

## 5 Diskussion

Die Immuntherapie maligner Erkrankungen gewinnt aufgrund der teilweise begrenzten Wirksamkeit sowie des hohen Nebenwirkungspotentials konventioneller Behandlungsmethoden immer mehr an Bedeutung. Dabei werden verschiedene Strategien verfolgt, die sich zum Großteil noch in der präklinischen Phase oder klinischen Phase I und II Studien befinden. Therapien mit Tumorimpfstoffen oder mit antigenbeladenen dendritischen Zellen zielen auf eine Aktivierung des patienteneigenen Immunsystems, welche sich zunächst in einer spezifischen Reaktion gegen die verabfolgten Tumorantigene richtet. Durch Zerstörung der Tumorzellen werden weitere Antigene frei, die von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und so ebenfalls dem Immunsystem zugänglich gemacht werden. Die Behandlung mit dendritischen Zellen weist den Vorteil auf, daß die Tumorantigene in Verbindung mit MHC-Molekülen präsentiert werden, und auf diese Weise eine spezifische T-Zell-Reaktion ausgelöst werden kann.

Auch die Therapie mit bispezifischen Antikörpern beinhaltet eine Aktivierung des Immunsystems. Dies geschieht durch eine Vernetzung tumorassoziierter Antigene mit zytotoxischen Effektorzellen wie T-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen oder NK-Zellen. Andere Therapieformen nutzen tumorspezifische Antikörper, um zytotoxische Substanzen (Zytostatika, Toxine, radioaktive Isotope) gezielt zu malignen Zellen zu transportieren und diese zu zerstören.

Bei den für die Krebstherapie bisher zugelassenen immuntherapeutischen Medikamenten handelt es sich um zwei monoklonale Antikörper. Der anti-CD20 Antikörper Rituximab wird in der Therapie des Non-Hodgkin-Lymphoms eingesetzt, das anti-HER2 Konstrukt Herceptin® findet Anwendung in der Behandlung HER2/neu-positiver Mammakarzinome. Beide Antikörper werden in unkonjugierter Form appliziert und wirken daher hauptsächlich über die Effektorfunktionen ihres Fc-Teils (Komplementaktivierung, Bindung von Effektorzellen) sowie über die Blockade von Wachstumsrezeptoren.

Die optimale Immuntherapie wird voraussichtlich die Kombination mehrerer der genannten Strategien beinhalten, um eine effektive Lyse der Tumorzellen zu erreichen. Alle bisher dargestellten Ansätze implizieren als notwendige Voraussetzung die Identifizierung geeigneter tumorassoziierter Antigene, welche entweder als Vakzine oder als Ziel für Antikörper dienen. Da die Methoden zur Detektion solcher Antigene bisher auf wenige, zeitintensive Techniken beschränkt sind, besteht die Notwendigkeit, diese Ansätze zu optimieren und neue Strategien zu entwickeln.

Ein bereits gut etabliertes System zur Isolierung der Zielantigene von Antikörpern ist das Screening von  $\lambda$ -Phagen-cDNA-Expressionsbanken. Aus Tumor-RNA erstellte Bibliotheken enthalten im Idealfall die Gene aller Proteine und damit auch der Antigene einer Tumorzelle. Das Screening einer solchen Expressionsbank mit tumorspezifischen Antikörperstrukturen führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Identifizierung tumorassoziierter Antigene. Bisher wurde ein System entwickelt, welches auf dem Screening tumorspezifischer  $\lambda$ -Phagen-Banken mit Serum der zugehörigen Patienten basiert (SEREX). Diese Strategie zielt auf die Identifizierung zytoplasmatischer und membranständiger Antigene, um möglichst viele Pro-

teine zu identifizieren, die im Tumorgeschehen eine Rolle spielen. Für den Einsatz in der Immuntherapie sind jedoch hauptsächlich Oberflächenantigene von Bedeutung, die eine Immunantwort provozieren oder als Ziel für Antikörper dienen. Daher sollte im ersten Teil dieser Arbeit ein SEREX-System etabliert werden, das mit einer höheren Wahrscheinlichkeit Tumoroberflächenantigene detektiert.

Eine weitere Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, ein neues Verfahren zur Isolierung tumorspezifischer Antigene zu erarbeiten, welches auf dem Screening von  $\lambda$ -Phagen-Expressionsbanken mit einem vorher mittels phage display angereicherten, auf filamentösen Phagen exprimierten scFv beruht. Da noch keine gut etablierte Möglichkeit besteht, das Antigen eines solchen scFv zu bestimmen, erscheint es folgerichtig, dies ebenfalls durch Screening einer cDNA-Expressionsbank zu ermöglichen.

## 5.1 Erstellung einer Mammakarzinom-spezifischen $\lambda$ -Phagen-cDNA-Expressionsbank

Das Mammakarzinom wurde ausgewählt, da gerade bei dieser Tumorart großer Bedarf an neuen Therapieformen besteht. Für die häufigste Krebserkrankung der Frau stehen auch heutzutage noch keine optimalen Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Vor allem die Bekämpfung von Metastasen gelingt häufig nur unzureichend. Hier könnten mit Immuntherapeutika die Heilungschancen verbessert werden.

Um in der cDNA-Bank eine möglichst große Antigendiversität zu erreichen, wurde die RNA zweier unterschiedlicher Mammakarzinom-Zelllinien verwendet (8701-BC und BT-474). Die Qualität einer Expressionsbibliothek ist für ein erfolgreiches Screening von besonderer Bedeutung. Je mehr Insert-tragende Klone vorhanden sind, desto mehr tumorspezifische Proteine werden von den Phagen exprimiert. Daher sollte der Anteil sogenannter nicht rekombinanter Phagen unter 5% liegen. Um eine hohe Diversität zu gewährleisten, muß die Primärbibliothek einen Titer zwischen  $10^6$  und  $10^7$  rekombinanten Klonen pro  $\mu\text{g}$  Vektor aufweisen. Jeder Klon sollte auch in der amplifizierten Bibliothek in ausreichender Menge vorliegen. Der Titer der amplifizierten Bank sollte daher  $10^9$ - $10^{11}$  pfu/ml betragen (Manual ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning Kit, Stratagene, 1998). Alle genannten Qualitätsmerkmale werden von der etablierten Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbank erfüllt. Die Primärbibliothek enthält  $5,6 \times 10^6$  rekombinante Klone (Tabellen 4.1.4.1 + 2). Der Anteil nicht rekombinanter Phagen liegt sowohl in der Primär- als auch in der amplifizierten Bank weit unter 5% (Tabellen 4.1.4.1 + 4.1.5). Der Titer der amplifizierten Bibliothek beträgt  $> 10^9$  pfu (Tabelle 4.1.5). Die cDNA-Expressionbank sollte zur korrekten Identifizierung der DNA-Sequenz isolierter Antigene möglichst große Anteile der Gene enthalten. Daher wurde eine Größenfraktionierung der cDNA vorgenommen, um DNA-Fragmente  $< 400$  bp zu entfernen. Die mittlere Insertgröße der amplifizierten Bank zeigt mit 1164 bp einen sehr guten Wert. Die

mittlere Insertgröße einer kommerziellen  $\lambda$ -Phagen-Bibliothek aus einer Mammakarzinom-Zelllinie beträgt lediglich 800 bp (Stratagene Katalog, La Jolla, CA, 1999).

## **5.2 Screening der Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbank mit Serum immunisierter Mäuse (SEREX)**

Das SEREX-System verwendet für das Screening von cDNA-Expressionsbanken Serum der zugehörigen Patienten. Dieses enthält nur einen geringen Anteil tumorspezifischer Antikörper. Von diesen Antikörpern wiederum ist nur ein Bruchteil gegen Oberflächenantigene gerichtet. Daher werden mit dem SEREX-Verfahren vornehmlich zytoplasmatische Antigenstrukturen detektiert. Um mit einer höheren Wahrscheinlichkeit Tumoroberflächenantigene zu erfassen, wurde in dieser Arbeit ein an tumorspezifischen Immunglobulinen angereichertes Mausserum eingesetzt. Eine Maus wurde mit Membranfraktionen der gleichen Mammakarzinom-Zelllinien, die auch für die Erstellung der cDNA-Bank verwendet wurden, immunisiert. Es wurden statt ganzer Zellen Membranfraktionen eingesetzt, um den Anteil Membran- und damit auch Oberflächenantigen-spezifischer Antikörper zu erhöhen. Die Immunisierung mit ganzen Zellen führt zur Lyse der fremden Zellen durch das murine Immunsystem und damit zur Freisetzung zytoplasmatischer Antigene. Die Mammakarzinom-spezifische Immunantwort konnte durch einen Titeranstieg im Zellmembran-ELISA dokumentiert werden. Es kam zu einem stetigen Anstieg des IgG-Spiegels, der in der 7. Woche eine Plateauphase erreichte (Abb. 4.2).

Für das Screening der Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbibliothek wurde Serum der 6. Woche in einer Verdünnung von 1:11.250 eingesetzt. Zumeist erfordert die Detektion von Antigenen mittels SEREX eine sehr viel geringere Verdünnung des Serums von lediglich 1:100. Da aufgrund des geringen murinen Blutvolumens nur wenige Mikroliter Mausserum zur Verfügung standen, mußte eine sehr viel höhere Verdünnung gewählt werden. Versuche mit nicht abgesättigtem Serum ergaben einen zu starken Hintergrund, so daß auch die Verwendung von Mausserum eine Absättigung gegen Coliprotein erfordert.

In 240.000 Klonen konnte ein deutlich positiver Plaque identifiziert werden. Dieser wurde in zwei weiteren Screenings vereinzelt. Im 3. Screening zeigte sich neben den deutlich positiven auch ein schwach angefärbter Klon. Excisionen der Insert-tragenden Plasmide aus dem  $\lambda$ -Phagen-Vektor mit anschließendem Verdau zur Größenbestimmung der Inserts zeigten, daß alle deutlich positiven Phagen ein 2100 bp großes Insert enthielten. Das Insert des schwach gefärbten Klons war ca. 1100 bp groß (Abb. 4.4.1).

Um durch einen Homologievergleich die Proteine zu bestimmen, gegen die offensichtlich eine Serumreaktion vorlag, wurden die Inserts sequenziert.



	280	290	300	310	320	330
678/3	QKATEKQHITLALEKQKLEEKRAFDSAVAKALEHHRSEIQAEQDRKIEEVRDAMENEMRT					
Mitof.:	QKATEKQHITLALEKQKLEEKRAFDSAVAKALEHHRSEIQAEQDRKIEEVRDAMENEMRT					
	430	440	450	460	470	480
	340	350	360	370	380	390
6/8/3	QLRRQAAAHTDHLRDVLRVQEQELKSEFEQNLSEKLSEQELQFRRLSQQEVDNFTLDINT					
Mitof.:	QLRRQAAAHTDHLRDVLRVQEQELKSEFEQNLSEKLSEQELQFRRLSQQEVDNFTLDINT					
	490	500	510	520	530	540
	400	410	420	430	440	450
678/3	AYARLRGIEQAVQSHAVAEEREARKAHQLWLSVEALKYSMKTSSAETPTIPLGSAVEAIKA					
Mitof.:	AYARLRGIEQAVQSHAVAEEREARKAHQLWLSVEALKYSMKTSSAETPTIPLGSAVEAIKA					
	550	560	570	580	590	600
	460	470	480	490	500	510
6/8/3	NCSDNEFTQALTAAI PPESLTRGVYSEETLRRARYAVQKLARRVAMIDETRNSLYQYFLS					
Mitof.:	NCSDNEFTQALTAAI PPESLTRGVYSEETLRRARYAVQKLARRVAMIDETRNSLYQYFLS					
	610	620	630	640	650	660
	520	530	540	550	560	570
6/8/3	YLQSLLLFPPQQLKPPPELCPEDINTFKLLSYASYCIEHGDELA AKFVNQLKGESRRVA					
Mitof.:	YLQSLLLFPPQQLKPPPELCPEDINTFKLLSYASYCIEHGDELA AKFVNQLKGESRRVA					
	670	680	690	700	710	720
	580	590	600	610		
6/8/3	QDWLKEARMTLETQIVEILTAYASAVGIGTTQVQPE					
Mitof.:	QDWLKEARMTLETQIVEILTAYASAVGIGTTQVQPE					
	730	740	750			

**Abbildung 5.2.1** Aminosäurehomologie von Klon 6/8/3 zu humanem Mitofilin. Die in der Splice-Variante fehlenden Aminosäuren sind eingerahmt. Aminosäuren, die sich von humanem Mitofilin unterscheiden, sind grau hinterlegt.

Die Proteinsequenz von Insert 6/8/3 unterscheidet sich von humanem Mitofilin in acht Aminosäuren. Sieben dieser Aminosäureaustausche gehen auf Punktmutationen zurück. Weiterhin fehlen fünf Aminosäuren (aa 389-393 humanes Mitofilin).

Über die Funktion von Mitofilin ist wenig bekannt. Das Protein enthält eine Transmembran-Domäne, mit der es in der inneren Mitochondrienmembran verankert ist. Der größte Teil des Mitofilins ragt in den Raum zwischen beiden Mitochondrienmembranen (Gieffers et al., 1997). Das Protein kommt in allen bisher untersuchten Zellen außer in Erythrozyten vor. Es konnte eine  $\alpha$ -Helix Struktur mit drei sogenannte „coiled coil“-Domänen nachgewiesen werden. Diese Regionen bedingen eine Interaktion des Proteins mit sich selbst oder mit anderen Proteinen. Da ein Mitochondrien-assoziiertes Motorprotein ebenfalls drei „coiled coil“-Domänen aufweist, postulieren Odgren et al. für Mitofilin eine ähnliche Funktion. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß Mitofilin weder mit Mikrotubuli noch mit Aktin-Filamenten in-

teragiert. Daher wird angenommen, daß das Protein an Kontaktstellen der Mitochondrien mit anderen Zytoskelett-Elementen beteiligt ist.

Der für Mitofilin kodierende Klon 6/8/3 zeigte sich im Screening mit Mausserum eindeutig positiv, so daß eine Antikörperreaktion gegen dieses Protein vorliegt. Die Proteinart und Funktion von Mitofilin, sowie sein ubiquitäres Auftreten schließen eine tumorspezifische Immunantwort jedoch nahezu aus. In der Literatur finden sich nur sehr wenige Hinweise auf eine Beteiligung mitochondrialer Proteine am Tumorgeschehen. So konnten lediglich Welter et al. (1988) den erhöhten Gehalt eines nicht näher definierten, Mitochondrien-assoziierten Proteins in Tumorzellen nachweisen. Auch Odgren et al. (1996) isolierten das Mitofilin-Gen zufällig aus Zervikal-Tumorzellen. Diese Sequenz ist mit humanem Mitofilin identisch und enthält daher weder die in Klon 6/8/3 festgestellten acht Mutationen noch die Deletion von fünf Aminosäuren. Somit ist es als unwahrscheinlich zu erachten, daß die erwähnten Veränderungen zur Tumorentstehung beitragen. Da sich vier der Basenaustausche am Anfang der Sequenz befinden, können diese auch durch fehlerhaftes „Lesen“ während der Sequenzierung bedingt sein. Bei den übrigen Mutationen handelt es sich wahrscheinlich um zufällige Punktmutationen. Das Fehlen von fünf Aminosäuren könnte darauf hindeuten, daß Klon 6/8/3 eine weitere Splice-Variante des Mitofilin-Gens enthält.

Die Membranfraktionen, die zur Immunisierung der Maus verwendet wurden, enthalten neben den Zellmembranen auch Membranen zytoplasmatischer Strukturen wie endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat und Mitochondrien. Mitofilin besitzt offensichtlich eine hohe Immunogenität, die einen hohen Antikörpertiter gegen das Protein bedingt. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von Odgren et al. bestätigt. Mit ihren Experimenten sollten durch Screening einer  $\lambda$ -Phagen-cDNA-Expressionsbank Proteine der nukleären Matrix (NuMA-Proteine) identifiziert werden, um diese als Malignitätsmarker einzusetzen. Dazu wurden Mäuse mit NuMa-Proteinen einer Tumorzelllinie immunisiert und mit der Hybridom-Technik monoklonale Antikörper gegen Proteine der nukleären Matrix generiert. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß viele Hybridome mit nukleären Proteinen reagierten, ein Antikörper jedoch ein Protein detektierte, das ein zytoplasmatisches Verteilungsmuster aufwies. Das durch Screening einer tumorspezifischen cDNA-Expressionsbibliothek ermittelte Antigen kodierte für Mitofilin. Es konnte festgestellt werden, daß die Extrakte von NuMA-Proteinen, die zur Immunisierung der Mäuse verwendet wurden, geringe Mengen an Mitofilin enthielten, die ausreichten, um eine hohen spezifischen Antikörpertiter zu induzieren.

Mit dem hier eingesetzten modifizierten SEREX-System sollten mit höherer Wahrscheinlichkeit membranständige und möglichst Mammakarzinom-spezifische Antigene isoliert werden. Tatsächlich konnte mit Mitofilin ein membranständiges Antigen identifiziert werden. Mitofilin ist jedoch als Bestandteil der Mitochondrienmembran wahrscheinlich nicht tumorspezifisch. Auch das Screening weiterer 240.000 Plaques erbrachte keine positiven Klone. Durch die Detektion von Mitofilin konnte gezeigt werden, daß sich die Methode durchaus für den Nachweis membranassoziierter Antigene eignet. Um ausschließlich tumorspezifische Ober-

flächenproteine zu isolieren, sollte die Methode in einigen Punkten noch verbessert werden. Da die zur Immunisierung verwendeten Membranfraktionen auch zytoplasmatische Membranen enthalten, werden auch Antikörper gegen intrazelluläre, membranständige Antigene gebildet. Um mehrheitlich Immunglobuline gegen Oberflächenproteine zu induzieren, sollten zur Immunisierung lediglich die Plasmamembranen und nicht die gesamten Membranfraktionen verwendet werden. Dies kann durch Auftrennen der Membranen in einem Sucrogradienten erreicht werden. Mit Substraten, die spezifisch für Enzyme der zytoplasmatischen Membranen bzw. der Plasmamembran sind, kann nachgewiesen werden, ob eine Verunreinigung mit zytoplasmatischen Membranen vorliegt.

Aufgrund des geringen murinen Blutvolumens standen nur wenige Mikroliter Serum zur Verfügung, welche für das Screening hoch verdünnt werden mußten (1:11.250). Üblicherweise wird das Serum jedoch in einer sehr viel geringeren Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, positive Klone zu detektieren. Daher sollte in zukünftigen Untersuchungen möglichst ein größeres Tier (z.B. Kaninchen) immunisiert werden, um die Serummenge zu erhöhen.

Weiterhin sollte erwähnt werden, daß der in dieser Arbeit für die Erstellung der cDNA-Expressionsbank eingesetzte  $\lambda$ -Phagen-Vektor ZAP® II nur jedes dritte Insert im richtigen Leserahmen exprimiert. Daher bilden nur 33% der Klone funktionsfähiges, korrekt translatiertes Protein. Hiervon kodiert wiederum nur ein Bruchteil für Mammakarzinom-spezifische Oberflächenantigene. Im ungünstigen Fall wird daher das Antigen eines tumorspezifischen Antikörpers in der cDNA-Bibliothek nicht im richtigen Leserahmen exprimiert und kann nicht detektiert werden. Mittlerweile steht ein  $\lambda$ -Phagen-Vektor zur Verfügung, der jedes Insert in allen drei Leserastern exprimiert (TripleEx, Clontech). Daher bilden alle Klone korrekt translatiertes Protein. Auch dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, tumorspezifische Antigene zu identifizieren.

### **5.2.2 Analyse Klon 6/18/8 (schwach positiv), kodierend für humanes Rheb (Ras Homologue Enriched in Brain)**

Klon 6/18/8 enthält die vollständige Rheb-Gensequenz einschließlich Start- und Stop-Codon. Diese befindet sich jedoch nicht in Übereinstimmung mit dem Vektorleserahmen, so daß nicht das zugehörige Rheb-Gen von den Phagen exprimiert wird (Abb. 4.4.2.2). Wird die Insertsequenz im Vektorleserahmen in die zugehörige Peptidsequenz übersetzt, so entsteht ein 72 Aminosäuren großes Protein. Dieses zeigt in der Datenbankabfrage nur geringe Homologien zu bekannten Proteinen. Die größten Ähnlichkeiten ergeben sich für ein hypothetisches Protein aus dem Bakterienstamm *Streptomyces Coelicolor* A3 (34,6%) und für Synapsin II (43%), ein Phosphoprotein, das an der synaptischen Transmitterfreisetzung beteiligt ist und nur in neuronalen Zellen exprimiert wird. Das Vorkommen der genannten homologen Proteine in einer Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbank ist unwahrscheinlich. Es kann davon ausgegangen werden, daß das Rheb-Gen im Vektorleserahmen in ein Nonsens-Protein übersetzt wird, das von Antikörpern des Mausserums erkannt wird. Daher



Die Nukleotidsequenz des Klons 6/18/8 enthält im Vergleich zu humanem Rheb sieben Einzelbasenmutationen, die jedoch keine Änderung der Aminosäureabfolge nach sich ziehen. Eine unvollständige Rheb-cDNA wurde auch von Strausberg et al. (GenBank AA 555167) aus einer Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Bibliothek isoliert. Das Vorkommen dieses Gens in Brustkrebs-spezifischen Expressionsbanken scheint demnach nicht außergewöhnlich zu sein.

Das Rheb-Gen wurde erstmalig 1994 in einer Hippocampus-cDNA-Bibliothek identifiziert (Yamagata et al., 1994). Die größten Homologien bestehen zu humanem Rap2 (37,7%), zu Ras1 aus Hefe (43,3%) und zu humanem H-Ras (34%). Yamagata et al. zeigten, daß Rheb-mRNA in Neuronen des Hippocampus durch synaptische Stimuli, aber auch durch bestimmte Wachstumsfaktoren wie EGF (Epidermal Growth Factor) und NGF (Nerve Growth Factor) induziert wird. Die Gruppe konnte weiterhin zeigen, daß Rheb-mRNA in konstant hohen Konzentrationen im embryonalen Gehirn vorliegt. Das Rheb-Protein übernimmt Funktionen in der Gehirnentwicklung, aber auch in Neuronen des adulten Gehirns, die über längere Zeit aktiviert sind (Mizuki et al., 1996). Es wird in allen bisher untersuchten Geweben exprimiert (Haut, Herz, Plazenta, Leber, Niere, Muskel, Pankreas, Lunge, Darm).

Rheb enthält die für Ras-Proteine charakteristischen GTP-Bindungsdomänen (G1-G5) und zeigt vor allem in der für die Ras-Signaltransduktion wichtigen G2-Domäne große Ähnlichkeit mit H-Ras (6 von 9 Aminosäuren sind identisch). Die Homologie von Rheb zu H-Ras beträgt 32,3%, die Übereinstimmung in den GTP-Bindungsstellen ist hingegen weitaus höher (G1 = 62,5%, G2 = 66,7%, G3 = 60%, G4 = 57%, G5 = 57%). Darüber hinaus enthält die Rheb-Sequenz mit Arginin und Serin an den Position 15 und 16 Aminosäuren, welche onkogene Mutationen für Ras darstellen. Befindet sich im Ras-Gen an der homologen Position 12 Arginin statt Glycin, so entsteht ein onkogenes Ras-Protein mit transformierenden Eigenschaften. Aufgrund der Mutation kann die aktive GTP-gebundene Ras-Form nicht durch GTPasen inaktiviert werden. Der Ras-Signaltransduktionsweg ist permanent angeschaltet und führt zu ungehemmtem Zellwachstum.

Aufgrund seiner Ähnlichkeit mit dem potentiellen Onkogen Ras, ergibt sich die Frage, ob das Rheb-Gen ebenfalls in den Ras-Signaltransduktionsweg eingebunden ist und eventuell sogar Ras-Effektoren wie Raf-1 aktiviert. Mit dieser Fragestellung beschäftigen sich zwei Untersuchungen, die zu gegensätzlichen Ergebnissen gelangen. Beide Forschergruppen konnten eine GTP-abhängige Bindung von Rheb an den Ras-Effektor Raf-1 nachweisen. Im Verlauf des normalen Ras-Signalweges kommt es durch die Bindung von Ras an Raf-1 zu einer Translokation des Raf-1 Proteins zur Plasmamembran. Dies bedingt eine Aktivierung der Raf-1-Kinasefunktion. Die Raf-1-Kinase wiederum aktiviert weitere Serin/Threonin-Kinasen, welche zum Zellkern translokieren und dort die Regulation von Transkriptionsfaktoren steuern. Eine permanente Aktivierung des Ras-Transduktionsweges führt zu ungehemmtem Zellwachstum und einem transformierten Zell-Phänotyp. Dies zeigt sich unter anderem in einer erhöhten Teilungsrate der Zellen, in einem Wachstum trotz niedrigem FCS-Anteil im Medium sowie in einem Verlust der Kontaktinhibition mit Koloniebildung. Yee & Worley (1997)

dokumentierten nach Transfektion von NIH 3T3-Fibroblasten mit Rheb eine Zunahme der Koloniebildung, die mit der von onkogenem Ras vergleichbar war. Clark et al. (1997) konnten diese Ergebnisse hingegen nicht bestätigen. Nach Transfektion der gleichen Fibroblasten-Zelllinie mit Rheb kam es zu keinerlei Änderung des Wachstumsverhaltens. Es konnte im Gegenteil sogar gezeigt werden, daß Rheb die transformierenden Eigenschaften von onkogenem Ras inhibiert. So kam es nach einer Co-Transfektion von Fibroblasten mit onkogenem Ras und Rheb zu einer mehr als 50%igen Reduktion der Koloniebildung. Durch weitergehende Experimente wurden die transformationshemmenden Eigenschaften des Rheb-Gens genauer untersucht. Es wurde nachgewiesen, daß Rheb die durch onkogenes Ras bedingte Aktivierung von MAP-Kinasen sowie die Transkriptionsaktivierung nahezu vollständig blockiert. Clark et al. (1997) gehen daher davon aus, daß Rheb keine transformierenden Eigenschaften besitzt, sondern in seiner Funktion eher dem Ras-Homolog Krev-1 (Kirsten-ras-revertant-1) ähnelt. Dieses Protein vermag zwar Ras-Effektorproteine wie Raf-1 zu binden, führt aber zu keiner Aktivierung und antagonisiert auf diese Weise die transformierende Wirkung von Ras. Da auch Rheb Raf-1 bindet, könnte es, ebenso wie Krev-1, nicht aktivierte Komplexe mit Raf-1 bilden und somit die Bindungsstellen für Ras blockieren. Da der Signalweg an dieser Stelle unterbrochen wird, kommt es zu der erwähnten Inhibierung der MAP-Kinasen- und Transkriptionsaktivierung. Rheb enthält an den Positionen 15 und 16 Mutationen, die das Protein für GTPasen unzugänglich machen. Daher ist zu vermuten, daß das Protein ständig in seiner aktivierten Form vorliegt und somit dauerhaft die Raf-1-Bindungsstellen blockieren kann. Rheb unterliegt, wie andere Ras-Proteine auch, aufgrund seines terminalen CAAX-Motivs einer posttranslationalen Isoprenylierung. Durch die Addition eines Carbon-Isoprenoids (15-Carbon-Farnesyl oder 20-Carbon-Geranylgeranyl) wird das Molekül hydrophob und kann so mit der Plasmamembran assoziieren. Rheb wird farnesyliert, während Krev-1 durch eine Geranylgeranyl-Gruppe modifiziert wird. Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, daß Rheb und Ras mit der inneren Plasmamembran assoziiert sind, während Krev-1 den intrazellulären Kompartimenten von Golgi-Apparat und endoplasmatischem Retikulum zugeordnet werden kann. Clark et al. (1997) konnten durch ihre Untersuchungen dokumentieren, daß Rheb, ebenso wie Krev-1, die Ras-Funktion antagonisiert, in seinem zellulären Verteilungsmuster jedoch dem Ras-Protein ähnelt.

Das Vorliegen der Rheb-cDNA in einer Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbank zeigt, daß das Gen zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion aktiv war und dementsprechend als mRNA vorlag. Es ist daher zu vermuten, daß das Rheb-Protein auch in Brustkrebszellen bestimmte Aufgaben übernimmt. Die von Clark et al. beschriebene Ras-Inhibition in Fibroblasten muß nicht zwangsläufig ebenfalls in Mammakarzinomzellen vorliegen. Auch der Ras-Antagonist Krev-1 beispielsweise induziert in Phäochromozytomzellen ein beschleunigtes Wachstum (Clark et al., 1997). Die Rolle des Rheb-Gens ist zudem von Interesse, da für Ras bereits eindeutig eine Beteiligung an der Brustkrebsentstehung nachgewiesen wurde.

### 5.3 Expressionsanalysen des Rheb-Gens in Mammakarzinom- und normalem Brustgewebe

Die Assoziation einer Ras-Überexpression mit dem fortschreitenden Wachstum von Mammakarzinomen konnte bereits in vielen Untersuchungen demonstriert werden. So zeigen 67% der Tumoren eine zwei- bis vierfache Überexpression des normalen Ras-Gens. Onkogen mutiertes Ras konnte nur in 6,5% der Mammakarzinome nachgewiesen werden (Miyakis et al., 1998). Auch andere Analysen zeigen, daß die Wirkung von Ras in der Entwicklung von Brustkrebs hauptsächlich auf einer Überexpression des normalen Ras-Proteins beruht und nur wenige Tumoren onkogen mutiertes Ras aufweisen (Clark & Der, 1995, Rochlitz et al., 1989). Eine vermehrte Ras-Protein-Expression korreliert mit invasivem Wachstumsverhalten, welches durch Infiltration in Fettgewebe und Lymphgefäße gekennzeichnet ist (Czerniak et al., 1989, Moon et al., 2000, Smith et al., 2000). Durch das vermehrte Eindringen in Lymphgefäße sind Tumoren, welche eine Ras-Überexpression zeigen, zudem häufig mit Lymphknotenmetastasen vergesellschaftet. Weiterhin konnte eine Beziehung zwischen vermehrter Ras-Expression und der Tumorgroße nachgewiesen werden (Lundy et al., 1986). Nishimura et al. (1991) zeigten, daß schlecht differenzierte, skirrhöse Karzinome einen höheren Ras-Proteingehalt aufweisen, als besser differenzierte, tubulo-papilläre Karzinome.

Um zu evaluieren, ob auch das Ras-Homolog Rheb in Mammakarzinomen einer veränderten Expression unterliegt und somit zur Tumorgenese beiträgt, wurden Genexpressionsanalysen mit Rheb-spezifischen Primern durchgeführt.

Das Rheb-Gen konnte mittels RT-PCR sowohl in einer Mammakarzinom- als auch in einer Brustepithelzelllinie nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse ließen sich auch auf cDNA aus normalem Brustgewebe sowie einem Mammakarzinom übertragen. Hiermit wurde verdeutlicht, daß das Rheb-Gen nicht tumorspezifisch ist, sondern auch in Normalgewebe vorkommt. Aufgrund der Tatsache, daß Rheb in allen bislang untersuchten Normalgeweben detektiert wurde, ist dieses Ergebnis nicht überraschend. Die qualitativen Rheb-Gen-Analysen (Abb. 4.5.1.1 + 4.5.1.2) ließen keinen Rückschluß auf die tatsächliche Menge an Rheb-Genkopien in Tumor- und Normalgewebe zu. Um die Genexpression in normalem Brustepithel mit derjenigen in Mammakarzinomen zu vergleichen, wurde eine real time PCR für das Rheb-Gen auf dem LightCycler™ etabliert. Mit dieser PCR-Methode war eine genaue Quantifizierung der Rheb-Genexpression möglich.

Es zeigte sich, daß das Rheb-Gen in allen untersuchten Mammakarzinomen im Vergleich zur Normalgewebeprobe unterexprimiert ist (Tabellen 4.5.2.4.1 + Abb. 4.5.2.4.2). Es lassen sich drei Gruppen unterscheiden, die jeweils eine gering (Ma-Ca 3 + 6), mittelgradig (Ma-Ca 1 + 4) oder stark (Ma-Ca 2 + 5) verminderte Expression aufweisen. Die Unterexpression des Rheb-Gens stellt aufgrund der vorliegenden Daten zur Überexpression des Ras-Gens in Mammakarzinomen zunächst ein unerwartetes Ergebnis dar. Die Ähnlichkeit mit Ras und die Tatsache, daß Rheb zwei Mutationen enthält, die Ras onkogen transformierende Eigenschaften verleihen, deuten eher darauf hin, daß auch Rheb zur Transformation sowie zum aberranten Zellwachstum beitragen könnte. In diesem Fall wäre jedoch eine Überexpression, keines-

falls aber eine zum Teil stark verminderte Expression anzunehmen. Die Unterexpression des Rheb-Gens läßt eher eine Funktion als Tumor-Suppressor-Gen vermuten. Diese Hypothese wird durch die Untersuchungen von Clark et al. (1997) unterstützt, welche dem Rheb-Gen eine Krev-ähnliche, Ras-antagonistische Wirkung zuordnen. Da invasives Wachstum und das Auftreten von Lymphknotenmetastasen mit einer Ras-Überexpression korreliert sind, liegt der Schluß nahe, daß diese Überexpression in frühen Tumorstadien von Rheb durch die Blockade des Ras-Effektors Raf-1 neutralisiert werden könnte. Kommt es mit dem Fortschreiten der Erkrankung zu einer Unterexpression des inhibierenden Rheb-Proteins, so überwiegt die Ras-Wirkung und es entwickelt sich ein invasiver Tumortyp. Ebenso könnte die nicht mehr vorhandene Neutralisierung der Ras-Effekte die bereits für eine Ras-Überexpression nachgewiesene schlechtere Zelldifferenzierung sowie ungehemmtes Zellwachstum bedingen.

Die Umkehrung der transformierenden und tumorinduzierenden Ras-Effekte durch Krev-1 wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben. Die gleichzeitige Expression von Ras und Krev-1 in kultivierten Tumorzellen führt zu einem weniger transformierten Phänotyp mit retardiertem Wachstumsverhalten und vermindertem Verlust der Zelladhäsion (Leach et al., 1998). Werden mit Ras und Krev transfezierte Tumorzellen in Mäuse inokuliert, so kommt es zu einem verspäteten Tumorwachstum. Zudem ist die Tumorgröße im Vergleich zu Tieren, die Ras-transfezierte Zellen erhielten, deutlich vermindert (Caamano et al., 1992, Burney et al., 1994). Die Tumor-Suppressor-Aktivität des Krev-Gens konnte bis jetzt für Pankreas-, Lungen- und Prostatakarzinome nachgewiesen werden. Auch das Rheb-Gen zeigt in Zellkultur eine Ras-antagonistische Wirkung und führt zu einer Reversion der Transformation. Es wäre daher möglich, daß Rheb, ebenso wie Krev, im Tumorgeschehen eine Suppressorfunktion übernimmt, die durch die Inhibierung des Ras-Signaltransduktionsweges bedingt ist. Diese These wird durch die Tatsache unterstützt, daß das Rheb-Gen in allen untersuchten Mammakarzinomen im Vergleich zu normalem Brustepithel unterexprimiert ist.

#### **5.4 Etablierung eines Modellsystems zur Detektion des Zielantigens eines auf filamentösen Phagen exprimierten scFv in einer $\lambda$ -Phagen-cDNA-Expressionsbank**

Neben dem SEREX-System bietet die phage display Technik eine weitere Möglichkeit, tumorspezifische Antikörperstrukturen und Antigene zu definieren. Das phage display Verfahren basiert auf der Selektion großer Antikörperbanken auf Antigenen oder auf Tumorzellen. Bei den Antikörperstrukturen handelt es sich zumeist um scFvs, welche als p3-Fusionsprotein auf der Oberfläche filamentöser Phagen exprimiert werden. Durch mehrere Selektionsrunden einer phage display Antikörperbibliothek auf Tumorzellen können tumorspezifische Binder angereichert werden. Eine Selektion besteht aus der Bindung spezifischer, scFv-tragender Phagen an die Tumorzellen, wegwaschen unspezifischer Phagen und Elution der Binder mit anschließender Vermehrung. Auf diese Weise entsteht nach mehreren Selektionsrunden eine Phagenpopulation, die im Idealfall ein bestimmtes, tumorspezifisches scFv exprimiert. Nach

der Isolierung eines solchen scFv werden dessen Bindungseigenschaften durch FACS, ELISA und immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten genau charakterisiert, um unspezifische Bindungen an andere Gewebe auszuschließen.

Da die mit dem phage display System generierten Antikörperstrukturen mehrheitlich in der Immuntherapie Verwendung finden, sind Informationen über das zugehörige Antigen von großer Bedeutung. So sollte das Antigen nur auf malignen Zellen und nicht in anderen Geweben exprimiert werden. Um eine Wirkungsminderung zu vermeiden, sollte das Antigen keinem Shedding-Prozeß unterliegen. Zudem ist es für die Konstruktion entsprechender Immuntherapeutika wichtig, ob das Antigen internalisierende Eigenschaften aufweist, welche z.B. für die Wirkung von Immuntoxinen eine notwendige Voraussetzung darstellen. Handelt es sich um einen nicht internalisierenden Rezeptor, kann die Herstellung eines bispezifischen Antikörpers in Erwägung gezogen werden.

Durch die Isolierung der DNA-Sequenz des Zielantigens könnte durch einen Homologievergleich ermittelt werden, ob es sich um ein bereits bekanntes oder um ein neues Antigen handelt. Bindet der tumorspezifische Antikörper an ein bekanntes Antigen, stehen alle Informationen, die für die Konstruktion von Immuntherapeutika benötigt werden, zur Verfügung.

Vor dem Beginn dieser Arbeit waren keine Methoden bekannt, die es ermöglichen, das Zielantigen eines mittels phage display isolierten, tumorspezifischen scFv zu ermitteln.  $\lambda$ -Phagen-cDNA-Expressionsbanken bieten eine gut etablierte Möglichkeit, mehrere hunderttausend Klone pro Experiment auf das Vorliegen eines bestimmten Antigens zu untersuchen. Dieses Verfahren wird erfolgreich und routinemäßig für die Identifizierung der genauen Antigensequenz monoklonaler Antikörper eingesetzt. Nach der Isolierung eines positiven Klons kann das Insert sequenziert werden und die Nukleotid- sowie die Aminosäuresequenz des Antigens stehen zur Verfügung.

Ziel des zweiten Teils dieser Dissertation war es, das Screening von  $\lambda$ -Phagen-cDNA-Expressionsbanken mit Antikörpern auf das Screening mit scFv-tragenden filamentösen Phagen zu übertragen. Als Modellsystem wurde das hauptsächlich auf Lymphomen exprimierte CD30-Antigen und der anti-CD30 Antikörper Ki-4 verwendet. Beide Strukturen standen im Labor zur Verfügung und wiesen zudem den Vorteil gut untersuchter Bindungskinetiken auf. Sowohl der monoklonale Ki-4 als auch das abgeleitete scFv weisen ausgezeichnete Bindungseigenschaften auf (Klimka et al., 1999). Um die Funktionalität des neuen Screening-Systems zu demonstrieren, sollte gezeigt werden, daß Ki-4-scFv-Phagen in Tausenden irrelevanter  $\lambda$ -Phagen-Klone spezifisch das CD30-Antigen erkennen. Die irrelevanten, CD30-negativen Klone repräsentierte die im ersten Teil der Dissertation angefertigte Mammakarzinom-spezifische cDNA-Bank. Diese wurde im Verhältnis 1:1 und 1:200 mit dem CD30-Antigen produzierenden  $\lambda$ -Phagen-Klon gemischt. Die Plaques wurden auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit Ki-4-scFv exprimierenden filamentösen Phagen sowie mit dem monoklonalen Ki-4 als Positivkontrolle gescreent.

Das Screening von cDNA-Expressionsbanken ist, sofern kein hochaufgereinigter monoklonaler Antikörper eingesetzt wird, oftmals mit der unspezifischen Färbung aller auf Nitrozellulose übertragenen Plaques verbunden. Diese „Hintergrund-Plaques“ können die Identifi-

zierung positiver Klone erschweren. Daher ist z.B. eine erfolgreiche Anwendung des SEREX-Systems abhängig von der intensiven Absättigung des Serums gegen Coliproteine.

Auch die Selektion von scFv-tragenden filamentösen Phagen auf Antigen oder ganzen Zellen ist mit einem hohen unspezifischen Bindungsverhalten der Phagen verbunden. Die filamentösen Phagen binden an unterschiedlichste Materialien wie Kunststoff, Glas oder auch an Proteine des Zellkulturmediums. So erfordert eine Anreicherung spezifisch bindender Phagen über das phage display System intensive Waschschriffe, um unspezifische Binder zu entfernen. Es war daher anzunehmen, daß auch das Screening einer cDNA-Expressionbank, die Tausende unterschiedlicher Proteine enthält, mit einer starken, unspezifische Bindung der filamentösen Phagen einhergeht. Dies konnte durch mehrere Vorversuche bestätigt werden. Auch Hoogenboom et al. (1998) erachten den durch nicht spezifische Phagen bedingten Hintergrund als das größte Problem bei der Selektion filamentöser Phagen auf Nitrozellulosegebundenem Antigen. Die effektive Kombination des Screenings von  $\lambda$ -Phagen-cDNA-Expressionsbanken und der phage display Technik ist demnach davon abhängig, ob es gelingt, die unspezifische Hintergrundfärbung irrelevanter Plaques so gering zu halten, daß positive Klone identifiziert werden können.

Um nicht spezifische Bindungsstellen abzublocken, wurden die scFv-Phagen zunächst eine Stunde mit 2% Milchpulver abgesättigt. Da geringere Konzentrationen an filamentösen Phagen auch einen weniger starken Hintergrund verursachen, wurden unterschiedliche Konzentrationen pro Blot eingesetzt. Anhand mehrerer Titerbestimmungen konnte die durchschnittliche Phagenmenge in einem Milliliter phage rescue auf  $5 \times 10^{13}$  festgelegt werden. Nach der Inkubation mit den Filtern wurden diese intensiv eine Stunde lang gewaschen, um möglichst viele unspezifische Binder zu entfernen. Die Ergebnisse zeigen, daß trotz Blockierungsreaktion und eines intensiven Waschschriffes bei hohen Phagenkonzentrationen von  $2,5 \times 10^{12}$  (50  $\mu$ l rescue) und  $5 \times 10^{12}$  (100  $\mu$ l rescue) eine Hintergrundfärbung auftritt (Tabellen 4.6.2.1 + 2). Diese ist bei einer 1:200-Mischung der cDNA-Bibliothek deutlich stärker ausgeprägt. Dies kann durch die Tatsache erklärt werden, daß in einer 1:1-Mischung sehr viel mehr Zielantigen der filamentösen Phagen vorhanden ist. Daher binden mehr Phagen spezifisch an das CD30-Antigen und haben nicht mehr die Möglichkeit, unspezifisch zu binden. Die unspezifische Bindung beruht nicht auf den exprimierten scFvs, sondern wird durch die Phagen selbst verursacht (Mutuberria et al., 1999). In der 1:200-Verdünnung waren lediglich ca. 20 CD30-Antigen-bildende Klone vorhanden, so daß nur der geringste Teil der scFv-tragenden Phagen spezifisch binden konnte. Aufgrund des sehr viel stärkeren Hintergrundes waren positive Klone schlechter zu identifizieren und nicht so deutlich gefärbt wie in der 1:1-Verdünnung (Abb. 4.6.2.2 + 3). Da durch den monoklonalen Ki-4 22 positive Plaques detektiert wurden, das Screening mit 50 bzw. 100  $\mu$ l Ki-4-scFv-Phagen jedoch nur 10 bzw. 8 positive Klone ergab, ist zu vermuten, daß durch das scFv nicht alle vorhandenen CD30-exprimierenden Klone nachgewiesen wurden. Auch dies könnte eine Folge der starken Färbung des gesamten Filters sein, der wahrscheinlich das Erkennen positiver Reaktionen mancher Phagen im Vergleich zu den Hintergrund-Plaques verhindert.

Sowohl in einer 1:1- als auch in einer 1:200-Mischung aus CD30- und irrelevanten  $\lambda$ -Phagen waren mindestens 50  $\mu$ l phage rescue nötig, um positive Klone zu detektieren.

Es fällt auf, daß die höchsten M13-Phagen Konzentrationen von 50  $\mu$ l ( $2,5 \times 10^{12}$ ) und 100  $\mu$ l ( $5 \times 10^{12}$ ) rescue unabhängig von der Menge des Zielantigens auf den Blots eine Zunahme der unspezifischen Hintergrundbindung nach sich zogen. 10  $\mu$ l phage rescue ( $5 \times 10^{11}$  pfu) führte nach Screening einer 1:1- wie auch einer 1:200-Mischung nicht bzw. nur zu einer geringen unspezifischen Färbung.

Mit den hier präsentierten Arbeiten konnte gezeigt werden, daß eine Kombination des Screenings von  $\lambda$ -Phagen-cDNA-Expressionsbanken mit der phage display Technik zur spezifischen Detektion des CD30-Antigens durch anti-CD30 Ki-4-scFv-Phagen führt. Hiermit wurde zum ersten Mal gezeigt, daß ein auf filamentösen Phagen exprimiertes Antikörperfragment sein zugehöriges Antigen in Tausenden irrelevanter Phagenplaques erkennt. Diese Bindung wurde durch einen anti-M13-Antikörper und einen AP-gekoppelten Sekundärantikörper über eine Farbreaktion nachgewiesen.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit etablierte Methode soll zur Detektion neuer Tumorantigene durch zuvor auf Tumorzellen selektionierten scFv-tragenden Phagen eingesetzt werden. Die cDNA-Expressionsbank wird hierbei aus denselben Zellen erstellt, die auch für die Selektion verwendet werden. Auch hier muß, wie schon bei der Besprechung des modifizierten SEREX-Systems darauf hingewiesen werden, daß in einen  $\lambda$ -Phagen-Vektor kloniert werden sollte, der das Insert in allen drei Leserahmen exprimiert. Nur so kann gewährleistet werden, daß alle in der Bank vorhandenen Antigene auch korrekt translatiert werden.

Da das gesuchte Antigen im ungünstigen Fall nur einmal in Tausenden von  $\lambda$ -Phagen-Klonen vorhanden ist, muß das Screening noch soweit optimiert werden, daß mit Sicherheit auch dieser eine positive Plaque identifiziert werden kann. Hierfür ist eine weitere Reduktion des unspezifischen Hintergrundes von entscheidender Bedeutung. Da die Qualität des phage rescues von Mal zu Mal unterschiedlich ist, schwankt auch der Titer der filamentösen Phagen. In 100  $\mu$ l rescue ist also nicht immer die gleiche Menge scFv-tragender filamentöser Phagen vorhanden. Daher muß ein genügend großes Volumen gewählt werden, mit dem, unabhängig von der Qualität des rescues, auf den Blots Antigen nachgewiesen werden kann. Die Ergebnisse des Modellsystems zeigen, daß mindestens 50  $\mu$ l erforderlich sind. Um eine drastische Reduzierung der nicht spezifisch bindenden Phagen zu erzielen, werden zukünftig weitere Untersuchungen durchgeführt.

Für die Eliminierung unspezifischer Binder stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Die bisher in den Screenings eingesetzten phage rescues wurden aus organisatorischen Gründen einen Tag vor ihrer Verwendung fertiggestellt und über Nacht im Kühlschrank belassen. Es ist bekannt, daß nur etwa 10% der M13-Phagen eines rescues überhaupt scFv exprimieren und diese tragen zumeist auch nur eine Kopie des Antikörperfragmentes (Griffiths & Duncan, 1998). Die Zahl der spezifischen Binder ist also sehr begrenzt. Durch längere Aufbewahrung im Kühlschrank kann es zur proteolytischen Abspaltung der scFvs durch kontaminierende Proteasen kommen (CESAME Manual, 1996), so daß der Anteil spezifischer Phagen weiter reduziert wird. Es wird daher empfohlen, das rescue innerhalb einer Woche zu verwenden.

Inwieweit eine 24-stündige Lagerung bei 4°C bereits zur Proteolyse führt, ist nicht bekannt. Es ist durchaus möglich, daß es auch während dieser kurzen Aufbewahrungszeit zur Abspaltung der scFvs kommt. Um den Anteil scFv-tragender Phagen und damit die Menge spezifischer Binder zu erhöhen, könnte mit frischen filamentösen Phagen gescreent werden. Enthält dieses rescue eine höhere Konzentration antigenspezifischer Phagen, so könnte das pro Blot einzusetzende Volumen und damit auch der unspezifische Hintergrund verringert werden.

Weiterhin kann versucht werden, nicht spezifische Binder vor dem Screening durch den Einsatz anderer Substanzen (BSA, Gelatine, Serum) effizienter abzublocken.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, die unspezifische Bindung an die Filter während der Inkubationsphase zu minimieren. Zu diesem Zweck kann die Inkubationsdauer (bisher 1,5 Std.) verkürzt werden. Um unspezifische Binder zu entfernen, könnte die Waschstringenz durch eine höhere Detergenzienkonzentration (bisher 0,05% Tween) oder die Verwendung eines anderen Detergenz (z.B. Nonidet-40) verbessert werden. Die Selektion von phage display Bibliotheken an Zellen hat gezeigt, daß auch der Einsatz von Waschpuffern mit niedrigem pH-Wert (pH 3) zu einer effizienteren Eliminierung unspezifischer Phagen führt. Ein anderer Weg, den Hintergrund so gering wie möglich zu halten, wäre sicher auch, die nicht spezifischen M13-Phagen nach kurzer Inkubation mit den Filtern (10-30 min.) sofort durch Zugabe eines blockierenden Agens zu entfernen. Hierfür käme z.B. FCS in Betracht, da filamentöse Phagen eine hohe Affinität zu Serumproteinen aufweisen (Watters et al., 1997, Hoogenboom et al., 1999).

Gegen Ende der praktischen Arbeiten zu dieser Promotion wurden zwei Verfahren veröffentlicht, die die Detektion neuer Tumorantigene als Zielstrukturen für die Immuntherapie zum Inhalt haben. Beide Methoden beruhen ebenfalls auf einem Screening von cDNA-Expressionsbanken und werden im folgenden vergleichend mit der von uns entwickelten Technik diskutiert.

Ridgway et al. (1999) präsentieren eine Strategie, die, ebenso wie die im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelte Technik, auf der Bestimmung der Zielantigene phage display selektionierter scFvs basiert. Die Forscher isolierten ein Lungenkarzinom-spezifisches scFv, klonierten die zugehörige cDNA-Expressionsbank in einen eukaryotischen Expressionsvektor und elektroporierten die DNA in DHB10-Zellen. Diese wurden in 20 Pools aufgeteilt und die Plasmid-DNA jedes Pools in COS7-Zellen transfeziert. Diese cDNA-Bibliothek wurde mit dem zuvor an Lungenkarzinomzellen selektionierten scFv gescreent. Verwendet wurde jedoch nicht das auf filamentösen Phagen exprimierte Antikörperfragment, sondern lösliches, aufgereinigtes scFv. Das Screening entsprach methodisch einer Selektion und beinhaltete die Bindung spezifischer single chains sowie Wegwaschen unspezifischer Binder. Die COS-Zellen wurden mit anti-Maus Immunglobulin beschichteten Platten inkubiert, so daß scFv-tragende Zellen gebunden wurden. Die DNA dieser Klone wurde für jede neue Selektionsrunde extrahiert, amplifiziert und wieder elektroporiert. Nach drei Selektionsrunden konnte ein spezifisch bindender cDNA-Pool identifiziert werden. Um die COS-Zelle zu bestimmen, welche das Zielantigen exprimiert, waren weitere, aufwendige Untersuchungen notwendig. Die DNA der

COS-Zellen wurde präpariert und in *E.coli* TG-1 überführt. Einzelne Bakterienkolonien wurden in 96-Well-Platten vermehrt. Plasmid-DNA von je 10-20 Kolonien wurde wiederum in COS7-Zellen transfeziert und diese mit scFv gescreent. Bakterien-Pools, die im zugehörigen COS-Zell-Screening eine Bindung zeigten, wurden in einzelne Klone aufgeteilt und diese auf positive Reaktionen untersucht. Schließlich wurde ein Klon isoliert, der durch das scFv spezifisch detektiert wurde. Durch Sequenzierung des Inserts konnte das Antigen als „decay-accelerating factor“ (DAF, CD55) identifiziert werden. Die Eigenschaften dieses bereits bekannten Antigens ließen auch eine Beurteilung seiner Eignung als Zielantigen in der Immuntherapie zu. Da CD55 auf vielen normalen Zellen einschließlich Lungengewebe vorkommt, wurde es von den Autoren als für eine Immuntherapie schlecht geeignet eingestuft.

Die Beschreibung des Verfahrens macht deutlich, daß es sich um eine sehr komplizierte, zeitintensive Methode handelt, die im normalen Labormaßstab routinemäßig kaum durchführbar ist. Um einen positiven Klon zu isolieren sind unzählige Selektionsrunden erforderlich, die den ständigen Wechsel zwischen der Klonierung in Bakterien und der Transfektion in eukaryotische Zellen beinhalten. Zudem erfolgt das Screening nicht mit auf Phagen exprimierten scFvs, die noch recht einfach hergestellt werden können, sondern mit löslichen scFvs. Dies erfordert eine aufwendige Reinigung der Antikörperfragmente über eine Affinitätsäule mit anschließender Dialyse zur Entfernung des Imidazols. Die von uns entwickelte Technik hat den Vorteil, daß sie weniger umständliche Abläufe beinhaltet. Es wird nur eine cDNA-Bank für das Screening benötigt und es sind lediglich 3-4 Screenings erforderlich, um einen positiven Klon zu vereinzeln. Damit entfallen viele Screening-Runden sowie die Notwendigkeit neben Bakterien und Phagen auch noch zwei verschiedene Zelllinien in die Technik miteinbeziehen zu müssen. Weiterhin kann auf die Aufreinigung der scFvs verzichtet werden. Die von Ridgway et al. (1999) präsentierte Methode bietet den Vorteil, daß durch die Verwendung von scFvs der durch unspezifische filamentöse Phagen bedingte Hintergrund nicht vorhanden ist. Die zuvor beschriebene Technik wurde von der Firma Genentech entwickelt. Dies zeigt, daß die Etablierung von Strategien zur Identifizierung des Zielantigens eines tumorspezifischen scFvs offensichtlich auch für große Biotechnologiefirmen von Interesse ist.

Ende 1999 wurde ein weiterer molekularbiologischer Ansatz zur Isolierung tumorspezifischer Antigene veröffentlicht. Dieses Verfahren beinhaltet das Screening von an Kunststoffröhrchen gebundenen Patientenserum mit allogenen, tumorspezifischen phage display-cDNA-Expressionsbanken (Hufton et al., 1999). Die Autoren konnten die Effizienz dieser Methode ebenfalls in einem Modellsystem demonstrieren. Zu diesem Zweck wurde eine Colonkarzinom-spezifische cDNA-Expressionsbank in den  $\lambda$ -Phagen Vektor ZAP® kloniert. Es erfolgte eine Excision der gesamten Bibliothek mit nachfolgender DNA-Präparation und Verdau der Inserts. Die cDNA-Inserts wurden in drei Phagmidvektoren ligiert, welche das Insert in je einem der drei Leseraster exprimieren. Hiermit sollte gewährleistet werden, daß jedes cDNA-Fragment in allen drei Leserastern translatiert wird. Es wurden also drei phage display cDNA-Bibliotheken mit unterschiedlichen Leserastern generiert. Die klonierten cDNA-Inserts wurden als Fusionsprotein mit dem „minor coat“-Protein pVI auf der Phagenoberfläche exprimiert. Die tumorspezifischen cDNA-Banken sollten auf einem monoklonalen

Antikörper gegen  $\beta$ 2-Mikroglobulin und auf einem polyklonalen anti-human IgG-Serum gescreent werden. Die Antikörper wurden an Kunststoffröhrchen gebunden und Mischungen gleicher Teile der drei Banken selektioniert. Nach zwei Selektionsrunden detektierten 91% der Phagenklone den anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin Antikörper im ELISA. Nach Selektion auf dem polyklonalen anti-human IgG-Serum zeigten sich 30% spezifische Klone. Warum hier keine zweite Selektion durchgeführt wurde, bleibt unklar.

Die von Hufton et al. (1999) dargestellte Strategie verbindet die phage display Technik mit dem SEREX-System. Auch hier sollen also durch Kombination des phage display Systems mit einer weiteren gentechnologischen Methode neue Antigene isoliert werden. Das in dieser Dissertation ausgearbeitete System basiert, ebenso wie die Arbeiten von Genentech, auf dem Screening von tumorspezifischen cDNA-Expressionbanken mit zuvor mittels phage display auf Tumorzellen selektionierten Antikörperstrukturen. Es wird also mit Antikörpern auf immobilisierten Antigenen gescreent. Hufton et al. (1999) klonieren die cDNA-Bibliothek in filamentöse Phagen und selektionieren diese auf Antikörpern. Daher wird bei diesem Verfahren mit der cDNA-Expressionsbank auf immobilisierten Antikörpern gescreent.

Laut Aussage der Autoren soll das von ihnen etablierte System für die Testung von Patientenseren in Tumorkarzinom-Studien eingesetzt werden. Dementsprechend sollen unterschiedliche Patientenseren mit tumorspezifischen cDNA-Banken gescreent werden. Als Ziel wird die Definition von Antigenen angegeben, welche für eine Tumorart und nicht nur für den Tumor eines bestimmten Patienten spezifisch sind. Ob dies mit der von den Verfassern als „phage display von cDNA-Repertoires“ bezeichneten Methode möglich sein wird, ist jedoch fraglich. Betrachtet man den Arbeitsaufwand unter der Prämisse der routinemäßigen Durchführbarkeit, so ist der Ansatz von Hufton et al. mit dem in dieser Arbeit präsentierten Screening von  $\lambda$ -Phagen-Bibliotheken vergleichbar. Er weist jedoch mehr Schwachstellen auf, die die erfolgreiche Identifizierung von Antigenen in Frage stellen. Hier ist sicherlich die zweimalige Klonierung der cDNA-Bank zu nennen. Bereits während der Excision aus den  $\lambda$ -Phagen kommt es zu Verlusten von cDNA-Fragmenten und auch bei der neuerlichen Klonierung in die drei verschiedenen Phagemidvektoren werden wohl kaum alle Inserts ligiert, so daß die Qualität der cDNA-Bibliothek leidet. Bei der Klonierung in einen  $\lambda$ -Phagen-Vektor, der jedes Insert in allen drei Leserahmen (TripleEx, Clontech) exprimiert, ist nur eine Ligation notwendig. Die Angabe, daß nach der Selektion der phage display cDNA-Bank auf Antikörpern 40 (!) Waschschrte durchgeführt wurden, deutet darauf hin, daß auch hier Schwierigkeiten mit der unspezifischen Bindung der filamentösen Phagen vorliegen.

Im Modellsystem wurde eine Colonkarzinom-spezifische Bank auf einem monoklonalen Antikörper gegen  $\beta$ 2-Mikroglobulin selektioniert. Die Anreicherung von  $\beta$ 2-Mikroglobulin-cDNA-tragenden Phagen ist nicht weiter verwunderlich, da es sich um ein „housekeeping“ Gen handelt, das in jeder Zelle exprimiert wird. Daher wird es auch in einer tumorspezifischen-cDNA-Bank in großer Zahl vorliegen. Dieser Versuch entspräche, übertragen auf das hier präsentierte System, dem Screening einer Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Bibliothek mit einem monoklonalen anti-Cytokeratin Antikörper. Cytokeratin wird in den verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien in hohem Maße exprimiert und konnte in einem der ersten Experimente problemlos mit dem entsprechenden Antikörper nachgewiesen werden. Die

Selektion der Colonkarzinombank an einem polyklonalen anti-human IgG-Serum erbrachte in der ersten Runde 30% spezifische cDNA-Klone. Immunglobulin-Fragmente sind in vielen Tumor-cDNA-Banken vorhanden und gehen auf die Infiltration des Tumors mit B-Zellen zurück. Nichtsdestotrotz liegen sie nicht in so großer Menge vor, wie  $\beta$ 2-Mikroglobulin-DNA. Die Tatsache, daß keine Ergebnisse für eine zweite Selektion präsentiert werden, läßt vermuten, daß keine weitere Anreicherung erzielt werden konnte.

Ob mit einer Selektion von phage display cDNA-Banken auf Patientenserum tumorspezifische, antigenträgende Phagen isoliert werden können, bleibt abzuwarten, denn die von Hufton et al. (1999) entwickelte Strategie impliziert die gleichen Probleme wie das SEREX-System. Die Patientenserum, auch wenn sie von vakzinierten Patienten stammen, enthalten Millionen irrelevanter Antikörper und nur einen Bruchteil tumorspezifischer Immunglobuline. Es dürfte sich als sehr schwierig erweisen, durch Selektion auf diesen wenigen Antikörpern spezifische cDNA-Klone anzureichern. Zudem umfaßt das Serum Antikörper gegen sämtliche, also auch gegen zytoplasmatische Tumorantigene. Von Interesse für eine Immuntherapie und auch für die von den Autoren angestrebte Tumorstimmung sind jedoch vornehmlich Oberflächenantigene. Durch ein Screening mit zuvor an Tumorzellen selektionierten, monoklonalen Antikörperstrukturen können diese Nachteile vermieden werden. Bei der Selektion auf intakten Tumorzellen sind nur Oberflächenantigene zugänglich, so daß die generierten Antikörper mit Sicherheit gegen diese, für eine Immuntherapie relevanten Antigene gerichtet sind. Darüber hinaus ist die Chance, mit einem monoklonalen Antikörper in einer cDNA-Bank das zugehörige Antigen zu detektieren, sehr viel höher, als mit Patientenserum, das nur geringe Mengen des Antikörpers beinhaltet. Daher ist die in der vorliegenden Dissertation dargestellte Technik sowie das von Ridgway et al. (1999) entwickelte Verfahren zur Detektion neuer, tumorspezifischer Antigene besser geeignet.

Das von Genentech gezeigte Screening ist bereits etabliert und wurde zudem schon erfolgreich in der Bestimmung des Zielantigens eines tumorspezifischen scFv eingesetzt. Die Funktionalität des in dieser Promotion dokumentierten Verfahrens konnte erst im Modellsystem bewiesen werden. Ziel der folgenden Forschungsarbeiten ist es, diese Technik soweit zu verbessern, daß tatsächlich mit auf Phagen exprimierten, tumorspezifischen scFvs das Zielantigen in einer  $\lambda$ -Phagen-cDNA-Expressionbank bestimmt werden kann. Sollte dies gelingen, so stellt diese Methode sicherlich die weniger komplexe, zeit- und kostensparendere Alternative dar.