

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
Technik und Umwelt

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 5729B

**Varianten des Glykoproteins  
CD44 als Zielmoleküle für  
immunintervenierende  
Strategien zur Behandlung  
von Krebs**

**A. Hekele**  
Institut für Genetik

Februar 1996

---



**Forschungszentrum Karlsruhe**

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 5729 B

**Varianten des Glykoproteins CD44  
als Zielmoleküle  
für immunintervenierende Strategien  
zur Behandlung von Krebs**

**Armin Hekele  
Institut für Genetik**

Dissertation genehmigt von der Fakultät für Bio- und  
Geowissenschaften der Universität Karlsruhe

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe  
1996

**Als Manuskript gedruckt  
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

**ISSN 0947-8620**

.....

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

CD44 bezeichnet eine heterogene Familie von Zelloberflächen-Glykoproteinen. Durch alternatives Spleißen von 12 der 20 Exons, aus denen sich das Gen zusammensetzt, wird eine enorme Variabilität erzielt. Die Expression von Varianten, welche von Exon v6 kodierte Sequenzen enthalten, ist ein prognostischer Faktor für viele humane Krebserkrankungen, einschließlich „Non-Hodgkin“-Lymphome, Brust- und kolorektaler Karzinome. Die Expression von CD44v6-enthaltenden Varianten bedingt das metastatische Potential eines Pankreaskarzinoms der Ratte. Der monoklonale Antikörper 1.1ASML erkennt ein Epitop, welches in der Sequenz WFENEWQGKNPPT des Ratten-CD44v6 enthalten ist. Der mAk1.1ASML interferiert mit der Disseminierung des Pankreaskarzinoms.

Die Antigenerkennungsdomäne dieses monoklonalen Antikörpers wurde als „single-chain“-Fv-Fragment (scFv) zunächst mit dem Exotoxin A (ETA) aus *Pseudomonas aeruginosa* fusioniert. Ein entsprechendes Konstrukt wurde in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert. Transformierte Bakterien exprimieren das scFv:ETA-Fusionsprotein in teilweise antigenreaktiver Konformation. Funktionelle Tests konnten wegen zu geringer Ausbeute an bindungsaktivem Immuntoxin nicht durchgeführt werden.

In einem zweiten Projekt wurde dieses scFv-Fragment mit der  $\zeta$ -Kette des T-Zell-Rezeptorkomplexes fusioniert. Ein entsprechendes Konstrukt wurde in einen retroviralen Expressionsvektor kloniert. Infizierte Klone einer etablierten, murinen zytotoxischen T-Lymphozytenlinie exprimieren das scFv: $\zeta$ -Fusionsprotein als antigenreaktiven Oberflächenrezeptor. Diese „abgerichteten“ CTLs (für „cytotoxic T-lymphocytes“) umgehen die MHC-restringierte Antigenerkennung durch den T-Zell-Rezeptor und lysieren *in vitro* mit hoher Spezifität CD44v6-positive Zielzellen. CD44v6-positive Tumor-Xenotransplantate in Nacktmäusen werden durch systemische Applikation der gentechnologisch manipulierten CTLs in ihrem Wachstum gehemmt. Die gleichzeitige systemische Applikation von Interleukin-2 steigert den therapeutischen Effekt der „abgerichteten“ CTLs.

Der adoptive Transfer zytotoxischer T-Zellen, die aufgrund der Expression von scFv: $\zeta$ -Chimären Tumorzellen erkennen und lysieren, könnte eine neuartige Strategie zur Behandlung von Krebs werden. Die Korrelation zwischen der Expression von CD44v6 und einer schlechten klinischen Prognose für Krebspatienten identifiziert diese Proteine als attraktive Zielantigene für derartige Konzepte.

# Variants of the glycoprotein CD44 as target molecules for immune intervention strategies for the treatment of cancer

## 1 SUMMARY

The term CD44 refers to a heterogenous family of cell surface glycoproteins encoded by a single gene containing 20 exons. The tremendous variability in CD44 protein structure results from alternative splicing of 12 of these 20 exons. Interestingly, the expression of splice variants containing exon v6-encoded sequences is of prognostic value for several human cancers, including non-Hodgkin lymphoma, mammary and colorectal carcinoma. Furthermore, the metastatic potential of a rat pancreatic carcinoma is dependent on the expression of v6-carrying CD44 variants (CD44v6). The monoclonal antibody 1.1ASML recognizes an epitope in the sequence WFENEWQGKNPPT encoded by rat CD44v6. This antibody interferes with the dissemination of the v6-positive pancreatic carcinoma.

In the present study, the antigen combining site of mAb1.1ASML was isolated as a single-chain Fv-fragment (scFv). In a first attempt to utilize this fragment in experimental tumor therapy, the scFv-fragment was fused to the *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (ETA). A corresponding construct was introduced into a bacterial expression vector. Bacteria transformed with this vector expressed the scFv:ETA-fusion protein. However, the yield of protein in an antigen reactive conformation was too low to test the immunotoxin for its anti-tumor activity.

In a second project, the scFv-fragment was fused to the T-cell receptor complex  $\zeta$ -chain. A corresponding construct was introduced into a retroviral expression vector. Infected clones of an established murine cytotoxic T-lymphocyte (CTL) line expressed the scFv: $\zeta$ -fusion protein as an antigen reactive receptor on their cell surface. These redirected CTLs could bypass the MHC-restricted antigen recognition by the T-cell receptor and exhibited cytotoxicity *in vitro* with high specificity towards CD44v6-positive target cells. The growth of CD44v6-positive tumor xeno-transplants in nude mice was retarded by systemic application of the manipulated CTLs. The therapeutic efficiency could be enhanced by systemic application of interleukin-2.

These data indicate that the adoptive transfer of cytotoxic T-cells recognizing tumor cells by scFv- $\zeta$ -chain chimeras could become a novel strategy towards the treatment of cancer. The enhanced expression of CD44v6 on tumor cells and the correlation of v6-expression with unfavourable prognosis for tumor patients identifies these proteins as attractive target antigens for such a therapeutic approach.

# INHALT

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

## 2 EINLEITUNG..... 1

2.1	Mechanismen der Zytolyse oder „Der Todeskuß“.....	1
2.1.1	Exozytose zytolytischer Vesikel .....	2
2.1.2	Fas-induzierte Apoptose .....	4
2.2	T-Zell-Aktivierung.....	5
2.2.1	Antigenpräsentation.....	5
2.2.2	T-Zell-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion .....	6
2.2.3	Der T-Zell-Rezeptorkomplex .....	8
2.2.4	Signalinitiation nach Stimulierung des TCR-Komplexes.....	9
2.2.5	Aktivierung der Zytolysemechanismen.....	10
2.2.5.1	Aktivierung der Vesikelexozytose.....	10
2.2.5.2	Induktion der FasL-Expression.....	11
2.3	Die minimale antigenerkennende Einheit .....	11
2.4	Das Zielantigen.....	13
2.4.1	Der Metastasierungsprozeß.....	13
2.4.2	CD44.....	14
2.4.3	Variante CD44-Isoformen als Metastasierungspromotoren.....	16
2.4.4	Tumorzellen gehen in den Untergrund .....	18
2.5	Zielsetzung der Arbeit.....	20

## 3 MATERIAL & METHODEN ..... 21

3.1	Material.....	21
3.2.	Versuchstiere .....	25
3.3	Zelllinien und Kulturbedingungen.....	25
3.4	Methoden.....	26
3.4.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen.....	26
3.4.2	„Glättung“ kohäsiver Restriktionsschnittstellen mit 5´-überstehenden Enden.....	26
3.4.3	Dephosphorylierung von DNA.....	27
3.4.4	Analyse von DNA in Agarosegelen.....	27
3.4.5	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	28
3.4.6	Ligation von DNA.....	28
3.4.7	Präparation kompetenter Bakterien.....	28
3.4.8	Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA.....	29
3.4.9	Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979).....	29
3.4.10	Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (modifiziert nach Kondo et al., 1991).....	30
3.4.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	30
3.4.12	Enzymatische Sequenzierung von DNA.....	31
3.4.13	Analyse von DNA in denaturierenden Polyacrylamidgelen .....	31
3.4.14	Isolierung von gesamtzellulärer RNA aus eukaryontischen Zellen.....	32
3.4.15	Reverse Transkription (Erststrang-cDNA-Synthese).....	32

3.4.16	Amplifikation von DNA (Polymerase-Kettenreaktion).....	32
3.4.17	Transkription <i>in vitro</i> .....	33
3.4.18	Translation <i>in vitro</i> .....	33
3.4.19	Fluorographie .....	33
3.4.20	Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen.....	34
3.4.21	Calciumphosphat-Transfektion eukaryontischer Zellen (für adhären wachsende Zellen).....	34
3.4.22	Ernten retroviraler Zellkulturüberstände und Infektion von eukaryontischen Zellen.....	34
3.4.23	Retroviralvektor vermittelter Gentransfer in zytotoxische T-Zellen.....	35
3.4.24	Bestimmung des retroviralen Titters in Zellkulturüberständen von Verpackungszelllinien .....	35
3.4.25	Präparation von rekombinantem murinem Interleukin-2 und Bestimmung der IL-2 Konzentration .....	36
3.4.26	Lyse eukaryontischer Zellen.....	36
3.4.27	Analyse von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen .....	37
3.4.28	Coomassie-Brilliant-Blau Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen.....	37
3.4.29	Immunpräzipitation .....	37
3.4.30	Produktion und Reinigung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen .....	38
3.4.31	Produktion von FLAG-Fusionsproteinen.....	39
3.4.32	Kopräzipitation von scFv- und GST-Fusionsproteinen mit Glutathion-Agarose.....	39
3.4.33	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen.....	39
3.4.34	Immunoblot-Analyse von Proteinen.....	40
3.4.35	Fluoreszenz-Färbung von Zellen für die Durchflußzytometrie.....	40
3.4.36	<i>In vitro</i> Zytotoxizitätstest.....	41
3.4.37	Adoptive Immunisierung von Nacktmäusen mit den gentechnologisch veränderten T-Zellen.....	42
3.4.38	Statistische Auswertung der Daten .....	42
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>43</b>
4.1	Klonierung der cDNAs der variablen Domänen der schweren und leichten Kette des mAk1.1ASML.....	43
4.2	Bakterielle Expression von scFv(1.1ASML) .....	46
4.3	Konstruktion des Expressionsplasmids pGEX2T:CD44v4-v7.....	48
4.4	Expression und Reinigung von GST und GST#CD44v4-v7 aus <i>E. coli</i> .....	49
4.5	scFv(1.1ASML) bindet spezifisch an bakteriell exprimiertes v6-Epitop.....	50
4.6	Das scFv(1.1ASML):ETA-Immuntoxin - ein gescheiterter Ansatz.....	50
4.6.1	Molekulare Klonierung des scFv(1.1ASML):ETA-Fusionsgens.....	51
4.6.2	Expression und Affinität des scFv(1.1ASML):ETA-Immuntoxins.....	53
4.7	Molekulare Klonierung der cDNA des chimären scFv(1.1ASML): $\zeta$ -Rezeptors .....	55
4.8	<i>In vitro</i> Transkription/Translation des chimären Rezeptors.....	58
4.9	Retroviraler Gentransfer des scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Fusionsgens.....	59
4.10	Expression des chimären scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Proteins in c196-CTLs...	60
4.11	Oberflächenexpression der scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Chimären in PA317- und c196-Zellen.....	61
4.12	Antigenspezifität der gentechnologisch veränderten T-Zellen.....	64
4.13	CD44v6-Epitopexpression in verschiedenen Zelllinien.....	65
4.14	<i>In vitro</i> Zytotoxizität der scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -exprimierenden CTLs.....	66
4.15	Adoptive Immunisierung von Nacktmäusen mit CAYZ.007-CTLs.....	70

---

<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>74</b>
5.1	Das gescheiterte Projekt .....	75
5.2	Die „Abrichtung“ zytotoxischer T-Lymphozyten.....	75
5.3	CAYZ.007-CTLs haben die „Lizenz zum Töten“ .....	77
5.4	Eine Steigerung der Effizienz ist dringend erforderlich.....	79
5.5	Systemische Toxizität der anti-CD44v6-CTLs.....	81
5.6	Perspektiven für die Zukunft.....	81
5.7	Fazit .....	83
<b>6</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>84</b>

# ABKÜRZUNGEN

A	Adenosin	FKS	fötales Kälberserum
A	Ampère	G	Guanosin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat	g	Einheit der Gravitation
$A_\lambda$	Absorption von Licht der Wellenlänge $\lambda$	g	Gramm
AMV	engl. <i>avian myoblastosis virus</i>	gag	gruppenspezifisches Antigen
APC	antigenpräsentierende Zelle (engl. <i>antigen presenting cell</i> )	gp	Glykoprotein
APS	Ammoniumperoxodisulfat	$^\circ\text{C}$	Grad Celsius
ATCC	engl. <i>American Type Culture Collection</i>	GST	Glutathion S-Transferase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat (analog CTP; GTP; UTP)	Gz	Granzym
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat	H	schwere (engl. <i>heavy</i> ) Kette von Ig
BLV	Rinderleukämievirus (engl. <i>bovine leukemia virus</i> )	h	Stunde
bp	Basenpaar	HEPES	N-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
Bq	Bequerel	HEV	engl. <i>high endothelial venule</i>
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )	i.p.	intraperitoneal
bzw.	beziehungsweise	i.v.	intravenös
c	Zenti- ( $10^{-2}$ )	ICE	engl. <i>interleukin-1<math>\beta</math> converting enzyme</i>
C	Cytidin	Ig	Immunglobulin
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>	IL	Interleukin (z.B. IL-2)
CD44s	CD44-Standardisoform	IP <sub>3</sub>	Inositol (1,4,5)-Triphosphat
CD44v	variante CD44-Isoform	IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
cDNA	zur mRNA komplementäre (engl. <i>complementary</i> ) DNA	ITAM	engl. <i>immunoreceptor tyrosine based activation motif</i>
CDR	engl. <i>complementarity-determining region</i>	k	Kilo- ( $10^3$ )
CIAP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (engl. <i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> )	kb	Kilobasen (paare)
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie (engl. <i>cervical intraepithelial neoplasia</i> )	KBE	koloniebildende Einheit
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt (engl. <i>cytotoxic T lymphocyte</i> )	kDa	Kilodalton
2D	zweidimensional	k	$\kappa$ Kette von Ig
d	Dezi- ( $10^{-1}$ )	L	leichte Kette von Ig
d	Tag (engl. <i>day</i> )	l	Liter
Da	Dalton	lat.	lateinisch
DAG	Diacylglycerol	LDH	Laktatdehydrogenase
dATP	2'-Deoxyadenosin-5'-triphosphat (analog: dCTP; dGTP aber TTP)	log	Logarithmus (zur Basis 10)
ddATP	2',3'-Dideoxyadenosintriphosphat (analog: ddCTP; ddGTP; ddTTP)	LTR	engl. <i>long terminal repeat</i>
ddNTP	2',3'-Dideoxynukleosid-5'-triphosphat	M	Mega- ( $10^6$ )
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	M	molar
DMF	N,N'-Dimethylformamid	m	Meter
DMSO	Dimethylsulfoxid	m	Milli- ( $10^{-3}$ )
DNA	Deoxyribonukleinsäure	$\mu$	Mikro- ( $10^{-6}$ )
DNase	Deoxyribonuklease	mAk	monoklonaler Antikörper
dNTP	2'-Deoxynukleosid-5'-triphosphat	MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
DTT	Dithiothreitol	min	Minute
E	Einheit	MMP	Metalloproteinase
EBV	Eppstein-Barr-Virus	MoMLV	Moloney Maus Leukämie Virus
ECM	extrazelluläre Matrix (engl. <i>extracellular matrix</i> )	MoMSV	Moloney Maus Sarkom Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )	mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i> )
EF-2	Elongationsfaktor-2	MW	Molekulargewicht (engl. <i>molecular weight</i> )
ELISA	engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>	N	normal
engl.	englisch	n	Nano- ( $10^{-9}$ )
env	Hüll- (engl. <i>envelope</i> )	NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
ER	endoplasmatisches Retikulum	NBT	4-Nitroblue-Tetrazoliumchlorid
ETA	Exotoxin A	NGF	Nervenwachstumsfaktor (engl. <i>nerve growth factor</i> )
et al.	und andere (lat. <i>et alii</i> )	NHL	engl. <i>non-Hodgkin lymphoma</i>
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorter</i>	NHS	N-Hydroxysuccinimid
FasL	Fas-Ligand	nm23	
Fc $\epsilon$ RI	Fc-Rezeptor für IgE	NP40	Nonidet P40
		NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
		OAc	Acetat (z.B. KOAc)
		ompA	engl. <i>outer membrane protein A</i>
		p	Piko- ( $10^{-12}$ )
		p	Wahrscheinlichkeit, daß die Nullhypothese gilt (z.B. im Student's t-Test)
		PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
		PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
		PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )

PCD	programmierter Zelltod (engl. <i>programmed cell death</i> )	Aminosäuren wurden im Einbuchstabencode angegeben	
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )	A	Alanin
PE	Phycoerythrin	C	Cystein
PEG	Polyethylenglykol	D	Aspartat
PFP	porenbildendes Protein (engl. <i>pore forming protein</i> )	E	Glutamat
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol (4,5)-Diphosphat	F	Phenylalanin
PKC	Proteinkinase C	G	Glycin
PLC	Phospholipase C	H	Histidin
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid	I	Isoleucin
PPO	2,5-Diphenyloxazol	K	Lysin
PTK	Protein-Tyrosinkinase	L	Leucin
PTP	Protein-Tyrosinphosphatase	M	Methionin
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid	N	Asparagin
		P	Prolin
RBL	basophile Leukämiezellen aus Ratten (engl. <i>rat basophilic leukemia</i> )	Q	Glutamin
RNA	Ribonukleinsäure	R	Arginin
RNase	Ribonuklease	S	Serin
		T	Threonin
s	Sekunde	V	Valin
s.c.	subkutan (engl. <i>subcutaneous</i> )	W	Tryptophan
scFv	engl. <i>single-chain Fv</i>	Y	Tyrosin
SCID	engl. <i>severe combined immune deficiency</i>		
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )		
SH	Src-Homologie		
SV40	engl. <i>semian virus 40</i>		
T	Tera- (10 <sup>12</sup> )		
T	Thymidin		
TAP	engl. <i>transporter associated with antigen presentation</i>		
TCR	T Zell Rezeptor (engl. <i>T cell receptor</i> )		
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin		
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten		
TIMP	engl. <i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>		
TNF	Tumornekrosefaktor		
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan		
tRNA	Transfer-RNA		
UV	ultraviolett		
v	variant		
V/D/J	engl. <i>variable/diversity/joining regions</i> von Ig oder TCR		
vgl.	vergleiche		
VLA	engl. <i>very late antigen</i>		
(v/v)	Volumen pro Volumen		
Vol.	Volumen		
W	Watt		
(w/v)	Masse pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i> )		
z.B.	zum Beispiel		

## **2. EINLEITUNG**

Krebs ist nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die Haupttodesursache unter der Bevölkerung der Industriestaaten der westlichen Welt. Allein in den USA starben im Jahr 1993 530000 Menschen an Krebs (Ames et al., 1995). Traditionellen Behandlungsmethoden wie Chirurgie, Radio- und Chemotherapie zum Trotz fordert diese Krankheit von Jahr zu Jahr mehr Menschenleben. Seit einigen Jahren werden unter großem finanziellen und personellen Aufwand neue Methoden erforscht, die das Ziel verfolgen, das eigene Immunsystem von Tumorpatienten als Therapeutikum einzusetzen. Möglich wurde dies nur durch Fortschritte auf Forschungsgebieten, die die molekularen Ereignisse während der Tumorgenese und Tumorprogression sowie die Funktionsweise des Immunsystems untersuchen.

Eine der Methoden der Tumor-Immuntherapie beruht auf der Verknüpfung der Erkennung tumorassoziierter Oberflächenstrukturen durch monoklonale Antikörper mit der Fähigkeit zytotoxischer T-Lymphozyten, Zellen zu lysieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Tumorzellen stammen von einem spontanen Pankreas-Adenokarzinom der Ratte ab. Sie exprimieren eine Isoform des Glykoproteins CD44, welche in diesen Zellen den metastatischen Phänotyp manifestiert. So gesehen wäre für die vorgestellten Experimente die Bezeichnung „Metastasen-Immuntherapie“ gerechtfertigt. Da jedoch die Konzeption meiner Forschungen nur die Behandlung von primären Tumoren zuließ und zudem die beschriebene Technologie auf jedes beliebige, tumorassoziert exprimierte Zelloberflächenantigen übertragbar ist, wird im folgenden die Bezeichnung „Tumor-Immuntherapie“ verwendet.

In der Einleitung werde ich die Säulen, auf denen diese Arbeit steht, darstellen. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die molekularen Ereignisse bei der Antigenerkennung durch T-Lymphozyten sowie die daraus resultierende Signalübertragung gelegt, deren ultimative Konsequenz, im Fall zytotoxischer T-Lymphozyten, die Lyse der Zielzelle ist. Das Konzept der minimalen antigenerkennenden Einheit wird beschrieben. Ich werde auf molekulare Aspekte der Tumorprogression und Evidenzen eingehen, die die Beteiligung des Glykoproteins CD44 an diesem Prozeß nahelegen. Schließlich werde ich Mechanismen zusammenfassen, die es Tumorzellen erlauben, sich vor den Effektoren des Immunsystems quasi zu verstecken. Dies wiederum macht eine spezifische „Abrichtung“ des Effektorarms als immunintervenierende Strategie zur Behandlung von Krebs sehr attraktiv.

### **2.1            *Mechanismen der Zytolyse oder „Der Todeskuß“***

Zytolytische Lymphozyten wie CTLs (für „cytotoxic T-lymphocyte“) oder NK-(für „natural killer“)-Zellen vermitteln Immunität gegenüber Viren und Fremdtransplantaten und spüren neoplastisch transformierte Zellen auf. Zur Eliminierung von Zielzellen bedienen sie sich wahrscheinlich nur zweier Mechanismen (als Übersichtsartikel siehe Berke et al., 1995;

Liu et al., 1995; Smyth and Trapani, 1995), der  $\text{Ca}^{++}$ -abhängigen Sekretion zytolytischer Vesikel sowie der  $\text{Ca}^{++}$ -unabhängigen Interaktion von FasL (für Fas-Ligand) mit Fas (APO-1/CD95). Beide Mechanismen führen letztendlich zum apoptotischen Tod der Zielzelle.

### **2.1.1 Exozytose zytolytischer Vesikel**

Zytolytische Lymphozyten enthalten eine große Anzahl zytoplasmatischer, lysosomenähnlicher Vesikel, die mit sekretorischen Proteinen gefüllt sind. In Gegenwart von  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen fusionieren diese Vesikel vektorieell mit der Plasmamembran der T-Zelle und schütten ihren Inhalt in den interzellulären Spalt aus, der sich bei der Interaktion zwischen T- und Zielzelle ausbildet. Die Freisetzung des Vesikelinhaltes erfolgt durch regulierte Sekretion. Die molekularen Ereignisse, die zur Fusion zytolytischer Vesikel mit der Plasmamembran von CTLs führen, sind noch nicht charakterisiert. Man nimmt jedoch an, daß alle eukaryontischen Fusionsmaschinerien strukturell verwandt sind (als Übersichtsartikel siehe Ferro-Novick und Jahn, 1994), so daß ein Mechanismus ähnlich der  $\text{Ca}^{++}$ -abhängigen Neurotransmitterfreisetzung aus präsynaptischen Vesikeln vorstellbar ist.

Ein wichtiger Bestandteil des Vesikelinhaltes ist das porenbildende Protein Perforin (auch als Zytolysin oder PFP für „pore forming protein“ bezeichnet). Perforin ist ein 66-70 kDa großes Glykoprotein mit Sequenzhomologie und immunologischer Kreuzreaktivität mit den Komponenten C6-C9 der Komplementkaskade (Liu et al., 1995 und darin zitierte Publikationen). Phosphorylcholinlipide in der Membran der Zielzelle scheinen als Perforinrezeptoren zu fungieren (Tschopp et al., 1989). Perforin-Monomere inserieren in die Zielzellmembran und aggregieren zu einem Komplex mit zentraler Öffnung. Solche funktionellen Perforinporen können die Zielzellmembran permeabilisieren und zu einem osmotischen Ungleichgewicht und somit zum Tod der Zielzelle führen. Beispielsweise entwickelt gereinigtes Perforin, in Gegenwart von  $\text{Ca}^{++}$ , lytische Aktivität gegenüber Zielzellen (Podack et al., 1985; Young et al., 1986a, b). Ebenso können an sich nicht-zytolytische Zellen mit einem regulierten sekretorischen System (RBL, basophile Leukämiezellen aus Ratten; RBL steht für „rat basophilic leukemia“) Zielzellen lysieren, nachdem sie mit Perforin-cDNA transfiziert worden sind (Shiver und Henkart, 1991). Die Schädigung der Zellmembran kann also ausreichen, um Zellen zu zerstören. Manche Zellen sind jedoch in der Lage, Membranschädigungen zu reparieren (Bashford et al., 1988). Auch solche Zellen können aber lysiert werden. Die letztendlich tödlichen Ereignisse sind apoptotische Veränderungen (Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung) im Kern der Zielzellen, die normalerweise mit dem CTL-induzierten Zelltod einhergehen. Perforin allein verursacht die Fragmentierung der Zielzell-DNA nicht, was z.B. mit Perforin-transfizierten RBL-Zellen gezeigt wurde (Nakajima und Henkart, 1994; Nakajima et al., 1995). Dieses Phänomen wird von anderen Komponenten des Vesikelinhaltes ausgelöst. Dazu gehören Proteine wie TIA-1 und Leukalexin. TIA-1, ein polyadenylatbindendes Protein, induziert DNA-Fragmentierung in permeabilisierten Zielzellen (Tian et al., 1991); Leukalexin, ein zur  $\text{TNF}\alpha$ /Lymphotoxin-Klasse gehörendes Zytotoxin führt in bestimmten Zellen zu programmiertem Zelltod (PCD für „programmed cell death“) beziehungsweise Apoptose (Liu et al., 1987). Die am besten untersuchten apoptoseinduzierenden Komponenten des Vesikelinhaltes sind die Granzyme (Gz), eine Reihe lymphozytenspezifisch exprimierter Serin-Proteinasen (als Übersichtsartikel siehe Smyth und Trapani, 1995). GzA und GzB,

die am besten charakterisierten dieser Enzyme, induzieren PCD nur in Kooperation mit Perforin und scheinen sich dabei gegenseitig zu ergänzen. So entwickeln z.B. GzA- oder GzB-transfizierte RBL-Zellen keine lytische Aktivität gegenüber Zielzellen. Erst die Koexpression eines Granzym und Perforin macht die Transfektanten zytotoxisch (Shiver et al., 1992; Nakajima und Henkart, 1994; Nakajima et al., 1995). Die effizienteste Zielzellyse beobachtet man mit RBL-Zellen, die Perforin und beide Granzyme (GzA und GzB) exprimieren (Nakajima et al., 1995). Im Einklang mit diesen Daten haben CTLs aus GzB-defizienten Mäusen reduzierte lytische Aktivität und induzieren die DNA-Fragmentierung in Zielzellen langsamer als Wildtyp-CTLs (Heusel et al., 1994). Daß Gz's tatsächlich die Proteolyse intrazellulärer Substrate katalysieren, wurde durch ihre Hemmung durch den Proteinaseinhibitor Aprotinin innerhalb von Zielzellen gezeigt. Die Beladung des Zytoplasmas von Zielzellen mit Aprotinin, nicht jedoch mit BSA, erhöht deren Resistenz gegenüber Lyse und DNA-Fragmentierung durch CTLs und Perforin/GzB-kotransfizierte RBL-Zellen (Nakajima und Henkart, 1994).

Bleibt die Frage, wie Proteasen die Fragmentierung des Zielzellgenoms verursachen können. GzB beeinflusst den Zellzyklus durch Induktion der Tyrosinphosphorylierung und dadurch vorzeitige Aktivierung der mitoseregulierenden p34<sup>cdc2</sup>-Kinase (Shi et al., 1994). Die Überexpression dieser Kinase zu einem unpassenden Zeitpunkt während des Zellzyklus führt tatsächlich zu einer „mitotischen Katastrophe“, ein Phänomen, das morphologisch dem apoptotischen Zelltod gleicht (Heald et al., 1993). Im Einklang mit diesem Ergebnis verhindert die exogene Expression von Wee-1, einer nukleären Kinase, die die Aktivität von p34<sup>cdc2</sup> negativ reguliert, den Perforin/GzB-induzierten PCD in Zielzellen (Chen et al., 1995). GzB könnte auch die Freisetzung von DNase I bewirken, welche damit Zugang zum Kern erhält und dort die DNA-Fragmentierung verursacht (Peitsch et al., 1993; Smyth und Trapani, 1995). DNase I existiert in vielen Zellen in einem inaktiven Zustand als Komplex mit Aktin. Eine weitere Möglichkeit ist, daß Granzyme ein bereits in der Zielzelle vorliegendes Todesprogramm aktivieren, welches auch durch endogene Proteasen ausgelöst werden kann. GzB spaltet wie ced-3 aus dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Mutationen in ced-3 blockieren den PCD in allen somatischen Zellen, die während der normalen Entwicklung eliminiert werden) seine Substrate an einem Aspartatrest (Poe et al., 1991). Die Überexpression von ced-3 beziehungsweise seiner humanen und murinen Homologen ICE (für „Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme“), NEDD2/ICH1-L und CPP32 induziert PCD (als Übersichtsartikel siehe Kumar, 1995). Sind Granzyme funktionelle Homologe dieser PCD-induzierenden Proteasen oder werden letztere von Granzymen aktiviert? GzA ist beispielsweise als ein „Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme“ beschrieben worden (Irmiler et al., 1995), GzB aktiviert durch proteolytische Prozessierung die PCD-Effektorprotease CPP32 (Darmon et al., 1995; vgl auch 2.1.2).

Wie bereits ausführlich beschrieben, führt die Freisetzung des Vesikelinhaltes in die lokale Umgebung zwischen CTL und Zielzelle zur Lyse der letzteren. Interessanterweise scheinen CTLs einen Mechanismus entwickelt zu haben, der sie vor ihrem eigenen lytischen System schützt (Blakeley et al., 1987). Dabei spielt wahrscheinlich ein mit Perforin interagierendes Protein, das spezifisch auf CTLs exprimiert wird, eine Rolle (Müller und Tschopp, 1994).

### 2.1.2 Fas-induzierte Apoptose

Der Phänotyp Perforin-defizienter Mäuse demonstriert eine zentrale, wenn auch nicht exklusive Rolle dieses porenbildenden Proteins bei der CTL-induzierten Zielzellyse. Aktivierte CTLs aus diesen Mäusen entwickeln *in vitro* und *in vivo* gegenüber bestimmten Tumor- und virusinfizierten Zellen keine zytotoxische Aktivität (Kägi et al., 1994a; Kojima et al., 1994; Lowin et al., 1994a; Walsh et al., 1994). Andere Zielzellen hämatopoetischen Ursprungs werden jedoch lysiert, vorausgesetzt diese exprimieren Fas (Kägi et al., 1994b; Kojima et al., 1994; Lowin et al., 1994b; Walsh et al., 1994). Zellen aus Fas-negativen Mäusen (lpr/lpr-Mäuse haben durch eine Mutation im Fas-Genlocus kein funktionelles Fas-Antigen) sind resistent gegenüber der Lyse durch Perforin-freie CTLs (Adachi et al., 1993; als Übersichtsartikel siehe Nagata und Suda, 1995; Nagata und Golstein, 1995). Fas ist ein Transmembranprotein aus der TNF/NGF-Rezeptor-Familie (TNF steht für Tumornekrosefaktor; NGF für „nerve growth factor“), welches PCD-induzierende Signale übermitteln kann (Itoh et al., 1991; als Übersichtsartikel siehe Nagata und Golstein, 1995).

Der Ligand von Fas (FasL) ist ein Transmembranprotein aus der TNF-Familie, das auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird (Suda et al., 1993, 1995; Takahashi et al., 1994; als Übersichtsartikel siehe Nagata und Golstein, 1995). Die Quervernetzung von Fas auf der Zielzelloberfläche durch FasL auf der CTL-Oberfläche führt zum apoptotischen Tod der Zielzelle. Ebenso induzieren COS-Zellen, die rekombinanten FasL exprimieren, Apoptose in Fas-positiven Zellen (Suda et al., 1993). Auch die artifizielle Quervernetzung von Fas durch Antikörper führt zum PCD der betreffenden Zelle (Dhein et al., 1992). Analog zu TNF existiert eine lösliche Form von FasL, die wie TNF Trimere bildet und in Fas-exprimierenden Zellen PCD induziert (Tanaka et al., 1995). Wird die Interaktion zwischen Fas und FasL verhindert (durch eine Punktmutation in der C-terminalen extrazellulären Domäne des FasL in *gld/gld*-Mäusen), dann können aktivierte CTLs Fas-exprimierende Zielzellen in  $Ca^{++}$ -freiem Medium (vgl. 2.1.1) nicht lysieren (Takahashi et al., 1994a).

Die durch den Fas-Rezeptor adressierte Signalkaskade ist nur äußerst lückenhaft charakterisiert. Fas selbst hat keine enzymatische Aktivität, besitzt aber wie der 55 kDa TNF-Rezeptor eine sogenannte „Todesdomäne“ (Itoh und Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993). Die Aktivierung des TNF-Rezeptors durch Ligandenbindung initiiert ebenfalls Signale, die zum PCD führen können. Mutationen in dieser „Todesdomäne“ verhindern die PCD-Induktion sowohl durch den TNF-Rezeptor als auch durch Fas. Die durch Quervernetzung von Fas ausgelösten biochemischen Ereignisse sind denen nach TNF-Rezeptor-Aktivierung sehr ähnlich. So wird zum Beispiel in beiden Fällen eine Sphingomyelinase aktiviert, die das Membranlipid Sphingomyelin hydrolysiert (Cifone et al., 1994; Gulbins et al., 1995; als Übersichtsartikel siehe Gill et al., 1994; Kolesnick und Golde, 1994). Ein Produkt dieser Reaktion ist Ceramid. Da im Kulturmedium enthaltenes Ceramid, welches die Plasmamembran passieren kann, Apoptose induziert, wirkt Ceramid wahrscheinlich als intrazelluläres Signal für den programmierten Zelltod (als Übersichtsartikel siehe Hannun und Obeid, 1995).

Die Fas-iniziierte Signalkaskade mündet wahrscheinlich in ein generelles, in Zellen bereits vorliegendes Todesprogramm ein. Ein wichtiger Schritt in diesem Programm scheint die Inaktivierung der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) zu sein. Die proteolytische Spaltung von (PARP) beobachtet man praktisch in jeder Form des PCD (Tewari et al., 1995 und darin zitierte Publikationen). PARP ist in die DNA-Reparatur involviert (Wang et

al., 1995). Die proteolytische Spaltung von PARP verhindert ihre Rekrutierung zu DNA-Läsionen und die Koordination von Reparaturmechanismen. Außerdem wird die  $Ca^{++}/Mg^{++}$ -abhängige Endonuklease, die mit der DNA-Fragmentierung in Verbindung gebracht wird, negativ durch Poly-ADP-Ribosylierung reguliert (Tanaka et al., 1984). Verlust der PARP-Funktion könnte diese Nuklease in sterbenden Zellen aktivieren. CPP32 (CPP32 $\beta$ /Yama/Apopain), ein Kandidat für die PCD-Effektorprotease in Säugerzellen, spaltet PARP, und die Überexpression von CPP32 induziert Apoptose (Fernandez-Alnemri et al., 1994; Lazebnik et al., 1994; Nicholson et al., 1995; Tewari et al., 1995). Sowohl die Proteolyse von PARP als auch die Induktion des PCD durch CPP32 werden von crmA, einem von Kuhpockenviren kodierten Proteaseinhibitor, blockiert (Tewari et al., 1995). CPP32 wird als inaktives Proenzym synthetisiert und bedarf zu seiner Aktivierung einer proteolytischen Prozessierung (Tewari et al., 1995). Die Quervernetzung von Fas induziert die Proteolyse von PARP, und Fas-induzierter apoptotischer Zelltod wird durch crmA blockiert (Tewari und Dixit, 1995; Tewari et al., 1995). Die Fas-abhängigen Signale könnten demnach die proteolytische Aktivierung der PCD-Effektorprotease CPP32 induzieren.

CTLs besitzen also zwei Mechanismen, mit denen sie Zielzellen eliminieren. Sowohl die Perforin-vermittelte Einschleusung von Proteasen in Zielzellen, als auch die Quervernetzung des Fas-Rezeptors auf der Zielzelloberfläche durch FasL auf der CTL-Oberfläche, induzieren den programmierten Zelltod der Zielzellen. Das eigentliche Signal, das die beiden Mechanismen in Gang setzt, ist aber die spezifische Erkennung eines „fremd“-Antigens auf einer Zielzelle. Wie wird diese Erkennungsspezifität erreicht?

## **2.2 T-Zell-Aktivierung**

### **2.2.1 Antigenpräsentation**

T-Zellen richten sich gegen „fremdes“ Material, das sich innerhalb von Zellen befindet. Um ihre Mission zu erfüllen, müssen T-Zellen praktisch in jede Zelle des Organismus „hineinschauen“ können. Der MHC (für „major histocompatibility complex“) ist eine genetische Region, deren Produkte diesem Zweck dienen. MHC-Moleküle sind Oberflächenrezeptoren, die die intrazelluläre Invasion durch ein Pathogen nach außen anzeigen können. Es gibt zwei Arten von MHC-Molekülen: Klasse-I und Klasse-II. T-Zellen erkennen ihr korrespondierendes Antigen als kurzes, prozessiertes Peptid, das an ein MHC-Molekül auf einer antigenpräsentierenden Zelle (APC für „antigen presenting cell“) oder einer Zielzelle gebunden ist. „Reife“ MHC-Moleküle bestehen aus je drei Komponenten: zwei Polypeptidketten (einer schweren Kette und dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin im Fall von Klasse-I-MHC; einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette im Fall von Klasse-II-MHC) in Assoziation mit einem Peptidfragment. Trotz dieses Aufbaus aus unterschiedlichen Proteinen haben beide MHCs eine sehr ähnliche Tertiärstruktur, was durch Röntgenstrukturanalyse gezeigt werden konnte (MHC-Klasse-I: Bjorkman et al., 1987; Madden et al., 1992; MHC-Klasse-II: Brown et al., 1993; Überblick in Madden, 1995). MHC-Klasse-II-Proteine werden vorwiegend auf dendritischen Zellen (APCs), B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert, MHC-Klasse-I-Proteine dagegen auf allen (kernhaltigen) Zellen.

Intrazelluläres, antigenes Material befindet sich in zwei Kompartimenten: Im Falle einer Virusinfektion z.B. sind intrazellulär synthetisierte virale Proteine im Zytoplasma lokalisiert. Werden „Fremdantigene“ von Zellen aufgenommen (einer der wichtigsten Mechanismen hierfür ist die Aufnahme von Antigenen durch antikörpervermittelte Endozytose in B-Lymphozyten), so befinden sie sich in den Endosomen. Erstere werden von MHC-Klasse-I-Molekülen, letztere von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert. Wie werden nun die antigenen Proteine aus den beiden Kompartimenten mit den spezifisch zu ihrer Präsentation entwickelten MHC-Molekülen zusammengeführt?

Im Fall der Präsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle werden intrazellulär synthetisierte Proteine von zytoplasmatischen Proteasen prozessiert. Fragmente, die die von Klasse-I-Molekülen bevorzugte Länge von acht bis zehn Aminosäuren besitzen (Falk et al., 1991), werden aus dem Zytoplasma ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert. Dies geschieht durch einen vorwiegend in der ER-Membran lokalisierten Transporterproteinkomplex (TAP; steht für „transporter associated with antigen presentation“; als Übersichtsartikel siehe Römisch, 1994). Die Untereinheiten des Komplexes werden in der Klasse-II-Region des MHC kodiert. Im Lumen des ER führt die Bindung des antigenen Peptidfragmentes an die schwere MHC-Klasse-I-Kette zur stabilen Assoziation mit  $\beta_2$ -Mikroglobulin und zur Dissoziation von Calnexin (als Übersichtsartikel siehe Bergeron et al., 1994; Williams und Watts, 1995). Die Assoziation schwerer MHC-Klasse-I-Ketten mit dem Protein Calnexin verhindert in ihrer unbeladenen Form den Transport in den Golgi-Apparat und somit die unproduktive Oberflächenexpression „leerer“ MHC-Klasse-I-Moleküle. Peptidbeladene Klasse-I-Moleküle werden dann als ternärer Komplex zum Golgi-Apparat und weiter an die Plasmamembran transportiert, wo sie ihr antigenes Peptid zytotoxischen T-Zellen präsentieren.

Im Fall der Präsentation aufgenommener Antigene durch MHC-Klasse-II-Moleküle erfolgt die Zusammenführung von MHC-Proteinen und Antigenen in den Endosomen, wo sich die aufgenommenen antigenen Peptide bereits befinden. Da MHC-Klasse-II-Moleküle mit Segmenten intakter Proteine assoziieren, muß verhindert werden, daß sie bereits im ER mit Segmenten intakter, zelleigener Proteine interagieren. Dies geschieht durch Assoziation neusynthetisierter MHC-Klasse-II- $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten im ER mit der invarianten Kette (Germain, 1994; als Übersichtsartikel siehe Sant und Miller, 1994; Williams und Watts, 1995). Der Komplex aus Klasse-II-MHC und invarianter Kette gelangt über den Golgi-Apparat (und möglicherweise die Zellmembran und endozytotische Vesikel) in späte Endosomen. Der niedrige pH-Wert sowie spezifische Proteasen in den späten Endosomen führen zur Dissoziation der invarianten Kette. Die nun freie Bindungsregion des MHC-Klasse-II-Dimers interagiert mit teilweise ungefalteten (aufgenommenen) Proteinen. Die nicht von der Bindungstasche des MHC-Klasse-II-Moleküls geschützten Teile der gebundenen Peptide werden proteolytisch abgespalten, und die peptidbeladenen MHC-Klasse-II-Moleküle gelangen schließlich aus den späten Endosomen auf die Oberfläche antigenpräsentierender Zellen.

## **2.2.2 T-Zell-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion**

T-Zellen erkennen MHC-präsentierte antigene Peptide mit Hilfe eines spezialisierten heterooligomeren Rezeptor-Komplexes, dem T-Zell-Rezeptorkomplex (TCR-Komplex;

TCR steht für „T-cell receptor“). Der TCR-Komplex besitzt duale Funktion: er bindet ein mit einem MHC-Molekül assoziiertes Antigen und leitet dieses extrazelluläre Bindungsereignis an die intrazelluläre Signaltransduktionsmaschinerie weiter. Diese Signaltransduktion induziert eine Kaskade von biochemischen Reaktionen, die verschiedenste Konsequenzen wie z.B. Änderung der Genexpression, Proliferation und Differenzierung haben (als Übersichtsartikel siehe Chan et al., 1994a; Weiss und Littman, 1994; Exton, 1994; DeFranco, 1995; Howe und Weiss, 1995; Pastor et al., 1995). Zusätzlich zum TCR-Komplex sind weitere Moleküle zur zellulären Aktivierung erforderlich: (i) die Korezeptoren CD4 oder CD8, (ii) Adhäsionsmoleküle, die die Avidität der Interaktion mit der antigenpräsentierenden - oder Zielzelle erhöhen und (iii) Kostimulatoren, die zusätzliche Signaltransduktionsmechanismen initiieren.

(i) Die sogenannten Korezeptoren CD4 und CD8 werden auf unterschiedlichen T-Lymphozytensubpopulationen exprimiert und unterscheiden zwischen der MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Präsentation des Antigens. CD4 und CD8 sind direkt an der T-Zell-Aktivierung beteiligt. CD8 bindet an die schwere Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls (Salter et al., 1990), CD4 an die  $\beta$ -Kette des MHC-Klasse-II-Moleküls (König et al., 1992). MHC-Klasse-I-präsentierte antigene Peptide auf Zielzellen stimulieren somit CD8-positive zytotoxische T-Zellen. MHC-Klasse-II-präsentierte antigene Peptide auf APCs aktivieren dagegen CD4-positive T-Zellen. CD4-positive T-Zellen haben meist Helferfunktion. Sie unterstützen andere Zellen des Immunsystems (zum Beispiel B-Zellen oder CD8-positive CTLs) in der Form, daß sie Wachstumsfaktoren (Zytokine) sezernieren. Zum Teil sind CD4-positive T-Zellen selbst zytotoxisch (Stalder et al., 1994). Die von CD4-positiven CTLs vermittelte Zytotoxizität erfolgt dabei vorwiegend durch Interaktion von FasL mit dem Fas-Rezeptor (vgl. 2.1.1).

(ii) Antigene Peptide müssen mit einem enormen Überschuß an „selbst“-Peptiden um die Bindung an unbeladene MHC-Moleküle in APCs oder Zielzellen kompetieren. Daher ist die Konzentration eines bestimmten Antigens auf APCs oder Zielzellen sehr gering und eine extrem hohe Sensitivität von T-Zellen gegenüber diesen niedrigen Antigenkonzentrationen erforderlich. Die Anzahl der zur T-Zell-Aktivierung erforderlichen Peptid-MHC-TCR-Interaktionen ist dementsprechend gering. Angaben dazu reichen von 2-5 Bindungen bis zu 30-100 (als Übersichtsartikel siehe Karjalainen, 1994). Jedoch lassen sowohl die geringe Antigenkonzentration als auch die erstaunlich niedrige Affinität des TCR zu seinem Liganden von  $10^{-4}$ - $10^{-5}$ M (Matsui et al., 1991; Weber et al., 1992) die TCR-Ligand-Interaktion als treibende Kraft der Interaktion zwischen T- und Zielbeziehungsweise antigenpräsentierender Zelle unwahrscheinlich erscheinen. Tatsächlich nimmt man an, daß die initiale Interaktion antigenunabhängig von Adhäsionsmolekülen vermittelt wird, welche, verglichen mit dem TCR, teilweise wesentlich höhere Affinitäten zu ihren Liganden haben (als Übersichtsartikel siehe Springer, 1990; Williams und Beyers, 1992; Davis und Chien, 1993).

(iii) In naiven T-Zellen führt die alleinige TCR-Interaktion mit einem MHC-Peptid-Komplex, in Abwesenheit einer Kostimulation, zu klonaler Anergie. Anergie bezeichnet einen Zustand, der T-Zellen gegenüber einer weiteren Stimulation unempfindlich macht und letztendlich zu deren Tod führt (Gimmi et al., 1993). Die T-Zell-Aktivierung bedarf einer Kostimulation. Der wichtigste kostimulatorische Rezeptor für T-Zellen ist CD28, der mit Proteinen der B7-Familie auf APCs interagiert (als Übersichtsartikel siehe Allison, 1994; Rudd et al., 1994). Man nimmt an, daß sich die durch den TCR-Komplex und CD28

induzierten Signalwege gegenseitig ergänzen, und daß fehlende Kostimulation zu einem unvollständigen Signal-Netzwerk führt (Su et al., 1994).

### 2.2.3 *Der T-Zell-Rezeptorkomplex*

Der T-Zell-Rezeptorkomplex besteht aus mindestens acht Transmembranproteinen. Das polymorphe, antigenbindende, disulfidgepaarte  $\alpha\beta$ -TCR- (oder  $\gamma\delta$ -TCR-) Heterodimer ist durch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit sechs invarianten Ketten assoziiert: CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , zwei Kopien von CD3 $\epsilon$  und einem disulfidgepaarten Homodimer der  $\zeta$ -Kette. In bestimmten murinen T-Zell-Klonen liegt ein geringer Teil der  $\zeta$ -Ketten als Heterodimer mit der  $\eta$ -Kette, einem alternativen Spleißprodukt der  $\zeta$ -Kette oder der nahe verwandten  $\gamma$ -Kette des hochaffinen Fc-Rezeptors für Immunglobulin E (Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ ) vor (Jin et al., 1990; Orloff et al., 1990). Man nimmt an, daß jedes  $\alpha\beta$ -Heterodimer als Komplex mit je einem nicht-kovalenten CD3 $\epsilon\delta$ - und einem CD3 $\epsilon\gamma$ -Dimer sowie einem  $\zeta$ -Homodimer vorliegt. Die genaue Stöchiometrie der einzelnen Ketten im TCR-Komplex ist jedoch noch unbekannt. Für die effiziente Oberflächenexpression des TCR-Komplexes ist die Assoziation aller Untereinheiten notwendig.

Die Spezifität für die Bindung an das von einem MHC-Molekül präsentierte antigene Peptidfragment liegt im  $\alpha\beta$ -Heterodimer (Davis und Bjorkman, 1988). Genrearrangements der V/J-Segmente im  $\alpha$ -Ketten-Lokus und der V/D/J-Segmente im  $\beta$ -Ketten-Lokus sind die Grundlage für das immense Erkennungsrepertoire von T-Zell-Rezeptoren. Das TCR-Repertoire wird jedoch nicht wie im Fall des Immunglobulin-Repertoires durch somatische Hypermutation erweitert (Hedrick und Eidelman, 1993). Ein Grund dafür könnte sein, daß T-Zellen im Thymus u.a. auf die Erkennung von Selbst-MHC-Molekülen (die einen Teil des Liganden darstellen) selektioniert werden. Somatische Hypermutation könnte zum Verlust dieser Fähigkeit führen. Im Fall der Immunglobulingene führt die somatische Hypermutation außerdem zur Generierung hochaffiner Antikörper. Dies ist im Fall des TCR nicht erforderlich (vgl. 2.2.2).

Wie kommt es nun infolge der Interaktion zwischen dem TCR und dem MHC-präsentierten Antigen zur Signalübermittlung? Die zytoplasmatischen Domänen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette sind sehr kurz (fünf Aminosäuren) und nicht geeignet, das extrazelluläre Bindungsereignis direkt an die intrazelluläre Signaltransduktionsmaschinerie weiterzuleiten. Die eigentlichen signaltransduzierenden Untereinheiten des TCR-Komplexes sind die akzessorischen Proteine CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  und  $\zeta$ . Die untereinander homologen CD3-Ketten  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  besitzen zytoplasmatische Domänen zwischen 40 und 80 Aminosäuren Länge. Die  $\zeta$ -Kette hat eine 113 Aminosäuren lange zytoplasmatische Domäne (Weissman et al., 1988). Daß diese invarianten, nicht an der Antigenbindung beteiligten Proteine tatsächlich signaltransduzierende Funktion haben, konnte durch Untersuchungen an Zelllinien mit mutierten Proteinen (Wegener et al., 1992), sowie mit Hilfe chimärer Rezeptoren (Irving und Weiss, 1991; Romeo und Seed, 1991; Letourneur und Klausner, 1991, 1992; Romeo et al., 1992; Irving et al., 1993; Brocker et al., 1993; Brocker und Karjalainen 1995; Vignaux et al., 1995) gezeigt werden. In diesen letzteren Studien wurden die zytoplasmatischen Domänen von  $\zeta$ ,  $\eta$ , CD3 $\epsilon$  (und Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ ) mit den extrazellulären Domänen anderer Proteine fusioniert. Zur Insertion der chimären Rezeptoren in die Plasmamembran dienten die Transmembrandomänen der  $\zeta$ -Kette oder der Fusionspartner.

Die chimären Rezeptoren wurden unabhängig vom TCR an der Zelloberfläche exprimiert. Ihre Quervernetzung mittels Antikörpern gegen die extrazellulären Domänen resultierte in Signaltransduktionsereignissen, wie sie auch nach Stimulation der intakten oligomeren Rezeptoren beobachtet werden.

Wie initiieren nun die akzessorischen Untereinheiten des TCR-Komplexes die Signaltransduktion? Das erste Signaltransduktionsereignis, das auf die TCR-Stimulation folgt, ist die verstärkte Phosphorylierung von Tyrosinresten in verschiedenen zellulären Proteinen. In keinem der akzessorischen Proteine des TCR-Komplexes wurden intrinsische enzymatische Aktivitäten identifiziert. Ihre zytoplasmatischen Domänen besitzen jedoch eine funktionell wichtige Homologieregion, die man auch in anderen Rezeptorkomplexen des Immunsystems, wie dem B-Zell-Rezeptor oder dem FcεRI, findet. Diese, von Michael Reth (1989) zuerst identifizierte Region mit der Konsensussequenz (D/E)XXYXXL/IX<sub>6-8</sub>YXXLI (im Einbuchstaben-Aminosäurecode, wobei X jede beliebige Aminosäure sein kann) wird als ITAM (für „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“) bezeichnet (als Übersichtsartikel siehe Bolen, 1995). Je eine Kopie dieses Aktivierungsmotivs findet man in den zytoplasmatischen Domänen von CD3γ, CD3δ, CD3ε, Igα, Igβ, FcεRIγ und FcεRIβ. Die zytoplasmatische Domäne der ζ-Kette besitzt drei Kopien des Aktivierungsmotivs (Howe und Weiss, 1995). Interessanterweise findet man dieses Motiv auch in gp30 (für Glykoprotein mit 30 kDa Molekulargewicht) des Rinder-Leukämievirus und dem „late membrane protein 2“ des Epstein-Barr Virus. Beide Viren spielen bei der Transformation von B-Zellen eine Rolle. Der letztendliche Beweis, daß die ITAMs eine prominente Rolle bei der Signaltransduktion spielen, wurde durch Mutationsanalysen in den oben beschriebenen, chimären Rezeptoren erbracht. Mutiert man zum Beispiel einen der beiden konservierten Tyrosinreste zu Phenylalanin, geht die Signalfunktion verloren (Letourneur und Klausner, 1992; Romeo et al., 1992; Irving et al., 1993).

#### **2.2.4 Signalinitiation nach Stimulierung des TCR-Komplexes**

Wenige Sekunden nach Stimulation des TCR-Komplexes wird eine Reihe von Protein-Tyrosinkinase (PTKs) aktiviert, die eine Vielzahl zellulärer Substrate phosphorylieren. Prominente Substrate sind die ITAMs (vgl. 2.2.3) in den zytoplasmatischen Domänen der akzessorischen Proteine des TCR-Komplexes. Die biochemischen Mechanismen, in welche PTKs aus der Src-Familie, wie beispielsweise p56<sup>lck</sup>, p59<sup>fyn</sup> oder p50<sup>csk</sup>, sowie Protein-Tyrosinphosphatasen (PTPs), wie zum Beispiel die Rezeptor-PTP CD45, involviert sind und die letztendlich zur Tyrosin-Phosphorylierung der ITAMs führen, werden in einer Reihe exzellenter Übersichtsartikel beschrieben (Weiss, 1993; Ledbetter et al., 1993; Rudd et al., 1994; Sefton und Taddie, 1994; Exton, 1994; Cambier und Jensen, 1994; Weiss und Littman, 1994; Weissman, 1994; Chan et al., 1994a; DeFranco, 1995; Pastor et al., 1995; Howe und Weiss, 1995; Okomura und Thomas, 1995). Tyrosinphosphorylierte ITAMs rekrutieren die Tandem-SH2-PTK ZAP-70 (SH2 steht für Src-Homologie; ZAP-70 für ζ-assoziertes Protein mit 70 kDa Molekulargewicht) zum TCR-Komplex. ZAP-70 zeichnet sich durch den Besitz zweier SH2-Domänen aus, die beide an der Interaktion mit den tyrosinphosphorylierten ITAMs von ζ, η, CD3γ und CD3ε beteiligt sind (Chan et al., 1992; Wange et al., 1993; Gauen et al., 1994; Iwashima et al., 1994). SH2-Domänen sind etwa 100 Aminosäuren lange Sequenzmotive,

die mit Phosphotyrosin-enthaltenden Proteinen interagieren (als Übersichtsartikel siehe Pawson, 1992; Pawson und Gish, 1992). Zum TCR-Komplex rekrutierte ZAP-70-PTK wird durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert. Dies geschieht vermutlich wieder durch Kinasen aus der Src-Familie (Chan et al., 1992; Kolanus et al., 1993; Iwashima et al., 1994). ZAP-70 spielt eine zentrale Rolle bei der Signalinitiation nach TCR-Komplex-Stimulation. Dies wird am Phänotyp von SCID-Patienten (SCID steht für „severe combined immune deficiency“) deutlich, die Mutationen im ZAP-70-Lokus haben. Periphere T-Lymphozyten aus diesen Patienten exprimieren keine funktionelle ZAP-70-PTK und sind nicht über ihren TCR-Komplex stimulierbar (Arpaia et al., 1994; Chan et al., 1994b; Elder et al., 1994; Gelfand et al., 1995). Sie reagieren jedoch normal auf pharmakologische Agentien, die die initialen Signalereignisse umgehen (wie beispielsweise Phorbol ester in Kombination mit Calciumionophoren).

## **2.2.5            *Aktivierung der Zytolysemechanismen***

Zytotoxische T-Zellen sind in der Lage, in ihren Zielzellen nach Antigenerkennung PCD zu induzieren. Dazu bedienen sie sich, wie bereits ausführlich beschrieben, zweier Mechanismen: der Exozytose zytolytischer Vesikel (vgl. 2.1.1) und der Quervernetzung des Fas-Rezeptors auf der Zielzelloberfläche durch FasL (vgl. 2.1.2). Welche biochemischen Vorgänge sind nun zur Aktivierung dieser beiden Mechanismen erforderlich?

### **2.2.5.1        *Aktivierung der Vesikelexozytose***

Die Fusion der exozytotischen Vesikel mit der Plasmamembran aktivierter CTLs ist ein  $Ca^{++}$ -abhängiger Prozeß. Die intrazelluläre  $Ca^{++}$ -Konzentration wird im Zuge des Inositol-Phospholipid-Metabolismus erhöht. Wenige Sekunden nach TCR-Stimulierung wird eine Inositol-Phospholipid-spezifische Phospholipase C ( $PLC\gamma_1$ ) tyrosinphosphoryliert und damit in den katalytisch aktiven Zustand überführt (als Übersichtsartikel siehe Lee und Rhee, 1995). Der Signalweg, der zur Phosphorylierung von  $PLC\gamma_1$  führt, ist unbekannt. Die Tatsache, daß Mutationen im ZAP-70-Lokus einerseits zu Immundefizienz führen, daß T-Zellen dieser SCID-Patienten andererseits aber mit Phorbol estern und  $Ca^{++}$ -Ionophoren stimulierbar sind, legt allerdings eine Involvierung der ZAP-70-PTK in den Inositol-Phospholipid-Metabolismus nahe (Arpaia et al., 1994; Chan et al., 1994b, Elder et al., 1994).  $PLC\gamma_1$  katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat ( $PIP_2$ ). Dadurch werden zwei wichtige sekundäre Botenstoffe, Inositol-(1,4,5)-Triphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) freigesetzt (als Übersichtsartikel siehe Clapham, 1995).  $IP_3$  ist für die rasche Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{++}$ -Konzentration verantwortlich. In der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisierte  $IP_3$ -Rezeptoren mobilisieren  $Ca^{++}$  aus intrazellulären Vorräten (Harnick et al., 1995; Jayaraman et al., 1995). Im Zuge der  $Ca^{++}$ -Mobilisierung aus dem ER wird ein  $Ca^{++}$ -Influxfaktor freigesetzt, der wahrscheinlich den zusätzlichen Einfluß von  $Ca^{++}$  von außen in die Zelle bewirkt (Randriamampita und Tsien, 1993). In Gegenwart von  $Ca^{++}$  fusionieren die exozytotischen Vesikel mit der Zellmembran und entleeren ihren Inhalt (Perforin, Granzyme etc.; vgl. 2.1.1) in den interzellulären Spalt, der sich bei der Interaktion zwischen CTL und Zielzelle ausbildet.

### 2.2.5.2 *Induktion der FasL-Expression*

Die artifizielle T-Zell-Aktivierung mit T-Zell-Stimulatoren wie zum Beispiel anti-CD3-Antikörper, Staphylococcus Enterotoxin B Superantigen, Concanavalin A, Phorbol ester in Kombination mit Ionomycin oder allogene Lymphozyten (und vermutlich auch die Antigenbindung) induzieren die Expression des FasL in T-Zell-Hybridomen, T-Zell-Klonen oder peripheren T-Zellen (Suda et al., 1993, 1995; Anel et al., 1994; Brunner et al., 1995; Dhein et al., 1995; Ju et al., 1995; Vignaux et al., 1995). Interessanterweise ist auch für die Induktion der FasL-Expression die Aktivierung der  $\zeta$ -Kette allein (über einen chimären  $\zeta$ -Kette-Rezeptor) wieder ausreichend. So wird die FasL-Expression in T-Zell-Hybridomen, die einen chimären Rezeptor bestehend aus extrazellulärer - und Transmembrandomäne von CD25 ( $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors) und der zyttoplasmatischen Domäne der  $\zeta$ -Kette exprimieren, durch Antikörperquervernetzung des chimären Rezeptors mit einem anti-CD25-Antikörper induziert (Vignaux et al., 1995). Die FasL-vermittelte Zytolyse kann durch PTK-Inhibitoren wie Genistein, Immunsuppressiva wie Cyclosporin A, Transkriptioninhibitoren wie Actinomycin D oder Proteinsyntheseinhibitoren wie Cycloheximid gehemmt werden (Anel et al., 1994; Dhein et al., 1995). Obwohl der genaue Mechanismus noch nicht erforscht ist, scheinen zur Aktivierung der FasL-vermittelten Zielzellyse demnach PTKs, Genexpression und Proteinsynthese erforderlich zu sein. Die Signalwege, die zur erhöhten FasL-Expression nach T-Zell-Stimulation führen, sind nicht charakterisiert. Es gibt jedoch Evidenzen für die Involvierung von Tandem-SH2-PTKs (Vignaux et al., 1995), PLC $\gamma$ 1, Ca $^{++}$ , DAG und PKC (Anel et al., 1994; Suda et al., 1995) sowie der Ca $^{++}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinphosphatase Calcineurin (Anel et al., 1994). Diese Komponenten sind auch an der transkriptionellen Aktivierung von IL-2 oder Mitgliedern der TNF-Proteinfamilie nach Stimulation des TCR-Komplexes beteiligt (als Übersichtsartikel siehe Rao, 1994; Weiss und Littman, 1994), so daß die Expression des FasL wahrscheinlich ähnlichen Kontrollmechanismen unterliegt wie die von IL-2 und Proteinen der TNF-Familie. Genauen Aufschluß über die transkriptionelle Regulation des FasL-Lokus wird erst eine detaillierte Charakterisierung des FasL-Promotors erbringen, der bisher nur unvollständig kloniert ist (Takahashi et al., 1994b).

Der Exkurs über die traditionellen Konzepte der CTL-Aktivierung sollte verdeutlichen, daß das Programm „Zielzellyse“ unabhängig vom TCR-Komplex über die  $\zeta$ -Kette ausgelöst werden kann (Romeo et al., 1992; Vignaux et al., 1995).

### 2.3 *Die minimale antigenerkennende Einheit*

Im ersten Teil der Einleitung wurde die MHC-abhängige Erkennung und Eliminierung von „fremd“-Antigenen durch den zellulären Arm des Immunsystems dargestellt. In vielen Fällen präsentieren Tumorzellen aber keine „fremd“-Antigene sondern lediglich tumorassoziierte Oberflächenantigene, die vom Immunsystem nicht als „fremd“ erkannt werden. Gegen diese tumorassoziierten Antigene können monoklonale Antikörper generiert werden. In der vorliegenden Arbeit sollten zytotoxische T-Lymphozyten genetisch derart modifiziert werden, daß sie mit diesen tumorassoziierten Oberflächenantigenen, unter Umgehung der MHC-abhängigen Antigenerkennung, reagieren können. Dazu sollte die

minimale antigenerkennende Einheit eines Antikörpers (gegen ein tumorassoziiertes Antigen) direkt auf ihrer Oberfläche exprimiert werden.

Ein Antikörpermolekül ist ein Tetramer, das aus vier Polypeptidketten, zwei leichten Ketten von etwa 25 kDa Molekulargewicht und zwei schweren Ketten von etwa 50 kDa Molekulargewicht, zusammengesetzt ist. Die variablen Regionen der beiden Ketten (VH und VL; VH steht für variable Domäne der schweren Immunglobulinkette, H steht für „heavy“; VL steht für variable Domäne der leichten Immunglobulinkette) bestehen aus drei hypervariablen Bereichen, den CDRs (für „complementarity-determining regions“), die von vier weniger variablen Bereichen, den sogenannten „framework“-Regionen, „eingerahmt“ sind. Die CDRs bilden schleifenartige Strukturen aus, die den Kontakt zum Epitop herstellen. Es ist bekannt, daß man antigenbindende Fragmente von Antikörpern aus einem denaturierten Status unter Wiederherstellung der spezifischen Bindungsaktivität renaturieren kann. Das kleinste solcher Fragmente, das eine intakte Bindungsstelle enthält, wird Fv-Fragment genannt. Es besteht aus einem nichtkovalenten, etwa 26 kDa großen Heterodimer der variablen Domänen von leichter und schwerer Kette. Das erste Fv-Fragment wurde durch Pepsin-Spaltung des Fab-Fragments eines murinen anti-2,4-Dinitrophenol-IgA erzeugt (Inbar et al., 1972). Es konnte gezeigt werden, daß das Fv-Fragment ähnliche Affinität zu 2,4-Dinitrophenol besitzt wie das Fab-Fragment, von dem es abgeleitet ist. Inbar und Mitarbeiter schlugen schon 1972 die chemische Synthese von Antikörperbindungsstellen vor. Da sich jedoch viele andere IgA und IgG Antikörper nicht einfach durch Proteolyse auf das Fv-Fragment reduzieren ließen, wurden hochaffine Fv-Fragmente erst durch den Einsatz rekombinanter DNA-Technologien zugänglich (Bird et al., 1988; Huston et al., 1988). Im sogenannten scFv-(für „single-chain Fv“)-Fragment fusioniert ein Verbindungspeptid den N-Terminus von VL an den C-Terminus von VH oder vice versa. Die Aminosäuresequenz dieses Verbindungspeptides wird so gewählt, daß es weder selbst eine geordnete Sekundärstruktur annimmt, noch mit der Domänenfaltung des Fv-Fragments interferiert. Das computersimulierte Modell eines scFv-Fragments zeigte, daß das Protein eine ähnliche Tertiärstruktur ausbildet wie die Antigenbindungsregion des parentalen Antikörpers (Huston et al., 1988). Viele scFv-Fragmente behalten Spezifität und Affinität des mAk, von dem sie abgeleitet sind und können mittels gentechnologischer Methoden mit verschiedenen Effektorfunktionen ausgestattet werden (Chaudhary et al., 1990; Wels et al., 1992a, b, 1995; Gruber et al., 1994).

Für die Klonierung der cDNAs variabler Immunglobulinregionen sind strukturelle Eigenschaften dieser Regionen wichtig. Der Vergleich der Nukleotidsequenzen von Antikörpergenen zeigte, daß sowohl die J-Segmente als auch Sequenzbereiche, die für die reifen N-Termini der beiden variablen Domänen kodieren, weitgehend konserviert sind (Kabat et al., 1991). Das Design der Primer für die Klonierung der V-cDNAs durch PCR-Amplifikation basiert auf diesen stark konservierten Sequenzen. Die beiden „BACK“-Primer sind dabei komplementär zu den konservierten N-terminalen Bereichen der Erststrang-cDNA, die beiden „FOR“-Primer komplementär zur mRNA in den J-Segmenten. Die Amplifikationsprimer sind geringfügig degeneriert (Orlandi et al., 1989).

## **2.4 Das Zielantigen**

### **2.4.1 Der Metastasierungsprozeß**

Die Fähigkeit neoplastischer Zellen, den primären Tumorverband zu verlassen und an anderen Stellen des Körpers sekundäre Wucherungen (Metastasen) zu bilden, ist einer der am wenigsten verstandenen Aspekte von Krebs. Warum verstehen wir den Metastasierungsprozeß so wenig? Er ist ein sehr komplexes Phänomen, das sich aus einer koordinierten Abfolge vieler Wirt-Tumor-Interaktionen zusammensetzt (als Übersichtsartikel siehe Poste und Fidler, 1980; Fidler und Hart, 1982; Fidler, 1990; Liotta et al., 1991; Hart und Saini, 1992; Hynes und Lander, 1992), die als metastatische Kaskade bezeichnet wurden. Tumorzellen verlassen den Primärtumor, dringen in das lokale Wirtsgewebe ein und erlangen Zugang zum lymphatischen und Blutgefäßsystem. Hier müssen sie starken Scherkräften widerstehen und immunologischen Abwehrmechanismen entgehen. Tumorzellen, die hier überleben, bleiben entweder aufgrund von Aggregatbildung oder durch Rezeptor/Ligand-Interaktionen in Lymphknoten oder im Kapillarbett entfernter Organe hängen. Hier verlassen sie das Gefäßsystem und dringen in das Zielgewebe ein, um Sekundärtumore zu bilden. Die bloße Anwesenheit lebender Tumorzellen im Gefäßsystem ist jedoch nicht gleichbedeutend mit ihrer Kompetenz, in entfernte Organe einzudringen. Genausowenig bedeutet die Anwesenheit lebender Tumorzellen in einem bestimmten Organ, daß sie hier auch proliferieren können. Dies postulierte der englische Chirurg Stephen Paget schon im Jahr 1889 in seiner „seed and soil“-Hypothese, welche besagt, daß bestimmte Tumorzellen („seed“) eine spezifische Affinität zum Milieu bestimmter Organe („soil“) besitzen. Dieser Ansicht ist man heute, nach mehr als 100 Jahren, immer noch. Spezifische Bindung an Endothelzellen und die Fähigkeit, auf lokale Wachstumsfaktoren zu reagieren, beeinflussen die Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen (Fidler, 1990). Die Expansion einer metastatischen Kolonie im Zielgewebe erfordert zusätzlich die Ausbildung eines neuen kapillaren Netzwerks (Folkman und Klagsbrun, 1987; Folkman, 1989). Jede vom Primärtumor abgesiedelte Tumorzelle, die auch nur eine Aufgabe während des Metastasierungsprozesses nicht meistern kann, wird eliminiert. Die Notwendigkeit genetischer Veränderungen, die über jene hinausgehen, die zur Bildung eines Primärtumors führen, liegt auf der Hand.

Man beobachtet drei Arten von Veränderungen, wenn Zellen tumorigen werden - Immortalisierung, Transformation und Metastasierung. Durch Defekte in Mechanismen der Wachstumskontrolle werden Zellen zunächst immortalisiert. In diesem Stadium sind normalerweise keine weiteren Veränderungen im Phänotyp der Zellen zu beobachten. Transformierte Zellen unterliegen nicht mehr den normalen Wachstumsbeschränkungen. Sie benötigen normalerweise keine solide Oberfläche, an die sie sich anheften können. Transformierte Zellen sind zu ihrer Proliferation in geringerem Maße auf Serumfaktoren angewiesen. Das Wachstum transformierter Zellen wird nicht durch Kontakte zu benachbarten Zellen limitiert. Schließlich können transformierte Zellen Tumore induzieren, wenn man sie in geeignete Versuchstiere injiziert. Mutationen, die zur Aktivierung von Proto-Onkogenen oder der Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen führen, bewirken die Immortalisierung und/oder Transformation von Zellen (Bishop, 1991). Proto-Onkogene und Tumor-Suppressorgene spielen bei der Kontrolle des Zellwachstums eine herausragende Rolle. Von den genetischen Veränderungen, die erforderlich sind, um einer transformierten

Zelle Metastasierungskompetenz zu verleihen, wurden trotz der enormen Komplexität des Prozesses und der diffizilen Testmethoden in jüngster Zeit einige identifiziert. Der Funktionsverlust von E-Cadherin,  $\beta$ 1-Integrinen, nm23, TIMP-1 und TIMP-2 sowie der Funktionsgewinn von MMP-9, VLA-2, mts1/p9Ka, Tiam-1 und Varianten von CD44 korrelieren zumindest in einigen Tumorsystemen kausal mit der Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen (als Übersichtsartikel siehe Ponta et al., 1994).

#### 2.4.2 CD44

CD44 (CD steht für „cluster of differentiation“) repräsentiert eine heterogene Gruppe von Zelloberflächen- und sezernierten Glykoproteinen. Tumorbiologen begannen sich für CD44 zu interessieren, als man einen kausalen Zusammenhang zwischen der Expression bestimmter varianter CD44-Isoformen und der Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen herstellen konnte (Günthert et al., 1991). Ursprünglich wurde CD44 als sogenannter „lymphocyte homing“-Rezeptor beschrieben (Jalkanen et al., 1986), der zirkulierenden Lymphozyten den Übertritt aus dem Blutgefäßsystem in sekundäre lymphoide Gewebe erlaubt. CD44 vermittelt dabei, neben verschiedenen anderen Molekülen, wie beispielsweise L-Selektin, diversen Integrinen oder CD31, die Adhäsion von Lymphozyten an spezialisierte Endothelzellen in den HEV (für „high endothelial venules“). Daneben ist CD44 an Prozessen wie dem „homing“ von Vorläuferzellen und der Lymphopoese (Miyake et al., 1990; Kincade et al., 1993; Jürgen Moll, persönliche Mitteilung), der Präsentation von chemotaktischen Faktoren oder Wachstumsfaktoren (Tanaka et al., 1993; Bennett et al., 1995), der Bindung an extrazelluläre Matrix (Aruffo et al., 1990; Jalkanen und Jalkanen, 1992; Sherman et al., 1994), der Zelladhäsion und Migration (St. John et al., 1990; Thomas et al., 1992; Lazaar et al., 1994), der Aktivierung von Lymphozyten (Arch et al., 1992; Galandrini et al., 1993, 1994a, 1994b; Steven Pals, persönliche Mitteilung), sowie an entwicklungsbiologischen Vorgängen (Sretavan et al., 1994; Sherman et al., 1995) beteiligt.

Die Familie der CD44-Proteine wird von einem Gen kodiert. Dieses Gen erstreckt sich über einen Bereich von mehr als 50 kb und enthält mindestens zwanzig Exons (Screaton et al., 1992, 1993; Tölg et al., 1993). Die kleinste Form der CD44-Proteine (CD44 Standardform oder CD44s) wird von neun Exons, den Exons 1-5, 15-17 und 19 kodiert (Numerierung nach Screaton et al., 1992). Die dazwischen liegenden Exons werden durch Spleißen eliminiert. Dieses Protein wird nahezu ubiquitär exprimiert (Picker et al., 1989b; Fox et al., 1993; Heider et al., 1993; Mackay et al., 1994). CD44-Proteine wurden zunächst unter den verschiedensten Bezeichnungen wie Pgp-1 (für „phagocytic glycoprotein-1“), Ly-24, ECM-III (für „extracellular matrix receptor type III“), p80, p85, H-CAM (für „homing-cellular adhesion antigen“) oder F-10-44-2-, Hermes- und HUTCH-1-Antigen beschrieben, bevor man aufgrund von strukturellen Homologien und Kreuzreaktivitäten der jeweiligen Antikörper (Gallatin et al., 1989; Picker et al., 1989a, b), sowie durch Klonierung der jeweiligen cDNAs erkannte, daß es sich um Mitglieder derselben Proteinfamilie handelt (Goldstein et al., 1989; Idzerda et al., 1989; Nottenburg et al., 1989; Stamenkovic et al., 1989; Zhou et al., 1989). CD44s ist ein Typ-1 Transmembran-Glykoprotein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 85-95 kDa. Die Diskrepanz zu dem, aus der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewicht von etwa 37 kDa resultiert zum großen

Teil aus umfangreichen posttranslationalen Modifikationen. Diese schließen N- und O-Glykosylierung, sowie die Anheftung von Chondroitin- und Heparansulfat ein (Jalkanen et al., 1988; Zhou et al., 1989; Brown et al., 1991; Rudy et al., 1993). Zusätzlich zu den Exons, die für CD44s kodieren, gibt es zehn sogenannte variante Exons (v1 bis v10). Diese können alternativ gespleißt werden, wodurch eine große Anzahl verschiedener Isoformen generiert werden kann (Screaton et al., 1992, 1993; Tölg et al., 1993). Die varianten Isoformen enthalten zusätzliche, von verschiedenen Kombinationen der varianten Exons kodierte Aminosäuresequenzen, die jeweils an derselben Stelle in den extrazellulären, membranproximalen Teil des CD44s-Proteins inseriert sind (Brown et al., 1991; Dougherty et al., 1991; Günthert et al., 1991; Hofmann et al., 1991; He et al., 1992; Arch et al., 1992; Jackson et al., 1992; Screaton et al., 1992, 1993; Rudy et al., 1993; Tölg et al., 1993). Grundsätzlich haben alle CD44-Proteine identische extrazelluläre N-Termini, sowie Transmembrandomänen und zytoplasmatische C-Termini. Ausnahmen dazu bilden Isoformen mit verkürzter zytoplasmatischer Domäne (Screaton et al., 1992) und ins Serum abgegebene, lösliche CD44-Proteine (Lucas et al., 1989; Katoh et al., 1994). Das Exon v1 des humanen CD44 hat eine G nach A Transition an Position 55, die nach Aminosäure Nummer 17 ein Stopkodon einführt (Screaton et al., 1993). Das Vorhandensein von Exon v1 in humanen CD44-Transkripten könnte zur Produktion löslicher Isoformen im menschlichen Serum führen. Andere lösliche Isoformen könnten durch proteolytische Spaltung an einem Arginin-Dipeptid, einem Motiv für trypsinähnliche Proteasen, entstehen, welches von Exon v10 des humanen, murinen und Ratten-CD44-Gens kodiert wird (Dougherty et al., 1991; Screaton et al., 1993).

Bisher wurden Komponenten der extrazellulären Matrix wie Hyaluronsäure (Aruffo et al., 1990; Jalkanen und Jalkanen, 1992; Sherman et al., 1994), Kollagen und Fibronectin (Jalkanen und Jalkanen, 1992) sowie schwefelhaltige Proteoglycane (Toyama-Sorimachi und Miyasaka, 1994) als CD44-Liganden beschrieben. Die zwei Hyaluronsäure-Bindungsregionen von CD44 werden von Exon 2 und 5 kodiert (Yang et al., 1994). Die CD44-Affinität für Hyaluronsäure wird reguliert (Lesley et al., 1993, 1994; Puré et al., 1995). Biochemische Konsequenzen der CD44-Bindung versteht man noch kaum. Ricciarda Galandrini und Mitarbeiter (1993) zeigten Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine nach Antikörperquervernetzung von CD44 auf humanen peripheren T-Zellen oder T-Zell-Klonen. Bei einem dieser Phosphoproteine könnte es sich um die PTK p56<sup>lck</sup> handeln (Steven Pals, persönliche Mitteilung), ein Befund, der die Beteiligung von CD44 an Signaltransduktionsprozessen wahrscheinlich machen würde. Der Mechanismus der Rekrutierung von p56<sup>lck</sup> durch CD44 ist jedoch noch unbekannt. Ein Sequenzmotiv, ähnlich dem, welches die Assoziation von CD4 oder CD8 mit p56<sup>lck</sup> ermöglicht, ist in der zytoplasmatischen Domäne von CD44 nicht vorhanden (Turner et al., 1990).

Interessant ist, daß sich Mäuse mit homozygoter Null-Mutation im CD44-Lokus normal entwickeln und keine offensichtlichen phänotypischen Abnormalitäten gegenüber CD44-positiven Mäusen haben (Rudolf Schmits und Tak Mak, persönliche Mitteilung). Dies spricht für die Existenz von einem oder mehreren funktionellen Homologen. Bisher wurden allerdings noch keine detaillierten Untersuchungen an diesen Mäusen durchgeführt, so daß Störungen einzelner Prozesse, für die eine Beteiligung von CD44 beschrieben wurde, nicht auszuschließen sind.

### 2.4.3 Variante CD44-Isoformen als Metastasierungspromotoren

Die erste beschriebene variante Isoform von CD44 wurde bei der Suche nach Genprodukten isoliert, die lokal wachsenden Tumorzellen die Fähigkeit zu metastasieren verleihen. Siegfried Matzku und Mitarbeiter charakterisierten 1983 BSp73, ein spontanes Pankreas-Adenokarzinom der Ratte. Durch serielle Transplantationen von Tumorgewebe gelang die Selektion zweier Tumorkulturen, die sich dramatisch in ihrem spontanen Metastasierungsverhalten unterschieden. Die beiden Linien konnten an Gewebekulturbedingungen angepaßt werden. Die subkutane Injektion von AS, der einen Linie, in syngene Tiere führte zur Entwicklung eines lokal wachsenden Tumors ohne jede Tendenz zur Metastasierung. Die andere Linie, ASML, hingegen begann kurz nach der Inokulation lymphogen zu metastasieren. Mittels des monoklonalen Antikörpers mAk1.1ASML, der selektiv die metastasierende Tumorkultur erkennt, wurde die cDNA für ein, um 162 Aminosäuren längeres als das bis dahin einzig bekannte CD44-Genprodukt (CD44s) aus einer bakteriellen Expressionsbibliothek isoliert (Günthert et al., 1991). Später stellte sich heraus, daß in dieser CD44-Isoform eine Aminosäuresequenz, die von den varianten Exons v4 bis v7 kodiert wird, in die extrazelluläre Domäne inseriert ist. Der murine mAk1.1ASML erkennt ein Epitop, das vom varianten Exon 6 kodiert wird. Die funktionelle Relevanz dieser Varianten für den Metastasierungsprozeß ergab sich aus zwei Datenblöcken. (i) Der mAk1.1ASML interferiert *in vivo* mit der Kolonisierung von Lymphknoten und Lunge durch ASML-Zellen (Reber et al., 1990; Seiter et al., 1993). Ratten, denen, beginnend mit der Injektion von ASML, zweimal pro Woche 200 µg mAk1.1ASML intravenös appliziert wurden, hatten signifikant weniger Lungenmetastasen und lebten dementsprechend länger als Kontrolltiere, die dieselbe Menge eines Antikörpers vom selben Isotyp, jedoch mit irrelevanter Spezifität erhalten hatten. (ii) Die Expression zweier metastasenassoziiierter Isoformen, CD44v4-v7 und CD44v6-v7, in nicht-metastasierenden AS-Zellen verleiht diesen Zellen spontane metastatische Fähigkeiten *in vivo* (Günthert et al., 1991; Rudy et al., 1993). Auch in diesem Fall blockiert der mAk1.1ASML die Kolonisierung von Lymphknoten und Lunge (Seiter et al., 1993). Die Überexpression der CD44-Standardisoform in AS-Zellen induziert nicht den metastatischen Phänotyp (Rudy et al., 1993). Zusammengefasst zeigen diese Daten, daß die Expression bestimmter CD44-Varianten notwendig und ausreichend ist, um Zellen des BSp73-Pankreas-Adenokarzinoms der Ratte metastatische Fähigkeiten zu verleihen.

Auffällig ist, daß beide, die Metastasierung induzierenden Isoformen Exon v6- und v7- kodierte Sequenzen enthalten. Reicht die Insertion von Sequenzen, die von einem dieser Exons kodiert werden aus, um Tumorzellen den metastatischen Phänotyp zu verleihen? Welche biochemischen Abläufe sind dazu nötig? Die zytoplasmatische Domäne der varianten CD44-Isoformen ist nicht erforderlich, um Metastasierungs-fähigkeit zu verleihen (Martin Hofmann, persönliche Mitteilung). Spezifische Liganden für die variante Region wurden bisher nicht charakterisiert. Verlieren ASML-Zellen ihre Metastasierungs-fähigkeit, wenn man die Expression varianter CD44-Isoformen unterbindet? Induziert ihre Expression in anderen Tumorzellen den metastatischen Phänotyp? Diese und viele andere Fragen sind zur Zeit noch nicht beantwortet.

In den vergangenen Jahren wurde intensiv die Expression varianter CD44-Isoformen auf verschiedenen humanen Tumoren untersucht. Besonderes Augenmerk soll

an dieser Stelle auf die Korrelation zwischen der Variantenexpression und der Tumorprogression beziehungsweise der Überlebenserwartung der Krebspatienten gelegt werden. Daraus können Aussagen über den kausalen Bezug der Expression von CD44-Isoformen zum Metastasierungspotential bestimmter Tumoren gemacht werden.

Gebärmutterhalskarzinome sind Tumore eines Gewebes, das normalerweise CD44-Varianten exprimiert. Im Verlauf der Progression des humanen Zervixkarzinoms kommt es zur Akquisition eines varianten CD44-Epitops, das von Sequenzen der Exons v7 und v8 gemeinsam kodiert wird. Im normalen Zervix-Plattenepithel ist CD44v7/8 immunhistochemisch nicht nachweisbar. CD44v7/8 tritt jedoch mit zunehmendem Grad intraepithelialer zervikaler Neoplasie (CIN für „intraepithelial cervical neoplasia“) mit steigender Inzidenz auf (CIN I: 19%; CIN II: 26 %; CIN III 92 %). Alle invasiven Plattenepithelkarzinome sind CD44v7/8-positiv (Dall et al., 1994, Dall et al., zur Publikation eingereicht). Die Expression des v7/v8-Epitops könnte ein nützlicher diagnostischer und prognostischer Faktor zur Früherkennung des Zervixkarzinoms sein.

„Non-Hodgkin“ Lymphome (NHL), Brustkarzinome und kolorektale Neoplasien sind Tumore von Geweben, die normalerweise keine CD44-Varianten exprimieren.

#### *Non-Hodgkin Lymphome*

NHL repräsentieren antagonistische klinische Verhaltensweisen: (i) nichtinvasives Wachstum („low grade“ NHL) sowie (ii) aggressives Wachstumsverhalten mit Tendenz zur Organinfiltration („high grade“ NHL). Molekulare Marker, anhand derer man den klinischen Verlauf der Krankheit früher und besser vorhersagen kann, wären wünschenswert. Eine Studie an 138 NHL-Patienten ergab, daß sowohl die erhöhte Expression von CD44s als auch das Auftreten von Exon v3- und v6-kodierten Epitopen mit einer schlechten Prognose für die Patienten korrelieren (Stauder et al., 1995). Die Expression von CD44v6 stellt im Fall von NHL einen unabhängigen prognostischen Faktor dar. Die Expression von CD44v3 und CD44v6 ist interessanterweise in aktivierten Lymphozyten transient erhöht (Arch et al., 1992; Koopmann et al., 1993; Hirano et al., 1994; Stauder et al., 1995). Aktivierte Lymphozyten rezirkulieren über die afferenten Lymphbahnen. Die Expression von Exon v3- und v6-enthaltenden CD44-Isoformen könnte aktivierten Lymphozyten den Zugang zum und/oder die Proliferation im lymphatischen Gewebe ermöglichen (als Übersichtsartikel siehe Herrlich et al., 1993). Möglicherweise benutzen NHL, die malignen Pendanten normaler Lymphozyten, CD44-Varianten zu ihrer Disseminierung.

#### *Brustkarzinome*

Eine Untersuchung mit 136 Patientinnen mit primärem Brusttumor ergab eine Korrelation zwischen der Expression von CD44v5- und v6- Epitopen (nicht jedoch v7/v8-, v8- und v10-Epitopen) und einer verminderten Überlebensdauer (Kaufmann et al., 1995). CD44v6 wurde in dieser Studie als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert. Eine Untersuchung von Kay Friedrichs und Kollegen (1995) zeigt jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der Expression varianter CD44-Isoformen und der Überlebensdauer

von Brustkrebspatientinnen. Diese Diskrepanzen könnten auf der Untersuchung unterschiedlicher Tumorstadien beruhen. Studien an Tumoren größerer Patientenserien mit der Möglichkeit, Untergruppen zu definieren, müssen durchgeführt werden, um den prognostischen Stellenwert der Expression von CD44-Varianten zu evaluieren.

#### *Kolorektale Neoplasien*

Die CD44-Variantenexpression in der normalen Dickdarmmukosa ist kaum nachweisbar. Schwache Expression zeigen lediglich die generativen Epithelzellen an der Basis der Krypten. CD44v6 wird in der normalen humanen Darmmukosa nicht exprimiert. (Heider et al., 1993; Wielenga et al., 1993; Mackay et al., 1994) Die Inzidenz CD44v6-positiver Proben nimmt mit steigendem Dysplasiegrad [frühe Adenome, späte Adenome, stationäre Karzinome (Dukes A und B), invasive Karzinome (Dukes C/D)] signifikant zu (Wielenga et al., 1993). Während frühe Adenome so gut wie negativ für die Expression von CD44v6 sind, exprimiert etwa die Hälfte der invasiven Karzinome CD44v6. Genauso hoch ist der Prozentsatz kolorektaler Karzinome, die metastasieren, obwohl zum Zeitpunkt der Operation keine Metastasen detektierbar waren. Kann aufgrund der CD44v6-Expression die Tendenz kolorektaler Karzinome, zu metastasieren, vorhergesagt werden? Dies wurde in einer Studie mit 68 Patienten mit primärem kolorektalen Karzinom untersucht (Mulder et al., 1994). Die CD44v6-Expression in kolorektalen Tumoren ist höchst variabel und reicht von negativ bis stark positiv. Die Überlebensdauer der Patienten nahm mit zunehmender Anzahl CD44v6-positiver Zellen im Tumor ab. Das bedeutet, die CD44v6-Expression ist ein prognostischer Faktor für Tumorpatienten mit operiertem, primärem Kolonkarzinom.

Zusammengefaßt scheint es, daß variante CD44-Proteine wichtige Komponenten des Programms der Tumorprogression verschiedener Krebsarten von Mensch und Tier sind. CD44v6-kodierte Epitope wurden bei bestimmten humanen Krebsarten (NHL, Brustkrebs und kolorektales Karzinom) als prognostische Faktoren identifiziert. Da die Metastasierung die hauptsächliche und bisher am wenigsten zu bekämpfende Ursache für Krebserkrankungen ist, sind Varianten von CD44 ideale Zielproteine für die Tumorthherapie.

#### **2.4.4 Tumorzellen gehen in den Untergrund**

Eine grundlegendes Paradox bei der Entstehung von Krebs ist, daß Tumorzellen nicht einfach durch immunologische Abwehrmechanismen eliminiert werden. Warum ist dies der Fall? Am leichtesten versteht man dieses Phänomen, wenn die Tumorentstehung auf der Überexpression von Selbst-Proteinen, wie im Fall des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor (als Übersichtsartikel siehe Gullick 1991) oder der Rezeptor-Tyrosinkinase erbB-2 (als Übersichtsartikel siehe Hynes, 1993) beruht, gegen die keine Immunreaktion zu erwarten ist. Andererseits könnte fehlende tumorspezifische Immunität durch inadäquate Aktivierung tumorspezifischer Helfer-T-Zellen verursacht werden. In einer klassischen Immunantwort werden lösliche Antigene von professionellen APCs (für „antigen presenting cell“) aufgenommen, prozessiert und, im Kontext mit MHC-Klasse-II-Molekülen, tumorreaktiven CD4-positiven Helfer-Lymphozyten präsentiert (vgl. 2.2.1).

Durch Antigenerkennung aktivierte CD4-positive T-Zellen sezernieren Wachstumsfaktoren, sogenannte Zytokine und „helfen“ damit antigenspezifischen CD8-positiven T-Zellen. Diese CD8-positiven T-Zellen werden wahrscheinlich direkt durch Zielzellen aktiviert, die endogen synthetisiertes, antigenes Peptid im Kontext mit ihren MHC-Klasse-I-Molekülen präsentieren. Alle bisher charakterisierten tumorassoziierten Antigene, die von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, werden jedoch nicht sezerniert (als Übersichtsartikel siehe Boon et al., 1994; Slingluff et al., 1994). APCs erlangen also nur durch den Tod von Tumorzellen Zugang zu tumorassoziiert exprimierten Antigenen. Während früher Stadien des Tumorwachstums sterben nur wenige Tumorzellen. Später werden Teile der Tumormasse nekrotisch und lösliches Antigen wird verfügbar. Zu diesem Zeitpunkt ist der Tumor oft schon zu groß, so daß das Immunsystem machtlos ist.

Daneben haben Tumorzellen eine ganze Palette von Mechanismen entwickelt, die es ihnen erlauben, sich der Immunüberwachung zu entziehen. Häufig beobachtet man beispielsweise die verminderte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, den selektiven Verlust eines MHC-Klasse-I  $\alpha$ -Ketten-Allels oder von funktionellem  $\beta$ 2-Mikroglobulin (Tanaka et al., 1988; Feldman und Eisenbach, 1991; Pantel et al., 1991; Kaklamanis et al., 1992; Browning et al., 1993; Vegh et al., 1993; Wang et al., 1993; Honma et al., 1994; Marincola et al., 1994; Bicknell et al., 1994; Branch et al., 1995;) sowie Defekte in Komponenten des Antigenprozessierungsapparates (Cromme et al., 1994a, b; Restifo et al., 1991, 1993). Oft fehlt Tumorzellen die Expression kostimulatorischer Moleküle wie B7-1 (CD80) oder B7-2 (CD86), die durch Interaktion mit ihrem Rezeptor (CD28) auf der T-Zell-Oberfläche das zweite Signal zur T-Zell-Aktivierung liefern (Chen et al., 1993; Janeway, Jr. und Bottomly., 1994; Mondino und Jenkins, 1994; Ramarathinam et al., 1994; Yang et al., 1995). Dies erklärt jedoch nicht, warum man aus Patienten mit wachsenden Tumoren tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs) gewinnen kann, die *in vitro* die autologen Tumorzellen lysieren können. Möglicherweise wird durch Induktion immunologischer Ignoranz oder durch Suppression die spezifische Immunität in der *in vivo* Situation verhindert. So hat offensichtlich die Nutzung spezifischer V $\alpha$ - oder V $\beta$ -Gensegmente (V $\alpha$  und V $\beta$  stehen für variable Region der TCR- $\alpha$ - beziehungsweise - $\beta$ -Kette) einen negativen regulatorischen Einfluß auf die Effektor-T-Zellen in TILs (Gelber et al., 1992; Wang und Taniguchi, 1995). Wie Tumorzellen dies beeinflussen ist nicht bekannt. Die Sekretion immuninhibitorischer Substanzen durch Tumorzellen wurde beschrieben (Roth et al., 1983). Die Expression wichtiger Signalmoleküle in Lymphozyten tumortragender Mäuse (interessanterweise in T-Zellen, die aus der Milz der Tiere isoliert wurden) kann drastisch reduziert sein (Mizoguchi et al., 1992). Der postulierte, tumorabgeleitete, humorale Faktor, der diese Veränderungen induziert, wurde jedoch noch nicht charakterisiert. Tumorexposition induziert in humanen TILs deutlich verminderte Expression von p56<sup>lck</sup> und CD3 $\zeta$  (Finke et al., 1993). Schließlich läßt ein Bericht von Cascino und Mitarbeitern darauf schließen, daß sich Tumorzellen durch Abgabe von löslichen Formen des apoptoseinduzierenden Fas-Moleküls vor der Lyse durch CTLs schützen könnten (Cascino et al., 1995).

Eine prominente Ursache der Tumorentstehung ist also, daß T-Zellen für bestimmte Tumorzellen „blind“ sind. Eine sehr attraktive Form der Tumorthherapie wäre somit, T-Zellen eine Art „Sehhilfe“ zur Verfügung zu stellen, die ihnen erlauben würde, Tumorzellen trotz ausgeklügelter Tarnmechanismen zu erkennen. Geeignete Zielmoleküle wären tumorassoziiert exprimierte oder überexprimierte Oberflächenantigene. Metastatische

Tumorzellen zeichnen sich in verschiedenen Fällen durch die Expression varianter CD44-Isoformen aus. Die „Sehhilfe“ könnte in der Erkennung dieser CD44-Varianten liegen. Sie sollte T-Zellen unabhängig von ihrer TCR-Spezifität ermöglichen, Tumorzellen, die CD44-Varianten exprimieren, aufzuspüren. Die Erkennung müßte jedoch in dieselben Signalwege einmünden, die nach Stimulierung des TCR-Komplexes initiiert werden.

## 2.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer neuartigen Strategie zur Behandlung von Tumoren. CD44-Isoformen, die Exon v6-kodierte Sequenzen enthalten, sind theoretisch vielversprechende Zielmoleküle für eine selektive Immuntherapie, da solche Isoformen bevorzugt auf Tumoren mit Metastasierungspotential exprimiert werden. Zunächst sollte an einem CD44v6-positiven Rattentumor untersucht werden, ob sich das v6-Epitop auch in der Praxis als Zielantigen für immunintervenierende Konzepte zur Behandlung von Krebs eignet. Der zelluläre, zytolytische Effektorarm des Immunsystems sollte artifiziell, d.h. unter Umgehung der MHC-Abhängigkeit, auf CD44v6-exprimierende Tumorzellen „abgerichtet“ werden. Dies sollte mit der Expression eines chimären Rezeptors in zytotoxischen T-Zellen erfolgen. Der chimäre Rezeptor sollte die Antigenerkennung unmittelbar an den zellulären Signaltransduktionsapparat koppeln, der zur Aktivierung der CTLs führt. Die Erkennung des v6-Epitops sollte durch ein scFv-Fragment erfolgen, die Signaltransduktion sollte durch Kopplung des scFv-Fragments an die  $\zeta$ -Kette des TCR-Komplexes ausgelöst werden. Die Realisierung dieser Aufgabe beinhaltete:

- i) die Klonierung der cDNAs für die variablen Regionen des mAk1.1ASML
- ii) die Expressionsklonierung des synthetischen Gens, das für ein Fusionsprotein aus scFv1.1ASML und der TCR- $\zeta$ -Kette kodiert
- iii) die Einführung des synthetischen Gens in das Genom zytotoxischer T-Lymphozyten
- vi) die biochemische Charakterisierung der gentechnologisch veränderten CTLs
- v) die Demonstration der in vitro und in vivo anti-Tumor-Aktivität der veränderten CTLs gegenüber CD44v6-positiven Zellen

Ein zweites Projekt, über das ich nur sehr kurz berichten werde, hatte die bakterielle Expression eines Immuntoxins zum Ziel. Die Zellbindungsdomäne des Exotoxin A (ETA) aus *Pseudomonas aeruginosa* sollte durch scFv(1.1ASML) ersetzt werden. ETA würde dadurch spezifisch gegen v6-Epitop-positive Zellen „abgerichtet“. ETA blockiert durch ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors-2 irreversibel die zelluläre Proteinbiosynthese.

## 3. MATERIAL & METHODEN

### 3.1 Material

#### Bezugsquellen

Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30/0,8)	Roth (Karlsruhe)
Agarose (SeaKem LE)	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Ammoniumperoxodisulfat	BioRad (München)
Ampicillin	Boehringer (Mannheim)
Aprotinin	Boehringer (Mannheim)
Bacto Agar	Difco (Detroit, MI, USA)
Bacto Hefeextrakt	Difco (Detroit, MI, USA)
Bacto Trypton	Difco (Detroit, MI, USA)
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat	Sigma (Deisenhofen)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
"Cap"-Struktur-Analog [m <sup>7</sup> G(5')pppGTP]	Boehringer (Mannheim)
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva (Heidelberg)
2'-Deoxynukleosid-5'-Triphosphate	Boehringer (Mannheim)
2',3'-Dideoxynukleosid-5'-Triphosphate	Boehringer (Mannheim)
N,N'-Dimethylformamid	Sigma (Deisenhofen)
2,5-Diphenyloxazol	Merck (Darmstadt)
Dithiothreitol	Boehringer (Mannheim)
DMEM (synthetisches Kulturmedium)	Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)
Eichproteine, vorgefärbt	BioRad (München)
Ethidiumbromid	Sigma (Deisenhofen)
Ficoll Typ 400	Pharmacia (Freiburg)
Fötale Kälberserum	Bio Whittaker (Verviers, Belgien)
Geneticin-Sulfat (G418)	Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)
L-Glutamin	Sigma (Deisenhofen)
Glutathion-Agarose	Sigma (Deisenhofen)
N-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure	Roth (Karlsruhe)
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid	Roth (Karlsruhe)
Leupeptin	Boehringer (Mannheim)
Lysat aus Kaninchenretikulozyten	Promega (Madison, WI, USA)
Magemilchpulver	Saliter (Obergünzburg)
2-Mercaptoethanol (50 mM, für die Zellkultur)	Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)
Miobrill-Plastikwolle	Migros (Basel, Schweiz)
3MM Whatman Papier	Whatman (Maidstone, UK)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	BioRad (München)
Nonidet P40	Boehringer (Mannheim)
4-Nitroblue-Tetrazoliumchlorid	Sigma (Deisenhofen)
Pepstatin	Boehringer (Mannheim)
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid	Sigma (Deisenhofen)
Polyvinyliden-Difluorid-Membran	Millipore (Bedford, MA, USA)
Protein-G-Plus/Protein-A-Agarose	Oncogene Science (Uniondale, NY, USA)
Ribonuklease A	Sigma (Deisenhofen)
Nukleosid-5'-Triphosphate	Boehringer (Mannheim)
Rinderserumalbumin, Fraktion V	Serva (Heidelberg)
RPMI 1640 (synthetisches Kulturmedium)	Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)

Sulfo-NHS-Biotin	Pierce (Rockford, IL, USA)
Trypanblau	Serva (Heidelberg)
Trypsin	Difco (Detroit, MI, USA)
tRNA (aus Hefe)	Sigma (Deisenhofen)
Tween 20	Serva (Heidelberg)
Xylencyanol FF	Serva (Heidelberg)

Alle übrigen in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in analytischem Reinheitsgrad von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

### *Radiochemikalien*

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Buchler (Braunschweig) bezogen.

L-[ <sup>35</sup> S] Methionin	>37 TBq/mmol	555 MBq/ml	SJ204
[ <sup>35</sup> S] dATP $\alpha$ S	>37 TBq/mmol	370 MBq/ml	AG1000
[ <sup>14</sup> C] methylierter Protein-Molekulargewichtsstandard (MW in kDa: 200; 97,4; 66; 46; 30; 21,5; 14,3)		185 kBq/ml	CFA626

### *Enzyme*

Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme wurden von den Firmen Amersham Buchler (Braunschweig), Boehringer (Mannheim), Promega (Madison, WI, USA), Pharmacia (Freiburg) oder United States Biochemicals (Cleveland, OH, USA) bezogen.

### *DNA-Fragmentlängen-Standard*

HaellI-gespaltene pUC9-Plasmid-DNA (in bp)	587, 458/434, 298, 267, 257, 174, 102, 80, 18, 11
--	---

### *Bakterienstämme:*

Die E. coli-Stämme XL-1Blue (Bullock et al., 1987) und JM110 (Yanisch-Perron et al., 1985) wurden für Klonierungen verwendet. Der E. coli-Stamm CC118 (Manoil und Beckwith, 1985) wurde zur bakteriellen Expression von Proteinen eingesetzt.

### *Oligonukleotide*

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG BIOTECH (Ebersberg), TIB MOLBIOL (Berlin), EUROGENTECH (Seraing, Belgien) beziehungsweise von der DNA-Synthese-Abteilung des Friedrich Miescher Institutes (Basel, Schweiz) bezogen. Sämtliche Oligonukleotide sind weder am 5'- noch am 3'-Ende phosphoryliert. Im folgenden sind die Bezeichnung (#), die Nukleotidsequenz, die Anwendung, falls erforderlich die Position und Orientierung relativ zu den kodierenden Sequenzen der zu amplifizierenden cDNAs, sowie eventuelle Spaltstellen für Restriktionsenzyme angegeben.

# Orientierung	Sequenz	Anwendung	Position/Referenz	
CD8HINGEBACK	5'-TCA AAG <u>CTC TAG</u> AGA TCA GC-3' XbaI	Mutagenese der CD8 $\alpha$ - <i>"hinge"</i> -cDNA	813 - 832 (Moritz, 1994)	"sense"
CD8HINGEFOR	5'-AAT AGA <u>ATT CGC TAG</u> CAA GTC CAA TCC GGT CCC C-3' EcoRI NheI	Mutagenese der CD8 $\alpha$ - <i>"hinge"</i> -cDNA	988 - 1012 (Moritz, 1994)	"anti-sense"
FRAMEBACK	5'-AGC TTC AGG TAC AAC TGC A-3'	Mutagenese von pWW15		
FRAMEFOR	5'-GTT GTA CCT GA-3'	Mutagenese von pWW15		
MCH2	5'-AGA TCC AGG GGC CAG TGG ATA GA-3'	Erststrang cDNA-Synthese der $\gamma$ 1-Kette	121 - 143 (Honjo et al., 1979)	"anti-sense"
VH1BACK	5'-AGG TSM ARC <u>TGC AGS</u> AGT CWG G-3' PstI	Amplifikation der VH-cDNA	(modifiziert nach Orlandi et al., 1988)	"sense"
VH1BACKHIND	5'-ATT ATA <u>AGC TTC</u> AGG TSM ARC <u>TGC AGS</u> AGT CWG G-3' HindIII PstI	Amplifikation der VH-cDNA	(Orlandi et al., 1988)	"sense"
VH1FOR	5'-TGA GGA GAC <u>GGT GAC</u> CGT GGT CCC TTG GCC CCA G-3' BstEII	Amplifikation der VH-cDNA	(Orlandi et al., 1988)	"anti-sense"
VkW1BACK	5'-GAC ATT <u>CAG CTG</u> ACC CAG WCT SMH-3' PvuII	Amplifikation der V $\kappa$ -cDNA	(modifiziert nach Orlandi et al., 1988)	"sense"
VkW1FOR	5'-GTT <u>AGA TCT</u> CCA RYT TKG TSC S-3' BglII	Amplifikation der V $\kappa$ -cDNA	(Wels et al., 1995)	"anti-sense"
3177	5'-GTC TCT AAC ACT CAT TCC TGT TGA AGC-3'	Erststrang cDNA-Synthese der $\kappa$ -Kette	511 - 538 (Hieter et al., 1980)	"anti-sense"
C $\kappa$ A1FOR	5'-GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC AGC-3'	Erststrang cDNA-Synthese der $\kappa$ -Kette	113 - 136 (Hieter et al., 1980)	"anti-sense"
T3	5'-ATT AAC CCT CAC TAA AG-3'	Sequenzierung		
T7	5'-GAT ATC ACT CAG CAT AA-3'	Sequenzierung		
KS	5'-CGA GGT CGA CGG TAT CG-3'	Sequenzierung		

Ein-Buchstaben-Code für degenerierte Stellen in Oligonukleotiden

H = (A, C, T); K = (G, T); M = (A, C); R = (A, G); S = (C, G); W = (A, T); Y = (C, T)

*Plasmid-DNA*

pT7T3s	Ursula Günthert (Basel Institute for Immunology, Basel, Schweiz; nicht publiziert)
pLXSN	Miller und Rosman, 1989
pGEM-1	Promega (Madison, WI, USA)
pL(FYZ)SN	Moritz et al., 1994
pWW15	Wels et al., 1992a
pWW15/SP <sup>m</sup> -VH(225)	Roger Beerli (Friedrich-Miescher-Institut, Basel, Schweiz; nicht publiziert)
pWW152	Wels et al., 1995
pFLAG-1	IBI Biochemicals (New Haven, CT, USA)
pWW20	Wels et al., 1992b
pGEX-2T	Smith und Johnson, 1988
pSVMeta-1	Günthert et al., 1991

*Monoklonale Antikörper*

<u>Bezeichnung</u>	<u>Immunogen</u>	<u>Referenz/Bemerkung</u>
M1 (Maus-IgG1)	FLAG-Epitop (DYKDDDDK)	(Prickett et al., 1989) die Reaktion von mAkM1 mit dem FLAG-Peptid ist Ca <sup>++</sup> -abhängig.
H146-968 (Hamster-IgG)	C-terminales Peptid der humanen CD3 ζ-Kette; reagiert mit der murinen CD3 ζ-Kette	(Rozdzial et al., 1994);
1.1ASML (Maus-IgG1)	Epitop, das von CD44-Exon v6 der Ratte kodiert wird	(Günthert et al., 1991)
3-9 (Maus-IgG1)	oktaedrisches Galliumchelat	(Zöller et al., 1992); dient als Kontrollantikörper

*Sekundärreagenzien*

Schaf-Antiserum gegen Maus-Ig, Meerrettichperoxidase-konjugiert (NA931)	Amersham Buchler (Braunschweig)
Kaninchen-Antiserum gegen Maus-Ig, Meerrettichperoxidase-konjugiert kreuzreagiert mit Hamster-IgG (P161)	Dako (Hamburg)
Ziegen-Antiserum gegen Maus-IgG, alkalische-Phosphatase-konjugiert kreuzreagiert mit Hamster-IgG (A2179)	Sigma (Deisenhofen)
Esel-Antiserum gegen Kaninchen-Ig, Meerrettichperoxidase-konjugiert (NA934)	Amersham Buchler (Braunschweig)
Ziegen-Antiserum gegen Maus-Ig, Phycoerythrin-konjugiert (R480)	Dako (Hamburg)
Streptavidin Meerrettichperoxidase-konjugiert (RPN1231)	Amersham Buchler (Braunschweig)

### 3.2. Versuchstiere

Thymusaplastische BALB/c Nacktmäuse wurden von der Firma Charles River Deutschland (Sulzfeld) bezogen. Die Tiere wurden in Käfigen mit Filterdeckeln gehalten und im Alter von acht bis zwölf Wochen in den Experimenten eingesetzt.

### 3.3 Zelllinien und Kulturbedingungen

Vorbemerkung: Alle Zellen werden in befeuchteter Atmosphäre bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### 1.1ASML

MAK1.1ASML-(IgG1, kappa)-produzierende Hybridomzelllinie (Günthert et al., 1991). Die Hybridomzelllinie wird in RPMI 1640, 10% FKS kultiviert.

#### 1AS, 10AS

Tumorzelllinien, die aus dem Ascites eines spontanen Bauchspeicheldrüsen-Adenokarzinoms (BSp73) einer BDX-Ratte etabliert wurden (AS steht für "ascites variant adapted to solid growth"; Matzku et al., 1983). (Die vollständige Bezeichnung der Zelllinie ist BSp73AS). Bei 1AS handelt es sich um eine frühere Passage. 1AS- und 10AS-Zellen werden in RPMI, 10% FKS kultiviert.

#### 4E11

MAK1-produzierende Hybridomzelllinie (ATCC HB 9259). 4E11-Zellen werden in RPMI 1640, 10% FKS kultiviert.

#### AS14

10AS-Transfektanten, mit starker Expression der Ratten-CD44-Isoform CD44v4-v7 (Meta-1; Günthert et al., 1991). Die Transfektanten werden in RPMI 1640, 10% FKS, 400 µg/ml G418 kultiviert. (Die vollständige Bezeichnung der Zelllinie ist BSp73ASpSVmeta1-14.)

#### ASML

Tumorzelllinie, die aus dem Ascites eines spontanen Bauchspeicheldrüsen-Adenokarzinoms (BSp73) einer BDX-Ratte etabliert wurde (ASML steht für "ascites variant adapted to solid growth metastasizing via the lymphatics"; Matzku et al., 1983). ASML wurde durch wiederholte *in vivo* Passage der BSp73-Ascites Zellen mit anschließender Reimplantation der dadurch hervorgerufenen Lungenmetastasen in syngene BDX-Ratten etabliert. (Die vollständige Bezeichnung der Zelllinie ist BSp73ASML). ASML-Zellen werden in RPMI 1640, 10% FKS kultiviert.

#### CI96

Zytotoxische T-Zelllinie aus der C57Bl/6-Maus (H-2K<sup>b</sup>; Marcucci et al., 1981; Eichmann et al., 1991) mit H-2K<sup>d</sup>-restringierter Spezifität für die Mastozytom-Zelllinie P815 (H-2K<sup>d</sup>). CI96-Zellen sowie ihre Infektanten werden in DMEM, 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 0,05 mM 2-Mercaptoethanol, 3% konditioniertem X63/IL-2-Kulturüberstand kultiviert.

#### NIH3T3

Murine embryonale Fibroblastenlinie, die in DMEM, 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES kultiviert werden (ATCC CRL 1658).

**NIH3T3#CD44v4-v7**

NIH3T3-Zellen, die mit der cDNA für die CD44v4-v7 Isoform der Ratte infiziert wurden. NIH3T3#CD44v4-v7-Zellen werden in DMEM, 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES kultiviert.

**P815**

Mastozytom-Zelllinie aus der DBA/2-Maus (H-2K<sup>d</sup>). P815 werden in DMEM, 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES kultiviert (ATCC TIB 64).

**PA317**

Murine amphotrope Verpackungszelllinie für Retroviren (Miller und Buttimore, 1986). PA317-Zellen werden in DMEM, 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES kultiviert (ATCC CRL 9078).

**ΩE**

Murine ecotrope Verpackungszelllinie für Retroviren (Morgenstern und Land, 1990). ΩE-Zellen werden in DMEM, 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES kultiviert.

**X63/IL-2**

X63Ag8-653 Plastozytom Zellen transfiziert mit der cDNA für das murine Interleukin-2 (IL-2; Karasuyama und Melchers, 1988). X63/IL-2 sezernieren große Mengen rekombinantes murines IL-2 ins Kulturmedium. X63/IL-2-Zellen werden in DMEM, 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES kultiviert. Konditionierter X63/IL-2-Kulturüberstand diente als Quelle für rekombinantes murines IL-2.

### 3.4 Methoden

Vorbemerkung: Falls nicht anders angegeben, werden Inkubationen, Zentrifugationen oder Waschschriffe bei Raumtemperatur durchgeführt und bei Prozentangaben in Zusammensetzungen von Lösungen und Puffern handelt es sich um Volumenprozent (v/v).

#### 3.4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltungen werden in den vom Hersteller angegebenen Pufferlösungen in 20 µl Gesamtvolumen durchgeführt. In der Regel werden 2 µg DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten. In Abhängigkeit von der Aktivität des jeweiligen Enzyms und der Reinheit der DNA werden 3-5 Enzymeinheiten pro µg DNA zum Reaktionsansatz gegeben und dieser 1 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert. Danach wird die DNA entweder weiter modifiziert (vgl. 3.4.2 und 3.4.3) oder in einem Agarosegel geeigneter Konzentration (vgl. 3.4.4) elektrophoretisch aufgetrennt.

#### 3.4.2 "Glättung" kohäsiver Restriktionsschnittstellen mit 5'-überstehenden Enden

(A) 20 µl einer DNA-Restriktions-Reaktion werden mit 3 µl zehnfach konzentriertem Klenow-Puffer [50 mM Tris-HCl pH 7,2; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT], 1,5 µl dNTP-Mix

[10 mM dATP; 10 mM dCTP; 10 mM dGTP; 10 mM TTP], 1-5 E Klenow-Enzym (großes Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase) und 4,5 µl deionisiertem Wasser versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch 10 min Erhitzen des Ansatzes auf 68 °C erfolgt eine Phenolextraktion. Anschließend wird die DNA in Gegenwart von 0,3 M NaOAc pH 5,2 mit 2 Vol. Ethanol 1 h bei -80 °C präzipitiert, durch Zentrifugation (11000 g, 10 min) sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen, im Wasserstrahlvakuum getrocknet und in 20 µl deionisiertem Wasser gelöst. (B) 5'-überstehende Enden kohäsiver Restriktionsschnittstellen können auch durch Behandlung der entsprechenden DNA mit einer einzelstrangspezifischen Exonuklease aus Mungbohnenkeimen degradiert werden. Typischerweise werden 2 µg linearisierter DNA in Gegenwart von 30 mM NaOAc pH 4,6; 50 mM NaCl; 1 mM ZnCl<sub>2</sub>; 5% Glycerin; 500 µg/ml hitzedenaturierter DNA und 50 µg/ml BSA in einem Reaktionsvolumen von 100 µl 10 min bei 37 °C mit 2 Einheiten Mungbohnen-Nuklease verdaut. Die Reaktionsbedingungen (Reaktionsvolumen, Menge zu verdauender DNA, Menge an Enzymeinheiten, Reaktionstemperatur und Reaktionsdauer) sind jedoch für jede Anwendung empirisch zu ermitteln. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zusatz von 1 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 erfolgt eine Phenolextraktion. Die DNA wird wie oben beschrieben weiterbehandelt und in 20 µl deionisiertem Wasser gelöst.

### 3.4.3 Dephosphorylierung von DNA

Um eine intramolekulare Ligation von Plasmid-Vektoren zu vermeiden, werden deren 5'-Enden dephosphoryliert. Dazu werden 20 µl einer DNA-Restriktions-Reaktion oder 20 µl restriktionsgespaltener, „geglätteter“ DNA (vgl. 3.4.2) mit 2,4 µl zehnfach konzentriertem Phosphatase-Puffer [0,5 M Tris-HCl pH 9,3; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM ZnCl<sub>2</sub>; 10 mM Spermidin] und 1,6 µl alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert.

Hinweis: Linearisierte Plasmid-Vektoren mit unterschiedlichen Enden, die mit einem DNA-Fragment aus hybridisierten Oligonukleotiden ligiert werden sollen, werden nicht dephosphoryliert. Indem gleichzeitig die Oligonukleotide unphosphoryliert bleiben, vermeidet man, daß der Vektor mit mehreren der DNA-Fragmente ligiert. Um die Effizienz der Klonierung zu erhöhen, setzt man das zu ligierende DNA-Fragment in großem Überschuß ein.

### 3.4.4 Analyse von DNA in Agarosegelen

Je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente verwendet man 0,5-2% Agarosegele. Agarose wird in entsprechender Konzentration in TAE-Puffer [20 mM Tris-HCl; 10 mM Essigsäure; 1 mM EDTA] durch kochen gelöst und mit Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 1 µg/ml) versetzt. Man gießt die, auf etwa 60 °C abgekühlte Gellösung in eine Flachbett-Gelapparatur und setzt einen Taschenformer in das noch flüssige Gel. Als Elektrophoresepuffer dient TAE-Puffer (siehe oben). Die zu analysierenden DNA-Proben werden mit 1/10 Vol. Gelladepuffer [25% (w/v) Ficoll Typ 400; 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol] versetzt und durch Unterschichten in die Taschen des Gels transferiert. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Stromstärke von 80 mA. Die nach ihrer

Größe aufgetrennten DNA-Fragmente werden im UV-Licht sichtbar gemacht und gegebenenfalls fotografiert.

#### 3.4.5 *Isolierung von DNA aus Agarosegelen*

Zur Isolierung eines bestimmten DNA-Fragmentes aus einem durch Restriktions-spaltung erhaltenen DNA-Fragmentegemisch wird das Gemisch in einem Agarosegel entsprechender Konzentration aufgetrennt. Nach der Elektrophorese legt man das Gel mindestens 10 min in deionisiertes Wasser bevor man die, im UV-Licht sichtbar gemachte gewünschte Bande ausschneidet. Das Gelstückchen, das die entsprechende Bande enthält, wird in ein zur Hälfte mit Plastikwolle gefülltes, unten durchbohrtes 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses stellt man in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß. Durch Zentrifugation (3000 g, 10 min) gelangt die zu isolierende DNA aus dem Gelstückchen in das untere Reaktionsgefäß, während die Agarose durch die Plastikwolle zurückgehalten wird. Die auf diese Weise isolierte DNA wird direkt in Ligationsreaktionen (vgl. 3.4.6) eingesetzt.

#### 3.4.6 *Ligation von DNA*

DNA-Fragmente, die in einer Ligations-Reaktion verwendet werden sollen, werden grundsätzlich in einem Agarosegel entsprechender Konzentration gereinigt. Die aus einem Agarosegel eluierte DNA (vgl. 3.4.5) wird direkt, ohne zusätzliche Behandlung, zur Ligation verwendet. 10 µl Fragment-Lösung (bei Mehr-Fragment-Ligationen entsprechende Mengen der einzelnen Fragmente) werden in einer 20 µl Reaktion mit 3 µl Vektor-Lösung in Gegenwart von 66 mM Tris-HCl pH 7,6; 6,6 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT; 66 µM ATP; 6% (w/v) PEG 6000 und 1 E T4-DNA Ligase 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 100 µl kompetente Bakterien mit 10 µl des Ligationsansatzes transformiert (vgl. 3.4.8).

#### 3.4.7 *Präparation kompetenter Bakterien*

Eine 100 ml-Kultur des entsprechenden E. coli-Stammes wird bei 37 °C geschüttelt, bis die Bakteriensuspension eine A<sub>550</sub> von 0.3 erreicht hat. Die Kultur wird im Eisbad abgekühlt und die Bakterien durch Zentrifugation (4000 g, 10 min, 4 °C) sedimentiert. Die Bakterien werden anschließend mit 20 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> (4 °C) gewaschen, erneut sedimentiert (4000 g, 5 min, 4 °C), in 10 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> (4 °C) resuspendiert und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (4000 g, 5 min, 4 °C) wird das Bakteriensediment in 2,5 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>/15% Glycerin (4 °C) aufgenommen und die Zellsuspension in 100 µl-Portionen in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Die kompetenten Bakterien werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.4.8 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Man läßt 100 µl kompetente Bakterien auf Eis auftauen, mischt diese mit der Plasmid-DNA (500 ng oder weniger ungespaltene Plasmid-DNA beziehungsweise 10 µl eines Ligationsansatzes) und inkubiert mindestens 30 min bei 0 °C. Anschließend wird der Transformationsansatz 90 s auf 42 °C erwärmt und wieder auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wird die Bakteriensuspension 1 h bei 37 °C inkubiert. Bei der Transformation mit ungespaltenem Plasmid streicht man 50 µl des Transformationsansatzes auf einer Selektions-Agarplatte [1,5% (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium; 100 µg/ml Ampicillin] aus. Im Fall der Transformation mit ligierter Plasmid-DNA werden die Bakterien zunächst durch Zentrifugation (4000 g, 5 min) sedimentiert. 800 µl des Überstandes werden verworfen, die Bakterien in den verbleibenden 100 µl Medium resuspendiert und der gesamte Transformationsansatz auf einer Selektions-Agarplatte ausgestrichen. Man läßt die Bakteriensuspension auf den Platten eintrocknen, bevor man diese 12-16 h bei 37 °C inkubiert.

LB-Medium: 10 g Bacto Trypton  
 5 g Bacto Hefeextrakt  
 10 g NaCl  
 ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

### 3.4.9 Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979)

Ampicillinresistente Bakterienkolonien werden von der Agarplatte in Kulturröhrchen mit 2 ml TB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) abgeimpft und 5-20 h bei 37 °C geschüttelt. Man überführt 1,5 ml der Kulturen in Eppendorf-Reaktionsgefäße und sedimentiert die Bakterien durch Zentrifugation (11000 g, 10 s). Man verwirft den Überstand bis auf einen Rest von 100 µl, in welchem man die Bakterien wieder resuspendiert. Die Zellen werden nach Zugabe von 200 µl frisch angesetzter, alkalischer SDS-Lösung [0,2 N NaOH; 1% (w/v) SDS] und vorsichtigem Mischen 2 min lysiert. Man gibt 150 µl 5 M KOAc pH 4,8 zu, mischt vorsichtig und inkubiert das Bakterienlysat 2 min auf Eis. Die chromosomale Bakterien-DNA, sowie unlösliche Zellbestandteile werden durch Zentrifugation (17000 g, 5 min) abgetrennt. Der Überstand wird in einem frischen Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 Vol. Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (50:49:1) extrahiert und zur Phasentrennung zentrifugiert (11000 g, 2 min). Plasmid-DNA und bakterielle RNA (wäßrige Phase) werden in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 2 Vol. Ethanol 2 min präzipitiert, durch Zentrifugation (11000 g, 2 min) sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen und im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Das Nukleinsäure-Sediment wird in 50 µl RNaseA (0,2 µg/µl) gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

TB-Medium: 12 g Bacto Trypton  
 24 g Bacto Hefeextrakt  
 10 g NaCl  
 ad 900 ml H<sub>2</sub>O

+ 100 ml 170 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 720 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Die beiden Lösungen werden nach getrennter Sterilisation vereinigt.

#### 3.4.10 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (modifiziert nach Kondo et al., 1991)

Ampicillinresistente Bakterien werden in 100 ml-Erlenmeyerkolben in 10 ml TB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) 10-16 h bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien werden durch Zentrifugation (10000 g, 5 min, 4 °C) sedimentiert, in 1 ml Lysozymlösung [4 mg/ml Lysozym; 50 mM Glucose; 10 mM EDTA pH 8,0; 25 mM Tris-HCl pH 8,0] resuspendiert und 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden nach Zugabe von 2 ml frisch angesetzter alkalischer SDS-Lösung [0,2 N NaOH; 1% (w/v) SDS] und vorsichtigem Mischen 5 min lysiert. Man gibt 1,5 ml 5 M KOAc pH 4,8 zu, mischt kräftig und inkubiert das Bakterienlysat 10 min bei 0 °C. Ein Teil der chromosomalen Bakterien-DNA, sowie unlösliche Zellbestandteile werden durch Zentrifugation (17000 g, 10 min, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wird mit 0,66 Vol. 2-Propanol versetzt, gut gemischt und zur Sedimentation der Nucleinsäuren zentrifugiert (17000 g, 10 min, 4 °C). Das Sediment wird 10 min an der Luft getrocknet und anschließend in 200 µl 2xTE [20 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM EDTA pH 8,0] gelöst. Die Nucleinsäurelösung wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Vol. 8 M LiCl und 2 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt, gut gemischt und 5 min lichtgeschützt bei 0 °C inkubiert. Chromosomale DNA, ein Teil der RNA und Proteine werden durch Zentrifugation (11000 g, 5 min) abgetrennt. Der Überstand wird zur Entfernung des Ethidiumbromids zweimal mit 1-Butanol extrahiert und jeweils zur Phasentrennung zentrifugiert. Die Plasmid-DNA und bakterielle RNA (untere Phase) werden in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 2 Vol. Ethanol präzipitiert, durch Zentrifugation (11000 g, 5 min) sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen und im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Das Nucleinsäure-Sediment wird in 100 µl RNaseA (0,1 µg/µl) in 2xTE gelöst und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend extrahiert man die Plasmid-DNA-Lösung je einmal mit 1 Vol. Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (50:49:1) und mit 1 Vol. Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) und zentrifugiert (11000 g, 2 min) jeweils zur Phasentrennung. Die Plasmid-DNA (wäßrige Phase) wird erneut in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in Gegenwart von 0,3 M NaOAc mit 2 Vol. Ethanol präzipitiert, durch Zentrifugation (11000 g, 5 min) sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen und im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Die Plasmid-DNA wird in 100 µl 2xTE gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

#### 3.4.11 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen

Zur genauen Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration wird die Absorption von UV-Strahlung der Wellenlängen 260 und 280 nm durch eine Nucleinsäurelösung, gegen das jeweilige Lösungsmittel, in einem Spektralphotometer (SPEKOL UV VIS; Carl Zeiss, Jena) gemessen. Eine  $A_{260}$ -Einheit entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml, einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml und einer Einzelstrang-Oligonukleotid-Konzentration von 20 µg/ml. Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm ist ein Indikator für die Reinheit einer Nucleinsäurelösung. Es nimmt bei optimaler Reinheit von DNA den Wert 1,8 und von RNA den Wert 2,0 an.

### 3.4.12 Enzymatische Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen werden nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger und Kollegen (1977) durchgeführt. Dazu werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 10 µg der zu sequenzierenden, zirkulären Plasmid-DNA in 200 µl Denaturierungspuffer [0,2 M NaOH; 0,2 mM EDTA] 15 min bei 37 °C denaturiert. Die DNA wird anschließend in Gegenwart von 0,2 M NH<sub>4</sub>OAc pH 4,5 mit 2 Vol. Ethanol 1 h bei -80 °C präzipitiert, durch Zentrifugation sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die denaturierte DNA wird in 7 µl deionisiertem Wasser gelöst und mit 2 µl 5 x Sequenzierungspuffer [200 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 250 mM NaCl] und 1 µl Sequenzierprimer (0,5 µM) versetzt, 3 min auf 70 °C erhitzt und langsam abgekühlt. Danach gibt man 2 µl Markierungslösung [1,5 µM dGTP; 1,5 µM dCTP; 1,5 µM TTP; 10% DMSO], 1 µl 0,1 M DTT, 0,5 µl α<sup>35</sup>S-dATP und 2 µl Sequenase (1,5 E/µl) zu und inkubiert die Reaktion 5 min bei Raumtemperatur. Je 3,5 µl dieser Markierungsreaktion werden anschließend in vier, auf 37 °C vorgewärmte Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert, in die bereits 2,5 µl der entsprechenden Stopplösung [z.B. Stopplösung A: 80 µM dATP; 80 µM dCTP; 80 µM dGTP; 80 µM TTP; 50 mM NaCl; 10% DMSO; 8 µM ddATP; Stopplösungen C, G und T analog dazu] vorgelegt worden sind, und erneut bei 37 °C inkubiert. Nach fünf Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von 4 µl Gelladepuffer [95% (w/v) Formamid; 20 mM EDTA; 0,05% (w/v) Bromphenolblau; 0,05% (w/v) Xylencyanol] gestoppt. Das DNA-Fragmentegemisch wird zur Denaturierung 10 min auf 75 °C erhitzt und in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (vgl. 3.4.13) elektrophoretisch aufgetrennt.

### 3.4.13 Analyse von DNA in denaturierenden Polyacrylamidgelen

Um DNA-Fragmentegemische, die im Verlauf von Sequenzierreaktionen entstanden sind, ihrer Größe nach aufzutrennen, werden denaturierende 6% Polyacrylamidgele verwendet. Um die DNA-Fragmente in denaturiertem Zustand zu halten, werden Sequenzgele normalerweise mit einer hohen Harnstoffkonzentration (8 M) hergestellt. DNA-Sequenzgele sind typischerweise sehr dünn (0,4 mm) und sehr lang (40 cm). Die Elektrophorese wird bei einer hohen Leistung (30 W) durchgeführt, um eine Temperatur von 45-50 °C aufrechtzuerhalten. Die Elektrophoresedauer richtet sich nach dem Ausmaß der gewünschten Sequenzinformation und beträgt zwischen 1,5 und 4,5 h. 40 ml einer Gellösung [6% (w/v) Acrylamid; 0,16% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid; 8 M Harnstoff in TBE pH 8,3 (90 mM Tris; 90 mM Borat; 1,25 mM EDTA)] werden mit 300 µl 10% (w/v) APS und 30 µl TEMED versetzt und nach vorsichtigem Mischen zwischen zwei, durch 0,4 mm dicke Abstandhalter voneinander getrennte Glasplatten gegossen. Nach Einsetzen eines Haifischkamms läßt man das Gel in horizontaler Lage polymerisieren. Nach erfolgter Polymerisation spannt man das Gel in eine Vertikalgelapparatur ein, füllt oberes und unteres Pufferreservoir mit TBE und dreht den Haifischkamm um. Nach einem 0,5 h Vorlauf des Gels bei einer Leistung von 30 W transferiert man die Proben in die Taschen. Nach jeweils 1,5 h wechselt man den Elektrophoresepuffer in beiden Reservoirs. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die beiden Glasplatten voneinander getrennt, das Gel auf 3MM Papier aufgezogen und auf

einem Geltrockner (BioRad, München) getrocknet. Die Exposition erfolgt bei Raumtemperatur.

#### 3.4.14 Isolierung von gesamtzellulärer RNA aus eukaryontischen Zellen

10<sup>7</sup> Zellen werden in 2 ml Guanidin-Lösung [5 M Guanidin-Thiocyanat; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA pH 8,0; 140 mM 2-Mercaptoethanol] mechanisch zerkleinert (Ultraturrax; Janke & Kunkel, Staufen). Nach Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile durch Zentrifugation (10000 g, 10 min, 12 °C) wird der Überstand mit 1 Vol. 20% (w/v) Sarkosyl versetzt und 2 min auf 65 °C erhitzt. Die Probe wird auf 2,5 ml 5,7 M CsCl aufgeschichtet und in einem Ausschwingrotor zentrifugiert (120000 g, 12 h, 18 °C). Nach der Zentrifugation entfernt man den Überstand möglichst quantitativ. Die sedimentierte RNA wird in 200 µl deionisiertem Wasser gelöst, phenolextrahiert und in Gegenwart von 2 M NH<sub>4</sub>OAc mit Ethanol präzipitiert. Die RNA wird durch Zentrifugation (11000 g, 10 min, 4 °C) sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen, im Wasserstrahlvakuum getrocknet, in deionisiertem Wasser gelöst und bei -80 °C aufbewahrt.

#### 3.4.15 Reverse Transkription (Erststrang-cDNA-Synthese)

5 µg gesamtzelluläre RNA (vgl. 3.4.14) werden zusammen mit 25 pmol Erststrang-cDNA-Synthese-Primer in einem Gesamtvolumen von 10 µl 5 min auf 70 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur setzt man 4 µl fünffach konzentrierten AMV-Reaktionspuffer [0,25 M Tris-HCl pH 8,3; 0,25 M NaCl; 40 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT], 4 µl dNTP-Mix [5 mM dATP; 5 mM dCTP; 5 mM dGTP; 5 mM TTP], 1 µl RNase-Inhibitor (34 E/µl) und 1 µl AMV-Reverse Transkriptase (25 E/µl) zu und inkubiert die Reaktion 1 h bei 42 °C.

#### 3.4.16 Amplifikation von DNA (Polymerase-Kettenreaktion)

5 ng Plasmid-DNA oder 1 µl einer Erststrang-cDNA-Synthese (vgl. 3.4.15) werden in Gegenwart von 25 mM Glycin-KOH pH 9,3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0,2 mM dNTPs, jeweils 50 pmol der beiden Amplifikationsprimer und 2 E thermostabiler DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µl amplifiziert (Gene Amp PCR-System 9600, Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA). Die Reaktionsbedingungen [die Anzahl der Segmente (Denaturierung-Hybridisierung-Synthese oder nur Denaturierung-Synthese), die Dauer der einzelnen Segmente, die Temperatur im Hybridisierungssegment und die Anzahl der Zyklen] richten sich jeweils nach der Länge und der Abundanz des zu amplifizierenden DNA-Fragments sowie der Schmelztemperatur ( $T_m$  für „melting temperature“) der Amplifikationsprimer und sind empirisch zu ermitteln. Typischerweise denaturiert man 10 s bei 94 °C, hybridisiert 10 s bei einer Temperatur, die 3-5 °C unter der errechneten Schmelztemperatur der Amplifikationsprimer liegt und synthetisiert bei 72 °C (10 s pro 1000bp des zu erwartenden Amplifikationsproduktes). Die Anzahl der Zyklen sollte bei Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase ohne Korrekturaktivität

möglichst niedrig gewählt werden (20-30). Als Anhaltspunkt zur Berechnung der Schmelztemperatur von Amplifikationsprimern gilt folgende Gleichung:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = \frac{(4 \cdot \text{G/C} + 2 \cdot \text{A/T}) \cdot 20}{n}$$

wobei: G/C = Anzahl der hybridisierenden G/C-Basenpaare

A/T = Anzahl der hybridisierenden A/T-Basenpaare

n = Gesamtzahl der hybridisierenden Basenpaare

#### 3.4.17 Transkription *in vitro*

Die zu transkribierende cDNA wird in SP6-Orientierung in das bakterielle Transkriptionsplasmid pGEM-1 kloniert und 2 µg des entstandenen Plasmids mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease linearisiert (vgl. 3.4.1). Nach Phenolextraktion, Ethanolpräzipitation und Zentrifugation wird das getrocknete, linearisierte Plasmid in 27 µl deionisiertem Wasser gelöst. 5 µl werden in einem Agarosegel geeigneter Konzentration analysiert. Die verbleibenden 22 µl werden in einem Gesamtvolumen von 50 µl in Gegenwart von 40 mM Tris-HCl pH 7,9, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 4 mM Spermidin, 1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM UTP, 0,1 mM GTP, 1 mM m<sup>7</sup>Gppp(5')GTP ("Cap"-Struktur-Analog), 40 E RNase-Inhibitor und 20 E SP6-RNA-Polymerase bei 40 °C inkubiert. Nach 1 h entnimmt man der Reaktion 5 µl zur Analyse in einem Agarosegel, setzt 20 E frisches Enzym zu und inkubiert erneut 1 h bei 40 °C. Die *in vitro* synthetisierte RNA wird phenolextrahiert und in Gegenwart von 2 M NH<sub>4</sub>OAc und 20 ng/ml Hefe-tRNA (als Fällungshilfe) mit 2,5 Vol. Ethanol präzipitiert. Die RNA wird mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl deionisiertem Wasser gelöst.

#### 3.4.18 Translation *in vitro*

Man mischt 35 µl Lysat aus Kaninchenretikulozyten, 1 µl Aminosäuremix (enthält alle Aminosäuren außer Methionin in einer Konzentration von 1 mM), 4 µl L-[<sup>35</sup>S]Methionin, 1 µl der *in vitro* synthetisierten RNA (vgl. 3.4.17) und 9 µl deionisiertes Wasser und inkubiert den Translationsansatz 1 h bei 25 °C.

#### 3.4.19 Fluorographie

Die Methode wird zum Nachweis von Proteinen angewandt, die mit einem radioaktiven Isotop schwacher Emissionsenergie markiert sind und allein durch Autoradiographie kaum nachweisbar wären (Bonner und Laskey, 1974). Ein SDS-Polyacrylamidgel (vgl. 3.4.27) wird zur Entwässerung dreimal 30 min in 10 Vol. DMSO unter sanftem Schütteln inkubiert. DMSO wird durch 10 Vol. 22% (w/v) PPO in DMSO ersetzt und das Gel in dieser Lösung 3 h geschwenkt. Die *in situ* Präzipitation des PPO

erfolgt während einstündiger Inkubation des Gels in deionisiertem Wasser, welches mehrfach gewechselt wird. Nach Trocknung auf 3MM Papier im Wasserstrahlvakuum wird dem Gel ein Röntgenfilm exponiert.

#### *3.4.20 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen*

Nachdem die Zellen durch Zentrifugation (250 g, 5 min) sedimentiert worden sind, werden sie in Einfriermedium (70% des jeweiligen Kulturmediums, 20% FKS, 10% DMSO) resuspendiert und auf eine geeignete Anzahl von Kryoröhrchen verteilt. Die Röhrchen werden anschließend sofort bei -80 °C eingefroren und gegebenenfalls zur Langzeitaufbewahrung unter flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen eukaryontischer Zellen wird ein entsprechendes Kryoröhrchen schnell auf 37 °C erwärmt und der Inhalt in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Unter ständigem Schütteln werden 10 ml Kulturmedium tropfenweise zugegeben (dies ist vor allem beim Auftauen von Lymphozyten wichtig; durch die allmähliche Verdünnung des DMSO wird den Zellen Zeit zum Ausgleich des osmotischen Drucks gegeben). Die Zellen werden anschließend durch Zentrifugation (250 g, 5 min) sedimentiert und ausgesät.

#### *3.4.21 Calciumphosphat-Transfektion eukaryontischer Zellen (für adhärent wachsende Zellen)*

10 µg der zu transfizierenden DNA werden in 240 µl deionisiertem Wasser gelöst. Man setzt 240 µl Puffer A [0,5 M CaCl<sub>2</sub>; 0,1 M HEPES pH 6,95 bei 25 °C] zu und mischt kräftig. Nach 10 min werden 480 µl Puffer B [0,28 M NaCl; 0,05 M HEPES; 0,75 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,75 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 6,95 bei 25 °C] zugegeben, erneut kräftig gemischt und 15 min inkubiert. Das Calciumphosphat-DNA-Präzipitat wird zu den Zellen (40% konfluent) gegeben, nachdem das Kulturmedium abgesaugt worden ist. Man gibt 10 ml frisches Medium zu und inkubiert 10 h bei normalen Zellkulturbedingungen. Danach entfernt man das Präzipitat und wäscht die Zellen zweimal mit Medium. Anschließend werden die Zellen 3 min in 3 ml 15% Glycerin in isotonischem HEPES-Puffer [0,28 M NaCl; 10 mM KCl; 0,05 M HEPES; 1,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 12 mM Glucose; pH 7,05 bei 25 °C] inkubiert. Das Glycerin wird sorgfältig, durch viermaliges Waschen mit Medium entfernt und die Zellen 24 h bei Normalbedingungen inkubiert. Man splittet die Zellen 1:10 und beginnt mit der Selektion in G418-haltigem Kulturmedium. Die zur Selektion erforderliche G418-Konzentration ist in Vorversuchen empirisch zu ermitteln. Resistente Kolonien erscheinen nach etwa acht Tagen.

#### *3.4.22 Ernten retroviraler Zellkulturüberstände und Infektion von eukaryontischen Zellen*

Verpackungszelllinien für Retroviren werden in 10 cm Schalen in selektivem Medium (1 mg/ml G418) kultiviert. Die Zellen werden in G418-freiem Medium gewaschen, zu etwa 50% Konfluenz in nichtselektivem Medium ausgesät und bei normalen Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach 24-48 h wird der Kulturüberstand filtriert (0,2 µm), zu

gleichen Teilen mit frischem Medium versetzt und in Gegenwart von 8 µg/ml Polybren auf die zu infizierenden Zellen (40% konfluent) gegeben. Nach 4-10 h werden die Zellen 1:1000 in selektives Medium (1 mg/ml G418) gesplittet. Resistente Klone erscheinen nach etwa acht Tagen. CTLs werden nach der Infektion durch Zentrifugation (250 g, 5 min) sedimentiert, in selektivem Medium (1 mg/ml G418) resuspendiert und in 100 µl Aliquoten (2 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml) auf Mikrotiterplatten mit 96 flachen Vertiefungen verteilt. Nach fünf Tagen pipettiert man in jede Vertiefung 100 µl frisches Selektionsmedium (1 mg/ml G418). Resistente Klone erscheinen nach etwa zwei Wochen.

#### 3.4.23 Retroviralvektor vermittelter Gentransfer in zytotoxische T-Zellen

Ein retrovirales Vektorkonstrukt wird durch Calciumphosphat-Transfektion (vgl. 3.4.21) der helfervirusfreien, ecotropen Verpackungszelllinie ΩE in das entsprechende Retrovirus umgewandelt. Transfektanten werden in Gegenwart von 1 mg/ml G418 für stabile Integration proviraler DNA selektioniert. Die amphotrope Verpackungszelllinie PA317 wird mit filtrierten Zellkulturüberständen von stabil transfizierten, polyklonalen, retrovirusproduzierenden Zellen in Gegenwart von 8 µg/ml Polybren infiziert (vgl. 3.4.22). Die Zellen werden gesplittet und Klone, die hohe Virustiter produzieren, in 1 mg/ml G418 enthaltendem Medium selektioniert. Die retroviralen Titer von Überständen dieser Verpackungslinien werden aufgrund ihrer Fähigkeit, G418-Resistenz auf NIH3T3-Zellen zu übertragen, ermittelt (vgl. 3.4.24). Die maximal erzielten, viralen Titer liegen bei einer Größenordnung von 10<sup>5</sup> G418-R KBE/ml (G418-resistente koloniebildende Einheiten). 10<sup>7</sup> Zellen der murinen CTL-Linie cl96 werden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Überständen dieser Verpackungslinien in Gegenwart von 8 µg/ml Polybren infiziert. Infizierte CTL-Klone werden durch Kultur in selektivem Medium (1 mg/ml G418) expandiert.

#### 3.4.24 Bestimmung des retroviralen Titers in Zellkulturüberständen von Verpackungszelllinien

NIH3T3 embryonale Mausfibroblasten werden am Tag vor der Infektion 1:10 bis 1:20 in 6 cm Petrischalen gesplittet. Die Zellen werden mit logarithmischen Verdünnungen des zu testenden Kulturüberstandes in Gegenwart von 8µg/ml Polybren infiziert. Nach 4 h erneuert man das Medium und inkubiert die Zellen 2-3 d bei normalen Zellkulturbedingungen. Die infizierten Zellen werden in verschiedenen Verdünnungen auf je zwei 10 cm Petrischalen in selektives Medium (1mg/ml G418) ausgesät und weitere 10 d kultiviert. Man zählt die Kolonien und ermittelt die Anzahl der G418 resistenten koloniebildenden Einheiten das zu testenden Kulturüberstandes als Maß für den retroviralen Titer nach folgender Gleichung:

$$\text{G418R-KBE/ml} = \frac{nc}{v \cdot rf \cdot fc}$$

wobei:           nc = Anzahl der Kolonien (Zählergebnis)

                  v = Volumen (in ml) des zu testenden Kulturüberstand, das zur Infektion eingesetzt wurde

- rf = Replikationsfaktor (Der Replikationsfaktor bereinigt die Berechnung des viralen Titers für die Anzahl der Zellteilungen, die zwar nach der viralen Integration, jedoch vor dem Transfer der Zellen in selektives Medium erfolgte. Der Replikationsfaktor kann durch einfaches Auszählen der Zellen auf separaten Petrischalen direkt vor der Infektion und direkt vor dem Transfer in selektives Medium ermittelt werden.)
- fc = Fraktion der infizierten Zellen, die ausgesät wurde

#### 3.4.25 Präparation von rekombinantem murinem Interleukin-2 und Bestimmung der IL-2 -Konzentration

Man kultiviert X63/IL-2 bei normalen Bedingungen bis mindestens 80% der Zellen tot sind (Trypanblau-Ausschluß). Die Zellen werden durch Zentrifugation (250 g, 5 min) sedimentiert, der Überstand filtersterilisiert (0,2 µm) und in geeigneten Aliquoten bei -20 °C aufbewahrt. Der IL-2-Gehalt der Überstände wird durch Titration an einer IL-2-abhängigen Zelllinie (z.B. cl96) im Vergleich zu einem kommerziellen IL-2-Standard ermittelt. Hierzu wird ein nichtradioaktiver Zellproliferationstest (Promega; Madison, WI, USA) verwendet. Der Versuch basiert auf der kolorimetrischen Quantifizierung der metabolischen Reduktion von MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylformazanbromid] durch mitochondriale Dehydrogenasen. Alle Versuchsanordnungen werden in dreifacher Ausführung auf einer Mikrotiterplatte mit 96 flachen Vertiefungen durchgeführt. Das Endvolumen in allen Vertiefungen beträgt 100 µl. Eine konstante Anzahl (10<sup>4</sup> Zellen pro Vertiefung) cl96-Zellen wird zu seriellen 1:2 Verdünnungen der IL-2-enthaltenden, konditionierten Zellkulturüberstände beziehungsweise des IL-2-Standards pipettiert und bei normalen Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach 48-72 h pipettiert man 15 µl Farbstofflösung [1% (w/v) MTT in PBS] in jede Vertiefung und inkubiert 4 h bei Normalbedingungen. Man gibt 100 µl Stopplösung (die genaue Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht angegeben; die Stopplösung enthält SDS, Essigsäure und N,N-Dimethylformamid) pro Vertiefung zu und solubilisiert, die bei der Reduktion von MTT gebildeten Formazan-Kristalle über Nacht bei 37 °C. Abschließend mißt man die Absorption von Licht der Wellenlänge 600 nm (A<sub>600</sub>) in den einzelnen Versuchsanordnungen in einem ELISA-Platten-Photometer (Titertek Multiskan PLUS MKII, Labsystems; Finnland). Die Absorption ist direkt proportional zur Proliferationsrate der Zellen und somit ein Maß für die IL-2- Konzentration im Medium. Man trägt jeweils die A<sub>600</sub> gegen die absolute eingesetzte Menge des IL-2-Standards oder gegen die Verdünnung des konditionierten X63/IL-2-Kulturüberstandes auf. Anhand der Kurven kann man die IL-2-Konzentration im X63/IL-2-Überstand abschätzen.

#### 3.4.26 Lyse eukaryontischer Zellen

Man versetzt 10<sup>7</sup> lebende (Trypanblau-Ausschluß) Zellen mit 0,5 ml NP40 Lysepuffer [1% NP40; 150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM EDTA pH 8,0; 1 mM PMSF; 10 mM Iodacetamid; 80 µg/ml Aprotinin; 50 µg/ml Leupeptin; 4 µg/ml Pepstatin] und rotiert 1 h bei 4 °C. Das Lysat wird zentrifugiert (11000 g, 15 min, 4 °C) und der kernfreie Überstand vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Hinweise: PMSF wird in einer Konzentration von 100 mM in 2-Propanol oder Aceton gelöst und ist in dieser Form längere Zeit bei Raumtemperatur stabil. Pepstatin wird in einer Konzentration von 1 mg/ml in Ethanol gelöst.

#### 3.4.27 Analyse von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Proteine werden grundsätzlich mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese analysiert (Laemmli, 1970). Dabei werden sie zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und in einem, sich direkt anschließenden, höherprozentigen Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Die Trenngel-Lösung [6-12% (w/v) Acrylamid; 0,16-0,32% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) APS; 0,5% TEMED] wird nach vorsichtigem Mischen zwischen zwei, durch 0,75-1,5 mm dicke Abstandhalter voneinander getrennte Glasplatten gegossen. Nach Überschichten mit wassergesättigtem 1-Butanol läßt man das Gel in vertikaler Lage polymerisieren. Nach erfolgter Polymerisation entfernt man das 1-Butanol und gießt die Sammelgel-Lösung [4% (w/v) Acrylamid; 0,1% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) APS; 0,1% TEMED] direkt auf das Trenngel. Nach Einsetzen eines entsprechenden Taschenformers läßt man das Sammelgel in vertikaler Lage polymerisieren. Anschließend wird das Gel in eine Vertikalgelapparatur eingespannt und die Reservoirs mit Elektrophorese-Puffer [25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS] gefüllt. Die Proben werden in 1 Vol. reduzierendem [0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 2% (w/v) SDS; 20% Glycerin; 0,02% (w/v) Bromphenolblau; 0,1 M DTT] oder nichtreduzierendem [dito ohne DTT] Probenpuffer versetzt, zum Denaturieren 5 min auf 100 °C erhitzt und nach Entfernen des Taschenformers in die Taschen des Gels transferiert. Die Elektrophorese erfolgt in der Regel bei einer Stromstärke von 20 mA. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die beiden Glasplatten voneinander getrennt, und die Proteine entweder mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt (vgl. 3.4.28) oder auf eine PVDF-Membran übertragen (vgl. 3.4.34).

#### 3.4.28 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Proteine, die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt worden sind, werden durch Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wird das Gel 15 min in Färbelösung [0,2% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R250; 50% Methanol, 7,5% Essigsäure; 0,5 ml pro cm<sup>2</sup> Gelfläche] und danach in Entfärbelösung [50% Methanol, 7,5% Essigsäure] inkubiert, bis die Protein-Banden sichtbar werden. Anschließend wird das Gel im Wasserstrahlvakuum getrocknet.

#### 3.4.29 Immunpräzipitation

Immunpräzipitationen werden grundsätzlich in einem Mindestvolumen von 500 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit Deckelverriegelung durchgeführt. Man setzt jeder Lösung, aus der etwas präzipitiert werden soll, 40 µl Protein-G-Plus/Protein-A-Agarose, die in

NET-TA [150 mM NaCl; 5 mM EDTA pH 8,0; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5% Triton X-100; 0,05% NaN<sub>3</sub>; 1mg/ml BSA] äquilibriert worden ist, zu und rotiert mindestens 3 h bei 4 °C. Nach kurzer Zentrifugation überführt man den Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß, gibt 2 µg des entsprechenden Antikörpers zu und rotiert erneut 3 h bei 4 °C. Die Immunkomplexe werden mit 40 µl Protein-G-Plus/Protein-A-Agarose (in NET-TA equilibriert) 1 h bei 4 °C präzipitiert. Nach kurzer Zentrifugation verwirft man den Überstand und wäscht die Präzipitate dreimal mit je 1 ml eiskaltem NET-TAN (NET-TA mit zusätzlich 0,5 M NaCl) und einmal mit 1 ml eiskaltem NET-T (NET-TA ohne BSA), zentrifugiert und verwirft den Überstand. Die Immunpräzipitate werden in reduzierendem oder nichtreduzierendem Probenpuffer (vgl. 3.4.27) 5 min auf 100 °C erhitzt und in einem entsprechend konzentrierten SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

### 3.4.30 Produktion und Reinigung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen

Eukaryontische Proteine können durch Fusion mit dem Protein Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* in großen Mengen und in löslicher Form in Bakterien exprimiert werden (Smith und Johnson, 1988). Die Affinität von GST für Glutathion ermöglicht eine milde Reinigung der Fusionsproteine aus bakteriellen Rohlysaten mittels Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion. Die cDNA des zu exprimierenden Proteins wird dazu in eines der drei pGEX-Plasmide (das Leseraster der Insertionsstelle ist jeweils um ein Nukleotid verschoben - damit stehen alle drei Leseraster zur Verfügung) an das 3'-Ende des GST-Gens fusioniert. Eine stationäre Kultur des entsprechend transformierten Bakterienstammes wird 1:10 mit LB-Medium/0,4% (w/v) Glucose verdünnt und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach 1 h werden die Bakterien durch 0,1 mM IPTG (Endkonzentration in der Kultur) zur Expression des Fusionsproteins induziert und weitere 4 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend werden die Bakterien durch Zentrifugation (3000 g, 10 min, 4 °C) sedimentiert, in PBS (1% des Kulturvolumens) suspendiert und durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen in Gegenwart von 0,1 mg/ml Lysozym lysiert. Die bakterielle DNA wird im Ultraschall mechanisch geschert. Man setzt Triton X-100 zu (Endkonzentration 1%) und sedimentiert unlösliche Bakterienbestandteile durch Zentrifugation (10000 g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wird in Gegenwart gequollener Glutathion-Agarose (die Menge an Glutathion-Agarose ist für die jeweilige Anwendung empirisch zu ermitteln; theoretisch hat 1 ml gequollene Glutathion-Agarose Bindungskapazität für 8 mg Fusionsprotein) 10 min bei Raumtemperatur rotiert. Die Glutathion-Agarose mit dem gebundenen Fusionsprotein wird in eine Säule transferiert und mit dem Zehnfachen des Säulenvolumens an PBS gewaschen. Das Fusionsprotein wird mit 50 mM Tris-HCl pH 8,0 in Gegenwart von 5 mM reduziertem Glutathion fraktioniert von der Säule eluiert. Die Anwesenheit des Fusionsproteins in den einzelnen Fraktionen wird durch Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel geeigneter Konzentration (vgl. 3.4.27) mit anschließender Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (vgl. 3.4.28) überprüft. Fraktionen mit hohem Gehalt an Fusionsprotein werden vereinigt und gegen PBS dialysiert. Da die Präparationen nicht rein sind, (Verunreinigung durch bakterielle Proteine und Degradationsprodukte) gibt eine kolorimetrische Proteinbestimmung keinen Aufschluß über die tatsächliche Konzentration des Fusionsproteins in der Präparation. Diese wird in einem

Coomassie-Brilliant-Blau-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel, auf dem parallel zum Fusionsprotein definierte Mengen BSA elektrophoretisiert werden, durch Vergleich der Bandenintensitäten abgeschätzt.

#### 3.4.31 Produktion von FLAG-Fusionsproteinen

FLAG bezeichnet eine acht Aminosäuren lange (DYKDDDDK), artifizielle, antigene Determinante, die vom mAkM1 erkannt wird (Prickett et al., 1989). MAKM1 kann sowohl zum Nachweis als auch zur milden Reinigung von FLAG-Fusionsproteinen verwendet werden. Das FLAG-Epitop muß dazu am N-Terminus des Fusionsproteins lokalisiert sein. Die Bindung von mAkM1 an das FLAG-Epitop ist  $\text{Ca}^{++}$ -abhängig und kann sehr einfach durch Entfernung der  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen (beispielsweise durch EDTA) gelöst werden. Die cDNA des zu exprimierenden Proteins wird an das 3'-Ende der kodierenden Sequenz für das FLAG-Peptid im pFLAG-1-Vektor kloniert. 50 ml einer stationären Kultur des entsprechend transformierten Bakterienstammes werden mit 950 ml LB-Medium/0,4% (w/v) Glucose verdünnt und bis zu einer optischen Dichte ( $\text{OD}_{550}$ ) von 0,3 unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien werden mit 1 mM IPTG (Endkonzentration in der Kultur) zur Expression des Fusionsproteins induziert und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend werden die Bakterien wie unter 3.4.30 beschrieben aufgebrochen. Unlösliche Bakterienbestandteile werden durch Zentrifugation (100000 g, 30 min, 4 °C) sedimentiert. Das so erhaltene Rohlysat (Überstand) wird auf die Anwesenheit des entsprechenden FLAG-Fusionsproteins untersucht.

#### 3.4.32 Kopräzipitation von scFv- und GST-Fusionsproteinen mit Glutathion-Agarose

Zur qualitativen Bestimmung der Affinität von scFv-Fusionsproteinen für ihr korrespondierendes Epitop werden Rohlysate eukaryontischer (vgl. 3.4.26) oder bakterieller (vgl. 3.4.31) scFv-exprimierender Zellen mit GST oder GST-Fusionsproteinen in einem Volumen von mindestens 500 µl 4 h bei 4 °C rotiert. Die Lysate werden vorher mit 40 µl Glutathion-Agarose 3 h bei 4 °C vorgereinigt. Immunkomplexe werden mit 40 µl Glutathion-Agarose 1 h bei 4 °C präzipitiert. Anschließend zentrifugiert man kurz, verwirft den Überstand und wäscht die Präzipitate dreimal mit PBS. Die Immunpräzipitate werden in 50 µl reduzierendem Probenpuffer (vgl. 3.4.27) 5 min auf 100 °C erhitzt und in einem entsprechend konzentrierten SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Präzipitierte scFv-Fusionsproteine werden nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit einem entsprechenden Antikörper (vgl. 3.4.34) sichtbar gemacht.

#### 3.4.33 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

$2 \times 10^7$  lebende (Trypanblau-Ausschluß) Zellen werden viermal in PBS- $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  gewaschen, in 1,5 ml 0,5 µg/ml Sulfo-NHS-Biotin in PBS- $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  resuspendiert und 20 min bei 4 °C rotiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 ml 25 mM L-Lysin in PBS-

Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> gestoppt. Anschließend wäscht man die Zellen dreimal mit 10 ml 25 mM L-Lysin in PBS-Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>.

#### 3.4.34 Immunoblot-Analyse von Proteinen

Proteine, die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt worden sind, werden in einer Na<sup>+</sup>B<sup>-</sup>Transferzelle (Trans-Blot; BioRad, München) auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wird das Gel zusammen mit einer, in Methanol aktivierten PVDF-Membran luftblasenfrei zwischen mehrere Lagen Transferpuffer [20 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,01% (w/v) SDS; 20% Methanol] getränktes 3MM Papier gelegt und in die Transferzelle eingespannt. Die Zelle wird mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgt entweder über Nacht mit 60 mA bei Raumtemperatur oder 2 h mit 600 mA bei 4 °C. Nach erfolgtem Transfer wird die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1 h in 5% (w/v) fettfreier Milch in PBS (0,1 ml pro cm<sup>2</sup> Membranfläche) geschwenkt und anschließend 1 h mit dem Primärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen oder einer empirisch ermittelten Verdünnung) in 1% (w/v) fettfreier Milch in PBS/0,4% Tween 20 (0,1 ml pro cm<sup>2</sup> Membranfläche) inkubiert. Die Membran wird viermal 10 min in PBS/0,4% Tween 20 (0,5 ml pro cm<sup>2</sup> Membranfläche) gewaschen und danach eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung) in 1% (w/v) fettfreier Milch in PBS/0,4% Tween 20 (0,1 ml pro cm<sup>2</sup> Membranfläche) inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschen in PBS/0,4% Tween 20 (0,1 ml pro cm<sup>2</sup> Membranfläche) werden Proteine, die vom Primärantikörper erkannt worden sind, sichtbar gemacht. Das Detektionsverfahren richtet sich nach dem verwendeten Sekundärreagenz. Bei Verwendung eines Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörpers oder Streptavidin [biotinylierte Proteine (vgl. 3.4.33) werden mit einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat detektiert] wird die Membran 1 min mit einer 1:1 Mischung der beiden ECL-Lösungen (2 ml pro dm<sup>2</sup> Membranfläche; Amersham Buchler, Braunschweig) überschichtet. Nach Entfernung überschüssiger Flüssigkeit wird der Membran ein Röntgenfilm exponiert. Bei Verwendung eines, an alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörpers wird die Membran kurz in Phosphatasepuffer [0,1 M Tris-HCl pH 9,5; 0,1 M NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>] geschwenkt und anschließend in 165 ng/ml BCIP, 330 ng/ml NBT in Phosphatasepuffer (0,2 ml pro cm<sup>2</sup> Membranfläche) inkubiert. Sobald die Proteinbanden gut sichtbar sind, wird die Reaktion durch den Zusatz von deionisiertem Wasser gestoppt und die Membran an der Luft getrocknet.

Hinweise: NBT-Stammlösung: 0,5 g NBT in 10 ml 70% DMF gelöst  
BCIP-Stammlösung: 0,5 g BCIP in 10 ml 100% DMF gelöst

Kurz vor der Verwendung mischt man 66 µl NBT-Stammlösung und 33 µl BCIP-Stammlösung mit 10 ml Phosphatase-Puffer.

#### 3.4.35 Fluoreszenzfärbung von Zellen für die Durchflußzytometrie

2-5 x 10<sup>5</sup> lebende (Trypanblau-Ausschluß) Zellen werden einmal in FACS-Puffer [3% FKS in PBS] gewaschen und anschließend 30 min mit dem Primärantikörper

(1-20 µg/ml in FACS-Puffer) auf Eis inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen in FACS-Puffer folgt eine 30 min Inkubation mit dem, an ein Fluorochrom gekoppelten Sekundärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung) in FACS-Puffer. Die Zellen werden anschließend zweimal in FACS-Puffer gewaschen, in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und im Durchflußzytometer (FACStar<sup>Plus</sup>™; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) analysiert.

#### 3.4.36 *In vitro* Zytotoxizitätstest

Das Potential der gentechnologisch veränderten T-Zellen, Zielzellen spezifisch zu lysieren, wurde mit Hilfe eines nichtradioaktiven Zytotoxizitätstests (Promega; Madison, WI, USA) bestimmt. Der Versuch basiert auf der kolorimetrischen Quantifizierung des stabilen zytoplasmatischen Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH), das bei der Lyse von Zielzellen ins Kulturmedium freigesetzt wird. Die gentechnologisch veränderten CTLs müssen mindestens eine Woche vor dem Versuch in G418-freies Medium überführt werden. Es empfiehlt sich, für den Zytotoxizitätstest phenolrotfreies Medium zu verwenden. Alle Versuchsanordnungen werden in dreifacher Ausführung auf einer Mikrotiterplatte mit 96 U-förmigen Vertiefungen durchgeführt. Das Endvolumen in allen Vertiefungen beträgt 100 µl. Eine konstante Anzahl Zielzellen (10<sup>4</sup> Zellen pro Vertiefung) wird mit seriellen 1:2 Verdünnungen von Effektorzellen gemischt (EXP). Die spontane LDH-Freisetzung der Zielzellen (SFZ) und die maximale LDH-Freisetzung nach Lyse der Zielzellen mit 0.8% Triton X-100 (MFZ; entspricht 100% LDH-Freisetzung der Zielzellen) müssen bestimmt werden. Um die Absorptionswerte in den experimentellen Versuchsanordnungen um die spontane LDH-Freisetzung der Effektorzellen korrigieren zu können, wird die LDH-Aktivität für jede verwendete Effektorzellkonzentration, in Abwesenheit von Zielzellen, bestimmt (SFE). Die Mikrotiterplatte wird 5 min bei 250 g zentrifugiert, um einen engen Zellkontakt zu gewährleisten. Nach 6 h Inkubation bei normalen Zellkulturbedingungen wird die Platte erneut 5 min bei 250 g zentrifugiert. 50 µl-Aliquote der zellfreien Überstände werden auf eine Mikrotiterplatte mit 96 flachen Vertiefungen transferiert. Man pipettiert 50 µl frisch angesetzte Substratlösung (die genaue Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht angegeben; die Substratlösung enthält NAD<sup>+</sup> und Milchsäure sowie ein Tetrazoliumsalz und das Enzym Diaphorase) in jede Vertiefung und inkubiert lichtgeschützt 30 min. Die Reaktion wird anschließend durch Zusatz von 50 µl 6% Essigsäure pro Vertiefung beendet und die Absorption von Licht der Wellenlänge 490 nm in den einzelnen Versuchsanordnungen in einem ELISA-Platten-Photometer (Titertek Multiskan PLUS MKII; Labsystems, Finnland) gemessen. Alle Absorptionswerte werden um die LDH-Aktivität im Kulturmedium korrigiert. Anhand der korrigierten Werte wird der Prozentsatz an spezifischer LDH-Freisetzung, der ein direktes Maß für den Prozentsatz der spezifischen Zielzellyse ist, nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{EXP-SFE-SFZ}}{\text{MFZ-SFZ}}$$

### 3.4.37 Adoptive Immunisierung von Nacktmäusen mit den gentechnologisch veränderten T-Zellen

Vorbemerkung: Um unnötiges Leiden zu vermeiden, wurden alle Tiere getötet, sobald ihre Tumore ein Volumen von 1.5 cm<sup>3</sup> erreicht hatten. Alle Tiere wurden auf die Anwesenheit von Lymphknoten- und Lungenmetastasen untersucht.

10<sup>5</sup> lebende (Trypanblau-Ausschluß) Tumorzellen werden in 100 µl PBS subkutan, auf den Rücken von Nacktmäusen injiziert. Tiere, die Tumore mit einem Volumen von 20-40 mm<sup>3</sup> tragen, werden verschiedenen Behandlungsprotokollen unterzogen. Zytotoxische T-Zellen (in 200 µl PBS) oder PBS allein werden intravenös, in eine der Schwanzvenen appliziert. Humanes rekombinantes IL-2 wird intraperitoneal appliziert. Das Tumorwachstum wird durch Messungen von Tumurlänge, -breite und -tiefe mit einer Schieblehre (Mitutoyo; Japan) verfolgt. Das Tumolvolumen wird nach folgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Tumolvolumen [mm}^3] &= \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3 \\ &= \text{Länge} \cdot \text{Breite} \cdot \text{Tiefe} \cdot 0,5238 \end{aligned}$$

### 3.3.38 Statistische Auswertung der Daten

arithmetisches Mittel:  $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$

Standardabweichung:  $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$

Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den durchschnittlichen Tumolvolumina von behandelten Versuchstiergruppen und Kontrollgruppen wurde mit dem Student t-Test berechnet. Die Verwendung des t-Tests basiert auf der Annahme, daß die Daten einer Gruppe von Beobachtungen normalverteilt sind. Wenn die Daten ungleichmäßig verteilt sind, hilft oft eine logarithmische Transformation der Rohdaten. Sind die Standardabweichungen bei größeren Werten größer, oder sind die Standardabweichungen größer als die Mittelwerte, weist dies stark auf eine ungleichmäßige Verteilung der Rohdaten hin. Nach der logarithmischen Transformation wird eine Normalverteilung der Daten plausibel, die Standardabweichungen werden ähnlich groß und die Anwendung des Student t-Tests ist somit erlaubt (Altman, 1991).

## 4. ERGEBNISSE

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer Strategie, Epitope, die vom varianten CD44-Exon v6 kodiert werden, als Ziele einer gerichteten Tumortherapie nutzbar zu machen. In der Einleitung wurde der Zusammenhang zwischen der Expression Exon v6-enthaltender CD44-Isoformen und der Metastasierungsfähigkeit eines Rattentumors beziehungsweise verschiedener menschlicher Krebsarten beschrieben. Das scFv-Fragment eines monoklonalen Antikörpers (mAk) gegen CD44v6 der Ratte sollte als Erkennungsfunktion für den Tumor benutzt und mit einer Effektorfunktion versehen werden. Der erste Ansatz zur Realisierung des Projektes war die Fusion des scFv-Fragments an eine verkürzte Form des Exotoxin A (ETA) aus *Pseudomonas aeruginosa*. Die Bindungsdomäne des Wildtyp-ETA wird dabei durch einen "single-chain"-Antikörper ersetzt. Dadurch wird das Wirtsspektrum des ETA auf CD44v6-positive Zellen eingeschränkt. Das Fusionsprotein sollte in großen Mengen in Bakterien herzustellen sowie einfach zu reinigen sein und mußte sowohl antigenerkennende (anti-CD44v6) als auch enzymatische (ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors-2) Funktion besitzen. Der zweite Ansatz beinhaltete die "Abrichtung" zytolytischer T-Lymphozyten auf CD44v6-positive Zielzellen. In diesem Fall mußte der gewählte Fusionspartner das scFv-Fragment in der CTL-Membran verankern und extrazelluläre Bindungsereignisse direkt an die Signaltransduktionsmaschinerie weiterleiten und damit zur Aktivierung der T-Zelle führen.

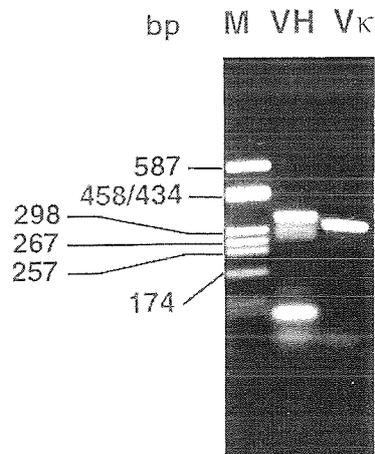
### 4.1 Klonierung der cDNAs der variablen Domänen der schweren und leichten Kette des mAk1.1ASML

Der monoklonale Antikörper 1.1ASML (IgG<sub>1</sub>/kappa) reagiert spezifisch mit einem Epitop in der membranproximalen extrazellulären Domäne des Ratten-CD44-Proteins, das vom varianten Exon 6 kodiert wird (Günthert et al., 1991). Das 1.1ASML-Epitop wurde bei der Firma Bender in Wien durch Kompletionsanalyse mit synthetischen Peptiden charakterisiert (Günther Adolf, persönliche Mitteilung). Es ist in der Aminosäuresequenz WFENEWQGKNPPT (Aminosäurepositionen 319 bis 331; Numerierung nach Günthert et al., 1991) enthalten. Zur Klonierung der cDNA des "single-chain"-Antikörpers wurde aus der mAk1.1ASML-produzierenden Hybridomzelle gesamtzelluläre RNA isoliert. Erststrang-cDNA-Synthese wurde unter Verwendung der Oligonukleotide MCH2 und CκA1FOR durchgeführt. MCH2 ist komplementär zu Position 121 bis 143 (Numerierung nach Honjo et al., 1979) der mRNA der Maus-Immunglobulin-γ1-Kette, CκA1FOR komplementär zu Position 3 bis 27 (Numerierung nach Hamlyn et al., 1978) der mRNA der konstanten Region der murinen κ-Kette. Die cDNAs der variablen Domänen von schwerer [VH(1.1ASML)] und leichter Kette [Vκ(1.1ASML)] wurden zwischen den Amplifikationsprimern VH1BACKHIND und VH1FOR beziehungsweise VκW1BACK und VκW1FOR mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. VH1FOR und VκW1FOR sind komplementär zur mRNA in den J-Segmenten von schwerer und leichter Kette, VH1BACKHIND und VκW1BACK komplementär zu den konservierten N-terminalen Bereichen der Erststrang-cDNAs von

schwerer und leichter Kette. Alle Primer kodieren an ihren 5'-Enden Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, wodurch die direkte Klonierung der Amplifikationsprodukte ermöglicht wird. Die Restriktionsschnittstellen wurden so gewählt, daß sie für Aminosäuren kodieren, die typisch für VH und V $\kappa$  sind. Außerdem sollten die Restriktionsschnittstellen möglichst nicht innerhalb der cDNAs von VH und V $\kappa$  vorkommen.

Ein typisches Ergebnis einer Amplifikation von cDNAs variabler Antikörperregionen ist in Abbildung 1 dargestellt. Die cDNAs haben die erwarteten Größen (338-398 bp für VH und 322-358 bp für V $\kappa$ ). Bei der zweiten Bande in der VH-Spur handelt es sich um ein Amplifikationsartefakt.

**Abbildung 1: Amplifikation der cDNAs der variablen Regionen von schwerer und leichter Kette des monoklonalen Antikörpers mAk1.1ASML.** Gesamtzelluläre RNA der mAk1.1ASML-produzierenden Hybridomzelllinie wurde in Gegenwart der Oligonukleotide MCH2 [für VH(1.1ASML)] und C $\kappa$ A1FOR [für V $\kappa$ (1.1ASML)] wie unter 3.4.15 beschrieben revers transkribiert. Die VH(1.1ASML)-cDNA wurde zwischen den Oligonukleotiden VH1BACKHIND und VH1FOR, die V $\kappa$ (1.1ASML)-cDNA zwischen V $\kappa$ W1BACK und V $\kappa$ W1FOR amplifiziert (Reaktionsvolumen 50  $\mu$ l, siehe 3.4.16). Die Amplifikationsbedingungen waren: für die VH-cDNA 30 Zyklen; 10 s 94 °C, 10 s 60 °C, 10 s 72 °C und für die V $\kappa$ -cDNA 30 Zyklen; 10 s 94 °C, 10 s 56 °C, 10 s 72 °C. Die Amplifikationsprodukte in 10% der PCR-Reaktion wurden in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Positionen und Fragmentlängen (bp) von DNA-Fragmenten bekannter Größe sind in Spur M indiziert.

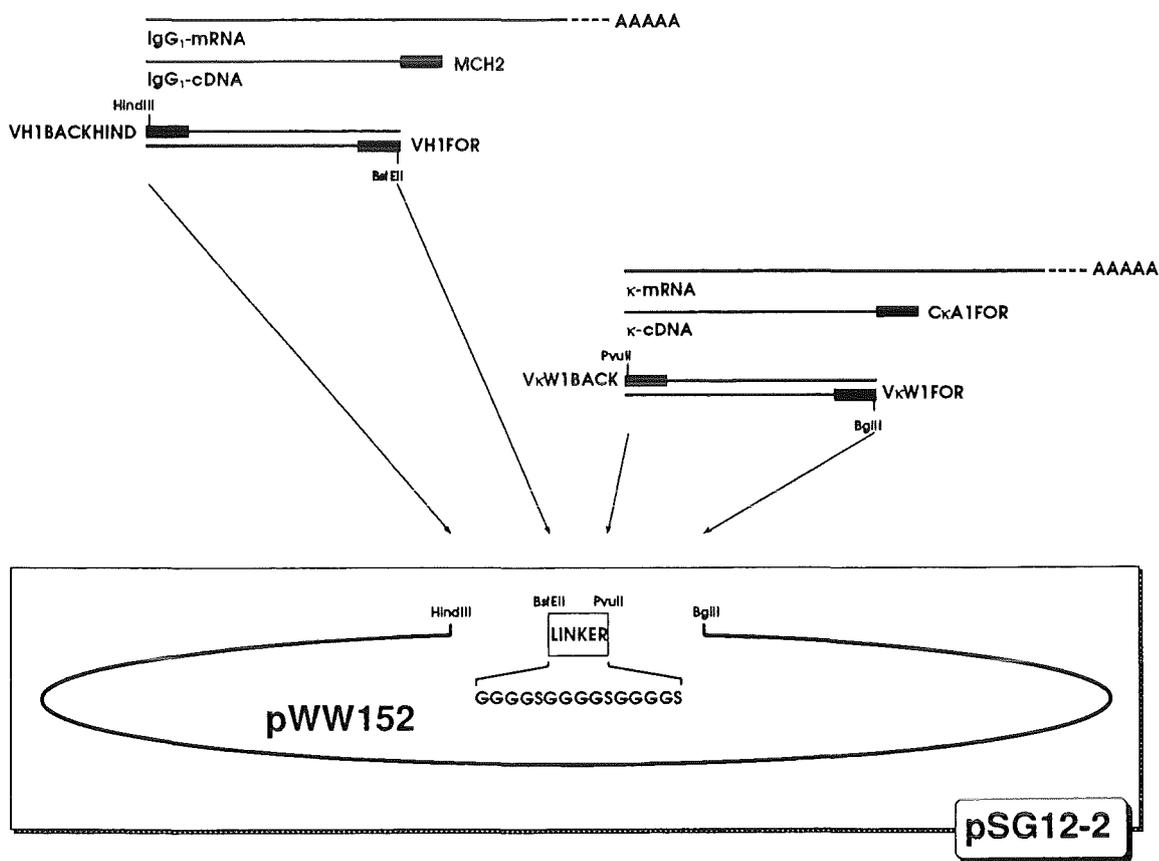


Zur Klonierung der VH- und V $\kappa$ -cDNAs des mAk1.1ASML wurde zunächst das Plasmid pWW15 (Wels et al., 1992a) modifiziert. Der pWW15-Vektor ist ein Derivat des bakteriellen Expressionsplasmids pBluescript KS<sup>+</sup>. pWW15 kodiert für ein flexibles, fünfzehn Aminosäuren langes Verbindungspeptid (GGGGGS)<sub>3</sub>. Dieses liegt im selben Leseraster wie die zu inserierenden VH(1.1ASML)- und V $\kappa$ (1.1ASML)-cDNAs. Zur Konstruktion von pWW152 wurde ein doppelsträngiges DNA-Fragment, bestehend aus den hybridisierten Oligonukleotiden FRAMEBACK und FRAMEFOR, in ein HindIII/PstI-geschnittenes pWW15-Plasmid inseriert. Dies führt zu einer Leserasterverschiebung von minus 2 in pWW152 gegenüber pWW15, so daß die HindIII-Restriktionsschnittstellen von pWW152 und pFLAG-1 (siehe unten) im selben Leseraster liegen. Die amplifizierte VH(1.1ASML)-cDNA wurde als PstI/BstEII-Fragment in pWW152 inseriert. Aus fünf unabhängigen Klonen wurde Plasmid-DNA präpariert und die inserierten Fragmente sequenziert. Durch Vergleich mit publizierten Sequenzen (Kabat et al., 1991) wurden diese als cDNAs variabler Regionen schwerer Immunglobulinketten identifiziert.

Die amplifizierte V $\kappa$ (1.1ASML)-cDNA wurde mit BglII und PvuII gespalten. Dies resultierte aufgrund einer internen BglII-Schnittstelle in einem 63 bp langen PvuII/BglII- und einem 259 bp langen BglII-Fragment. Beide Fragmente wurden gelelektrophoretisch

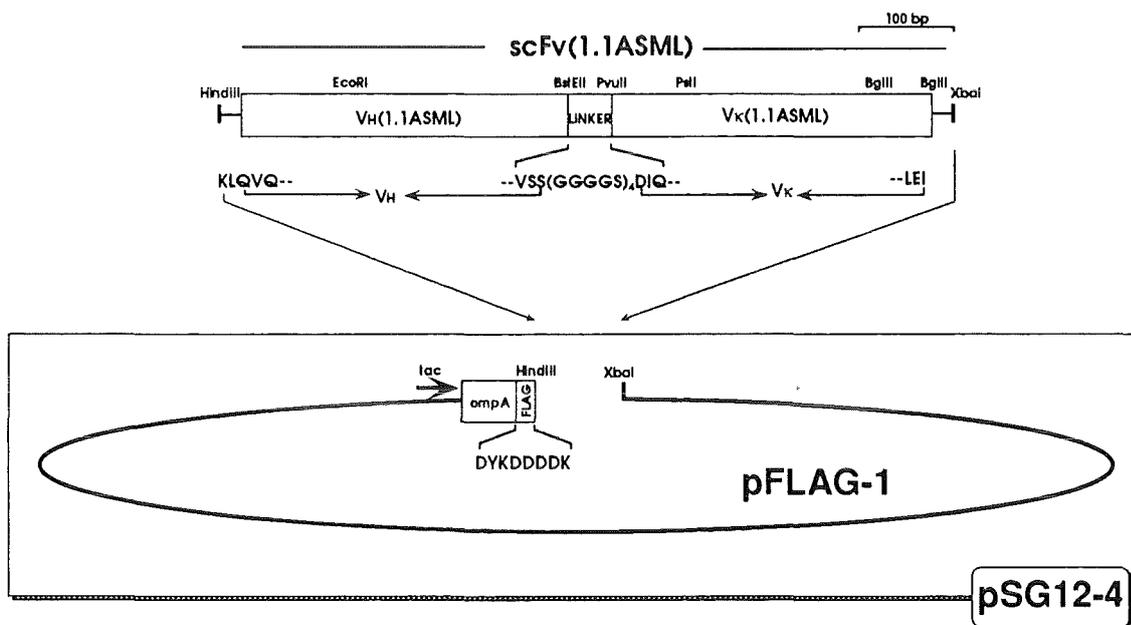
gereinigt und in PvuII/BglII- beziehungsweise BglII-gespaltene pWW152-Vektoren kloniert. Aus je fünf unabhängigen Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert und die inserierten Fragmente sequenziert. Der Vergleich mit publizierten Sequenzen (Kabat et al., 1991) zeigte, daß beide Fragmente für Teile der variablen Region einer leichten Immunglobulinkette kodieren. Das BglII-Fragment wurde anschließend in ein BglII-geschnittenens pWW152-Derivat kloniert, welches das PvuII/BglII-Fragment enthält. Die korrekte Orientierung des BglII-Fragments wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Alle sequenzierten VH(1.1ASML)-cDNAs waren identisch. Der Vergleich der Aminosäuresequenz mit denen anderer Immunoglobulin-VH-Domänen in der Kabat-Datenbank (Kabat et al., 1991) zeigte, daß VH(1.1ASML) zur Untergruppe I (A) variabler Domänen muriner schwerer Immunglobulinketten gehört. Auch alle sequenzierten



**Abbildung 2: Schema der Konstruktion der cDNA des scFv-Fragmentes von mAk1.1ASML.** VH(1.1ASML) und Vκ(1.1ASML) wurden durch reverse Transkription von Hybridom-mRNA unter Verwendung der Oligonukleotide MCH2 bzw. CκA1FOR und anschließender PCR-Amplifikation zwischen den Primer-Paaren VH1BACK/VH1FOR oder VκW1BACK/VκW1FOR gewonnen (vgl. Abbildung 1). Die Oligonukleotide sind durch schwarze Balken dargestellt. Beide cDNAs wurden unter Verwendung der in den Oligonukleotiden kodierten Restriktionsschnittstellen (PstI/BstEII bzw. PvuII/BglII; siehe Material und Methoden) in das Plasmid pWW152 kloniert und sequenziert. pWW152 kodiert unter anderem für das fünfzehn Aminosäuren [(GGGGS)<sub>3</sub>] lange, flexible Verbindungspeptid (Linker). Die Aminosäuresequenz des Verbindungspeptids ist im Einbuchstabencode angegeben. Im letzten Schritt wurde die Vκ(1.1ASML)-cDNA 3' von Linker und VH(1.1ASML)-cDNA inseriert. Das resultierende Plasmid, pSG12-2, kodiert für die variable Region der schweren Kette von mAk1.1ASML, das fünfzehn Aminosäuren lange, verbindende Peptid und die variable Region der leichten Kette von mAk1.1ASML. Die drei funktionellen Elemente liegen im selben Leseraster.

V $\kappa$ (1.1ASML)-cDNAs waren nahezu identisch. Einzelne Basenaustausche im 5'- sowie im 3'-Bereich der sequenzierten V $\kappa$ (1.1ASML)-cDNAs sind auf die degenerierten Amplifikationsprimer zurückzuführen. V $\kappa$ (1.1ASML) gehört zur Untergruppe II variabler Domänen muriner  $\kappa$ -Ketten (Kabat et al., 1991). Für die weitere Arbeit wurde ein V $\kappa$ (1.1ASML)-Klon verwendet, der im 5'- und 3'-Bereich Aminosäuren kodiert, die für V $\kappa$ -Domänen der Untergruppe II typisch sind. Schließlich wurde die V $\kappa$ (1.1ASML)-cDNA als PvuII/XbaI-Fragment 3' der V $H$ (1.1ASML)-cDNA inseriert. Das resultierende Plasmid wird im weiteren als pSG12-2 bezeichnet (Abbildung 2). Die synthetische cDNA, bestehend aus V $H$ -cDNA, Linker und V $\kappa$ -cDNA, kann als eine zusammenhängende Polypeptidkette, das scFv-Fragment, exprimiert werden. Das 5'-V $H$ -Verbindungspeptid-V $\kappa$ -3'-Design, das den Aminoterminus von V $H$  mit dem Carboxyterminus von V $\kappa$  verbindet, wurde gewählt, da dieses bereits in anderen Arbeitsgruppen vielfach zur Expression von scFv-Fragmenten oder deren Fusionsproteinen in Bakterien oder eukaryontischen Zellen erfolgreich angewendet wurde (Huston et al., 1988; Wels et al., 1992a, b, 1995; Skerra et al., 1993; Moritz et al., 1994).



**Abbildung 3: Schematische Anordnung wesentlicher Elemente des scFv(1.1ASML)-Fusionsgens im bakteriellen Expressionsvektor pSG12-4.** Zur Expression des scFv(1.1ASML) wurde das entsprechende cDNA-Fragment (vgl. Abbildung 2) in den bakteriellen Expressionsvektor pFLAG-1 subkloniert. Das Fusionsgen steht unter transkriptioneller Kontrolle des IPTG-induzierbaren tac-Promotors. ompA induziert die kodierende Sequenz des Signalpeptids von ompA (für "outer membrane protein A"), welches die Sekretion der rekombinanten Proteine ins bakterielle Periplasma vermittelt. FLAG bezeichnet eine acht Aminosäuren lange, artifizielle antigene Determinante zur Detektion der rekombinanten Proteine. Die Aminosäuresequenzen des FLAG-Peptids und der Fusionsgrenzen sind im Einbuchstabencode angegeben.

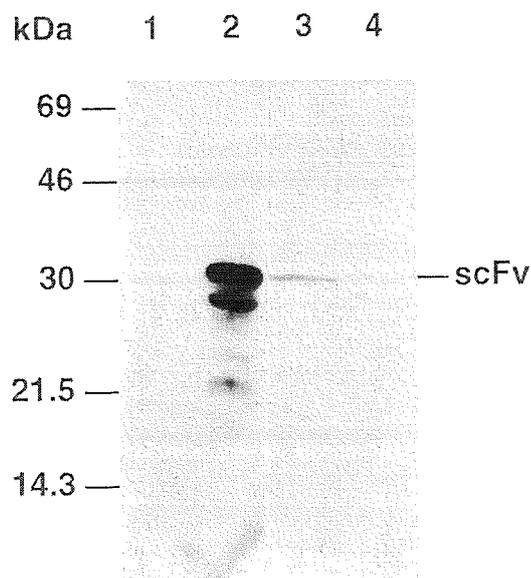
#### 4.2 Bakterielle Expression von scFv(1.1ASML)

Zur spezifischen „Abrichtung“ von Exotoxin A bzw. zytotoxischer T-Lymphozyten mußte das scFv-Fragment das CD44v6-Epitop erkennen. Das scFv(1.1ASML)-Protein

wurde daher zunächst bakteriell exprimiert und auf seine Bindungseigenschaften analysiert. Zur bakteriellen Expression von scFv(1.1ASML) wurde die entsprechende cDNA in den bakteriellen Expressionsvektor pFLAG-1 subkloniert. Die scFv(1.1ASML)-cDNA wurde als HindIII/XbaI-Fragment aus pSG12-2 präpariert und in pFLAG-1 inseriert. Das Plasmid pSG12-2 enthält direkt 3' des offenen Leserasters für das scFv-Fragment ein Stopkodon, an dem die Translation von scFv(1.1ASML) terminiert wird. Das resultierende Plasmid wird als pSG12-4 bezeichnet (Abbildung 3). Das pFLAG-1-Vektorsystem erlaubt die Sekretion von Proteinen ins bakterielle Periplasma. Dazu werden sie als Fusionsproteine mit dem bakteriellen ompA-Signalpeptid (ompA) synthetisiert, welches ihren Transport ins Periplasma gewährleistet. Der pFLAG-1-Vektor kodiert außerdem für eine acht Aminosäuren lange, artifizielle antigene Determinante (DYKDDDDK), das FLAG-Peptid. Rekombinante Proteine können mit dem mAkm1 (anti-FLAG) detektiert werden. Die Transkription des ompA-FLAG-scFv(1.1ASML)-Fusionsproteins wird vom IPTG-induzierbaren tac-Promotor kontrolliert.

Bakterien des *E. coli*-Stammes CC118 wurden mit dem Expressionsplasmid pSG12-4 transformiert. Einzelkolonien der Transformanten wurden kultiviert, die Produktion von scFv(1.1ASML) wurde mit IPTG induziert und bakterielle Lysate wurden präpariert. Immunoblot-Analyse der löslichen Fraktion des bakteriellen Lysates mit mAkm1 (anti-FLAG) zeigt die Expression eines Proteins mit etwa dem erwarteten Molekulargewicht (Abbildung 4, Spur 3). Das Molekulargewicht des scFv(1.1ASML) wurde aus der Aminosäuresequenz berechnet und beträgt inklusive FLAG-Peptid 27,7 kDa. Ein Proteinlysat von CC118-Bakterien, die mit pFLAG-1-Vektor transformiert wurden, reagiert nicht mit mAkm1 (Abbildung 4, Spur 1 und 4). Der größte Teil des 27,7 kDa rekombinanten Proteins liegt jedoch in Form bakterieller "inclusion bodies" (Kane und Hartley, 1988) vor. Die Präparation des Bakterienlysesates beinhaltet einen Ultrazentrifugationsschritt (100000 g). Große Mengen von scFv(1.1ASML) befinden sich im Sediment dieser Zentrifugation (Abbildung 4, Spur 2). Bei den kleineren Proteinspezies in Spur 2 handelt es sich vermutlich um Degradationsprodukte des scFv(1.1ASML)-Proteins.

**Abbildung 4: Bakterielle Expression von scFv(1.1ASML)-Proteinen.** CC118-Bakterien wurden mit pSG12-4- (Spuren 2 und 3) oder mit pFLAG-1-Plasmid-DNA (Spuren 1 und 4) transformiert. Die Proteinexpression wurde durch den Zusatz von IPTG induziert. Die Bakterien wurden wie unter 3.4.31 beschrieben lysiert. Die Proteine aus 0,5% der löslichen Präparation (Spuren 3 und 4) sowie 0,1% des 100000 g-Sediments (Spuren 1 und 2) wurden mittels 12% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (siehe 3.4.27) und anschließend einer Immunoblot-Analyse (siehe 3.4.34) unterzogen. Die Membran wurde nacheinander mit dem anti-FLAG-mAkm1 (0,5 µg/ml) und einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Schaf-Antiserum gegen Maus-Immunglobuline (1:5000) in Anwesenheit von 1mM CaCl<sub>2</sub> behandelt. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.



### 4.3 Konstruktion des Expressionsplasmids pGEX2T:CD44v4-v7

Der Nachweis der Bindungsspezifität des scFv-Fragmentes sollte mit bakteriell exprimiertem v6-Epitop geführt werden. Die cDNA der varianten CD44-Exons v4 bis v7 der Ratte wurde in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX2T subkloniert, der den IPTG-induzierbaren *lac*-Promotor enthält. Das pGEX-Vektorsystem erlaubt die Expression rekombinanter Proteine in großen Mengen als Fusion mit der Glutathion-S-Transferase (GST) aus dem parasitischen Helminthen *Schistosoma japonicum*. Rekombinante Proteine können durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose in einem Schritt gereinigt werden. Ein cDNA-Fragment, das aus den varianten Exons v4 bis v7 des Ratten-CD44 besteht, wurde durch *Acyl/Tth1111*-Spaltung aus pSVMeta-1 (Günthert et al., 1991) isoliert. Nach Glätten der Überhänge mit einer Nuklease aus Mungbohnen wurde das Fragment in einen *Sma*I-gespaltenen pGEX2T-Vektor ligiert. Korrekte Orientierung des Fragments und seine Lage im richtigen Leseraster wurden durch Sequenzierung bestätigt. Das resultierende Plasmid, pGEX2T:CD44v4-v7 (Abbildung 5), kodiert für ein Fusionsprotein (GST#CD44v4-v7), bestehend aus Glutathion-S-Transferase (GST) und einem Peptid, das von den Exons v4 bis v7 des Ratten-CD44 kodiert wird.

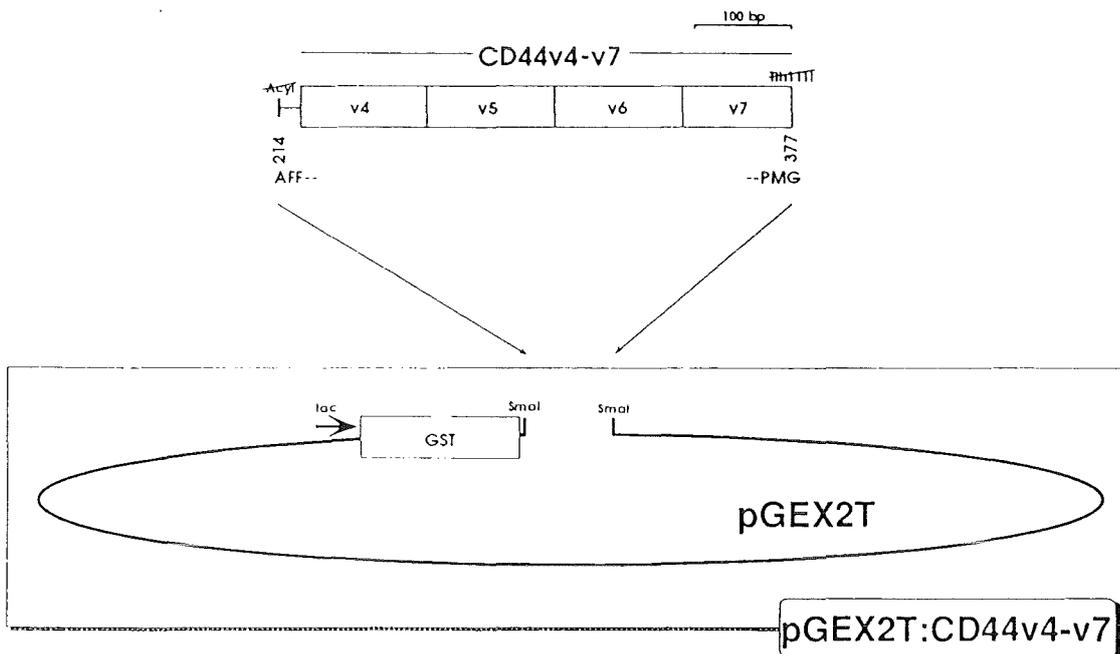


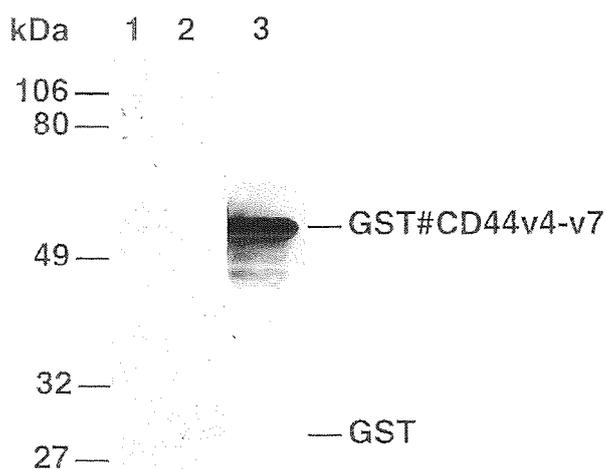
Abbildung 5: Schematische Darstellung des bakteriellen Expressionsvektors pGEX2T:CD44v4-v7. Ein cDNA-Fragment, das die varianten Exons v4-v7 des Ratten-CD44-Gens enthält (Günthert et al., 1991), wurde mit der cDNA der Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* im Vektor pGEX2T fusioniert. Das Fusionsgen steht unter transkriptioneller Kontrolle des IPTG-induzierbaren *lac*-Promotors. Aminosäuresequenzen an den Fusionsgrenzen sind im Einbuchstabencode angegeben. Die Numerierungen oberhalb der Aminosäuresequenzen beziehen sich auf die Positionen in den publizierten Sequenzen des CD44-Klons pMeta-1 (Günthert et al., 1991).

#### 4.4 Expression und Reinigung von GST und GST#CD44v4-v7 aus *E. coli*

Bakterien des *E. coli*-Stammes CC118 wurden mit den Expressionsplasmiden pGEX2T und pGEX2T:CD44v4-v7 transformiert. Die Expression von GST#CD44v4-v7- bzw. GST-Protein wurde mit IPTG induziert und bakterielle Lysate wurden präpariert. GST beziehungsweise GST#CD44v4-v7 wurden durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion aus der löslichen Fraktion der bakteriellen Lysate gewonnen. Abbildung 6 zeigt ein mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbtes Gel der gereinigten Proteine. Die Affinitätsreinigung führt praktisch in einem Schritt zu relativ reinem GST#CD44v4-v7-Protein (Spur 1; aus der Aminosäuresequenz berechnetes Molekulargewicht: 45 kDa) beziehungsweise GST-Protein (Spur 2; berechnetes Molekulargewicht: 26,5 kDa). Die Differenz zwischen der erwarteten Molekülmasse von 45 kDa und dem scheinbaren Molekulargewicht des GST#CD44v4-v7-Proteins von 55 kDa im SDS-Gel resultiert wahrscheinlich durch Tertiärstrukturen des Proteins, die gegenüber der Denaturierung durch SDS resistent sind. Ein ähnliches Resultat wurde mit *in vitro* synthetisiertem CD44v4-v7 der Ratte erhalten (Rudy et al., 1993). Die Präsenz des v6-Epitops im 45 kDa GST#CD44v4-v7-Protein wurde durch Immunoblot-Analyse mit mAk1.1ASML bestätigt. GST#CD44v4-v7 wird von mAk1.1ASML erkannt (Abbildung 6; Spur 3). Bei der 27 kDa Bande in Spur 1 des mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten Gels handelt es sich um GST-Protein. Die Bande reagiert mit einem anti-GST-Antikörper (nicht gezeigt). Offensichtlich ist die Fusionsstelle zwischen GST und dem Fusionspartner instabil. Dies beobachtet man auch bei anderen GST-Fusionsproteinen.

**Abbildung 6: Expression von GST- und GST#CD44v4-v7-Proteinen.** CC118-Bakterien wurden mit pGEX2T:CD44v4-v7- (Spuren 1 und 3) oder mit pGEX2T-Plasmid-DNA (Spur 2) transformiert. Die Expression von GST#CD44v4-v7- bzw. GST-Protein wurde durch IPTG induziert. Die Bakterien wurden, wie unter 3.4.30 beschrieben, lysiert und die GST#CD44v4-v7- beziehungsweise GST-Proteine mittels Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion gereinigt. Spuren 1 und 3 zeigen GST#CD44v4-v7-Protein, Spur 2 zeigt GST-Protein. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben. Je 1 µg (Spuren 1 und 2) oder 0,1 µg (Spur 3) der affinitätsgereinigten Proteine wurden mittels 9% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (siehe 3.4.27). Spuren 1 und 2

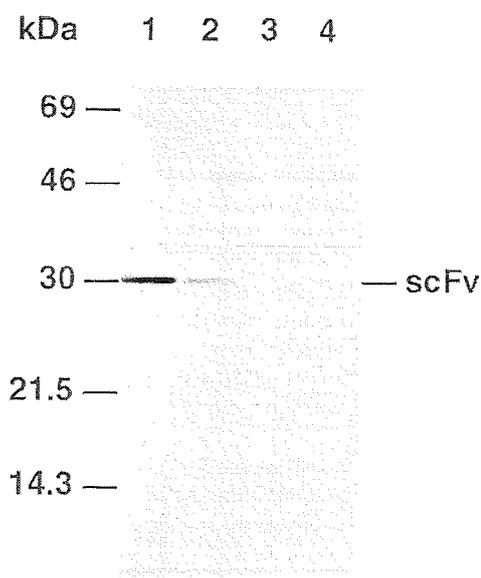
des Gels wurden mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt (siehe 3.4.28), Spur 3 einer Immunoblot-Analyse (siehe 3.4.34) unterzogen. Die Membran wurde nacheinander mit mAk1.1ASML (0,5 µg/ml) und einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Schaf-Antiserum gegen Maus-Immunglobuline (1:5000) behandelt.



#### 4.5 *scFv(1.1ASML)* bindet spezifisch an bakteriell exprimiertes v6-Epitop

Die Affinität von *scFv(1.1ASML)* für das Ratten-CD44v6-kodierte Epitop konnte durch Kopräzipitation mit bakteriell exprimiertem Epitop gezeigt werden. CC118-Bakterien, die mit dem Expressionsplasmid pSG12-4 transformiert waren, wurden mit IPTG induziert und lysiert. Das bakterielle Lysat wurde nach Ultrazentrifugation (100000 g) mit affinitätsgereinigtem GST#CD44v4-v7-Protein inkubiert. Immunkomplexe wurden mit Glutathion-Agarose präzipitiert und einer Immunoblot-Analyse mit mAkM1 (anti-FLAG) unterzogen (Abbildung 7, Spuren 1 und 2). Präzipitationen in Gegenwart von GST (Spur 3) beziehungsweise mit Glutathion-Agarose allein (Spur 4) dienten als Kontrollen. Die mAkM1-reaktive Bande war nur sichtbar, wenn die Präzipitation in Gegenwart von GST#CD44v4-v7 durchgeführt wurde, das heißt, nur wenn *scFv(1.1ASML)* spezifisch an das v6-Epitop gebunden hatte. Die Affinität von *scFv(1.1ASML)* für GST#CD44v4-v7 wurde zusätzlich durch ELISA bestätigt (nicht gezeigt). Die Spezifität von *scFv(1.1ASML)* für das v6-Epitop war Voraussetzung dafür, daß die zu generierenden, chimären Proteine funktionieren konnten.

**Abbildung 7: Bindungsspezifität von *scFv(1.1ASML)*.** CC118-Bakterien wurden mit pSG12-4-Plamid-DNA transformiert. Die Expression von *scFv(1.1ASML)* wurde durch IPTG induziert. Aus 1 l Bakterienkultur wurde wie unter 3.4.31 beschrieben, lösliches Proteinlysate präpariert. 10% (Spuren 1, 3 und 4) oder 2% (Spur 2) dieser Proteinpräparationen wurden mit 2 µg affinitätsgereinigtem GST#CD44v4-v7-Protein (Spuren 1 und 2) bzw. GST-Protein (Spur 3) und anschließend mit Glutathion-Agarose (Spuren 1-3) oder nur mit Glutathion-Agarose (Spur 4) behandelt (siehe 3.4.32). Die immunpräzipitierten Proteine wurden mittels 12% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (siehe 3.4.27) und einer Immunoblot-Analyse mit mAkM1 unterzogen (vgl. Abbildung 4). Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.



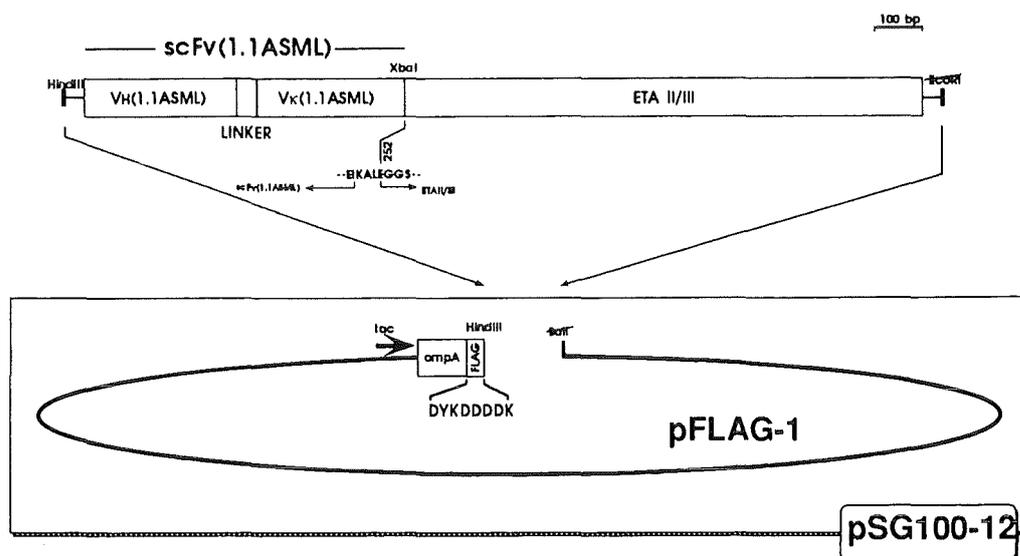
#### 4.6 Das *scFv(1.1ASML):ETA*-Immuntoxin - ein gescheiterter Ansatz

In einem ersten Projekt sollte das *scFv*-Fragment von mAk1.1ASML mittels rekombinanter DNA-Technologie mit einem bakteriellen Toxin als Effektorfunktion versehen werden. Als Fusionspartner für *scFv(1.1ASML)* wurde Exotoxin A (ETA) aus *Pseudomonas aeruginosa* gewählt. ETA wird nach rezeptorvermittelter Endozytose und proteolytischer Prozessierung aus dem endosomalen Kompartiment ins Zytoplasma

transloziert (Ogata et al., 1990). Dort hemmt es durch ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors-2 irreversibel die zelluläre Proteinbiosynthese. Das Immuntoxin sollte in großen Mengen aus bakteriellen Lysaten gereinigt werden und als lösliches Therapeutikum zur Behandlung von CD44v6-positiven Tumoren in Nacktmäusen und in BDY-Ratten eingesetzt werden.

#### 4.6.1 Molekulare Klonierung des scFv(1.1ASML):ETA-Fusionsgens

Der pFLAG-1-Vektor wurde mit Sall verdaut und anschließend mit Klenow-Enzym behandelt, um glatte Enden zu generieren; das linearisierte Fragment wurde mit XbaI gespalten. Eine verkürzte kodierende Sequenz des Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa*, in der Sequenzen deletiert sind, die für die zellbindende Domäne kodieren, wurde durch EcoRI-Verdau, Glättung der überhängenden Enden mit Klenow-Enzym und anschließender XbaI-Spaltung aus pWW20 (Wels et al., 1992b) isoliert. Dieses XbaI/glatt-Fragment wurde in den XbaI/glatt-pFLAG-1-Vektor inseriert. Das daraus resultierende Plasmid wird als pSG100 bezeichnet. Um das scFv-Fragment des mAk1.1ASML mit dem verkürzten ETA zu fusionieren, mußte am 3'-Ende der V $\kappa$ -cDNA ein offenes Leseraster generiert werden. Dazu wurde pSG12-2 (vgl. 4.1) mit BglII und BclI gespalten, wodurch ein 259 bp langes BglII-Fragment erhalten wurde. Dieses wurde anschließend wieder in den BglII/BclI-geschnittenen pSG12-2-Vektor ligiert und auf korrekte Orientierung überprüft. Im resultierenden Plasmid (pSG12-3) wurde durch diesen Schritt das Stopkodon am 3'-Ende der V $\kappa$ -cDNA deletiert und gleichzeitig die XbaI-Restriktionsschnittstellen von pSG12-3 und pSG100 in dasselbe Leseraster gebracht. Schließlich wurde die scFv(1.1ASML)-cDNA als HindIII/XbaI-Fragment aus pSG12-3 isoliert und in einen HindIII/XbaI-



**Abbildung 8: Schematische Anordnung wesentlicher Elemente des scFv(1.1ASML):ETA-Fusionsgens im bakteriellen Expressionsvektor pSG100-12.** Die cDNA eines verkürzten *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A, bestehend aus den funktionellen Domänen II, (Ib) und III, wurde an das 3'-Ende der cDNA für das scFv(1.1ASML) fusioniert und in pFLAG-1 kloniert. *ompA*, FLAG und *tac* sind in Abbildung 3 erklärt. Die Aminosäuresequenz der Fusionsgrenze ist im Einbuchstabencode angegeben, die Numerierung entspricht Position 252 des prozessierten Wildtyp-ETA (Gray et al., 1984).

geschnittenen pSG100-Vektor inseriert. Das resultierende Expressionsplasmid (pSG100-12; Abbildung 8), kodiert für ein Protein bestehend aus dem scFv-Fragment des mAk1.1ASML, welches mit den Domänen II, Ib und III des *Pseudomonas aeruginosa* ETA fusioniert ist. Die deletierte ETA-Domäne Ia ist für die Erkennung von Zellen verantwortlich, ist jedoch für die enzymatische Aktivität, die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors-2, nicht erforderlich (Hwang et al., 1987; Siegall et al., 1989). pSG100-12 besitzt den IPTG-induzierbaren tac-Promotor, gefolgt von Sequenzen, die das ompA- und das FLAG-Peptid, die variable Region der schweren Kette, das Verbindungspeptid, die variable Region der leichten Kette sowie die ETA-Domänen II, Ib und III spezifizieren. Abbildung 9 zeigt die Nukleotid- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des scFv(1.1ASML):ETA-Fusionsgens.

**Abbildung 9: Nukleotid- und davon abgeleitete Aminosäuresequenz des scFv(1.1ASML)ETA-Fusionsgens.** Die Nukleotidpositionen 88-837 sowie der Übergang von der Vκ(1.1ASML)- zur ETA-cDNA wurden durch DNA-Sequenzanalyse bestätigt; die Positionen 1-87 beziehungsweise 838-1926 sind aus pFLAG-1 (IBI Biochemicals New Haven, CT, USA) beziehungsweise Gray et al., 1984 übernommen. Die Sequenz zeigt: die ompA-Signalpeptid-Sequenz (ompA) aus dem pFLAG-1 Vektor (bp 1-63); das FLAG-Epitop (bp 64-87); das HindIII/BstEII-Fragment, das für VH(1.1ASML) kodiert (bp 88-441); das synthetische, fünfzehn Aminosäuren lange Verbindungspeptid (Linker: bp 451-494); das PvuII/BglIII-Fragment, das für Vκ(1.1ASML) kodiert (bp 502-829); die verkürzte *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A cDNA, welche für die ETA-Domänen II, Ib und III kodiert (bp 838-1923). Glutamat an Aminosäure Position 259 entspricht Position 252 des prozessierten Wildtyp-ETA (Numerierung nach Gray et al., 1984). Aspartat an Aminosäure Position 1 entspricht dem N-Terminus des prozessierten scFv(1.1ASML):ETA-Fusionsproteins (inklusive FLAG-Peptid). Die hypervariablen Regionen (CDR für "complementarity-determining region") in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von VH(1.1ASML) und Vκ(1.1ASML) sind unterstrichen. Die Sequenz-Positionen bp 88-102, bp 442-501 und bp 830-837 resultieren aus einer synthetischen Adaptorsequenz in pWW152, die zur Subklonierung der cDNAs für die variablen Domänen generiert wurde. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist im Einbuchstabencode angegeben. Der Stern indiziert ein Terminationskodon für die Proteinbiosynthese.

ompA	ATGAAAAGACAGCTATGCGGATTGCGAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTTCGCCAA M K K T A I A I A V A L A G F A T V A Q	60
	<u>HindIII</u>	
	CGTCACTCAAGGACGAGATGACAGAGACTTCAGGTACAACCTCAGAGGATCGAGAGCT A D Y K D D D D K K L Q V Q L Q E S G P	120
	GGCTGTGAAAAGCTTCTCAGTCTCTGTCTCTCACTGCTCTCTCACTGCTACTCCATC G L V K P S Q S L S L T C S V T G Y S I	180
	ACCAGTGTATTACTGGAAGTGGATCCGCAATTTCCAGGAAACAATCGAATGGATG T S G V Y W H W I R Q F P G N K L E W H	240
VH	<u>CDR1</u>	59
	GGTACATGAGAAAGGAGGTAATAAATGACTCAACCCATCTCTCAAAAATGACTCTCC G Y M R R N D G N N H Y H P S L K K N R L S	300
	<u>CDR2</u>	79
	ATCAGTGTGTGACACATCAAGAAGCAGTTTTCCTGAACTTGAATCTGTACTACTGAG I S R D T S K N Q P F L N L N S V T T E	360
	99	99
	GACACATCTACATTAATCTGTCAAGTCAAGGCTACGGTAGTAGCGGGTTTGTTTACTGG D T S T Y Y C A S H G Y G S S G F V Y W	420
	119	119
	<u>BstEII</u> <u>CDR3</u>	
	GGCAAGGGACCAAGCTCAAGTTTCTCTTGGCGGTGGCGGTTCTGTGGCGGTGGCTCC G Q G T T V T V S S G G G S G G G S	480
	139	139
	<u>PvuII</u> <u>Linker</u>	
	GGCGGGGGGTTCTGACATCGACCTGACCCAGTCTGCACTCTCCCTCTCTCTCAGTCTT G G G G S D I Q L T Q S A L S L P V S L	540
	159	159
	GGAGTCAAGGCTCCATCTCTGTGAGTGTAGTACAGGCTTTGACAGTAATGGAAC G D Q A S I S C R S S Q S L V H I N G N	600
	179	179
Vκ	<u>CDR1</u>	179
	ACCTATTATGATGGTACCTGACAGAGCCAGGCAAGTCTCCGAAAGCTCTGACTCTACAA T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K	660
	199	199
	GTTCACACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGACAGAT V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D	720
	219	219
	<u>CDR2</u>	
	TTTCACTCAAGATCAAGAGTGGAGGCTGAGATCTGGAGTTTATTTCTGCTCTCAA F T L K I T S R V E A E D L G V Y F C S Q	780
	239	239
	<u>BglIII/BstI</u> <u>2ndI</u>	
	AGTACACATGATCTCGAGGCTTGGGGAGGACCAAGCTGGAGTCAAGCTCTAGAG S T H D P P T F G G G G T K L E I K A L E	840
	259	259
	<u>CDR3</u>	
	GGGGGAGGCTGGCGGCTGACCGCGCAAGGCTGCCACTCCCTCGAGTCTTC G G S L A A L T A H Q A C H L P L E T F	900
	279	279
	ACCGCTCATCGCCAGCGCGGCTGGGAAACAATGAGCACTGGAGTGGCTATCCGCTGAG T R H R Q P R G W E Q L E Q C G Y F V Q	960
	299	299
	CCGCTGTGCGGCTTACTGCGGCGGCACTGTCTATGAAAGCAAGTGTGACCAAGTATC R L V A L Y L A A R L S W H Q V D Q V I	1020
	319	319
	CCCAAGCGGCTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG R N A L A S P G S G G D L G E A I R E Q	1080
	339	339
	CCGAGCAGCGGCTCTGGGCTGACCTTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTTCTCCGG P E Q A R L A L T L A A A E S E R F V R	1140
	359	359
	CAGGCAACCGGCAAGCAAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG Q G T G N D E A G A A N A D V V S L T C	1200
	379	379
	CCGCTGGCGGCTGGGAGTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG P V A A G E C A G P A D S G D A L L E R	1260
	399	399
	AACATCCCACTGGCGGCGGAGTTCCTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG H Y P T G A E F L G D G G D V S F S T R	1320
	419	419
	GGCAGCAGAACTGGACGGTGGAGCGGCTCTCCAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG G T Q N W T V E R L L Q A H R Q L E E R	1380
	439	439
ETA	GGTATGTGTGCTGGCTACCGCGGCACTTCTCTGAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG G Y V F V G Y H G T F L E A A Q S I V F	1440
	459	459
	GGCGGGGTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG G G V R A R S Q D L D A I W R G F Y I A	500
	479	479
	GGGATCGCGGCTGGCTGAGGCTACGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG G D P A L A Y G Y A Q D Q E P D A R G R	560
	499	499
	ATCCGCAAGCGTCCCTGCTCCGGTCTATGTGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG I R N G A L L R V Y V P R S S L P G F Y	1620
	519	519
	CCACAGGCTGACCTTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG R T S L T L A A P E A A G E V E R L I G	1680
	529	529
	CATCGGCTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG H P L P L R L D A I T G P E E E G R L	1740
	539	539
	GAGACATTTCTGGCTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG E T I L G W P L A E R T V V I P S A I P	1800
	559	559
	ACCGACCGG T D P R N V G G D L D P S S I P D K E Q	1860
	579	579
	GGATCAGCGGCTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG A I S A L P D Y A S Q P G K P P R E D L	1920
	599	599
	AAGTAA K *	1926 600

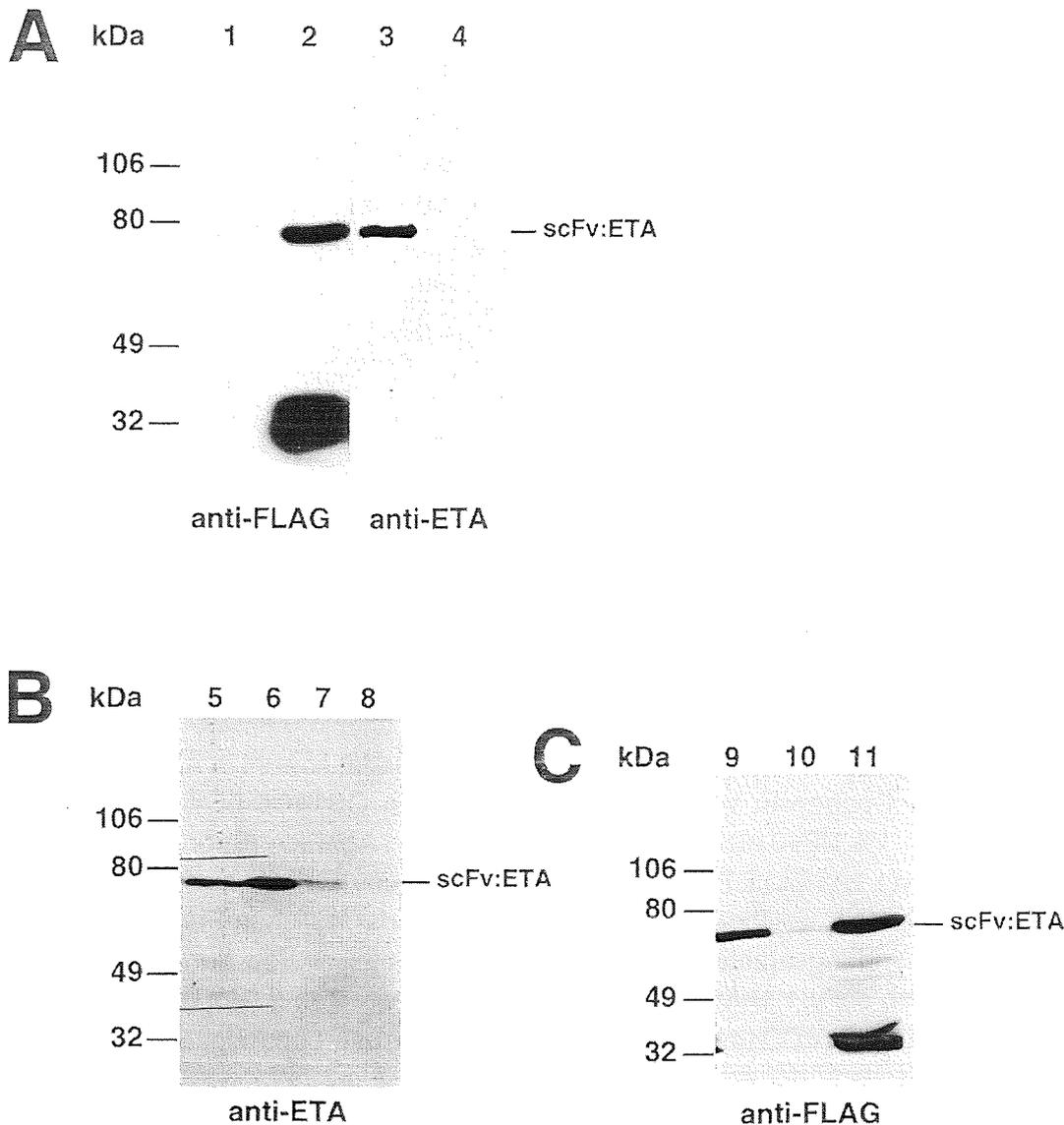
#### 4.6.2 Expression und Affinität des scFv(1.1ASML):ETA-Immuntoxins

Bakterien des *E. coli*-Stammes CC118 wurden mit pSG100-12-Plasmid-DNA transformiert. Die Expression von scFv(1.1ASML):ETA wurde durch IPTG induziert und die Bakterien wurden anschließend lysiert. Abbildung 10A zeigt Immunoblot-Analysen der löslichen Fraktion des bakteriellen Lysats mit mAkM1 (anti-FLAG) und einem Kaninchenserum gegen Exotoxin A (anti-ETA; Wels et al., 1992b). Sowohl mAkM1 (Spur 2) als auch das Antiserum gegen Exotoxin A (Spur 3) detektieren eine Bande von etwa 70 kDa Molekulargewicht im Lysat von pSG100-12-Transformanten, jedoch nicht im Lysat von pFLAG-1-transformierten CC118-Bakterien (Spuren 1 und 4). Das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht des prozessierten Immuntoxins ist 66,7 kDa. Bei der 32 kDa-Bande in Spur 2 handelt es sich vermutlich um ein Degradationsprodukt des scFv:ETA-Proteins.

Die Affinität von scFv(1.1ASML):ETA für das Ratten-CD44v6-kodierte Epitop wurde wiederum durch Kopräzipitation mit bakteriell exprimiertem Epitop gezeigt. Das bakterielle Lysat wurde nach Ultrazentrifugation (100000 g) mit affinitätsgereinigtem GST#CD44v4-v7-Protein beziehungsweise GST-Protein inkubiert. Immunkomplexe wurden mit Glutathion-Agarose präzipitiert und einer Immunoblot-Analyse mit dem anti-ETA-Serum unterzogen (Abbildung 10B). Das Immuntoxin bindet sowohl in Abwesenheit (Spur 5) als auch in Gegenwart von 1% NP40 (Spur 6) an GST#CD44v4-v7. Es bindet in Gegenwart von 1% NP40 nicht an GST oder Glutathion-Agarose (Spur 8). Das in Spur 7 detektierte scFv(1.1ASML):ETA-Fusionsprotein wurde demnach unspezifisch präzipitiert.

Um zu testen, welcher Anteil des gesamten, in der löslichen Fraktion enthaltenen Immuntoxins Bindungsaffinität für das v6-Epitop besitzt, wurde der Überstand einer Präzipitation von scFv(1.1ASML):ETA mit GST#CD44v4-v7 und Glutathion-Agarose ein zweites Mal mit GST#CD44v4-v7 und Glutathion-Agarose behandelt (Abbildung 10C). Obwohl im Überstand der ersten Präzipitation noch eine große Menge des Immuntoxins enthalten ist (Spur 11), bindet kaum noch etwas davon an das v6-Epitop (Spur 10). Der Anteil, der in der ersten Runde der Präzipitation an GST#CD44v4-v7-Protein gebunden hatte, ist zum Vergleich in Spur 9 zu sehen. Es kann ausgeschlossen werden, daß es sich bei den Immuntoxinmolekülen im Überstand um Degradationsprodukte handelt, da sie vom mAkM1 (anti-FLAG) erkannt werden. Das FLAG-Epitop ist am äußersten Aminoterminal von scFv(1.1ASML):ETA lokalisiert. Spur 11 repräsentiert eine Immunoblot-Analyse von weniger als 1% des im Überstand enthaltenen Immuntoxins. Das gesamte v6-Epitop-reaktive Material ist in Spur 9 zu sehen. Obwohl weniger als 1% des im Überstand enthaltenen Immuntoxins gezeigt ist (Spur 11), ist die Reaktion mit dem anti-FLAG-mAkM1 stärker als die von mAkM1 mit dem gesamten an GST#CD44v4-v7 gebundenen Immuntoxin (Spur 9). Dies bedeutet, daß wesentlich weniger als 1% des in der löslichen Fraktion enthaltenen scFv(1.1ASML):ETA Affinität für das v6-Epitop besitzt. (Anderenfalls wäre zu erwarten, daß das Immuntoxin auch aus dem Überstand zu präzipitieren ist.) Offensichtlich liegt jedoch nur ein sehr geringer Anteil des löslichen Immuntoxins im korrekt gefalteten, das heißt im bindungsaktiven Zustand vor. Bei einer Gesamtausbeute löslichen Immuntoxins von etwa 0,5 bis 1 mg pro Liter Bakterienkultur (Daten nicht gezeigt) binden wahrscheinlich weniger als 5 µg an das v6-Epitop.

Es wurden verschiedene Methoden getestet, um die Ausbeute an v6-Epitop-reaktivem scFv(1.1ASML):ETA zu erhöhen, wie z. B. Denaturierungs/Renaturierungs-



**Abbildung 10: Expression und Antigen-spezifität des scFv(1.1ASML):ETA-Immunttoxins.** (A) CC118-Bakterien wurden mit pSG100-12- (Spuren 2 und 3) oder mit pFLAG-1-Plasmid-DNA (Spuren 1 und 4) transformiert. Die Proteinexpression wurde durch IPTG induziert. Aus 1 l Bakterienkultur wurde wie unter 3.4.31 beschrieben, lösliches Proteinlysate präpariert. Die Proteine aus 0,1% der löslichen Präparationen wurden mittels 12% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (siehe 3.4.27) und anschließend einer Immunoblot-Analyse (siehe 3.4.34) unterzogen. Die Membran wurde entweder nacheinander mit mAkM1 (anti-FLAG; 0,5 µg/ml; Spuren 1 und 2) und einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Schaf-Antiserum gegen Maus-Immunglobuline (1:5000) oder einem Kaninchenserum gegen ETA (anti-ETA; 1:2000; Spuren 3 und 4) und anschließend mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Esel-Antiserum gegen Kaninchen-Immunglobuline (1:5000) behandelt. (B) Jeweils 10% einer scFv(1.1ASML):ETA-Proteinpräparation (vgl. A) wurden mit 2 µg affinitätsgereinigtem GST#CD44v4-v7-Protein (Spuren 5 und 6) bzw. GST-Protein (Spuren 7 und 8) und anschließend mit Glutathion-Agarose behandelt (siehe 3.4.32). Um unspezifische Bindung zu blockieren, wurde die Präzipitation in Gegenwart von 1% NP40 durchgeführt (Spuren 6 und 8). Die immunpräzipitierten Proteine wurden mittels 12% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend einer Immunoblot-Analyse mit anti-ETA unterzogen (vgl. A). (C) In Spur 9 ist immunpräzipitierbares scFv(1.1ASML):ETA-Protein in der löslichen Fraktion von pSG100-12-transformierten Bakterien (wie in Spur 6) dargestellt. Der Überstand einer solchen Präzipitation wurde erneut mit 2 µg GST#CD44v4-v7-Protein behandelt und erneut mit Glutathion-Agarose präzipitiert (Spur 10). 1% des Überstandes der ersten Präzipitation (Spur 11) wurde direkt auf das Gel aufgetragen. Die Membran wurde mit mAkM1 behandelt (anti-FLAG; vgl. A). Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

Verfahren beziehungsweise gezielte Mutationen in der variablen Domäne der leichten Kette. Diese waren jedoch ohne Erfolg und werden daher an dieser Stelle nicht näher beschrieben. Funktionelle Versuche, wie beispielsweise die *in vitro* Zytotoxizität des ungereinigten Immuntoxins gegenüber CD44v6-positiven Zellen, waren ebenfalls negativ. Wegen der zu geringen Ausbeute konnte weder die Zytotoxizität von gereinigtem Immuntoxin noch seine *in vivo* anti-Tumor-Aktivität getestet werden. Das Projekt wurde schließlich gestoppt.

#### **4.7 Molekulare Klonierung der cDNA des chimären scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Rezeptors**

In einem zweiten Projekt sollte der zelluläre Arm des Immunsystems gegen CD44v6-positive Tumorzellen "abgerichtet" werden. Zytotoxische T-Lymphozyten, Zellen also, die die Fähigkeit besitzen, andere Zellen zu töten, sollten quasi als Fusionspartner für scFv(1.1ASML) dienen. Eine weitere, in diesem Zusammenhang sehr willkommene Eigenschaft zytotoxischer T-Zellen ist ihre gewebeinfiltrierende Aktivität. Das scFv-Fragment sollte in der CTL-Membran verankert werden und extrazelluläre Bindungsereignisse direkt in Signale, die zur Aktivierung der T-Zellen führen, umwandeln. Die Quervernetzung rekombinanter Rezeptoren, die den zytoplasmatischen Teil der  $\zeta$ -Kette enthalten, führte zur Induktion von Signalen, die von denen nach TCR-Stimulierung nicht zu unterscheiden sind (Irving und Weiss, 1991; Romeo und Seed, 1991; Letourneur und Klausner, 1991, 1992; Romeo et al., 1992; Irving et al., 1993; Brocker et al., 1993; Brocker und Karjalainen, 1995; Vignaux et al., 1995). Folglich wurde das scFv-Fragment von mAk1.1ASML mit der  $\zeta$ -Kette des T-Zell-Rezeptorkomplexes verknüpft und auf der Oberfläche von zytotoxischen T-Zellen exprimiert.

Ein Gen, das für einen chimären Rezeptor, bestehend aus dem scFv-Fragment des CD44v6-spezifischen mAk1.1ASML und der  $\zeta$ -Kette des T-Zell-Rezeptorkomplexes kodiert, wurde im retroviralen Expressionsvektor pLXSN konstruiert. Ein cDNA-Fragment, welches für das Signalpeptid einer schweren Immunglobulinkette kodiert, wurde durch XhoI/PstI-Spaltung aus dem Plasmid pWW15/SP<sup>m</sup>-VH(225) (siehe Material und Methoden) isoliert und in einen XhoI/PstI-gespaltenen pWW152-Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid, pWW150, wurde mit PstI und XbaI geschnitten und die scFv(1.1ASML)-cDNA als ein 239 bp PstI/EcoRI- und ein 492 bp EcoRI/XbaI-Fragment (aus pSG12-3, offenes Leseraster am 3'-Ende von V $\kappa$ ; vgl. 4.6.1) in einer Dreifragmentligation inseriert. Die Dreifragmentligation war notwendig, da sich in der V $\kappa$ (1.1ASML)-cDNA eine interne PstI-Schnittstelle befindet und somit die scFv(1.1ASML)-cDNA nicht als PstI/XbaI-Fragment inseriert werden konnte.

Eine verkürzte cDNA der murinen  $\zeta$ -Kette, in der Sequenzen deletiert sind, die für die 27 N-terminalen Aminosäuren des nicht-prozessierten  $\zeta$ -Genprodukts kodieren (Numerierung nach Weissman et al., 1988), wurde durch XbaI/EcoRI-Verdau aus dem Plasmid pL[scFv(FRP5)/hinge/ $\zeta$ ]SN (Moritz et al., 1994) isoliert und in einen XbaI/EcoRI-geschnittenen pGEM-1-Vektor (Promega, Madison, WI, USA) ligiert. Das daraus resultierende Plasmid, pGEM: $\zeta$ , wurde mit XbaI gespalten. Die cDNA der „hinge“-Region der

murinen CD8  $\alpha$ -Kette (Nukleotidpositionen 519-698; Numerierung nach Zamoyska et al., 1985) wurde unter Verwendung der Oligonukleotide CD8HINGEBACK und CD8HINGEFOR (25 Zyklen; 10 s 94 °C, 10 s 53 °C, 10 s 72 °C) aus pL[scFv(FRP5)/hinge/ $\zeta$ ]SN-Plasmid-DNA (Moritz et al., 1994) amplifiziert und in einen XbaI/EcoRI-geschnittenen pT7T3s-Vektor ligiert. PCR-bedingte Mutationen wurden durch DNA-Sequenzanalyse ausgeschlossen. Anschließend wurde die cDNA der „hinge“-Region der CD8  $\alpha$ -Kette als XbaI/NheI-Fragment 5' der  $\zeta$ -Ketten-cDNA in den XbaI-gespaltenen pGEM: $\zeta$ -Vektor inseriert. Das dabei entstandene Plasmid, pGEM: $\alpha$ : $\zeta$ , wurde mittels DNA-Sequenzanalyse auf korrekte Orientierung der cDNA der „hinge“-Region der CD8  $\alpha$ -Kette überprüft. Die verkürzte  $\zeta$ -Ketten-cDNA und die cDNA der „hinge“-Region der CD8  $\alpha$ -Kette sind in pGEM: $\alpha$ : $\zeta$  im selben Leseraster miteinander fusioniert. Die CD8  $\alpha$ -„hinge“-Region dient quasi als Abstandhalter für das scFv-Fragment von der CTL-Oberfläche. Um die kodierende Sequenz des Fusionsproteins aus scFv(1.1ASML), der „hinge“-Region der CD8  $\alpha$ -Kette und der  $\zeta$ -Kette, zu vervollständigen, wurde die cDNA des scFv(1.1ASML), inklusive Signalpeptid, durch HindIII/XbaI-Verdau aus dem oben beschriebenen pWW150-Derivat isoliert und in einen HindIII/XbaI-geschnittenen

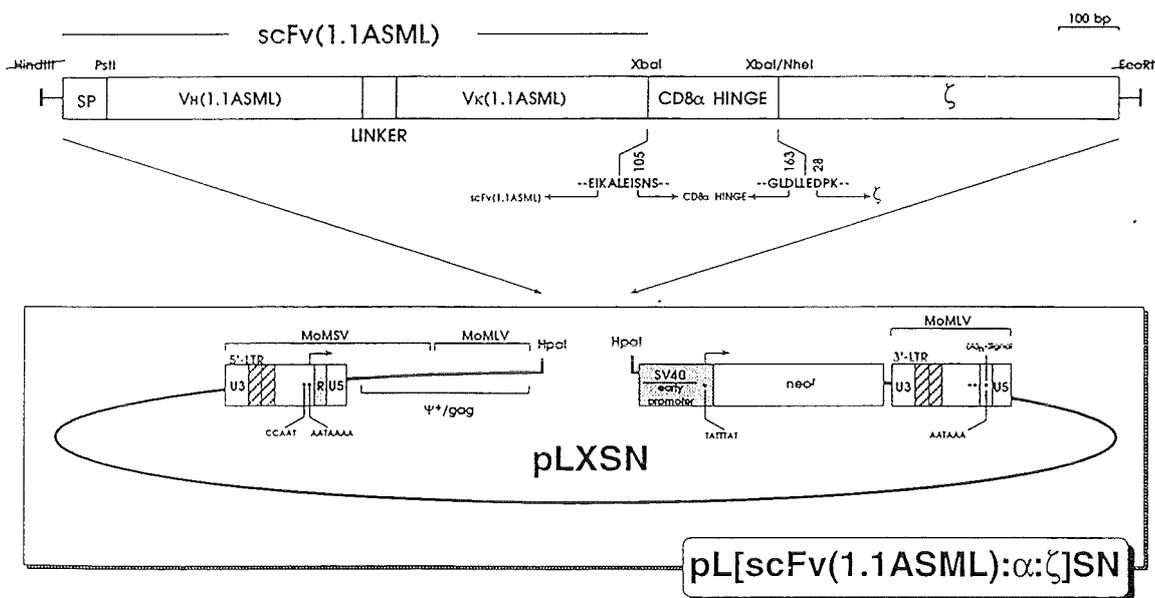


Abbildung 11: Schematische Darstellung der wesentlichen Elemente des scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Fusionsgens im retroviralen Expressionsvektor pL[scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ ]SN. Zur Expression des scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Fusionsproteins wurde das entsprechende DNA-Fragment in den retroviralen Expressionsvektor pLXSN subkloniert. Vh(1.1ASML), V $\kappa$ (1.1ASML) und Linker sind in Abbildung 2 beschrieben. SP indiziert Sequenzen, die für das Signalpeptid der schweren Kette eines Immunglobulins kodieren. CD8 $\alpha$  HINGE kodiert für eine Sequenz in der membranproximalen Region der extrazellulären Domäne des murinen CD8  $\alpha$ -Genprodukts.  $\zeta$  kodiert für die Transmembran- und intrazelluläre Domäne der  $\zeta$ -Kette des T-Zell-Rezeptorkomplexes. Das Fusionsgen steht unter transkriptioneller Kontrolle des Promotors im 5'-LTR des Moloney Maus Sarkom Virus (MoMSV). Der Vektor enthält außerdem das bakterielle Transposon-Gen Tn5 *neo<sup>r</sup>*, transkriptionell reguliert durch den SV40 "early promoter". Transkriptionsstartpunkte sind durch Pfeile gekennzeichnet.  $\psi^+$ /gag ist eine Sequenz, die den Genomen von MoMLV (Moloney Maus Leukämie Virus) und MoMSV entnommen ist, und die das erweiterte Verpackungssignal enthält, welches bis in die gag-Region reicht (gag steht für "group-specific antigen"). (A)<sub>n</sub>-Signal indiziert das Polyadenylierungssignal im 3'-LTR von MoMLV. Aminosäuresequenzen an den Fusionsgrenzen sind im Einbuchstabencode angegeben. Die Numerierungen oberhalb der Aminosäuresequenzen beziehen sich auf die Positionen in den publizierten Sequenzen von CD8  $\alpha$  (Zamoyska et al., 1985) bzw.  $\zeta$  (Weissman et al., 1988).

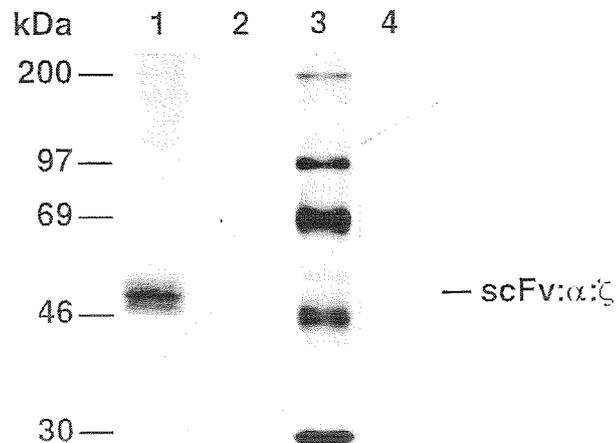


XbaI geschnitten. Die beiden Fragmente (ein 821 bp glatt/XbaI-Fragment, das für scFv(1.1ASML) inklusive Signalpeptid kodiert und ein 661 bp XbaI/glatt-Fragment, das für die „hinge“-Region der CD8  $\alpha$ -Kette und die verkürzte  $\zeta$ -Kette kodiert) wurden in einer Dreifragment-Reaktion in die HpaI-Schnittstelle in der multiplen Klonierungsregion des retroviralen Expressionsvektors pLXSN ligiert. In dem daraus resultierenden Plasmid, pL[scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ ]SN (Abbildung 11), steht das Fusionsgen unter transkriptioneller Kontrolle des retroviralen Promotors im MoMSV 5'-LTR. Das bakterielle Transposon Tn5 *neo<sup>r</sup>*, das für eine Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase kodiert, dient der späteren dominanten Selektion stabiler Transfektanten beziehungsweise Infektanten in Gegenwart des Neomycin-Analogon Genitacin<sup>®</sup>-Sulfat (G418). G418 tötet Zellen durch Inhibition der ribosomalen Proteinbiosynthese, Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase interferiert mit dem Transport der Droge in die Zellen (als Übersichtsartikel siehe Davies und Smith, 1978). Der bakterielle Promotor des Tn5 *neo<sup>r</sup>*-Gens ist durch den Promotor für die Expression der frühen Gene des SV40-Virus ersetzt (Fiers et al., 1978). Sequenzen aus pBR322, inklusive Replikationsstartpunkt und  $\beta$ -Lactamase-Gen, dienen der Vermehrung der retroviralen Expressionskonstrukte in Bakterien. Die Nukleotid- und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz von pL[scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ ]SN sind in Abbildung 12 dargestellt.

#### 4.8 *In vitro* Transkription/Translation des chimären Rezeptors

Die Klonierung der cDNA des chimären Rezeptors war sehr komplex. Zur Überprüfung, ob ein entsprechendes Protein synthetisiert werden kann, wurde die cDNA des scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Rezeptors *in vitro* transkribiert und translatiert. Dazu wurde die cDNA in SP6-Orientierung in den Transkriptionsvektor pGEM-1 subkloniert (vgl. 4.7). Dieser Vektor hat zwei Phagenpromotoren, T7 und SP6, zur *in vitro* Transkription der inserierten cDNA mit RNA-Polymerasen aus den Bakteriophagen T7 oder SP6. Die scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -cDNA wurde mit SP6-RNA-Polymerase transkribiert. Anschließend wurde die *in vitro* synthetisierte mRNA in einem Lysat aus Kaninchenretikulozyten in Gegenwart von L-[<sup>35</sup>S]Methionin translatiert. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte, daß die Translation der *in vitro* Transkripte zur Synthese eines Proteins mit dem erwarteten Molekulargewicht führte (Abbildung 13, Spur 4; das Molekulargewicht von scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$  wurde aus der Aminosäuresequenz berechnet und beträgt inklusive Signalpeptid 51,1 kDa). Die *in vitro* translatierten Proteine wurden mit dem mAkH146-968, der gegen das C-terminale Peptid der  $\zeta$ -Kette gerichtet ist, immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der mAkH146-968 präzipitiert aus der *in vitro* Translationsreaktion ein Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 50 kDa (Spur 1). Dieses Protein ist nicht detektierbar, wenn die Immunpräzipitation mit dem Kontrollantikörper mAk3-9 (anti-Galliumchelate) durchgeführt wird (Spur 2). Die Tatsache, daß das *in vitro* translatierte Protein in etwa das erwartete Molekulargewicht sowie das C-terminale Peptid der  $\zeta$ -Kette besitzt, beweist die korrekte Klonierung der entsprechenden kodierenden Sequenz.

**Abbildung 13: *In vitro* Synthese des rekombinanten scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Proteins.** 2  $\mu$ g pGEM[scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ ] wurden 3' des Fusionsgens mit BglI linearisiert und nachfolgend mit SP6-RNA-Polymerase transkribiert (siehe 3.4.17). Die *in vitro* Transkripte wurden in einem Lysat aus Kaninchenretikulozyten in Gegenwart von L-[ $^{35}$ S]Methionin translatiert (Reaktionsvolumen 50  $\mu$ l; siehe 3.4.18). Je 20% des Translationsansatzes wurden einer Immunpräzipitation mit 2  $\mu$ g mAkH146-968 (anti- $\zeta$ ; Spur 1) oder mAk3-9 (anti-Galliumchelate; Spur 2) unterzogen (siehe 3.4.29). Die immunpräzipitierten Proteine und 2  $\mu$ l des Translationsansatzes (Spur 4) wurden mittels 9% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (siehe 3.4.27). Radioaktiv markierte *in vitro* Translationsprodukte wurden mittels Fluorographie (siehe 3.4.19) sichtbar gemacht und ihr Molekulargewicht anhand radioaktiv markierter Eichproteine bekannten Molekulargewichts (Spur 3) ermittelt.



#### 4.9 Retroviraler Gentransfer des scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Fusionsgens

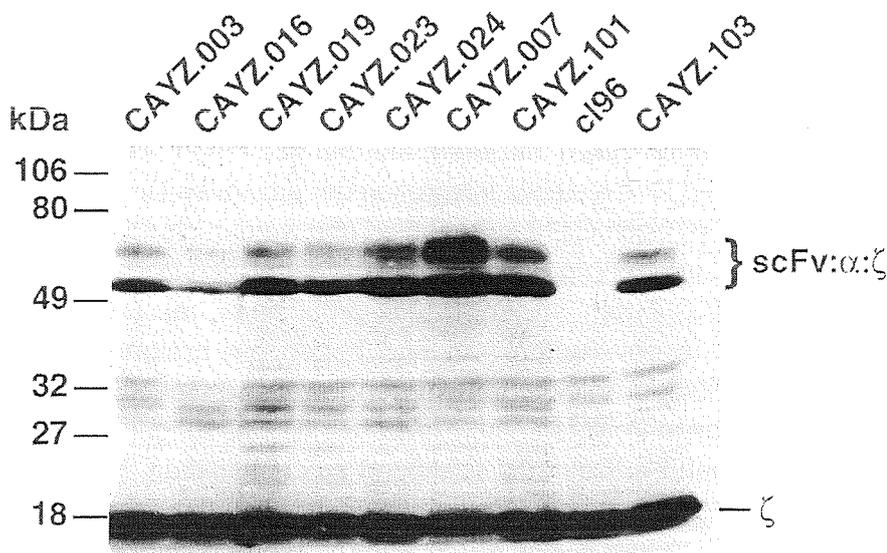
Die helfervirusfreie Verpackungszelllinie  $\Omega$ E wurde durch Calciumphosphat-Präzipitation mit dem Plasmid pL[scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ ]SN transfiziert. Die Verpackungszellen produzieren das ecotrope env-Genprodukt; rekombinante Retroviren können nur Maus- und Rattenzellen infizieren, die den ecotropen Rezeptor exprimieren. Transfizierte Zellen wurden für die stabile Integration der proviralen DNA in Gegenwart von 1 mg/ml des Neomycin-Analogen G418 selektiert und werden als  $\Omega$ E<sub>i</sub>(AYZ) bezeichnet. Die amphotrope Verpackungszelllinie PA317 wurde mit dem Überstand einer Massenkultur G418-resistenter  $\Omega$ E<sub>i</sub>(AYZ)-Zellen infiziert. PA317-produzierte, rekombinante Retroviren besitzen das amphotrope env-Genprodukt und haben ein breiteres Wirtsspektrum, inklusive menschlicher Zellen. Infektionen wurden jeweils in Gegenwart von Polybren durchgeführt. Das Polykation Polybren neutralisiert negative Ladungen auf der Oberfläche von Zellen und retroviralen Partikeln und erleichtert so die Infektion. PA317<sub>i</sub>(AYZ)-Klone wurden wiederum in G418-haltigem Medium selektiert. Der retrovirale Titer der Kulturüberstände verschiedener Klone wurde aufgrund ihrer Fähigkeit ermittelt, G418-Resistenz auf NIH3T3 embryonale Mausfibroblasten zu übertragen. Die Titer einzelner Klone lagen dabei zwischen  $10^3$  und  $10^5$  G418R-KBE/ml (G418-resistente koloniebildende Einheiten). Der Kulturüberstand des PA317<sub>i</sub>(AYZ)-Klons mit dem höchsten retroviralen Titer ( $10^5$  G418R-KBE/ml) diente zur Infektion der murinen zytotoxischen T-Zelllinie cl96. Die Infektion der T-Zellen erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils neuem PA317<sub>i</sub>(AYZ)-Kulturüberstand. G418-resistente Einzelklone, CAYZ.#, wurden selektiert.

Die beschriebene Strategie zum Transfer des scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Fusionsgens in CTLs basiert auf einer Reihe von Vorversuchen im Laufe derer deutlich wurde, daß

infizierte Verpackungszellen einen höheren retroviralen Titer produzieren als transfizierte, und daß mit PA317-Infektanten grundsätzlich ein höherer retroviraler Titer erzielt wird als mit  $\Omega$ E-Infektanten (nicht gezeigt).

#### 4.10 Expression des chimären scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Proteins in c196-CTLs

Die Proteinexpression der scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Chimären wurde mittels Immunoblot-Analyse untersucht. Gesamtzellextrakte von infizierten (CAYZ.#) und parentalen c196-Zellen wurden präpariert. Die Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit dem  $\zeta$ -Ketten-spezifischen mAkh146-968 inkubiert. Abbildung 14 zeigt die Immunoblot-Analyse gesamtzellulärer Lysate von acht individuellen CAYZ-Klonen. Der anti- $\zeta$  mAkh146-968 detektiert in allen acht Lysaten eine Doppelbande von 50 und 70 kDa scheinbarem Molekulargewicht. Die Größe der kleineren Spezies korreliert mit dem aus der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewicht von 49 kDa für den prozessierten scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Rezeptor. In Analogie zu Berichten von Dirk Moritz und Kollegen (1994 und Dirk Moritz, persönliche Mitteilung) könnte es sich bei den größeren Proteinen um posttranslational modifizierte scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Moleküle handeln. Tatsächlich enthält das scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Protein eine putative Konsensussequenz für die Addition N-glykosidisch gebundener Kohlenhydratstrukturen (NST; Aminosäurepositionen 268-270; siehe Abbildung 12).



**Abbildung 14: Expression von scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ .** Von jeweils  $10^7$  Zellen verschiedener CAYZ-Klone sowie von  $10^7$  c196 Wildtyp-CTL (wie indiziert) wurden gesamtzelluläre Proteinlysate (siehe 3.4.26) präpariert. Die Proteine in Aliquoten der Lysate, die  $2 \times 10^5$  Zellen entsprechen wurden mittels 9% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (siehe 3.4.27) und anschließend einer Immunoblot-Analyse (siehe 3.4.34) unterzogen. Die Membran wurde nacheinander mit mAkh146-968 (anti- $\zeta$ ; 0,5  $\mu$ g/ml) und einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Kaninchen-Antiserum gegen Maus-Immunglobuline (1:500; kreuzreagiert mit Hamster IgG) behandelt. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

Die einzige Bande, die von mAkH146-968 im Lysat parentaler cl96-Zellen detektiert wurde, ist die endogene  $\zeta$ -Kette, ein Molekül mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 16 kDa (Abbildung 14; Spur "cl96"). Dieses 16 kDa  $\zeta$ -Protein war in allen Lysaten zu sehen. Die einzelnen CAYZ-Klone exprimierten unterschiedliche Mengen des rekombinanten Rezeptors. CAYZ.007 zeigte die stärkste Expression von scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$  und wurde daher für die weiteren Experimente verwendet.

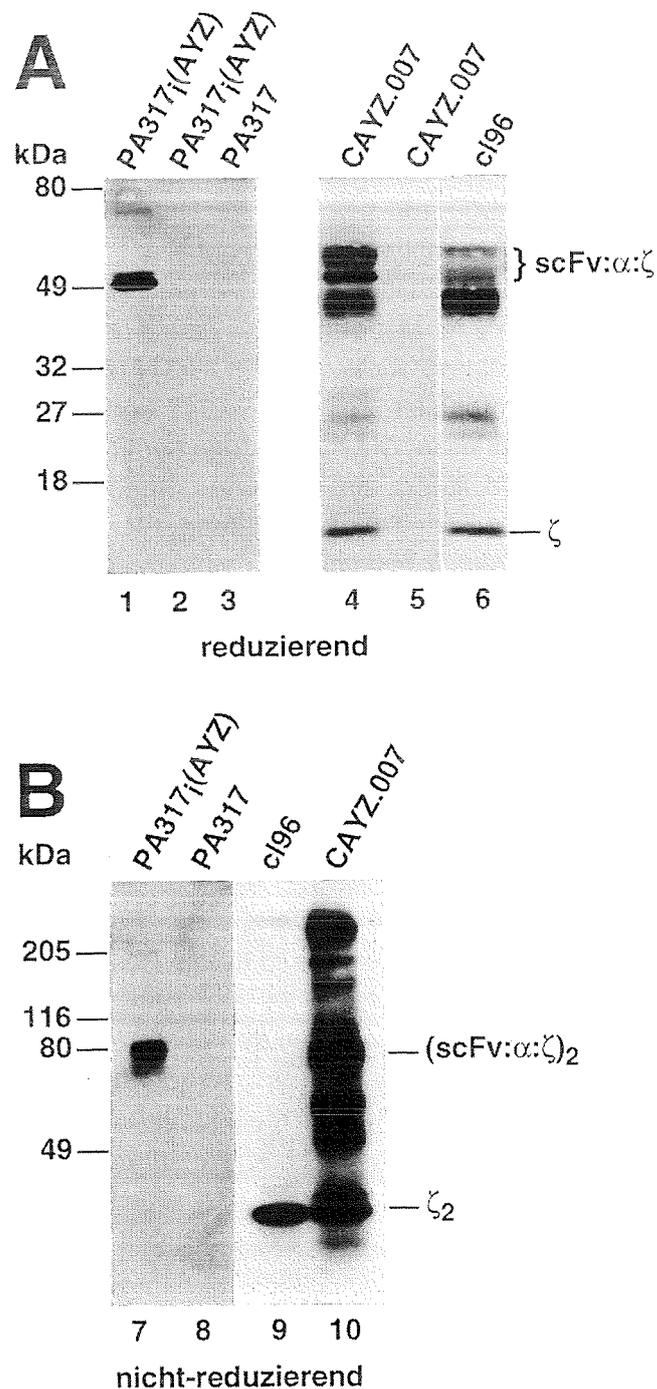
#### **4.11 Oberflächenexpression der scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Chimären in PA317- und cl96-Zellen**

Eine Voraussetzung für die Funktionalität der rekombinanten scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Rezeptoren ist ihre Lokalisation auf der Zelloberfläche der zytotoxischen T-Zellen. Um diese nachzuweisen wurden Zelloberflächenproteine von PA317-, PA317<sub>i</sub>(AYZ)-, cl96- und CAYZ.007-Zellen biotinyliert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Extrakte mit dem anti- $\zeta$  mAkH146-968 inkubiert. Immunkomplexe wurden präzipitiert, in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin inkubiert und präzipitierte Proteine mit einem Substrat für Meerrettichperoxidase und anschließender Autoradiographie visualisiert. scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$  wird sowohl in PA317<sub>i</sub>(AYZ) als auch in CAYZ.007, nicht jedoch in den jeweiligen parental Zelllinien PA317 und cl96, als membranständiger Zelloberflächen-Rezeptor exprimiert. Die Auftrennung der immunpräzipitierten Proteine unter reduzierenden Bedingungen liefert ein ähnliches Bandenmuster wie die Immunoblot-Analyse von Gesamtzellextrakten (vgl. Abbildung 14). Der mAkH146-968 präzipitiert das scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Protein als Molekül mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 50 kDa aus Lysaten von PA317<sub>i</sub>(AYZ)- und CAYZ.007-Zellen (Abbildung 15A, Spuren 1 und 4). Bei den höher migrierenden Spezies handelt es sich vermutlich wieder um Glykosylierungsprodukte. In Lysaten der parental Zelllinien PA317 und cl96 ist das anti- $\zeta$ -reaktive, 50 kDa-Protein nicht enthalten (Spuren 3 und 6). Die 16 kDa-Bande in den Spuren 4 und 6 entspricht der endogenen  $\zeta$ -Kette. Weder das endogene noch das chimäre  $\zeta$ -Protein werden von einem Kontrollantikörper mit irrelevanter Spezifität (mAk3-9; anti-Galliumchelate) präzipitiert (Spuren 2 und 5).

Das scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Fusionsprotein enthält die Transmembran- und zytoplasmatische Domäne der  $\zeta$ -Kette. Ein Cystein an Aminosäureposition 32 des nicht-prozessierten  $\zeta$ -Genprodukts ist für die Ausbildung von disulfidgepaarten  $\zeta$ : $\zeta$ -Homodimeren verantwortlich (Weissman et al., 1988). Um zu testen, ob dieser Cysteinrest zur Ausbildung von Homodimeren der rekombinanten Rezeptoren oder von Heterodimeren mit der endogenen  $\zeta$ -Kette führt, wurde die Auftrennung der Proteine in den anti- $\zeta$ -Immunpräzipitaten unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sind unter anderem intermolekulare Disulfidbrücken stabil. Aus dem PA317<sub>i</sub>(AYZ)-Lysat präzipitiert der mAkH146-968 nur eine Proteinspezies von 80 kDa scheinbarer Molekülmasse. Dabei handelt es sich vermutlich um ein scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Homodimer (Abbildung 15B, Spur 7). Dieses Protein ist im PA317-Lysat nicht enthalten (Spur 8). Die Differenz zwischen der erwarteten Molekülmasse von 98 kDa und dem scheinbaren Molekulargewicht des Dimers von 80 kDa im SDS-Gel resultiert wahrscheinlich aus der teilweise intakten Primärstruktur der Monomere. Intramolekulare Disulfidbrücken in den

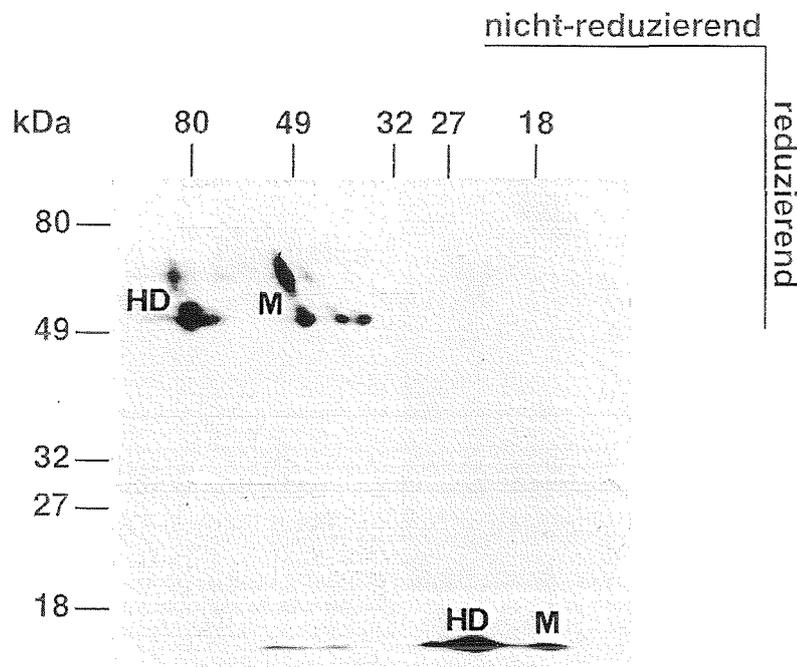
variablen Regionen der schweren und leichten Immunglobulinketten werden unter nicht-denaturierenden Bedingungen ebenfalls bewahrt und bewirken möglicherweise, daß die Proteine im Gel nicht ihrem Molekulargewicht entsprechend wandern. Im anti- $\zeta$ -Immunpräzipitat des CAYZ.007-Extrakts sind neben einer 32 kDa-Bande, die die endogenen  $\zeta$ : $\zeta$ -Homodimere repräsentiert, größere Proteinspezies zu sehen (Spur 10). Die Bande bei 80 kDa könnte auch hier dem Homodimer des rekombinanten Rezeptors entsprechen. Es wird an dieser Stelle nicht klar, ob es sich bei den Banden im Bereich zwischen 50 und 70 kDa um Heterodimere aus endogener und rekombinanter  $\zeta$ -Kette oder Monomere der rekombinanten  $\zeta$ -Kette handelt. Die molekulare Natur der noch größeren

**Abbildung 15: Membranlokalisation der scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Fusionsrezeptoren.** (A) Je  $2 \times 10^7$  PA317-, PA317<sub>i</sub>(AYZ)-, cl96- und CAYZ.007- (wie indiziert) wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, oberflächenbiotinyliert, lysiert und die Extrakte mit  $2 \mu\text{g}$  mAkH146-968 (Spuren 1, 3, 4 und 6) oder mAk3-9 (Spuren 2 und 5) immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Biotinylierte Proteine wurden mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin (1:5000) sichtbar gemacht (siehe 3.4.34). (B) Die Proteine in mAkH146-968-Immunpräzipitaten von Extrakten oberflächenbiotinylierter Zellen (wie angegeben) wurden, wie unter (A) beschrieben, jedoch unter nicht-reduzierenden Bedingungen, analysiert. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.



Proteine wurde nicht untersucht. Im Extrakt der parentalen c196-Zellen ist nur das endogene  $\zeta$ : $\zeta$ -Homodimer als 32 kDa-Bande zu sehen (Spur 9).

Spur 10 in Abbildung 15 zeigt die Analyse des anti- $\zeta$ -Immunpräzipitates eines CAYZ.007-Extraktes unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Aufschluß über die molekulare Natur der 50 bis 70 kDa-Proteine sollte eine zweidimensionale (2D) SDS-Gelelektrophorese geben (Abbildung 16). CAYZ.007-Proteinlysate wurde in der ersten Dimension unter nicht-reduzierenden und in der zweiten Dimension unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Man sieht Monomere der endogenen sowie der rekombinanten ( $\pm$  glykosylierten)  $\zeta$ -Kette, die im 2D-Gel auf der Diagonalen laufen (M). Weiterhin sieht man Heterodimere der endogenen und der rekombinanten  $\zeta$ -Kette (HD). Es gibt jedoch keine Anzeichen für eine Heterodimerisierung der endogenen mit der chimären  $\zeta$ -Kette.

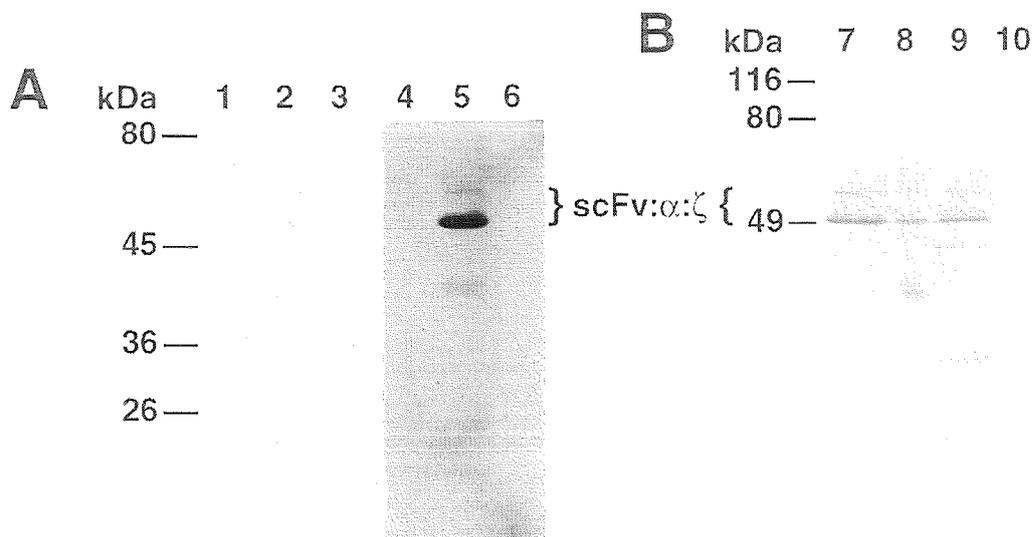


**Abbildung 16: 2D-SDS-PAGE/Immunoblot-Analyse von scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Proteinen.** Von  $2 \times 10^5$  CAYZ.007-Zellen wurde gesamtzellulärer Proteinextrakt (siehe 3.4.26) präpariert. Die Proteine wurden mittels 9% SDS-PAGE in der ersten Dimension unter nicht-reduzierenden und in der zweiten Dimension unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (siehe 3.4.27) und einer Immunoblot-Analyse mit mAkH146-968 unterzogen (vgl. Abbildung 14). M: Monomere; HD: Homodimere. Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

Die Versuche zeigen, daß scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$  (in teilweise glykosylierter Form) auf der Zelloberfläche infizierter Verpackungs- und T-Zellen exprimiert wird. Endogene und chimäre  $\zeta$ -Ketten dimerisieren jedoch nicht miteinander. Es ist unklar, ob das rekombinante  $\zeta$ -Protein im TCR-Komplex lokalisiert ist.

#### 4.12 Antigen-spezifität der gentechnologisch veränderten T-Zellen

Die Bindungsaffinität von scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$  für das CD44v6-Epitop wurde mit dem GST#CD44v4-v7-Fusionsprotein (siehe 4.4) getestet. NP40-Proteinextrakte von PA317; $\zeta$ (AYZ)-Zellen (Abbildung 17A; Spuren 1-3) und CAYZ.007-CTLs (Spuren 4-6) wurden mit affinitätsgereinigtem GST#CD44v4-v7-Fusionsprotein (Spuren 2 und 5) oder GST-Protein (Spuren 3 und 6) inkubiert. Immunkomplexe wurden durch Inkubation mit Glutathion-Agarose präzipitiert und einer SDS-PAGE/Immunoblot-Analyse mit dem anti- $\zeta$  mAkH146-968 unterzogen. Die Daten in Abbildung 17A zeigen, daß scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$  spezifisch mit dem bakteriell exprimierten v6-Epitop interagiert (Spur 2 und 5), während GST (Spur 3 und 6) und Glutathion-Agarose allein (Spur 1 und 4) den chimären Rezeptor nicht präzipitieren.



**Abbildung 17: Bindungsspezifität von scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ .** (A) Je  $2 \times 10^7$  PA317; $\zeta$ (AYZ)- (Spuren 1-3) und CAYZ.007-Zellen (Spuren 4-6) wurden wie unter 2.4.26 beschrieben lysiert. Die NP40-Lysate wurden mit  $2 \mu\text{g}$  affinitätsgereinigtem GST#CD44v4-v7-Protein (Spuren 2 und 5) beziehungsweise GST-Protein (Spuren 3 und 6) und anschließend mit Glutathion-Agarose (Spuren 2, 3, 5 und 6) oder nur mit Glutathion-Agarose (Spuren 1 und 4) inkubiert (siehe 3.4.32). Die präzipitierten Proteine wurden mittels 9% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (siehe 3.4.27) und anschließend einer Immunoblot-Analyse mit mAkH146-968 (anti- $\zeta$ ) und Phosphatase-konjugiertem Ziegen Serum gegen Maus-Immunglobuline (1:1000; Spuren 1-3; siehe 3.4.34) oder Merrettichperoxidase-konjugiertem Kaninchenserum gegen Maus-Immunglobuline (Spuren 4-6; vgl. Abbildung 14) unterzogen. (B) In Spur 7 ist immunpräzipitierbares scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Protein in einem PA317; $\zeta$ (AYZ)-Proteinlysate (wie in Spur 2) dargestellt. Der Überstand einer solchen Präzipitation wurde erneut mit  $2 \mu\text{g}$  GST#CD44v4-v7-Protein behandelt und mit frischer Glutathion-Agarose präzipitiert (Spur 9). Ein Aliquot des Überstandes wurde direkt auf das Gel aufgetragen (Spur 8). Spur 10 zeigt eine Kontrollpräzipitation in Gegenwart von GST-Protein. Die Membran wurde mit mAkH146-968 und Phosphatase-konjugiertem Ziegen Serum gegen Maus-Immunglobuline behandelt (vgl. A). Die Positionen und Molekulargewichte von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte sind angegeben.

Um zu untersuchen, ob wie im Fall des Immuntoxins (vgl. 4.6.2) ebenfalls nur ein verschwindend geringer Anteil des scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Fusionsproteins Affinität zu CD44v6 hat,

wurde der Überstand der Präzipitation eines PA317<sub>i</sub>(AYZ)-Proteinlysats mit GST#CD44v4-v7-Protein erneut einer Präzipitation mit GST#CD44v4-v7 und Glutathion-Agarose unterzogen. Abbildung 17B zeigt, daß die erste Präzipitation (Spur 7) nicht quantitativ ist; im Überstand ist scFv: $\alpha$ : $\zeta$  nachweisbar (Spur 8). Diese im Überstand verbliebenen, chimären Rezeptoren reagieren jedoch mit dem GST#CD44v4-v7-Fusionsprotein (Spur 9). Offensichtlich unterstützen eukaryontische Zellen, im Fall des scFv(1.1ASML), die Ausbildung der korrekten dreidimensionalen Struktur von Immunglobulin-domänen wesentlich besser als Bakterien.

#### 4.13 CD44v6-Epitopexpression in verschiedenen Zelllinien

Sind CTLs, die scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$  exprimieren fähig, an CD44v6-exprimierende Tumorzellen zu binden und diese zu lysieren? Um dies in Gewebekultur zu testen, wurden potentielle Zielzellen, die unterschiedliche Mengen an Ratten-CD44v6-Epitop an der Oberfläche exprimieren zusammen mit diesen CTLs inkubiert. Die Expression von CD44v6 auf den Zielzellen wurde mittels Durchflußzytometrie quantifiziert. 1AS, 10AS und ASML sind die ursprünglich aus dem spontanen Pankreaskarzinom BSp73 der BDX-Ratte etablierten Tumorzelllinien (Matzku et al., 1983). 1AS und 10AS wurden als CD44v6-negative, ASML als CD44v6-positive Zelllinien beschrieben (Günthert et al., 1991; Rudy et al., 1993). AS14 entstand durch stabile Transfektion von 10AS mit der cDNA der CD44-Isoform CD44v4-v7 der Ratte (Günthert et al., 1991). AS14 metastasiert in syngenen Tieren in Lymphknoten und Lunge. Alle Zelllinien wurden nacheinander mit mAk1.1ASML (anti-CD44v6) und PE-konjugiertem Ziegen Serum gegen Maus-Immunglobuline inkubiert und im Durchflußzytometer (FACStar<sup>Plus</sup><sup>TM</sup>, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) analysiert. Kontrollfärbungen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gleichen Isotyps, jedoch irrelevanter Spezifität (mAk3-9), durchgeführt.

Wie man an der relativen Verschiebung des Maximums der Färbung mit mAk1.1ASML gegenüber der Kontrolle mit mAk3-9 erkennt, weist AS14 die stärkste Oberflächenexpression des v6-Epitops auf (Abbildung 18; Diagramm unten links). Wie zu erwarten, ist auch ASML CD44v6-positiv (unten rechts). Die beiden Zelllinien 1AS und 10AS sollten als Negativkontrollen für spätere funktionelle Tests der gentechnologisch veränderten CTLs dienen. Wie die FACS-Analyse zeigt, exprimieren jedoch beide Linien CD44v6 auf ihrer Oberfläche (1AS: Mitte links; 10AS: Mitte rechts) und sind somit nicht geeignet, die Spezifität von CAYZ.007 zu untersuchen. Da offensichtlich keine der Zelllinien des Ratten-Pankreaskarzinoms BSp73 negativ für die v6-Epitop-Expression ist, wurde die cDNA von CD44v4-v7 der Ratte mittels retroviralem Gentransfer in NIH3T3 embryonale Mausfibroblasten eingebracht. Die Infektanten, NIH3T3#CD44v4-v7, sind in der FACS-Analyse deutlich positiv für die Oberflächenexpression des v6-Epitops (Diagramm oben rechts), vergleichbar der Expression in AS14- und ASML-Zellen. Der mAk1.1ASML bindet nicht an die parentalen NIH3T3-Zellen (oben links). Somit kann die Spezifität der scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -exprimierenden CAYZ.007-CTLs an dem Zellpaar NIH3T3/NIH3T3#CD44v4-v7 getestet werden.

Alle analysierten Zelllinien, mit Ausnahme von NIH3T3, exprimieren das Ratten-CD44v6-Epitop auf ihrer Oberfläche. Der mAk1.1ASML erkennt das CD44v6-Epitop in

nativer Form auf der Oberfläche lebender Zellen. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Bindung der scFv(1.1ASML)-Chimären an das v6-Epitop.

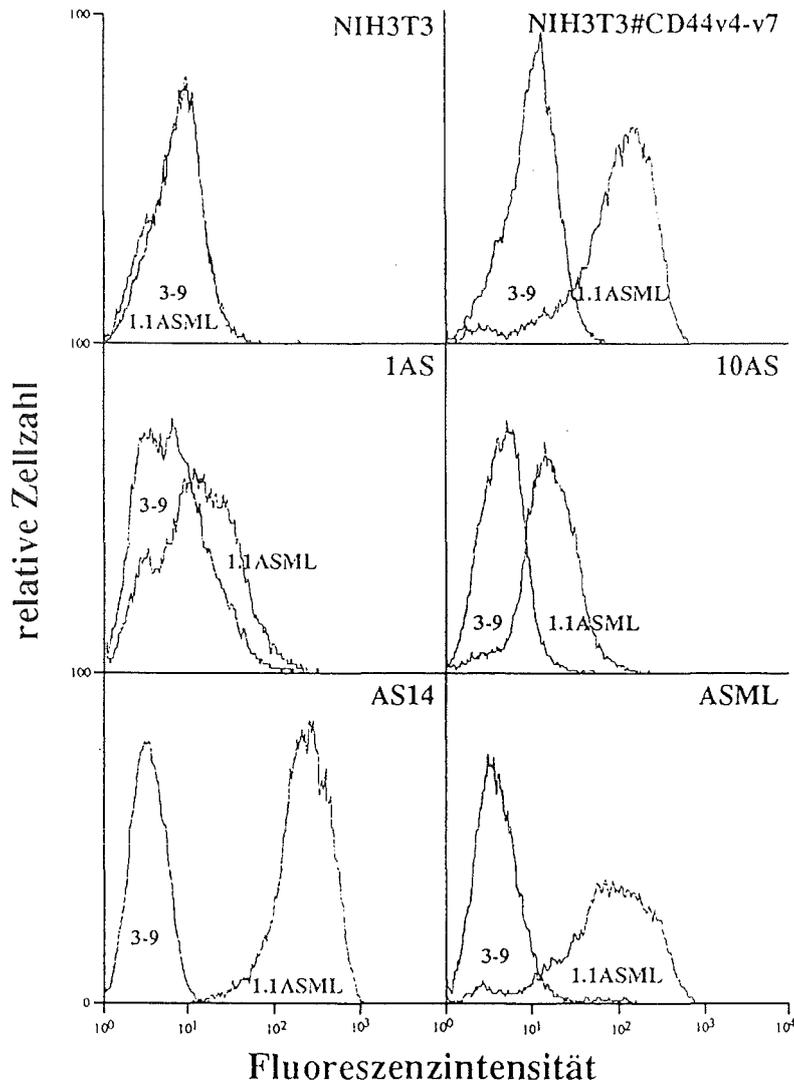


Abbildung 18: v6-Epitop-Oberflächenexpression in verschiedenen Zelllinien. NIH3T3-, NIH3T3#CD44v4-v7-, 1AS-, 10AS-, AS14- und ASML-Zellen (wie indiziert) wurden mit mAk1.1ASML (2 µg/ml) oder mAk3-9 (2 µg/ml) und anschließend mit einem Phycoerythrin-konjugierten Ziegen Serum gegen Maus-IgG (1:500) inkubiert und mittels Durchflußzytometrie analysiert (siehe 3.4.35). Jeweils 10000 lebende Zellen wurden ausgewertet. In den Diagrammen ist die relative Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) aufgetragen.

#### 4.14 *In vitro* Zytotoxizität der scFv:α:ζ-exprimierenden CTLs

Die zytolytische Aktivität der cl96-Infektanten CAYZ.007 wurde *in vitro* durch Kokultivierung mit CD44v6-positiven Zellen bestimmt. Die Freisetzung des stabilen zytoplasmatischen Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) diente als Indikator für die Lyse

der Zielzellen. Die Zellen wurden bei verschiedenen Verhältnissen von Effektor- zu Zielzellen sechs Stunden inkubiert. Danach wurde der LDH-Gehalt in den zellfreien Überständen ermittelt.

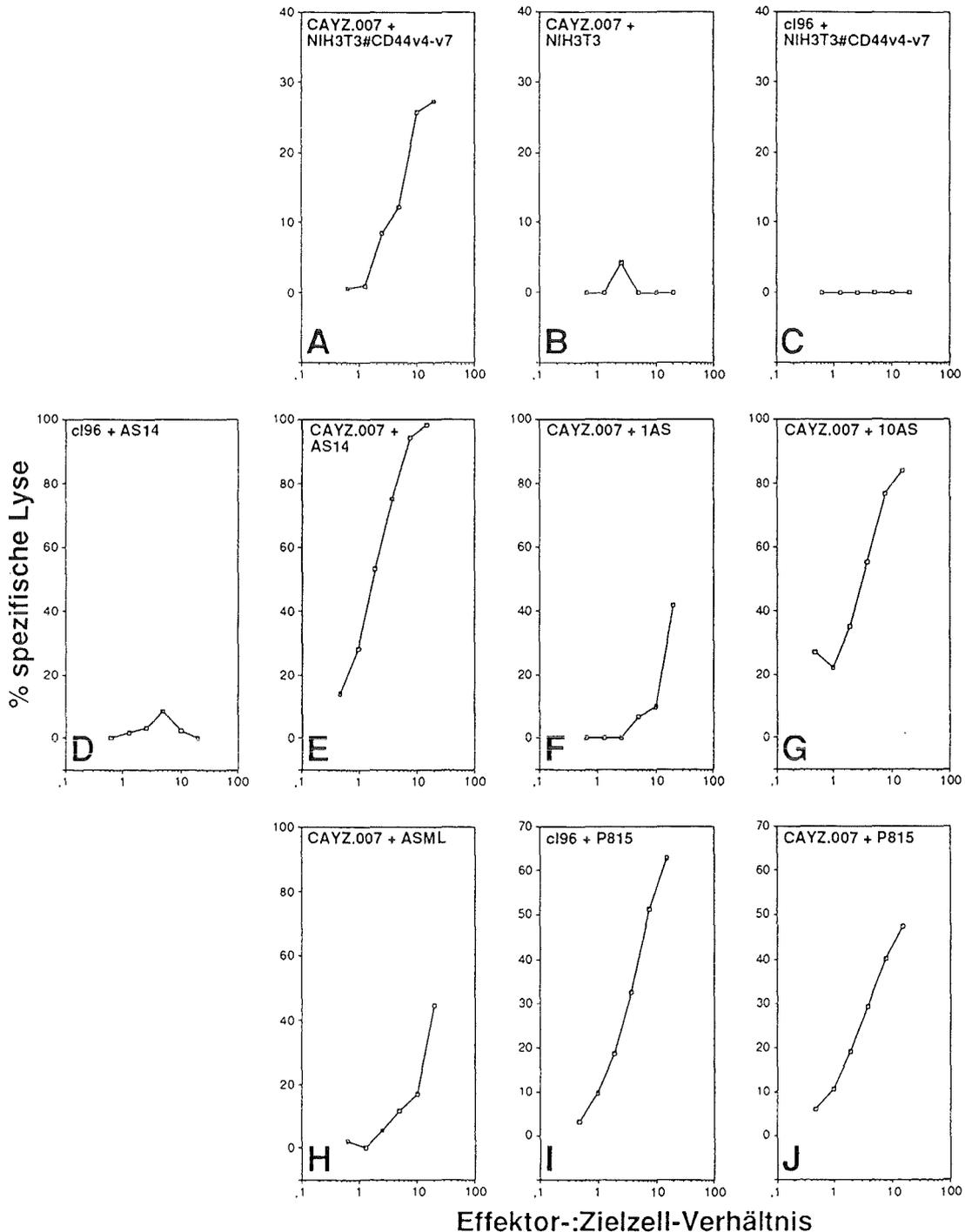


Abbildung 19: *In vitro* Zytotoxizität der scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -exprimierenden CAYZ.007-CTL. Parentale cI96- beziehungsweise infizierte CAYZ.007-CTL (wie angegeben) wurden jeweils in verschiedenen Effektor-Zielzell-Verhältnissen mit NIH3T3-, NIH3T3#CD44v4-v7-, 1AS-, 10AS-, AS14- und P815-Zellen (in den Diagrammen indiziert) in einem nichtradioaktiven Zytotoxizitätstest (siehe 3.4.36) inkubiert. Der Prozentsatz spezifisch lysierter Zielzellen ist in den Diagrammen gegen das Effektor-Zielzell-Verhältnis aufgetragen.

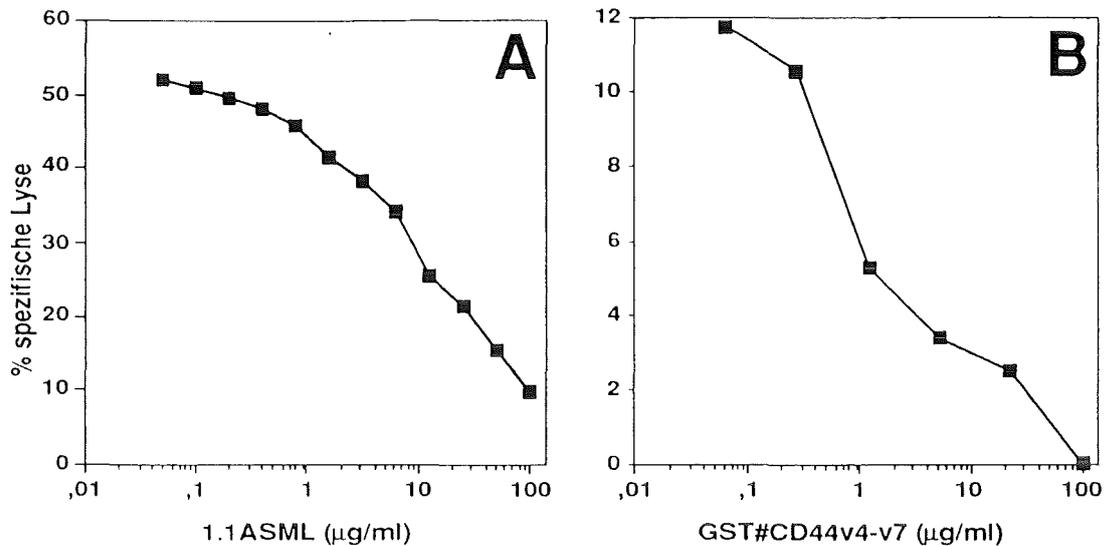
CAYZ.007 lysieren spezifisch NIH3T3#CD44v4-v7 (Abbildung 19A), nicht jedoch die parentalen NIH3T3-Fibroblasten (19B). Die NIH3T3#CD44v4-v7 werden aber nicht von den parentalen cl96-CTLs (19C) lysiert. Zusammengenommen demonstrieren diese Beobachtungen die Spezifität der Erkennung zwischen Zielzellen und CTLs. Die Expression des v6-Epitops der Ratte ist unbedingte Voraussetzung für die Erkennung von Zielzellen durch die "abgerichteten" zytolytischen T-Zellen.

Die FACS-Analyse zeigte unterschiedlich starke Oberflächenexpression des CD44v6-Epitops in den vier, vom BSp73-Ratten-Pankreaskarzinom abgeleiteten Zelllinien (1AS, 10AS, AS14, ASML; vgl. Abbildung 18). Alle vier Zelllinien sind daher geeignete Zielzellen für CAYZ.007. Die v6-Epitop-Expression nimmt von 1AS über 10AS zu AS14 zu. In dieser Reihenfolge steigt auch die Effizienz der Lyse der einzelnen Zielzellen durch CAYZ.007 (19E-G). AS14-Zellen werden unter geeigneten Bedingungen zu 100% lysiert (19E). 1AS exprimiert sehr wenig CD44v6. Die schwache Expression reicht jedoch aus, um von CAYZ.007 erkannt und ebenfalls lysiert zu werden (19E). Offensichtlich müssen nur wenige scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Chimären ihr entsprechendes Antigen binden, damit in der zytotoxischen T-Zelle das Programm "Aktivierung" initiiert wird. Diese Beobachtung wird durch einen Bericht von Thomas Brocker und Klaus Karjalainen gestützt. Sie konnten zeigen, daß die Anzahl ähnlicher rekombinanter Rezeptoren auf der CTL-Oberfläche keinen signifikanten Einfluß auf die Effizienz der Zielzellyse hat (Brocker und Karjalainen, 1995). Dieser Zusammenhang gilt jedoch jeweils nur für eine gegebene Zielzelle. ASML und NIH3T3#CD44v4-v7 unterscheiden sich (schon morphologisch) deutlich von den anderen Zielzellen (Sublinien beziehungsweise daraus abgeleitete Transfektanten, die sich lediglich in der Stärke der CD44v6-Expression unterscheiden) und werden reproduzierbar weniger effizient lysiert.

Die Expression von scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$  in cl96-CTLs interferiert nicht mit der MHC-restringierten Zielzellerkennung. CAYZ.007 lysieren P815-Mastozytomzellen ähnlich effizient wie die parentalen cl96-Zellen (Abbildung 19I,J).

Die Zielzellerkennung wird spezifisch vom scFv-Fragment des mAk1.1ASML auf der Oberfläche der modifizierten T-Zellen vermittelt. In Übereinstimmung damit führen parentale cl96-CTLs in CD44v6-positiven Zielzellen nicht zur LDH-Freisetzung. Dies ist in Abbildung 19 für NIH3T3#CD44v4-v7 (19C) und AS14 (19D) gezeigt.

Ein weiterer Beweis, daß die Zytotoxizität der CAYZ.007-CTLs spezifisch ist, wurde durch Konkurrenzexperimente mit dem monoklonalen Antikörper 1.1ASML bzw. löslichem Antigen erbracht. Zytotoxizitätstests bei einem konstanten Effektor-Zielzell-Verhältnis von 4:1, bei dem zuvor eine etwa 50%ige Lyse von AS14-Zellen erzielt wurde (vgl. Abbildung 19E), wurden in Gegenwart steigender Konzentrationen des mAk1.1ASML durchgeführt. Die in Abbildung 20A dargestellten Daten zeigen erneut, in einem solchen Konkurrenzexperiment, daß die Lyse der AS14-Tumorzellen durch die CAYZ.007-CTLs nach spezifischer Interaktion des scFv(1.1ASML) mit dem v6-Epitop erfolgt. In Abwesenheit des Kompetitors wurden wie erwartet etwa 50% der Zielzellen lysiert. Die Zytotoxizität wird jedoch dosisabhängig von mAk1.1ASML blockiert. Sehr große Mengen an kompetierendem, monoklonalem Antikörper (100  $\mu$ g/ml) sind erforderlich, um die Lyse der AS14-Zellen wirksam zu blockieren (Abbildung 20A). Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der effizienten Lyse von 1AS- und 10AS-Zellen (geringes Oberflächen-Expressionsniveau des v6-Epitops) durch CAYZ.007 (siehe Abbildung 19F,G). Einerseits



**Abbildung 20:** Hemmung der lytischen Aktivität der CAYZ.007-CTL durch mAk1.1ASML oder GST#CD44v4-v7. CAYZ.007-CTL wurden bei einem konstanten Effektor:-Zielzell-Verhältnis von 4:1 mit AS14-Zellen in Gegenwart steigender Konzentrationen des mAk1.1ASML (A) oder GST#CD44v4-v7-Protein (B) inkubiert (siehe 3.4.36). Der Prozentsatz spezifisch lysierter Zielzellen ist in den Diagrammen gegen die Kompetitor-Konzentration aufgetragen.

exprimieren AS14-Zellen große Mengen des v6-Epitops auf ihrer Oberfläche und andererseits reicht die Bindung nur weniger scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Chimären an ihr entsprechendes Antigen aus, um in zytotoxischen T-Zellen das Aktivierungsprogramm zu initiieren. Die v6-Epitope auf den Zielzellen müssen offensichtlich quantitativ von mAk1.1ASML protektiert werden, um die Tumorzellen vor der Erkennung durch die CTLs zu "tarnen" und dazu sind im Fall von AS14-Zellen sehr hohe mAk1.1ASML-Konzentrationen erforderlich. Der Zusatz des Kontrollantikörpers mAk3-9 (hier wurde nur die höchste Konzentration getestet) hatte keinen Einfluß auf die AS14-Lyse durch CAYZ.007-CTLs (nicht gezeigt).

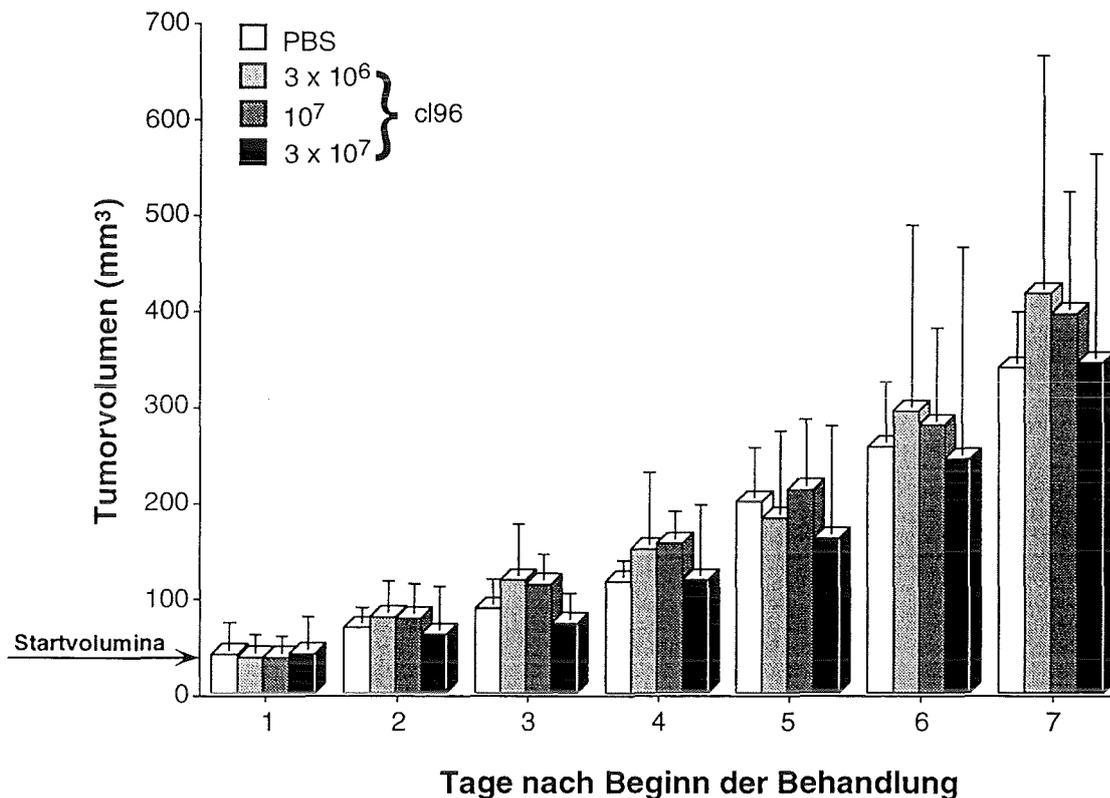
In einem zweiten Wettbewerbsexperiment wurde lösliches Epitop als spezifischer Kompetitor eingesetzt. Zytotoxizitätstests bei einem Effektor:-Zielzell-Verhältnis von 4:1 wurden in Gegenwart steigender Konzentrationen von bakteriell exprimiertem GST#CD44v4-v7-Fusionsprotein (siehe 4.4) durchgeführt. Die spezifische Lyse der AS14-Tumorzellen durch die CAYZ.007-CTLs in Abwesenheit des Kompetitors betrug in diesem Experiment lediglich 12%. In Gegenwart des GST#CD44v4-v7-Proteins konnte die Zielzellyse jedoch vollständig blockiert werden (Abbildung 20B). Wird GST-Protein allein (in einer Konzentration von 100 µg/ml) eingesetzt, wird die Zielzellyse nicht beeinflusst (nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgestellt werden: Die Expression von scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$  verleiht c196-CTLs eine zusätzliche Spezifität; sie erkennen Ratten-CD44v6-exprimierende Zellen. Die Antigenerkennung führt zur Aktivierung der "abgerichteten" CTLs und schließlich zur Zerstörung der Zielzellen.

#### 4.15 Adoptive Immunisierung von Nacktmäusen mit CAYZ.007-CTLs

Die Fähigkeit der gentechnologisch modifizierten CTLs, die das Ratten CD44v6-Epitop erkennen, *in vivo* mit dem Tumorwachstum zu interferieren, wurde an AS14-Tumoren in Nacktmäusen getestet. AS14 Ratten-Tumorzellen wurden subkutan auf den Rücken von thymusaplastischen BALB/c Mäusen injiziert. Das Tumorwachstum wurde anhand von Messungen mit einer Schieblehre verfolgt. Als die Tumore ein mittleres Volumen von etwa 30 mm<sup>3</sup> hatten, was nach drei bis sieben Tagen der Fall war, wurde mit der Applikation von T-Zellen durch die Schwanzvene begonnen.

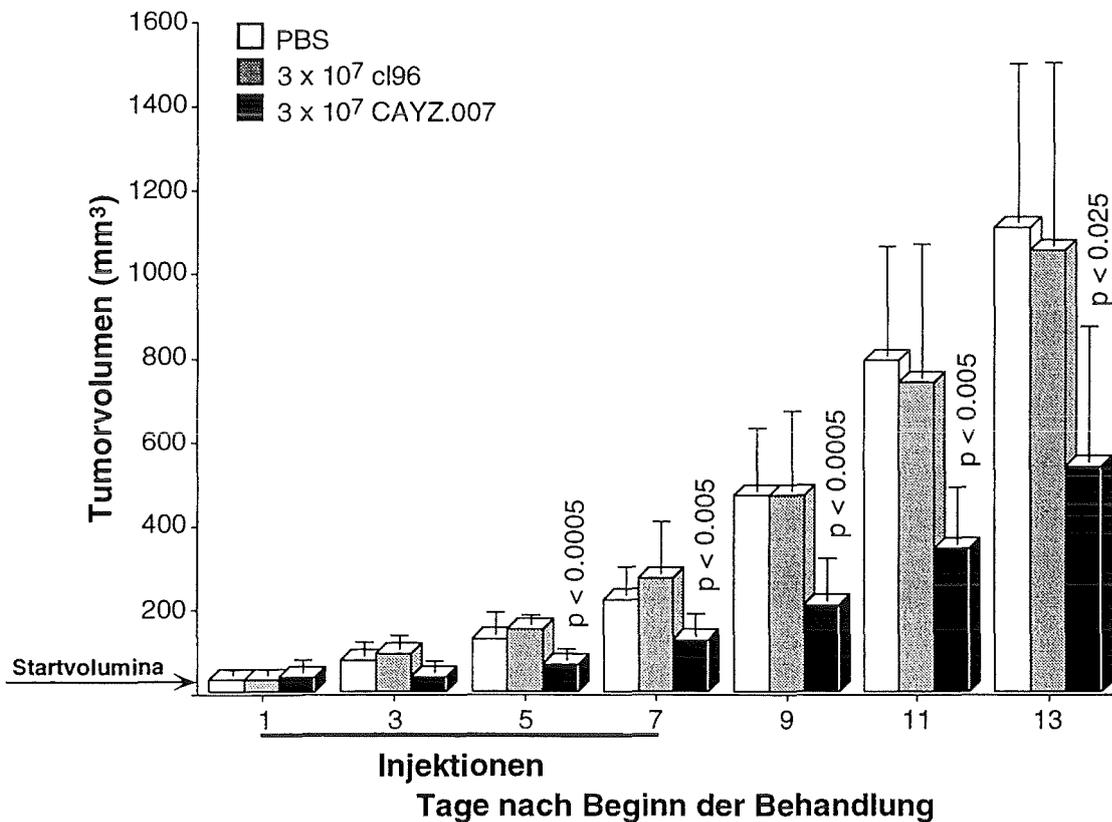
Zunächst sollte ermittelt werden, wieviele CTLs pro Tag in Nacktmäuse injiziert werden können, ohne das Wohlbefinden der Tiere zu beeinträchtigen (was einen negativen Einfluß auf das Wachstumsverhalten des Tumors haben könnte). Je fünf AS14-Tumor-tragende (durchschnittliches Tumolvolumen: 39 mm<sup>3</sup> ± Standardabweichung) Nacktmäuse erhielten an sieben aufeinanderfolgenden Tagen intravenöse Injektionen von  $3 \times 10^6$  (Abbildung 21; hellgraue Säulen),  $10^7$  (dunkelgraue Säulen) oder  $3 \times 10^7$



**Abbildung 21: Parentale cI96-CTL beeinflussen nicht das Tumorwachstum.** BALB/c Nacktmäuse wurden subkutan auf den Rücken mit  $5 \times 10^5$  AS14-Zellen inokuliert. Sobald die Tumore ein durchschnittliches Volumen von etwa 40 mm<sup>3</sup> erreicht hatten, wurde mit der Applikation der T-Zellen begonnen. Je fünf Versuchstiere erhielten sieben Tage lang täglich intravenöse (durch die Schwanzvene) Injektionen von  $3 \times 10^6$  (hellgraue Säulen; durchschnittliches Tumolvolumen zu Beginn der Therapie: 37 mm<sup>3</sup>),  $10^7$  (dunkelgraue Säulen; durchschnittliches Tumolvolumen zu Beginn der Therapie: 37 mm<sup>3</sup>) oder  $3 \times 10^7$  (schwarze Säulen; durchschnittliches Tumolvolumen zu Beginn der Therapie: 41 mm<sup>3</sup>) cI96-CTL. Fünf Kontrolltieren (weiße Säulen; durchschnittliches Tumolvolumen zu Beginn der Therapie: 39 mm<sup>3</sup>) wurde nach demselben Behandlungsschema PBS appliziert. Das Tumolvolumen wurde durch Messung der drei Tumordurchmesser mit einer Schieblehre ermittelt (siehe 3.4.37). Das durchschnittliche Tumolvolumen ist gegen die Zeit (in Tagen) aufgetragen. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

(schwarze Säulen) cl96-CTLs. Eine weitere Gruppe von fünf Versuchstieren erhielt zur Kontrolle des Tumorwachstums in Abwesenheit eines Therapeutikums, tägliche Injektionen von PBS (weiße Säulen). Das durchschnittliche Tumorumfangen ist gegen die Behandlungstage aufgetragen. Der Vergleich der durchschnittlichen Tumorumfangen in den cl96-behandelten Gruppen untereinander, sowie mit denen in der Kontrollgruppe (PBS-Behandlung) zeigt, daß die tägliche Applikation von bis zu  $3 \times 10^7$  cl96-CTLs das Wachstum von AS14-Tumoren in Nacktmäusen nicht beeinflußt. Die tägliche Injektion von  $3 \times 10^7$  CTLs wurde auch von allen Versuchstieren sehr gut toleriert. Eine systemische Toxizität der cl96-CTLs war nicht zu beobachten. In allen folgenden Therapieexperimenten wurden daher, über einen Zeitraum von sieben Tagen, täglich  $3 \times 10^7$  CTLs appliziert.

Durch die Applikation der scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -exprimierenden CTLs läßt sich das Wachstum von AS14-Tumoren in Nacktmäusen signifikant retardieren. Das Ergebnis einer solchen Therapie ist in Abbildung 22 zu sehen. Zwei Kontrollgruppen mit je sieben AS14-Tumor-tragenden Nacktmäusen wurden an sieben aufeinanderfolgenden Tagen durch intravenöse Applikation von entweder  $3 \times 10^7$  cl96-CTLs (graue Säulen) oder PBS (weiße



**Abbildung 22: Adoptive Immunisierung AS14-Tumor-tragender Mäuse.** BALB/c Nacktmäusen mit tastbaren, subkutanen AS14-Tumoren wurde entweder PBS (sieben Mäuse; durchschnittliches Tumorumfangen zu Beginn der Therapie:  $28 \text{ mm}^3$ ; weiße Säulen),  $3 \times 10^7$  parentale cl96-CTL (sieben Mäuse; durchschnittliches Tumorumfangen zu Beginn der Therapie:  $30 \text{ mm}^3$ ; graue Säulen) oder  $3 \times 10^7$  gentechnologisch modifizierte CAYZ.007-CTL (zehn Mäuse; durchschnittliches Tumorumfangen zu Beginn der Therapie:  $34 \text{ mm}^3$ ; schwarze Säulen) appliziert. Die Behandlung beinhaltete tägliche intravenöse Injektionen über einen Zeitraum von sieben Tagen. Nach Beendigung der Therapie wurden die Tiere eine weitere Woche beobachtet. Das Tumorumfangen wurde wie unter Abbildung 21 beschrieben ermittelt. Das durchschnittliche Tumorumfangen ist gegen die Zeit (in Tagen) aufgetragen. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Signifikanz des Unterschiedes zwischen den durchschnittlichen Tumorumfangen von cl96- und CAYZ.007-Gruppe wurde mittels Student t-Test berechnet (3.3.38). Die Irrtumswahrscheinlichkeiten (p) sind angegeben.

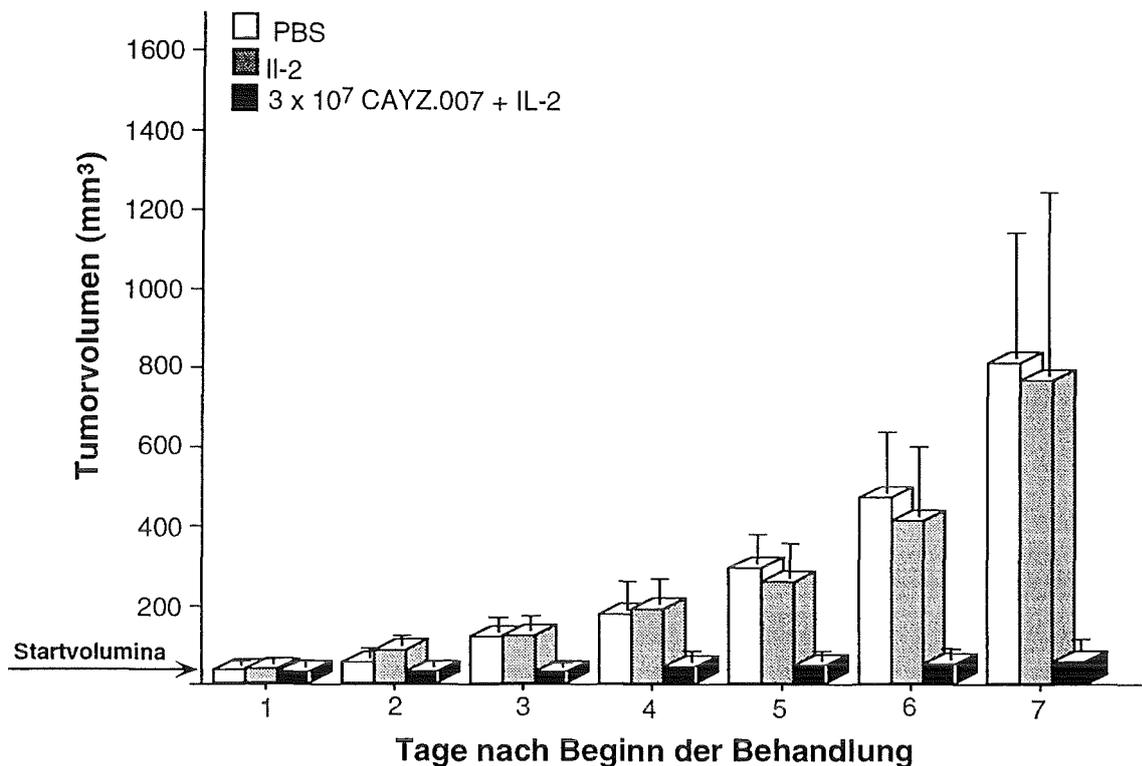
Säulen) behandelt. Eine dritte Gruppe von zehn tumortragenden Versuchstieren erhielt sieben Tage lang tägliche intravenöse Injektionen von  $3 \times 10^7$  der gentechnologisch modifizierten CTLs (schwarze Säulen). Das Startvolumen der Tumore am Tag 1 der Therapie (Tag der ersten Applikation) betrug im Durchschnitt  $31 \text{ mm}^3 \pm$  Standardabweichung. Aufgetragen ist das durchschnittliche Tumolvolumen gegen die Beobachtungstage.

Während das durchschnittliche Tumolvolumen in den beiden Kontrollgruppen (PBS- und c196-Behandlung) innerhalb von zwei Wochen auf mehr als  $1 \text{ cm}^3$  anstieg, vermittelte der adoptive Transfer der CAYZ.007-CTLs eine signifikante Retardierung des Tumorstwachstums. Am Ende des Beobachtungszeitraums (Tag 13 nach Therapiebeginn) waren die Tumore hier durchschnittlich nur halb so groß wie in den Kontrolltieren. Das Experiment wurde am Tag 13 beendet, da zu diesem Zeitpunkt einige der Kontrolltiere Tumore mit einem Volumen von mehr als  $1,5 \text{ cm}^3$  hatten und daher getötet werden mußten. Der Unterschied im Tumorstwachstum war bis zum Tag 13 statistisch signifikant (Student t-Test; vgl. 3.3.38).

Dieses Schlüsselexperiment der gesamten vorliegenden Arbeit beweist, daß die gentechnologisch modifizierten zytotoxischen T-Lymphozyten *in vivo* das Wachstum CD44v6-exprimierender Tumore hemmen. Alle Tiere wurden nach Autopsie auf Metastasenbildung in Lymphknoten und Lunge untersucht. In keinem einzigen der Versuchstiere konnten sekundäre Kolonien nachgewiesen werden. Aus den beschriebenen Versuchen kann, aufgrund des relativ kurzen Beobachtungszeitraumes, nicht der Schluß gezogen werden, daß AS14-Zellen in thymusaplastischen Nacktmäusen nicht metastasieren. Da der Primärtumor bereits zu groß war, mußten die Mäuse wahrscheinlich zu einem Zeitpunkt getötet werden, bevor Metastasen auftreten konnten.

Interleukin-2 (IL-2) ist der wichtigste Wachstumsfaktor für T-Zellen. Sowohl c196-CTLs als auch ihre Infektanten überleben und proliferieren in Zellkultur nur in Gegenwart von IL-2 (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Therapieexperiment der Effekt von systemisch appliziertem IL-2 auf die anti-Tumor-Aktivität von CAYZ.007 untersucht. Nacktmäuse wurden subkutan mit  $5 \times 10^5$  AS14-Tumorzellen inokuliert. Bei Erreichen eines durchschnittlichen Tumolvolumens von etwa  $30 \text{ mm}^3$  wurden sie den folgenden Behandlungsprotokollen unterzogen. Neun Mäuse erhielten an sieben aufeinanderfolgenden Tagen intravenöse Injektionen von PBS (Abbildung 23; weiße Säulen). Fünf Versuchstieren wurden sieben Tage lang täglich  $10^4$  Einheiten humanes rekombinantes IL-2 intraperitoneal injiziert (graue Säulen). Eine dritte Gruppe von sechs Tieren erhielt eine Kombinationstherapie (sieben Tage; täglich), bestehend aus intravenöser Injektion von  $3 \times 10^7$  CAYZ.007-CTLs und intraperitonealer Injektion von  $10^4$  Einheiten humanem, rekombinatem IL-2 (schwarze Säulen).

Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt einen starken additiven Effekt von IL-2 auf die anti-Tumor-Aktivität der "abgerichteten" CTLs. Während IL-2 selbst keine tumorinhibierende Wirkung hatte, wurde durch parallele Applikation von IL-2 der Effekt der gentechnologisch modifizierten CTLs gegenüber dem AS14-Tumor dramatisch verstärkt (schwarze Säulen gegenüber weißen Säulen in Abbildung 23). Die Tumore in der Therapiegruppe (Behandlung mit CAYZ.007-CTLs und IL-2) wuchsen in sieben Tagen nur auf das Doppelte des Startvolumens, während in beiden Kontrollgruppen (Behandlung mit PBS oder IL-2) im selben Zeitraum ein Wachstum um mehr als das 25-fache zu beobachten war.



**Abbildung 23: Kombinationstherapie mit CAYZ.007-CTL und humanem, rekombinatem IL-2.** BALB/c Nacktmäuse mit palpierbaren, subkutanen AS14-Tumoren (durchschnittliches Tumorumfang: 30 mm<sup>3</sup>) erhielten über einen Zeitraum von sieben Tagen entweder tägliche i.p. Injektionen von 10<sup>4</sup> Einheiten humanem, rekombinatem IL-2 (fünf Tiere; durchschnittliches Tumorumfang zu Beginn der Therapie: 34 mm<sup>3</sup>; graue Säulen) oder tägliche i.v. Injektionen von 3 x 10<sup>7</sup> CAYZ.007-CTL in Kombination mit i.p. Injektionen von 10<sup>4</sup> Einheiten IL-2 (sechs Tiere; durchschnittliches Tumorumfang zu Beginn der Therapie: 29 mm<sup>3</sup>; schwarze Säulen). Neun Kontrolltieren (durchschnittliches Tumorumfang zu Beginn der Therapie: 32 mm<sup>3</sup>; weiße Säulen) wurde täglich i.v. PBS appliziert. Das Tumorumfang wurde wie unter Abbildung 21 beschrieben ermittelt. Das durchschnittliche Tumorumfang ist gegen die Zeit (in Tagen) aufgetragen. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Versuchstiere, die die Kombinationstherapie erhalten hatten, wurden eine weitere Woche beobachtet und das Tumorumfang ermittelt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden: CAYZ.007-CTLs retardieren das Wachstum subkutaner AS14-Tumore in Nacktmäusen. Die systemische Applikation von humanem, rekombinatem Interleukin-2 verstärkt diesen Effekt.

## 5. DISKUSSION

Die Expression varianter CD44-Isoformen ist ein Indikator für das Progressionsstadium verschiedener humaner Neoplasien und korreliert oft mit verminderter Überlebenserwartung von Krebspatienten (Mulder et al., 1994; Kaufmann et al., 1995; Stauder et al., 1995). Beim BSp73-Pankreaskarzinom der Ratte konnte der kausale Zusammenhang zwischen der Expression von CD44-Varianten und dem metastatischen Potential von Tumorzellen experimentell bewiesen werden (Günthert et al., 1991; Rudy et al., 1993; Seiter et al., 1993). Sowohl in humanen Tumoren als auch im Rattensystem nehmen v6-Epitop-enhaltende CD44-Isoformen eine herausragende Stellung ein. In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst im BSp73-Rattensystem immunintervenierende Strategien zur Behandlung von Krebs entwickelt werden. Aufgrund ihrer Beteiligung am malignen Prozeß, ihrem tumorassoziierten Auftreten und ihrer extrazellulären Zugänglichkeit sind variante CD44-Isoformen attraktive molekulare "Zielscheiben" für ein solches Vorhaben.

Die Realisierung des Vorhabens sollte auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Einerseits war ein bakterielles Toxin derart zu modifizieren, daß es selektiv an v6-Epitop-exprimierende Zellen bindet und diese eliminiert. Dieses Immuntoxin sollte in großen Mengen in *Escherichia coli* produziert und zur Behandlung von BSp73-Tumoren in Nacktmäusen und Ratten eingesetzt werden. Andererseits sollten zytotoxische T-Lymphozyten artifiziell gegen CD44v6-positive Zellen "abgerichtet" werden und durch Transfer in Nacktmäuse adoptive Immunität gegenüber BSp73-Xenotransplantaten vermitteln.

Beide Strategien bergen Vor- und Nachteile. Immuntoxine lassen sich unter relativ geringem Aufwand in großen Mengen in Bakterien herstellen (Chaudhary et al., 1990; Wels et al., 1992a, b, 1995). Ein therapeutisch wirksames Immuntoxin könnte über die MHC-Schranken hinweg in jedem Krebspatienten eingesetzt werden. Da ein Teil des Immuntoxins jedoch eukaryontischen Ursprungs ist, könnte die Produktion in Bakterien mit Faltungsproblemen verbunden sein. Zudem ist in behandelten Patienten eine Immunantwort gegen den bakteriellen Teil des Immuntoxins zu erwarten, wodurch die Dauer der Applikation limitiert würde. Schließlich besitzen solide Tumore Barrieren, die das Eindringen diffusibler Substanzen erschweren (Jain, 1990), so daß therapeutisch wirksame Mengen des Toxins möglicherweise den Tumor gar nicht erreichen. Letztgenanntem Problem wäre durch den zweiten Ansatz, den Einsatz zytolytischer T-Lymphozyten zu begegnen. Diese Zellen sind in der Lage, Gewebe aktiv zu penetrieren. Hierbei müßte man allerdings den enormen Aufwand in Kauf nehmen, daß CTLs für individuelle Krebspatienten gesondert "abgerichtet" werden müssen. Die ansonsten zu erwartende Alloreaktion verbietet den Transfer von CTLs, die in einem Patienten anti-Tumor-Aktivität entwickeln, in weitere Patienten mit demselben Krankheitsbild. Aufgrund der Vielzahl positiver wie negativer Aspekte der beiden Konzepte sollten von vornherein beide geprüft werden.

## 5.1 Das gescheiterte Projekt

In einem ersten Projekt galt es, ein CD44v6-spezifisches Immuntoxin in Bakterien zu produzieren. Dazu wurde die kodierende Sequenz der minimalen antigenerkennenden Einheit des monoklonalen Antikörpers mAk1.1ASML mit der cDNA der Domänen II, Ib und III des Exotoxin A (ETA) aus *Pseudomonas aeruginosa* fusioniert (Abbildung 8). Wildtyp-ETA wird nach rezeptorvermittelter Endozytose und proteolytischer Prozessierung ins Zytoplasma einer Zielzelle transloziert (Ogata et al., 1990). Dort blockiert es durch ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors-2 (EF-2) die zelluläre Proteinsynthese. Die Domänenstruktur von ETA ist gut charakterisiert (Hwang et al., 1987; Siegall et al., 1989). Translokations- und enzymatische Domäne sind in den Domänen II und III lokalisiert. Domäne I ist für diese beiden Funktionen entbehrlich und kann durch ein scFv-Fragment (oder einen Wachstumsfaktor) ersetzt werden (Debinski et al., 1993; Wels et al., 1992b, 1995). ETA erhält damit eine neue Spezifität. Viele auf diese Weise erzeugte Immuntoxine zeigen wachstumsretardierende Aktivität gegenüber Tumoren *in vitro* und *in vivo*.

Zwar gelang in der vorliegenden Arbeit die Produktion relativ großer Mengen des scFv(1.1ASML):ETA-Immuntoxins in Bakterien, jedoch hatte nur ein geringer Anteil des synthetisierten Proteins Bindungsaffinität zum CD44v6-Epitop der Ratte (Abbildung 10). Trotz großer Anstrengungen konnte dieser Anteil nicht gesteigert werden und das Projekt wurde vorübergehend "auf Eis gelegt". Neue Befunde der Arbeitsgruppe von Andreas Plückthun geben nun Anlaß, das Toxinprojekt wieder "aufzutauen". Durch gezielte Mutationen in "framework"-Regionen variabler Immunglobulindomänen konnte die Ausbeute an korrekt gefalteten, das heißt antigenreaktiven scFv-Fragmenten signifikant gesteigert werden (Knappick und Plückthun, 1995). Möglicherweise ließe sich die Ausbeute an korrekt gefaltetem scFv(1.1ASML):ETA durch analoge Mutationen ebenfalls erhöhen. Mit größeren Mengen antigenreaktiven Immuntoxins wiederum wären funktionelle Analysen durchführbar und somit könnte die anti-Tumor-Aktivität von scFv(1.1ASML):ETA untersucht werden.

## 5.2 Die "Abrichtung" zytotoxischer T-Lymphozyten

Prinzipiell könnte man sich vorstellen, daß das Immunsystem Effektorzellen hervorbringen kann, die transformierte Zellen erkennen und zerstören können. Anhand von Tiermodellen konnte dies auch eindeutig bewiesen werden. Adoptiv transferierte, spezifische T-Lymphozyten sind in der Lage, ansonsten letale Tumore zu eliminieren (Fernandez-Cruz et al., 1982; Shu und Rosenberg, 1985; Kast et al., 1989). Diese Daten wurden allerdings mit immunogenen Tumoren in Tiermodellen gewonnen. Sie sind daher aus klinischer Sicht nur unter der Prämisse, daß humane Tumorzellen von autologen T-Zellen spezifisch erkannt werden können, für die Behandlung humaner Krebserkrankungen relevant. Bei einigen humanen Tumoren war die Suche nach tumorspezifischen T-Zellen erfolgreich, aber ihre Existenz scheint eher die Ausnahme als die Regel zu sein (Rosenberg et al., 1986; Halapi et al., 1993; Baxevanis et al., 1994; Hilders et al., 1994; Freedman et al., 1994; Robbins et al., 1995; Matsuda et al., 1995).

Virusinduzierte Tumore (wie beispielsweise Epstein-Barr-Virus-(EBV)-assoziierte B-Zell-Lymphome) präsentieren autologen T-Zellen viruskodierte, also "fremde" Proteine als MHC-Klasse-I-assoziierte Peptidfragmente. Ein intaktes Immunsystem kann solche

Zellen eliminieren. EBV-assoziierte B-Zell-Lymphome treten dementsprechend vermehrt in immunsupprimierten Patienten auf (als Übersichtsartikel siehe Ioachim, 1990). Dagegen ist bei Tumoren, die durch Mutationen von Proto-Onkogenen hervorgerufen werden, bei einem gegebenen Repertoire an MHC-Haplotypen die Wahrscheinlichkeit sehr gering, daß ein punktmutiertes Onkogenprodukt dem Immunsystem in Form eines MHC-assoziierten Peptids präsentiert wird (Röttschke und Falk, 1991). Mutationen von Tumorsuppressorgenen, die zu deren Inaktivierung und damit zum Auslösen maligner Transformationen führen (Bishop, 1991), können dem Immunsystem überhaupt nicht mitgeteilt werden. Schließlich bedienen sich viele Tumorzellen zur Disseminierung invasiver und migratorischer Eigenschaften, die in der Embryonalentwicklung und einigen spezialisierten Zellen des adulten Organismus eine Rolle spielen (als Übersichtsartikel siehe Herrlich et al., 1993; Bernstein und Liotta, 1994). Sie exprimieren also „selbst“-Antigene. Ob die Expression von diesen Proteinen immunogen ist, ist in Frage zu stellen. Daneben scheint der Palette an Mechanismen, mit Hilfe derer sich Tumorzellen der Immunüberwachung entziehen können, keine Grenze gesetzt zu sein (Cromme et al., 1994a, b; als Übersichtsartikel siehe Restifo et al., 1993).

Es sieht also ganz so aus, als müsse man der Tatsache ins Auge sehen, daß viele Tumore Zelloberflächenstrukturen, die den TCR-Komplex autologer T-Zellen stimulieren können, gar nicht besitzen. Wie wäre nun solchen Tumoren beizukommen? Man beobachtet oft die tumorassoziierte Expression körpereigener Zelloberflächen-Antigene. Monoklonale Antikörper gegen solche tumorassoziierten Antigene können hergestellt werden. Diese wurden sogar - allerdings ohne Erfolg - in einer Reihe klinischer Studien als potentielle Krebstherapeutika eingesetzt (als Übersichtsartikel siehe Riethmüller et al., 1993). Die Ursache liegt auf der Hand: Antikörper sind trotz ihrer beeindruckenden Spezifität und ihrer offensichtlichen Fähigkeit, Tumorzellen zu erkennen, nicht (genügend) zytotoxisch. Um Antikörper zytotoxisch zu machen, wurde ihre Fähigkeit, tumorassoziierte Antigene spezifisch zu erkennen, mit der Fähigkeit von T-Zellen kombiniert, zytolytische Aktivität gegenüber Zielzellen zu entwickeln. Dazu wurden sogenannte bispezifische Antikörper entwickelt, die duale Bindungsspezifität besitzen. Sie binden gleichzeitig an Strukturen auf der Oberfläche von Zielzellen und den TCR-Komplex auf T-Zellen und aktivieren so T-Zell-Effektormechanismen gegenüber der Zelle, mit der ein physikalischer Kontakt besteht (als Übersichtsartikel siehe Fanger und Guyre, 1991). Im Tierexperiment lassen sich mit bispezifischen Antikörpern erstaunliche Therapieerfolge erzielen (Renner et al., 1994). Die humane Tumorthherapie mit bispezifischen Antikörpern wird derzeit jedoch noch durch Probleme limitiert, wie der Unzugänglichkeit vieler solider Tumore für ausreichende Mengen des therapeutischen Immunglobulins (Jain, 1990), der Entwicklung einer Immunreaktion gegen das (meistens murine) Immunglobulin (HAMA für "human anti-mouse antibody") oder der relativ schnellen Dissoziation von Antikörpern von der Lymphozytenmembran (Bolhuis et al., 1991). Durch die Entwicklung bispezifischer sc(Fv)<sub>2</sub>-Fragmente oder sogenannter "diabodies" (Holliger et al., 1993; Gruber et al., 1994; Mack et al., 1995) oder die Bereitstellung humanisierter Antikörper (Jones et al., 1986; als Übersichtsartikel siehe Hurler und Gross, 1994), beziehungsweise in Mäusen generierter humaner Antikörper (Taylor et al., 1992; Choi et al., 1993; Wagner et al., 1994a, b) sind in diesem Forschungsgebiet jedoch in nächster Zukunft Fortschritte zu erwarten.

Eine neue Strategie der "Abrichtung" zytotoxischer T-Lymphozyten zu Werkzeugen einer anti-Tumor-Therapie wurde in der vorliegenden Arbeit beschrieben. Durch Fusion der Antigenbindungsregion von mAk1.1ASML und der  $\zeta$ -Kette des TCR-Komplexes (das Fusionsprotein wird als scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$  bezeichnet) wurde ein CD44v6-spezifischer Zelloberflächenrezeptor mit signaltransduzierenden Eigenschaften generiert. Ein für den chimären Rezeptor kodierendes, synthetisches Gen wurde mittels retroviralem Gentransfer in eine murine zytotoxische T-Zelllinie eingeschleust. Zytotoxische T-Lymphozyten, die den chimären Rezeptor exprimieren, lysierten selektiv CD44v6-positive Zielzellen. Das Wachstum CD44v6-positiver BSp73-Xenotransplantate in Nacktmäusen wurde durch adoptiven Transfer der gentechnologisch manipulierten CTLs signifikant retardiert.

scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$  wird in infizierten Zellen als antigenreaktiver Zelloberflächenrezeptor exprimiert (Abbildungen 14-17). Theoretisch könnten die scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Proteine in verschiedenen Formen an der Oberfläche von Zellen auftreten. In infizierten CTLs könnte eine Assoziation mit endogenen TCR/CD3-Komponenten erfolgen. Außerdem könnte die  $\zeta$ -Transmembrandomäne in CTLs eine kovalente Disulfidbindung zwischen der chimären und der endogenen  $\zeta$ -Kette erlauben. Der chimäre Rezeptor assoziiert jedoch nur mit sich selbst zu disulfidgebundenen Homodimeren, heterodimerisiert aber nicht mit der endogenen  $\zeta$ -Kette (Abbildungen 15 und 16). Da letzterer Befund mit Gesamtzellextrakten infizierter CTLs gewonnen wurde, ist davon auszugehen, daß Heterodimere nicht nur nicht an die Oberfläche gelangen, sondern gar nicht gebildet werden. Die Kolo-kalisation der chimären  $\zeta$ -Kette mit dem TCR-Komplex wurde nicht untersucht. Diese ist jedoch, in Analogie zu einem Bericht von Thomas Brocker und Kollegen (1993), unwahrscheinlich. Ein ähnliches rekombinantes  $\zeta$ -Protein kopräzipitierte in dieser Studie nicht mit Komponenten des TCR-Komplexes. Das heißt, es sollte zu keiner sterischen Behinderung zwischen dem endogenen TCR-Komplex und dem chimären Rezeptor kommen.

### 5.3 CAYZ.007-CTLs haben die "Lizenz zum Töten"

scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -exprimierende CTLs entwickelten mit hoher Spezifität Zytotoxizität gegenüber CD44v6-positiven Zellen *in vitro* (Abbildungen 19 und 20): Alle untersuchten CD44v6-positiven Zielzellen wurden lysiert, während CD44v6-negative Zellen nicht lysiert wurden. Die Zytolyse konnte durch spezifische Kompetitoren, wie den parentalen monoklonalen Antikörper oder bakteriell exprimiertes v6-Epitop, blockiert werden. Dazu waren allerdings sehr hohe Kompetitorkonzentrationen erforderlich. Ähnlich hohe Konzentrationen werden benötigt um die Bindung von radioaktiv markiertem mAk1.1ASML an AS14-Zellen durch nicht-markierten mAk1.1ASML zu inhibieren (Wirth et al., 1993). Selbst bei einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml des nicht-markierten Ig's wurde die Bindung des markierten Ig's an die AS14-Zellen nur zu 98% blockiert. Offensichtlich induziert aber bereits die Bindung weniger chimärer  $\zeta$ -Proteine auf CTLs die Aktivierung der T-Zellen. CD44v6-Epitope auf AS14-Zellen beziehungsweise scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Rezeptoren auf CAYZ.007-CTLs müssen daher nahezu quantitativ protektiert werden, um eine Zielzellyse zu verhindern.

Bei der Effizienz der Zielzellyse ist eine gewisse Abhängigkeit von der Antigendichte zu beobachten, die jedoch offensichtlich ab einem bestimmten Schwellenwert nicht mehr zum Tragen kommt. So wurden 1AS-Zellen, welche nur sehr wenig CD44v6 exprimieren (Abbildung 18), zwar von CAYZ.007-CTLs lysiert, jedoch mit deutlich geringerer Effizienz als 10AS-Zellen, die nur geringfügig mehr CD44v6 exprimieren. 10AS-Zellen wurden mit fast identischer Effizienz lysiert wie AS14-Zellen, die stark positiv für CD44v6 sind. Zielzellen sind also ab einem gewissen Expressionsniveau des Antigens maximal sensitiv für die Lyse durch die gegen sie "abgerichteten" CTLs. Diese Sensitivität wird durch ein höheres Antigenexpressionsniveau nicht mehr gesteigert. Die *in vitro*-Experimente zeigen auch, daß der geschilderte Zusammenhang jeweils nur auf eine bestimmte Zelllinie zutrifft. 1AS, 10AS und AS14 sind miteinander verwandt. 1AS und 10AS unterscheiden sich lediglich in der Passagenzahl, AS14 ist durch Transfektion aus 10AS hervorgegangen. Zwei andere Zielzellenlinien, nämlich NIH3T3#CD44v4-v7- und ASML-Zellen, waren deutlich resistenter gegenüber der Lyse durch CAYZ.007-CTLs, obwohl sie ebensoviel CD44v6-Epitop auf ihrer Oberfläche haben wie AS14-Zellen. ASML-Zellen sind auch gegenüber anderen Lysemechanismen des Immunsystems, wie zum Beispiel der Komplementlyse sowie der Lyse durch NK-Zellen, Makrophagen und allogene T-Zellen, resistenter als AS14-Zellen (Arch, 1994). Diese Beobachtungen sind wahrscheinlich auf morphologische Unterschiede zurückzuführen, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll.

Sehr geringe Mengen an CD44v6, wie man sie auf der Oberfläche von 10AS-Zellen findet, reichen aus, um Zielzellen nahezu optimal gegenüber der Lyse durch CAYZ.007 zu sensitivieren. Dieser Befund steht nicht im Widerspruch zur beobachteten Kinetik der Inhibition der Lyse durch mAk1.1ASML. AS14-Zellen haben auf ihrer Oberfläche etwa  $1,8 \times 10^6$  CD44v6-Epitope (Wirth et al., 1993). In Analogie zu der beobachteten, sehr effizienten Lyse der 10AS-Zellen sollte man trotz 98%iger Blockierung der Epitope auf AS14-Zellen in Gegenwart von 100 µg/ml mAk1.1ASML maximale Lyse erwarten. Die Fähigkeit des mAk1.1ASML, die Lyse zu blockieren, basiert sicher einerseits auf der direkten Protektion der v6-Epitope. Um die beobachtete Effizienz der Inhibition zu erklären, muß man allerdings weitere, indirekte Einflüsse des mAk1.1ASML auf die AS14-Lyse postulieren. Eine Möglichkeit wäre, daß an AS14-Zellen gebundene Immunglobulin-Moleküle den Zugang der CAYZ.007-CTLs sterisch behindern.

Die adoptive Immunisierung AS14-Tumor-tragender Nacktmäuse mit den gentechnologisch modifizierten CTLs hatte eine signifikante wachstumsinhibierende Wirkung auf diese Tumore (Abbildung 22). Bei genauer Betrachtung des Diagramms fällt jedoch auf, daß der anti-Tumor-Effekt nur bei kleinen Tumoren ausgeprägt ist. Von Tag 1 der Behandlung bis Tag 3 verdreifachte sich das Tumolvolumen in Kontrolltieren nahezu, in CAYZ.007-behandelten Versuchstieren dagegen wuchsen die Tumoren nur minimal. Danach wuchsen die Tumore, wenn auch zeitversetzt, in allen Gruppen mit derselben Kinetik. Die Zahl neugebildeter Tumorzellen überwiegt ab einem gewissen Tumolvolumen bei weitem die Zahl der eliminierten, so daß kein anti-Tumor-Effekt mehr zu beobachten ist. Dieser Befund zeigt, daß wie bei allen Tumortherapiekonzepten, möglichst kleine Tumore oder minimale, residuelle Erkrankungen nach chirurgischen Eingriffen, auch für die vorgestellte Strategie die lohnendsten Ziele sein werden.

#### 5.4 Eine Steigerung der Effizienz ist dringend erforderlich

Die gezeigten *in vivo* Daten wurden durch tägliche Injektion von  $3 \times 10^7$  CAYZ.007-CTLs erzielt. Bei Applikation von weniger Zellen war kein Therapieerfolg zu erkennen (nicht gezeigt). Man wagt gar nicht, diese Zahl anhand des Körpergewichts auf andere Organismen zu extrapolieren. Schon bei der Ratte (etwa 250 g Körpergewicht) kommt man dabei auf  $3 \times 10^8$  Zellen pro Tag und Versuchstier. Dies liegt weit jenseits der Kapazität eines Forschungsinstitutes. Außerdem wurde hier mit einer T-Zelllinie gearbeitet, unter Bedingungen also, die praktisch unlimitierten Nachschub an therapeutischen T-Zellen gewährleisten. Diesen Vorteil kann man unter realistischen Bedingungen, also der Therapie von Tumorpatienten mit autologen, gentechnisch manipulierten T-Zellen nicht nutzen. Warum ist also diese immense Zahl von Zellen nötig und wie ließe sie sich reduzieren?

Eine sehr einfache Erklärung wäre, daß die "abgerichteten" T-Zellen *in vivo* (genau wie *in vitro*) in Abwesenheit von IL-2 nicht proliferieren. Konsequenterweise war der anti-Tumor-Effekt der CAYZ.007-CTL in Gegenwart von IL-2 wesentlich deutlicher ausgeprägt; das Wachstum der AS14-Tumore wurde fast vollständig blockiert (Abbildung 23). Die Einschleusung anderer Gene, wie beispielsweise des IL-2-Gens in Kombination mit dem scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Gen könnte die anti-Tumor-Aktivität der CTLs steigern. Ein entsprechendes retrovirales Expressionskonstrukt, in dem die cDNAs von scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$  und IL-2 durch die interne ribosomale Bindungsstelle des Encephalomyocarditis-Virus (Ghattas et al., 1991; Duke et al., 1992; als Übersichtsartikel siehe Mountford und Smith, 1995) miteinander verbunden sind, kloniere ich gerade. Diese Strategie erlaubt die Expression beider Proteine von einem polycistronischen mRNA-Molekül.

Der Bedarf eines enormen Überschusses an manipulierten CTLs zur Erzielung eines Therapieerfolgs könnte auch daran liegen, daß zu wenige der manipulierten CTLs die Tumore infiltrieren. Es muß hier erneut darauf hingewiesen werden, daß in dieser Arbeit eine T-Zelllinie verwendet wurde, deren Fähigkeit, in Tumore einzudringen, nicht vorausgesetzt werden kann. Man könnte jedoch auf T-Zellen zurückgreifen, die bereits im Tumor lokalisiert sind. Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs), unter denen sich auch tumorreaktive T-Zellen befinden, können in vielen Fällen aus Tumoren präpariert werden (Rosenberg et al., 1986; Halapi et al., 1993; Baxevanis et al., 1994; Hilders et al., 1994; Freedman et al., 1994; Robbins et al., 1995; Matsuda et al., 1995). TILs können *ex vivo* in Gegenwart von IL-2 expandiert werden und Patienten in Form einer systemischen, adoptiven Immuntherapie zurückinfundiert werden (Rosenberg et al., 1988, 1994). Da die "homing"-Spezifität von Lymphozyten, also ihre Präferenz, bestimmte Gewebe zu penetrieren, streng reguliert wird (als Übersichtsartikel siehe Mackay, 1993; Picker, 1994), hofft man, daß auch TILs eine solche Präferenz haben und den Tumor infiltrieren, aus dem sie isoliert wurden. Tatsächlich findet man, intravenös verabreichte,  $^{111}\text{Indium}$ -markierte TILs im Tumor von Krebspatienten, aus denen sie gewonnen wurden (Fisher et al., 1989; Griffith et al., 1989; Pockaj et al., 1994). Pionierarbeit bei der gentechnologischen "Abrichtung" von TILs wurde von Patrick Hwu und Kollegen (1993) geleistet. Sie exprimierten in humanen TILs chimäre Rezeptoren, bestehend aus einem scFv-Fragment und der  $\gamma$ -Kette von Immunglobulin-Fc-Rezeptoren. Die  $\gamma$ -Kette ist ein zur  $\zeta$ -Kette homologes Protein mit signaltransduzierenden Eigenschaften. Die modifizierten TILs entwickelten *in vitro*, mit hoher Spezifität, Zytotoxizität gegenüber Zielzellen, die das entsprechende Antigen als Oberflächenprotein exprimierten. *In vivo* Daten dazu liegen zur Zeit noch nicht vor. Ein

nicht zu unterschätzendes Problem bei der "Abrichtung" von TILs ist, daß Langzeit-Krebspatienten oft immunsupprimiert sind. Eine der Ursachen dafür ist, daß die Tumorexposition in humanen tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten eine drastisch verminderte Expression der  $\zeta$ -Kette des TCR-Komplexes verursachen kann (Finke et al., 1993). Ob diese Beobachtung auf der spezifischen Suppression des  $\zeta$ -Promotors oder auf posttranslationalen Mechanismen beruht, ist derzeit noch nicht geklärt. Es ist zu testen, ob chimäre svFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Rezeptoren davon betroffen wären. Hierbei wären nur posttranslationale Mechanismen von Bedeutung, vorausgesetzt man exprimiert die chimären scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Rezeptoren nicht unter transkriptioneller Kontrolle des  $\zeta$ -Promotors.

Ein weiterer Grund für die mangelnde Effizienz der manipulierten CTLs in der Tumorabwehr könnte sein, daß sich die, im Vergleich zum TCR, um mehrere Größenordnungen höhere Affinität von Immunglobulinen zu ihrem Antigen (als Übersichtsartikel siehe Davis und Chien, 1993; Karjalainen, 1994) negativ auf die Effizienz der anti-Tumor-Aktivität auswirkt. Die Affinität von scFv(1.1ASML) zum v6-Epitop wurde nicht bestimmt. Jedoch können eukaryontisch exprimierte scFv-Fragmente fast identische Affinität zu ihrem Antigen haben wie der parentale Antikörper, von dem sie abgeleitet sind (Dirk Moritz, persönliche Mitteilung). Nach erfolgter Lyse sollte sich eine zytotoxische T-Zelle von einer Zielzelle ablösen und andere Zielzellen eliminieren. Möglicherweise wird dieser Ablösungsprozess der CAYZ.007-CTLs von lysierten AS14-Zellen durch die hohe Affinität von scFv(1.1ASML) zum CD44v6-Epitop erschwert. *In vitro* wirkt sich dieser Effekt nicht aus. Bei Effektor:-Zielzell-Verhältnissen von bis zu 20:1 muß jede T-Zelle maximal eine Zielzelle eliminieren. *In vivo* sind solche Verhältnisse nicht realisierbar. Die Affinität von scFv-Fragmenten ließe sich jedoch durch willkürliche Mutagenese der entsprechenden kodierenden Sequenzen verringern. Hierzu liegen bereits eigene Erfahrungen vor, die noch nicht gesichert sind und daher nicht im Ergebnisteil erscheinen. Aufgrund PCR-bedingter Punktmutationen ist die Affinität des scFv-Fragmentes eines monoklonalen Antikörpers (mAkVFF18) gegen ein humanes CD44v6-Epitop stark reduziert (Ellen Ostermann, persönliche Mitteilung). Zusätzlich exprimieren infizierte CTLs nur sehr geringe Mengen eines entsprechenden scFv(VFF18): $\alpha$ : $\zeta$ -Rezeptors. Weder die Expression dieses scFv(VFF18): $\alpha$ : $\zeta$ -Proteins (durch Immunoblot-Analyse), noch seine Membranlokalisierung (durch Oberflächenbiotinylierung), noch seine Bindung an ein bakteriell exprimiertes Fusionsprotein aus GST und Sequenzen, die das humane CD44v6-Epitop enthalten, konnte gezeigt werden. Dennoch lysieren diese Zellen spezifisch und mit hoher Effizienz Zielzellen, die das humane CD44v6-Epitop exprimieren. Bei den Zielzellen (A10) handelt es sich um 10AS-Zellen, die mit einem Expressionskonstrukt transfiziert wurden, das die humanen CD44-Exons v4-v7 im Kontext der CD44-Exons 1-5, 16, 17 und 19 der Ratte enthält (Karl-Heinz Heider, persönliche Mitteilung). Während diese Zielzellen von scFv(VFF18): $\alpha$ : $\zeta$ -exprimierenden CTLs lysiert werden, ist keine Lyse der nichttransfizierten AS-Zellen zu beobachten. Parentale cl96-CTLs lysieren A10-Zellen nicht. Offensichtlich ist die geringe Expression eines niederaffinen scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Rezeptors ausreichend, um zytotoxische T-Zellen "abzurichten". Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen Thomas Bocker und Klaus Karjalainen (1995). Sie konnten zeigen, daß minimale Mengen der  $\zeta$ -Chimären ausreichen, um Effektorfunktionen in T-Zell-Hybridomen zu induzieren. Getestet wurde hier die Sekretion von IL-2 und IL-3. Die produzierten Zytokinmengen waren mit denen vergleichbar, die nach TCR-Komplex-Stimulation der T-

Zellen zu beobachten waren. Eine Überexpression des Signalmoleküls konnte den stimulatorischen Effekt nicht steigern.

### 5.5 Systemische Toxizität der anti-CD44v6-CTLs

CD44-Varianten werden wie alle tumorassoziierten Antigene nicht ausschließlich im Tumor exprimiert. Eine solche Exklusivität ist auch nicht zu erwarten. Moleküle, die vermutlich an Invasion und Metastasierung beteiligt sind, wie beispielsweise Urokinase-Plasminogenaktivator, Metalloproteinasen, Integrine und zytoskelettassoziierte Proteine, werden auch in normalen Zellen von Embryonen und adulten Organismen exprimiert (als Übersichtsartikel siehe Bernstein und Liotta, 1994). Die v6-Epitop-enthaltenden CD44-Isoformen machen davon keine Ausnahme, wenn auch ihre Expression im adulten Organismus auf transiente Stadien und Epithelien außerhalb von Basalmembranen beschränkt ist (Arch et al., 1992; Heider et al., 1993; Koopmann et al., 1993; Wirth et al., 1993; Stauder et al., 1995). Prominente Orte mit CD44v6-Expression im adulten Organismus sind aktivierte Lymphozyten, Keratinozyten in der Haut und die generativen Zellen des Darmepithels an der Basis der Krypten. Einerseits ist unter realistischen Bedingungen, also in der immunkompetenten Situation, eine transiente Immunsuppression als Folge der Eliminierung aktivierter Lymphozyten durch CD44v6-spezifische CTLs zu erwarten. Andererseits wurde aber eine Resistenz von CTLs, zumindest gegenüber der Perforin-vermittelten Lyse, beschrieben (Blakeley et al., 1987; Müller und Tschopp, 1994). Daß infundierte "abgerichtete" CTLs in direkten Kontakt mit aktivierten Lymphozyten kommen, ist anzunehmen. Aber gelangen CD44v6-spezifische CTLs auch in die anderen Gewebe, die das v6-Epitop exprimieren? Aufgrund von Befunden über gewebespezifisches "homing" von Lymphozyten muß dies vermutet werden (als Übersichtsartikel siehe Mackay, 1993). So wird zum Beispiel über einen Darmtropismus von *in vitro* aktivierten T-Zellen berichtet. Auch die Haut ist stark von T-Zellen infiltriert (Mackay et al., 1994). Prinzipiell besteht also die Möglichkeit, daß "abgerichtete", CD44v6-spezifische CTLs auf CD44v6-positive Zellen in Normalgeweben treffen. Die systemische Toxizität scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -exprimierender CTLs gegenüber Normalgeweben muß in Ratten untersucht werden. Hier wird sich dann erweisen, ob Unterschiede in der Empfindlichkeit verschiedener Zellen gegenüber der Lyse durch die "abgerichteten" T-Zellen existieren. Es ist unklar, ob bedingt durch die Expression geringster Mengen des v6-Epitops Zellen in Normalgeweben zerstört werden und welche Konsequenzen dies für den Gesamtorganismus hat.

### 5.6 Perspektiven für die Zukunft

Nach der eigentlichen Pionierarbeit in den Labors von Zelig Eshhar, Steven Rosenberg und Klaus Karjalainen (Eshhar et al., 1993; Hwu et al., 1993; Brocker et al., 1993; Stancowski et al., 1993) waren Dirk Moritz und Kollegen (1994) die ersten, denen es gelang, einen therapeutischen Effekt "abgerichteter" CTLs in lebenden Organismen zu zeigen. In dieser Studie konnte das Wachstum von murinen embryonalen NIH3T3-Fibroblasten, die mit dem humanen c-erbB-2-Onkogen transformiert waren, in Nacktmäusen

durch Behandlung der Versuchstiere mit anti-erbB2-CTLs signifikant verlangsamt werden. Zusammen mit diesen Daten sind die hier beschriebenen Experimente ein vielversprechender Anfang zur Entwicklung einer Tumor-/Metastasentherapie auf immunbiologisch/gentechnologischer Basis. Es war zwar innerhalb des Rahmens der vorliegenden Arbeit - CD44-positive Primärtumore in immundefizienten Nacktmäusen - gelungen, variante Isoformen des Oberflächenglycoproteins CD44 als Zielantigene einer gerichteten Tumorimmuntherapie zu benutzen. Die Hürden, die es auf dem Weg bis zur Realisierung der Zukunftsvision - Tumor- oder Metastasenimmuntherapie mit gentechnologisch veränderten T-Zellen am Menschen - zu überwinden gilt, sind jedoch sehr hoch.

Der nächste Schritt wäre die Modifikation primärer Lymphozyten mit dem scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Rezeptor. Zunächst sind die durch Aktivierung der  $\zeta$ -Kette initiierten Signale nicht ausreichend, um ruhende T-Zellen zu aktivieren (Brockner und Karjalainen, 1995). Ruhende T-Lymphozyten aus transgenen Mäusen, die in ihrem T-Zell-Kompartiment einen scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Rezeptor exprimieren, sind nicht über diesen Rezeptor aktivierbar. Dies trifft auch für den Fall zusätzlicher Kostimulation über CD4, CD8, CD28, CD45 oder den IL-2-Rezeptor zu. Dieses Resultat scheint für den Ansatz der Infektion autologer T-Zellen mit genetisch manipulierten Retroviren belanglos zu sein, denn die momentan verwendeten Retroviren können nur proliferierende Zellen infizieren. Zu infizierende primäre T-Zellen müssen also präaktiviert werden; dies kann zum Beispiel mit Antikörpern gegen CD3 erfolgen. Präaktivierte transgene T-Zellen (siehe oben) sind aber über scFv: $\alpha$ : $\zeta$  stimulierbar (Brockner und Karjalainen, 1995).

Bei der Infektion primärer Lymphozyten könnte man auch andere Zellen des Immunsystems rekrutieren, die eine positive Wirkung auf den Therapieerfolg haben könnten. Durch Expression des scFv(1.1ASML): $\alpha$ : $\zeta$ -Rezeptors in CD4-positiven T-Zellen würde man tumorspezifische T-Helferzellen erzeugen. Nach Aktivierung durch Bindung an die Tumorzellen könnten CD4-positive T-Helferzellen große Mengen IL-2 sezernieren, und es in der lokalen Umgebung des Tumors tumorspezifisch "abgerichteten" CTLs zur Verfügung stellen. Der positive Einfluß von IL-2 auf die anti-Tumor-Aktivität von CAYZ.007-CTL wurde beschrieben. Daß die "Abrichtung" primärer T-Lymphozyten auf diese Art und Weise generell machbar ist, zeigen die Experimente von Patrick Hwu und Kollegen (1993).

Sollte die vorgestellte Strategie jemals zu klinischer Relevanz gelangen, muß die Prozedur der T-Zell-Explantation, der Infektion, Selektion und Expansion für jeden einzelnen Patienten durchgeführt werden. Dies bedeutet einen immensen zeitlichen wie technischen Aufwand. Vielleicht ist es dann schon zu spät für eine Therapie des betreffenden Patienten. Wünschenswert wäre die parallele Entwicklung von *in vivo* Gentransfer-Technologien. Diese könnten wieder auf retroviralen Vektorsystemen basieren. Durch die Expression eines scFv-Fragmentes als Fusion mit dem retroviralen env-Genprodukt in der Hülle von Retroviren, läßt sich deren Wirtsspektrum erweitern (Russell et al., 1993). Gelänge es gleichzeitig, Sequenzen im env-Protein, die für die traditionelle Interaktion mit Wirtszellen verantwortlich sind, selektiv zu deletieren, hätte man Retroviren, deren Wirtsspektrum willkürlich verändert werden kann. CD4- oder CD8-spezifische Retroviren würden dann beispielsweise nur T-Zellen infizieren. Mit den herkömmlichen Retroviren wären damit aber wieder nur präaktivierte T-Lymphozyten zu erreichen. Denkbar ist die Entwicklung neuer retroviraler Gentransfer-Konzepte auf der Basis von

Lentiviren (wie zum Beispiel HIV-1). Lentiviren sind Retroviren, die im Gegensatz zu Onkoretroviren auch nichtproliferierende Zellen infizieren können (Lewis et al., 1992). Lentiviren haben dazu einen Mechanismus entwickelt, der einen aktiven Transport des viralen Präintegrationskomplexes durch Kernporen in den Zellkern erlaubt (Bukrinsky et al., 1992, 1993; Heinzinger et al., 1994; von Schwedler et al., 1994; Gallay et al., 1995). Onkoretroviren bedürfen dazu des Zusammenbruchs der Kernmembran während der Mitose (Roe et al., 1993; Lewis und Emerman, 1994).

Im Hinblick auf die *in vivo* Infektion von T-Zellen ist allerdings wieder zu berücksichtigen, daß die Signale, die durch scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Rezeptoren induziert werden, nicht ausreichen, um ruhende T-Lymphozyten zu aktivieren (Brockner und Karjalainen, 1995). Die scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Chimären sind nicht im TCR-Komplex lokalisiert (Brockner et al., 1993). Denkbar wäre die Fusion von scFv-Fragmenten mit der konstanten Region von entweder TCR $\alpha$  (TCR:C $\alpha$  für „constant“ Region der TCR  $\alpha$ -Kette) oder TCR $\beta$  (TCR:C $\beta$ ) und die damit verbundene direkte Assoziation der neuen Spezifität mit dem TCR-Komplex. Möglicherweise ließe sich auf diesem Weg die gesamte Signalkapazität des TCR-Komplexes ausnutzen, die auch die Aktivierung ruhender T-Zellen erlauben würde. Versuche dazu wurden bereits 1992 von Gross und Eshhar durchgeführt. Die chimären scFv-TCR:C $\alpha$ - oder scFv-TCR:C $\beta$ -Proteine wurden in T-Zell-Hybridomen jedoch nur intrazellulär synthetisiert und assoziierten nicht mit endogenen TCR-Ketten. Als Konsequenz wurden sie wahrscheinlich im ER degradiert und nicht als funktionelle, TCR-Komplex-lokalisierte Oberflächenrezeptoren exprimiert.

Der immense Aufwand ließe sich möglicherweise auch reduzieren, wenn es gelingen würde, scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Konstrukte in hämatopoetische Stammzellen (HSC für "hematopoietic stem cell") einzuschleusen. Damit wären auch noch andere Effektorzellen des Immunsystems zu rekrutieren. Die Expression von scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -Chimären hat keinen negativen Einfluß auf die T-Zell-Entwicklung. Sie ist in den scFv: $\alpha$ : $\zeta$ -transgenen Mäusen nicht gestört (Brockner und Karjalainen, 1995). Würde man zusätzlich ein „Selbstmordgen“, wie beispielsweise das Gen der Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase, in die HSCs einschleusen, könnten die therapeutischen T-Zellen nach Belieben aus dem Organismus eliminiert werden. Dieser Schutzmechanismus wäre im übrigen auch bei der "Abrichtung" peripherer T-Zellen denkbar.

## 5.7 Fazit

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß durch die artifizielle Interaktion zwischen Tumorzellen und (präaktivierten) zytotoxischen T-Lymphozyten die Zerstörung von Tumorzellen induziert werden kann. Die Effizienz ist (in Zellkultur) mit der natürlichen, MHC-restringierten Zielzellyse vergleichbar. Der große Vorteil der "Abrichtung" von T-Zellen ist die Unabhängigkeit von der Präsentation intrazellulärer Neoantigene durch MHC-Klasse-I-Moleküle. Das Spektrum potentieller Zielzellen ist dadurch praktisch grenzenlos. Auf der anderen Seite könnte das Fehlen absoluter Tumorspezifität ernsthafte Probleme bereiten. Perspektiven wurden aufgezeigt, wie die Effizienz der Tumorzellyse gesteigert werden kann und welches die nächsten experimentellen Schritte in Richtung Anwendung bei Tumorkranken sein müssen.

## 6 LITERATUR

- Adachi, M., Watanabe-Fukunaga, R. und Nagata, S.** (1993). Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**: 1756-1760.
- Allison, J. P.** (1994). CD28-B7 interactions in T-cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 414-419.
- Altman, D. G.** (1991). Practical statistics for medical research. Chapman & Hall, London.
- Ames, B. N., Gold, L. S. und Willett, W. C.** (1995). The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 5258-5265.
- Anel, A., Buferne, M., Boyer, C., Schmitt-Verhulst, A.-M. und Golstein, P.** (1994). T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A. *Eur. J. Immunol.* **24**: 2469-2476.
- Arch, R., Wirth, K., Hofmann, M., Ponta, H., Matzku, S., Herrlich, P. und Zöller, M.** (1992). Participation in normal immune response of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* **257**: 682-685.
- Arch, R.** (1994). Physiologische Funktionen von CD44-Isoformen bei der Lymphozytenaktivierung als Schlüssel zur Metastasierung. Universität Würzburg, Dissertation.
- Arpaia, E., Shahar, M., Dadi, H., Cohen, A. und Roifman, C. M.** (1994). Defective T cell receptor signaling and CD8<sup>+</sup> thymic selection in humans lacking ZAP-70 kinase. *Cell* **76**: 947-958.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B. und Seed, B.** (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* **61**: 1303-1313.
- Bashford, C. L., Menestrina, G., Henkart, P. A. und Pasternak, C. A.** (1988). Cell damage by cytolysin. Spontaneous recovery and reversible inhibition by divalent cations. *J. Immunol.* **141**: 3965-3974.
- Baxevanis, C. N., Dedoussis, G. V., Papadopoulos, N. G., Missitzis, I., Stathopoulos, G. P. und Papamichail, M.** (1994). Tumor specific cytolysis by tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Cancer* **74**: 1275-1282.
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E. A., Reiss, B. und Schaller, H.** (1982). Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* **19**: 327-336.
- Bennett, K. L., Jackson, D. G., Simon, J. C., Tanczos, E., Peach, R., Modrell, B., Stamenkovic, I., Plowman, G. und Aruffo, A.** (1995). CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J. Cell. Biol.* **128**: 687-698.
- Bergeron, J., Brenner, M., Thomas, D. und Williams, D.** (1994). Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends. Biochem. Sci.* **19**: 124-128.
- Berke, G.** (1995). The CTL's kiss of death. *Cell* **81**: 9-12.
- Bernstein, L. R. und Liotta, L. A.** (1994). Molecular mediators of interactions with extracellular matrix components in metastasis and angiogenesis. *Curr. Opin. Oncol.* **6**: 106-113.
- Bicknell, D. C., Rowan, A. und Bodmer, W. F.** (1994).  $\beta_2$ -microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 4751-4756.
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S.-M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S. und Whitlow, M.** (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**: 423-426.
- Birnboim, H. C. und Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Bishop, J. M.** (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**: 235-248.
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. und Wiley, D. C.** (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen. *Nature* **329**: 506-512.
- Blakely, A., Gorman, K., Ostergaard, H., Svoboda, K., Liu, C. C., Young, J. D. und Clark, W. R.** (1987). Resistance of cloned cytotoxic T lymphocytes to cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* **166**: 1070-1083.
- Bolen, J. B.** (1995). Protein tyrosine kinases in the initiation of antigen receptor signaling. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 306-311.
- Bolhuis, R. L., Sturm, E. und Braakman, E.** (1991). T cell targeting in cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **34**: 1-8.
- Bonner, W. M. und Laskey, R. A.** (1974). A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamid gels. *Eur. J. Biochem.* **46**: 83-88.
- Boon, T., Cerottini, J. C., van den Eynde, B., van der Bruggen, P. und van Pel, A.** (1994). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 337-365.
- Branch, P., Bicknell, D. C., Rowan, A., Bodmer, W. F. und Karran, P.** (1995). Immune surveillance in colorectal carcinoma. *Nature Genet.* **9**: 231-232.
- Brocker, T., Peter, A., Traunecker, A. und Karjalainen, K.** (1993). New simplified molecular design for functional T cell receptor. *Eur. J. Immunol.* **23**: 1435-1439.
- Brocker, T. und Karjalainen, K.** (1995). Signals through T cell receptor- $\zeta$  chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **181**: 1653-1659.
- Brown, T. A., Bouchard, T., St. John, T., Wayner, E. und Carter, W. G.** (1991). Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J. Cell Biol.* **113**: 207-221.
- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stem, L. J., Urban, R. G., Strominger, L. J. und Wiley, D. C.** (1993). The three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* **364**: 33-39.

- Browning, M. J., Krausa, P., Rowan, A., Bicknell, D. C., Bodmer, J. G. und Bodmer, W. F. (1993). Tissue typing the HLA-A locus from genomic DNA by sequence-specific PCR: comparison of HLA genotype and surface expression on colorectal tumor cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2842-2845.
- Brunner, T., Mogil, R. J., LaFace, D., Jin Yoo, N., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S. J., Force, W. R., Lynch, D. H., Ware, C. F. und Green, D. R. (1995). Cell-autonomous Fas(CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* **373**: 441-444.
- Bukrinsky, M. I., Sharova, N., Dempsey, M. P., Stanwick, T. L., Bukrinskaya, A. G., Haggerty, S. und Stevenson, M. (1992). Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6580-6584.
- Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzubei, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M. und Stevenson, M. (1993). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365**: 666-669.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376-381.
- Cambier, J. C. und Jensen, W. A. (1994). The heterooligomeric antigen receptor complex and its coupling to cytoplasmic effectors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**: 55-63.
- Cascino, I., Fiucci, G., Papoff, G. und Ruberti, G. (1995). Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J. Immunol.* **154**: 2706-2713.
- Chan, A. C., Iwashima, M., Turck, C. W. und Weiss, A. (1992). ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR  $\zeta$  chain. *Cell* **71**: 649-662.
- Chan, A. C., Desai, D. M. und Weiss, A. (1994a). The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 555-592.
- Chan, A. C., Kadlecsek, T. A., Elder, M. E., Filipovich, A. H., Kuo, W. L., Iwashima, M., Parslow, T. G. und Weiss, A. (1994b). ZAP-70 deficiency in autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* **264**: 1599-1601.
- Chaudhary, V. K., Gallo, M. G., FitzGerald, D. J. und Pastan, I. (1990). A recombinant single-chain immunotoxin composed of anti-Tac variable regions and a truncated diphtheria toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9491-9494.
- Chen, L., Linsley, P. S. und Hellström, K. E. (1993). Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol. Today* **14**: 483-486.
- Chen, G., Shi, L., Litchfield, D. W. und Greenberg, A. H. (1995). Rescue from Granzyme B-induced apoptosis by Wee1 kinase. *J. Exp. Med.* **181**: 2295-2300.
- Choi, T. K., Hollenbach, P. W., Pearson, B. E., Ueda, R. M., Weddell, G. N., Kurahara, C. G., Woodhouse, C. S., Kay, R. M. und Loring, J. F. (1993). Transgenic mice containing a human heavy chain immunoglobulin gene fragment cloned in a yeast artificial chromosome. *Nat. Genet.* **4**: 117-123.
- Cifone, M. G., De Maria, R., Roncaioli, P., Rippon, M. R., Azuma, M., Lanier, L. L., Santoni, A. und Testi, R. (1994). Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *J. Exp. Med.* **180**: 1547-1552.
- Clapham, D. E. (1995). Calcium signaling. *Cell* **80**: 259-268.
- Cromme, F. V., Airey, J., Heemels, M.-T., Ploegh, H. L., Keating, P. J., Stern, P. L., Meijer, C. J. L. M. und Walboomers, J. M. M. (1994a). Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J. Exp. Med.* **179**: 335-340.
- Cromme, F. V., van Bommel, P. F. J., Walboomers, J. M. M., Gallee, M. P. W., Stern, P. L., Kenemans, P., Helmerhorst, T. J. M., Stukart, M. J. und Meijer, C. J. L. M. (1994b). Differences in MHC and TAP-1 expression in cervical cancer lymph node metastases as compared with the primary tumours. *Br. J. Cancer* **69**: 1176-1181.
- Dall, P., Heider, K.-H., Hekele, A., von Minckwitz, G., Kaufmann, M., Ponta, H. und Herrlich, P. (1994). Surface protein expression and messenger RNA-splicing analysis of CD44 in uterine cervical cancer and normal epithelium. *Cancer Res.* **54**: 3337-3341.
- Darmon, A. J., Nicholson, D. W. und Bleackley, C. (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* **377**: 446-448.
- Davies, J. und Smith, D. I. (1978). Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Annu. Rev. Microbiol.* **32**: 469-518.
- Davis, M. M. und Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* **334**: 395-402.
- Davis, M. M. und Chien, Y.-H. (1993). Topology and affinity of T-cell receptor mediated recognition of peptide-MHC complexes. *Curr. Opin. Immunol.* **5**: 45-49.
- Debinski, W., Puri, R.K., Kreitman, R.J. und Pastan, I. (1993). A wide range of human cancers express interleukin 4 (IL-4) receptors that can be targeted with chimeric toxin composed of IL-4 and *Pseudomonas* Exotoxin. *J. Biol. Chem.* **268**: 14065-14070.
- DeFranco, A. L. (1995). Transmembrane signaling by antigen receptors of B and T lymphocytes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 163-175.
- Dhein, J., Daniel, P. T., Trauth, B. C., Oehm, A., Möller, P. und Krammer, P. H. (1992). Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J. Immunol.* **149**: 3166-3173.
- Dhein, J., Walczak, H., Bäuml, C., Debatin, K.-M. und Krammer, P. H. (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* **373**: 438-441.
- Dougherty, G. J., Lansdorp, P. M., Cooper, D. L. und Humphries, R. K. (1991). Molecular cloning of CD44R1 and CD44R2, two novel isoforms of the human CD44 lymphocyte "homing" receptor expressed by hemopoietic cells. *J. Exp. Med.* **174**: 1-5.
- Duke, G. M., Hoffman, M. A. und Palmenberg, A., C. (1992). Sequence and structural elements that contribute to efficient encephalomyocarditis virus RNA translation. *J. Virol.* **66**: 1602-1609.

- Eichmann, K., Ehrfeld, A., Falk, I., Goebel, H., Kupsch, J., Reimann, A., Zgaga-Griesz, A., Saizawa, K. M., Yachelini, P. und Tomonari, K. (1991). Affinity enhancement and transmembrane signaling are associated with distinct epitopes on the CD8  $\alpha\beta$  heterodimer. *J. Immunol.* **147**: 2075-2081.
- Elder, M. E., Lin, D., Clever, J., Chan, A. C., Hope, T. J., Weiss, A. und Parslow, T. G. (1994). Humane severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* **264**: 1596-1599.
- Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G. und Schindler, D.G. (1993). Specific activation of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the  $\gamma$  or  $\zeta$  subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 720-724.
- Exton, J. H. (1994). Messenger molecules derived from membrane lipids. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 226-229.
- Falk, K., Röttschke, O., Stevanović, S., Jung, G. und Rammensee, H. G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**: 296-300.
- Fanger, M. W. und Guyre, P. M. (1991). Bispecific antibodies for targeted cellular cytotoxicity. *Trends Biotechnol.* **9**: 375-380.
- Feldman, M. und Eisenbach, L. (1991). MHC class I genes controlling the metastatic phenotype of tumor cells. *Semin. Cancer Biol.* **2**: 337-346.
- Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G. und Alnemri, E. S. (1994). CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. *J. Biol. Chem.* **269**: 30761-30764.
- Fernandez-Cruz, E., Gilman, S. C. und Feldman, J. D. (1982). Immunotherapy of a chemically-induced sarcoma in rats: characterization of the effector T cell subset and nature of suppression. *J. Immunol.* **128**: 1112-1117.
- Ferro-Novick, S. und Jahn, R. (1994). Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* **370**: 191-193.
- Fidler, I. J. und Hart, I. R. (1982). Biological diversity in metastatic neoplasms: Origins and implications. *Science* **217**: 998-1003.
- Fidler, I. J. (1990). Critical factors in the biology of human cancer metastasis: Twenty-eighth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* **50**: 6130-6138.
- Fiers, W., Contreras, R., Haegemann, G., Rogiers, R., Van de Voorde, A., Van Heuverswyn, H., Van Herreweghe, J., Volckaert, G. und Ysebaert, M. (1978). Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature* **273**: 113-120.
- Finke, J. H., Zea, A. H., Stanley, J., Longo, D. L., Mizoguchi, H., Tubbs, R. R., Wiltrout, R. H., O'Shea, J. J., Kudoh, S., Klein, E., Bukowski, R. M. und Ochoa, A. C. (1993). Loss of T-cell receptor  $\zeta$  chain and p56<sup>lck</sup> in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **53**: 5613-5616.
- Fisher, B., Packard, B. S., Read, E. J., Carrasquillo, J. A., Carter, C. S., Topalian, S. L., Yang, J. C., Yolles, P., Larson, S. M. und Rosenberg, S. A. (1989). Tumor localization of adoptively transferred indium-111 labeled tumor infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **7**: 250-261.
- Folkman, J. und Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science* **235**: 442-447.
- Folkman, J. (1989). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 4-6.
- Fox, S. B., Gatter, K. C., Jackson, D. G., Screaton, G. R., Bell, M. V., Bell, J. I., Harris, A. L., Simmons, D. und Fawcett, J. (1993). CD44 and cancer screening. *Lancet* **342**: 548-549.
- Freedman, R. S., Tomasovic, B., Templin, S., Atkinson, E. N., Kudelka, A. und Edwards, C. L. (1994). Large-scale expansion in interleukin-2 of tumor infiltrating lymphocytes from patients with ovarian carcinoma for adoptive immunotherapy. *J. Immunol. Methods* **167**: 145-160.
- Friedrichs, K., Kugler, G., Franke, F., Terpe, H. J., Arlt, J., Regidor, P. A. und Güntherth, U. (1995). CD44 isoforms in prognosis of breast cancer. *Lancet* **345**: 1237.
- Galandrini, R., Albi, N., Tripodi, G., Zarccone, D., Terenzi, A., Moretta, A., Grossi, C. E. und Velardi, A. (1993). Antibodies to CD44 trigger effector functions of human T cell clones. *J. Immunol.* **150**: 4225-4235.
- Galandrini, R., Galluzzo, E., Albi, N., Grossi, C. E. und Velardi, A. (1994a). Hyaluronate is costimulatory for human T cell effector functions and binds to CD44 on activated T cells. *J. Immunol.* **153**: 21-31.
- Galandrini, R., De Maria, R., Piccoli, M., Frati, L. und Santoni, A. (1994b). CD44 triggering enhances human NK cell cytotoxic functions. *J. Immunol.* **153**: 4399-4407.
- Gallatin, W. M., Wayner, E. A., Hoffman, P. A., St. John, T., Butcher, E. C. und Carter, W. G. (1989). Structural homology between lymphocyte receptors for high endothelium and class III extracellular matrix receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 4654-4658.
- Gallay, P., Swingler, S., Aiken, C. und Trono, D. (1995). HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell* **80**: 379-380.
- Gauen, L. K. T., Zhu, Y., Letourneur, F., Hu, Q., Bolen, J. B., Matis, L. A., Klausner, R. D. und Shaw, A. S. (1994). Interactions of p59<sup>l<sup>y</sup>n</sup> and ZAP-70 with T-cell receptor activation motifs: defining the nature of a signalling motif. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 3729-3741.
- Gelber, C., Eisenbach, L., Feldman, M. und Goodenow, R. S. (1992). T-cell subset analysis of Lewis lung carcinoma tumor rejection: heterogeneity of effectors and evidence for negative regulatory lymphocytes correlating with metastasis. *Cancer Res.* **52**: 6507-6515.
- Gelfand, E. W., Weinberg, K., Mazer, B. D., Kadlecsek, T. A. und Weiss, A. (1995). Absence of ZAP-70 prevents signaling through the antigen receptor on peripheral blood T cells but not on thymocytes. *J. Exp. Med.* **182**: 1057-1066.
- Germain, R. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* **76**: 287-299.
- Ghattas, I., Sanes, J. R. und Majors, J. E. (1991). The encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site allows efficient coexpression of two genes from recombinant provirus in cultured cells and in embryos. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5848-5859.

- Gill, B. M., Nishikata, H., Chan, G., Delovitch, T. L. und Ochi, A. (1994). Fas antigen and sphingomyelin-ceramide turnover-mediated signaling: role in life and death of T lymphocytes. *Immunol. Rev.* **142**: 113-125.
- Gimmi, C. D., Freeman, G. J., Gribben, J. G., Gray, G. und Nadler, L. M. (1993). Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6586-6590.
- Goldstein, L. A., Zhou, D. F. H., Picker, L. J., Minty, C. N., Bargatze, R. F., Ding, J. F. und Butcher, E. C. (1989). A human lymphocyte homing receptor, the Hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell* **56**: 1063-1072.
- Gray, G. L., Smith, D. H., Baldrige, J. S., Harkins, R. N., Vasil, M. L., Chen, E. Y. und Heyneker, H. L. (1984). Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the Exotoxin A structural gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2645-2649.
- Griffith, K. D., Read, E. J., Carrasquillo, J. A., Carter, C. S., Yang, J. C., Fisher, B., Aebersold, P., Packard, B. S., Yu, M. Y. und Rosenberg, S. A. (1989). In vivo distribution of adoptively transferred indium-111-labeled tumor infiltrating lymphocytes and peripheral blood lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**: 1709-1717.
- Gross, G. und Eshhar, Z. (1992). Endowing T cells with antibody specificity using chimeric T cell receptors. *FASEB J.* **6**: 3370-3378.
- Gruber, M., Schodin, B. A., Wilson, E. R. und Kranz, D. M. (1994). Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in *Escherichia coli*. *J. Immunol.* **152**: 5368-5374.
- Gulbins, E., Bissonnette, R., Mahboubi, A., Martin, S., Nishioka, W., Brunner, T., Baier, G., Baier-Bitterlich, G., Byrd, C., Lang, F., Kolesnick, R., Altman, A. und Green, D. (1995). FAS-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated RAS signaling pathway. *Immunity* **2**: 341-351.
- Gullick, W. J. (1991). Prevalence of aberrant expression of the epidermal-growth-factor receptor in human cancers. *Brit. Med. Bull.* **47**: 87-98.
- Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zöller, M., Haubmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H. und Herrlich, P. (1991). A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* **65**: 13-24.
- Halapi, E., Yamamoto, Y., Juhlin, C., Jeddi-Tehrani, M., Grunewald, J., Andersson, R., Hising, C., Masucci, G., Mellstedt, H. und Kiessling, R. (1993). Restricted T cell receptor V $\beta$  and J $\beta$  usage in T cells from interleukin-2-cultured lymphocytes of ovarian and renal carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother.* **36**: 191-197.
- Hamlyn, P. H., Brownlee, G. G., Cheng, C.-C., Gait, M. J. und Milstein, C. (1978). Complete sequence of constant and 3' noncoding regions of an immunoglobulin mRNA using the dideoxynucleotide method of RNA sequencing. *Cell* **15**: 1067-1075.
- Hannun, Y. A. und Obeid, L. M. (1995). Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 73-77.
- Harnick, D. H., Jayaraman, T., Go, L., Ma, Y., Mulieri, P. und Marks, A. R. (1995). The human type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from T lymphocytes: structure, localization, and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **270**: 2833-2840.
- Hart, I. R. und Saini, A. (1992). Biology of tumour metastasis. *Lancet* **339**: 1453-1457.
- He, Q., Lesley, J., Hyman, R., Ishimura, K. und Kincade, P. W. (1992). Molecular isoforms of murine CD44 and evidence that the membrane proximal domain is not critical for hyaluronate recognition. *J. Cell Biol.* **119**: 1711-1719.
- Heald, R., McLoughlin, M. und McKeon, F. (1993). Human Wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. *Cell* **74**: 463-474.
- Hedrick, S. M. und Eidelman, F. J. (1993). T lymphocyte antigen receptors. In "Fundamental immunology." (W. E. Paul, Ed.) Raven Press, Ltd., New York, 383-420.
- Heider, K.-H., Hofmann, M., Hors, E., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P. und Pals, S. T. (1993). A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J. Cell Biol.* **120**: 227-233.
- Heinzinger, N. K., Bukrinsky, M. I., Haggerty, S. A., Ragland, A. M., Kewalramani, V., Lee, M.-A., Gendelman, H. E., Ratner, L., Stevenson, M. und Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7311-7315.
- Herrlich, P., Zöller, M., Pals, S. und Ponta, H. (1993). CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol. Today* **14**: 395-399.
- Heusel, J. W., Wesselschmidt, R. I., Shresta, S., Russel, J. H. und Ley, J. T. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* **76**: 977-987.
- Hieter, P. A., Max, E. E., Seidman, J. G., Maizel, J., Jr. und Leder, P. (1980). Cloned human and mouse kappa immunoglobulin constant and J region genes conserve homology in functional segments. *Cell* **22**: 197-207.
- Hilders, C. G., Ras, L., van Eendenburg, J. D., Nooyen, Y. und Fleuren, G. J. (1994). Isolation and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes from cervical carcinoma. *Int. J. Cancer* **57**: 805-813.
- Hirano, H., Screaton, G. R., Bell, M. V., Jackson, D. G., Bell, J. I. und Hodes, R. J. (1994). CD44 isoform expression mediated by alternative splicing: tissue-specific regulation in mice. *Int. Immunol.* **6**: 49-59.
- Hofmann, M., Rudy, W., Zöller, M., Tölg, C., Ponta, H., Herrlich, P. und Günthert, U. (1991). CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res.* **51**: 5292-5297.
- Holliger, P., Prosoero, T. und Winter, G. (1993). "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6444-6448.
- Honjo, T., Obata, M., Yamawaki-Kataoka, Y., Kataoka, T., Kawakami, T., Takahashi, N. und Mano, Y. (1979). Cloning and complete nucleotide sequence of mouse immunoglobulin  $\gamma$ 1 chain gene. *Cell* **18**: 559-568.

- Honma, S., Tsukada, S., Honda, S., Nakamura, M., Takakuwa, K., Maruhashi, T., Kodama, S., Kanazawa, K., Takahashi, T. und Tanaka, K. (1994). Biological-clinical significance of selective loss of HLA-class-I allelic product expression in squamous-cell carcinoma of the uterine cervix. *Int. J. Cancer* **57**: 650-655.
- Howe, L. R. und Weiss, A. (1995). Multiple kinases mediate T-cell-receptor signalling. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 59-64.
- Hurle, M. R. und Gross, M. (1994). Protein engineering techniques for antibody humanization. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**: 428-433.
- Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.-S., Novotny, J., Margolies, M. N., Ridge, R. J., Bruccoleri, R. E., Haber, E., Crea, R. und Oppermann, H. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5879-5883.
- Hwang, J., Fitzgerald, D. J., Adhya, S. und Pastan, I. (1987). Functional domains of *Pseudomonas* Exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in *E. coli*. *Cell* **48**: 129-136.
- Hwu, P., Shafer, G. E., Treisman, J., Schindler, D. G., Gross, G., Cowherd, R., Rosenberg, S. A. und Eshhar, Z. (1993). Lysis of ovarian cancer cells by human lymphocytes redirected with a chimeric gene composed of an antibody variable region and the Fc receptor  $\gamma$  chain. *J. Exp. Med.* **178**: 361-366.
- Hynes, N. E. (1993). Amplification and over-expression of the erbB-2 gene in human tumors: its involvement in tumor development, significance as a prognostic factor, and potential target for cancer therapy. *Semin. Cancer Biol.* **4**: 19-26.
- Hynes, R. O. und Lander, A. D. (1992). Contact and adhesive specificities in the associations, migrations and targeting of cells and axons. *Cell* **68**: 303-322.
- Idzerda, R. L., Carter, W. G., Nottenburg, C., Wayner, E. A., Gallatin, W. M. und St. John, T. (1989). Isolation and DNA sequence of a cDNA clone encoding a lymphocyte adhesion receptor for high endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 4659-4663.
- Inbar, D., Hochman, J. und Givol, D. (1972). Localization of antibody-combining sites within the variable portions of heavy and light chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2659-2662.
- Ioachim, H. L. (1990). The opportunistic tumors of immune deficiency. *Adv. Cancer Res.* **54**: 301-317.
- Irmeler, M., Hertig, S., MacDonald, H. R., Sadoul, R., Becherer, J. D., Proudfoot, A., Solari, R. und Tschopp, J. (1995). Granzyme A is an Interleukin  $1\beta$ -converting enzyme. *J. Exp. Med.* **181**: 1917-1922.
- 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, B. A., Chan, A. C. und Weiss, A. (1993). Functional characterization of a signal transducing motif in the T cell antigen receptor  $\zeta$  chain. *J. Exp. Med.* **177**: 1093-1103.
- Itoh, N., Yonehara, A., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S.-I., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. und Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**: 233-234.
- Itoh, N. und Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis: mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* **268**: 10932-10937.
- Iwashima, M., Irving, B. A., van Oers, N. S. C., Chan, A. C. und Weiss, A. (1994). Sequential interactions of TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* **263**: 1136-1139.
- Jackson, D. G., Buckley, J. und Bell, J. I. (1992). Multiple variants of the human lymphocyte homing receptor CD44 generated by insertions at a single site in the extracellular domain. *J. Biol. Chem.* **267**: 4732-4739.
- Jain, R. K. (1990). Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res.* **50**: 814s-819s.
- Jalkanen, S., Bargatze, R., Herron, L. und Butcher, E. C. (1986). A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *Eur. J. Immunol.* **16**: 1195-1202.
- Jalkanen, S., Jalkanen, M., Bargatze, R., Tammi, M. und Butcher, E. C. (1988). Biochemical properties of glycoproteins involved in lymphocyte recognition of high endothelial venules in man. *J. Immunol.* **141**: 1615-1623.
- Jalkanen, S. und Jalkanen, M. (1992). CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J. Cell Biol.* **116**: 817-825.
- Janeway, C. A., Jr. und Bottomly, K. (1994). Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* **76**: 275-285.
- Jayaraman, T., Ondriasova, E., Ondrias, K., Hamick, D. J. und Marks, A. R. (1995). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for T-cell receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6007-6011.
- 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 $\zeta$  subunit identifies a CD3 $\zeta$ -related product in thymus-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3319-3323.
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. und Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **321**: 522-525.
- Ju, S.-T., Panka, D. J., Cui, H., Ettinger, R., El-Khatib, M., Sherr, D. H., Stanger, B. Z. und Marshak-Rothstein, A. (1995). Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* **373**: 444-448.
- Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. und Foeller, C. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. U.S. Dept. Health Human Services, Washington, DC.
- Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M. und Hengartner, H. (1994a). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* **369**: 31-37.

- Kägi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Bürki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H. und Golstein, P. (1994b). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* **265**: 528-530.
- Kaklamanis, L., Gatter, K. C., Hill, A. B., Mortensen, N., Harris, A. L., Krausa, P., McMichael, A., Bodmer, J. G. und Bodmer, W. F. (1992). Loss of HLA class-I alleles, heavy chains and  $\beta_2$ -microglobulin in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **51**: 379-385.
- Kane, J. F. und Hartley, D. L. (1988). Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends Biotech.* **6**: 95-101.
- Karasuyama, H. und Melchers, F. (1988). Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified expression vectors. *Eur. J. Immunol.* **18**: 97-104.
- Karjalainen, K. (1994). High sensitivity, low affinity - paradox of T-cell receptor recognition. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 9-12.
- Kast, W. M., Offringa, R., Peter, P. J., Voordouw, A. C., Meloen, R. H., van der Eb, A. J. und Melief, C. J. M. (1989). Eradication of adenovirus E1-induced tumors by E1A-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cell* **59**: 603-614.
- Katoh, S., McCarthy, J. B. und Kincade, P. W. (1994). Characterization of soluble CD44 in the circulation of mice. Levels are affected by immune activity and tumor growth. *J. Immunol.* **153**: 3440-3449.
- Kaufmann, M., Heider, K.-H., Sinn, H.-P., von Minckwitz, G., Ponta, H. und Herrlich, P. (1995). CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *Lancet* **345**: 615-619.
- Kincade, P. W., He, Q., Ishihara, K., Miyake, K., Lesley, J. und Hyman, R. (1993). CD44 and other cell interaction molecules contributing to B lymphopoiesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **184**: 215-222.
- Knappik, A. und Plückthun, A. (1995). Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Eng.* **8**: 81-89.
- Kojima, H., Shinohara, N., Hanaoka, S., Someya-Shirota, Y., Takagaki, Y., Ohno, H., Saito, T., Katayama, T., Yagita, H., Okumura, K., Shinkai, Y., Alt, F. W., Matsuzawa, A., Yonehara, S., Nagata, S. und Takayama, H. (1994). Two distinct pathways of specific killing revealed by perforin mutant cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* **1**: 357-364.
- Kolanus, W., Romeo, C. und Seed, B. (1993). T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell* **74**: 171-183.
- Kolesnick, R. und Golde, D. W. (1994). The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* **77**: 325-328.
- Kondo, T., Mukai, M. und Kondo, Y. (1991). Rapid isolation of plasmid DNA by LiCl-ethidium bromide treatment and gel filtration. *Anal. Biochem.* **198**: 30-35.
- König, R., Huang, L. Y. und Germain, R. N. (1992). MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* **356**: 799-801.
- Koopmann, G., Heider, K.-H., Horst, E., Adolf, G. R., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P. und Pals, S. T. (1993). Activated human lymphocytes and aggressive Non-Hodgkin lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J. Exp. Med.* **177**: 897-904.
- Kumar, S. (1995). ICE-like proteases in apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 198-202.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lazaar, A. L., Albelda, S. M., Pilewski, J. M., Brennan, B., Puré, E. und Panettieri, R. A., Jr. (1994). T lymphocytes adhere to airway smooth muscle cells via integrins and CD44 and induce smooth muscle cell DNA synthesis. *J. Exp. Med.* **180**: 807-816.
- Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G. und Earnshaw, W. C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**: 346-347.
- Ledbetter, J. A., Deans, J. P., Aruffo, A., Grosmaire, L. S., Kanner, S. B., Bolen, J. B. und Schieven, G. L. (1993). CD4, CD8 and the role of CD45 in T-cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* **5**: 334-340.
- Lee, S. B. und Rhee, S. G. (1995). Significance of PIP<sub>2</sub> hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**: 183-189.
- Lesley, J., Hyman, R. und Kincade, P. W. (1993). CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv. Immunol.* **54**: 271-335.
- Lesley, J., Howes, N., Perschl, A. und Hyman, R. (1994). Hyaluronan binding function of CD44 is transiently activated on T cells during an in vivo immune response. *J. Exp. Med.* **180**: 383-387.
- 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**: 8905-8909.
- Letourneur, F. und Klausner, R. D. (1992). Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 $\epsilon$ . *Science* **255**: 79-82.
- Lewis, P., Hensel, M. und Emerman, M. (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J.* **11**: 3053-3058.
- Lewis, P. F. und Emerman, M. (1994). Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **68**: 510-516.
- Liotta, L. A., Steeg, P. S. und Steller-Stevenson, W. G. (1991). Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* **64**: 327-336.
- Liu, C.-C., Steffen, M., King, F. und Young, J. D.-E. (1987). Identification, isolation, and characterization of a novel cytotoxin in murine cytolytic lymphocytes. *Cell* **51**: 393-403.
- Liu, C.-C., Walsh, C. M. und Young, J. D.-E. (1995). Perforin: structure and function. *Immunol. Today* **16**: 194-201.
- Lowin, B., Beermann, F., Schmidt, A. und Tschopp, J. (1994a). A null mutation in the perforin gene impairs cytolytic T lymphocyte- and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11571-11575.

- Lowin, B., Hahne, M., Mattmann, C. und Tschopp, J. (1994b). Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* **370**: 650-652.
- Lucas, M. G., Green, A. M. und Telen, M. J. (1989). Characterization of the serum In(lu)-related antigen: identification of a serum protein related to erythrocyte p80. *Blood* **73**: 596-600.
- 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**: 7021-7025.
- Mackay, C. R. (1993). Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **5**: 423-427.
- Mackay, C. R., Terpe, H.-J., Stauder, R., Marston, W. L., Stark, H. und Günthert, U. (1994). Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J. Cell Biol.* **124**: 71-82.
- Madden, D. R., Gorga, J. C., Strominger, J. L. und Wiley, D. C. (1992). The three-dimensional structure of HLA-B27 at a 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* **70**: 1035-1048.
- Madden, D. R. (1995). The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 587-622.
- Manoil, C. und Beckwith, J. (1985). TnphoA: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 8129-8133.
- Marcucci, F., Waller, M., Kirchner, H. und Krammer, P. (1981). Production of immune interferon by murine T-cell clones from long-term cultures. *Nature* **291**: 79-81.
- Marincola, F. M., Shamamian, P., Alexander, R. B., Gnarr, J. R., Turetskaya, R. L., Nedospasov, S. A., Simonis, T. B., Taubenberger, J. K., Yannelli, J., Mixon, A., Restifo, N. P., Herlyn, M. und Rosenberg, S. A. (1994). Loss of HLA haplotype and B locus down-regulation in melanoma cell lines. *J. Immunol.* **153**: 1225-1237.
- Matsuda, M., Petersson, M., Lenkei, R., Taupin, J. L., Magnusson, I., Mellstedt, H., Anderson, P. und Kiessling, R. (1995). Alterations in the signal-transducing molecules of T cells and NK cells in colorectal tumor-infiltrating, gut mucosal and peripheral lymphocytes: correlation with the stage of the disease. *Int. J. Cancer* **61**: 765-772.
- Matsui, K., Boniface, J. J., Reay, P. A., Schild, H., Fazekas de St. Groth, B. und Davis, M. M. (1991). Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science* **254**: 1788-1791.
- Matzku, S., Komitowski, D., Mildnerberger, M. und Zöller, M. (1983). Characterization of BSp73, a spontaneous rat tumor and its in vivo selected variants showing different metastasizing capacities. *Invasion Metastasis* **3**: 109-123.
- Miller, A. D. und Buttimore, C. (1986). Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 2895-2902.
- Miller, A. D. und Rosman, G. J. (1989). Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* **9**: 980-990.
- Miyake, K., Medina, K. L., Hayashi, S.-I., Ono, T. und Kincade, P. W. (1990). Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. *J. Exp. Med.* **172**: 69-75.
- 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**: 1795-1798.
- Mondino, A. und Jenkins, M. K. (1994). Surface proteins involved in T cell costimulation. *J. Leukoc. Biol.* **55**: 805-815.
- Morgenstern, J. P. und Land, H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titer retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3587-3596.
- Moritz, D., Wels, W., Matern, J. und Groner, B. (1994). Cytotoxic T lymphocytes with a grafted recognition specificity for ERBB2-expressing tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 4318-4322.
- Mountford, P. S. und Smith, A. G. (1995). Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis. *Trends Genet.* **11**: 179-184.
- Mulder, J.-W. R., Kruyt, P. M., Sewnath, M., Oosting, J., Seldenrijk, C. A., Weidema, W. F., Offerhaus, G. J. A. und Pals, S. T. (1994). Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *Lancet* **344**: 1470-1472.
- Müller, C. und Tschopp, J. (1994). Resistance of CTL to perforin-mediated lysis: evidence for a lymphocyte membrane protein interacting with perforin. *J. Immunol.* **153**: 2470-2478.
- Nagata, S. und Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* **267**: 1449-1456.
- Nagata, S. und Suda, T. (1995). Fas and FasL: lpr and gld mutations. *Immunol. Today* **16**: 39-43.
- Nakajima, H. und Henkart, P. A. (1994). Cytotoxic lymphocyte granzymes trigger a target cell internal disintegration pathway leading to cytolysis and DNA breakdown. *J. Immunol.* **152**: 1057-1063.
- Nakajima, H., Park, H. L. und Henkart, P. A. (1995). Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin. *J. Exp. Med.* **181**: 1037-1046.
- Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A., Munday, N. A., Raju, S. M., Smulson, M. E., Yamin, T.-T., Lu, V. L. und Miller, D. K. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**: 37-43.
- Nottenburg, C., Rees, G. und St. John, T. (1989). Isolation of mouse CD44 cDNA: structural features are distinct from the primate cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8521-8525.
- Ogata, M., Chaudhary, V. K., Pastan, I. und FitzGerald, D. J. (1990). Processing of the *Pseudomonas* Exotoxin by a cellular protease results in the generation of a 37,000-Da toxin fragment that is translocated to the cytosol. *J. Biol. Chem.* **265**: 20678-20685.

- Okumura, M. und Thomas, M. L.** (1995). Regulation of immune function by protein tyrosine phosphatases. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 312-319.
- Orlandi, R., Güssow, D. H., Jones, P. T. und Winter, G.** (1989). Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3833-3837.
- Orloff, D. G., Ra, C., Frank, S. J., Klausner, R. D. und Kinet, J.-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**: 189-191.
- Paget, S.** (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* **1**: 571-573.
- Pantel, K., Schlimok, G., Kutter, D., Schaller, G., Genz, T., Wiebecke, B., Backmann, R., Funke, I. und Riethmüller, G.** (1991). Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma. *Cancer Res.* **51**: 4712-4715.
- Pastor, M. I., Reif, K. und Cantrell, D.** (1995). The regulation and function of p21<sup>ras</sup> during T-cell activation and growth. *Immunol. Today* **16**: 159-164.
- Pawson, T.** (1992). Tyrosine kinases and their interactions with signalling proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2**: 4-12.
- Pawson, T. und Gish, G. D.** (1992). SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* **71**: 359-62.
- Peitsch, M. C., Polzar, B., Stephan, H., Crompton, T., MacDonald, H. R., Mannherz, H. G. und Tschopp, J.** (1993). Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J.* **12**: 371-377.
- Picker, L. J., Nakache, M. und Butcher, E. C.** (1989a). Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types. *J. Cell Biol.* **109**: 927-937.
- Picker, L. J., De Los Toyos, J., Telen, M. J., Haynes, B. F. und Butcher, E. C.** (1989b). Monoclonal antibodies against the CD44 [In(Lu)-related p80], and Pgp-1 antigens in man recognize the Hermes class of lymphocyte homing receptors. *J. Immunol.* **142**: 2046-2051.
- Picker, L. J.** (1994). Control of lymphocyte homing. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 394-406.
- Pockaj, B. A., Sherry, R. M., Wei, J. P., Yannelli, J. R., Carter, C. S., Leitman, S. F., Carasquillo, J. A., Steiberg, S. M., Rosenberg, S. A. und Yang, J. C.** (1994). Localization of <sup>111</sup>indium-labeled tumor infiltrating lymphocytes to tumor in patients receiving adoptive immunotherapy. Augmentation with cyclophosphamide and correlation with response. *Cancer* **73**: 1731-1737.
- Podack, E. R., Young, J. D. und Cohn, Z. A.** (1985). Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **82**: 8629-8633.
- Poe, M., Blake, J. T., Boulton, D. A., Gammon, M., Sigal, N. H., Wu, J. K. und Zweerink, H. J.** (1991). Human cytotoxic lymphocyte granzyme B. Its purification from granules and the characterization of substrate and inhibitor specificity. *J. Biol. Chem.* **266**: 98-103.
- Ponta, H., Hofmann, M. und Herrlich, P.** (1994). Recent advances in the genetics of metastasis. *Eur. J. Cancer* **30A**: 1995-2001.
- Poste, G. und Fidler, I. J.** (1980). The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* **283**: 139-146.
- Prickett, K. S., Amberg, D. C. und Hopp, T. P.** (1989). A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins. *Biotechniques* **7**: 580-589.
- Puré, E., Camp, R. L., Peritt, D., Panettieri, R. A., Jr., Lazaar, A. L. und Nayak, S.** (1995). Defective phosphorylation and hyaluronate binding of CD44 with point mutations in the cytoplasmic domain. *J. Exp. Med.* **181**: 55-62.
- Ramarathinam, L., Castle, M., Wu, Y. und Liu, Y.** (1994). T cell costimulation by B7/BB1 induces CD8 T cell-dependent tumor rejection: an important role of B7/BB1 in the induction, recruitment, and effector function of antitumor T cells. *J. Exp. Med.* **179**: 1205-1214.
- Randriamampita, C. und Tsien, R. Y.** (1993). Emptying of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores releases a novel small messenger that stimulates Ca<sup>2+</sup> influx. *Nature* **364**: 809-814.
- Rao, A.** (1994). NF-AT<sub>p</sub>: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol. Today* **15**: 274-281.
- Reber, S., Matzku, S., Günthert, U., Ponta, H., Herrlich, P. und Zöller, M.** (1990). Retardation of metastatic tumor growth after immunization with metastasis-specific monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer* **46**: 919-927.
- Renner, C., Jung, W., Sahin, U., Denfeld, R., Pohl, C., Trümper, L., Hartmann, F., Diehl, V., van Lier, R. und Pfreundschuh, M.** (1994). Cure of xenografted human tumors by bispecific monoclonal antibodies and human T cells. *Science* **264**: 833-835.
- Restifo, N. P., Esquivel, F., Asher, A. L., Stotter, H., Barth, R. J., Bennink, J. R., Mulé, J. J., Yewdell, J. W. und Rosenberg, S. A.** (1991). Defective presentation of endogenous antigens by murine sarcoma: implication for the failure of an anti-tumor immune response. *J. Immunol.* **147**: 1453-1459.
- Restifo, N. P., Kawakami, Y., Marincola, F., Shamamian, P., Taggarse, A., Esquivel, F. und Rosenberg, S. A.** (1993). Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: immunogenotherapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I. *J. Immunother.* **14**: 182-190.
- Reth, M.** (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* **338**: 383-384.
- Riethmüller, G., Schneider-Gädicke, E. und Johnson, J. P.** (1993). Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Curr. Opin. Immunol.* **5**: 732-739.
- Robbins, P. F., el-Gamil, M., Li, Y. F., Topalian, S. L., Rivoltini, L., Sakaguchi, K., Appella, E., Kawakami, Y. und Rosenberg, S. A.** (1995). Cloning of a new gene encoding an antigen recognized by melanoma-specific HLA-A24-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Immunol.* **154**: 5944-5950.
- Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G. und Brown, P. O.** (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* **12**: 2099-2108.
- Romeo, C. und Seed, B.** (1991). Cellular immunity to HIV by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides. *Cell* **64**: 1037-1046.

- Romeo, C., Amiot, M. und Seed, B. (1992). Sequence requirements for induction of cytolysis by the T cell antigen/Fc receptor  $\zeta$  chain. *Cell* **68**: 889-897.
- Römisch, K. (1994). Peptide traffic across the ER membrane: TAPs and other conduits. *Trends Cell Biol.* **4**: 311-314.
- Rosenberg, S. A., Spiess, P. und Lafreniere, R. (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* **233**: 1318-1321.
- Rosenberg, S. A., Schwarz, S. L. und Spiess, P. J. (1988). Combination immunotherapy for cancer: synergistic antitumor interactions of interleukin-2,  $\alpha$  interferon, and tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* **80**: 1393-1397.
- Rosenberg, S. A., Yannelli, J. R., Yang, J. C., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Weber, J. S., Parkinson, D. R., Seipp, C. A., Einhorn, J. H. und White, D. E. (1994). Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**: 1159-1166.
- Roth, J. A., Osborne, B. A. und Ames, R. S. (1983). Immunoregulatory factors derived from human tumors. II. Partial purification and further immunobiochemical characterization of a human sarcoma-derived immunosuppressive factor expressing HLA-DR and immunoglobulin-related determinants. *J. Immunol.* **130**: 303-308.
- Rötzschke, O. und Falk, K. (1991). Naturally-occurring peptide antigens derived from MHC class-I-restricted processing pathways. *Immunol. Today* **12**: 447-455.
- Rozdzial, M. M., Kubo, R. T., Turner, S. L. und Finkel, T. H. (1994). Developmental regulation of the TCR  $\zeta$ -chain. Differential expression and tyrosine phosphorylation of the TCR  $\zeta$ -chain in resting immature and mature T lymphocytes. *J. Immunol.* **153**: 1563-1580.
- Rudd, C. E., Janssen, O., Cai, Y.-C., da Silva, A. J., Raab, M. und Prasad, K. V. S. (1994). Two-step TCR/CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SH3 domains, protein-tyrosine and lipid kinases. *Immunol. Today* **15**: 225-234.
- Rudy, W., Hofmann, M., Schwartz-Albiez, R., Zöller, M., Heider, K.-H., Ponta, H. und Herrlich, P. (1993). The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: each one individually suffices to confer metastatic behavior. *Cancer Res.* **53**: 1262-1268.
- Russell, S. J., Hawkins, R. E. und Winter, G. (1993). Retroviral vectors displaying functional antibody fragments. *Nucleic Acids Res.* **11**: 1081-1085.
- Salter, R. D., Benjamin, R. J., Wesley, P. K., Buxton, S. E., Garrett, T. P. J., Clayberger, C., Krensky, A. M., Norment, A. M., Littman, D. R. und Parham, P. (1990). A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the  $\alpha$ 3 domain of HLA-A2. *Nature* **345**: 41-46.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **74**: 5463-5467.
- Sant, A. und Miller, J. (1994). MHC class II antigen processing: biology of invariant chain. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 57-63.
- Screaton, G. R., Bell, M. V., Jackson, D. G., Cornelis, F. B., Gerth, U. und Bell, J. I. (1992). Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 12160-12164.
- Screaton, G. R., Bell, M. V., Bell, J. I. und Jackson, D. G. (1993). The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. *J. Biol. Chem.* **268**: 12235-12238.
- Sefton, B. M. und Taddie, J. A. (1994). Role of tyrosine kinases in lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 372-379.
- Seiter, S., Arch, R., Reber, S., Komitowski, D., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P., Matzku, S. und Zöller, M. (1993). Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J. Exp. Med.* **177**: 443-455.
- Sherman, L., Sleeman, J., Herrlich, P. und Ponta, H. (1994). Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 726-733.
- Sherman, L., Sleeman, J., Dail, P., Hekele, A., Moll, J., Ponta, H. und Herrlich, P. (1995). The CD44 proteins in embryonic development and in cancer. In "Current Topics in Microbiology and Immunology". (W. Birchmeier et al., Ed.) Springer Verlag, Berlin, Im Druck.
- Shi, L., Nishioka, W. K., Th'ng, J., Bradbury, E. M., Litchfield, D. W. und Greenberg, A. H. (1994). Premature p34<sup>cdc2</sup> activation required for apoptosis. *Science* **263**: 1143-1145.
- Shiver, J. W. und Henkart, P. A. (1991). A noncytotoxic mast cell tumor line exhibits potent IgE-dependent cytotoxicity after transfection with the cytolysin/perforin gene. *Cell* **64**: 1175-1181.
- Shiver, J. W., Su, L. und Henkart, P. A. (1992). Cytotoxicity with target DNA breakdown by rat basophilic leukemia cells expressing both cytolysin and granzyme A. *Cell* **71**: 315-322.
- Shu, S. Y. und Rosenberg, S. A. (1985). Adoptive immunotherapy of newly induced murine sarcomas. *Cancer Res.* **45**: 1657-1662.
- Siegal, C. B., Chaudhary, V. K., FitzGerald, D. J. und Pastan, I. (1989). Functional analysis of domains II, Ib, and III of *Pseudomonas* exotoxin. *J. Biol. Chem.* **264**: 14256-14261.
- Skerra, A. (1993). Bacterial expression of immunoglobulin fragments. *Curr. Opin. Immunol.* **5**: 256-262.
- Slingluff, C. L. Jr., Hunt, D. F. und Engelhard, V. H. (1994). Direct analysis of tumor-associated peptide antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 733-740.
- Smith, D. B. und Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31-40.
- Smyth, M. J. und Trapani, J. A. (1995). Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol. Today* **16**: 202-206.
- Springer, T. A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**: 425-434.

- Sretavan, D. W., Feng, L., Puré, E. und Reichardt, L. F. (1994). Embryonic neurons of the developing optic chiasm express L1 and CD44, cell surface molecules with opposing effects on retinal axon growth. *Neuron* 12: 957-975.
- St. John, T., Meyer, J., Idzerda, R. und Gallatin, W. M. (1990). Expression of CD44 confers a new adhesive phenotype on transfected cells. *Cell* 60: 45-52.
- Stalder, T., Hahn, S. und Erb, P. (1994). Fas antigen is the major target molecule for CD4<sup>+</sup> T cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 152: 1127-1133.
- Stamenkovic, I., Amiot, M., Pesando, J. M. und Seed, B. (1989). A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* 56: 1057-1062.
- 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: 6577-6582.
- Stauder, R., Eisterer, W., Thaler, J. und Günthert, U. (1995). CD44 variant isoforms in Non-Hodgkin's lymphoma: a new independent prognostic factor. *Blood* 85: 2885-2899.
- Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M. und Ben-Neriah, Y. (1994). JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* 77: 727-736.
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. und Nagata, S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75: 1169-1178.
- Suda, T., Okazaki, T., Naito, Y., Yokota, T., Arai, N., Ozaki, S., Nakao, K. und Nagata, S. (1995). Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J. Immunol.* 154: 3806-3813.
- Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C. I., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Suda, T. und Nagata, S. (1994a). Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76: 969-976.
- Takahashi, T., Tanaka, M., Inazawa, J., Abe, T., Suda, T. und Nagata, S. (1994b). Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int. Immunol.* 6: 1567-1574.
- Tanaka, Y., Yoshihara, K., Itaya, A., Kamiya, T. und Koide, S. S. (1984). Mechanism of the inhibition of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation. *J. Biol. Chem.* 259: 6579-6585.
- Tanaka, K., Yoshioka, T., Bieberich, C. und Jay, G. (1988). Role of the major histocompatibility complex class I antigens in tumor growth and metastasis. *Annu. Rev. Immunol.* 6: 359-380.
- Tanaka, Y., Adams, D. H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U. und Shaw, S. (1993). T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 $\beta$ . *Nature* 361: 79-82.
- Tanaka, M., Suda, T., Takahashi, T. und Nagata, S. (1995). Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J.* 14: 1129-1135.
- Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H. W. und Goeddel, D. V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74: 845-853.
- Taylor, L. D., Carmack, C. E., Schramm, S. R., Mashayekh, R., Higgins, K. M., Kuo, C. C., Woodhouse, C., Kay, R. M. und Lonberg, N. (1992). A transgenic mouse that expresses a diversity of human sequence heavy and light chain immunoglobulins. *Nucleic Acids Res.* 20: 6287-6295.
- Tewari, M. und Dixit, V. M. (1995). Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J. Biol. Chem.* 270: 3255-3260.
- Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., Poirier, G. G., Salvesen, G. S. und Dixit, V. M. (1995). Yama/ CPP32 $\beta$ , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81: 801-809.
- Thomas, L., Byers, H. R., Vink, J. und Stamenkovic, I. (1992). CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J. Cell Biol.* 118: 971-977.
- Tian, Q., Streuli, M., Saito, H., Schlossman, S. F. und Anderson, P. (1991). A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* 67: 629-639.
- Tölg, C., Hofmann, M., Herrlich, P. und Ponta, H. (1993). Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res.* 21: 1225-1229.
- Toyama-Sorimachi, N. und Miyasaka, M. (1994). A novel ligand for CD44 is sulfated proteoglycan. *Int. Immunol.* 6: 655-660.
- Tschopp, J., Schafer, S., Masson, D., Peitsch, M. C. und Heusser, C. (1989). Phosphorylcholine acts as a Ca<sup>2+</sup>-dependent receptor molecule for lymphocyte perforin. *Nature* 337: 272-274.
- Turner, J. M., Brodsky, M. H., Irving, B. A., Levin, S. D., Perlmutter, R. M. und Littman, D. R. (1990). Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* 60: 755-765.
- Vegh, Z., Wang, P., Vanky, F. und Klein, E. (1993). Selectively down-regulated expression of major histocompatibility complex class I alleles in human solid tumors. *Cancer Res.* 53: 2416-2420.
- Vignaux, F., Vivier, E., Malissen, B., Depraetere, V., Nagata, S. und Golstein, P. (1995). TCR/CD3 coupling to Fas-based cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 181: 781-786.
- von Schwedler, U., Kornbluth, R. S. und Trono, D. (1994). The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6992-6996.
- Wagner, S. D., Popov, A. V., Davies, S. L., Xian, J., Neuberger, M. S. und Bruggemann, M. (1994a). The diversity of antigen-specific monoclonal antibodies from transgenic mice bearing human immunoglobulin gene miniloci. *Eur. J. Immunol.* 24: 2672-2681.

- Wagner, S. D., Williams, G. T., Larson, T., Neuberger, M. S., Kitamura, D., Rajewsky, K., Xian, J. und Bruggemann, M. (1994b). Antibodies generated from human immunoglobulin miniloci in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 1389-1393.
- Walsh, C. M., Matloubian, M., Liu, C. C., Ueda, R., Kurahara, C. G., Christensen, J. L., Huang, M. T., Young, J. D., Ahmed, R. und Clark, W. R. (1994). Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**: 10854-10858.
- Wang, Z., Cao, Y., Albino, A. P., Zeff, R. A., Houghton, A. und Ferrone, S. (1993). Lack of HLA class I antigen expression by melanoma cells SK-MEL-33 caused by a reading frameshift in  $\beta_2$ -microglobulin messenger RNA. *J. Clin. Invest.* **91**: 684-692.
- Wang, R. und Taniguchi, M. (1995). Limited T cell antigen receptor repertoire in tumor-infiltrating lymphocyte and inhibition of experimental lung metastasis of murine melanoma by anti-TCR antibody. *J. Immunol.* **154**: 1797-1803.
- Wang, Z. Q., Auer, B., Stingl, L., Berghammer, H., Haidacher, D., Schweiger, M. und Wagner, E. F. (1995). Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev.* **9**: 509-520.
- Wange, R. L., Malek, S. N., Desiderio, S. und Samelson, L. E. (1993). Tandem SH2 domains of ZAP-70 bind to T cell antigen receptor  $\zeta$  and CD3  $\epsilon$  from activated Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 19797-19801.
- Weber, S., Traunecker, A., Oliveri, F., Gerhard, W. und Karjalainen, K. (1992). Specific low-affinity recognition of major histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. *Nature* **356**: 793-795.
- Wegener, A. M., Letourneur, F., Hoeveler, A., Brocker, T., Luton, F. und Malissen, B. (1992). The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell* **68**: 83-95.
- Weiss, A. (1993). T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell* **73**: 209-212.
- Weiss, A. und Littman, D. R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**: 263-274.
- 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**: 1018-1021.
- Weissman, A. M. (1994). The T-cell antigen receptor: a multisubunit signaling complex. *Chem. Immunol.* **59**: 1-18.
- Wels, W., Harwerth, I.-M., Mueller, M., Groner, B. und Hynes, N. E. (1992a). Selective inhibition of tumor cell growth by a recombinant single-chain antibody-toxin specific for the erbB-2 receptor. *Cancer Res.* **52**: 6310-6317.
- Wels, W., Harwerth, I.-M., Zwickl, M., Hardman, N., Groner, B. und Hynes, N. E. (1992b). Construction, bacterial expression and characterization of a bifunctional single-chain antibody-phosphatase fusion protein targeted to the human erbB-2 receptor. *Bio/Technology* **10**: 1128-1132.
- Wels, W., Beerli, R., Hellmann, P., Schmidt, M., Marte, B. M., Kornilowa, E. S., Hekele, A., Mendelsohn, J., Groner, B. und Hynes, N. E. (1995). EGF receptor and p185<sup>erbB-2</sup>-specific single-chain antibody toxins differ in their cell-killing activity on tumor cells expressing both receptor proteins. *Int. J. Cancer* **60**: 137-144.
- Wielenga, V. J. M., Heider, K.-H., Offerhaus, G. J. A., Adolf, G. R., van den Berg, F. M., Ponta, H., Herrlich, P. und Pals, S. T. (1993). Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res.* **53**: 4754-4756.
- Williams, A.F. und Beyers, A.D. (1992). T-cell receptors: at grips with interactions. *Nature* **356**: 746-747.
- Williams, D. B. und Watts, T. H. (1995). Molecular chaperones in antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 77-84.
- Wirth, K., Arch, R., Somasundaram, C., Hofmann, M., Weber, B., Herrlich, P., Matzku, S. und Zöller, M. (1993). Expression of CD44 isoforms carrying metastasis-associated sequences in newborn and adult rats. *Eur. J. Cancer* **29A**: 1172-1177.
- Yang, B., Yang, B. L., Savani, R. C. und Turley, E. A. (1994). Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. *EMBO J.* **13**: 286-296.
- Yang, G., Hellström, K. E., Hellström, I. und Chen, L. (1995). Antitumor immunity elicited by tumor cells transfected with B7-2, a second ligand for CD28/CTLA-4 costimulatory molecules. *J. Immunol.* **154**: 2794-2800.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Young, J. D., Hengartner, H., Podack, E. R. und Cohn, Z. A. (1986a). Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. *Cell* **44**: 849-859.
- Young, J. D., Podack, E. R. und Cohn, Z. A. (1986b). Properties of a purified pore-forming protein (perforin 1) isolated from H-2-restricted cytotoxic T cell granules. *J. Exp. Med.* **164**: 144-155.
- Zamoyska, R., Vollmer, A. C., Sizer, K. C., Liaw, C. W. und Parnes, J. R. (1985). Two Lym-2 polypeptides arise from a single gene by alternative splicing patterns of mRNA. *Cell* **43**: 153-163.
- Zhou, D. F. H., Ding, J. F., Picker, L. F., Bargatze, R. F., Butcher, E. C. und Goeddel, D. V. (1989). Molecular cloning and expression of Pgp-1: the mouse homolog of the human H-CAM (Hermes) lymphocyte homing receptor. *J. Immunol.* **143**: 3390-3395.
- Zöller, M., Schuhmacher, J., Reed, J., Maier-Borst, W. und Matzku, S. (1992). Establishment and characterization of monoclonal antibodies against an octahedral gallium chelate suitable for immunoscintigraphy with PET. *J. Nucl. Med.* **33**: 1366-1372.