

6 Zusammenfassung/Summary

Die Immuntherapie wird zukünftig im Rahmen der Behandlung von Tumorerkrankungen einen immer größeren Stellenwert einnehmen. Es besteht die dringende Notwendigkeit, die konventionelle, mit starken Nebenwirkungen behaftete Chemotherapie durch neue Therapie-konzepte zu ergänzen. Die Immuntherapie nutzt humorale sowie zelluläre Komponenten der Immunabwehr und zeichnet sich durch eine hohe, tumorspezifische Wirkung bei sehr guter Verträglichkeit aus. Intensive Forschungsarbeiten werden auf den Gebieten der Antikörpertherapie sowie der Tumorstimmung durchgeführt. Ergebnisse dieser Bemühungen sind die Zulassungen der ersten beiden Antikörper für den Einsatz in der Krebstherapie. Diese Antikörper finden in der Behandlung von Lymphomen sowie Brustkrebs Anwendung und werden zumeist in Verbindung mit einer Chemotherapie eingesetzt.

Alle immuntherapeutischen Behandlungsstrategien beinhalten als notwendige Voraussetzung die Identifizierung tumorassoziierter Oberflächenantigene. Diese dienen als Ziel für Antikörper oder werden zur Stimulierung des patienteneigenen Immunsystems verwendet. Bisher stehen nur wenige, überdies recht aufwendige Techniken zur Definition tumorspezifischer Antigene zur Verfügung (Detektion mit T-Zellen, SEREX). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zwei Methoden zur Bestimmung tumorspezifischer Antigene entwickelt werden, die auf dem Screening von λ -Phagen-cDNA-Expressionsbanken beruhen.

Zunächst wurde ein modifiziertes SEREX-System zur Detektion membranständiger Antigene etabliert. Aus der RNA zweier Mammakarzinomzelllinien wurde eine cDNA-Expressionsbank in dem λ -Phagen-Expressionsvektor ZAP® II erstellt. Eine Balb/c-Maus wurde mit Membranfraktionen der gleichen Zelllinien immunisiert und der Anstieg des Mammakarzinom-spezifischen IgG-Spiegels im Serum mittels Zellmembran-ELISA dokumentiert. Insgesamt 480.000 Klone der cDNA-Bibliothek wurden mit Mausserum der sechsten Woche nach Immunisierung gescreent. Es wurden ein deutlich sowie ein schwach positiver Plaque detektiert, vereinzelt und die Inserts sequenziert. Das Insert des deutlich positiven Klons befand sich im Einklang mit dem Vektorleserahmen und kodierte für humanes Mitofilin, ein membranständiges Mitochondrien-Protein ohne Bezug zum Tumorgeschehen. Da die für die Immunisierung verwendeten Membranfraktionen auch zytoplasmatische Membranen enthielten und Mitofilin eine hohe Immunogenität besitzt, wurde offensichtlich ein hoher Antikörpertiter gegen dieses Protein induziert, der jedoch höchstwahrscheinlich nicht tumorspezifisch war.

Der schwach positive Klon kodierte für humanes Rheb (Ras Homologue Enriched in Brain), zeigte jedoch keine Übereinstimmung mit dem Vektorleserahmen. Daher kam es zur Bildung eines Nonsens-Proteins, welches von Serumantikörpern als fremd erkannt und somit detektiert wurde. Es lag hiermit keine spezifische Reaktion gegen das Rheb-Protein vor. Da es sich um ein Ras-Homolog handelt, welches zudem onkogene Mutationen aufweist, erhob sich die Frage, ob dieses Gen, obwohl keine Antikörperreaktion vorlag, an der Entstehung von Mammakarzinomen beteiligt ist. Diese Vermutung lag nahe, da eine Überexpression von normalem Ras in Brustkrebstumoren ein invasives Wachstum bedingt. Die Quantifizierung des Rheb-Gens in sechs verschiedenen Mammakarzinomen im Vergleich zu normalem Brust-

gewebe ergab eine Verminderung der Expression in allen untersuchten Tumorgeweben. Diese Unterexpression zeigte sich besonders eindeutig in zwei Tumoren mit einer Reduktion um 74% bzw. um 82,4%. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, daß andere Autoren für Rheb bereits eine Ras-antagonistische Wirkung nachgewiesen haben, kann vermutet werden, daß es sich um ein Tumor-Suppressor-Gen handelt. Durch die Krev-ähnliche Blockade des Ras-Signaltransduktionsweg kommt es wahrscheinlich zu einer Transformations-inhibierenden Wirkung sowie zu einem verlangsamten Tumorwachstum.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine weitere Methode zur Definition tumorspezifischer Antigene entwickelt, welche auf der Detektion des Zielantigens von auf Tumorzellen selektionierten, antikörpertragenden filamentösen Phagen in einer λ -Phagen-cDNA-Expressionsbank basiert. Als Modellsystem diente das hauptsächlich auf Lymphomen exprimierte CD30-Antigen sowie der anti-CD30 Antikörper Ki-4 und das abgeleitete, auf Phagen exprimierte Antikörperfragment (scFv). Es konnte demonstriert werden, daß sowohl in einer 1:1- als auch einer 1:200 Mischung von CD30-positiven und irrelevanten λ -Phagen-Klonen mit $2,5 \times 10^{12}$ sowie 5×10^{12} Ki-4-scFv filamentösen Phagen pro Filter positive Signale generiert wurden. Die CD30-spezifische Bindung konnte durch eine Konkurrenz mit dem Ki-4 mAk belegt werden. Darüber hinaus wurden die Inserts einiger positiver Klone sequenziert. Alle enthielten das CD30-Antigen. Die unspezifische Färbung der Blots durch die filamentösen Phagen war bei der Verwendung von 50 μ l ($2,5 \times 10^{12}$ pfu) bzw. 100 μ l (5×10^{12} pfu) dieser Phagen am größten. Waren nur wenig positive Plaques vorhanden (1:200-Mischung), so kam es zu einer intensiveren Hintergrundbildung. Es zeigte sich auch, daß, verglichen mit der Positivkontrolle des Ki-4 monoklonalen Antikörpers, in der 1:200 Mischung vermutlich nicht alle CD30-positiven Plaques erkannt wurden. Dies ist wahrscheinlich auf die stark erhöhte Hintergrundfärbung zurückzuführen, die eine Differenzierung zwischen positiven und Hintergrundplaques erschwert. Um eine Reduzierung der nicht spezifisch bindenden filamentösen Phagen zu erzielen, werden künftig weitere Untersuchungen durchgeführt. Mit den hier präsentierten Arbeiten konnte erstmalig gezeigt werden, daß ein auf filamentösen Phagen exprimiertes Antikörperfragment sein zugehöriges Antigen in Tausenden irrelevanter λ -Phagenplaques erkennt. Durch die Kombination des Screenings von λ -Phagen-cDNA-Expressionsbanken mit dem phage display System wurde eine neue Methode zur Detektion tumorspezifischer Antigene etabliert und deren Funktionalität im Modellsystem nachgewiesen.

Summary

Immunoscreening of λ phage cDNA expression libraries for the detection of tumor associated antigens

As conventional chemotherapy is associated with severe side effects there is the need to develop new strategies for the treatment of cancer. One possibility to supplement conventional therapy is to use the advantages of immunotherapy. Immunotherapy stimulates both humoral and cellular components of the immune system and shows high tumor specificity without causing serious side effects. A lot of investigations have been carried out to develop anti cancer antibodies as well as tumor vaccines. Two monoclonal antibodies have been approved by the FDA so far.

A prerequisite for the successful application of immunotherapeutics is the discovery of tumor specific antigens which serve as targets for monoclonal antibodies. In the field of cancer vaccination antigens are employed for stimulation of the patients' immune system. Up to now only a few possibilities exist for the detection of tumor specific antigens. These methods implicate complex and time consuming procedures which are difficult to establish (SEREX, T-cell based systems).

The purpose of this work was to develop new strategies for the detection of tumor specific antigens based upon the screening of λ -phage cDNA expression libraries.

First a modified SEREX system was established in order to identify membrane-associated proteins. RNA was isolated from two mammary carcinoma cell lines and a cDNA library was prepared using λ -phage-vector ZAP® II. A Balb/c mouse was immunized with membrane fractions from the same cell lines. A significant increase in specific antibody serum levels was demonstrated by cell membrane ELISA. Screening of 480.000 plaques with serum from mice 6 weeks p.i. yielded one strongly positive and one weakly positive clone. The nucleotide sequence of the strongly positive clone was in register with the junctional λ phage vector sequence and coded for human Mitofilin, a transmembrane protein of the inner mitochondrial membrane. Recombinant Mitofilin protein was found to be highly immunogenic which might be the reason for a high anti-Mitofilin antibody titer in mice immunized with membrane fractions. As Mitofilin is an ubiquitous protein and the amino acid sequence contained no changes that alter protein structure, the immune response can't be considered to be tumor specific.

The second clone which seemed to be weakly positive coded für human Rheb (Ras Homologue Enriched in Brain). As the insert sequence was not in frame with the vector it can be supposed that a nonsense protein is produced which is detected by serum antibodies. Nevertheless reaction against this protein is not specific. As Rheb represents a ras homolog with oncogene mutations it could be of interest if this protein is involved in the development of breast cancer. Quantification of the Rheb gene in six mammary carcinomas in comparison

to normal breast showed that Rheb gene expression was decreased in the carcinomas. Suppression was striking in two tumors with 74% and 82,4% reduction compared with normal breast tissue. As it has already been proven that Rheb antagonizes ras transforming effects it could be speculated that Rheb could serve as a tumor suppressor gene in breast cancer development. Rheb might block the ras signal transduction pathway und inhibit transformation and tumor growth.

The second part of the work included the development of a new strategy to define the target antigen of a previously selected scFv in a λ phage cDNA expression library. To provide the prove of principle an artificial model system was established employing the anti-CD30 scFv Ki-4 generated by phage display technology to detect immobilized recombinant human CD30 receptor mixed in an irrelevant cDNA library. Investigations were carried out to determine the titre of antibody displaying phage providing optimal antigen detection and minimal background staining for different ratios of CD30 receptor- and irrelevant λ phage.

It could be demonstrated that a minimum of $2,5 \times 10^{12}$ scFv expressing phage per blot is required to generate positive signals both in a 1:1 and a 1:200 mix of CD30 positive and irrelevant λ phage. Specificity of Ki-4-scFv phage binding was verified by competition experiments with Ki-4 monoclonal antibody. In addition inserts of four CD30 positive λ phages were sequenced. All clones contained the CD30 antigen insert. Background reaction was increased at 5×10^{12} pfu/filter and $2,5 \times 10^{12}$ pfu/filter but positive signals were still clearly distinguishable from nonreactive clones in the 1:1 mix. Binding Ki-4 scFv phage showed a weaker color reaction compared to Ki-4 moab. In the 1:200 mix the number of positive clones was decreased when compared with staining by Ki-4 monoclonal antibody. This might be due to higher background reaction caused by unspecific binding filamentous phage which makes it difficult to distinguish between positive and background plaques. In order to reduce non specific binding further experiments will be carried out to optimize the system presented in this work.

It was shown for the first time that a scFv expressed on filamentous phage detects its target antigen in thousands of irrelevant λ phage cDNA clones. The method described in this study provides a powerful tool to detect new tumor specific target antigens and their respective antibodies by combining phage display technology with screening of λ phage cDNA libraries.