzipitation übertragen, so könnte daraus eine verschlechterte Fähigkeit zur Immunpräzipitation der Zeta-Kette aus NK-Zellysaten abgeleitet werden. Schließlich könnte wegen der hohen interindividuellen Variabilität Zeta-Ketten-assoziiierter NK-Rezeptoren auch noch die Wahl des NK-Zellspenders eine Rolle spielen. Auf Grund des hohen Bedarfs an gereinigten NK-Zellen für die Immunpräzipitation wurde „Buffy Coat“ als Ausgangsmaterial verwendet, das sich jedoch für die durchflußzytometrische Analyse von NK-Zellen mit dem 2-B-5 Antikörper als untauglich erwies.

4.4 Rezeptorinternalisierung nach Antikörperbindung

Rezeptorinternalisierung nach Ligandenbindung und eine sich anschließende intrazelluläre Signaltransduktion sind gemeinsame Eigenschaften vieler biologischer Systeme (Brown und Greene, 1991). Der Prozeß der Internalisierung wird als wichtiges Ereignis für die Homeostase im Sinne einer Begrenzung der Signaldauer oder der Signalquantität erachtet. Die Internalisierung des TCR-CD3-Komplexes nach seiner natürlichen (Peptid:MHC) oder artifiziellen (Querverknüpfung durch Antikörper) Rekrutierung wird bei humanen wie murinen T-Zellen berichtet (Luton et al., 1994; Valitutti et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde der 2-B-5 Antikörper mit einem Anti-CD3 ϵ -Referenz-Antikörper im Hinblick auf die Antikörper-induzierte Internalisierung des TCR-CD3-Komplexes verglichen. Die durch den Anti-Zeta-Ketten-Antikörper 2-B-5 ausgelöste Modulation der Rezeptorexpression war durch den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten des Sekundärantikörpers bei 4°C und bei 37°C gut erkennbar. Während die Intensität der Bindung des Sekundärantikörpers an den Ratten IgM-Antikörper 2-B-5 bei 4°C keine Veränderung erfuhr, nahm die Fluoreszenz bei 37°C sichtbar ab und überlappte deutlich mit der Kontrollfärbung (ohne den Primärantikörper). Das gleiche Phänomen war bei der Anfärbung mit dem Anti-CD3 ϵ -Antikörper zu beobachten. Die Abschwächung der Färbeintensität kann theoretisch zwei Ursachen haben: Zum einen kann eine Antikörper-induzierte Rezeptorinternalisierung und zum anderen eine Dissoziation der Antikörper-Rezeptorbindung stattgefunden haben.

Schon 1987 untersuchten Telerman und Mitarbeiter die Internalisierung des TCR-CD3-Komplexes nach Stimulation mit OKT3 (einen Anti-CD3 ϵ Antikörper). Dazu wurden die isolierten PBMC bei 4°C mit OKT3-Antikörpern inkubiert, ungebundene Antikörper durch mehrmaliges Waschen entfernt und anschließend die Zellen bei 37°C inkubiert. Ein Nachweis der oberflächlich gebundenen Antikörper

erfolgte durch einen Fluorescein-gekoppelten Sekundärantikörper; der Internalisierungsprozeß wurde mit Goldpartikel-gekoppelten Antikörpern elektronenmikroskopisch verfolgt. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß die Rezeptorinternalisierung rasch nach der Antikörperbindung einsetzte; schon nach 15 Minuten waren bei 37°C 50% der stimulierten TCR-CD3-Komplexe internalisiert. Ein Verschwinden des Rezeptorkomplexes nach Antikörperstimulation wurde bei 4°C nicht beobachtet. Die mit Goldpartikeln markierten Antikörper ermöglichten es, den Vorgang der Internalisierung detaillierter zu beobachten: Nach Inkubation bei einer permissiven Temperatur von 37°C war eine Zusammenlagerung („Clustering“) von stimulierten Rezeptoren zu beobachten, gefolgt von der Ausbildung einer Invagination („coated pit“), die letztlich in die Bildung eines Endosoms mündete, in dem sich die internalisierten TCR-CD3-Komplexe befanden.

San Jose et al. (2000) untersuchten in diesem Zusammenhang die Ko-Internalisierung von nicht unmittelbar beteiligten Rezeptorketten des TCR-CD3-Komplexes. Für ihre Untersuchungen wurden u.a. Zeta-Ketten-basierte chimäre Rezeptorkonstrukte verwendet, die sich aus der Extrazellulär- und der Transmembrandomäne des IL-2-Rezeptors (CD25) sowie der Intrazellulärdomäne der Zeta-Kette zusammensetzten. Die verhältnismäßig aufwendige Konstruktion und der Einsatz eines chimären Rezeptors für diese Untersuchungen waren notwendig, da kein Antikörper zur Verfügung stand, der mit der Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette reagiert. Milzzellen aus transgenen Mäusen, die den chimären Rezeptor exprimierten, wurden alternierend mit Anti-CD3 ϵ -Antikörpern und Anti-CD25-Antikörpern stimuliert. Es zeigte sich, daß nach einer Stimulation des chimären CD25-Zeta-Ketten-Rezeptors eine Ko-Internalisierung von unbeteiligten Rezeptoren stattfand. Auch die Stimulation durch Anti-CD3 ϵ -Antikörper zog die Rezeptorinternalisierung nach sich. Die Autoren leiteten daraus ab, daß auch das Engagement der unmodifizierten Zeta-Kette zur Internalisierung nicht-kontakter Rezeptoren führt.

Werden die mit dem Zeta-Ketten-Antikörper gewonnenen Ergebnisse mit denen von Telerman (et al., 1987) und San Jose (et al., 2000) verglichen, erscheint es wahrscheinlich, daß die Antikörper-induzierte Komplex-Internalisierung für die Fluoreszenzabnahme verantwortlich ist. Die Fähigkeit des 2-B-5 Antikörpers, diesen Prozeß zu induzieren, kann damit als ein starkes Indiz für die Anti-Zeta-Ketten-Spezifität des Antikörpers gewertet werden, da auch der von San Jose et al. beschriebene chimäre Rezeptor, der die Intrazellulärdomäne der Zeta-Kette enthielt, nach Bindung des spezifischen Liganden IL-2 eine Internalisierung des Rezeptors induzierte.

4.5 Antikörper-induzierte Proliferation

In den Versuchen zur Antikörper-vermittelten Rezeptorinternalisierung wurde bereits gezeigt, daß der Anti-Zeta-Antikörper nach Bindung an sein Antigen in die Zelle aufgenommen wird. Daraus konnte geschlossen werden, daß es zu einer Aktivierung kommt. Im Proliferationstest wurde eingehender untersucht, ob der Aktivierung auch eine Proliferationsphase folgt. Die Trennung in die beiden Effektorzellpopulationen – CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen – sollte zusätzlich aufklären, ob beide Zelltypen zur Proliferation stimuliert werden können. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, daß die durch den immobilisierten 2-B-5 Antikörper sowohl in den unseparierten PBMC als auch in den getrennten Effektorpopulationen Zellproliferation induziert wurde. Das Ausbleiben der Proliferation bei jeder der

drei Populationen nach Stimulation durch Isotyp-Kontrollen irrelevanter Spezifität unabhängig von der Antikörperverdünnungsstufe, ist ein eindeutiger Beleg für die Spezifität der Stimulation durch den Anti-Zeta-Ketten-Antikörper. Die durch den 2-B-5 Antikörper induzierte Proliferation zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration mit einem Maximum bei 5 µg/ml. Der erwartete stetige Anstieg mit maximaler Proliferation bei 10 µg/ml Antikörperkonzentration zeigte sich jedoch nicht. Vermutlich handelt es sich hierbei um ein Artefakt. Die Messung der Proliferation findet während der letzten 24 Teststunden durch BrdU-Inkorporation in sich teilenden Zellen statt. Sollte die starke Proliferation bei der höchsten Antikörperkonzentration vor diesem Zeitraum bereits zu einer Verknappung der Nährstoffe im Medium geführt haben, so kann dies die Proliferationsrate im relevanten Meßzeitraum auf Grund von Nährstoffmangel herabgesetzt haben. Als Hinweis dafür kann die starke Gelbfärbung des mit einem pH-Indikator versehenen Nährmedium RPMI-1640 gewertet werden, die bei der höchsten Antikörperkonzentration ein stark verbrauchtes Medium anzeigte. Des weiteren zeigte sich, daß neben den unseparierten PBMC auch die isolierten CD8⁺ T-Lymphozyten und NK-Zellen durch die Quervernetzung der Zeta-Ketten mit dem 2-B-5 Antikörper zur Proliferation stimuliert werden können. Somit konnten durch diesen Versuchsansatz eindeutig die wachstumsstimulierenden Eigenschaften des Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers belegt und die Verbindung der durch den Antikörper gebundenen Zeta-Ketten mit der zellinternen Signaltransduktionskaskade nachgewiesen werden.

Zellproliferation als Reaktion auf externe Stimuli ist ein komplexer, vielschrittiger Prozeß. Er umfaßt im Regelfall die Rekrutierung eines oberflächengebundenen Rezeptors, die Signaltransduktion ins Zellinnere durch die Phosphorylierung von intrazellulären Enzymen wie z.B. der zahlreichen Phosphokinasen, bis hin zur Aktivierung und Transkription multipler Gene. DNA- und Proteinsynthese münden letztendlich in die Expansion der stimulierten Zellen durch Zellteilung. Eine solche Aktivierung von T-Lymphozyten *in vivo* erfolgt z.B. nach TCR-MHC-Interaktion infolge der Präsentation eines prozessierten Viruspeptids im MHC-Kontext einer Antigen-präsentierenden Zelle. Die Aktivierung und Proliferation der so stimulierten T-Zelle initiiert eine Immunantwort, die letztlich zur Elimination von Virus-infizierten Zellen führt, die das gleiche Peptid in ihrem MHC-Molekülen auf der Oberfläche tragen. *In vitro* kann die immunologische Kompetenz von T-Lymphozyten, auf antigene Stimulation zu reagieren, dadurch festgestellt werden, daß z.B. Anti-CD3-Antikörper als Mitogen zur Proliferation führen. Die Bindung des Antikörpers imitiert dabei die natürliche Stimulation des TCR-CD3-Komplexes durch einen MHC-Peptid-Komplex. Es wird dadurch die gleiche zellinterne Signalkaskade ausgelöst wie bei einem natürlichen TCR-Engagement (Gajewski et al., 1989). Methodisch wird diese Eigenschaft immobilisierter Anti-CD3-Antikörper z.B. für die Aktivierung und Expansion von T-Lymphozyten vor Zytotoxizitätstests eingesetzt (Mezzanzanica et al., 1991; Kipriyanov et al., 1998). Der 2-B-5 Antikörper erfüllt mit der Fähigkeit, Proliferation bei den beiden Effektorpopulationen zu induzieren eine wichtige Grundvoraussetzung für eine Verwendung der Anti-Zeta-Spezifität im Rahmen eines bispezifischen Antikörpers.

4.6 N-Terminus-Blockade im Phage-Display zur Isolierung von scFv-Fragmenten

Ein bispezifischer Single-Chain-Antikörper, der einerseits die Extrazellulärdomäne des tumorassoziierten EpCAM-Antigens erkennen und andererseits auf T-Lymphozyten und NK-Zellen an die Extrazellulärdomäne der humanen Zeta-Kette binden soll, kann prinzipiell folgende Anordnungen der variablen Domänen aufweisen: $V_{L_{\text{Anti-Zeta-Kette}}}-V_{H_{\text{Anti-Zeta-Kette}}}-V_{H_{\text{Anti-EpCAM}}}-V_{L_{\text{Anti-EpCAM}}}$ oder $V_{L_{\text{Anti-EpCAM}}}-V_{H_{\text{Anti-EpCAM}}}-V_{H_{\text{Anti-Zeta-Kette}}}-V_{L_{\text{Anti-Zeta-Kette}}}$. Single-Chain-Fragmente (scFv), die sich aus konventionellen Hybridom-Antikörpern ableiten oder aus kombinatorischen Antikörper-Bibliotheken mit Hilfe der Phage-Display-Methode isoliert wurden, verlieren jedoch häufig ihre Bindungsfähigkeit, wenn sie C-terminal im Kontext eines bispezifischen Single-Chain-Antikörpers positioniert werden (Dissertation F. Zettl). Die Kriterien, die eine Voraussage ermöglichen, welches scFv-Konstrukt in dieser Position seine Fähigkeit zur Antigenbindung beibehält, sind bis jetzt nicht bekannt. Auf Grund der ohnehin kritischen Bindungsverhältnisse im Bereich der Extrazellulärdomäne der humanen Zeta-Kette, sollte der Zeta-Ketten-Spezifität die N-terminale Position vorbehalten bleiben.

Um gezielt C-terminal bindende EpCAM-spezifische scFv-Fragmente zu isolieren kam im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals eine Methode zum Einsatz, die durch ein modifiziertes Phage-Display-Verfahren die Selektion von VL/VH-Kombinationen erlaubt, die ihre Bindungskapazität in C-terminaler Position nicht einbüßen. Die Modifikation der Phage-Display-Methode besteht in der Einführung einer Surrogat-Domäne, die unmittelbar vor der Sequenz der VL/VH-Domänen positioniert wurde und mit diesen über einen kurzen Peptidlinker verbunden ist. So wurden simultan während der Anreicherung von spezifisch bindenden VL/VH-Kombinationen diejenigen selektioniert, die eine N-terminale Blockade tolerierten. Als geeignete Surrogat-Domäne, die vor die spezifitätsbestimmenden Sequenzen kloniert wurde, kam die Sequenz der N2-Domäne des Gen III-Proteins des filamentösen M13-Phagen zum Einsatz (Krebber et al., 1995). Diese N2-Domäne hat innerhalb des Infektionsvorgangs beim Wildtyp-Phagen die Funktion der Bindung des Phagen an den Sex-Pilus der F⁺-*E.coli*-Stämme (Holliger et al., 1997; Chatellier et al., 1999). Die 130 Aminosäuren lange N2-Domäne wurde als Surrogat-Domäne gewählt, da sie ohnehin in 2 bis 3 Kopien auf dem Phagen exprimiert wird und damit keine zusätzlichen Anforderungen an den Expressionsapparat der Wirtszelle stellt. Die Größe der N2-Domäne entspricht außerdem in etwa der einer Immunglobulin-Domäne.

Trotz der erschwerten Selektionsbedingungen durch die N-terminale Blockade kam es zur Anreicherung von EpCAM-spezifischen scFv-Fragmenten, die eine Positionierung am benachteiligten C-Terminus ohne Funktionseinbußen tolerierten. Die Umklonierung der selektierten scFv-Fragmente in ein bispezifisches Antikörperkonstrukt, das in Säugerzellen exprimiert wurde, erbrachte schließlich den definitiven Beleg für die erhaltene Bindung in C-terminaler Position.

Dieses Ergebnis ist ein Nachweis dafür, daß das Prinzip der N-terminalen Blockade im Rahmen des Phage-Display-Verfahrens zu den gewünschten Bindungseigenschaften führt. Damit zeigt sich dieses System der Hybridomtechnik für die Herstellung von Bindungsmodulen zur Verwendung in bispezifischen Single-Chain-Antikörpern klar überlegen.

4.7 Zeta-Ketten-basierte bispezifische Antikörper

Der rekombinate bispezifische Anti-Zeta/anti-EpCAM-Antikörper wurde auf seine Fähigkeit hin untersucht, die Zytotoxizität der Zeta-Ketten-positiven Effektorzellpopulationen gegen die EpCAM-positive Zelllinie Kato zu dirigieren. Es zeigte sich dabei eine gut reproduzierbare durch den bispezifischen Antikörper induzierte Zytotoxizität unseparierter PBMC und gereinigter CD8⁺ T-Lymphozyten. Der direkte Vergleich der spezifischen Lyseraten läßt eine bessere Lyse der Tumorzellen durch die PBMCs als durch die gereinigten CD8⁺ T-Zellen erkennen. Die Ursache für die erniedrigten CD8⁺ T-Zell-Lyseraten dürfte insbesondere im fehlenden Lyse-Beitrag der depletierten NK-Zellen liegen.

Die verschieden ausgeprägten spezifischen Lyseraten der Tumorzellen durch die gereinigten NK-Zellen zeigen eine deutliche Donorabhängigkeit, die durch das donorabhängige Expressionsniveau der Zeta-Ketten-assoziierten „Natural Cytotoxicity Receptors“ erklärbar ist. Außerdem fand sich eine stark variable unspezifische Tumorzellyse in Abwesenheit des bispezifischen Antikörpers, die zwischen den Donoren ebenfalls starke Schwankungen aufwies. Wie schon in der Einleitung erwähnt, sind NK-Zellen dazu in der Lage einige Tumorzelltypen ohne vorherige Sensibilisierung spontan zu lysieren. NK-Zell-Aktivität wird durch die Interaktion von einer Vielzahl von Rezeptorfamilien reguliert. Die Interaktionen dieser Rezeptoren mit ihren Liganden auf der potentiellen Zielzelle kontrollieren die verschiedenen aktivierenden und inhibitorischen Signalwege und bestimmen so die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen. Einen starken Einfluß auf die inhibitorischen Signalwege hat die Erkennung der MHC-I-Moleküle auf den Zielzellen durch „Killer cell inhibitory receptors“ (KIRs). Diese Rezeptoren erkennen spezifisch polymorphe Epitope auf MHC-I-Molekülen. So erwies sich die Zytotoxizität verschiedener NK-Zellklone als abhängig vom HLA-Allotyp der Zielzellen (Long et al., 1997). Da der HLA-Allotyp der eingesetzten Zielzellen vermutlich stark von den, durch die inhibitorischen Rezeptoren der NK-Zellen erkannten Allotypen abweicht, fällt in solchen Fällen die inhibitorische Komponente weg; eine Lyse der Zielzellen durch NK-Zellen auf Grund dieser Alloreaktivität ist die Folge. Die durch den bispezifischen Antikörper induzierte Zytotoxizität der NK-Zellen zeigt sich deshalb in einem zusätzlichen Beitrag zu derjenigen Lyserate, die bereits in Abwesenheit des bispezifischen Antikörpers meßbar ist. Die Erhöhung der relativen spezifischen Lyse fällt mit nur 8 - 15 % gering aus. Eine Ursache für diesen nur mäßigen Effekt kann in der schwachen Bindung des bispezifischen Antikörpers an die NK-Zellen begründet sein. In den durchflußzytometrischen Anfärbungen der Effektorzellpopulationen durch den pentameren IgM-Antikörper 2-B-5 war schon eine schwächer ausgeprägte Bindung an die NK-Zellen erkennbar. Dieser Unterschied in der Bindung auf T- und NK-Zellen dürfte sich im Falle des bispezifischen Antikörpers weiter zu Ungunsten der NK-Zellen vergrößern, da hier für die Interaktion mit der Zeta-Kette nur mehr eine einzige Valenz zur Verfügung steht statt 10 Valenzen wie sie im IgM-Antikörper vorliegen. Diese relative Bindungsschwäche verglichen mit T-Zellen könnte bei den NK-Zellen zu einer zeitlich verkürzten Effektorzell-Zielzell-Interaktion führen und/oder eine schwächere Aktivierung der Effektorzellen bewirken, so daß es mit NK-Zellen auch zu einer schwächeren Tumorzellyse kommt.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß es hier erstmals gelungen ist einen bispezifischen Antikörper herzustellen, der mit der Extrazellulärdomäne der humanen Zeta-Kette auf intakten T- und NK-Zellen reagiert und so diese beiden zytotoxischen Effektorzellpopulationen für die Zerstörung von Tumorzellen rekrutieren kann.

4.8 Zeta-Ketten basierte bispezifische Antikörper als Alternative zu chimären Rezeptoren auf T-Lymphozyten

Das Konzept der chimären Rezeptoren wurde in der Einleitung schon kurz vorgestellt. Die chimären Rezeptor-Konstrukte können u.a. aus Tumorantigen-bindenden scFv-Antikörper-Fragmenten bestehen, die mit der intrazellulären Signaltransduktionsdomäne der Zeta-Kette verbunden sind. Wird ein solches Konstrukt z.B. durch retroviralen Transfer auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten zur Expression gebracht, so entstehen tumorreaktive Effektorzellen, die eine Lyse von Tumorzellen induzieren indem sie diese durch ihren chimären Rezeptor spezifisch erkennen. Die Parallelen zwischen diesen chimären Rezeptoren und den Zeta-Ketten-basierten bispezifischen Antikörpern liegen in der gemeinsamen Nutzung der Signaltransduktionseigenschaften der Zeta-Kette und der spezifischen Erkennung der Tumorzellen mit Hilfe eines scFv-Antikörper-Fragments. Die Vorteile beider Ansätze liegen in der Unabhängigkeit von der Existenz einer Antitumor-Immunität und der Nicht-MHC-restringierten Erkennung des Tumorantigens. Doch während die chimären Rezeptor-Konstrukte für therapeutische Anwendungen erst mit großem Aufwand *ex vivo* in primäre T-Lymphozyten eines jeden einzelnen Patienten transfiziert werden müssen, bevor sie durch adoptiven Transfer reinfundiert werden, können bispezifische Antikörper jedem Patienten in gleicher Weise verabreicht werden.

Stancovski und Mitarbeiter beschrieben 1993 einen chimären Rezeptor, der aus einem Anti-Her2/Neu Single-Chain-Fragment und der Intrazellulärdomäne der Zeta-Kette bestand (Abb. 29). Nach Transfektion des Konstrukts in eine zytotoxische T-Zell-Hybridlinie und Selektion eines den chimären Rezeptor exprimierenden Klons erfolgte die funktionelle Charakterisierung. Die Integrität des Fusionsproteins aus Antigenbindungsteil und Signaltransduktionsteil wurde durch einen Rezeptor-spezifischen ELISA-Test nachgewiesen. Das an immobilisiertes Her2/Neu-Antigen gebundene Fusionsprotein wurde im Zellysate der transfizierten Zellen durch einen Anti-Zeta-Ketten Antikörper detektiert. Die Signaltransduktionsfunktion der Zeta-Kette wurde durch Messung der IL-2-Sekretion nachgewiesen, die mit der T-Zell-Aktivierung einher geht. Dabei ließen sich hohe IL-2-Spiegel bei der

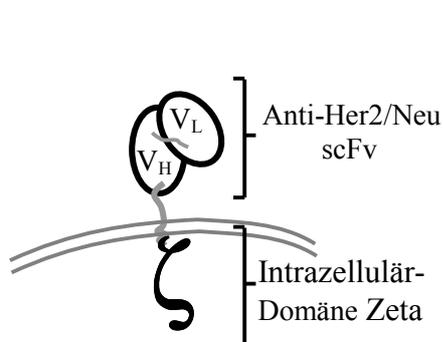


Abb. 29: Schematische Darstellung der Her2/Neu spezifischen scFv: Zeta-Ketten-Chimäre auf einer transfizierten CTL-Zelllinie (nach Stancovski et al., 1993)

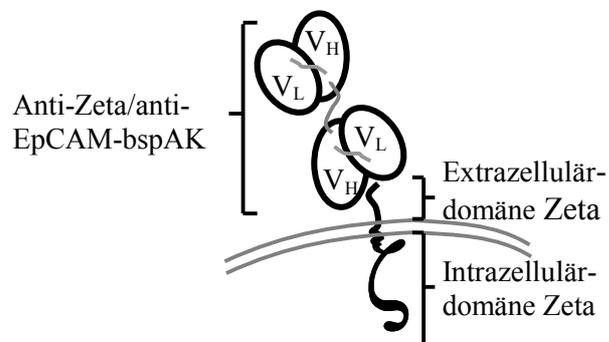


Abb. 30: Schematische Darstellung der Bindung des bispezifischen Antikörpers an die Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette auf T- oder NK-Zellen (Die mit der Zeta-Kette assoziierten Ketten wurden nicht eingezeichnet)

Ko-Kultivierung der Rezeptor-positiven T-Zellen mit Her2/Neu-exprimierenden Fibroblasten nachweisen. Ein weiterer funktioneller Test umfaßte die spezifische Lyse von Her2/Neu-exprimierenden Zellen durch die Rezeptor-positiven CTL-Klone. Es zeigte sich eine spezifische Lyse der Her2/Neu-positiver Zellen. In einem 16-stündigen Zytotoxizitätstest wurde eine spezifische Zellyse von 18% bei einem Effektor/Zielzell-Verhältnis von 10:1 erreicht. Werden die mit dem bispezifischen Anti-Zeta-Kette/anti-EpCAM Antikörper erhaltenen Ergebnisse diesen Ergebnissen gegenüber gestellt, so erscheint das bispezifische Single-Chain-Konstrukt dem chimären Rezeptor gleichwertig: Die durch den bispezifischen Antikörper (5µg/ml) rekrutierten CD8⁺ T-Lymphozyten erzielten im 18-Stunden Test eine Lyse von 27% bei einem Effektor/Zielzell-Verhältnis von 10:1. Wird der wesentlich höhere experimentelle Aufwand mit chimären Rezeptoren berücksichtigt, so erscheint die Eliminierung von Tumorzellen mit einem Zeta-Ketten-basierten bispezifischen Antikörper (Abb. 30) ohne Zweifel praktikabler. Ferner wurde der chimäre Zeta-Ketten-Rezeptor von Stancovski et al. in einer T-Zelllinie getestet, während für die therapeutische Umsetzung primäre T-Lymphozyten transfiziert werden müßten, was erfahrungsgemäß mit einer Verschlechterung der Gesamteffizienz einhergeht.

4.9 Verringerte Zeta-Ketten-Expression bei Karzinomen

Verschiedene Mechanismen können nach heutigem Wissen für die eingeschränkte Immunantwort gegen Tumore in immunkompetenten Patienten und Versuchstieren verantwortlich sein wie z.B. die aktive Inhibition der T-Zellen durch Suppressor-Zellen, eine herabgesetzte Produktion von Zytokinen oder T-Zell-supprimierende Zytokine im Tumor (Broder et al., 1978). Mizoguchi und Mitarbeiter fanden 1992 heraus, daß in Mäusen mit experimentell induzierten Kolonkarzinomen ein Signaltransduktionsdefekt durch das vollständige Fehlen der Zeta-Kette hervorgerufen worden war. Des weiteren war die fortgeschrittene Tumorerkrankung mit einer reduzierten Expression zweier Tyrosin-Kinasen, p56lck und p59fyn assoziiert (Mizoguchi et al., 1992). Auch Nakagomi fand in 14 Kolorektalkarzinom-Patienten eine signifikant verringerte Zeta-Ketten-Expression der peripheren T-Lymphozyten im Vergleich zu einem Normalkollektiv. Das gleiche Phänomen war auch bei tumorinfiltrierenden T- und NK-Zellen zu beobachten (Nakagomi et al., 1993). Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren, daß die Tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten (TIL) mit herabgesetzter Zeta-Ketten-Expression eine deutlich verminderte Anti-Tumor-Wirksamkeit besitzen. Neben Kolorektalkarzinomen wurden weitere Krebserkrankungen mit einer erniedrigten Zeta-Ketten-Expression in Zusammenhang gebracht: Zervix-Karzinom (Kono et al., 1996), Nierenzellkarzinom (Finke et al., 1993), Ovarialkarzinom (Lai et al., 1996), Prostata-Karzinom (Healy et al., 1998), und malignes Melanom (Hakansson et al., 1999). Des weiteren stellte sich heraus, daß T-Lymphozyten, die aus dem Tumorstroma isoliert wurden, im Vergleich zu T-Lymphozyten des peripheren Bluts desselben Patienten ein erniedrigtes Zeta-Ketten-Expressionsniveau zeigten. Diese TILs konnten allerdings ihre Fähigkeit zur Proliferation und Zytolyse *ex vivo* durch die Gabe von Interleukin-2 wiedererlangen (Tartour et al., 1995; Rabinowich et al., 1996). Gegenläufige Ergebnisse von Farace und Mitarbeitern zeigen in einer 41 Patienten umfassenden Studie, daß unter z.T. langandauernder IL-2-Administration keine Reversion der Zeta-Kette-Expression der T-Lymphozyten zum Normalniveau stattfand (Farace et al., 1994). Sie folgerten daraus, daß die veränderte Signaltransduktion durch die niedrige Expression der Zeta-Kette eine verbreitete Ursache für die progressive Immunsuppression bei Patienten mit fortgeschrittenem Krebs sei und eine IL-2-Gabe nicht ausreiche, um die Situation *in vivo* umzukehren.

In einer von Renner und Mitarbeitern durchgeführten Studie wurde festgestellt, daß das erniedrigte Expressionsniveau der Zeta-Kette auf T-Zellen bei Hodgkin-Lymphom-Patienten durch eine kombinierte Behandlung mit zwei bispezifischen Antikörpern, Anti-CD30/anti-CD28 und Anti-CD30/anti-CD3, innerhalb von 48 Stunden auf ein normales Niveau gebracht werden kann (Renner et al., 1996). Diese Beobachtung wurde durch den Nachweis einer normalen IL-2-Sekretion durch die T-Lymphozyten und andere funktionelle Tests (z.B. Zytotoxizität), bestätigt. Die Autoren interpretierten die positiven Ergebnisse als Bestätigung ihrer Ansicht von der generellen Notwendigkeit des „zweiten Signals“: Nur eine gleichzeitige Stimulation der T-Lymphozyten via CD3 und den kostimulatorischen Rezeptor CD28 als kostimulierender Ligand vermag nach diesen Resultaten die Zeta-Ketten-Expression auf T-Zellen zu normalisieren.

Viele unabhängige Untersuchungen konnten die erniedrigte Expression der Zeta-Kette bei verschiedenen Tumoren nachweisen. Die Strategien um diesem Phänomen zu begegnen, wie die externe IL-2-Gabe oder die gleichzeitige Verabreichung weiterer stimulierender Antikörper zielen darauf ab, die Zeta-Kette als wichtiges Glied der Signaltransduktion auf ein normales Expressionsniveau zurückzubringen. Die Herabsetzung der Zeta-Ketten-Expression auf T-Lymphozyten und NK-Zellen innerhalb des Tumors im Gegensatz zu der vorwiegend „normalen“ Expression im peripheren Blut legt einen nicht näher definierten negativen Einfluß der Tumorzellen oder des Tumorstromas nahe. Wird der Tumor aber chirurgisch entfernt und so eine Situation geschaffen, in der nur vereinzelte Tumorzellen oder Zellaggregate vorliegen, entfällt dieser Einfluß. Die minimal residuale Krebserkrankung erscheint daher als geeignetes Erkrankungsstadium, um ggf. eine Antikörper-basierte Tumorthherapie mit bispezifischen Antikörperkonstrukten durchzuführen, die T-Lymphozyten und NK-Zellen über die Bindung an die Zeta-Kette rekrutieren. Des weiteren könnte der Einsatz des 2-B-5 Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers einen wichtigen Beitrag zur Untersuchung der Zeta-Ketten-Defizienz bei Tumorerkrankungen leisten.

4.10 Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit, einen Antikörper zu isolieren, der die Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette sowohl auf zytotoxischen T-Lymphozyten, als auch auf NK-Zellen erkennt, kann im Sinne eines „proof of principle“ als erreicht gelten. Die Versuche zeigten aber auch die Limitationen des Zeta-Kettenspezifischen 2-B-5 Antikörpers auf, die wahrscheinlich auf seine geringe Affinität zurückzuführen sind. Dies trifft insbesondere für die schwache Reaktivität mit der Zeta-Kette auf NK-Zellen zu, die auch für die schwache, inkonsistente Tumorzellyse durch NK-Zellen verantwortlich sein dürfte, wenn diese mit Hilfe eines 2-B-5 basierten bispezifischen Antikörpers rekrutiert werden. Die Spezifität des 2-B-5 Antikörpers steht somit außer Zweifel, die Affinität allerdings erscheint verbesserungswürdig, so daß die Isolierung eines höheraffinen Anti-Zeta-Ketten-Antikörpers wünschenswert wäre.

Nachdem in dieser Arbeit die Realisierbarkeit des oben beschriebenen Ansatzes gezeigt werden konnte, gilt es, mit Hilfe von geeigneten Methoden die oben aufgezeigten Limitationen zu überwinden, um zu einem potenteren Antikörper zu gelangen, der z.B. als bispezifisches Konstrukt noch effektiver für die Rekrutierung der zytotoxischen Effektorzellen eingesetzt werden kann. Es existieren mehrere gentechnische Methoden, die zur Steigerung der Affinität bei gegebener Feinspezifität bereits erfolgreich eingesetzt wurden. Ein Ansatz beruht darauf, daß der zu verbessernde Antikörper als Leitstruktur bei der

Suche eines höheraffinen Antikörpers Verwendung findet ("guided selection"; Jespers et al., 1994). Im Rahmen eines solchen Versuchs werden z.B. nach der Immunisierung einer Ratte mit dem löslichen Zeta-Ketten-KLH-Konjugat die Milzzellen isoliert und nicht wie üblich für die Generierung eines Hybridoms genutzt. Vielmehr wird mit ihnen eine kombinatorische Bibliothek aus dem Immunglobulin-Repertoire der Antikörperantwort gegen die Zeta-Kette erstellt. Letztlich könnte mit Hilfe der Leitstruktur aus diesem Antikörper-Repertoire eine vollständig neue, stärker bindende VL/VH-Kombination selektiert werden, die das identische Epitop des Parentalantikörpers erkennt (Jespers et al., 1994). Ein wichtiger Vorteil dieser Methode besteht darin, daß durch die starke Fokussierung mittels Leitstruktur die Isolierung einer geeigneten VL/VH-Kombination wahrscheinlicher wird.

Eine weitere Methode imitiert die Affinitätsreifung von Antikörpern in den Keimzentren. Während die Mutationsrate der DNA in somatischen Zellen gewöhnlich bei einem Basenpaar pro 10^{10} Zellteilungen liegt, erhöht sie sich in B-Zellen während der somatischen Hypermutation in den Keimzentren auf einen Basenaustausch pro 10^3 Zellteilungen. Die gentechnische Imitation dieser natürlichen Mutations- und Selektionszyklen beruht auf dem Einsatz von *E.coli*-Stämmen mit einem Mutator-Phänotyp als Wirtszellen für Phage-Display-Verfahren (Irving et al., 1996; Low et al., 1996). So werden die scFv-exprimierenden Phagen zunächst z.B. in mehreren Wachstumsrunden expandiert, so daß es auf Grund der defekten Fehlerkorrektur der DNA-Polymerase III im *E.coli*-Mutatorstamm zu einer schnellen Anhäufung von Punktmutationen in der Antikörpersequenz und damit zur Bildung eines mutierten Repertoires kommt. Die Einführung von Mutationen in die spezifitätsbestimmenden VH- und VL-Sequenzen eines Antikörpers kann alternativ auch durch den Einsatz einer sogenannten "Error prone" PCR erfolgen (Daugherty et al., 1998). In mehrere Selektionsrunden mit steigender Waschstringenz auf dem gewünschten Antigen werden schließlich Antikörperfragmente mit verbesserter Bindungsaffinität isoliert. Mit Hilfe dieser Methoden konnten bereits Antikörper generiert werden, die im Vergleich zum Ausgangsantikörper eine 100-fach gesteigerte Affinität aufwiesen (Low et al., 1996).

Für den therapeutischen Einsatz sollte der 2-B-5 Antikörper und/oder affinitätsgesteigerte Anti-Zeta-Ketten-Antikörper der zweiten Generation außerdem humanisiert werden um ihre Immunogenität *in vivo* zu reduzieren. Vor dem Hintergrund der oben geschilderten Möglichkeiten zur Verbesserung der Antikörperbindung erscheinen die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit dem Anti-Zeta-Ketten-Antikörper 2-B-5 und dem bispezifischen Anti-Zeta-Kette/anti-EpCAM Antikörper als gute Grundlage, um verbesserte Zeta-Ketten-reaktive Antikörper zu generieren und für die Herstellung bispezifischer Antikörper zu verwenden.

5 Zusammenfassung

Antikörper-basierte Ansätze zur Therapie von Krebserkrankungen gewinnen gegenüber den konventionellen Behandlungsformen (Chirurgie, Chemo- und Strahlentherapie) zunehmend an Bedeutung. Dazu zählen auch bispezifische Antikörper, die immunologische Effektorzellen und Tumorzellen miteinander vernetzen, auf diese Weise die Effektorzellen aktivieren und schließlich zur Zerstörung der Tumorzellen führen. Um eine möglichst effektive Lyse der Tumorzellen zu erreichen, bieten sich als Effektorzellen insbesondere zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) und NK-Zellen an, die physiologischerweise einen ausgeprägten zytotoxischen Phänotyp besitzen. Während CTLs mit konventionellen bispezifischen Antikörpern meist über die Epsilon-Ketten des T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplexes rekrutiert werden, wird auf NK-Zellen der niedrig affine Fc-Rezeptor Fc γ RIII (CD16) als klassisches Aktivierungsmolekül für bispezifische Antikörper eingesetzt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals versucht einen Antikörper gegen die Zeta-Kette als ein weiteres Rekrutierungsmolekül zu isolieren, welche auf T- und NK-Effektorzellpopulationen gleichermaßen exprimiert wird. Die Zeta-Kette besitzt eine äußerst kurze Extrazellulärdomäne von nur 9 Aminosäuren und weist in seinem 113 Aminosäuren großen Intrazellulärteil drei Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive (ITAMs) auf, die in beiden Zellpopulationen eine wichtige Rolle bei von extrazellulären Rezeptoren ausgelösten Signaltransduktion spielen. Versuche, mit Hilfe der konventionellen Hybridomtechnik einen murinen monoklonalen Antikörper zu isolieren, schlugen fehl, ebenso wie die Isolierung eines entsprechenden Antikörpers aus einer murinen kombinatorischen VL/VH-Bibliothek mit 2×10^8 unabhängigen Klonen mittels Phage-Display. Erst nach Immunisierung von Ratten gelang es aus einem entsprechenden Hybridom einen IgM-Antikörper zu gewinnen, der sowohl an die Zeta-Ketten von CTLs als auch an die von NK-Zellen bindet. Der isolierte Antikörper 2-B-5 konnte auf mehrere Weisen charakterisiert werden: In einem kompetitiven Blockierungsansatz wurden Zielzellen mit dem 2-B-5 Antikörper in Anwesenheit von löslichem Peptidantigen inkubiert, das der kurzen Extrazellulärdomäne der Zeta-Kette entsprach. Die Antikörperbindung an die beiden Effektorzellpopulationen konnte so quantitativ inhibiert werden. Die weitere Spezifizierung des durch den Ratten-Antikörper gebundenen Antigens erfolgte durch ein Immunoblotting, bei dem die Zeta-Kette als Antigen direkt nachgewiesen werden konnte. In einem Proliferationsassay ließ sich nachweisen, daß der 2-B-5 Antikörper T-Lymphozyten aktiviert. Es zeigte sich, daß durch Immobilisierung des Antikörpers sowohl isolierte zytotoxische T-Lymphozyten als auch NK-Zellen zur Zellteilung stimuliert werden konnten.

Die spezifitätsbestimmenden variablen Domänen dieses Ratten-Antikörpers wurden aus den Hybridomzellen isoliert und durch Fusion mit den variablen Regionen eines Antikörpers, der das humane EpCAM-Antigen erkennt, zu einem bispezifischen Single-Chain-Antikörper mit der Strukturformel $VL_{\text{Anti-Zeta-Kette}}-VH_{\text{Anti-Zeta-Kette}}-VH_{\text{Anti-EpCAM}}-VL_{\text{Anti-EpCAM}}$ kombiniert. Der gereinigte bispezifische Antikörper stimulierte die Effektorzellen zu zytotoxischen Reaktionen gegen eine EpCAM-positive Magenkarzinomzelllinie *in vitro*. Während sich in zytotoxischen T-Lymphozyten mit dem bispezifischen Antikörper eine gut reproduzierbare und konzentrationsabhängige Lyse der

EpCAM-positiven Tumorzellen auslösen läßt, wiesen NK-Zellen eine deutlich schwächere Lyse auf, die außerdem stark vom individuellen Donor der Effektorzellen beeinflusst wurde.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß es mit dem Immunglobulin 2-B-5 erstmals gelungen ist, einen Antikörper gegen die kurze extrazelluläre Domäne der humanen Zeta-Kette herzustellen und damit die beiden relevanten Effektorpopulationen (T-Lymphozyten und NK-Zellen) zu stimulieren. Mit Hilfe eines aus diesem Antikörper entwickelten bispezifischen Konstrukts konnten Zeta-Ketten-positive Effektorzellen gegen Tumorzellen rekrutiert werden. Diese Ergebnisse zeigen einen Ansatz zur Rekrutierung mehrerer Effektorpopulationen für die Anwendung im Bereich bispezifischer Antikörper und eröffnen bispezifischen Antikörpern einen neuen Weg zur Therapie.

**Nukleotid- und Aminosäuresequenz der variablen leichten Kette
des Anti-zeta-Ketten Antikörpers 2-B-5**

5' 9 18 27 36 45 54
 GAC ATC CAG ATG ACA CAG TCT CCT GCT TCC CTG TCT GCG TCT CCG GAA GAA ATT

 D I Q M T Q S P A S L S A S P E E I

CDR 1

 63 72 81 90 99 108
 GTC ACG ATC ACA TGC CAG GCA AGC CAG GAC ATT GGT AAT TGG TTA GCA TGG TAT

 V T I T C Q A S Q D I G N W L A W Y

CDR 2

 117 126 135 144 153 162
 CAG CAG AAA CCA GGG AAA TCT CCT CAA CTC CTG ATC TAT AGT GCA ACC AGC TTG

 Q Q K P G K S P Q L L I Y S A T S L

GCA GAC 171 180 189 198 207 216
 GGG ATC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT AGA TCT GGT ACA CAG TAT TCT

 A D G I P S R F S G S R S G T Q Y S

 225 234 243 252 261 270
 CTT AAG ATC AGC AGA CTA CAG GTT GAA GAT ACT GGA ATC TAT TAC TGT CTA CAG

 L K I S R L Q V E D T G I Y Y C L Q

CDR 3

 279 288 297 306 315
 CGT TAT AGT AAT CCC AAC ACG TTT GGA GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA 3'

 R Y S N P N T F G A G T K L E L K

Nukleotid- und Aminosäuresequenz
des EpCAM-bindenden single-chain Fragmentes 4-7

Die Zahlen geben die Nukleotidposition wider, die daraus resultierende Aminosäuresequenz (im Ein-Buchstaben-Kode) ist unterhalb der Nukleotidsequenz angegeben. Die ersten vier Aminosäuren werden durch das Plasmid pComb3H5Bhis kodiert. Die variable Region der schweren Kette (Position 1 - 372) ist durch eine Glyzin-Serin-Linker von der variablen Region der leichten Kette (417 - 753) getrennt. Die für die Konstruktion des single-chain Fragmentes relevanten Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen sind angegeben.

			9	Xho I ₁₈				27			36			45			54	
5'	GAG	GTG	CAG	CTG	CTC	GAG	CAG	TCT	GGA	GCT	GAG	CTG	GCG	AGG	CCT	GGG	GCT	TCA
	E	V	Q	L	L	E	Q	S	G	A	E	L	A	R	P	G	A	S
			63			72			81			90			99			108
	GTG	AAG	CTG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAC	ACC	TTC	ACA	AAC	TAT	GGT	TTA	AGC
	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	N	Y	G	L	S
			117			126			135			144			153			162
	TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	CCT	GGA	CAG	GTC	CTT	GAG	TGG	ATT	GGA	GAG	GTT	TAT	CCT
	W	V	K	Q	R	P	G	Q	V	L	E	W	I	G	E	V	Y	P
			171			180			189			198			207			216
	AGA	ATT	GGT	AAT	GCT	TAC	TAC	AAT	GAG	AAG	TTC	AAG	GGC	AAG	GCC	ACA	CTG	ACT
	R	I	G	N	A	Y	Y	N	E	K	F	K	G	K	A	T	L	T
			225			234			243			252			261			270
	GCA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCG	TCC	ATG	GAG	CTC	CGC	AGC	CTG	ACC	TCT	GAG
	A	D	K	S	S	S	T	A	S	M	E	L	R	S	L	T	S	E
			279			288			297			306			315			324
	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TTC	TGT	GCA	AGA	CGG	GGA	TCC	TAC	GAT	ACT	AAC	TAC	GAC
	D	S	A	V	Y	F	C	A	R	R	G	S	Y	D	T	N	Y	D
			333			342			351			360 BstE II			369			378
	TGG	TAC	TTC	GAT	GTC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGT
	W	Y	F	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	G	G
			387			396			405			414		Sac I ₄₂₃				432
	GGT	GGT	TCT	GGC	GGC	GGC	GGC	TCC	GGT	GGT	GGT	GGT	TCT	GAG	CTC	GTG	ATG	ACC
	G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	E	L	V	M	T
			441			450			459			468			477			486
	CAG	ACT	CCA	CTC	TCC	CTG	CCT	GTC	AGT	CTT	GGA	GAT	CAA	GCC	TCC	ATC	TCT	TGC
	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C
			495			504			513			522			531			540
	AGA	TCT	AGT	CAG	AGC	CTT	GTA	CAC	AGT	AAT	GGA	AAC	ACC	TAT	TTA	CAT	TGG	TAC
	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	G	N	T	Y	L	H	W	Y

		180		189		198		207		216		225					
TAT	CAG	CAG	AAA	CCA	GGG	AAA	TCT	CCT	CAA	CTC	CTG	ATC	TAT	AGT	GCA	ACC	AGC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Y	Q	Q	K	P	G	K	S	P	Q	L	L	I	Y	S	A	T	S
		234		243		252		261		270		279					
TTG	GCA	GAC	GGG	ATC	CCA	TCA	AGG	TTC	AGC	GGC	AGT	AGA	TCT	GGT	ACA	CAG	TAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	A	D	G	I	P	S	R	F	S	G	S	R	S	G	T	Q	Y
		288		297		306		315		324		333					
TCT	CTT	AAG	ATC	AGC	AGA	CTA	CAG	GTT	GAA	GAT	ACT	GGA	ATC	TAT	TAC	TGT	CTA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	L	K	I	S	R	L	Q	V	E	D	T	G	I	Y	Y	C	L
		342		351		360		369		378		387					
CAG	CGT	TAT	AGT	AAT	CCC	AAC	ACG	TTT	GGA	GCT	GGG	ACC	AAG	CTG	GAG	CTG	AAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Q	R	Y	S	N	P	N	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K
		396		405		414		423		432		441					
GGT	GGT	GGT	GGT	TCT	GGC	GGC	GGC	GGC	TCC	GGT	GGT	GGT	GGT	TCT	CAG	GTA	CAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	Q	V	Q
		450		459		468		477		486		495					
CTG	CAG	CAA	TCT	GGA	GCT	GAG	CTA	GTG	AAG	CCT	GGG	TCC	TCA	GTG	AAA	ATT	TCC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	S	S	V	K	I	S
		504		513		522		531		540		549					
TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAC	ACA	TTC	ACC	AGT	TAC	GAT	ATG	CAC	TGG	ATA	AAA	CAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	D	M	H	W	I	K	Q
		558		567		576		585		594		603					
CAG	CCT	GGA	AAT	GGC	CTT	GAG	TGG	ATT	GGG	TGG	ATT	TAT	CCT	GGA	AAT	GGT	AAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Q	P	G	N	G	L	E	W	I	G	W	I	Y	P	G	N	G	N
		612		621		630		639		648		657					
ACT	AAG	TAC	AAT	CAA	AAG	TTC	AAT	GGG	AAG	GCA	ACA	CTC	ACT	GCA	GAC	AAA	TCC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T	K	Y	N	Q	K	F	N	G	K	A	T	L	T	A	D	K	S
		666		675		684		693		702		711					
TCC	AGC	ACA	GCC	TAT	ATG	CAG	CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCA	GTC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V
		720		729		738		747		756		765					
TAT	TTC	TGT	GCA	AGA	GAT	TGG	CAT	TAC	TAT	AGC	AGC	TAT	ATC	CGT	CCC	TTT	GCT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Y	F	C	A	R	D	W	H	Y	Y	S	S	Y	I	R	P	F	A
		774		783		792		801		810		819					
TAC	TGG	GGC	CAA	GGC	ACT	CTG	GTC	ACT	GTC	TCC	GGA	GGT	GGT	GGT	TCT	GAG	GTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	G	G	G	G	S	E	V
		828		837		846		855		864		873					
CAG	CTG	CTC	GAG	CAG	TCT	GGA	GCT	GAG	CTG	GCG	AGG	CCT	GGG	GCT	TCA	GTG	AAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Q	L	L	E	Q	S	G	A	E	L	A	R	P	G	A	S	V	K
		882		891		900		909		918		927					
CTG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAC	ACC	TTC	ACA	AAC	TAT	GGT	TTA	AGC	TGG	GTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	N	Y	G	L	S	W	V

	936		945		954		963		972		981						
AAG	CAG	AGG	CCT	GGA	CAG	GTC	CTT	GAG	TGG	ATT	GGA	GAG	GTT	TAT	CCT	AGA	ATT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
K	Q	R	P	G	Q	V	L	E	W	I	G	E	V	Y	P	R	I
	990		999		1008		1017		1026		1035						
GGT	AAT	GCT	TAC	TAC	AAT	GAG	AAG	TTC	AAG	GCC	ACA	CTG	ACT	GCA	GAC		
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
G	N	A	Y	Y	N	E	K	F	K	G	K	A	T	L	T	A	D
	1044		1053		1062		1071		1080		1089						
AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCG	TCC	ATG	GAG	CTC	CGC	AGC	CTG	ACC	TCT	GAG	GAC	TCT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
K	S	S	S	T	A	S	M	E	L	R	S	L	T	S	E	D	S
	1098		1107		1116		1125		1134		1143						
GCG	GTC	TAT	TTC	TGT	GCA	AGA	CGG	GGA	TCC	TAC	GAT	ACT	AAC	TAC	GAC	TGG	TAC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	V	Y	F	C	A	R	R	G	S	Y	D	T	N	Y	D	W	Y
	1152		1161		1170		1179		1188		1197						
TTC	GAT	GTC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGT	GGT	GGT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	G	G	G	G
	1206		1215		1224		1233		1242		1251						
TCT	GGC	GGC	GGC	GGC	TCC	GGT	GGT	GGT	GGT	TCT	GAG	CTC	GTG	ATG	ACC	CAG	ACT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	E	L	V	M	T	Q	T
	1260		1269		1278		1287		1296		1305						
CCA	CTC	TCC	CTG	CCT	GTC	AGT	CTT	GGA	GAT	CAA	GCC	TCC	ATC	TCT	TGC	AGA	TCT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S
	1314		1323		1332		1341		1350		1359						
AGT	CAG	AGC	CTT	GTA	CAC	AGT	AAT	GGA	AAC	ACC	TAT	TTA	CAT	TGG	TAC	CTG	CAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	Q	S	L	V	H	S	N	G	N	T	Y	L	H	W	Y	L	Q
	1368		1377		1386		1395		1404		1413						
AAG	CCA	GGC	CAG	TCT	CCA	AAG	CTC	CTG	ATC	TAC	AAA	GTT	TCC	AAC	CGA	TTT	TCT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S
	1422		1431		1440		1449		1458		1467						
GGG	GTC	CCA	GAC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGA	TCA	GGG	ACA	GAT	TTC	ACA	CTC	AAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K
	1476		1485		1494		1503		1512		1521						
ATC	AGC	AGA	GTG	GAG	GCT	GAG	GAT	CTG	GGA	GTT	TAT	TTC	TGC	TCT	CAA	AGT	ACA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
I	S	R	V	E	A	E	D	L	G	V	Y	F	C	S	Q	S	T
	1530		1539		1548		1557		1566		1575						
CAT	GTT	CCG	TAC	ACG	TTC	GGA	GGG	GGG	ACC	AAG	CTT	GAG	ATC	AAA	CGT	ACG	ACT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H	V	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	R	T	T
SpeI/Nhe	1584		1593		1602		1611		1620		1629						
AGC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	ACT	AGC	TAA	TTA	ATT	TAA	GCG	GCC	GCT	CTA	GAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	H	H	H	H	H	H	T	S	*								
Sal I																	
TCG	AC	3'															

Oligonukleotidsequenzen

1) Oligonukleotide zur Amplifikation der murinen Antikörperfragmente zur Erstellung der DNA-Bibliothek

murine variable schwere Kette, 5'-Primer:

Die zur Klonierung eingesetzte Restriktionsenzymerschnittstelle **XhoI** ist fett hervorgehoben

MVH1	5'- (GC) AGGTGCAG CTCGAG GAGTCAGGACCT-3'
MVH2	5'-GAGGTCCAG CTCGAG CAGTCTGGACCT-3'
MVH3	5'-CAGGTCCA ACTCGAG CAGCCTGGGGCT-3'
MVH4	5'-GAGGTT CAGCTCGAG CAGTCTGGGGCA-3'
MVH5	5'-GA (AG) GTGAAG CTCGAG GAGTCTGGAGGA-3'
MVH6	5'-GAGGTGAAGCTT CTCGAG TCTGGAGGT-3'
MVH7	5'-GAAGTGAAG CTCGAG GAGTCTGGGGGA-3'
MVH8	5'-GAGGTT CAGCTCGAG CAGTCTGGAGCT-3'

murine variable schwere Kette, 3'-Primer (**SpeI**):

MIgG1	5'-TATGCA ACTAGT TACAACCAACAATCCCTGGG-3'
MIgG2a	5'-GAGAGAGGGGTTCTG ACTAGT GGGCACCTCTGGGCTC-3'
MIgG2b	5'-CTCCTT ACTAGT AGGACAGGGGTTGATTGT-3'
MIgG3	5'-GTTACC ACTAGT GCATGAAGAACCCTGGGGG-3'

murine variable leichte (kappa) Kette, 5'-Primer (**SacI**):

MUVK1	5'-CCAGTTC CGAGCT CGTTGTGACTCAGGAATCT-3'
MUVK2	5'-CCAGTTC CGAGCT CGTGTGACGCAGCCGCC-3'
MUVK3	5'-CCAGTTC CGAGCT CGTGCTCACCCAGTCTCCA-3'
MUVK4	5'-CCAGTTC CGAGCT CCAGATGACCCAGTCTCCA-3'
MUVK5	5'-CCAGATGT GAGCT CGTGATGACCCAGACTCCA-3'
MUVK6	5'-CCAGATGT GAGCT CGTCATGACCCAGTCTCCA-3'
MUVK7	5'-CCAGTTC CGAGCT CGTGATGACACAGTCTCCA-3'

murine variable leichte (kappa) Kette, 3'-Primer (**XbaI**):

MUCK	5'-GCGCCG TCTAGA ATTAACACTCATTCCTGTTGAA -3'
------	--

2) Oligonukleotide zur Amplifikation der N2-Domäne

5BFors:	5' - GCAGCTGGTTCGACAAATCCGGAGGTGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGC - 3'
5BForas:	5' - TCGAGCAGCTGCACCTCGGATCCACCACCTCCGATTTGTTCGACCAGCTGCAGCT - 3'

NS3s EcoRI:	5' - (p) ATCTCCGGAGGTGGTGGTAGCGCTATTCCATATGGACGTCCCGCTCGAGGTCGTC CATCATCACCATCATCACTGAGCGGCCGCTCTAGAG - 3'
-------------	--

NS3as Sall:	5' - (p) TCGACTCTAGAGCGGCCGCTCAGTGATGATGGTGGTGGTGGACGACCTCGAGCGG GACGTCCATATGGAATAGCGCTACCACCACCTCCGGAGAT - 3'
-------------	--

murine variable schwere Kette: (5B)

3'primer

MUVHBstEII 5'-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG-3'

murine V kappa Kette:

3'primer

MUVKHindIII/BsiWI 5'-TGGTGCACCTAGTCGTACGTTTGATCTCAAGCTTGGTCCC-3'

5' N2 **SaI I** : 5'-GGT**GTCGAC**ACTAAACCTCCTGAGTACGG-3'

3' N2 **BspEI** : 5'-GCCT**CCGGA**AGCATTGACAGGAGGTTGAGG-3'

Oligonukleotide zu Erstellung des 2-B-5 single-chain-Fragments

5'VL2B5BsrGI/EcoRV 5'-AGGTGTACACTCC**GATATC**CAGATGACACAGTCTCC-3'

3'VL 2B5 GS15 5'-GGAGCCGCCGCCGCGCCAGAACCACCACCACCTTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC-3'

5'VH 2B5 GS15 5'-GGCGGCGGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTCAGGTACAGCTGCAGCAATCTGG-3'

3'VH 2B5 **BspEI** 5'-AAT**CCGGA**AGAGACAGTGACCAGAGTG-3'

ratcmuRT 5'-GTGCAGGGCCAGAGAAGGCATC-3'

ratckRT 5'-GTAGGTCGCTTGTGGGGAAGTCTC-3'

5'-AncTail 5'-CGTCGATGAGCTCTAGAATTCCCCCCCCCCCCCD-3'

3'ratck 5'-GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCTGTTGAA-3'

3'ratcmu 5'-ATTGGGACTAGTCTCAACGACAGCTGGAAT-3'

5'RVHZ**XhoI** 5'-CAGGTACAGCTG**CTCGAGT**CTGGGGCTGAGCTAG-3'

5'RVKZ**SacI** 5'-GTAAATGT**GAGCTC**CAGATGACACAGTCTCCTG-3'

His6s 5'-CTAGCCATCACCATCACCATCACA-3'

His6as 5'-CTAGTGTGATGGTGATGGTGATGG-3'

7 Literaturverzeichnis

- Abelson, J. N. (1996). Combinatorial chemistry. *Meth. Enzymol.* 267: 82-109
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., und Watson, J. D. (1990). *Molecular biology of the cell.* New York, London: Garland Publishing Inc.
- Anderson, P. M., Ochoa, A. C., Ramsay, N. K., Hasz, D., und Weisdorf, D. (1992). Anti-CD3 + interleukin-2 stimulation of marrow and blood: comparison of proliferation and cytotoxicity. *Blood* 80, 1846-53.
- Anderson, P., Caligiuri, M., O'Brien, C., Manley, T., Ritz, J., und Schlossman, S. F. (1990). Fc gamma receptor type III (CD16) is included in the zeta NK receptor complex expressed by human natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 2274-8.
- Arber, W. (1978). Restriktionsendonukleasen. *Angew. Chem.* 90: 79-85
- August, D. A., Ottow, R. T., und Sugarbaker, P. H. (1984). Clinical perspective of human colorectal cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 3, 303-24.
- Bakker, A. B., Wu, J., Phillips, J. H., and Lanier, L. L. (2000). NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals. *Hum Immunol* 61, 18-27.
- Baniyash, M., Garcia-Morales, P., Bonifacino, J. S., Samelson, L. E., und Klausner, R. D. (1988). Disulfide linkage of the zeta and eta chains of the T cell receptor. Possible identification of two structural classes of receptors. *J Biol Chem* 263, 9874-8.
- Barbas, C. F. d., Amberg, W., Simoncsits, A., Jones, T. M., und Lerner, R. A. (1993). Selection of human anti-hapten antibodies from semisynthetic libraries. *Gene* 137, 57-62.
- Barbas, C. F. d., Kang, A. S., Lerner, R. A., und Benkovic, S. J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7978-82.
- Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C., Dantis, L., Sklarin, N. T., Seidman, A. D., Hudis, C. A., Moore, J., Rosen, P. P., Twaddell, T., Henderson, I. C., und Norton, L. (1996). Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti- p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 14, 737-44.
- Beck, E., und Zink, B. (1981). Nucleotide sequence and genome organisation of filamentous bacteriophages fl and fd. *Gene* 16, 35-58.
- Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S. H., und Roark, J. H. (1997). Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 15, 535-62.
- Birnboim, H.C., und Dolly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc Acid Res* 7, 1513-1515.
- Bottino, C., Biassoni, R., Millo, R., Moretta, L., und Moretta, A. (2000). The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I-independent NK cell triggering. *Hum Immunol* 61, 1-6.
- Boucher, Y., Baxter, L. T., und Jain, R. K. (1990). Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy. *Cancer Res* 50, 4478-84.
- Boyer, C., Auphan, N., Luton, F., Malburet, J. M., Barad, M., Bizozzero, J. P., Reggio, H., und Schmitt-Verhulst, A. M. (1991). T cell receptor/CD3 complex internalization following activation of a cytolytic T cell clone: evidence for a protein kinase C-independent staurosporine-sensitive step. *Eur J Immunol* 21, 1623-34.

- Broder, S., Muul, L., und Waldmann, T. A. (1978). Suppressor cells in neoplastic disease. *J Natl Cancer Inst* 61, 5-11.
- Brown, V. I., und Greene, M. I. (1991). Molecular and cellular mechanisms of receptor-mediated endocytosis. *DNA Cell Biol* 10, 399-409.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M. (1987). XL 1 Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-379.
- Burton, D. R. & Barbas C. F. (1993). Monoclonal Fab fragments from combinatorial libraries displayed on the surface of phage. *Immunometh.* 3: 1-9
- Burton, D. R. (1995). Phage display. *Immunotechnol.* 1: 87-94
- Cambier, J. C. (1995). Antigen und Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol* 155, 3281-5.
- Canevari, S., Mezzanzanica, D., Mazzoni, A., Negri, D. R., Ramakrishna, V., Bolhuis, R. L., Colnaghi, M. I., und Bolis, G. (1995). Bispecific antibody targeted T cell therapy of ovarian cancer: clinical results and future directions. *J Hematother* 4, 423-7.
- Carson, W. E., Fehniger, T. A., und Caligiuri, M. A. (1997). CD56bright natural killer cell subsets: characterization of distinct functional responses to interleukin-2 and the c-kit ligand. *Eur J Immunol* 27, 354-60.
- Chatellier, J., Hartley, O., Griffiths, A. D., Fersht, A. R., Winter, G., und Riechmann, L. (1999). Interdomain interactions within the gene 3 protein of filamentous phage. *FEBS Lett* 463, 371-4.
- Chomczynski, P., und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-9.
- Clayton, L. K., D'Adamio, L., Howard, F. D., Sieh, M., Hussey, R. E., Koyasu, S., und Reinherz, E. L. (1991). CD3 eta and CD3 zeta are alternatively spliced products of a common genetic locus and are transcriptionally and/or post-transcriptionally regulated during T-cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 5202-6.
- Clevers, H., Dunlap, S., und Terhorst, C. (1988). The transmembrane orientation of the epsilon chain of the TcR/CD3 complex. *Eur J Immunol* 18, 705-10.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. und Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 69, 2110-2115.
- Cornall, R. J., Goodnow, C. C., und Cyster, J. G. (1995). The regulation of self-reactive B cells. *Curr Opin Immunol* 7, 804-11.
- Daugherty, P. S., Chen, G., Olsen, M. J., Iverson, B. L., and Georgiou, G. (1998). Antibody affinity maturation using bacterial surface display. *Protein Eng* 11, 825-32.
- Davis, L. S., Patel, S. S., Atkinson, J. P., und Lipsky, P. E. (1988). Decay-accelerating factor functions as a signal transducing molecule for human T cells. *J Immunol* 141, 2246-52.
- De Gast, G. C., van de Winkel, J. G., und Bast, B. E. (1997). Clinical perspectives of bispecific antibodies in cancer. *Cancer Immunol Immunother* 45, 121-3.
- De Jonge, J., Brissinck, J., Heirman, C., Demanet, C., Leo, O., Moser, M., und Thielemans, K. (1995). Production and characterization of bispecific single-chain antibody fragments. *Mol Immunol* 32, 1405-12.
- De Jonge, J., Heirman, C., de Veerman, M., Van Meirvenne, S., Moser, M., Leo, O., und Thielemans, K. (1998). In vivo retargeting of T cell effector function by recombinant bispecific single chain Fv (anti-CD3 x anti-idiotypic) induces long-term survival in the murine BCL1 lymphoma model. *J Immunol* 161, 1454-61.

- Farace, F., Angevin, E., Vanderplancke, J., Escudier, B., und Triebel, F. (1994). The decreased expression of CD3 zeta chains in cancer patients is not reversed by IL-2 administration. *Int J Cancer* 59, 752-5.
- Finke, J. H., Zea, A. H., Stanley, J., Longo, D. L., Mizoguchi, H., Tubbs, R. R., Wiltrott, R. H., O'Shea, J. J., Kudoh, S., Klein, E., und et. al. (1993). Loss of T-cell receptor zeta chain and p56lck in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Research* 53, 5613-6.
- Fogler, W. E., Klinger, M. R., Abraham, K. G., Gottlinger, H. G., Riethmuller, G., und Daddona, P. E. (1988). Enhanced cytotoxicity against colon carcinoma by combinations of noncompeting monoclonal antibodies to the 17-1A antigen. *Cancer Res* 22, 6303-8.
- Foglesong, P. D., Winkler, M. A., Price, J. O., Marshall, G. D., Reagh, S. H., Bush, D. A., Hixson, K. S., und West, W. H. (1989). Preparation and analysis of bifunctional immunoconjugates containing monoclonal antibodies OKT3 and BABR1. *Cancer Immunol Immunother* 30, 177-84.
- Gajewski, T. F., Schell, S. R., Nau, G., und Fitch, F. W. (1989). Regulation of T-cell activation: differences among T-cell subsets. *Immunol Rev* 111, 79-110.
- Gemsa, D., Kalden, J.R., und Resch, K. (Herausgeber). *Immunologie*, 4. Auflage. Thieme-Verlag
- Geppert, T. D., und Lipsky, P. E. (1986). Accessory cell-T cell interactions involved in anti-CD3-induced T4 and T8 cell proliferation: analysis with monoclonal antibodies. *J Immunol* 137, 3065-73.
- Geppert, T. D., und Lipsky, P. E. (1988). Activation of T lymphocytes by immobilized monoclonal antibodies to CD3. Regulatory influences of monoclonal antibodies to additional T cell surface determinants. *J Clin Invest* 81, 1497-505.
- Gilliland, L. K., Norris, N. A., Marquardt, H., Tsu, T. T., Hayden, M. S., Neubauer, M. G., Yelton, D. E., Mittler, R. S., und Ledbetter, J. A. (1996). Rapid and reliable cloning of antibody variable regions and generation of recombinant single chain antibody fragments. *Tissue Antigens* 47, 1-20.
- Gottlinger, H. G., Funke, I., Johnson, J. P., Gokel, J. M., und Riethmuller, G. (1986). The epithelial cell surface antigen 17-1A, a target for antibody-mediated tumor therapy: its biochemical nature, tissue distribution and recognition by different monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 38, 47-53.
- Greenberg, A. H., Hudson, L., Shen, L., und Roitt, I. M. (1973). Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity due to a "null" lymphoid cell. *Nat New Biol* 242, 111-3.
- Greenman, J., Hogg, N., Nikoletti, S., Slade, C., Stevenson, G., und Glennie, M. (1992). Comparative efficiencies of bispecific F(ab'gamma)2 and chimeric mouse/human IgG antibodies in recruiting cellular effectors for cytotoxicity via Fc gamma receptors. *Cancer Immunol Immunother* 34, 361-9.
- Grillo-Lopez, A. J., White, C. A., Varns, C., Shen, D., Wei, A., McClure, A., und Dallaire, B. K. (1999). Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. *Semin Oncol* 26, 66-73.
- Hagens, G., Galley, Y., Glaser, I., Davis, W. C., Baldwin, C. L., Clevers, H., und Dobbelaere, D. A. (1996). Cloning, sequencing and expression of the bovine CD3 epsilon and TCR-zeta chains, two invariant components of the T-cell receptor complex. *Gene* 169, 165-71.
- Hakansson, A., Gustafsson, B., Krysanter, L., Hjelmqvist, B., Rettrup, B., und Hakansson, L. (1999). On down-regulation of the immune response to metastatic malignant melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 48, 253-62.
- Healy, C. G., Simons, J. W., Carducci, M. A., DeWeese, T. L., Bartkowski, M., Tong, K. P., und Bolton, W. E. (1998). Impaired expression and function of signal-transducing zeta chains in peripheral T cells and natural killer cells in patients with prostate cancer. *Cytometry* 32, 109-19.
- Hebbes, T. R., Turner, C. H., Thorne, A. W., und Crane-Robinson, C. (1989). A "minimal epitope" anti-protein antibody that recognises a single modified amino acid. *Mol Immunol* 26, 865-73.

- Hein, W. R., und Tunnacliffe, A. (1993). Invariant components of the sheep T-cell antigen receptor: cloning of the CD3 epsilon and Tcr zeta chains. *Immunogenetics* 37, 279-84.
- Holliger, P., und Riechmann, L. (1997). A conserved infection pathway for filamentous bacteriophages is suggested by the structure of the membrane penetration domain of the minor coat protein g3p from phage fd. *Structure* 5, 265-75.
- Holliger, P., und Winter, G. (1993). Engineering bispecific antibodies. *Curr Opin Biotechnol* 4, 446-9.
- Hoogenboom, H. R. (1997). Mix and match: building manifold binding sites. *Nat Biotechnol* 15, 125-6.
- Hoogenboom, H. R., de Bruine, A. P., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J. W., und Roovers, R. C. (1998). Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4, 1-20.
- Hussain, A., Lewis, D., Yu, M., und Melera, P. W. (1992). Construction of a dominant selectable marker using a novel dihydrofolate reductase. *Gene* 112, 179-88.
- Innis, M.A., Mayambo, K.B., Gelfand, D.G. und Broe, M.A.D. (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 9436-40.
- Irving, B. A., Chan, A. C., und Weiss, A. (1993). Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J Exp Med* 177, 1093-103.
- Irving, B. A., und Weiss, A. (1991). The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 64, 891-901.
- Irving, R. A., Kortt, A. A., und Hudson, P. J. (1996). Affinity maturation of recombinant antibodies using *E. coli* mutator cells. *Immunotechnology* 2, 127-43.
- Itoh, Y., Matsuura, A., Kinebuchi, M., Honda, R., Takayama, S., Ichimiya, S., Kon, S., und Kikuchi, K. (1993). Structural analysis of the CD3 zeta/eta locus of the rat. Expression of zeta but not eta transcripts by rat T cells. *J Immunol* 151, 4705-17.
- Jain, R. K. (1988). Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res* 48, 2641-58.
- Jensen, M., Tan, G., Forman, S., Wu, A. M., und Raubitschek, A. (1998). CD20 is a molecular target for scFvFc:zeta receptor redirected T cells: implications for cellular immunotherapy of CD20+ malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant* 4, 75-83.
- Jespers, L. S., Roberts, A., Mahler, S. M., Winter, G., und Hoogenboom, H. R. (1994). Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. *Biotechnology* 12, 899-903.
- Jin, Y. J., Clayton, L. K., Howard, F. D., Koyasu, S., Sieh, M., Steinbrich, R., Tarr, G. E., und Reinherz, E. L. (1990). Molecular cloning of the CD3 eta subunit identifies a CD3 zeta-related product in thymus-derived cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 3319-23.
- Kabat, E. A. (1979). Implications of the assortment of framework segments for the assembly of immunoglobulin VL und VH regions and the generation of diversity. pp. 33-44. In: Pernis B, Vogel HJ, ed. *Cells of immunoglobulin synthesis*. New York, Academic Press 601.
- Kaklamanis, L., Leek, R., Koukourakis, M., Gatter, K. C., und Harris, A. L. (1995). Loss of transporter in antigen processing 1 transport protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic versus primary breast cancer. *Cancer Res* 55, 5191-4.
- Karpovsky, B., Titus, J. A., Stephany, D. A., und Segal, D. M. (1984). Production of target-specific effector cells using hetero-cross-linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc gamma receptor antibodies. *J Exp Med* 160, 1686-701.

- Kaufman R. J. (1990). Strategies for obtaining high level expression in mammalian cells. *Technique* 2, 221-236
- Kaufman, R. J. (1990). Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells. *Methods Enzymol* 185, 537-66.
- Kinet, J. P. (1992). The gamma-zeta dimers of Fc receptors as connectors to signal transduction. *Curr Opin Immunol* 4, 43-8.
- Kipriyanov, S. M., Moldenhauer, G., Strauss, G., und Little, M. (1998). Bispecific CD3 x CD19 diabody for T cell-mediated lysis of malignant human B cells. *Int J Cancer* 77, 763-72.
- Köhler, G., Howe, S. C., und Milstein, C. (1976). Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. *Eur J Immunol* 6, 292-5.
- Köhler, G., und Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol* 6, 511-9.
- Kono, K., Ichihara, F., Iizuka, H., Sekikawa, T., und Matsumoto, Y. (1998). Expression of signal transducing T-cell receptor zeta molecules after adoptive immunotherapy in patients with gastric and colon cancer. *Int J Cancer* 78, 301-5.
- Kostelny, S. A., Cole, M. S., und Tso, J. Y. (1992). Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J Immunol* 148, 1547-53.
- Krebber, C., Spada, S., Desplancq, D., und Pluckthun, A. (1995). Co-selection of cognate antibody-antigen pairs by selectively-infective phages. *FEBS Lett* 377, 227-31.
- Kuby J. (1997) *Immunology*. W. H. Freeman und Company, 3. Auflage
- Kurucz, I., Titus, J. A., Jost, C. R., Jacobus, C. M., und Segal, D. M. (1995). Retargeting of CTL by an efficiently refolded bispecific single-chain Fv dimer produced in bacteria. *J Immunol* 154, 4576-82.
- Kushner, S.R. (1978). An improved method for transformation of *E. coli* with ColE1-derived plasmids. *Genetic Engineering*, Elsevier, Amsterdam, 17-25.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Low, N. M., Holliger, P. H., und Winter, G. (1996). Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J Mol Biol* 260, 359-68.
- Lai, P., Rabinowich, H., Crowley-Nowick, P. A., Bell, M. C., Mantovani, G., und Whiteside, T. L. (1996). Alterations in expression and function of signal-transducing proteins in tumor-associated T and natural killer cells in patients with ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2, 161-73.
- Lamers, C. H., Gratama, J. W., Warnaar, S. O., Stoter, G., und Bolhuis, R. L. (1995). Inhibition of bispecific monoclonal antibody (bsAb)-targeted cytotoxicity by human anti-mouse antibodies in ovarian carcinoma patients treated with bsAb-targeted activated T-lymphocytes. *Int J Cancer* 60, 450-7.
- Lanier, L. L., Yu, G., und Phillips, J. H. (1989). Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* 342, 803-5.
- Letourneur, F., und Klausner, R. D. (1991). T-cell and basophil activation through the cytoplasmic tail of T-cell-receptor zeta family proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 8905-9.
- Löffler, A., Kufer, P., Lutterbüse, R., Zettl, F., Daniel, P. T., Schwenkenbecher, J. M., Riethmüller, G., Dörken, B., und Bargou, R. C. (2000). A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 95, 2098-103.
- Lurquin, P. F. (1997). Gene transfer by electroporation. *Mol Biotechnol* 7, 5-35.

- Luton, F., Buferne, M., Schmitt-Verhulst, A. M., und Boyer, C. (1994). Developmental control of T-cell receptor internalization. *Thymus* 23, 15-25.
- Mack, M., Riethmüller, G., und Kufer, P. (1995). A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7021-5.
- MacLennan, I. C. (1990). Autoimmunity. Deletion of autoreactive B cells. *Autoimmunity* 5, 232-3.
- Menard, S., Canevari, S., und Colnaghi, M. I. (1989). Hybrid antibodies in cancer diagnosis and therapy. *Int J Biol Markers* 4, 131-4.
- Merrie, A. E., Yun, K., van Rij, A. M., und McCall, J. L. (1999). Detection and significance of minimal residual disease in colorectal cancer. *Histol Histopathol* 14, 561-9.
- Mezzanzanica, D., Canevari, S., und Colnaghi, M. I. (1991). Retargeting of human lymphocytes against human ovarian carcinoma cells by bispecific antibodies: from laboratory to clinic. *Int J Clin Lab Res* 21, 159-64.
- Milstein, C., und Cuello, A. C. (1983). Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature* 305, 537-40.
- Mizoguchi, H., O'Shea, J. J., Longo, D. L., Loeffler, C. M., McVicar, D. W., und Ochoa, A. C. (1992). Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science* 258, 1795-8.
- Moingeon, P., Lucich, J. L., McConkey, D. J., Letourneur, F., Malissen, B., Kochan, J., Chang, H. C., Rodewald, H. R., und Reinherz, E. L. (1992). CD3 zeta dependence of the CD2 pathway of activation in T lymphocytes and natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 1492-6.
- Moingeon, P., Stebbins, C. C., D'Adamio, L., Lucich, J., und Reinherz, E. L. (1990). Human natural killer cells and mature T lymphocytes express identical CD3 zeta subunits as defined by cDNA cloning and sequence analysis. *Eur J Immunol* 20, 1741-5.
- Monaco, J. J., Cho, S., und Attaya, M. (1990). Transport protein genes in the murine MHC: possible implications for antigen processing. *Science* 250, 1723-6.
- Moretta, A., und Moretta, L. (1997). HLA class I specific inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol* 9, 694-701.
- Mullis, K.B. und Falona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro for a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-350.
- Nakagomi, H., Petersson, M., Magnusson, I., Juhlin, C., Matsuda, M., Mellstedt, H., Taupin, J. L., Vivier, E., Anderson, P., und Kiessling, R. (1993). Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Research* 53, 5610-2.
- Orloff, D. G., Frank, S. J., Robey, F. A., Weissman, A. M., und Klausner, R. D. (1989). Biochemical characterization of the eta chain of the T-cell receptor. A unique subunit related to zeta. *J Biol Chem* 264, 14812-7.
- Orloff, D. G., Ra, S., Frank, J., Klausner, D., und Kinet, P. (1990). Family of disulphide-linked dimers containing the zeta and eta chains of the T-cell receptor and the gamma chain of Fc receptors. *Nature* 347, 189-91.
- Pack, P., und Pluckthun, A. (1992). Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric FV fragments with high avidity in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31, 1579-84.
- Pantel, K., Koprowski, H. und Riethmüller, G. (1993). Conference on cancer micrometastasis: Biology, methodology und clinical significance. *Int J Oncol* 3, 1019-22.
- Pelletier J. & Sonneberg N. (1988). Internal translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320-325

- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190, 1505-16.
- Powis, S. J., Deverson, E. V., Coadwell, W. J., Ciruela, A., Huskisson, N. S., Smith, H., Butcher, G. W., and Howard, J. C. (1992). Effect of polymorphism of an MHC-linked transporter on the peptides assembled in a class I molecule. *Nature* 357, 211-5.
- Rabinowich, H., Banks, M., Reichert, T. E., Logan, T. F., Kirkwood, J. M., and Whiteside, T. L. (1996). Expression and activity of signaling molecules in T lymphocytes obtained from patients with metastatic melanoma before and after interleukin 2 therapy. *Clin Cancer Res* 2, 1263-74.
- Ravetch, J. V., and Kinet, J. P. (1991). Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 9, 457-92.
- Renner, C., Hartmann, F., Jung, W., Deisting, C., Juwana, M., and Pfreundschuh, M. (2000). Initiation of humoral and cellular immune responses in patients with refractory Hodgkin's disease by treatment with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody. *Cancer Immunol Immunother* 49, 173-80.
- Renner, C., Jung, W., Sahin, U., van Lier, R., and Pfreundschuh, M. (1995). The role of lymphocyte subsets and adhesion molecules in T cell- dependent cytotoxicity mediated by CD3 and CD28 bispecific monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 25, 2027-33.
- Renner, C., Ohnesorge, S., Held, G., Bauer, S., Jung, W., Pfitzenmeier, J. P., and Pfreundschuh, M. (1996). T cells from patients with Hodgkin's disease have a defective T-cell receptor zeta chain expression that is reversible by T-cell stimulation with CD3 and CD28. *Blood* 88, 236-41.
- Renner, C., Trumper, L., and Pfreundschuh, M. (1997). Monoclonal antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: recent results and future prospects. *Leukemia* 11 Suppl 2, S55-9.
- Renner, C., and Pfreundschuh, M. (1995). Treatment of heterotransplanted Hodgkin's tumors in SCID mice by a combination of human NK or T cells and bispecific antibodies. *J Hematother* 4, 447-51.
- Reynolds, J. C., Del Vecchio, S., Sakahara, H., Lora, M. E., Carrasquillo, J. A., Neumann, R. D., and Larson, S. M. (1989). Anti-murine antibody response to mouse monoclonal antibodies: clinical findings and implications. *Int J Rad Appl Instrum B* 16, 121-5.
- Riethmüller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Hoffken, K., Gruber, R., Funke, I., Pichlmaier, H., Hirche, H., Buggisch, P., Witte, J., and Pichlmayr, R. (1998). Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol.* 1998 May;16(5):1788-94
- Riethmüller, G., and Johnson, J. P. (1992). Monoclonal antibodies in the detection and therapy of micrometastatic epithelial cancers. *Curr Opin Immunol* 4, 647-55.
- Ritz, J., Schmidt, R. E., Michon, J., Hercend, T., and Schlossman, S. F. (1988). Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol* 42, 181-211.
- Romeo, C., Amiot, M., and Seed, B. (1992). Sequence requirements for induction of cytolysis by the T cell antigen/Fc receptor zeta chain. *Cell* 68, 889-97.
- Romeo, C., and Seed, B. (1991). Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides. *Cell* 64, 1037-46.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74, 5463-5468.

- San Jose, E., Borroto, A., Niedergang, F., Alcover, A., und Alarcon, B. (2000). Triggering the TCR complex causes the downregulation of nonengaged receptors by a signal transduction-dependent mechanism. *Immunity* 12, 161-70.
- Schimke, R. T. (1984). Gene amplification in cultured animal cells. *Cell* 37, 705-13.
- Sevick, E. M., und Jain, R. K. (1989). Geometric resistance to blood flow in solid tumors perfused ex vivo: effects of tumor size and perfusion pressure. *Cancer Res* 49, 3506-12.
- Sivori, S., Pende, D., Bottino, C., Marcenaro, E., Pessino, A., Biassoni, R., Moretta, L., und Moretta, A. (1999). NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol* 29, 1656-66.
- Slifka, M. K., Pagarigan, R. R., und Whitton, J. L. (2000). NK Markers Are Expressed on a High Percentage of Virus-Specific CD8+ and CD4+ T Cells. *J Immunol* 164, 2009-15.
- Stancovski, I., Schindler, D. G., Waks, T., Yarden, Y., Sela, M., und Eshhar, Z. (1993). Targeting of T lymphocytes to Neu/HER2-expressing cells using chimeric single chain Fv receptors. *J Immunol* 151, 6577-82.
- Steplewski, Z., Lubeck, M. D., Scholz, D., Loibner, H., McDonald Smith, J., und Koprowski, H. (1991). Tumor cell lysis and tumor growth inhibition by the isotype variants of MAb BR55-2 directed against Y oligosaccharide. *In Vivo* 5, 79-83.
- Straus, D. B., und Weiss, A. (1992). Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 70, 585-93.
- Sussman, J. J., Bonifacino, J. S., Lippincott-Schwartz, J., Weissman, A. M., Saito, T., Klausner, R. D., und Ashwell, J. D. (1988). Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell* 52, 85-95.
- Tartour, E., Latour, S., Mathiot, C., Thiounn, N., Mosseri, V., Joyeux, I., D'Enghien, C. D., Lee, R., Debre, B., und Fridman, W. H. (1995). Variable expression of CD3-zeta chain in tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) derived from renal-cell carcinoma: relationship with TIL phenotype and function. *Int J Cancer* 63, 205-12.
- Telerman, A., Amson, R. B., Romasco, F., Wybran, J., Galand, P., und Mosselmans, R. (1987). Internalization of human T lymphocyte receptors. *Eur J Immunol* 17, 991-7.
- Tran, A. C., Zhang, D., Byrn, R., und Roberts, M. R. (1995). Chimeric zeta-receptors direct human natural killer (NK) effector function to permit killing of NK-resistant tumor cells and HIV-infected T lymphocytes. *J Immunol* 155, 1000-9.
- Trinchieri, G., und Valiante, N. (1993). Receptors for the Fc fragment of IgG on natural killer cells. *Nat Immun* 12, 218-34.
- Urlaub, G., und Chasin, L. A. (1980). Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 4216-20.
- Valitutti, S., Dessing, M., Aktories, K., Gallati, H., und Lanzavecchia, A. (1995). Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J Exp Med* 181, 577-84.
- Van Oers, N.S., Killeen, N., und Weiss, A. (1996). Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J Exp Med* 183, 1053-62.
- Vivier, E., Rochet, N., Kochan, J. P., Presky, D. H., Schlossman, S. F., und Anderson, P. (1991). Structural similarity between Fc receptors and T cell receptors. Expression of the gamma-subunit of Fc epsilon RI in human T cells, natural killer cells and thymocytes. *J Immunol* 147, 4263-70.

- Weaver, J. C. (1995). Electroporation theory. Concepts and mechanisms. *Methods Mol Biol* 47, 1-26.
- Webber, D. (1998). Lymphoma Mabs rivalry continues. *Nat Biotechnol* 16, 1000-1.
- Weiner, G. J. (1992). Bispecific IgG und IL-2 therapy of a syngeneic B-cell lymphoma in immunocompetent mice. *Int J Cancer Suppl* 7, 63-6.
- Weiner, L. M., Clark, J. I., Davey, M., Li, W. S., Garcia de Palazzo, I., Ring, D. B., und Alpaugh, R. K. (1995). Phase I trial of 2B1, a bispecific monoclonal antibody targeting c-erbB- 2 and Fc gamma RIII. *Cancer Res* 55, 4586-93.
- Weiss, A., Chan, A. C., Iwashima, M., Straus, D., und Irving, B. A. (1992). Regulation of protein tyrosine kinase activation by the T-cell antigen receptor zeta chain. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 57, 107-16.
- Weissman, A. M., Baniyash, M., Hou, D., Samelson, L. E., Burgess, W. H., und Klausner, R. D. (1988). Molecular cloning of the zeta chain of the T cell antigen receptor. *Science* 239, 1018-21.
- Weissman, A. M., Frank, S. J., Orloff, D. G., Mercep, M., Ashwell, J. D., und Klausner, R. D. (1989). Role of the zeta chain in the expression of the T cell antigen receptor: genetic reconstitution studies. *Embo J* 8, 3651-6.
- Weissman, A. M., Hou, D., Orloff, D. G., Modi, W. S., Seunanz, H., O'Brien, S. J., und Klausner, R. D. (1988). Molecular cloning and chromosomal localization of the human T-cell receptor zeta chain: distinction from the molecular CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 9709-13.
- Weissman, A. M., Samelson, L. E., und Klausner, R. D. (1986). A new subunit of the human T-cell antigen receptor complex. *Nature* 324, 480-2.
- Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., und Hoogenboom, H. R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 12, 433-55.
- Winter, G., und Harris, W. J. (1993). Humanized antibodies. *Trends Pharmacol Sci* 14, 139-43.
- Winter, G., und Milstein, C. (1991). Man-made antibodies. *Nature* 349, 293-9.
- Wood, C. R., Dorner, A. J., Morris, G. E., Alderman, E. M., Wilson, D., O'Hara, R. M., Jr., und Kaufman, R. J. (1990). High level synthesis of immunoglobulins in Chinese hamster ovary cells. *J Immunol* 145, 3011-6.
- Zhang, J., Salojin, K., Gao, J. X., Cameron, M., Geisler, C., und Delovitch, T. L. (1998). TCR alpha beta chains associate with the plasma membrane independently of CD3 and TCR zeta chains in murine primary T cells. *J Immunol* 161, 2930-7.

8 Danksagung

Herrn Professor Dr. Gert Riethmüller danke ich für die kontinuierliche Förderung und sein stets großes Interesse am Fortgang der experimentellen Arbeit. Seine anhaltende Diskussionsbereitschaft und Offenheit für unkonventionelle Wege schufen ein kreatives Umfeld in dem diese Arbeit entstehen konnte.

Frau Professor Dr. Regine Kahmann möchte ich herzlich für die Vertretung meiner Promotion an der Biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München, und die Erstellung des Erstgutachtens danken.

Herrn Prof. Dr. Gutensohn danke ich für sein Interesse und die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Meinem Betreuer Herrn Dr. Peter Kufer möchte ich meinen Dank aussprechen für die stetige und kompetente Betreuung meiner Arbeit, die moralische Stütze auch in schwierigen Phasen und die anhaltende Gesprächsbereitschaft. Für die Weitergabe seines fachlichen Wissens und seine Unterstützung bin ich ihm sehr dankbar.

Für die Unterstützung von Frau Dr. Elisabeth Kremmer, GSF, München, in deren Arbeitsgruppe die Hybridom-Experimente durchgeführt wurden, möchte ich mich hier ebenfalls bedanken. Der Connex GmbH, Martinsried, und insbesondere Dr. Christian Reiter danke ich für die Erlaubnis, den 2-B-5 Antikörper für die hier beschriebene Arbeit zu benutzen. Herrn Eugen Kopp danke ich für die z.T. aufwendige Aufreinigung der rekombinaten Proteine und zahlreiche Tips im Laboralltag.

Weiterhin möchte ich den Arbeitsgruppen-Mitgliedern sowie allen Angehörigen des Instituts für Immunologie für die zahlreichen Hilfestellungen meinen Dank aussprechen.

Meinen Freunden und Kollegen Tobias Raum und Florian Zettl bin ich für Rat und Tat, aber insbesondere für die menschliche Bereicherung im Labor dankbar.

Meinen Eltern, ohne deren moralische Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre, gebührt mein aufrichtiger Dank.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Freundin Uli Stiffel für ihr Verständnis, besonders in der letzten Phase meiner Promotion, danken. Ihre Hilfe war und ist ein großer Rückhalt für mich.

9 Lebenslauf

Name:	Ralf Lutterbüse
Geburtstag / -ort:	23.08.1969 in Lippstadt
Familienstand:	Ledig
<u>Schulbildung:</u>	
1976 – 1980	Grundschule Josefschule Lippstadt
1980 – 1989	Evangelisches Gymnasium Lippstadt
<u>Grundwehrdienst:</u>	Sanitätssoldat in Hamm und Lippstadt
Juni 1989 - Sep. 1990	Einsatz als Truppenarztschreiber
<u>Universitäre Ausbildung:</u>	
Okt. 1990 – Okt. 1994	Studium der Biologie an der Universität Bielefeld, Diplom - Vorprüfung im September 1992
Okt. 1994	Diplom-Hauptprüfung zur „speziellen Biologie“ im Bereich Physiologie mit der Note „Sehr gut“
Nov. 1994 – Sept. 1995	Diplomarbeit am Institut für Immunologie der Ludwig- Maximilians-Universität München mit dem Thema „Frühmetastasierung epithelialer Tumore: Vergleichende Analyse der Genexpression primärer und mikrometastatischer Tumorzellen mittels mRNA-Differential Display Technik“ Diplom-Gesamtnote: „Sehr gut“
Seit Jan. 1996	Promotion zum Dr. rer. nat. am Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München bei Prof. Riethmüller mit dem Thema „Die Zeta-Kette des T- Zellrezeptors: Zielstruktur für die Rekrutierung humaner Effektorzellen durch bispezifische Antikörper“
<u>Praktia:</u>	
Juli - Aug. 1993	Praktikum bei der Deutschen Saatveredelung, Zuchtstation Thüle mit Schwerpunkt im Zellkulturlabor zur Züchtung von Mikrosporen- und Antherenkulturen
Feb. – März 1994	Laborpraktikum am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld zur molekulargenetischen Typisierung bakterieller Rhizosphärenpopulationen

Publikationen

Kufer, P., Mack, M., Gruber, R., **Lutterbüse, R.**, Zettl, F., und Riethmüller, G. (1997). Construction and biological activity of a recombinant bispecific single-chain antibody designed for therapy of minimal residual colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 45, 193-7.

Löffler, A., Kufer, P., **Lutterbüse, R.**, Zettl, F., Daniel, P. T., Schwenkenbecher, J. M., Riethmüller, G., Dorken, B., und Bargou, R. C. (2000). A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 95, 2098-103.

Zippelius, A., **Lutterbüse, R.**, Riethmüller, G., und Pantel, K. (2000). Analytical variables of reverse transcription-polymerase chain reaction-based detection of disseminated prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 6, 2741-50.

Kufer, P*, Zippelius, A*, **Lutterbüse, R.**, Enzmann, T, Montag, A, Dugas, M, Köllermann, MW, Pantel, K, und Riethmüller, G (2000) Expression of MAGE genes in occult disseminated tumor cells: an RT-PCR study on bone marrow aspirates of patients with clinically localized prostate cancer. Submitted. * Geteilte Erstautorenschaft

Kufer, P, Zettl, F, Borschert, K, **Lutterbüse, R.**, Kischel, R, und Riethmüller, G. Minimal costimulatory requirements for T-cell priming and TH1 differentiation. Manuskript in Präparation.

Lutterbüse, R., Kremmer, E, Reiter, C, Riethmüller, G, und Kufer, P. The TCR- ζ chain as triggering molecule for the retargeting of cytotoxic lymphocytes by bispecific antibodies. Manuskript in Präparation.

Internationale Patente

Immunological Reagent Specifically Interacting With The Extracellular Domain Of The Human Zeta Chain (WO0003016)

CD19xCD3 Specific Polypeptides And Uses Thereof (WO9954440)

Method Of Identifying Binding Site Domains That Retain The Capacity Of Binding To An Epitope (WO9925818)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Ralf Lutterbüse, an Eides statt, daß ich die vorgelegte Doktorarbeit selbständig und nur mit den angegebenen Quellen angefertigt habe.
