

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen**

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Selektive Aktivierung von TNF-Rezeptor 1 am Tumor
mittels bispezifischer Antikörper**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Matthias Krusch
aus
Stuttgart**

2005

Dekan

1. Berichterstatter

2. Berichterstatter

Professor Dr. C. D. Claussen

Privatdozent Dr. H. R. Salih

Professor Dr. G. Jung

Für meine Mutter Siegrid

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Das Immunsystem	6
1.1.1	Das angeborene Immunsystem	6
1.1.2	Das adaptive Immunsystem	7
1.2	Antikörper	8
1.3	Tumor Nekrose Faktor	10
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Geräte	13
2.1.2	Glaswaren und Verbrauchsmittel	14
2.1.3	Chemikalien, Medien und Puffer	14
2.1.4	Antikörper	16
2.1.5	Murine Zelllinien	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Zellkultur	17
2.2.2	Quantifizierung der Zellviabilität mittels WST-1 Reagenz	18
2.2.3	Messung der Aktivität der Kaspasen 3 und 7	19
2.2.4	Quantifizierung der Apoptoseinduktion mittels Chrom-Release	21
2.2.5	Konzentrationsbestimmung von Antikörperlösungen	22
2.2.6	Pufferwechsel von Antikörper-Lösungen	23
2.2.7	Aufkonzentrierung von Antikörper-Lösungen	24
2.2.8	Herstellung bispezifischer F(ab') ₂ -Fragmente	24
2.2.9	Applikation der bs-F(ab') ₂ -Fragmente <i>in vivo</i>	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Monoklonale anti-TNFR1-Antikörper	28
3.2	Untersuchung der Wirkung von TNF auf Zelllinien	28

3.2.1	Reduktion der Tumorzell-Viabilität durch Behandlung mit TNF	29
3.2.2	Die Aktivierung der Kaspasen 3 und 7 durch TNF	35
3.3	Testung der Antikörper auf agonistische Aktivität	36
3.3.1	Testung der Antikörper mittels WST-1 Test	36
3.3.2	Testung der Antikörper mittels Kaspasenaktivitätsmessung	38
3.4	Herstellung bispezifischer F(ab')₂-Fragmente	39
3.5	<i>In Vitro</i> Testung des EpCAMxTNFR1 Konstruktes	44
3.5.1	Testung des Konstruktes mittels Kaspasenaktivitätsmessung	44
3.5.2	Testung des Konstruktes im Chromfreisetzungstest	47
3.5.3	Titration des bispezifischen EpCAMxTNFR1-Konstruktes	49
3.6	<i>In vivo</i> Testung des EpCAMxTNFR1-Konstruktes	51
4	Diskussion	55
4.1	Übersicht über die antineoplastischen Effekte von TNF	55
4.2	Möglichkeiten einer therapeutischen Verabreichung von TNF	58
4.3	Das bispezifische Prinzip bei der TNFR1-Aktivierung am Tumor	59
4.4	Auswahl geeigneter Antikörper gegen murinen TNFR1	60
4.5	Herstellung bispezifischer EpCAMxTNFR1-Konstrukte	61
4.6	Testung des EpCAMxTNFR1-Konstruktes	62
4.7	<i>In vivo</i> Testung des EpCAMxTNFR1-Konstruktes	63
5	Zusammenfassung	66
6	Literaturverzeichnis	69
7	Danksagung	77
8	Lebenslauf	79

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen dient dem Schutz der Integrität des Organismus. Diese Integrität wird zum einen durch exogene Pathogene wie z.B. Viren, Bakterien oder Protozoen, zum anderen aber auch durch maligne entartete körpereigene Zellen gefährdet. Um den Vertebratenorganismus vor diesen Gefahren zu schützen hat sich ein komplexes Immunsystem entwickelt, welches sich aus verschiedenen Komponenten zusammensetzt. Es umfasst unter anderem eine Vielzahl verschiedener Zelltypen, die z.T. in gesonderten Organen (z.B. im Thymus) heranreifen und wiederum in speziellen Organen (z.B. in Milz und Lymphknoten) aktiviert werden. Die Zellen des Immunsystems werden in der Regel lebenslang neu gebildet, nehmen sehr unterschiedliche Funktionen wahr, zeigen Präferenzen für bestimmte Gewebe und weisen eine sehr unterschiedliche Lebensdauer auf. Daneben beinhaltet das Immunsystem auch ein großes Arsenal von löslichen Molekülen, die entweder direkt gegen Pathogene gerichtet sind (z.B. Lysozym, Immunglobuline) oder für die Kommunikation und Regulation der Zellen des Immunsystems untereinander von entscheidender Bedeutung sind (z.B. Zytokine, Chemokine).

Das Immunsystem der Vertebraten lässt sich in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilen. Während das angeborene Immunsystem einen schnellen allgemeinen Schutz vor „Standard-Pathogenen“ bietet, generiert das adaptive Immunsystem einen auf beliebige Fremd-Strukturen „maßgeschneiderten“ Schutz, der in der Regel sehr effektiv und langlebig ist.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist phylogenetisch konserviert und bei fast allen vielzelligen Organismen zu finden [1]. Hierzu zählen die Zellen der myeloischen Zellreihe wie z.B. Granulozyten und Monozyten, aber auch die natürlichen Killer Zellen (NK-Zellen) als Vertreter der Lymphozyten sowie diverse molekulare

Abwehrsysteme (z.B. Lysozym, Komplementsystem). All diesen Komponenten ist gemeinsam, dass sie im Zuge einer Infektion sofort aktiviert werden können und eine rasche Immunreaktion bewerkstelligen. Hierdurch wird auch die etwa vier bis sieben Tage währende Zeitspanne bis zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems überbrückt. Die schnelle Immunreaktion beruht unter anderem auf invarianten, pathogenspezifischen Rezeptorsystemen wie z.B. den Toll-ähnlichen Rezeptoren, welche eine spezifische Erkennung molekularer Struktureinheiten von Mikroorganismen und Viren ermöglichen [2]. Diese und andere „pattern recognition receptors“ (PRR) vermitteln u.a. die Aktivierung der Komplementkaskade, die Opsonierung bakterieller Zellwände, die Induktion von Phagozytose und Apoptose, die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen und auch die Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems. Mittels der PRR wird auch die Zelloberflächenexpression kostimulierender Moleküle und die Synthese proinflammatorischer Mediatoren durch antigen-präsentierende Zellen (APC) induziert, was wiederum die Voraussetzung für die Initiation einer adaptiven Immunantwort ist [3-5].

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem ist eine Errungenschaft der Vertebraten [6]. Es beruht im wesentlichen auf der zufälligen Zusammenstellung der für die Antigenrezeptoren kodierenden Gene aus variablen Einzelsegmenten durch „ungenau somatische Rekombination“ in lymphozytären Vorläuferzellen [7]. Die auf diese Weise erreichte klonale Diversität wurde auf 10^{16} bis 10^{20} taxiert [8,9]. Nach der somatischen Rekombination werden die *de novo* generierten Antigenrezeptoren auf ihre Toleranz gegenüber körpereigenen Selbst-Strukturen überprüft und selbst-reaktive Vorläuferzellen eliminiert. Selbst-tolerante Zellen werden dagegen in die Peripherie entlassen [10-12]. Die Aktivierung dieser „naiven“, peripheren Lymphozyten durch spezifische Signale führt schließlich zur Ausreifung zu Effektorzellen [13,14]. Während schließlich B-Lymphozyten Immunglobuline zur Neutralisation, Opsonierung und Phagozytose frei zugänglicher („extrazellulärer“) Antigene produzieren können,

erkennen T-Lymphozyten über ihre T-Zellrezeptoren Antigenstrukturen auf körpereigenen Zellen.

1.2 Antikörper

Jede B-Zelle synthetisiert ein Immunglobulin (Ig) mit einer einzigen Spezifität. Membrangebundenes Immunglobulin auf der B-Zell-Oberfläche dient als Antigenrezeptor der Zelle und heißt B-Zell-Rezeptor. Lösliche Immunglobuline derselben Spezifität werden von ausdifferenzierten B-Zellen – den klonalen Plasmazellen – als Antikörper sezerniert und stellen die freigesetzte Form der B-Zell-Antigenrezeptoren dar. Die biochemische Analyse von Immunglobulinen führte zu der Erkenntnis, dass die Antikörpermoleküle aus zwei unterschiedlichen Bereichen bestehen: einer konstanten Region, die jeweils eine von nur vier oder fünf biochemisch unterschiedlichen Formen annehmen kann, und einer variablen Region, die in einer nahezu unendlichen Vielfalt von sehr fein abgestuften Formen auftreten kann, was eine spezifische Bindung an die ebenso vielfältigen Antigene ermöglicht. Antikörper sind Y-förmige Moleküle und gleichermaßen aus je zwei gepaarten schweren und leichten Polypeptidketten aufgebaut [15]. Innerhalb dieser Gruppe unterscheidet man fünf verschiedene Klassen von Immunglobulinen – IgM, IgD, IgG, IgA und IgE – anhand ihrer konstanten Regionen [16].

Die im Mittelpunkt des Interesses dieser Arbeit stehenden IgG-Antikörper sind Moleküle mit einer relativen Molekülmasse von ca. 150kDa und aus zwei verschiedenen Polypeptidketten zusammengesetzt. Die Ketten mit annähernd 50kDa bezeichnet man als schwere (heavy) oder H-Ketten, die anderen mit 25kDa als die leichten (light) oder L-Ketten. Die beiden schweren Ketten sind durch Disulfid-Brücken miteinander verbunden und jede schwere Kette ist ebenfalls durch eine Disulfidbrücke mit einer leichten Kette verknüpft. Die jeweiligen beiden schweren und leichten Ketten in jedem Immunglobulinmolekül sind identisch. Damit stehen zwei identische Antigenbindungsstellen zur Verfügung, welche gleichzeitig an zwei identische Strukturen binden können. Zwei Typen von leichten Ketten werden unterschieden: Lambda- (λ -) und

Kappa- (κ -) Ketten, wobei nur jeweils ein Typ in einem Antikörper vorliegt und beide Typen von leichten Ketten in jeder der fünf Hauptklassen von Antikörpern vorliegen können.

Die Klasse eines Antikörpers wird durch die Struktur seiner schweren Kette festgelegt. Die schweren Ketten der fünf vorkommenden Immunglobulinklassen werden mit dem entsprechenden kleinen griechischen Buchstaben bezeichnet (μ , δ , γ , α , ϵ), wobei IgG am weitaus häufigsten vorkommt. Ihre charakteristischen funktionellen Eigenschaften erhalten die schweren Ketten durch ihren nicht mit der leichten Kette in Verbindung stehenden carboxyterminalen Anteil. Die aminoterminalen Sequenzen sowohl der schweren als auch der leichten Ketten variieren zwischen verschiedenen Antikörpern erheblich. Die Sequenzvariabilität beschränkt sich auf die erste Domäne, die übrigen Domänen desselben Isotyps sind dagegen konstant. Die aminoterminalen variablen V-Regionen oder V-Domänen der schweren und leichten Ketten (V_H bzw. V_L) bilden die variable Region des Antikörpers. Die konstanten C-Regionen oder C-Domänen der schweren und leichten Ketten (C_H bzw. C_L) dagegen bilden zusammen die konstante Region. Die schwere Kette ist aus mehreren konstanten Domänen aufgebaut, die man vom Aminoterminus zum Carboxylende durchzählt, zum Beispiel C_{H1} , C_{H2} und so weiter. Letztlich besteht ein Antikörpermolekül aus drei gleich großen Teilen, die über die Hinge-Region, ein bewegliches Stück der Polypeptidkette, miteinander verknüpft sind. Die Struktur von Antikörpermolekülen wurde mittels proteolytischer Enzyme, die Polypeptidsequenzen an bestimmten Aminosäuren spalten, untersucht. Ein Verdau mit der Protease Papain spaltet Antikörpermoleküle in zwei identische Fab'-Fragmente (fragment antigen binding), welche die antigenbindende Aktivität enthalten, und ein Fc-Fragment (fragment crystallizable), welches mit Effektormolekülen und Effektorzellen interagiert. Die funktionellen Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Isotypen von Antikörpern liegen im wesentlichen innerhalb des Fc-Fragments.

Spaltet man Antikörpermoleküle mit Pepsin, einer anderen Protease, so entsteht ein so genanntes $F(ab')_2$ -Fragment, in dem die beiden antigenbindenden Arme des Antikörpermoleküls miteinander verknüpft bleiben während die schwere Kette in kleine Fragmente zerschnitten wird. Dies ist

deshalb von herausragender Bedeutung, da ein F(ab')₂-Fragment im Gegensatz zu Fab'-Fragmenten genau die selben Bindungseigenschaften wie der ursprüngliche Antikörper besitzt, jedoch nicht mit Effektormolekülen in Wechselwirkung treten kann. Dies ist sowohl für die therapeutische Anwendung als auch für die Erforschung der Rolle der Fc-Region von besonderer Bedeutung.

1.3 Tumor Nekrose Faktor

Bereits vor ca. 30 Jahren wurde das Zytokin Tumor Nekrose Faktor (TNF) entdeckt, das bei Aktivierung des Immunsystems gebildet wird und zytotoxische Wirkung gegen viele Tumorzelllinien und auch gegen Tumore in einigen Tiermodellen aufwies [17]. Im Jahr 1984 wurde die cDNA kloniert [18,19] und einige Jahre später die zugehörigen Rezeptoren identifiziert, die in der Lage sind, TNF zu binden. Nachfolgend stellte man fest, dass TNF den Prototyp einer ganzen Zytokin-Familie – der TNF Familie – darstellt [20].

TNF wird zunächst als Typ II Transmembranprotein in Form eines stabilen Homotrimers gebildet [21,22] und nachfolgend durch TNF alpha converting enzyme (TACE) in löslicher Form als Trimer mit einem Molekulargewicht von 51kDa (Monomer 26kDa) abgespalten [23]. TNF sowie die anderen Mitglieder der TNF Familie lösen ihre Effekte nach Interaktion mit ihren zugehörigen Membranrezeptoren aus, die in der TNF-Rezeptor-Familie zusammengefasst werden [24] und durch cysteinreiche Repeats in ihrer extrazellulären Domäne charakterisiert sind [25]. Für TNF wurden zwei zugehörige Rezeptoren charakterisiert: TNF-Rezeptor 1 (TNFR1, CD120a, p55/60) und TNF-Rezeptor 2 (TNFR2, CD120b; p75/80) [25,26]. TNFR1 ist konstitutiv auf fast allen Geweben exprimiert, wohingegen TNFR2 typischerweise auf Zellen des Immunsystems gefunden wird [20]. Bei dem Großteil der Zellen stellt also TNFR1 den hauptsächlichen, da einzigen Mediator des TNF-Signaling dar. Im Gegensatz zu TNFR2 ist TNFR1 ein Todesrezeptor, d.h. er enthält eine Todes Domäne (DD) in seinem zytoplasmatischen Teil [27]. Die DD rekrutiert weitere Proteine, welche letztendlich zur Aktivierung von Kaspasen führen und damit Apoptose

(programmierten Zelltod) auslösen [28]. Andererseits kann TNFR1 jedoch auch über die Rekrutierung von TRAF (TNF-Rezeptor-Assoziierter-Faktor)-Molekülen spezifische Genexpression vermitteln [29].

TNF wird in erster Linie von Makrophagen und lymphatischen Zellen, aber auch von einer Vielzahl anderer Zellen wie Mastzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und neuronalen Zellen gebildet [30]. Die erstbeschriebene und daher namengebende Funktion von TNF war seine Antitumoraktivität in einem Maus-Tumormodell [17]. TNF besitzt jedoch ein sehr breites Spektrum von Bioaktivitäten, und fast alle Zellen reagieren auf die eine oder andere Weise auf TNF Stimuli. So spielt TNF, nach Stimulation durch Endotoxin oder andere bakterielle Komponenten z.B. eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des septischen Schocks [31]. Während hohe Konzentrationen von TNF schockähnliche Symptome verursachen, führt eine lange Exposition gegenüber niedrigen Konzentrationen von TNF zu Verfall und Kachexie. In der Tat wurde der biologische Mediator für Kachexie zuerst in einem Tiermodell bei der Infektion mit Trypanosomen nachgewiesen, weswegen TNF bei seiner Entdeckung ursprünglich parallel als Cachexin beschrieben worden war [32]. Heute ist TNF auch als wesentlicher Mediator von vielen Autoimmunerkrankungen wie z.B. rheumatoider Arthritis, Morbus Bechterew oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn identifiziert worden [33-35]. Darüber hinaus wird diesem Zytokin mittlerweile eine Rolle bei der Pathogenese des Herzversagens, Asthma, Leberzirrhose und Diabetes und vielen mehr, ja sogar bei psychiatrischen Erkrankungen zugewiesen [36-39].

TNF zeigt also eine beeindruckende Vielzahl an Funktionen sowohl in Regeneration, Proliferation als auch Destruktion, welche vom Zeitpunkt und der Dauer der TNF-Exposition ebenso beeinflusst werden wie von der Expression der zugehörigen Rezeptoren, insbesondere auch von dem Verhältnis der Expression von TNFR1 und TNFR2 im zellulären Kontext. Es scheint, als ob die Antitumoraktivität von TNF *in vivo* von einer funktionellen Immunantwort mindestens ebenso abhängig ist wie von dessen erstbeschriebener Fähigkeit zur Induktion von Zelltod in Tumorzellen. Heute wird TNF deshalb nicht mehr hauptsächlich als Nekrose oder Apoptose auslösendes Zytokin, sondern eher

als proinflammatorisches Zytokin mit einer zusätzlichen Fähigkeit zur Induktion von Apoptose angesehen. Nichtsdestotrotz, oder wie im Falle unserer und anderer Arbeitsgruppen gerade umso mehr besteht jedoch weiter ein großes Interesse an der Aktivierung von TNF Rezeptoren für die Tumorthherapie, falls es gelingt, die schwerwiegenden Nebenwirkungen einer systemischen Gabe von TNF, die von grippeähnlichen Symptomen bis zum septischen Schock reichen, zu limitieren.

Deshalb war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, einen bispezifischen Antikörper zu generieren und zu testen, mit welchem eine Aktivierung von murinem TNFR1 ausschließlich am Tumor nach Erkennung eines Zielantigens auf Tumorzellen erreicht wird. Dadurch sollten systemische Nebenwirkungen vermieden werden können und eine Grundlage für eine zukünftige experimentelle Erprobung von bispezifischen Antikörpern zur gezielten Aktivierung des TNF Rezeptors im Menschen geschaffen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Brutschrank, Hera cell	Heraeus, D-Hanau
Durchlicht-Mikroskop, Axiovert 25	Zeiss, D-Jena
Einkanal Durchfluss-UV-Monitor UV-1	Pharmacia-Biotech, D-Freiburg
Einkanalschreiber Rec 481	Pharmacia-Biotech, D-Freiburg
ELISA-Reader, E-max	Molecular Devices, D-Ismaning
Eppendorf-Zentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus, D-Hanau
Feinwaage, Mettler AT 261 Delta	Sartorius, D-Göttingen
Fluoreszenz-Reader, MicroTek FL1	Bio-Tek instruments, USA- Winooski
FPLC-Pumpe, P500	Pharmacia-Biotech, D-Freiburg
Fraktionskollektor FRAC-100	Pharmacia-Biotech, D-Freiburg
Gelfiltrationschromatographiesäule HiLoadTM 16/60 Superdex TM 200 (FPLC)	Pharmacia-Biotech, D-Freiburg
Heizrührer, MR 3002	Heidolph, D-Schwabach
MicroBeta Counter 1450 Plus	Perkin Elmer Wallac, FL-Turku
Multichannel Pipette, 25-200 µl	Integra Biosciences, D-Fernwald
Multipipette plus	Eppendorf, D-Hamburg
pH-Meter, inolab	WTW, D-Weilheim
Pipettboy, Pipeteboy comfort	Integra Biosciences, D-Fernwald
Pipetten	Gilson, D-Bad Camberg
Power Supply EPS 601	Pharmacia-Biotech, D-Freiburg
SMART System (Superdex 200)	Pharmacia-Biotech, D-Freiburg
Spektrophotometer Ultrospec 3000	Pharmacia-Biotech, SE-Uppsala
Sterilbank, Herasafe	Heraeus, D-Hanau
Tischwaage, BL150S	Sartorius, D-Göttingen
Vortexer, Reax Top	Heidolph, D-Schwabach
Wasserbad, 3042	Köttermann, D-München

Wippe Rocky RT-1
Zentrifuge, Multifuge

Fröbel, D-Lindau
Heraeus, D-Hanau

2.1.2 Glaswaren und Verbrauchsmittel

Allgemeine Glasgefäße
Cryoröhrchen (2ml)
Combitips (2,5 ml und 10,0 ml)
Dialysekassette, Slide-A-Lyzer, 10 kD
Einmalpipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)
Einmalspritzen
Lumaplate 96
Mikrokonzentratoren Centriprep YM-30
Neubauer Zählkammer
Pasteurpipetten Long Size
PD-10-Säulen Sephadex G25

Pipettenspitze 10, 200, 1000
Quarzküvette Suprasil halbmikro
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2 ml)
Spritzenfilter, Minisart 0.20 µm
Zellkulturflaschen (250 ml)
Zellkulturplatten 96-well flat und round bottom
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)

Schott, D-Mainz
Greiner, D-Frickenhausen
Eppendorf, D-Hamburg
Pierce, USA-Rockford, IL
Corning incorporated, USA-NY
Braun, D-Melsungen
Perkin Elmer, USA-Boston
Millipore Corp, USA-Bedford, MA
Brand, D-Werheim
WU, D-Mainz
Amersham Biosciences,
SE-Uppsala
VWR, D-Bruchsal
Hellma, CH-Basel
Eppendorf, D-Hamburg
Sartorius, D-Göttingen
Greiner, D-Frickenhausen
Corning B.V., NL-Shiphol-Rijk
Greiner, D-Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien, Medien und Puffer

DEVD-Amc
Ampuwa
Aprotinin
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl₂)

Biomol, D-Hamburg
Braun, D-Melsungen
Sigma, D-Steinheim
Roth, D-Karlsruhe

CHAPS (C ₃₂ H ₅₈ N ₂ O ₇ S)	Sigma, D-Steinheim
Cycloheximid (C ₁₅ H ₂₃ NO ₄) [1 mg/ml]	Sigma, D-Steinheim
α- Dithiothreitol (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Sigma, D-Steinheim
α- Dithiothreitol Solution [1,00 M]	Fluka, CH-Buchs
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₈ S ₂)	Sigma, D-Steinheim
Dimethylsulfoxid (C ₂ H ₅ SO)	Sigma, D-Steinheim
DPBS (1X PBS)	CambrexBio Science, B-Verviers
Ethanol p.a. (C ₂ H ₅ OH)	Merck, D-Darmstadt
Ethylenediamintetraacetat (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Sigma, D-Steinheim
Ethylenglycol-bis-(2aminoethyl)- N,N,N',N'-tetraacetat (C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀)	Sigma, D-Steinheim
Fetal Bovine Serum, FCS	Biochrom KG, D-Berlin
HEPES [1 M]	Sigma, D-Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka, CH-Buchs
Leupeptin	Sigma, D-Steinheim
Magnesium Chloride (MgCl ₂) [1,00 M]	Sigma, D-Steinheim
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, D-Darmstadt
[⁵¹ Cr] Natriumchromat (Na ₂ ⁵¹ CrO ₄)	Amersham Biosciences, D-Freiburg
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, D-Karlsruhe
Natrium Orthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma, D-Steinheim
Pepsin [10 U/mg]	Merck, D-Darmstadt
Pepstatin	Sigma, D-Steinheim
Pen-Strep 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin	CambrexBio Science, B-Verviers
Phenylmethanesulfonylfluorid (C ₇ H ₇ FO ₂ S)	Sigma, D-Steinheim
RPMI 1640 GlutaMAX-I, 25mM Hepes	Invitrogen Corporation, D-Karlsruhe
Sucrose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Sigma, D-Steinheim
Tergitol, Type NP-40	Sigma, D-Steinheim
TNF murine, rekombinant	R&D Systems inc., USA-Minneapolis

Trypan Blue Stain 0,4 %

Invitrogen Corporation,
D-Karlsruhe

Trypsin EDTA

Cambrex BioScience, B-Verviers

WST-1 Reagenz

Roche, D-Mannheim

2.1.4 Antikörper

Anti-TNFR1 Antikörper, Klon: 47803

R&D Systems inc.,
USA-Minneapolis

Anti-TNFR1 Antikörper, Klon: HM104

TebuBio, D-Offenbach

Rat IgG₁, Klon: 43414;

R&D Systems inc.,
USA-Minneapolis

Rat IgG_{2a}, Klon: 54447.11

R&D Systems inc.,
USA-Minneapolis

TNB-EpCAM-Fab'-Fragmente

Prof. Jung, Tübingen

2.1.5 Murine Zelllinien

A20 (B-Zell-Lymphom)

DSMZ, D-Braunschweig

B16-F0 (Melanom)

Prof. Jung, Tübingen

B16-C215 (Melanom)

Prof. Jung, Tübingen

EL-4 (T-Zell-Lymphom)

DSMZ, D-Braunschweig

WEHI-164s (Fibrosarkom)

DSMZ, D-Braunschweig

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5,0% CO₂ und 90% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Medium wurde für alle Zellen RPMI1640 mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Pen-Strep verwendet, wobei das FCS vor Benutzung für eine Stunde bei 56°C im Wasserbad hit zeinaktiviert wurde. Die Bestimmung der Zellzahl pro ml wurde unter Ausschluss der toten Zellen durch Anfärbung mit Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben wurden die Zellen bei 450g über 5 Minuten abzentrifugiert. Die Suspensionszelllinien EL-4 und A20 wurden jeden zweiten bis dritten Tag nach Bestimmung der Zellzahl abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Tumorzellen mit einer Konzentration von 0,15 bis 0,2x10⁶ Zellen/ml in 15ml frischem Medium in einer 250ml Zellkulturflasche propagiert. Falls Versuche mit den Zellen geplant waren, wurden diese am Tag zuvor gesplittet, so dass sie sich bei der Versuchsdurchführung in der Wachstumsphase befanden. Die adhärent wachsenden Zelllinien (WEHI-164s, B16-F0 und B16-C215) wurden bei einer Konfluenz von 80-90% mit Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (Trypsin-EDTA) und anschließendem Klopfen gegen die Zellkulturflasche abgelöst, abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Tumorzellen in 1ml frischem Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit 12.500 Zellen/cm² in einer 250ml Zellkulturflasche mit 80cm² Bodenfläche in 10ml Medium angesetzt.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden Zellen aus einer Zellkulturflasche am Tag nach dem Splitten falls nötig abgelöst, abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt, in 3,0ml Einfriermedium bestehend aus 70%RPMI 1640, 20%FCS und 10%Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und in zwei sterilen Cryoröhrchen mit je 1,5ml sofort bei -80°C eingefroren. Nach einem bis zwei Tagen wurden die Zellen in einen Stickstofftank überführt und dort bei ca. -160°C weiter gelagert.

Um eingefrorene Zellen in Kultur zu nehmen wurde ein Cryoröhrchen im

Wasserbad bei 37°C aufgetaut, sofort in ein 15ml Zentrifugenröhrchen mit ca. 10ml Medium gegeben und abzentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit sterilem PBS wurden die Zellen in 10ml Medium aufgenommen und in einer 250ml Zellkulturflasche angesetzt.

2.2.2 Quantifizierung der Zellviabilität mittels WST-1 Reagenz

Der WST-1 Test ist eine nicht-radioaktive Methode um die Proliferation und Viabilität von Zellen zu quantifizieren. In dem Test wird die Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen, dem Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System, über die Umsetzung des leicht rötlichen WST-1 Reagenz zu dunkelrotem Formazan gemessen. Die Farbveränderung, die zwischen 420 und 480nm mit einem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)-Reader gemessen werden kann, ist hierbei ein Maß für den Anteil von metabolisch aktiven Zellmitochondrien. Der WST-1 Test kann somit einerseits benutzt werden, um die Zellproliferation als Antwort auf Stimulation mit z.B. Wachstumsfaktoren oder Zytokinen zu testen, andererseits auch als Nachweismethode von Zelltod durch Gabe von z.B. apoptoseinduzierenden Substanzen oder Chemotherapeutika dienen [40].

Die Suspensionszellen EL-4 und A20 wurden mit 25.000 Zellen in 50µl Medium pro well in einer 96 well flat-bottom Platte als Triplets angesetzt. Anschließend wurden die zu testenden Substanzen (rekombinantes murines TNF und/oder Cycloheximid) zugegeben, so dass das Endvolumen 100µl pro well betrug. Für die Testung der Antikörper gegen murinen TNFR1 (anti-TNFR1) auf agonistische Aktivität wurden die Antikörperklone HM104 bzw. 47803 und ihre zugehörigen Isotypkontrollen über ihren Fc-Teil auf dem Boden einer 96 well flat-bottom Platte immobilisiert. Dafür wurden die Antikörper auf 10µg/ml in PBS verdünnt und 100µl der Antikörperlösung/well über Nacht bei 4-8°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit PBS gewaschen und die Suspensionszellen mit 25.000 Zellen in 100µl Medium pro well zu den immobilisierten Antikörpern gegeben. Nach 24h Inkubation im Brutschrank

wurden 10µl des WST-1 Reagenzes (10% Volumenanteil) zugegeben, die Platten in den Brutschrank zurückgestellt und die Absorption bei 450nm im ELISA-Reader zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen.

Die adhärenenten WEHI-164s Zellen wurden am Abend zuvor mit 50.000 Zellen in 100µl Medium pro well in einer 96 well flat-bottom Platte als Triplets angesetzt und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Danach wurden die Zellen drei mal mit sterilem PBS gewaschen, bevor die Zugabe der Substanzen in 100µl frisches Medium erfolgte. Für die Testung der Antikörper wurden die anti-TNFR1 Antikörper und ihre zugehörigen Isotypkontrollen wie oben beschrieben immobilisiert. Am nächsten Tag wurden die Platten gewaschen und 50.000 WEHI-164s Zellen in 100µl Medium pro well zu den immobilisierten Antikörpern gegeben. Anschließend wurde wie bei den Suspensionszellen weiterverfahren. Für die Auswertung wurde der Farbstoffumsatz der nicht mit TNF oder Antikörpern behandelten Zellen als 100% definiert, der Umsatz der mit den Antikörpern oder TNF behandelten Zellen auf diesen Wert bezogen und in Prozent angegeben.

$$\text{Zellviabilität [\%]} = \text{OD}_{\text{Probe}} / \text{OD}_{100\%} \times 100$$

OD_{Probe} Optische Dichte der mit TNF oder Antikörpern behandelten Zellen

OD_{100%} Optische Dichte der nicht mit TNF oder Antikörpern behandelten Zellen

2.2.3 Messung der Aktivität der Kaspasen 3 und 7

Die Grundlage der Messung basiert auf der Eigenschaft von Kaspasen, bestimmte Peptidsequenzen zu erkennen und C-terminal der Sequenz zu spalten. Im hier verwendeten System wird die Peptidsequenz Aspartat – Glutamat – Valin – Aspartat (DEVD) benutzt, welche von der Kaspase 3 (Apopain) und der Kaspase 7 (Mch-3) erkannt und C-terminal der Sequenz gespalten wird [41,42]. Das C-terminale Aspartat ist mit 7-Amino-4-Methyl-Coumarin (AMC) kovalent gebunden. Das intakte Peptid-Coumarin Konjugat

besitzt nach Anregung keine Fluoreszenz bei 460nm; wenn aber eine aktive Kaspase die Peptidsequenz abspaltet, entsteht ein Coumarin-Produkt, das nach Exzitation bei 360nm (Exzitationsmaximum 346nm) bei 460nm emittiert (Emissionsmaximum 442nm) [43]. Die gemessene Fluoreszenz ist damit ein relatives Maß für die Aktivität der Kaspasen 3 und 7 [44].

Für die Untersuchung der Aktivität der Kaspasen wurden 12.500 WEHI-164s Zellen in 100µl Medium pro well in einer 96 well flat-bottom Platte als Triplets angesetzt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die adhärennten Zellen wurden dann drei Mal mit sterilem PBS gewaschen, bevor die angegebenen Stimuli und ggf. die B16-F0 oder B16-C215 Zellen zugegeben wurden. Nach der angegebenen Inkubation bei 37°C wurden die Platten bei 450g abzentrifugiert, ausgeschlagen und auf Eis stehend getrocknet, bevor sie mit Klebefolie abgedeckt bei -80°C eingefroren wurden. Für die Testung der Antikörper wurden die anti-TNFR1 Antikörper und ihre zugehörigen Isotypkontrollen über ihren Fc-Teil auf dem Boden einer 96 well flat-bottom Platte immobilisiert. Dafür wurden die Antikörper auf 10µg/ml in PBS verdünnt und 100µl/well über Nacht bei 4-8°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten gewaschen und die 12.500 WEHI-164s Zellen in 100µl Medium pro well zu den immobilisierten Antikörpern gegeben. Anschließend wurde wie oben beschrieben fortgefahren.

Für die Messung der Aktivität der Kaspasen wurden die Platten auf Eis stehend aufgetaut und 50µl Lyse-Puffer (bestehend aus 10mM HEPES (pH 7,4), 84mM KCl, 10mM MgCl₂, 0,2mM EDTA, 0,2mM EGTA, 0,5% NP40, 1mM PMSF, 1mM DTT, 1µg/ml Leupeptin, 1µg/ml Pepstatin und 1µg/ml Aprotinin) pro well zugegeben. Nach einer Inkubation von 10 Minuten wurden 150µl Reaktions-Puffer (bestehend aus 50mM HEPES (pH 7,4), 100mM NaCl, 10% Sucrose, 0,1% CHAPS, 2mM CaCl₂, 2mM DTT und 50µM Ac-DEVD-Amc) pro well zugegeben. Die Endkonzentrationen betragen im Reaktionsansatz demnach: 40mM HEPES, 75mM NaCl, 21mM KCl, 2,5mM MgCl₂, 1,5mM CaCl₂, 0,05mM EDTA, 0,05mM EGTA, 0,125% NP-40, 7,5% Sucrose, 0,075% CHAPS, 1,75mM DTT, 0,25mM PMSF, 0,25µg/ml Leupeptin, 0,25µg/ml Pepstatin,

0,25µg/ml Aprotinin und 37,5µM Ac-DEVD-Amc. Die Platten wurden dann in den Fluoreszenz-Reader gestellt und die Emission bei 460nm nach Exzitation mit 360nm alle zwei Minuten über vier Stunden bei 37°C im Fluoreszenz-Reader gemessen. Der lange Messzeitraum diente dazu, einen Bereich zu identifizieren, in dem die Aktivität der Kaspasen linear zu messen war. Die Auswertung erfolgte zu einem jeweils zu definierenden und angegebenen Zeitpunkt im linearen Messbereich.

2.2.4 Quantifizierung der Apoptoseinduktion mittels Chrom-Release

Der Chrom-Release oder Chromfreisetzungstest bietet die Möglichkeit, in einem Zellgemisch spezifisch die Lyse von einer bestimmten Zellpopulation zu bestimmen. Hierfür werden die zu untersuchenden Zellen mit radioaktivem Natriumchromat ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, ca. 569MBq/ml, ca. 15mCi/ml Halbwertszeit 27,8d) behandelt. Das Natriumchromat gelangt schnell über die Zellmembran ins Zytosol, wo es von Cr^{6+} zu Cr^{3+} reduziert wird und nun nicht mehr die intakte Zellmembran durchwandern kann. Bei apoptotischen oder nekrotischen Zellen verändert sich die Zellmembran und wird durchlässig für das dreiwertige Chrom-Kation. Dieses gelangt aus der Zelle in den Überstand, welcher dann abgenommen und mittels einer mit Yttrium Silicat Scintillator-beschichteten Lumaplatte in einem Beta-Counter gemessen werden kann.

Von den zu untersuchenden Zellen wurden $1,2 \times 10^6$ Zellen in 50µl Medium aufgenommen und mit 5µl pro angebrochene Halbwertszeit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -Lösung 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 10ml Medium gewaschen, mit 2×10^4 Zellen in 100µl Medium pro well in einer 96 well flat-bottom Platte angesetzt und für 4-6h in einen Brutschrank gestellt. Dies diente dazu, den adhärent-wachsenden Zellen genügend Zeit zum Absetzen zu geben. Nach dieser Zeit wurden die angegebenen Stimuli und/oder Zellen zugegeben, wobei das Endvolumen pro well 200µl betrug. Nachdem der Ansatz für 18h bei 37°C inkubiert hatte, wurden 50µl des Überstandes auf eine Lumaplatte übertragen und diese, nachdem sie getrocknet war, mit Hilfe des

Beta-Counters gemessen.

Die prozentuale Lyse wurde aus den gemessenen counts per minute (cpm) über folgende Formel berechnet:

$$\text{Lyse [\%]} = (\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{spontan}}) / (\text{cpm}_{\text{maximal}} - \text{cpm}_{\text{spontan}}) \times 100$$

$\text{cpm}_{\text{Probe}}$ Counts per minute der Zellen mit den verschiedenen Stimuli

$\text{cpm}_{\text{spontan}}$ Counts per minute der unbehandelten Zellen

$\text{cpm}_{\text{maximal}}$ Counts per minute der Zellen mit 1 % Triton X 100

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Antikörperlösungen

Die Menge von Proteinen in einer Lösung kann einfach über deren Absorption bei 280nm bestimmt werden. Die Absorption ist in diesem Bereich hauptsächlich durch Tyrosin und Tryptophan, zu einer sehr geringen Menge auch durch Phenylalanin und Disulfid-Brücken bedingt. Da in Proteinen unterschiedliche Anteile der oben genannten Aminosäuren vorhanden sind, unterscheidet sich der Extinktionskoeffizient einer 1mg/ml Proteinlösung je nach Zusammensetzung des Proteins von 0 bis zu 4,0 [45]. Für Antikörper liegt der Extinktionskoeffizient bei 1,4. Bei der Messung sollte darauf geachtet werden, dass die Absorption ungefähr zwischen 0,05 und 1,0 liegt, da in diesem Bereich die Messung am exaktesten ist.

In einer Quarzküvette wurde zuerst der Puffer der Antikörperlösung eingefüllt und zur Eichung des Spektrophotometers benutzt. Dann wurde die Antikörperprobe eingefüllt und ebenfalls gemessen.

Mit dem Extinktionskoeffizienten und dem Verdünnungsfaktor wurde die Menge an Antikörper nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnet:

$$A = \varepsilon \times c \times l$$

A: Absorption bei 280 nm

ε : Extinktionskoeffizient bei 280 nm; $\varepsilon = 1,4 \text{ cm}^2/\text{mg}$

c: Konzentration in mg/ml

l: Optische Weglänge $l = 1 \text{ cm}$

Daraus ergibt sich für die Berechnung der Antikörperkonzentration:

$$c = A / 1,4 \text{ mg/ml}$$

2.2.6 Pufferwechsel von Antikörper-Lösungen

Um Salze bzw. kleinere Moleküle aus Lösungen zu entfernen bzw. eine Lösung umzupuffern, wurden PD-10-Säulen verwendet. Diese bestehen aus 8,3ml Sephadex G-25 Medium mit einer Partikelgröße von 85-260 μm . Das Säulenmedium ist so gewählt, dass Moleküle mit einem Molekulargewicht größer 5kDa ungehindert durch die Säule fließen können, wohingegen Moleküle kleiner 5kDa nur verzögert eluiert werden (vgl. 2.2.8.). Auf die mit dem gewünschten Puffer (Ziel-Puffer) equilibrierte Säule wird die Antikörper-Lösung aufgetragen und anschließend mit dem Ziel-Puffer eluiert.

Die Säule wurde viermal mit dem Ziel-Puffer vorgespült und das Eluat verworfen. Anschließend wurde die Antikörper im Ausgangs-Puffer aufgetragen und das Volumen auf 2,5ml mit dem Ziel-Puffer aufgefüllt, wobei auch diesmal das Eluat verworfen wurde. Nun wurden 3,5ml des Ziel-Puffers aufgetragen und das Eluat, in dem sich die Antikörper im Ziel-Puffer gelöst befanden, aufgefangen.

2.2.7 Aufkonzentrierung von Antikörper-Lösungen

Zur Konzentrierung von Antikörper-Lösungen wurden die Mikrokonzentratoren Centriprep YM-30 verwendet. Sie bestehen aus zwei ineinander stehenden Röhren, wobei die äußere eine normale Plastikröhre ist, der Boden der inneren aber durch eine Membran ersetzt ist, die so beschaffen ist, dass sie alle Moleküle, die größer als 30kDa sind, nicht durchlässt. In die äußere Röhre wird die zu konzentrierende Antikörperlösung gegeben und anschließend zentrifugiert. Durch die dabei wirkende Zentripetalkraft wird die Flüssigkeit mit allen Molekülen, die kleiner als 30kDa sind, aus dem äußeren Röhren durch die Membran in das innere Röhren gedrückt. In der äußeren Röhre verbleiben die Moleküle, die größer als 30kDa sind – in unserem Fall die Antikörperbausteine.

Die zu konzentrierende Lösung wurde in das äußere Röhren der Konzentratoren gegeben, das innere Röhren hineingestellt und bei 700g zentrifugiert, bis das gewünschte Restvolumen erreicht war. Um eine Bindung der Antikörperbausteine an die Membran zu verhindern wurde diese zuvor mit 0,1M Glycin-Puffer abgeblockt.

2.2.8 Herstellung bispezifischer F(ab')₂-Fragmente

Die Herstellung bispezifischer F(ab')₂-Fragmente erfolgt in vier Schritten: dem Pepsinverdau der Antikörper, der Reduktions- / Modifikationsreaktion der F(ab')₂-Fragmente, der Aufreinigung und Konzentrierung der modifizierten Fab'-Fragmente und schließlich der Hybridisierung der verschiedenen Fab'-Fragmente zu bispezifischen F(ab')₂-Fragmenten [46,47].

Im ersten Schritt werden die intakten Antikörper jeweils mittels Pepsin zu monospezifischen F(ab')₂-Fragmenten und dem Fc-Teil verdaut [48]. Hierbei muss eine zu lange Inkubation oder ein zu hoher Anteil an Pepsin vermieden werden, da es zu einer weiteren Spaltung der Antikörper in kleinere Bruchstücke kommen kann. Die erhaltenen F(ab')₂-Fragmente müssen im

nächsten Schritt in Fab'-Fragmente getrennt werden, wobei verhindert werden muss, dass sich hieraus spontan wieder F(ab')₂-Fragmente bilden. Dies kann durch Benutzung von 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) erreicht werden. DTNB wird dafür zuerst mit Dithiothreitol (DTT) reduziert, wobei zwei Moleküle TNB und zyklisches DTT entsteht. Die entstehenden 2-Nitro-5-Thiobenzoessäure (TNB) Moleküle besitzen ein Reduktionspotential, das groß genug ist, die Disulfid-Brücken der Hinge-Region zu spalten [49]. Im Rahmen dieser Reduktionsreaktion bindet TNB kovalent an die Cysteinyl-Reste der Fab'-Fragmente, so dass TNB-Fab'-Moleküle entstehen. Die spontane Oxidation der Fab'-Fragmente zu F(ab')₂-Fragmenten ist somit verhindert. Für die weiteren Reaktionen müssen die gewünschten TNB-Fab'-Moleküle von den nicht reduzierten F(ab')₂-Fragmenten, den Reduktionsmitteln und den Fc-Teilen getrennt werden. Hierzu kann die Gelfiltrations-Chromatographie verwendet werden. Eine derartige Chromatographiesäule besteht aus einem porösen Trägermaterial mit einer definierten Porengröße und einer flüssigen Phase. Abhängig von der Molekülgröße der zu reinigenden Proteine können diese zwischen das Trägermaterial oder auch in die Poren eindringen, so dass kleinere Moleküle langsamer mit der flüssigen Phase eluiert werden als größere Proteine, die nicht in das Trägermaterial eindringen können. Mittels eines Durchfluß-UV-Monitors, der die Absorption bei 280nm misst, können der Zeitpunkt, an welchem die verschiedenen Antikörperbausteine eluiert werden ermittelt und mit Hilfe eines Fraktionskollektors die Proteine aufgefangen werden. Im Zuge dieses Verfahrens kommt es allerdings zu einer Volumenzunahme der Proben, so dass eine Aufkonzentration (s.o.) notwendig wird. Nach dem die Proben aufgereinigt und konzentriert sind kann mit dem Hybridisierungsschritt fortgefahren werden. Hierzu müssen die TNB-Fab'-Moleküle von einer der beiden Spezifitäten wieder mittels DTT zu reinen Fab'-Fragmenten reduziert werden. Nach Trennung des DTT von den Fab'-Fragmenten reagieren diese dann mit TNB-Fab'-Molekülen unter Abspaltung von TNB zu bispezifischen F(ab')₂-Fragmenten.

Für den Pepsinverdau musste der anti-TNFR1 Antikörper, der in PBS gelöst vorlag, mit Hilfe einer PD-10-Säule in 0,1M Natriumacetatpuffer (0,05M Natriumacetat, 0,05M Essigsäure, 0,15M Natriumchlorid, pH4,0) umgepuffert werden. Der pH von 4,0 wurde als Kompromiss zwischen dem pH-Optimum des Pepsins (ca. pH2) [50] und dem für Antikörper maximal akzeptablen sauren pH-Wert gewählt. Nach spektrophotometrischer Bestimmung der Antikörperkonzentration wurde 1mg/ml Pepsinlösung im Mengenverhältnis 1:30 zu dem Antikörper gegeben und für 4h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der pH-Wert der Lösung durch Zugabe eines 1,0M Tris-Puffer (pH 9,0) auf ca. pH7,2 angehoben und damit der Verdau gestoppt.

Als nächster Schritt folgte die Reduktion und Modifikation der TNFR1-F(ab')₂ (gegen den murinen TNFR1 gerichtete F(ab')₂-Fragmente) mit DTNB. Hierfür wurden 40mM DTNB und 10mM DTT, beide in 0,1M Natriumphosphatpuffer (0,05M Natriumdehydrogenphosphat, 0,05M Natriumhydrogenphosphat, 0,15M Natriumchlorid, pH7,4) gemischt. Diese Lösung wurde dann in gleichem Volumen zu den verdauten TNFR1-Antikörpern gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert.

Die Aufreinigung der entstandenen TNB-TNFR1-Fab'-Moleküle erfolgte mittels einer Hiload 16/60 superdex 200 pregrade Säule. Als Laufpuffer wurde 0,1M Natriumphosphatpuffer mit einer Laufgeschwindigkeit von 50ml/h verwendet. Das Eluat wurde bei 280nm analysiert und mittels eines Fraktions-Kollektors aufgefangen (2min./Fraktion). Die nach der Analyse erhaltenen Fraktionen wurden wie oben beschrieben auf ein Volumen von ca. 2ml aufkonzentriert und die Antikörpermenge spektrophotometrisch bestimmt.

Für die Hybridisierung wurde das in PBS gelöste TNB-EpCAM-Fab'-Fragment mit DTT reduziert und anschließend auf eine PD10-Säule gegeben. Dadurch konnte einerseits eine Umpufferung in 0,015M Natriumacetatpuffer (0,0075M Natriumacetat, 0,0075M Essigsäure, 0,9% Natriumchlorid, pH4) vorgenommen werden, andererseits wurde das überschüssige DTT entfernt. Die Menge der Fab'-Fragmente in der Lösung wurde ebenfalls mittels Spektrophotometrie gemessen und die gleiche Menge der TNB-TNFR1-Fab'-Fragmente zugegeben. Nach 1h bei Raumtemperatur auf einer Wippe wurde das Gemisch auf die Gelchromatographie-Säule gegeben und die bispezifischen F(ab')₂-

Fragmente von den nicht gekoppelten Fab'-Fragmenten getrennt. Sowohl die Fraktionen der bispezifischen F(ab')₂-Fragmente als auch die der nicht gekoppelten Fab'-Fragmente (Fab'-Mix), die eine Mischung aus anti-TNFR1- und anti-EpCAM-Fab'-Fragmenten darstellen, wurden anschließend konzentriert, die Konzentration gemessen, steril filtriert und bei 4-8°C gelagert.

2.2.9 Applikation der bs-F(ab')₂-Fragmente *in vivo*

Die *in vivo* Versuche wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. G. Jung in der Abteilung Immunologie am Interfakultären Institut für Zellbiologie durchgeführt.

Für die Tumorthherapie wurden 10-12 Wochen alten C57BL/6-Mäusen (6 Tiere pro Gruppe) B16-C215 Melanomzellen, aufgenommen in einem Volumen von max. 300µl sterilem PBS, intra-peritoneal injiziert.

Nach der intra-peritonealen Applikation (2.500 B16-C215 Zellen) erfolgte eine Behandlung mit jeweils 20µg bispezifischen F(ab')₂-Fragmenten an den Tagen 1, 2, 3, 7, 9 und 10 nach Versuchsbeginn. Als Kontroll-Reagenzien wurden PBS bzw. 20µg des Fab'-Mix nach dem selben Behandlungsschema eingesetzt.

3 Ergebnisse

Zunächst wurde eine Liste der kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörper gegen den murinen TNFR1 erstellt. Zeitgleich wurde damit begonnen, Methoden zur Untersuchung der Wirkung von TNF auf murine Tumorzelllinien zu etablieren. Diese wurden dann benutzt, um die Antikörper auf agonistische Aktivität zu testen. Nachdem gezeigt werden konnte, dass einer der Antikörper den TNFR1 stimuliert wurden mit diesem Klon die bispezifischen Konstrukte hergestellt und anschließend *in vitro* und *in vivo* getestet.

3.1 Monoklonale anti-TNFR1-Antikörper

Mittels Internetrecherche und durch Anfragen bei verschiedenen Firmen konnten zahlreiche verschiedene, von unterschiedlichen Firmen vertriebene Antikörper gegen murinen TNFR1 gefunden werden. Es zeigte sich jedoch, dass insgesamt nur zwei verschiedene Klone monoklonaler Antikörper gegen den murinen TNFR1 verkauft werden: der Klon HM104, der von verschiedenen Firmen vertrieben wird, und der Klon 47803 von R&D-Systems. Der Klon HM104 ist ein monoklonaler Rattenantikörper der Klasse IgG2a und wird für ELISA, FACS, Immunhistochemie und Immunpräzipitation empfohlen. Der Klon 47803 ist ebenfalls ein monoklonaler Antikörper aus der Ratte, allerdings gehört er zur Klasse IgG1 und kann nach Firmenangabe für ELISA und Westernblot verwendet werden. Diese beiden Klone wurden käuflich erworben, jedoch war bezüglich möglicher agonistischer, d.h. den murinen TNFR1 stimulierender Eigenschaften der Antikörper nichts bekannt.

3.2 Untersuchung der Wirkung von TNF auf Zelllinien

Um die Wirkung von TNF auf murine Zelllinien zu untersuchen kamen mehrere Möglichkeiten in Frage. Zum einen können die durch TNF hervorgerufenen Reaktionen der Zellen untersucht werden, zum anderen die Aktivierung der

unterschiedlichen Signalkaskaden, die nach Bindung von TNF an TNFR1 ausgelöst werden. Bei den hervorgerufenen Reaktionen auf TNF kann die Induktion von Apoptose oder die immunmodulatorische Wirkung über die Produktion von Zytokinen nachgewiesen werden. Bei den Signalkaskaden kann die Aktivierung von Kaspasen oder NF κ B untersucht werden. Die Etablierung von Testmethoden war für eine nachfolgend geplante Untersuchung der Antikörper gegen murinen TNFR1 bezüglich ihrer agonistischen Aktivität erforderlich

3.2.1 Reduktion der Tumorzell-Viabilität durch Behandlung mit TNF

Um die Induktion von Apoptose in murinen Zelllinien über den TNFR1 zu testen wurde der nicht-radioaktive WST-1 Test benutzt. Zunächst wurden die Versuche mit den beiden Lymphomzelllinien A20 und EL-4 durchgeführt, welche aufgrund ihres Wachstums als Suspensionszellen die Durchführung der Versuche vereinfachten. Die Zelllinien wurden in einer in Vorversuchen als optimal ermittelten Konzentration von 25.000 Zellen/well in einer 96 well flat-bottom Platte angesetzt. Dann wurden verschiedene Konzentrationen von rekombinantem murinem TNF mit jeweils verschiedenen Konzentrationen des Proteininhibitors Cycloheximid zugegeben. Nach 24h Inkubation im Brutschrank wurde das WST-1 Reagenz zugefügt und die Absorption zu den angegebenen Zeiten gemessen.

Die Fibrosarkomzelllinie WEHI-164s, von der bekannt ist, dass sie sehr sensibel auf TNF reagiert, wurde mit 50.000 Zellen/well (zuvor ermittelte optimale Zellzahl) angesetzt und über Nacht im Brutschrank inkubiert, damit die Zellen genügend Zeit zum Absetzen hatten. Anschließend wurden die verschiedenen Konzentrationen von TNF zugegeben und 24h später die jeweiligen Ansätze mit dem WST-1 Test untersucht.

Es zeigte sich, dass die A20 Zellen auch in der hohen eingesetzten TNF Konzentration von 100ng/ml und sogar unter Zugabe des Proteininhibitors Cycloheximid, welcher Zellen für apoptotische Signale sensibilisiert, immer noch zu über 90% viabel waren (Abb.1). EL-4 Zellen waren unter der

Behandlung mit 100ng/ml TNF ohne Zugabe von Cycloheximid immer noch zu über 95% in der Lage, den Farbstoff zu verstoffwechseln, dies ließ sich allerdings durch die Zugabe von 0,5µg/ml Cycloheximid auf unter 50% im Vergleich zu nicht mit TNF behandelten Ansätzen absenken (Abb.2).

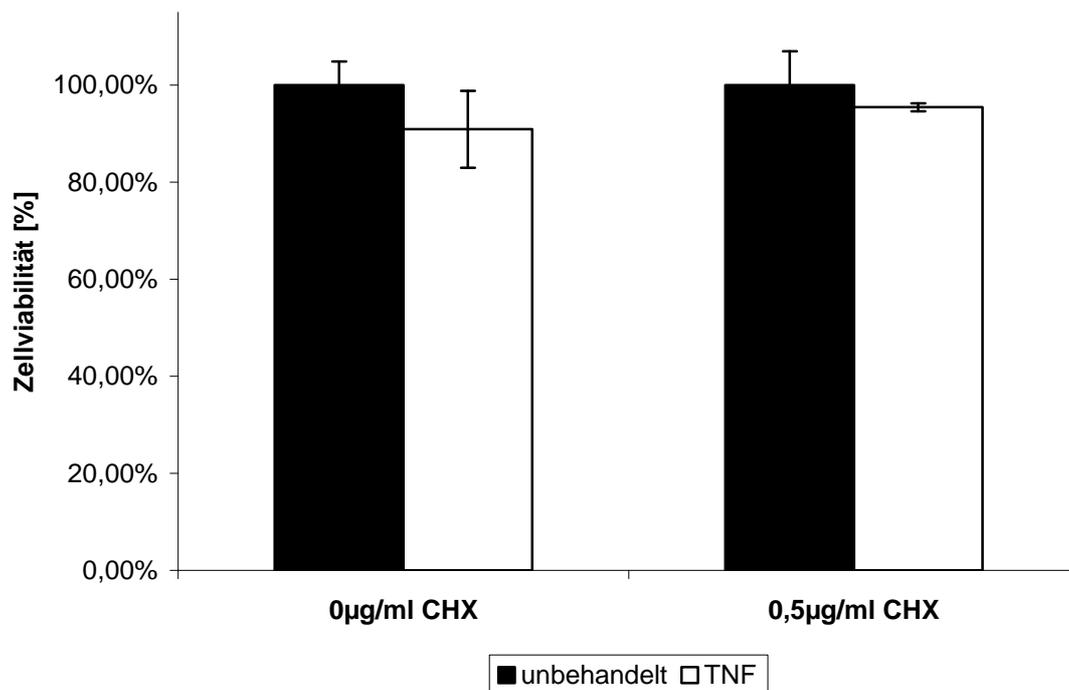


Abb.1: Untersuchung der Zellviabilität von A20 Zellen nach Behandlung mit rekombinatem murinem Tumor Nekrose Faktor (TNF):

25.000 A20 Zellen/well wurden mit 0ng/ml oder 100ng/ml TNF in Gegenwart von 0µg/ml oder 0,5µg/ml Cycloheximid (CHX) für 24h behandelt. Anschließend wurden 10µl/well WST-1 Reagenz zugegeben und nach 4h die Absorption bei 450nm gemessen. Die nicht mit TNF behandelten Zellen wurden als 100% viabel definiert. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten von Triplets mit Standardabweichung.

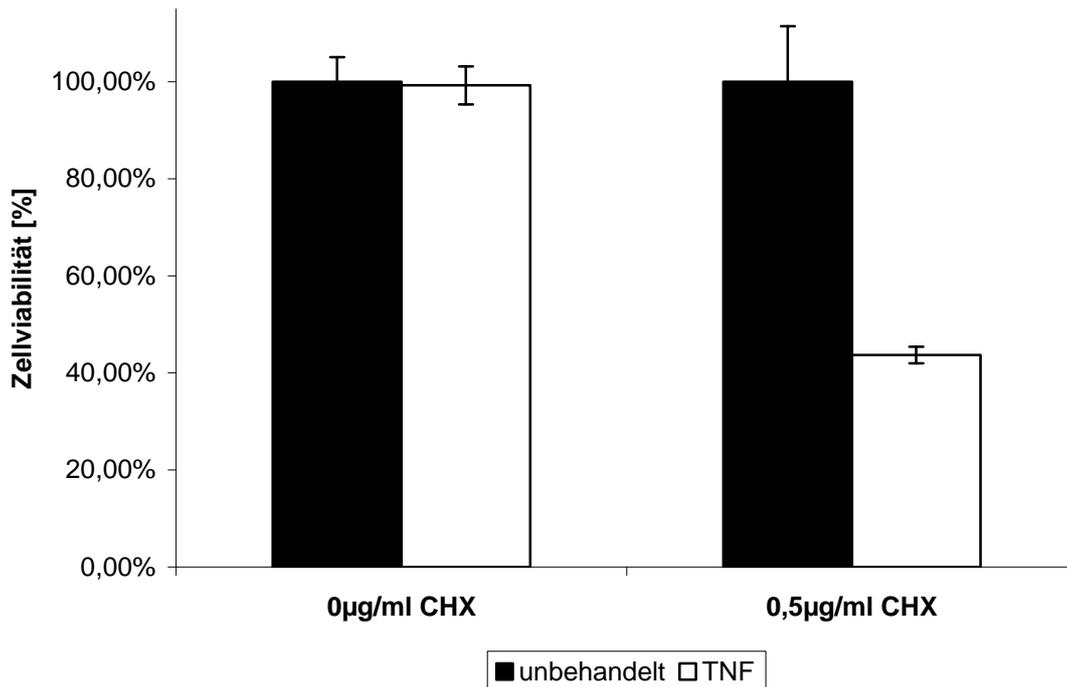


Abb.2: Untersuchung der Zellviabilität von EL-4 Zellen nach Behandlung mit rekombinatem murinem Tumor Nekrose Faktor (TNF):

25.000 EL-4 Zellen/well wurden mit 0ng/ml oder 100ng/ml TNF in Gegenwart von 0µg/ml oder 0,5µg/ml Cycloheximid (CHX) für 24h behandelt. Anschließend wurden 10µl/well WST-1 Reagenz zugegeben und nach 4h die Absorption bei 450nm gemessen. Die nicht mit TNF behandelten Zellen wurden als 100% viabel definiert. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten von Triplets mit Standardabweichung.

Daraufhin wurde der WST-1 Test mit den EL-4 Zellen dazu verwendet, die maximal effektive TNF Konzentration bei diesen Zellen sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Cycloheximid zu ermitteln (Abb.3-5).

Ohne Zusatz von Cycloheximid zeigten sich nur geringe Unterschiede bezüglich der Viabilität der Zellen nach Behandlung mit verschiedenen TNF-Konzentrationen, und auch mit einer maximalen Konzentration von 100ng/ml wurde kein Plateau erreicht (Abb.3). Nach Zusatz von Cycloheximid in Konzentrationen von 0,5µg/ml (Abb.4) und 1,0 µg/ml (Abb.5) war bei einer TNF Konzentration von 1ng/ml die Reduktion der Zellviabilität nahezu maximal und ließ sich auch durch Steigerung auf 100ng/ml TNF nicht relevant erhöhen. Der Effekt von TNF erwies sich in Gegenwart von 0,5µg/ml Cycloheximid als ausgeprägter als in Gegenwart der höheren Konzentration von 1µg/ml.

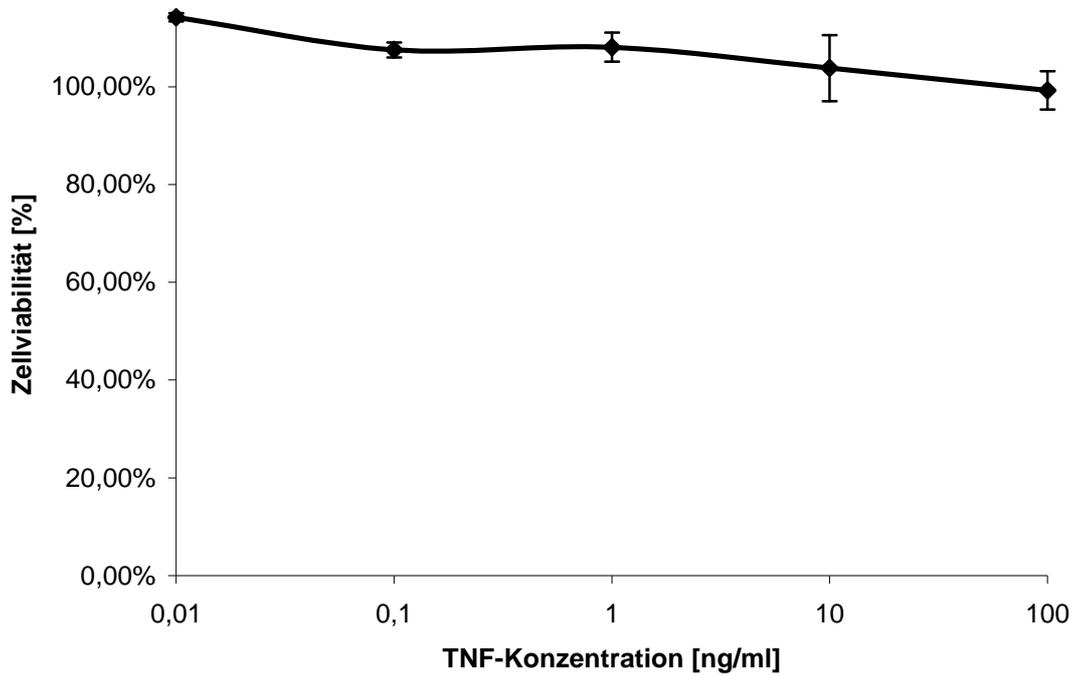


Abb.3: Untersuchung der Zellviabilität von EL-4 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem murinem Tumor Nekrose Faktor (TNF): 25.000 EL-4 Zellen/well wurden in Abwesenheit von Cycloheximid mit den angegebenen Konzentrationen von TNF für 24h behandelt. Anschließend wurden 10µl/well WST-1 Reagenz zugegeben und nach 4h die Absorption bei 450nm gemessen. Die nicht mit TNF behandelten Zellen wurden als 100% viabel definiert. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten von Triplets mit Standardabweichung.

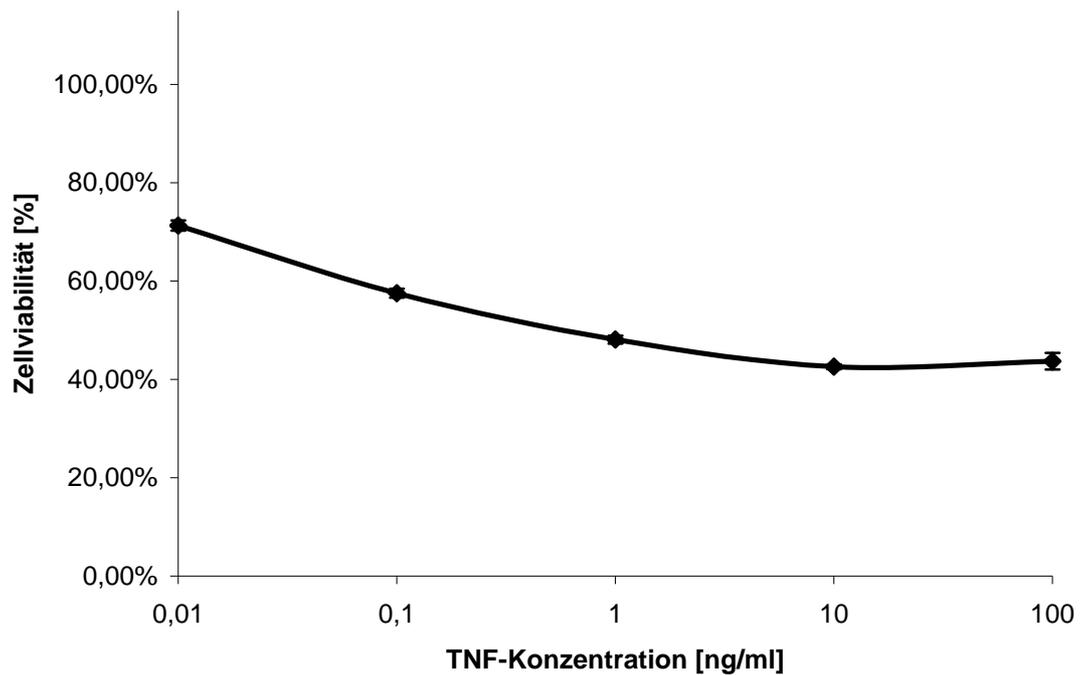


Abb.4: Untersuchung der Zellviabilität von EL-4 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem murinem Tumor Nekrose Faktor (TNF): 25.000 EL-4 Zellen/well wurden in Anwesenheit von 0,5µg/ml Cycloheximid mit den angegebenen Konzentrationen von TNF für 24h behandelt. Anschließend wurden 10µl/well WST-1 Reagenz zugegeben und nach 4h die Absorption bei 450nm gemessen. Die nicht mit TNF behandelten Zellen wurden als 100% viabel definiert. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten von Triplets mit Standardabweichung.

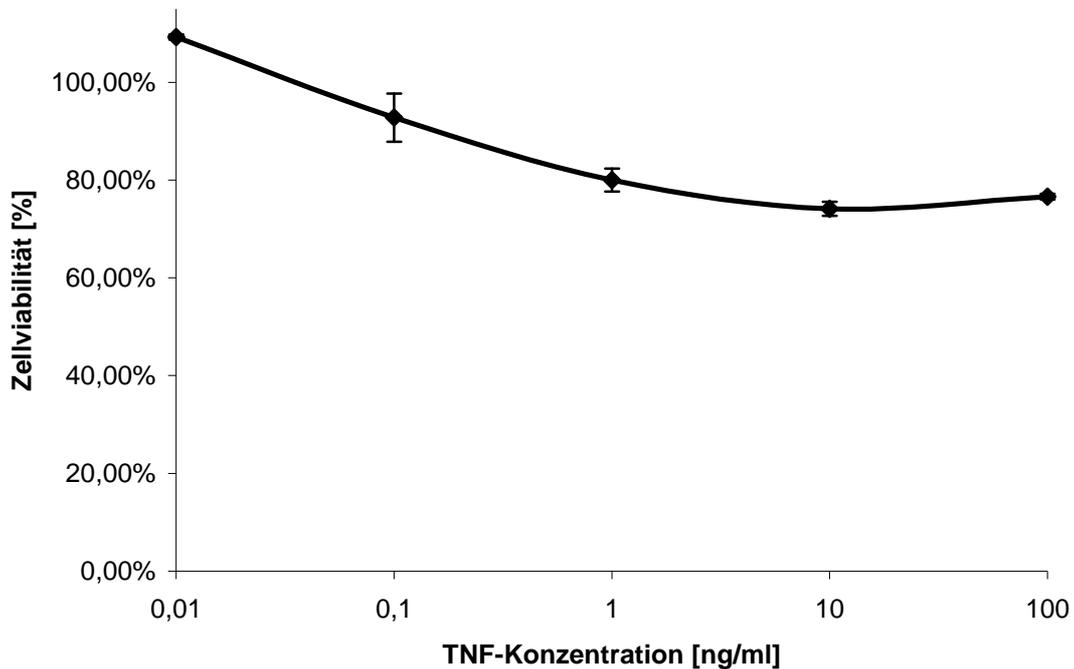


Abb.5: Untersuchung der Zellviabilität von EL-4 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem murinem Tumor Nekrose Faktor (TNF): 25.000 EL-4 Zellen/well wurden in Anwesenheit von 1,0µg/ml Cycloheximid mit den angegebenen Konzentrationen von TNF für 24h behandelt. Anschließend wurden 10µl/well WST-1 Reagenz zugegeben und nach 4h die Absorption bei 450nm gemessen. Die nicht mit TNF behandelten Zellen wurden als 100% viabel definiert. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten von Triplets mit Standardabweichung.

Um ein weiteres Versuchssystem zur Verfügung zu haben, in welchem auf die Verwendung des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid verzichtet werden kann führten wir WST-1 Versuche auch mit der hoch TNF-sensiblen adhären Zellenlinie WEHI-164s durch. Es zeigte sich eine TNF-konzentrationsabhängige Reduktion der Zellviabilität ohne Zusatz von Cycloheximid bereits mit deutlich niedrigeren TNF-Konzentrationen; Bereits mit 0,1ng/ml TNF konnte eine nahezu 50%-ige Reduktion der Zellviabilität erreicht werden (Abb.6). Somit stand für die nachfolgend beschriebenen Kokulturrexperimente ein zufriedenstellendes Testsystem zur Verfügung.

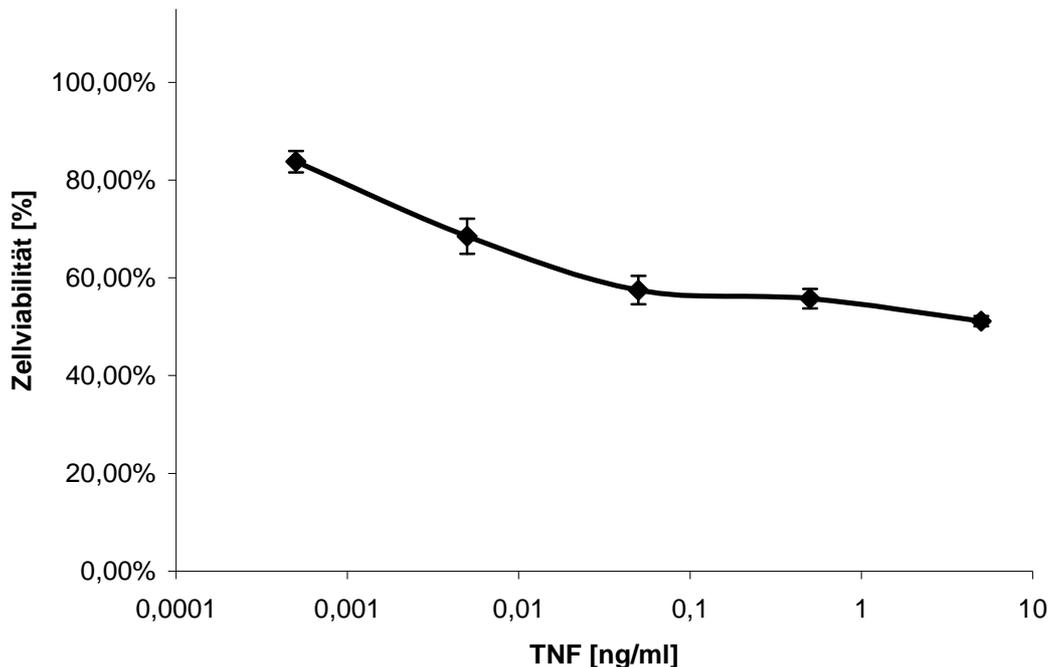


Abb.6: Untersuchung der Zellviabilität von WEHI-164s Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem murinem Tumor Nekrose Faktor (TNF):

50.000 WEHI-164s Zellen/well wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen von TNF für 24h behandelt. Nachfolgend wurden 10µl/well WST-1 Reagenz zugegeben und nach 2h die Absorption bei 450nm gemessen. Die nicht mit TNF behandelten Zellen wurden als 100% viabel definiert. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten von Triplets mit Standardabweichung.

3.2.2 Die Aktivierung der Kaspasen 3 und 7 durch TNF

Als weiteres Meßsystem für die Aktivierung des TNFR1 wurde die Aktivität von Kaspasen nach Behandlung mit TNF untersucht. Um die zeitlichen Verläufe beurteilen zu können wurde zunächst eine Zeitkinetik durchgeführt. 12.500 WEHI-164s Zellen/well wurden in einer 96 well Platte ausgesät, über Nacht im Brutschrank inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit 10ng/ml TNF behandelt. Die Messung der Aktivität der Kaspasen 3 und 7 wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Es zeigte sich ein Aktivitätsmaximum der Kaspasen zum Zeitpunkt 6h nach TNF Stimulation (Abb.7).

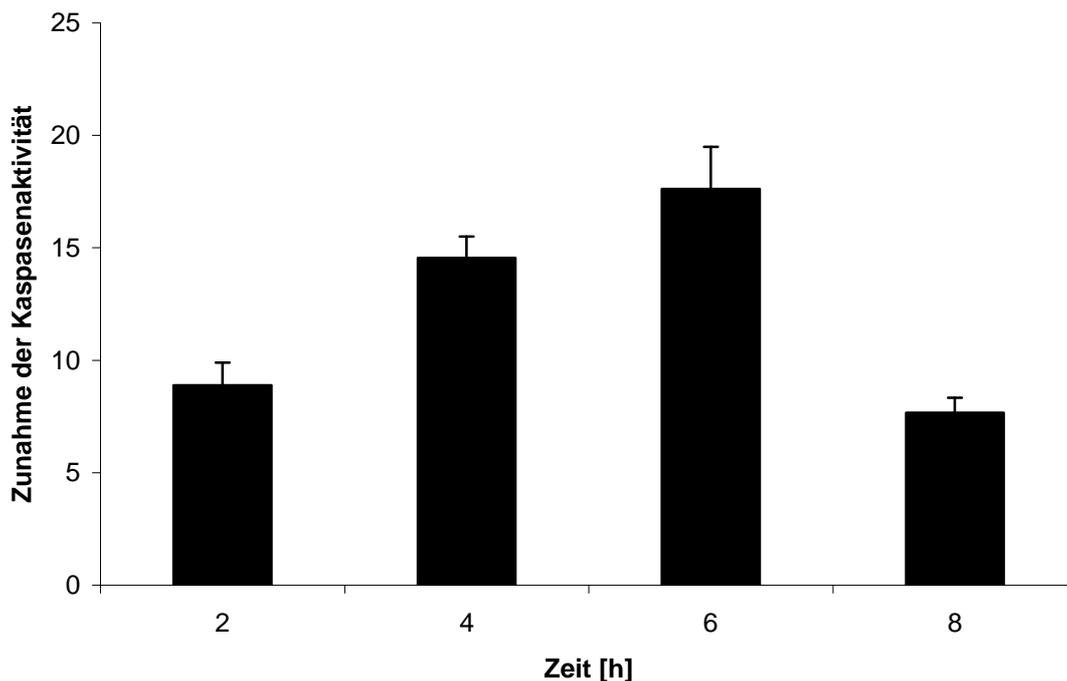


Abb.7: Untersuchung der durch rekombinanten murinen Tumor Nekrose Faktor (TNF) induzierten Aktivität von Kaspasen:

12.500 WEHI-164s Zellen/well wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert, anschließend mit einer Endkonzentration von 0,5ng/ml TNF zu den angegebenen Zeitpunkten vor der Messung behandelt und nachfolgend im Kaspasenassay gemessen. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten von Triplets mit Standardabweichung.

3.3 Testung der Antikörper auf agonistische Aktivität

3.3.1 Testung der Antikörper mittels WST-1 Test

Um die kommerziell zur Verfügung stehenden Antikörper auf agonistische Aktivität zu testen wurden zunächst WST-1 Untersuchungen mit EL-4 Zellen durchgeführt. Die EL-4 Zellen sowie 0,5µg/ml Cycloheximid wurden zu den immobilisierten Antikörpern gegeben. Als Positiv-Kontrolle diente eine Behandlung mit 1ng/ml TNF. Es zeigte sich, dass der Antikörperklon HM104 und dessen Isotypkontrolle keinen Einfluss auf die Zellviabilität hatten (Abb.8). Der Klon 47803 führte jedoch zu einer deutlichen Reduktion der Zellviabilität auf ca. 70%, was nahezu dem durch die Positivkontrolle (TNF) vermittelten Effekt

entsprach. Ein unspezifischer Effekt konnte ausgeschlossen werden, da die Isotypkontrolle keine signifikanten Unterschiede zu nicht mit TNF behandelten Zellen erbrachte (Abb.8). Damit war gezeigt, dass es sich bei dem Klon 47803 um einen agonistischen Antikörper handelt.

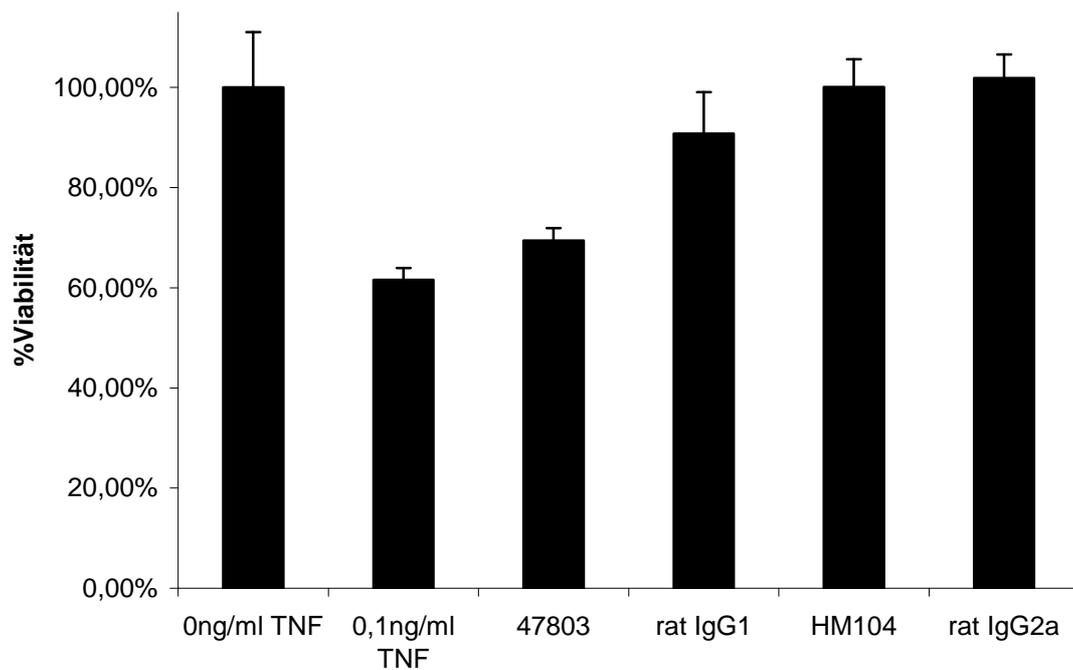


Abb.8: Testung der Antikörper mittels WST-1 Test:

25.000 EL-4 Zellen/well wurden in Gegenwart von 0,5µg/ml Cycloheximid (CHX) auf die immobilisierten Antikörper bzw. in nicht vorinkubierte wells gegeben. Als unbehandelte Kontrolle wurden EL-4 nur mit CHX behandelt und als Positiv-Kontrolle 1ng/ml rekombinanter muriner Tumor Nekrose Faktor (TNF) und 0,5µg/ml CHX verwendet. Nach 24h Inkubation wurden 10µl/well WST-1 Reagenz zugegeben und nach 4h die Absorption bei 450nm gemessen. Die nur mit CHX behandelten Zellen wurden als 100% viabel definiert. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten von Triplets mit Standardabweichung.

3.3.2 Testung der Antikörper mittels Kaspasenaktivitätsmessung

Um die Ergebnisse des WST-1 Testes mit einer anderen Methode und bei einem weiteren Zelltyp zu verifizieren wurde zusätzlich die Fähigkeit der Antikörper untersucht, Kaspasenaktivität zu induzieren. Hierzu wurden die Antikörper ebenfalls wie vorbeschrieben in einer 96-well-Platte über Nacht immobilisiert und 12.500 WEHI-164s Zellen/well zugegeben. Als Kontrollen dienten erneut unbehandelte und mit TNF behandelte Zellen. Wie vorab beschrieben war in diesem System eine Zugabe von Cycloheximid nicht erforderlich. Auch in diesem Versuchsansatz zeigte sich, dass der Klon 47803 agonistische Wirkung am TNFR1 besitzt, da er zu einer ca. 14-fachen Steigerung der Aktivität der Kaspasen führte, wohingegen bei den Zellen, die mit der Isotypkontrolle, dem Klon HM104 oder dessen Isotypkontrolle behandelt wurden, keine gesteigerte Aktivität der Kaspasen nachweisbar war. In der Positivkontrolle mit 0,5ng/ml TNF wurde eine ca. 18-fache Steigerung der Kaspasenaktivität erzielt (Abb.9). Damit waren die Ergebnisse bezüglich der agonistischen Aktivität des Klon 47803 aus dem WST-1 Test bestätigt.

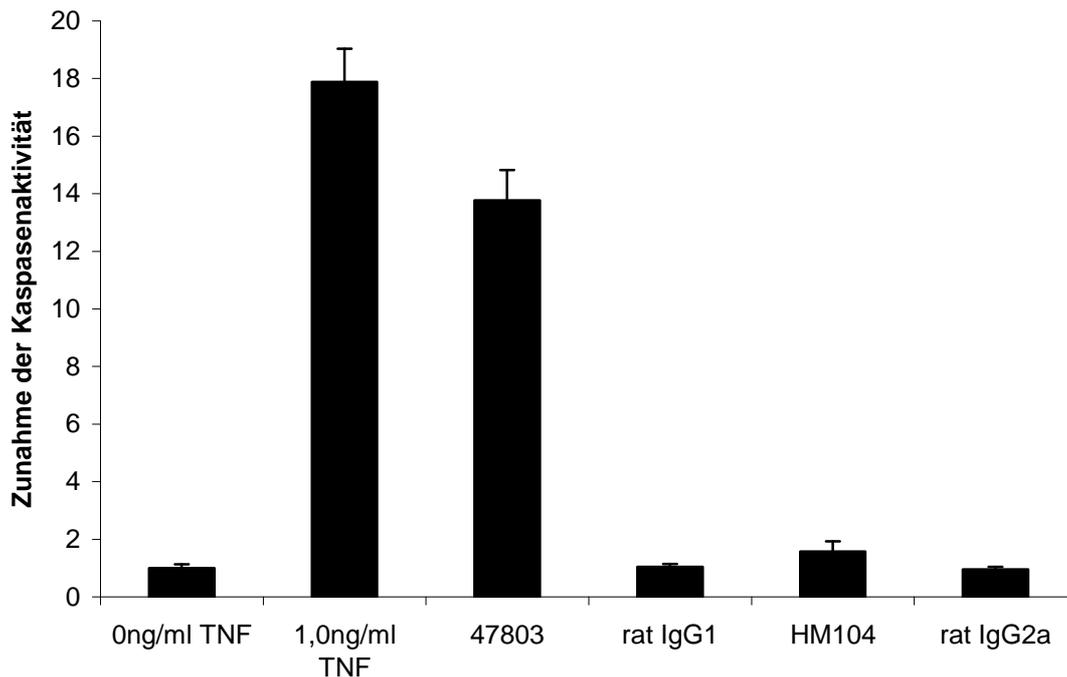


Abb.9: Testung der Antikörper mittels Kaspasenaktivitätsmessung:

12.500 WEHI-164s Zellen/well wurden auf die immobilisierten Antikörper bzw. in nicht vorinkubierte wells gegeben. Zudem wurde eine unbehandelte Kontrolle und als Positiv-Kontrolle 0,5ng/ml rekombinanter muriner Tumor Nekrose Faktor (TNF) verwendet. Nach 6h Inkubation wurden die Ansätze im Kaspasenassay gemessen. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten von Triplets mit Standardabweichung.

3.4 Herstellung bispezifischer F(ab')₂-Fragmente

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung eines bispezifischen F(ab')₂-Fragments, mit welchem strikt Zielantigen-abhängig der murine TNFR1 aktiviert werden kann. Nachdem ein agonistischer Antikörperklon definiert worden war sollten nun die bispezifischen Antikörper generiert werden. Nach Erwerb entsprechender Mengen des anti-TNFR1 Antikörper (Klon 47803) wurde die Antikörper-Lösung mit einer PD-10 Minisäule in Acetat-Puffer umpuffert. Diese Lösung wurde bei 280nm in einer Quarzküvette gegen Acetat-Puffer als Blank gemessen. Die optische Dichte betrug 1,10. Die Antikörperkonzentration betrug demnach

$$c = 1,1 / 1,4 = 0,786\text{mg/ml}$$

Es ergab sich somit eine totale Antikörpermenge von 2,750mg in 3,5ml Puffer. Für den Verdau musste nun Pepsin in einem Verhältnis von 30 zu 1 zugegeben werden. Das Pepsin wurde hierfür in 0,1M Acetat-Puffer mit einer Konzentration von 1mg/ml gelöst. Die benötigte Pepsinmenge betrug also

$$\text{Pepsinmenge} = 2,750 / 30 \text{ mg} = 92 \text{ } \mu\text{g}, \text{ entsprechend } 92 \mu\text{l}.$$

Diese Menge Pepsin wurde zu der Antikörperlösung gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 4h wurde die Reaktion mit dem 1,0M Tris-Puffer gestoppt. Für die Modifikation wurde zuerst DTNB und DTT miteinander gemischt und 3,6ml dieser Lösung davon zu den verdauten Antikörpern gegeben und über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Gemisch mittels einer Centriprep YM-30 aufkonzentriert und über eine Gelchromatographie-Säule mit folgenden Einstellungen aufgereinigt:

Laufgeschwindigkeit:	50 ml/h
Sensitivität:	0,02
Messung bei:	280 nm
Kollektor:	wait 50 Min., dann 2 Min./Fraktion

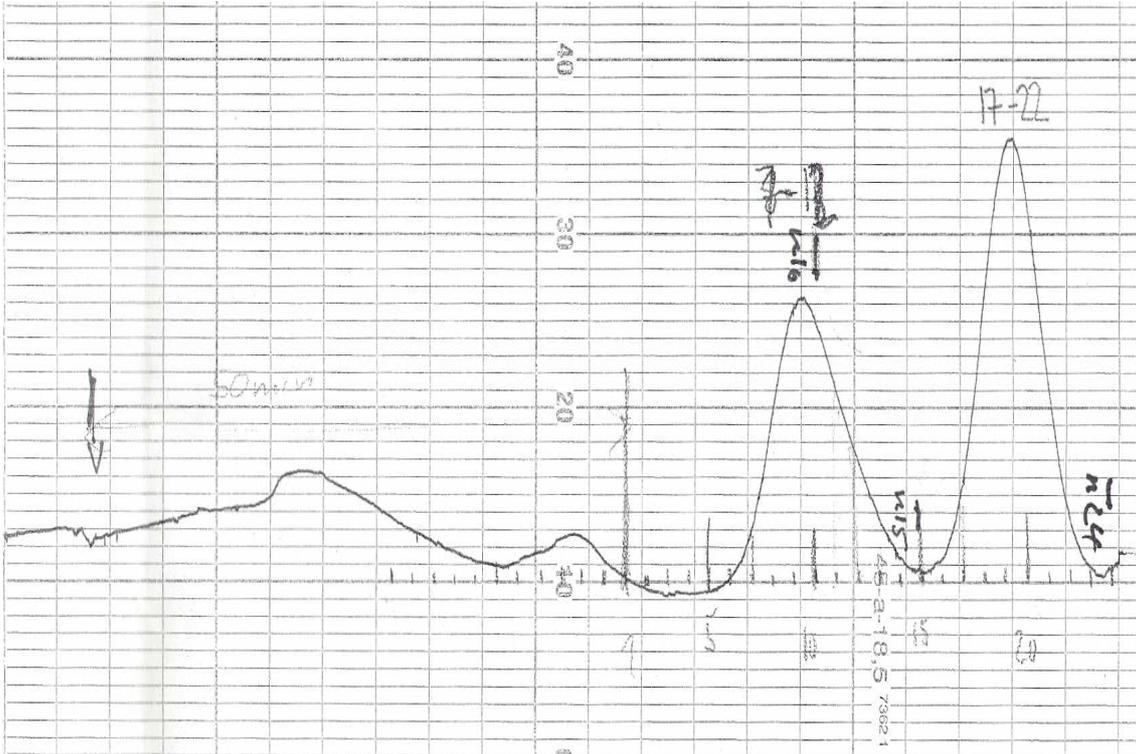


Abb.10: Gelchromatographische Trennung der TNB-TNFR1-Fab'-Fragmente von den Fc-Teilen des anti-TNFR1 Antikörpers:

Das Diagramm zeigt die Absorption bei 280nm gegen die Zeit. Durchlaufende Proteine bedingen einen Ausschlag nach oben in Abhängigkeit der Menge und entlang der Zeitachse gemäss der Größe.

Wie in Abb.10 dargestellt lassen sich zwei Ausschläge erkennen, wovon der erste nach einer Laufzeit von 64 Minuten beginnt und nach 74 Minuten endet (entsprechend den Fraktionen 7-12) und der zweite zwischen 84 und 94 Minuten (entsprechend den Fraktionen 17-22) sichtbar ist. Die Fraktionen 7-12 entsprechen hierbei dem abgespaltenen Fc-Teil und die Fraktionen 17-22 den gewünschten mit TNB modifizierten Fab'-Fragmenten des anti-TNFR1 Antikörpers (TNB-TNFR1-Fab'-Fragment). Entsprechend wurden die Fraktionen 17-22 gepoolt und wieder aufkonzentriert. Die optische Dichte dieser Lösung betrug 0,46. Die Proteinkonzentration betrug demnach

$$c = 0,46 / 1,4 = 0,33\text{mg/ml.}$$

Bei einem Volumen von 1,8ml ergab dies 549µg der TNB-TNFR1-Fab'-Fragmente. Nun musste das bereits aus früheren Versuchen vorliegende TNB-EpCAM-Fab'-Fragment für die Kopplungsreaktion vorbereitet werden. Zu der Fab'-Lösung wurden 0,2mM DTT zugegeben und für 30 Minuten inkubiert.

Nach Trennung der EpCAM-Fab'-Fragmente vom überschüssigem DTT wurde die Antikörperkonzentration bestimmt. Bei einer optischen Dichte von 1,10 betrug sie demnach:

$$c = 0,43/1,4 = 0,307\text{mg/ml}$$

Für die Kopplungsreaktion mussten jeweils die gleichen Mengen an Fab'-Fragmenten vorliegen. Diese wurden wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Volumen}_{\text{EpCAM-Fab}'} \times 0,307\text{mg/ml} &= 594\mu\text{g} \\ \rightarrow \text{Volumen}_{\text{EpCAM-Fab}'} &= 594 / 307\text{ml} = 1,9\text{ml} \end{aligned}$$

Es wurden also 1,9ml der EpCAM-Fab'-Lösung zu den 1,8ml TNB-TNFR1-Fab'-Lösung gegeben und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch wiederum mit den oben beschriebenen Einstellungen über die Säule getrennt, um die resultierenden bispezifischen F(ab')₂-Fragmente, bestehend aus einem EpCAM-Fab'-Fragment und einem TNFR1-Fab'-Fragment (gewünschtes EpCAMxTNFR1-Konstrukt) zu isolieren.

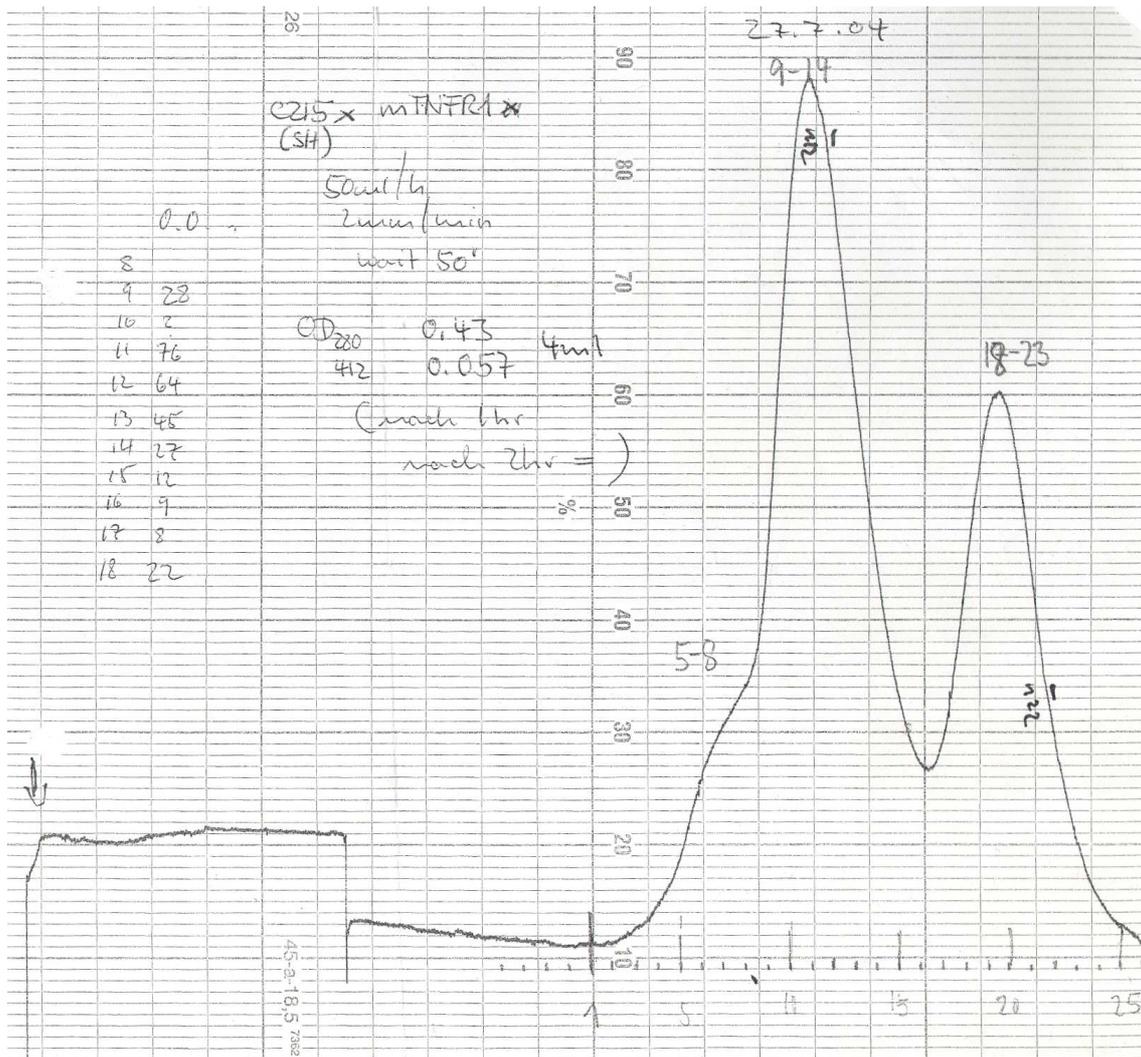


Abb.11: Gelchromatographische Trennung der EpCAMxTNFR1-Konstrukte von den nicht gekoppelten Fab'-Fragmenten:

Das Diagramm zeigt die Absorption bei 280nm gegen die Zeit. Durchlaufende Proteine bedingen einen Ausschlag nach oben in Abhängigkeit der Menge und entlang der Zeitachse gemäss der Größe.

Das Ergebnis ist in der Abb.11 dargestellt. Man kann drei Ausschläge erkennen, den ersten zwischen 59 und 66 Minuten (Fraktionen 5-8), den zweiten zwischen 67 und 78 Minuten (Fraktionen 9-14) und den dritten zwischen 85 und 96 Minuten (Fraktionen 18-23). Sowohl die Fraktionen 9 bis 14, die dem bispezifischen EpCAMxTNFR1-Konstrukt entsprechen, als auch die Fraktionen 18 – 23, die eine Mischung der EpCAM- und TNFR1-Fab'-Fragmente (Fab'-Mix) beinhalten, wurden gepoolt und auf ca. 500µl aufkonzentriert. Die Konzentrationen beider Lösungen wurden bei 280nm

gemessen. Die Messung ergab 0,59 für das EpCAMxTNFR1-Konstrukt und 0,44 für den Fab'-Mix. Die Proteinkonzentrationen betragen demnach

$$[\text{EpCAMxTNFR1-Konstrukt}] = 0,59 / 1,4 = 0,421\text{mg/ml}$$

$$[\text{Fab'-Mix}] = 0,36 / 1,4 = 0,257\text{mg/ml}$$

Für die Versuche standen also 210µg des bispezifischen Konstruktes und 129µg des Fab'-Mix zur Verfügung. Vor der weiteren Verwendung wurden die Lösungen sterilfiltriert und bei 4-8°C gelagert.

3.5 In Vitro Testung des EpCAMxTNFR1 Konstruktes

Nachdem nun erfolgreich bispezifische EpCAMxTNFR1-F(ab')₂-Fragmente hergestellt waren mussten zwei Fragen überprüft werden:

- Vermittelt das bispezifische Konstrukt eine agonistische Aktivität am murinen TNFR1?
- Ist die Aktivität zielgerichtet? Das heißt, ist nur dann eine Aktivität nachweisbar, wenn der zweite Arm des Konstruktes (Zielarm) an EpCAM auch gebunden hat?

3.5.1 Testung des Konstruktes mittels Kaspasenaktivitätsmessung

Zur Testung des Konstruktes wurde die vorbeschriebene Kaspasenaktivitätsmessung mit WEHI-164s Zellen herangezogen. Es wurden jedoch zusätzlich B16 Maus-Melanomzellen, welche mit humanem EpCAM (C215) transfiziert worden waren (B16-C215) oder entsprechende Mock-Transfektanten (B16-F0) in den Kulturansatz zugegeben, um die Abhängigkeit der durch die Konstrukte induzierten TNFR1 Aktivierung von der Gegenwart des Zielantigens EpCAM/C215 überprüfen zu können. Vorab musste allerdings sichergestellt werden, dass es durch TNF nicht zu einer Aktivierung der Kaspasen in den B16-Zellen kommt. Hierzu wurden 12.500 Wehi-164s, 12.500 B16-F0 und 12.500 B16-C215 Zellen pro well angesetzt und über Nacht inkubiert. Dann wurde Medium oder 1ng/ml TNF zu den Zellen gegeben und für

6h inkubiert. Die Messung erbrachte, dass durch TNF im Verlauf der Inkubationszeit eine ausgeprägte Steigerung der Aktivität der Kaspasen in den WEHI-164s Zellen induziert wird, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten und den mit TNF behandelten B16-Zellen festgestellt werden (Abb.12).

Wir konnten also die Kokulturrexperimente wie geplant durchführen, da die Veränderungen in der Aktivität der Kaspasen nur durch die Effekte von TNFR1 Stimuli auf den WEHI-164s Zellen bedingt sind, es zu keiner Zunahme der Aktivität der Kaspasen durch TNF-R1 Stimuli bei den B16-Zellen kommt und somit keine autokrinen/parakrinen Effekte des Konstruktes auf den B16-C215 Zellen zu befürchten waren.

Für die Kokultur wurden 12.500 WEHI-164s Zellen/well in 200µl Medium ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert, dann einmal mit sterilem PBS gewaschen und nachfolgend die B16-F0 oder B16-C215 Zellen und je nach Ansatz TNF als Positivkontrolle, das EpCAMxTNFR1-Konstrukt oder der Fab'-Mix als Negativkontrolle hinzugegeben. Wie in Abb.13 dargestellt führte die Zugabe von rekombinantem murinem TNF zu dem Ansatz bestehend aus WEHI-164s Zellen und B16-F0 Zellen zu einer deutlichen Steigerung der Kaspasenaktivität, und eine gleichartige Steigerung durch TNF konnte wie erwartet auch im Ansatz von WEHI-164s Zellen und B16-C215 Zellen gemessen werden. Der als Negativkontrolle dienende Fab'-Mix erbrachte keine signifikante Steigerung der Kaspasenaktivität, und es zeigten sich auch keine Unterschiede zwischen den beiden verschiedenen Kokulturansätzen. Das EpCAMxTNFR1-Konstrukt führte jedoch nur in Anwesenheit der Zielantigen exprimierenden B16-C215 Zellen zu einer deutlichen Erhöhung der messbaren Kaspasenaktivität in den kokultivierten Wehi-164s Zellen und nicht, wenn die EpCAM-negativen B16-F0 anwesend waren. Damit waren beide vorab formulierten Fragen bereits positiv beantwortet: Das generierte bispezifische EpCAMxTNFR1-Konstrukt vermittelt streng Zielantigen-abhängig eine Aktivierung des murinen TNFR1.

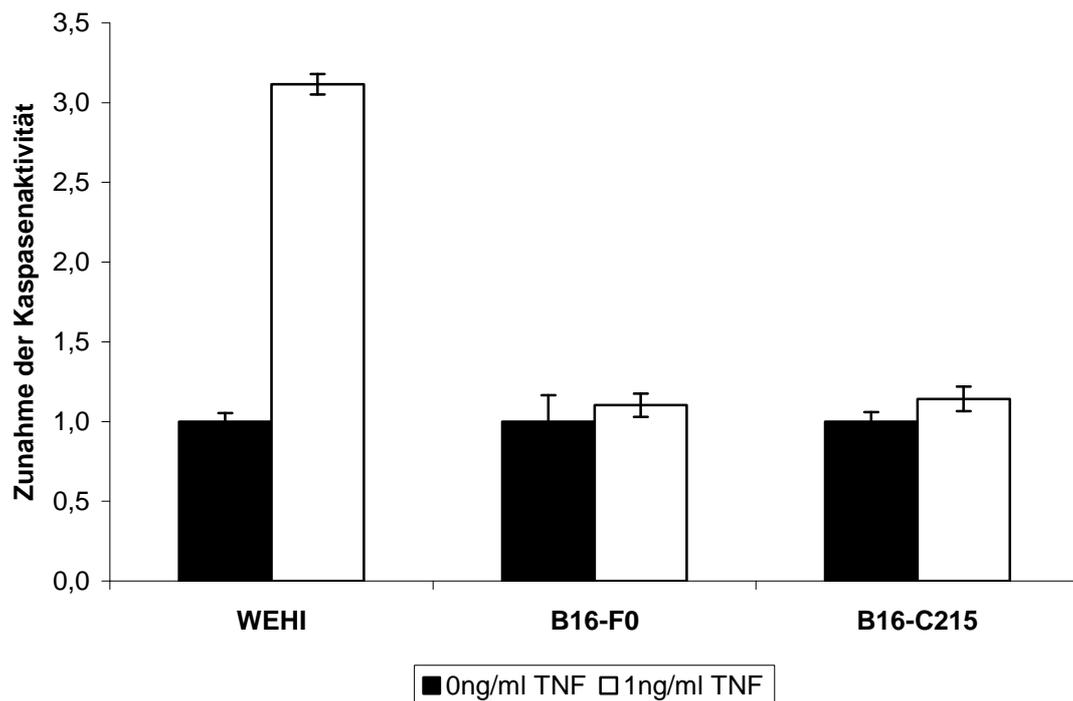


Abb.12: Untersuchung der durch Tumor Nekrose Faktor (TNF) induzierten Aktivität von Kaspasen:

Zu 12.500 WEHI-164s, B16-F0 oder B16-C215/well wurden 1ng/ml TNF oder Medium allein gegeben. Die Ansätze wurden nach 6h Inkubation im Kaspasenassay gemessen. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten von Triplets mit Standardabweichung.

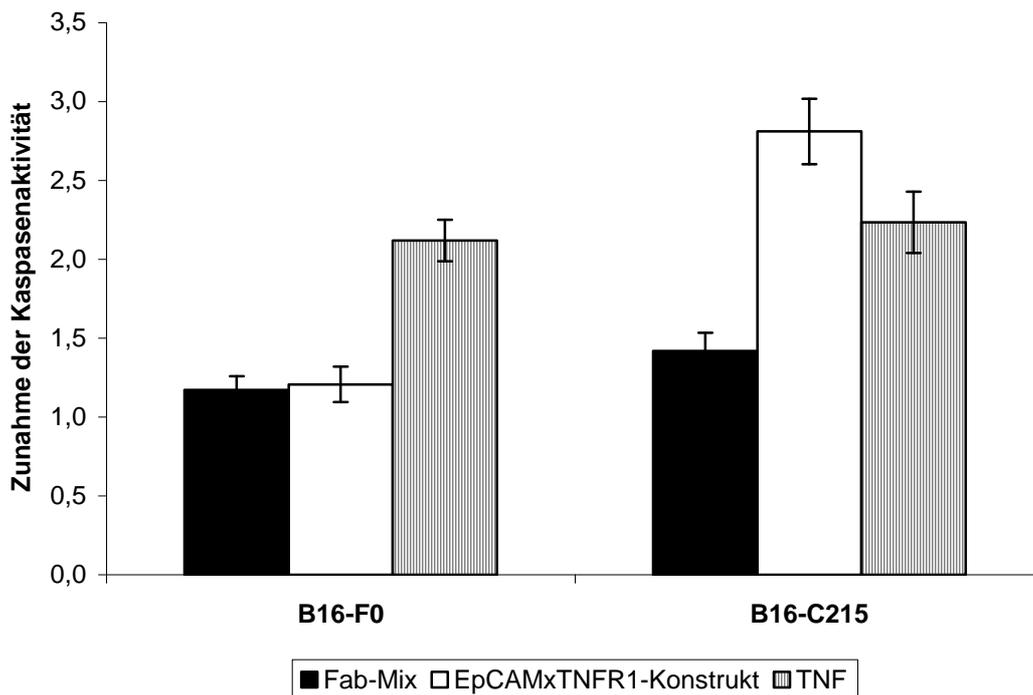


Abb.13: Testung des Konstruktes mittels Kaspasenaktivitätsmessung:

Zu 12.500 WEHI-164s/well wurden 12.500 B16-F0 bzw. B16-C215 Zellen als Kokulturansatz zugegeben. Anschließend wurden den beiden unterschiedlichen Kokulturen 200ng/ml Fab'-Mix, 200ng/ml EpCAMxTNFR1-Konstrukt oder 1ng/ml rekombinanter muriner Tumor Nekrose-Faktor (TNF) als Positivkontrolle allein zugegeben. Die Ansätze wurden nach 6h Inkubation im Kaspasenassay gemessen. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten von Triplets mit Standardabweichung.

3.5.2 Testung des Konstruktes im Chromfreisetzungstest

Als zweites Verfahren zur Überprüfung der zielantigenrestringierten Aktivität der hergestellten Konstrukte wurde die Fähigkeit der bispezifischen F(ab')₂-Fragmente, Apoptose zu induzieren getestet. Da in diesem Ansatz erneut eine Kokultur zweier verschiedener Zelllinien, nämlich der WEHI-164s und der das Tumorantigen exprimierenden B16-C215 Zellen bzw. deren Kontrolle, den B16-F0 benötigt wird, konnte nicht wie bisher der WST-1 Test benutzt werden, da der WST-1 Test alle lebenden Zellen nachweist und dadurch keine Unterscheidung zwischen den WEHI-164s und den B16 Zellen erfolgt. Deshalb wurde ein Chromfreisetzungstest mit Chrom-gelabelten WEHI-164s Zellen

durchgeführt. Hierzu wurden zu WEHI-164s entweder B16-F0 oder B16-C215 Zellen als Kokulturansatz zugegeben. Anschließend wurde zu den verschiedenen Ansätzen entweder TNF als Positivkontrolle, der Fab'-Mix als Negativkontrolle oder das zu testende EpCAMxTNFR1-Konstrukt zugegeben. Zudem erfolgte ein Ansatz einer Kokultur von WEHI-164s Zellen und B16-F0 bzw. B16-C215 Zellen ohne weitere Zusätze, um einen etwaigen Effekt der B16 Zellen auf die WEHI-164s Zellen auszuschließen.

Der Spontanrelease in den Versuchen betrug unter 30% und validiert damit die Versuchsbedingungen. Die alleinige Zugabe der B16-F0 oder B16-C215 Zellen erbrachte nur eine unrelevante Veränderung der Lyserate der WEHI-164s Zellen von <10%. Die Zugabe von TNF als Positivkontrolle erbrachte Lysewerte von über 50%. Die Zugabe des EpCAMxTNFR1-Konstruktes bzw. des Fab'-Mix brachte bei der Kokultur mit den B16-F0 Zellen, die das Antigen EpCAM/C215 nicht tragen, ebenfalls lediglich eine unrelevante Zellyse von ca. 10%, wohingegen das Konstrukt in der Kokultur mit den B16-C215 Zellen zu einer Zellyse von knapp 50% führte (Abb.14). Damit erbrachte es eine der TNF Konzentration von 10ng/ml vergleichbare Wirkung, die allerdings nur bei Vorhandensein des Zielantigens C215 auftritt. Somit ist auch in diesem Ansatz die agonistische Aktivität des bispezifischen F(ab')₂-Fragment am TNFR1 belegt, welche nur zielgerichtet, das heißt, nur wenn der zweite Arm des Konstruktes (Zielarm) das Tumorantigen gebunden hat, erfolgt. In diesem Versuch zeigte jedoch auch der Fab'-Mix im Kokulturansatz von WEHI-164s Zellen und B16-C215 Zellen eine gewisse Aktivierung des TNFR1, welche jedoch bei weitem unter der des EpCAMxTNFR1-Konstruktes blieb.

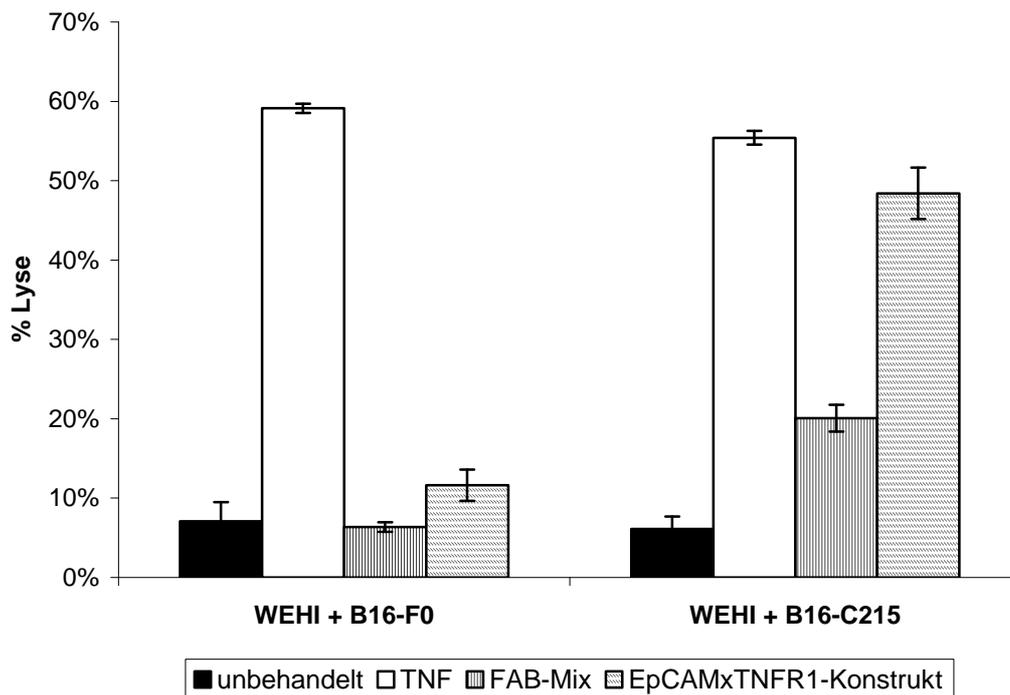


Abb.14: Testung des Konstruktes im Chromfreisetzungstest:

Zu 20.000 Chrom gelabelten WEHI-164s Zellen/well wurden nach vier Stunden 20.000 B16-F0 oder B16-C215 Zellen zugegeben und mit 10ng/ml Tumor Nekrose Faktor (TNF), 200ng/ml Fab'-Mix oder 200ng/ml EpCAMxTNFR1-Konstrukt behandelt. Nach 18h wurde der Überstand im Beta-Counter gemessen. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten von Triplets mit Standardabweichung.

3.5.3 Titration des bispezifischen EpCAMxTNFR1-Konstruktes

Um eine bessere Einschätzung der Wirkung des Konstruktes zu erhalten wurde in einem weiteren Versuch dessen Konzentration titriert. Hierzu wurden zu Chrom-markierten WEHI164s Zellen B16-F0 bzw. B16-C215 Zellen oder nur Medium zugegeben und zu diesen Ansätzen unterschiedliche Konzentrationen des Konstruktes gefügt. Der prozentuale Anteil der toten Zellen wurde mittels der vorab angegebenen Formel berechnet. Der Spontanrelease betrug bei diesen Versuchen wiederum unter 30%. Es zeigte sich, dass das Konstrukt eine knapp 20% Lyse der WEHI-164s Zellen schon bei einer Konzentration von 1ng/ml auslöst, falls die B16-C215 Zellen, die das Zielantigen trugen, anwesend waren. Ab einer Konzentration von 10ng/ml war die Lyse mit ca. 45% maximal,

d.h. auch eine weitere Erhöhung der Konzentration führte nicht zu einer signifikanten Steigerung der Target-Zell-Lyse. Bei der Titration des Konstruktes in Anwesenheit der B16-F0 Zellen, die das Target-Antigen nicht trugen, kam es erst bei 1000ng/ml zu einer gering gesteigerten Zellyse von ca. 15%. Bei dem Ansatz in Abwesenheit von B16 Zellen hatte das Konstrukt in keiner Konzentration eine signifikante Zellyse zur Folge (Abb.15).

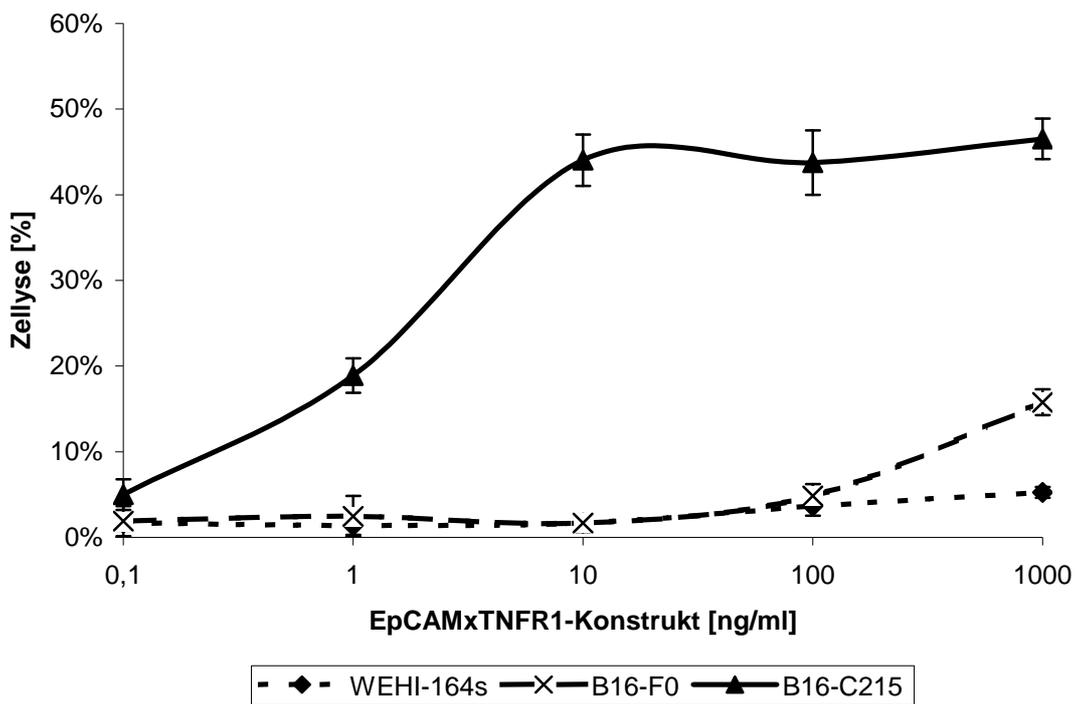


Abb.15: Titration des bispezifischen EpCAMxTNFR1-Konstruktes:

Zu 20.000 Chrom gelabelten WEHI-164s Zellen/well wurden nach vier Stunden 20.000 B16-F0 bzw. B16-C215 Zellen oder nur Medium zugegeben und diese Ansätze mit steigenden Konzentrationen des EpCAMxTNFR1-Konstruktes behandelt. Nach 18h wurde der Überstand abgenommen und im Beta-Counter gemessen. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten von Triplets mit Standardabweichung.

3.6 *In vivo* Testung des EpCAMxTNFR1-Konstruktes

Um nun die EpCAMxTNFR1-Konstrukte in einem Tiermodell untersuchen zu können wurden aus größeren Mengen Antikörpern erneut wie vorab beschrieben EpCAMxTNFR1-Konstrukte generiert und getestet. Diese zeigten vergleichbare Eigenschaften wie die zu Anfangs hergestellte Charge (Daten nicht gezeigt).

Für die *in vivo* Testung der Konstrukte wurden daraufhin jeweils 2.500 B16-C215 Zellen in C57BL/6 Mäuse intra-peritoneal injiziert und die Tiere anschließend an den Tagen 1, 2, 3, 7, 9 und 10 nach Versuchsbeginn mit jeweils 20µg des EpCAMxTNFR1-Konstruktes bzw. des Fab'-Mix oder mit PBS behandelt, wobei jede Gruppe aus sechs Tieren bestand. In diesem Modell konnte eine deutliche Antitumorwirkung des Konstruktes nachgewiesen werden. Nach 100 Tagen (Endpunkt des Experiments) lebten noch alle sechs Tiere, die mit dem Konstrukt behandelt wurden, wohingegen nach 65 Tagen schon fünf der sechs Tiere gestorben waren, die mit PBS behandelt wurden. Allerdings zeigte überraschenderweise auch der Fab'-Mix Antitumor-Wirkung, da nach 100 Tagen noch fünf von sechs Tieren der mit dem Fab'-Mix behandelten Gruppe lebten (Abb.16). Dieses Ergebnis war zunächst unerwartet, jedoch hatte sich bei der Testung der Konstrukte bzw. des Fab'-Mix im Chromfreisetzungstest (Abb.14) bereits ein Zielantigen-restringierter apoptoseinduzierender Effekt des Fab'-Mix gezeigt. Deshalb führten wir einen weiteren Kaspasenassay in Analogie zu dem in Abb.13 beschriebenen Versuch durch. In diesem Experiment zeigte sich, dass der Fab'-Mix nun plötzlich tatsächlich eine dem EpCAMxTNFR1-Konstrukt entsprechende Wirkung besaß. Der Fab'-Mix aktivierte die Kaspasen der WEHI-164s Zellen in gleichem Umfang wie das eigentliche Konstrukt, wenn das Tumorantigen EpCAM/C215 zugegen war, jedoch nicht, wenn B16-F0 Zellen verwendet wurden (Abb.17).

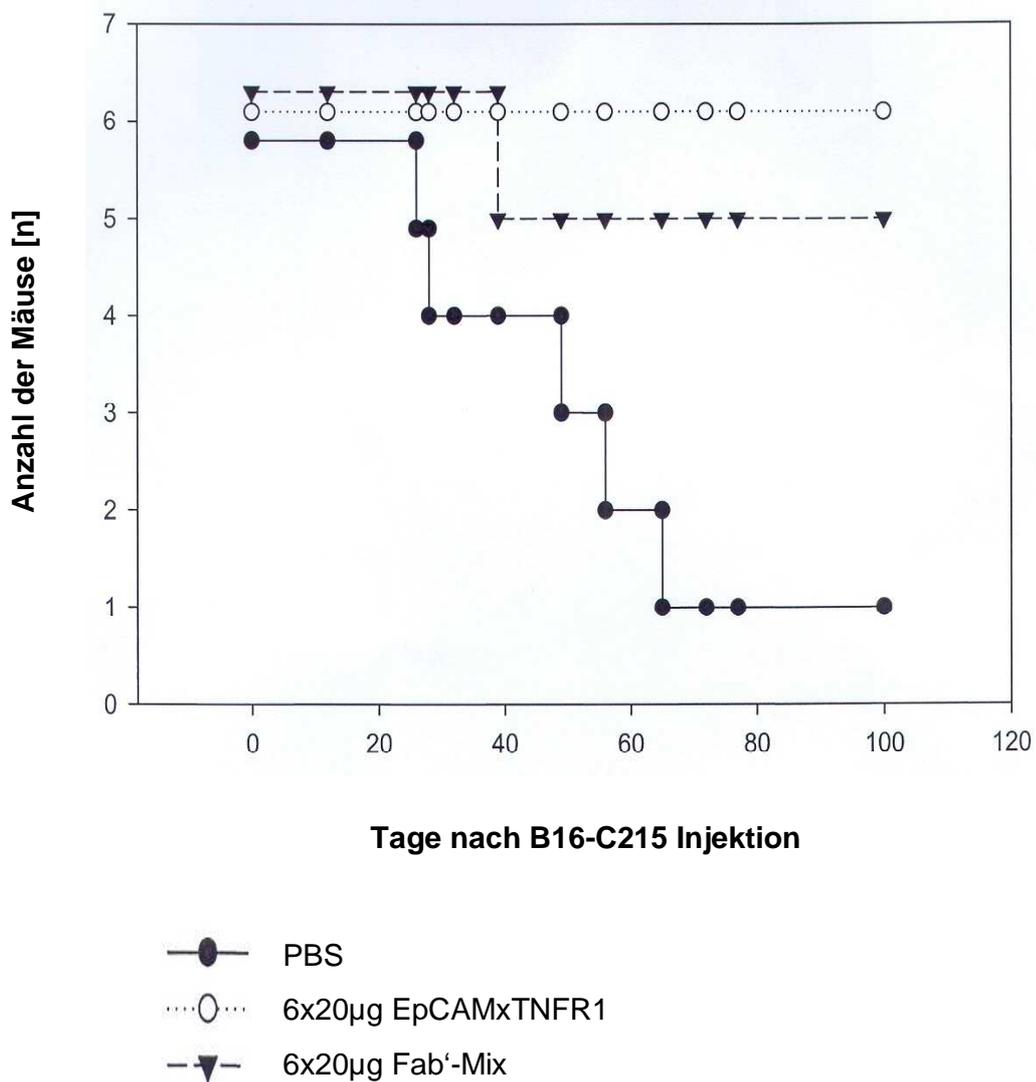


Abb.16: *In vivo* Testung des EpCAMxTNFR1-Konstruktes:

In C57BL/6 Mäuse wurden 2.500 B16-C215 Zellen intra-peritoneal injiziert und die Tiere anschließend mit 6 Gaben des EpCAMxTNFR1-Konstruktes, des Fab'-Mix oder mit PBS behandelt. Pro Gruppe wurden sechs Tiere behandelt. Gezeigt ist die Kaplan-Meier Kurve für die Überlebenszeit der Mäuse. Es wird die Anzahl der Mäuse gezeigt, die eine Zeit (in Tagen) nach Injektion der Tumorzellen überlebten.

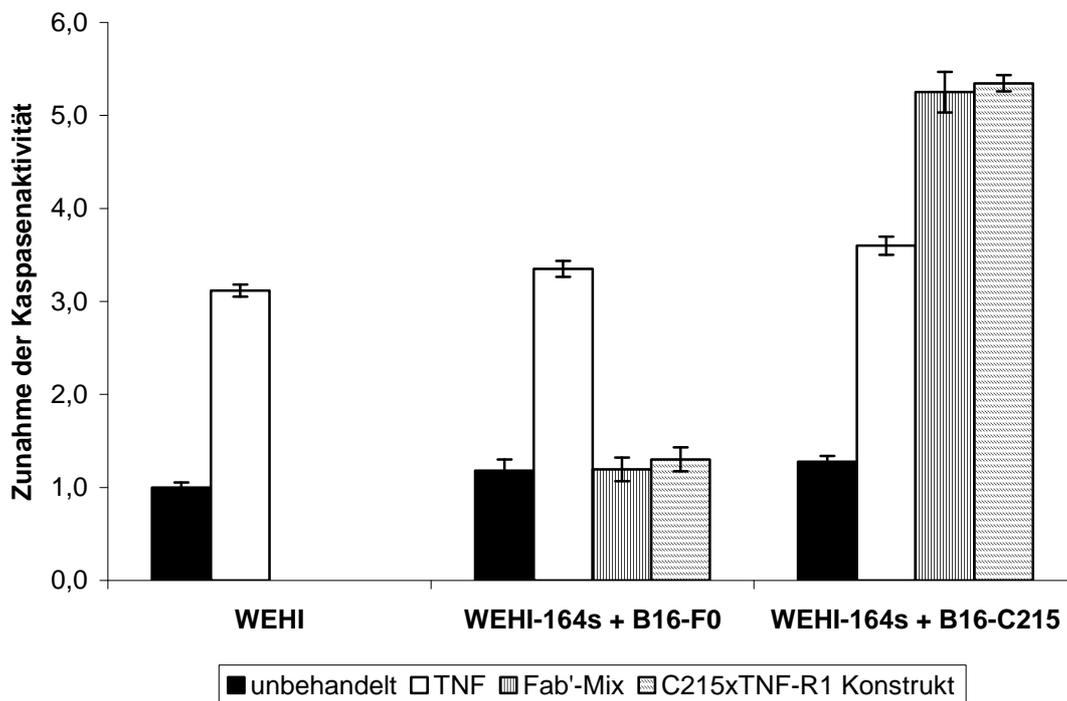


Abb.17: Nachtestung des Konstruktes mittels Kaspasenaktivitätsmessung:

Zu 12.500 WEHI-164s/well wurden Medium bzw. 12.500 B16-F0 oder B16-C215 Zellen zugegeben. Anschließend wurden den drei verschiedenen Ansätzen 200ng/ml Fab'-Mix oder 200ng/ml EpCAMxTNFR1-Konstrukt bzw. 1ng/ml rekombinanter muriner Tumor Nekrose-Faktor (TNF) als Positivkontrolle oder Medium allein zugegeben. Die Ansätze wurden nach 6h Inkubation im Kaspasenassay gemessen. Die Ergebnisse entsprechen Mittelwerten von Triplets mit Standardabweichung.

Als Erklärung für die TNFR1 Aktivierung durch den Fab'-Mix in Abhängigkeit von der C215-Expression auf Tumorzellen postulierten wir eine mögliche Nachhybridisierung der beiden verschiedenen Fab'-Fragmente, welche zu einer Kontamination des als Negativkontrolle dienenden Fab'-Mix durch funktionelle EpCAMxTNFR1-Konstrukte geführt haben könnte. Deshalb wurde der Fab'-Mix am Interfakultären Institut für Zellbiologie in der Abteilung Immunologie mittels einer SMART-Säule untersucht (Daten nicht gezeigt). Diese erbrachte, dass der Fab'-Mix zu einem großen Teil ebenfalls aus bispezifischen $F(ab')_2$ bestand. Es musste also später zu einer chemischen Koppelung gekommen sein, so dass wirkungsvolles Konstrukt in der Fab'-Mix Kontrolle vorhanden war, was sowohl die Ergebnisse des Tiermodells als auch des in Abb.17 dargestellten

Kaspasenassay erklärt, in welchem auch der Fab'-Mix Zielantigen-abhängige TNFR1 Aktivierung vermittelte.

4 Diskussion

4.1 Übersicht über die antineoplastischen Effekte von TNF

Tumor Nekrose Faktor (TNF) war bereits vor ca. 30 Jahren als Protein, welches Apoptose von Tumorzellen verursacht, beschrieben worden und liegt entweder als 26kDa Typ II Transmembranprotein oder nach proteolytischer Freisetzung löslich in Form eines Trimers mit 51kDa vor [24]. Im Jahr 1984 wurde die cDNA von TNF kloniert [18,19], und einige Jahre später wurden die beiden zugehörigen Membranrezeptoren TNF Rezeptor 1/CD120a (TNFR1) und TNF Rezeptor 2/CD120b (TNFR2) identifiziert [25,26]. Beide sind Typ I Transmembranproteine und enthalten vier cysteinreiche „repeats“ in ihrer extrazellulären Domäne [24]. TNFR1 ist konstitutiv auf den meisten Geweben und Zellen exprimiert, während die Expression von TNFR2 streng reguliert ist und typischerweise auf Zellen des Immunsystems zu finden ist [20]. TNFR1 enthält eine intrazytoplasmatische Sequenz, die „Todesdomäne“, welche die Verbindung mit der Apoptosekaskade vermittelt [24]. Im Vergleich zu „klassischen“ Todesrezeptoren wie CD95 oder TRAIL Rezeptoren transduziert TNFR1 aber auch viele Signale, welche eine spezifische Genexpression (z.B. die von NF- κ B) vermitteln. Dies führt dazu, dass TNF eine Vielzahl von sehr verschiedenen und z.T. gegensätzlichen Effekten wie Proliferation, Differenzierung und zellulärer Aktivierung vermitteln kann. Deshalb wird TNF mittlerweile als inflammatorisches Zytokin mit einer zusätzlichen Fähigkeit zur Induktion von Apoptose angesehen. Obwohl die erstbeschriebene und damit namengebende Funktion von TNF die Induktion von Tumorzelltod war [17] ist mittlerweile klar, dass dieser Effekt *in vivo* stärker durch dessen inflammatorische Wirkung in Abhängigkeit von einer funktionierenden Immunantwort als durch die Fähigkeit, Apoptose zu induzieren bedingt ist.

Die anti-neoplastischen Effekte von TNF können somit nicht auf eine einzige Wirkung zurückgeführt werden, sondern sind durch mehrere unterschiedliche Eigenschaften des Zytokins bedingt. Als eine der ersten Eigenschaften von TNF wurden die antiproliferativen und zytotoxischen Wirkungen auf tierische und humane Zelllinien nachgewiesen. Die Apoptoseinduktion wird dabei über den

TNFR1 vermittelt, der nach Bindung von TNF Kaspasen aktiviert, die dann wiederum die Apoptose vermitteln. Der Rezeptor wird zwar von nahezu allen Zelltypen exprimiert, doch im Allgemeinen ist normales Gewebe resistent gegenüber TNF induzierter Apoptose [30]. Auch bei vielen Tumorzellen kann TNF keine Apoptose auslösen. Bei diesen Zellen besteht allerdings die Möglichkeit, sie für die Wirkung von TNF zu sensibilisieren. Die proapoptotischen Enzyme liegen bereits in den Zellen vor, wohingegen die antiapoptotischen Proteine jeweils neu synthetisiert werden müssen. Deshalb kann durch eine Inhibition der Proteinsynthese, z.B. durch Cycloheximid, die TNF-vermittelte Apoptoserate in normalen und malignen Zellen erhöht werden [51]. Neben der direkten Zytotoxizität besitzt TNF aktivierende Wirkung auf Endothelzellen, die z.B. im Rahmen einer Entzündung zu den ersten Zielzellen gehören. Der Haupteffekt des Zytokins liegt hierbei in der Aktivierung des Endothels, was durch die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und die Erhöhung der interzellulären Permeabilität gekennzeichnet ist. Diese Veränderungen verbessern die Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand und dadurch und durch die erhöhte Gefäßpermeabilität die Einwanderung von Effektorzellen in das entzündliche Gebiet. Bei übermäßiger Ausschüttung von TNF kann seine Wirkung allerdings über eine zu starke Erhöhung der Permeabilität und eine übermäßige Einwanderung von Leukozyten und der damit verbundenen Gewebszerstörung zu schwerwiegenden Krankheitsbildern wie septischen Schockformen und Autoimmunreaktionen führen. Als ein entscheidender Aspekt für die Antitumor-Aktivität von TNF wird heute auch seine Wirkung auf die Endothelzellen von Tumorgefäßen angesehen [52]. In einem syngenem Mausmodell, bei dem Fibrosarkome durch Methylcholanthrene induziert wurden, waren die Tumorzellen *in vitro* zwar unempfindlich gegenüber TNF, doch führte die systemische Applikation von TNF *in vivo* zu hämorrhagischen Nekrosen von Tumoren [53-55]. Zusätzlich löste eine intratumorale Injektion von TNF auch bei humanem Tumorgewebe, das in Nacktmäuse verpflanzt worden war, Nekrosen durch Gefäßschäden aus [56,57]. TNF besitzt demnach die Fähigkeit, in hohen Dosierungen neu gebildete Blutgefäße, insbesondere Tumovaskularisation zu zerstören, obwohl niedrige Dosen angiogene wirken können [30]. Allerdings sind die exakten zellulären und molekularen

Umstände, die zu der TNF vermittelten Ischämie des Tumorgewebes führen, noch unbekannt. Eine dritte anti-neoplastische Wirkung von TNF ist die Stimulation des Immunsystems. In Untersuchungen mit immundefizienten und immunkompetenten Mäusen zeigte sich, dass die Tumore der immundefizienten Gruppe schlechter auf eine Therapie mit TNF ansprachen als die der anderen Gruppe. Dies belegt, dass die Wirksamkeit von TNF auch durch das Immunsystem vermittelt wird [58]. Es ist bekannt, dass TNF das angeborene Immunsystem stimuliert und so zur Produktion von weiteren Entzündungsmediatoren wie IL-1, IL-6 oder IL-8, aber auch von zytotoxischen Substanzen wie NO oder ROS führt [59]. Auch auf NK-Zellen hat TNF eine aktivierende Wirkung und führt zu gesteigerter Zytotoxizität und IFN- γ Produktion [59,60]. Neben der angeborenen Immunität spielt TNF auch bei der erworbenen Abwehr eine Rolle. In TNF knockout Tieren beispielsweise ist die Fähigkeit von T-Zellen, Tumore abzustößeln, stark eingeschränkt [61-63], und die Reifung von CD34+ Zellen zu Dendritischen Zellen, die eine herausragende Rolle bei der Antigenpräsentation einnehmen, wird ebenfalls von TNF gefördert [64]. Trotz der beschriebenen Effekte ist TNF bei einigen Tiermodellen nur geringfügig wirksam, und auch im Menschen sind die Ergebnisse einer alleinigen Applikation selbst hoher Dosen von TNF nicht überzeugend [65-69]. Eine Kombination der lokoregionalen Gabe von TNF mit konventionellen Chemotherapeutika, wie z.B. Doxorubicin, Paclitaxel oder Cisplatin führte dagegen zu signifikant verbessertem Tumoransprechen [65-70]. Die Fähigkeiten von TNF mögen beim Menschen also nicht ausreichen, um alleine zu einer ausgeprägten Tumorregression zu führen, können aber den zytotoxischen Effekt von Chemotherapeutika deutlich ergänzen [71]. TNF verbessert das pharmakokinetische Profil der kombinierten Wirkstoffe über die Erhöhung der Gefäßpermeabilität und über die Verringerung des interstitiellen Drucks, so dass die Wirkstoffkonzentrationen im Tumorgebiet erhöht sind [68,72,73]. Daneben können proapoptotische Effekte einzelner Therapeutika die Sensitivität der malignen Zellen für TNF erhöhen [74,75]. Die ausgeführten Eigenschaften von TNF legen nahe, das Zytokin in der Therapie von malignen Erkrankungen einzusetzen. Auf Grund der schwerwiegenden Nebenwirkungen von TNF ist eine systemische Gabe in der Tumor-Therapie bisher allerdings

nicht in anti-neoplastisch wirksamen Konzentrationen möglich.

4.2 Möglichkeiten einer therapeutischen Verabreichung von TNF

Neben der Stimulation von TNF-Rezeptoren durch ihren physiologischen Liganden TNF ist es auch möglich, mittels monoklonaler Antikörper eine Aktivierung der TNF-Rezeptoren zu erreichen. Doch auch die Hoffnungen auf eine therapeutische Nutzung von Antikörpern gegen Todesrezeptoren wurden durch die unspezifischen Effekte dieser Agenzien zunichte gemacht. Aus diesen Gründen wurde nach Möglichkeiten gesucht, TNF lokal begrenzt zu applizieren. Die isolierte Perfusion einer Extremität bei nicht resezierbarem Weichteilsarkom mit einer hohen Dosis von TNF kombiniert mit einer Chemotherapie führte Ende der neunziger Jahre zu unübertroffenen Ergebnissen und zu einem allgemein anerkannten klinisch eingesetzten Protokoll. In der Zwischenzeit wird dieser Therapieansatz auch für andere lokal perfundierbare Tumore eingesetzt [52,76,77]. Um TNF auch bei anderen malignen Erkrankungen einsetzen zu können müssen seine Wirkungen auf das zu behandelnde Zielgebiet beschränkt werden, damit es nicht zu den verheerenden systemischen Effekten kommen kann. Das Ziel ist also maximaler anti-neoplastischer Effekt bei Aussparung des normalen Gewebes [78]. Um dies zu erreichen wurden TNF-Fusionsproteine hergestellt, bei denen TNF an komplette Antikörper [79,80], F(ab)₂-Fragmente [81-84] oder scFv (single-chain-fragment variable) [85,86] gekoppelt ist, welche tumorassoziierte Antigene wie EGFR [79], Her2/Neu [85] oder CEA[86] auf malignen Zellen erkennen. Auch Oberflächenmarker der Stromazellen von Tumoren wie FAP [82] wurden für den zielbestimmenden Anteil benutzt. Pharmakokinetische Untersuchungen dieser Konstrukte zeigten eine große Variation bezüglich der Anreicherung im Tumorgewebe und damit bezüglich der Selektivität [83,84,86]. Die beobachteten Unterschiede lassen sich durch unterschiedliche Faktoren wie die Zugänglichkeit des Tumors, die Expression des Zielantigens auf den

Zellen und die pharmakologische Beschaffenheit der Fusionsproteine erklären [87]. Doch führte die Anreicherung im Tumorgewebe bei allen Ansätzen zu einem verstärkten Ansprechen verglichen mit nicht zielgerichteter Applikation von TNF. Die erwähnten Studien in Tiermodellen machen deutlich, dass eine Aktivität von TNF am Tumor weit unter der maximal tolerierten löslichen TNF-Dosis erreicht werden kann [82,84]. Es bleibt allerdings zu bedenken, dass mögliche Nebenwirkungen in einem Mausmodell nicht richtig untersucht werden können, da u.a. Mäuse TNF generell besser tolerieren als Menschen. Des Weiteren kann TNF in diesen Konstrukten seine Wirkungen immer noch unabhängig von der Bindung des Antikörperanteils entfalten, und so kommt es auch außerhalb des Tumors zu TNF vermittelten Effekten. Die verstärkte Wirkung von TNF gegen den Tumor ist bei diesen Konstrukten nur auf die Anreicherung im Tumorgewebe, die durch den Antikörperanteil vermittelt ist, zurückzuführen und nicht auf eine strikt Zielantigen-restringierte Wirkung.

4.3 Das bispezifische Prinzip bei der TNFR1-Aktivierung am Tumor

Aus diesen Gründen haben wir uns entschieden, kein Fusionsprotein mit dem rekombinanten TNF-Molekül herzustellen, sondern einen bispezifischen Antikörper mit einem agonistischen anti-TNFR1 Antikörper und einem zielvermittelnden Antikörper. Generell versteht man unter einem bispezifischen Antikörper Konstrukte, die sich im Gegensatz zu konventionellen Antikörpern durch zwei unterschiedliche Antigenbindungsstellen auszeichnen. Hierbei ist eine Bindungsstelle gegen ein tumorassoziiertes Antigen gerichtet (Zielantikörper) und die zweite Spezifität hat die Aufgabe, einen immunregulatorischen/apoptoseinduzierenden Rezeptor zu aktivieren und damit einen Effektormechanismus in Gang zu setzen, der zu einer Lyse von Tumorzellen führt (Effektorantikörper). Um das Ziel einer selektiven Aktivierung des TNFR1 am Tumor zu erreichen, muss der zu generierende bispezifische Antikörper zwei Voraussetzungen erfüllen. Zum einen muss die Stimulation des

Effektormoleküls, in unserem Fall TNFR1, effektiv erfolgen können und zum anderen muss der Antikörper ohne Bindung an die Zielzelle wirkungslos sein, d.h. die Effektivität muss zielzellvermittelt sein. Eine letztendliche Klärung dieser verlangten Eigenschaften kann schließlich nur in einem syngenen Mausmodell erfolgen.

4.4 Auswahl geeigneter Antikörper gegen murinen TNFR1

Die erste Aufgabe bestand darin, gegen den murinen TNFR1 gerichtete Antikörper (anti-TNFR1-Antikörper) zu finden, die agonistische Wirkung erzielen können. Selbst nach intensiver Recherche fanden sich nur zwei verschiedene Klone unter der Vielzahl käuflicher Antikörper gegen murinen TNFR1, der Klon HM104 und der Klon 47803. Die beiden Klone wurden hinsichtlich ihrer agonistischen Aktivität am TNFR1 getestet. Hierzu untersuchten wir die Fähigkeit der Antikörper, bei den murinen Zelllinien A20, EL-4 und WEHI-164s Apoptose zu induzieren und benutzten dafür zunächst den WST-1 Test. Bei den Wehi-164s Zellen, die bekanntermaßen sehr sensitiv auf TNF reagieren, war durch den Klon 47803 ein deutlicher Rückgang der Umsetzung des Farbstoffes messbar, wohingegen die zugehörige Isotypkontrolle, aber auch der Klon HM104 keine Wirkung zeigten. Bei den EL-4 Zellen konnte der gleiche Effekt erst nach Zugabe des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid gezeigt werden. Dieser hemmt die Synthese von antiapoptotischen Proteinen, welche, wie oben beschrieben, im Gegensatz zu den Proteinen der Apoptosekaskade neu generiert werden müssen und kann damit die TNF-Sensitivität verstärken. Bei den A20 Zellen war weder durch die Antikörper noch durch rekombinantes TNF selbst in Gegenwart von Cycloheximid eine signifikante Reduktion des Zellstoffwechsels nachweisbar. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden zusätzlich Untersuchungen der Kaspasenaktivität bei WEHI-164s Zellen nach Antikörperstimulation durchgeführt. Auch hier zeigte sich, dass der Klon 47803 über den TNFR1 Kaspasen aktiviert, wohingegen der Klon HM104 und die Isotypkontrollen dies nicht taten. Wir hatten also in dem Klon 47803 einen

agonistischen Antikörper gefunden, der die Anforderung nach effektiver Stimulation am murinen TNFR1 erfüllt.

4.5 Herstellung bispezifischer EpCAMxTNFR1-Konstrukte

Als Zielantigen wurde EpCAM (C215) ausgewählt, da es sich hierbei zum einen um einen klassischen Karzinommarker handelt [88] und zum anderen schon gezeigt wurde, dass mit dem zur Verfügung stehenden, gegen EpCAM gerichteten Antikörper (anti-EpCAM-Antikörper) effizient bispezifische F(ab')₂-Fragmente generiert werden können [89]. Zur Herstellung bispezifischer Antikörper stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Die beiden bisher am häufigsten angewendeten Methoden sind die chemischen Kopplung und die Zellfusionstechnologie. Daneben wurden in den letzten Jahren verschiedene gentechnologische Verfahren entwickelt, um die Ausbeute, Reinheit und Reproduzierbarkeit der Antikörperproduktion zu erhöhen [90,91]. Die Zellfusionstechnologie ist eine Weiterentwicklung der Hybridoma-Technologie [92] zur Quadrom-Technologie [93,94], bei der die Antikörper-produzierenden Hybridome fusioniert werden. Dabei werden die beiden schweren und leichten Ketten kodominant exprimiert, wodurch zufallsgemäß bis zu 10 verschiedene Antikörper-Moleküle entstehen, von denen nur eines das gewünschte bispezifische Molekül ist [93]. Ein Vorteil dieser Technologie ist die Sekretion physiologischer Antikörper-Moleküle, die in ihrer Größe den monoklonalen Antikörpern entsprechen. Durch die zufällig Paarung bei gleichzeitig unterschiedlichen Syntheseraten der parentalen Ketten liegen oftmals aber nur geringe Ausbeuten (zwischen 12 und 50%) des gewünschten Moleküls vor [95], dessen schwierige Reinigung zu weiteren Verlusten führen kann [96]. Darüber hinaus können Schwierigkeiten bei der Fusion und der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität der Quadrome aufgrund ihres polyploiden 8-fachen Chromosomensatzes auftreten [97]. Die Herstellung bispezifischer Antikörper durch chemische Kopplung wurde von Brennan [46] und Nitta [98] eingeführt und im weiteren von Glennie [99] und Jung [47] modifiziert. Durch selektive

Reduktion der Hinge-Region von proteolytisch erstellten $F(ab')_2$ -Fragmenten und Rehybridisierung der Fab'-Fragmente monoklonaler Antikörper wurde es möglich, bispezifische $F(ab')_2$ -Fragmente herzustellen. Vorteile dieses Verfahrens liegen neben der schnellen und einfachen Synthese in der Vermeidung einer unspezifischen Bindung an Fc-Rezeptor-positive Zellen. Letztere könnte *in vivo* zu einer unselektiven Immobilisierung der Antikörper und damit zu einer unspezifischen TNFR1-Aktivierung führen. Durch die geringere Größe der $F(ab')_2$ -Moleküle wird außerdem eine bessere Tumorpenetration ermöglicht [98]. Ebenso wird die Wahrscheinlichkeit der Anti-Antikörper-Antwort (HAMA) herabgesetzt, welche die verabreichten Konstrukte neutralisiert und zu einer Bildung von Immunglobulin-Komplexen führen kann, welche schädigende Einflüsse auf Leber, Milz und Niere haben können. Aus diesen Gründen haben wir uns für die Herstellung von $bsF(ab')_2$ aus zwei monoklonalen Antikörpern, dem anti-EpCAM-Antikörper und dem agonistischen anti-TNFR1-Antikörper, mittels chemischer Hybridisierung entschieden, welche erfolgreich durchgeführt werden konnte.

4.6 Testung des EpCAMxTNFR1-Konstruktes

Nach der Herstellung des bispezifischen EpCAMxTNFR1- $F(ab')_2$ musste als nächstes überprüft werden, in wieweit dieses Konstrukt nur dann agonistische Wirkung am TNFR1 hat, wenn das Zielantigen EpCAM, auch gebunden ist. Um dies zu zeigen wurden mit EpCAM/C215 transfizierten B16 Zellen (B16-C215) und die untransfizierten B16 Zellen (B16-F0) benutzt. Der Vorteil von transfizierten Zellen besteht darin, dass man mit den untransfizierten Zellen eine Kontrolle hat, die sich nur bezüglich der Expression des zu untersuchenden Antigens unterscheidet. Um die bispezifischen $F(ab')_2$ -Fragmente zu testen wurden Wehi-164s Zellen alleine oder mit B16-F0 bzw. B16-C215 Zellen zusammen mit dem Konstrukt oder dem Fab'-Mix (eine Mischung aus Fab'-Fragmenten beider parentaler Antikörper) behandelt. Als Positivkontrolle diente rekombinantes TNF. Wir konnten zeigen, dass TNF bei

den B-16-Zellen keine Aktivierung der Kaspasen herbeiführte und damit davon ausgehen, dass eine detektierbarer Kaspasenaktivität allein auf die WEHI-164s Zellen zurückzuführen ist. Durch Zugabe der B16-Zellen zu den WEHI-164s fand eine nur geringe Aktivierung von Kaspasen statt. Diese konnte sowohl bei den WEHI-164s allein als auch bei den WEHI-164s mit den B16-Zellen durch Zugabe von rekombinantem TNF signifikant erhöht werden. Das EpCAMxTNFR1-Konstrukt allerdings führte nur dann zu einer signifikanten Aktivierung der Kaspasen, wenn die B16-C215 Zellen, die das Zielantigen tragen, anwesend waren, nicht bei den WEHI-164s allein oder bei den WEHI-164s mit B16-F0. Das Konstrukt war also nur dann agonistisch, wenn das Zielantigen gebunden werden konnte. Um dies zu verifizieren wurden Chrom- Freisetzungstests durchgeführt. Die WEHI-164s Zellen waren hierbei die Target-Zellen. Auch hier zeigte sich, dass es nur zu einer Lyse der WEHI-164s Zellen durch das Konstrukt kam, wenn auch die B16-C215 Zellen anwesend waren. Um die Wirkung des bispezifischen Konstruktes noch besser zu charakterisieren wurde das Konstrukt in steigenden Konzentrationen titriert. Wenn die B16-C215 Zellen anwesend waren, kam es schon bei Konzentrationen von 1ng/ml zu einer knapp 20% Lyse der WEHI-164s Zellen. Ab 10ng/ml war die Lyse mit über 40 % fast maximal. Wenn die nicht transfizierten Zellen kokultiviert wurden, kam es erst bei Konzentrationen von 1000ng/ml zu einer lediglich 15%-igen Lyse der WEHI-164s Zellen. Ohne B16-Zellen führte das Konstrukt auch bei 1000ng/ml kaum zu einer Lyse der Target-Zellen. Die zweite Forderung nach Abhängigkeit der TNFR1-Stimulation durch das EpCAMxTNFR1-Konstrukt von der Bindung an EpCAM/C215 positiven Zellen war hiermit erfüllt.

4.7 *In vivo* Testung des EpCAMxTNFR1-Konstruktes

Damit konnte das eigentliche Ziel, die Testung einer möglichen selektiven TNFR1 Stimulation *in vivo* durch die generierten bispezifischen Antikörper unternommen werden. Um die Wirkung und vor allem auch die Sicherheit bzw.

potentielle Nebenwirkungen in einem *in vivo* System überprüfen zu können, wurde ein syngenes Mausmodell mit C57Bl/6 Mäusen herangezogen. Das syngene Mausmodell bietet gegenüber dem bei Tumorsystemen häufig gebräuchlichen Nacktmausmodell den Vorteil, dass nicht nur direkte Effekte des Agens gegen die Tumorzellen überprüft werden können, sondern auch immunstimulatorische Effekte, was in unserem Fall von besonderer Wichtigkeit war. Hierzu wurden C57Bl/6 Mäusen B16-C215 Zellen intra-peritoneal injiziert und die Tiere dann mit dem Konstrukt, dem Fab'-Mix bzw. PBS ebenfalls i.p. behandelt. Nach knapp 70 Tagen waren fünf von sechs Mäusen der PBS-Gruppe gestorben, wohingegen nach 100 Tagen alle Mäuse der mit dem Konstrukt behandelten Gruppe lebten. Da B16 Melanomzellen wie von uns gezeigt nicht sensitiv auf TNF sind kann postuliert werden, dass die Antitumor-Aktivität der eingesetzten Konstrukte ausschließlich durch immunmodulatorische Wirkungen des Konstruktes vermittelt werden. Da es sich um ein i.p. Modell handelt können auch potentielle Effekte auf die Tumervaskularisation vernachlässigt werden. Zu unserem Erstaunen überlebten auch fünf von sechs Mäusen, die mit dem Fab'-Mix therapiert wurden, die 100 Tage. Dafür kamen verschiedene Erklärungen in Betracht: zum einen war es vorstellbar, dass die TNFR1 Aktivierung durch die TNFR1-Fab'-Fragmente *in vivo* Zielantigen-unabhängig erfolgt. Dies wäre fatal, da damit das bispezifische Prinzip nicht zum tragen käme. Diese Möglichkeit schien jedoch durch die vorangegangenen *in vitro* Experimente ausgeschlossen. In einer Wiederholung der zuvor durchgeführten *in vitro* Experimente zeigte sich jedoch, dass der im Tiermodell eingesetzte Fab'-Mix wie das bispezifische Konstrukt, Zielantigen-abhängig Apoptose induzieren konnte, jedoch nicht in Abwesenheit des Zielantigens. Eine nachfolgend durchgeführte Untersuchung des Fab'-Mix auf einer Smart Säule ergab, dass der Fab'-Mix zu einem großen Teil ebenfalls aus bispezifischen F(ab')₂ bestand. Es musste also später zu einer spontanen chemischen Koppelung gekommen sein, so dass wirkungsvolles Konstrukt im Fab'-Mix vorhanden war, und dieser damit als valide Kontrolle entfiel.

Deshalb soll in nachfolgenden Experimenten zum einen ein erneutes Tiermodell durchgeführt werden, in welchen sichergestellt wird, dass die zum Einsatz kommende Fab'-Kontrolle nicht nachhybridisiert. Des weiteren ist geplant, ein Maus-Lungenmodell durchzuführen, um die Antitumor-Aktivität der hergestellten Konstrukte in einem weiteren, der Situation im Menschen noch näher kommenden Modell zu bestätigen.

Mit diesen Arbeiten sollte dann eine breite Grundlage für die experimentelle klinische Erprobung von bispezifischen Antikörpern zur Aktivierung des TNFR1 im Menschen ermöglicht werden.

5 Zusammenfassung

Tumor Nekrose Faktor (TNF) ist ein hoch potentes Zytokin, welches sowohl den angeborenen als auch den erworbenen Arm des Immunsystems nachhaltig beeinflussen und dadurch beachtliche Antitumor-Aktivität vermitteln kann. Diese ist nicht nur durch die direkte Toxizität von TNF auf Tumorzellen, sondern auch auf dessen immunstimulatorische und anti-angiogenetische Wirkungen zurückzuführen. Obwohl beeindruckende klinische Erfolge durch die lokoregionale Applikation von TNF z.B. in Kombination mit herkömmlichen Zytostatika erreicht werden können, ist diese Anwendung auf Grund der systemischen Nebenwirkungen auf lokoregionale Verfahren wie die „isolated limb perfusion“ beschränkt. Eine systemische Applikation ist damit bislang unmöglich.

Durch die Erforschung der Funktionen und Strukturen von Immunglobulinen (Antikörpern) und durch die Entwicklung von Verfahren zur Generierung von antikörperproduzierenden Hybridomen in den letzten Jahrzehnten ist es mittlerweile möglich, Antikörper gegen nahezu jedes beliebige Antigen, darunter auch Tumorantigene herzustellen. Nachfolgend wurden viele Versuche unternommen, die Aktivierung des TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) z.B. mit Hilfe von TNF-Fusionsproteinen bestehend aus einem Antikörpermolekül gegen ein Tumorantigen, an welches TNF gekoppelt wird, zielgerichtet zu vermitteln, um damit die therapeutische Effizienz in der Tumorthherapie zu maximieren und vor allem gesundes Gewebe vor den TNF-vermittelten Effekten zu schützen. Dieses Ziel wurde jedoch bisher nicht hinreichend erreicht, da es durch Kopplung von TNF an Antikörper zwar zu einer Anreicherung im Tumorgewebe kommt, die Wirkung von TNF allerdings weiterhin unabhängig von der Bindung des Tumorantigens erfolgt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Generierung eines bispezifischen EpCAMxTNFR1-F(ab')₂-Konstruktes zur zielgerichteten Aktivierung des murinen TNFR1. Dafür wurde zunächst untersucht, ob unter den käuflich zu erwerbenden Antikörpern gegen den murinen TNFR1 ein agonistischer Antikörper zur Verfügung stand. Dies konnte für den Klon 47803 über eine durch den Antikörper induzierte Reduktion der Viabilität von murinen EL-4 Lymphom-Zellen und murinen WEHI-164s

Fibrosarkom-Zellen mittels WST-1 Testes nachgewiesen werden. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit dem Antikörper ebenfalls zu einer Aktivierung der Kaspasen 3 und 7 in den WEHI-164s Zellen führt. Damit waren agonistische Antikörper gegen murinen TNFR1 identifiziert. Anschließend wurden TNB-TNFR1-Fab'-Fragmente des Antikörperklons 47803 durch Verdau der Antikörper mit Pepsin und anschließender Reduktion und Modifikation mit DTNB hergestellt. Nach gelchromatographischer Trennung der modifizierten Fab'-Fragmente von den Fc-Teilen wurden die TNB-TNFR1-Fab'-Fragmente chemisch mit einem EpCAM-Fab'-Fragment, welches bereits zur Verfügung stand, hybridisiert. Anschließend wurden die bispezifischen F(ab')₂-Fragmente mittels Gelchromatographie von den nicht gekoppelten Fab'-Fragmenten getrennt. Nun konnte mit der Testung der EpCAMxTNFR1-Konstrukte *in vitro* begonnen werden. Hierzu standen mit EpCAM (C215) transfizierte murine B16-Melanomzellen (B16-215) und untransfizierte B16-Melanomzellen (B16-F0) zur Verfügung. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass in B16 Zellen im Gegensatz zu den WEHI-164s Zellen durch TNF keine Kaspasenaktivität ausgelöst wird. Damit konnte eine spezifische Untersuchung der Aktivierung des TNFR1 auf WEHI-164s Zellen in Abhängigkeit von einer Bindung der Konstrukte an EpCAM als Zielantigen auf B16 Zellen durchgeführt werden. Dementsprechend wurden mit B16-F0 bzw. B16-C215 Zellen und TNF sensitiven WEHI-164s Zellen Kokulturansätze in Gegenwart der generierten Konstrukte durchgeführt. Wenn das bispezifische EpCAM-TNFR1-Konstrukt in diesen Kokulturansätzen an EpCAM auf den B16-C215 Zellen gebunden hatte, besaß es schon in Konzentrationen von 1ng/ml deutliche agonistische Aktivität, welche sowohl über eine Aktivierung von Kaspase 3 und 7 als auch über die Lyse von TNF sensitiven WEHI-164s Zellen nachgewiesen wurde. In Anwesenheit von untransfizierten B16-F0 Zellen als Kontrolle wurde erwartungsgemäß nur eine sehr schwache Zellyse erst bei sehr hohen Konzentrationen (1000ng/ml) vermittelt. Wenn das Konstrukt zu den WEHI-164s Zellen in Abwesenheit von B16 Zellen gegeben wurde, besaß es keinerlei detektierbare Wirkung. Dies demonstriert, dass die TNFR1 Aktivierung durch das hergestellte bispezifische Konstrukt abhängig von der Anwesenheit des Zielantigens EpCAM ist. Daraufhin untersuchten wir die Aktivität des

Konstruktes in einem B16 Melanom Mausmodell mit syngenem, immunkompetenten Mäusen. Hierfür wurden 2.500 EpCAM transfizierte B16 Melanom Zellen in C57Bl/6 Mäusen i.p. injiziert und die Tiere nachfolgend mit sechs Gaben des bispezifischen Konstruktes oder des Fab'-Mix bzw. PBS als Kontrolle behandelt. Während alle sechs mit dem EpCAMxTNRR1-Konstrukt behandelten Mäuse überlebten, starben in der Kontroll-Gruppe mit PBS fünf von sechs Mäusen innerhalb von 10 Wochen. Überraschenderweise überlebten jedoch auch 5 von 6 Mäusen in der mit dem Fab'-Mix behandelten Gruppe. Es zeigte sich in einer nachfolgend durchgeführten Testung des Fab'-Mix *in vitro* bezüglich dessen Induktion von Zellyse und Aktivierung von Kaspasen, dass auch in dem als Kontrolle vorgesehenen Fab'-Mix funktionelles Konstrukt vorlag. Offensichtlich war eine „Nachhybridisierung“ erfolgt, was durch eine gelchromatographische Analyse bestätigt wurde, so dass der Fab'-Mix schlüssigerweise nicht als valide Kontrolle gewertet werden konnte. In den behandelten Gruppen wurden keine signifikanten Nebenwirkungen beobachtet, was ebenfalls die Zielzellrestriktion der Konstrukte belegt. Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass die Aktivität des EpCAMxTNFR1-Konstruktes strikt von der Anwesenheit der EpCAM positiven Tumorzellen abhängig ist und das Konstrukt signifikante Antitumor Effekte vermittelt. Diese Ergebnisse bilden die Basis für eine weitere tierexperimentelle Erprobung der bispezifischen F(ab')₂-Fragmente zur lokal begrenzten Aktivierung des TNFR1 als Grundlage für eine experimentelle klinische Erprobung derartiger Reagenzien an Patienten mit malignen Erkrankungen.

6 Literaturverzeichnis

1. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA: Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999, 284: 1313-1318.
2. Janeway CA, Jr., Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002, 20: 197-216.
3. Fearon DT, Locksley RM: The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996, 272: 50-53.
4. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, 392: 245-252.
5. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S: Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002, 20: 621-667.
6. Litman GW, Anderson MK, Rast JP: Evolution of antigen binding receptors. *Annu Rev Immunol* 1999, 17: 109-147.
7. Thompson CB: New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity* 1995, 3: 531-539.
8. Davis MM, Bjorkman PJ: T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988, 334: 395-402.
9. Carding SR, Egan PJ: Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2002, 2: 336-345.
10. Nossal GJ: Negative selection of lymphocytes. *Cell* 1994, 76: 229-239.
11. Nemazee D: Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 2000, 18: 19-51.
12. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA: Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 2003, 21: 139-176.
13. Bretscher P, Cohn M: A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 1970, 169: 1042-1049.
14. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA: CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996, 14: 233-258.
15. Davies DR, Chacko S: Antibody structure. *Acc Chem Res* 1993, 26: 421-427.
16. Kabat EA: Antibody complementarity and antibody structure. *J Immunol* 1988, 141: S25-S36.

17. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975, 72: 3666-3670.
18. Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, Bringman TS, Henzel WJ, Jarrett JA et al.: Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature* 1984, 312: 721-724.
19. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA et al.: Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984, 312: 724-729.
20. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P: Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003, 10: 45-65.
21. Tang P, Hung M-C, Klostergaard J: Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 1996, 35: 8216-8225.
22. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD: A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988, 53: 45-53.
23. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF et al.: A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 1997, 385: 729-733.
24. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ: The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001, 104: 487-501.
25. Naismith JH, Sprang SR: Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci* 1998, 23: 74-79.
26. Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C et al.: Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 1993, 73: 431-445.
27. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV: A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993, 74: 845-853.
28. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME: Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998, 254: 439-459.
29. Chen G, Goeddel DV: TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002, 296: 1634-1635.
30. Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D: Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005, 16: 35-53.
31. Mannel DN, Echtenacher B: TNF in the inflammatory response. *Chem Immunol* 2000, 74: 141-161.

32. Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J et al.: Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 1985, 316: 552-554.
33. Matsuno H, Yudoh K, Katayama R, Nakazawa F, Uzuki M, Sawai T et al.: The role of TNF-alpha in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera. *Rheumatology (Oxford)* 2002, 41: 329-337.
34. Davis JC, Jr.: Understanding the role of tumor necrosis factor inhibition in ankylosing spondylitis. *Semin Arthritis Rheum* 2005, 34: 668-677.
35. Wang J, Fu YX: Tumor necrosis factor family members and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 2005, 204: 144-155.
36. Gupta S, Tripathi CD: Current status of TNF blocking therapy in heart failure. *Indian J Med Sci* 2005, 59: 363-366.
37. Holgate ST: Cytokine and anti-cytokine therapy for the treatment of asthma and allergic disease. *Cytokine* 2004, 28: 152-157.
38. Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M: Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005, 29: 201-217.
39. Pradhan AD, Ridker PM: Do atherosclerosis and type 2 diabetes share a common inflammatory basis? *Eur Heart J* 2002, 23: 831-834.
40. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K: A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 1996, 19: 1518-1520.
41. Stennicke HR, Renatus M, Meldal M, Salvesen GS: Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8. *Biochem J* 2000, 350 Pt 2: 563-568.
42. Talanian RV, Brady KD, Cryns VL: Caspases as targets for anti-inflammatory and anti-apoptotic drug discovery. *J Med Chem* 2000, 43: 3351-3371.
43. Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D et al.: Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* 1997, 272: 9677-9682.
44. Gurtu V, Kain SR, Zhang G: Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal Biochem* 1997, 251: 98-102.
45. Kirschenbaum DM: Molar absorptivity and A 1 per cent 1 cm values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible regions. XI. *Anal Biochem* 1975, 68: 465-484.

46. Brennan M, Davison PF, Paulus H: Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science* 1985, 229: 81-83.
47. Jung G, Freimann U, Von Marschall Z, Reisfeld RA, Wilmanns W: Target cell-induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments. *Eur J Immunol* 1991, 21: 2431-2435.
48. Parham P: On the fragmentation of monoclonal IgG1, IgG2a, and IgG2b from BALB/c mice. *J Immunol* 1983, 131: 2895-2902.
49. Ellman GL: Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959, 82: 70-77.
50. Schlamowitz M, Peterson LU: Studies on the optimum pH for the action of pepsin on "native" and denatured bovine serum albumin and bovine hemoglobin. *J Biol Chem* 1959, 234: 3137-3145.
51. Polunovsky VA, Wendt CH, Ingbar DH, Peterson MS, Bitterman PB: Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha: modulation by inhibitors of protein synthesis. *Exp Cell Res* 1994, 214: 584-594.
52. Eggermont AM, de Wilt JH, Ten Hagen TL: Current uses of isolated limb perfusion in the clinic and a model system for new strategies. *Lancet Oncol* 2003, 4: 429-437.
53. Palladino MA, Jr., Shalaby MR, Kramer SM, Ferraiolo BL, Baughman RA, Deleo AB et al.: Characterization of the antitumor activities of human tumor necrosis factor-alpha and the comparison with other cytokines: induction of tumor-specific immunity. *J Immunol* 1987, 138: 4023-4032.
54. Shimomura K, Manda T, Mukumoto S, Kobayashi K, Nakano K, Mori J: Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: thrombus formation is a cause of anti-tumor activity. *Int J Cancer* 1988, 41: 243-247.
55. Van de Wiel PA, Bloksma N, Kuper CF, Hofhuis FM, Willers JM: Macroscopic and microscopic early effects of tumour necrosis factor on murine Meth A sarcoma, and relation to curative activity. *J Pathol* 1989, 157: 65-73.
56. Furrer M, Altermatt HJ, Ris HB, Althaus U, Ruegg C, Lienard D et al.: Lack of antitumour activity of human recombinant tumour necrosis factor-alpha, alone or in combination with melphalan in a nude mouse human melanoma xenograft system. *Melanoma Res* 1997, 7 Suppl 2: S43-S49.
57. Balkwill FR, Lee A, Aldam G, Moodie E, Thomas JA, Tavernier J et al.: Human tumor xenografts treated with recombinant human tumor necrosis factor alone or in combination with interferons. *Cancer Res* 1986, 46: 3990-3993.

58. Havell EA, Fiers W, North RJ: The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF), I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity. *J Exp Med* 1988, 167: 1067-1085.
59. Vujanovic NL: Role of TNF family ligands in antitumor activity of natural killer cells. *Int Rev Immunol* 2001, 20: 415-437.
60. Mocellin S, Provenzano M, Lise M, Nitti D, Rossi CR: Increased TIA-1 gene expression in the tumor microenvironment after locoregional administration of tumor necrosis factor-alpha to patients with soft tissue limb sarcoma. *Int J Cancer* 2003, 107: 317-322.
61. Prevost-Blondel A, Roth E, Rosenthal FM, Pircher H: Crucial role of TNF-alpha in CD8 T cell-mediated elimination of 3LL-A9 Lewis lung carcinoma cells in vivo. *J Immunol* 2000, 164: 3645-3651.
62. Poehlein CH, Hu HM, Yamada J, Assmann I, Alvord WG, Urba WJ et al.: TNF plays an essential role in tumor regression after adoptive transfer of perforin/IFN-gamma double knockout effector T cells. *J Immunol* 2003, 170: 2004-2013.
63. Baxevasis CN, Voutsas IF, Tsitsilonis OE, Tsiatas ML, Gritzapis AD, Papamichail M: Compromised anti-tumor responses in tumor necrosis factor-alpha knockout mice. *Eur J Immunol* 2000, 30: 1957-1966.
64. Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ: Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* 2004, 10: 475-480.
65. Manusama ER, Nooijen PT, Stavast J, Durante NM, Marquet RL, Eggermont AM: Synergistic antitumour effect of recombinant human tumour necrosis factor alpha with melphalan in isolated limb perfusion in the rat. *Br J Surg* 1996, 83: 551-555.
66. Nooijen PT, Manusama ER, Eggermont AM, Schalkwijk L, Stavast J, Marquet RL et al.: Synergistic effects of TNF-alpha and melphalan in an isolated limb perfusion model of rat sarcoma: a histopathological, immunohistochemical and electron microscopical study. *Br J Cancer* 1996, 74: 1908-1915.
67. Seynhaeve AL, de Wilt JH, van Tiel ST, Eggermont AM, Ten Hagen TL: Isolated limb perfusion with actinomycin D and TNF-alpha results in improved tumour response in soft-tissue sarcoma-bearing rats but is accompanied by severe local toxicity. *Br J Cancer* 2002, 86: 1174-1179.
68. van der Veen AH, de Wilt JH, Eggermont AM, van Tiel ST, Seynhaeve AL, Ten Hagen TL: TNF-alpha augments intratumoural concentrations of doxorubicin in TNF-alpha-based isolated limb perfusion in rat sarcoma models and enhances anti-tumour effects. *Br J Cancer* 2000, 82: 973-980.

69. Bauer TW, Gutierrez M, Dudrick DJ, Li J, Blair IA, Menon C et al.: A human melanoma xenograft in a nude rat responds to isolated limb perfusion with TNF plus melphalan. *Surgery* 2003, 133: 420-428.
70. Buell JF, Reed E, Lee KB, Parker RJ, Venzon DJ, Amikura K et al.: Synergistic effect and possible mechanisms of tumor necrosis factor and cisplatin cytotoxicity under moderate hyperthermia against gastric cancer cells. *Ann Surg Oncol* 1997, 4: 141-148.
71. Lejeune FJ, Ruegg C, Lienard D: Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Opin Immunol* 1998, 10: 573-580.
72. Lejeune FJ: Clinical use of TNF revisited: improving penetration of anti-cancer agents by increasing vascular permeability. *J Clin Invest* 2002, 110: 433-435.
73. de Wilt JH, Ten Hagen TL, de Boeck G, van Tiel ST, de Bruijn EA, Eggermont AM: Tumour necrosis factor alpha increases melphalan concentration in tumour tissue after isolated limb perfusion. *Br J Cancer* 2000, 82: 1000-1003.
74. Duan L, Aoyagi M, Tamaki M, Yoshino Y, Morimoto T, Wakimoto H et al.: Impairment of both apoptotic and cytoprotective signalings in glioma cells resistant to the combined use of cisplatin and tumor necrosis factor alpha. *Clin Cancer Res* 2004, 10: 234-243.
75. Choi KH, Choi HY, Ko JK, Park SS, Kim YN, Kim CW: Transcriptional regulation of TNF family receptors and Bcl-2 family by chemotherapeutic agents in murine CT26 cells. *J Cell Biochem* 2004, 91: 410-422.
76. Ten Hagen TL, Eggermont AM, Lejeune FJ: TNF is here to stay--revisited. *Trends Immunol* 2001, 22: 127-129.
77. Lejeune FJ, Kroon BB, Di Filippo F, Hoekstra HJ, Santinami M, Lienard D et al.: Isolated limb perfusion: the European experience. *Surg Oncol Clin N Am* 2001, 10: 821-32, ix.
78. Allen TM: Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2002, 2: 750-763.
79. Christ O, Matzku S, Burger C, Zoller M: Interleukin 2-antibody and tumor necrosis factor-antibody fusion proteins induce different antitumor immune responses in vivo. *Clin Cancer Res* 2001, 7: 1385-1397.
80. Sharifi J, Khawli LA, Hu P, Li J, Epstein AL: Generation of human interferon gamma and tumor Necrosis factor alpha chimeric TNT-3 fusion proteins. *Hybrid Hybridomics* 2002, 21: 421-432.
81. Hoogenboom HR, Volckaert G, Raus JC: Construction and expression of antibody-tumor necrosis factor fusion proteins. *Mol Immunol* 1991, 28: 1027-1037.

82. Bauer S, Adrian N, Williamson B, Panousis C, Fadle N, Smerd J et al.: Targeted bioactivity of membrane-anchored TNF by an antibody-derived TNF fusion protein. *J Immunol* 2004, 172: 3930-3939.
83. Cooke SP, Pedley RB, Boden R, Begent RH, Chester KA: In vivo tumor delivery of a recombinant single chain Fv::tumor necrosis factor-alpha fusion [correction of factor: a fusion] protein. *Bioconjug Chem* 2002, 13: 7-15.
84. Halin C, Gafner V, Villani ME, Borsi L, Berndt A, Kosmehl H et al.: Synergistic therapeutic effects of a tumor targeting antibody fragment, fused to interleukin 12 and to tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res* 2003, 63: 3202-3210.
85. Rosenblum MG, Horn SA, Cheung LH: A novel recombinant fusion toxin targeting HER-2/NEU-over-expressing cells and containing human tumor necrosis factor. *Int J Cancer* 2000, 88: 267-273.
86. Liu Y, Cheung LH, Marks JW, Rosenblum MG: Recombinant single-chain antibody fusion construct targeting human melanoma cells and containing tumor necrosis factor. *Int J Cancer* 2004, 108: 549-557.
87. Wajant H, Gerspach J, Pfizenmaier K: Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005, 16: 55-76.
88. Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV: The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med* 1999, 77: 699-712.
89. Grosse-Hovest L, Brandl M, Dohlsten M, Kalland T, Wilmanns W, Jung G: Tumor-growth inhibition with bispecific antibody fragments in a syngeneic mouse melanoma model: the role of targeted T-cell co-stimulation via CD28. *Int J Cancer* 1999, 80: 138-144.
90. De Jonge J, Brissinck J, Heirman C, Demanet C, Leo O, Moser M et al.: Production and characterization of bispecific single-chain antibody fragments. *Mol Immunol* 1995, 32: 1405-1412.
91. Holliger P, Prospero T, Winter G: "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90: 6444-6448.
92. Kohler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975, 256: 495-497.
93. Milstein C, Cuello AC: Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature* 1983, 305: 537-540.
94. Staerz UD, Bevan MJ: Hybrid hybridoma producing a bispecific monoclonal antibody that can focus effector T-cell activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83: 1453-1457.

95. Lanzavecchia A, Scheidegger D: The use of hybrid hybridomas to target human cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1987, 17: 105-111.
96. Weiner GJ, Hillstrom JR: Bispecific anti-idiotypic/anti-CD3 antibody therapy of murine B cell lymphoma. *J Immunol* 1991, 147: 4035-4044.
97. Songsivilai S, Lachmann PJ: Bispecific antibody: a tool for diagnosis and treatment of disease. *Clin Exp Immunol* 1990, 79: 315-321.
98. Nitta T, Yagita H, Azuma T, Sato K, Okumura K: Bispecific F(ab')₂ monomer prepared with anti-CD3 and anti-tumor monoclonal antibodies is most potent in induction of cytolysis of human T cells. *Eur J Immunol* 1989, 19: 1437-1441.
99. Glennie MJ, McBride HM, Worth AT, Stevenson GT: Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)₂ antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. *J Immunol* 1987, 139: 2367-2375.

7 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Helmut R. Salih für die Themenstellung und die intensive Betreuung, nicht zu vergessen die hitzigen Diskussionen bedanken. Deine Visionen, neue Wege in der Tumorthherapie zu beschreiten, werden mich weiterhin für die Forschung motivieren.

Mein besonderer Dank gilt des weiteren Herrn Prof. Dr. med. Gundram Jung für viele konstruktive Gespräche und seine immerwährende Hilfsbereitschaft. Unsere gemeinsamen Erlebnisse bei der Antikörperaufreinigung werden mir stets im Gedächtnis bleiben.

Meinen Kolleginnen, Andi, Ingrid, Katrin und Mercedes, danke ich für ihre Geduld und das Ertragen meiner schlechten Laune, wenn die Experimente mal wieder nicht funktionieren wollten. Ohne Euch würde die Arbeit nicht halb soviel Spaß machen.

Ein großes Dankeschön auch an Tanja, meine Leidensgenossin in der Forschung mit bispezifischen Antikörpern, für die tatkräftige Unterstützung bei den *in vivo* Versuchen.

Wie wäre mein Studium wohl ohne Anke und ihre Anekdoten („Du, ich muss Dir was erzählen.“), Annikas Fürsorge („Hast du schon auf die morgige Prüfung gelernt?“-„Welche Prüfung?“) und Kims Ablenkungen („Gehen wir 'ne Runde Flipper spielen?“) gelaufen? Ich stehe tief in eurer Schuld.

Des weiteren möchte ich mich bei meinen langjährigen Freunden Gesi, Katja, Nini, Andy, Ben und Perry für ihre Treue und Unterstützung bedanken. Ihr seid zu Fixpunkten in meinem Leben geworden, die ich nicht mehr missen möchte.

Auch danke ich meinen Tübinger Freunden, im besonderen Felix, Frank, Gundi, Jens und Nils, für die vielen gemeinsamen Erlebnisse und ihre Offenheit. Durch Euch ist Tübingen neben der beruflichen auch zu meiner privaten Heimat geworden.

Zu guter Letzt möchte ich den größten Dank meiner Familie und hier im besonderen meiner Mutter für ihre unendliche Liebe, ihr Vertrauen und ihr Verständnis aussprechen. Ohne Dich wäre ich nicht der, der ich geworden bin.

8 Lebenslauf

Matthias Krusch

Geboren am 28. April 1976 in Stuttgart

Schulbildung

1982 bis 1986	Fuchsrain Grundschule, Stuttgart
1986 bis 1995	Evang. Heidehof-Gymnasium, Stuttgart
Juni 1995	Allgemeine Hochschulreife am Evang. Heidehof-Gymnasium, Stuttgart

Zivildienst

07/1995 bis 08/1995	Zivildienst am Bethesda-Krankenhaus, Stuttgart
---------------------	--

Studium

1996 bis 2003	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
13.11.2003	Staatsexamen in Humanmedizin

Berufstätigkeit

Seit 01/2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Labor für molekulare Tumorummunologie, Arbeitsgruppe PD Dr. med. Helmut R. Salih, Medizinische Klinik II, Eberhardt Karls Universität, Tübingen
--------------	---