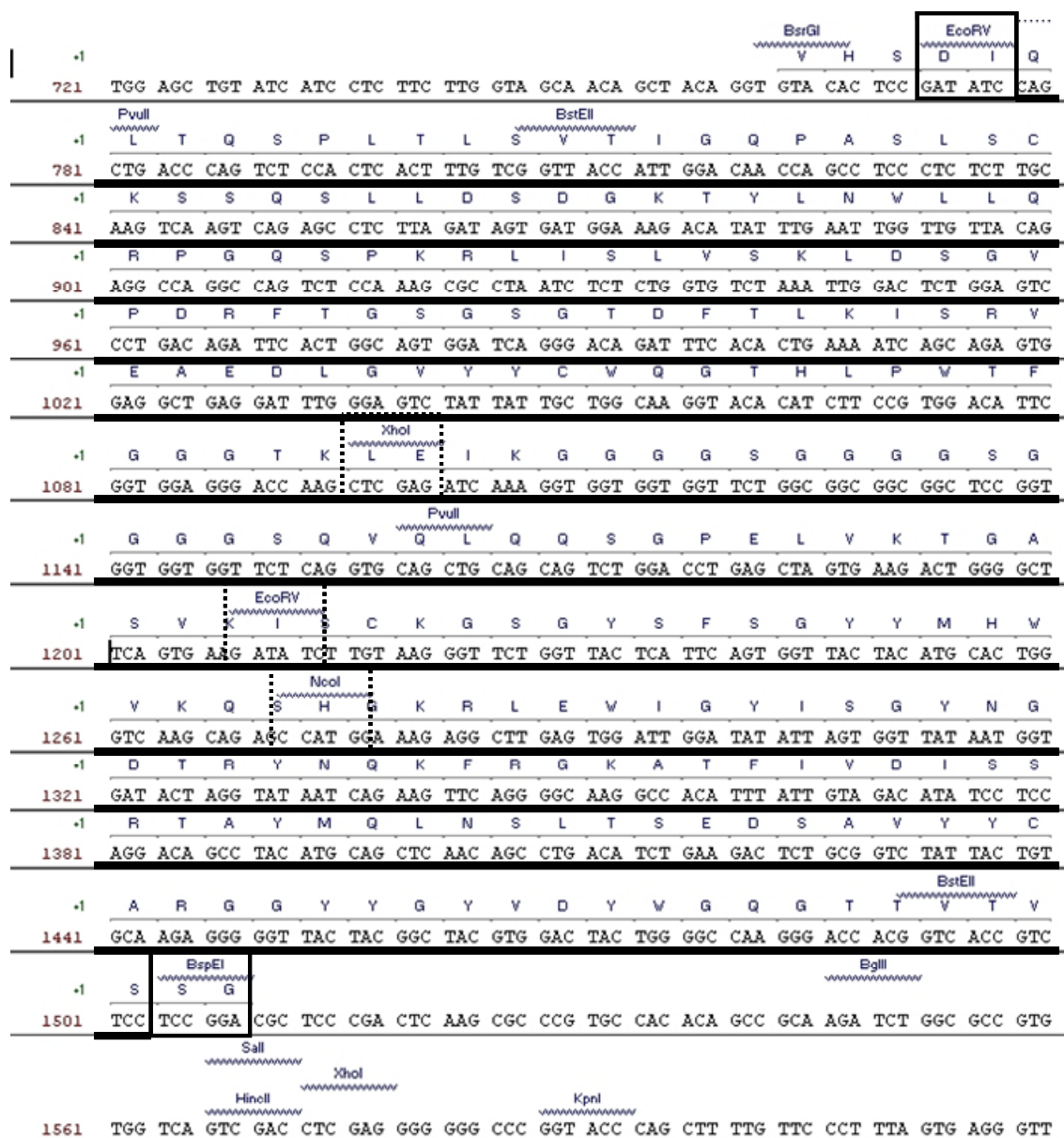


## 7 Appendix I

### 7.1 DNA sequence of scWue-1

Both, the nucleotide and the protein sequence of the single chain Wue-1 domain are shown (underlined). The sequence is flanked by a 5'-*EcoRV* and a 3'-*BspEI* restriction site. Relevant restriction sites are framed and indicated by name. This insert was used as template for Wue-1 amplification by PCR.



## 7.2 Sequence of the pBullet- $\kappa$ -HA-scWue1 expression cassette

Sequence of the scWue1 TCR expression cassette  $\kappa$ -HA-scWue1-Fc-CD28-CD3 $\zeta$  as it was cloned into pBullet. The sequence of pBullet- $\kappa$ -scWue1 lacks the HA-tag. Relevant restriction sites are underlined and indicated by name. **CAPITAL letters, bold print**:  $\kappa$ -leader; **bold print, italic**: HA-tag; *CAPITAL letters, italic*: Wue-1 single chain; **bold print**: Fc-CD28-CD3 $\zeta$  transmembrane signalling domain.

*NcoI* ccATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATGCTAGATatccatatgatgttccca  
***gattatgctCAGCTGACCCAGTCTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATGGACAACCAGCTCCCTCTTTGCAAGTCAAGTCA***  
*GAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAGACATATTTGAATTGGTTGTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCTAATCTCTC*  
*TGGTGTCTAAATGGACTCTGGAGTCCCTGACAGATTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGA*

*XbaI*  
*GTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTCTATTATTGCTGGCAAGGTACACATCTTCCGTGGACATTCGGTGGAGGGACCAAGCTCGA*  
*GATCAAAGGTGGTGGTGGTTCTGGCGCGCGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGC*  
*TAGTGAAGACTGGGGCTTCAGTGAAGATATCTTGTAAAGGGTTCTGGTACTCATTCAGTGGTTACTACATGCAGTGGGTCAAG*

*NcoI*  
*CAGAGCCATGGAAGAGGCTTGAGTGGATTGGATATATTAGTGGTTATAATGGTGATACTAGGTATAATCAGAAGTTCAGGGG*  
*CAAGGCCACATTTATTGTAGACATATCCTCCAGGACAGCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAAGACTCTGCGGTCT*

*BamHI*  
*ATTACTGTGCAAGAGGGGTTACTACGGCTACGTGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCGCGGATCCcgcc*  
*gagcccaaatctcctgacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttctctctt*  
*cccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacc*  
*ctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtagacaacagc*  
*acgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctcctcaacaa*  
*agcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccat*  
*ccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctcctgggtcaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtg*  
*gagagcaatgggagcgggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttctctctctacagcaa*  
*gctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaactcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactaca*  
*cgcagaagagcctctcctctgctccgggtaaaaaagatcccaatcttgggtgctggtggtggtggagtcctggcttg*  
*tatagcttgctagtaaacagtgcccttattatcttctgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaa*  
*catgactccccgccccgggccccaccgcaagcattaccagccctatgccccccacggcacttcgcagcctatcgctccc*  
*tgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgctaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctagga*  
*cgaagagaggagtagatggttttggaacaagagacgtggcgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaacccctca*  
*ggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcagcgcggagg*  
*gcaaggggcacgatggcctttaccaggtctcagtagaccaccaaggacacctacgacgccccttcacatgcaggccctgccc*

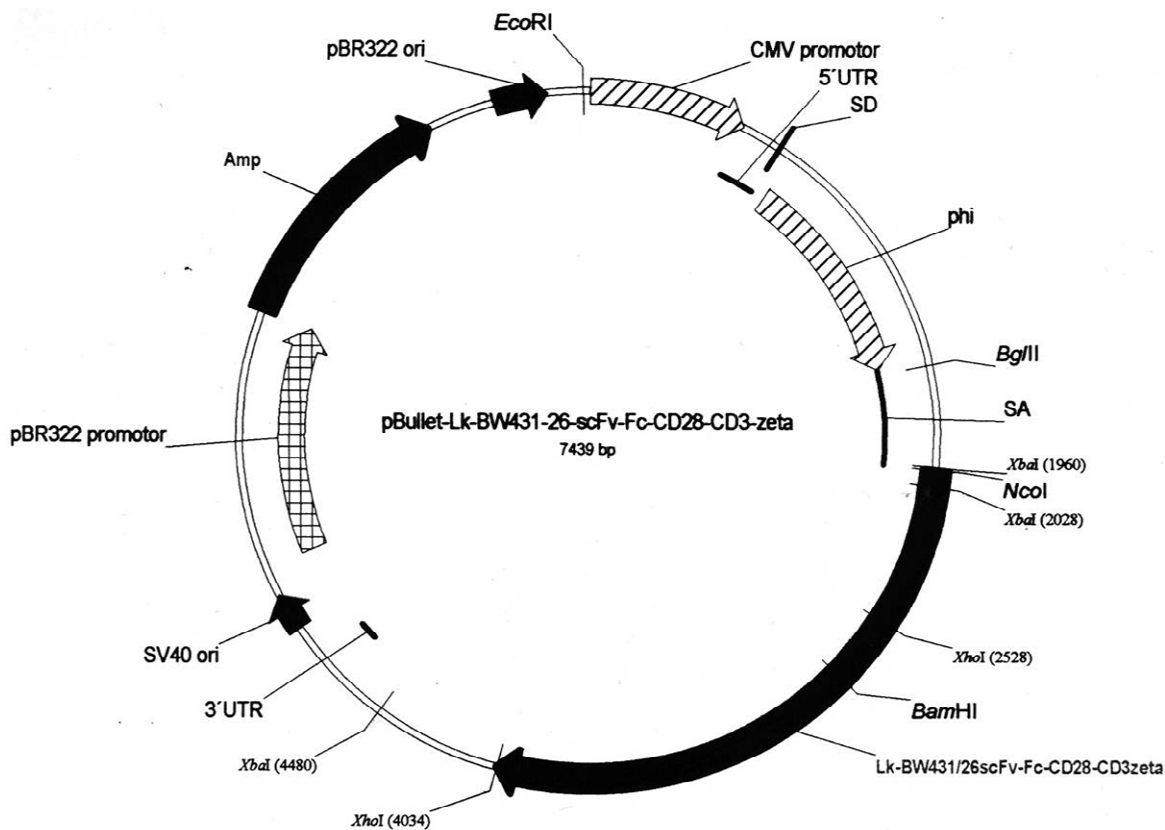
*XhoI*  
cctcgctaatacctcgag

## 7.3 Protein sequence of $\kappa$ -HA-scWue1-Fc-CD28-CD3 $\zeta$

Protein sequence of the WUE-1-specific TCR (i.e.  $\kappa$ -HA-scWue1-Fc-CD28-CD3 $\zeta$ ) as expressed by pBullet- $\kappa$ -HA-scWue1. The sequence of pBullet- $\kappa$ -scWue1 lacks the HA-tag. **Bold print**:  $\kappa$ -leader; **bold print, italic**: HA-tag; *italic*: Wue-1 single chain; **bold print**: Fc-CD28-CD3 $\zeta$  transmembrane signalling domain.

**MDFQVQIFSFLLISASVIMSRYPYDVPDYAQLTQSPLTLSVTIGQPASLSCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQSPKRLISL**  
**VSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLTKISRVEADLGVYWCQGTHLPWTFGGGKLEIKGGGSGGGGSGGGGQVQLQQSGPEL**  
**VKTGASVKISCKGSGYFSGYIMHWVKQSHGKRLEWIGYISGYNQKFRGKATFIVDISRTAYMQLNSLTSEDSAVY**  
**YCARGGYGYVDYWGQGTITVTVSADPAEPKSPDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP**  
**EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPS**  
**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYT**  
**QKSLSLSLSPGKKDPKFWLIVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSL**  
**RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLRREEDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRG**  
**KGHDLGLYQLSTATKDTYDALHMQLP**

## 7.4 Physical map of pBullet-607



**Figure 7.1: Physical map of pBullet-607.** pBullet-607 is based on the Moloney murine leukaemia virus-derived retroviral expression vector pSTITCH. It contains the expression cassette for an anti-CEA (carcinoembryonic antigen) chimeric T-cell receptor (TCR). The extracellular moiety of the recombinant TCR is composed of a humanized single chain antibody fragment (scFv) derived from the anti-CEA mAB (BW431-26) and the CH2/CH3 constant domains of human IgG. Moreover, the receptor comprises the intracellular signalling moieties of CD28 and CD3 $\zeta$ . The vector was kindly provided by Prof. H. Abken, University of Cologne, Germany.



## 8 Appendix II

### 8.1 Abbreviations

$\alpha$	<i>alpha</i>	DTSSP	dithiobis-sulfosuccinimidylpropionate
$\beta$	<i>beta</i>	DTT	dithiotreitol
$\delta$	<i>delta</i>	E:T	effector:target cell ratio
$\varepsilon$	<i>epsilon</i>	ECL	enhanced chemiluminescence
$\gamma$	<i>gamma</i>	ECM	extra cellular matrix
$\kappa$	<i>kappa</i>	EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
$\lambda$	<i>lambda</i>	EGTA	ethylene glycol-bis(2-aminoethyl-ether)-tetraacetic acid
$\rho$	<i>rho</i>	ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
$\zeta$	<i>zeta</i>	EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
$\mu$	<i>micro</i>	EtBr	ethidium bromide
$\mu\text{M}$	micromolar	EtOH	ethanol
AA	aminoacid	F(ab')	antigen binding antibody fragment
AB	antibody	FACS	fluorescence activated cell sorting
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity	Fc	constant domain antibody fragment
AG	antigen	FCS	fetal calf serum
AKV	Antikörper Verdünnungspuffer	FGFR-3	fibroblast growth factor receptor 3
APS	ammonium persulfate	FITC	fluorescein isothiocyanate
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane	FN	fibronectin
BiTE	bispecific T-cell engager	Fv	variable domain antibody fragment
Blimp-1	B-lymphocyte-induced maturation protein 1	fw	forward (primer)
BM	bone marrow	GaM-FITC	fluorescein isothiocyanate labelled goat anti-mouse antibody
BMSC	bone marrow stromal cell	GaM-PE	R-phycoerythrin labelled goat anti-mouse antibody
bp	base pairs	GC	germinal center
BPB	bromphenolblue	G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
BSA	bovine serum albumin	GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
bsAB	bispecific antibody	GPI	glycosyl-phosphatidylinositol
BSF-3	B cell stimulating factor 3	HDAC	histone deacetylase
bssc-AB	bispecific single-chain antibody	HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
CD	clusters of differentiation	HGF	hepatocyte growth factor
CDC	complement dependent cytotoxicity	HLA	human leukocyte antigen
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	HLA-DR	D-related human leukocyte antigen
cfu	colony forming unit	HMW	high molecular weight
CHO	Chinese hamster ovarian cells	HRP	horseradish peroxidase
cpm	counts per minute	HSCT	haematopoietic stem cell transplantation
CTL	cytotoxic T-lymphocytes	ICAM	intercellular adhesion molecule
DC	dendritic cells	Id	idiotype protein
DEPC	diethylpyrocarbonate	IEF	isoelectric focussing
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium	IFN	interferon
DMSO	dimethylsulfoxide	Ig	immunoglobulin
DNA	deoxyribonucleic acid	IGF	insulin-like growth factor
dNTP	deoxyribo nucleotide	IgH	immunoglobulin heavy chain
DSMZ	"Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen"		
DSS	disuccinimidylsulfate		

## Abbreviations

---

IgL	immunoglobulin light chain	pM	picomolar
IL	interleukin	PMSF	phenylmethylsulfonylfluoride
IP	immunoprecipitation	PTEN	phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten
JAK	janus kinase	PVDF	polyvinylidene fluoride
kb	kilo bases	RANKL	receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B ligand
kDa	kilo dalton	rev	reverse (primer)
LMW	low molecular weight	RIA	Radioimmunoassay
mAB	monoclonal antibody	RNA	ribonucleic acid
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization	R-PE	R-phycoerythrin
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue	RPMI	" Roswell Park Memorial Institute"
MBq	mega-Becquerel	RT	room temperature
mCi	milli-Curie	SBED	succinimidyl-biotinamido-p-azido benzamido-hexanoamido-ethyl- dithiopropionate
MCS	multiple cloning site	scAB	single-chain antibody
MeOH	methanol	SCF	stem cell factor
MES	4-morpholineethanesulfonic acid	scFv	single chain variable antibody domain
MGUS	monoclonal gammopathy of undetermined significance	SDF-1	stromal cell derived factor 1
MHC	major histocompatibility complex	SDS	sodium dodecyl sulfate
mM	milimolar	siRNA	small interfering RNA
MM	multiple myeloma	SN	supernatant
MOPS	4-morpholinepropanesulfonic acid	ssDNA	single strand deoxyribonucleic acid
MRD	minimal residual disease	STAT	signal transducer and activator of transcription
mRNA	messenger ribonucleic acid	TAA	tumour associated antigen
MS	mass spectrometry	TCA	trichloroacetic acid
MW	molecular weight	TCR	T-cell receptor
MWCO	molecular weight cut-off	TEMED	tetramethylethylenediamine
MZ	marginal zone	TF	Thomsen-Friedenreich antigen
NB	Northern blot	TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
NF $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B	TK	tyrosine kinase
NHS	N-hydroxysuccinimid	TNF	tumour necrosis factor
NK	natural killer	TRAIL	tumour necrosis factor - $\alpha$ related apoptosis inducing ligand
nM	nanomolar	Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethanhydrochlorid
ntc	no template control	U	Unit
o/n	over night	V(D)J	variable-, (diversity-), joining-region gene segments
OCs	osteoclasts	VCAM	vascular cellular adhesion molecule
OPD	o-phenylenediamine	VEGF	vascular endothelial growth factor
PAA	polyacrylamid	V <sub>H</sub>	variable region of the immunoglobulin heavy chain
PAGE	polyacrylamid gelelectrophoresis	V <sub>L</sub>	variable region of the immunoglobulin light chain
PBL	peripheral blood lymphocyte	VLA	very late antigen
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	WB	western blot
PBS	phosphate buffered saline	Wue-1	"Wuerzburg-1" antibody
PC	plasma cell	XBP-1	X-box binding protein-1
PCL	plasma cell leukaemia		
PCR	polymerase chain reaction		
PEG	polyethylene glycol		
pfu	plaque-forming units		
PI	propidium iodide		
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase		
PI-PCL	phosphatidylinositol specific phospholipase C		

## 8.2 Zusammenfassung

Das Multiple Myelom (MM) ist ein klonaler B-Zell Tumor der differenzierten, langsam proliferierenden Plasmazelle, der hauptsächlich im Knochenmark lokalisiert ist. Das MM ist eine bislang unheilbare Erkrankung, mit einer mittleren Überlebensrate von 3-5 Jahren und ist verantwortlich für ca. ein Prozent aller krebsassoziierten Todesfälle in der Westlichen Welt. Die molekularen Ursachen, die dieser Krankheit zugrunde liegen sind jedoch noch nicht geklärt. Die Entwicklung immuntherapeutischer Strategien, im Besonderen von rekombinanten bispezifischen "single-chain" (bsc) Antikörpern, die außergewöhnliche biologische Eigenschaften besitzen welche sie von konventionellen Antikörpern unterscheiden, spielt daher eine wichtige Rolle in der Behandlung des MM. Die Entwicklung Antikörper basierender Therapieformen für die Behandlung des Multiplen Myeloms wird jedoch dadurch behindert, dass man bis dato keine geeigneten Plasmazell-spezifischen Oberflächenantigene kennt.

Um neue, Plasmazell-spezifische Antikörper für dieses Projekt zu identifizieren wurden Hybridom-Überstände (generiert von Dr. Axel Greiner, Universität Würzburg) mittels Durchflußzytometrie mit einer Reihe von humanen MM, Plasmazell-Leukaemie, und B-Zell-Lymphom Zelllinien untersucht. Drei Überstände zeigten ein positives Ergebnis mit der humanen MM Zelllinie RPMI-8226. Die in den Überständen enthaltenen Immunglobuline wurden als dem IgM- $\kappa$  Subtyp angehörend identifiziert. Western Blot (WB) Analyse identifizierte eine starke Bande von ca. 25kDa (genannt "MUE-1"). Auf einem zweidimensionalen (2D) Western blot von RPMI-8226 Membranproteinen konnte ein einzelner Spot identifiziert, und mittels MALDI/MS analysiert werden. Analyse der Peptidsequenz und Datenbank Abgleich ergaben jedoch, dass es sich bei dem angeblichen Plasmazell-spezifischen Antigen MUE-1 um  $\lambda$ -Leichte Kette handelte.

Kürzlich wurde ein neuer monoklonaler Antikörper generiert, genannt "anti-Wue-1", der spezifisch an die Zelloberfläche von normalen und malignen humanen Plasmazellen bindet. Auf Basis dieses monoklonalen anti-Wue-1 Antikörpers konnte ein neuer, gegen MM Zellen gerichteter rekombinanter bsc Antikörper hergestellt werden, genannt "bsc anti-Wue-1xCD3". In einem Teilprojekt dieser Doktorarbeit wurden die biologischen Eigenschaften dieses neuen Konstruktes mittels der MM Zelllinie NCI-H929, oder primärer Myelom Zellen aus dem Knochenmark von Patienten, und mit autologen oder allogenen Effektor T-Zellen untersucht. In 10 von 11 Fällen konnte gezeigt werden, dass bsc anti-Wue-1xCD3 effizient



den T-Zell vermittelten Zelltod von NCI-H929 als auch von primären MM-Zellen induzieren kann. Im Gegensatz zu konventionellen bispezifischen Antikörpern ist bssc anti-Wue-1xCD3 auch bei geringen Effektor zu Target (E:T) Verhältnissen wirksam und es ist keine zusätzliche T-Zell Stimulation nötig.

Der Hauptteil dieser Doktorarbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung, Klonierung und funktionellen Charakterisierung des WUE-1 Antigens. Zuerst wurden WUE-1 positive Zelllinien mittels Durchflußzytometrie identifiziert. Die weitere Charakterisierung des Antigens mit biochemischen Standard Methoden wie WB oder Immunpräzipitation (IP) schlug jedoch fehl. Daher wurde versucht das Antigen mit Hilfe von Expressionsklonierung und Immunselektion monoklonalem anti-Wue-1 Antikörper aus einer cDNA Expressionsbibliothek zu isolieren. Die isolierten Klone wurden sequenziert und mittels Northern Blot und Durchflußzytometrie analysiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass alle Klone unspezifische DNA Fragmente trugen.

Da die Effizienz des "single-chain" (sc) anti-Wue-1 Antikörpers und seine Vorteile gegenüber dem monoklonalen anti-Wue-1 bereits erfolgreich demonstriert werden konnten wurde beschlossen einen rekombinanten chimären T-Zell Rezeptor (TCR) zu generieren, bestehend aus der sc anti-Wue-1 Antikörper Domäne, einer humanen IgG Fc Sequenz, dem transmembranen Teil von CD28 und der intrazellulären CD3 $\zeta$  Signaldomäne. In einem modifizierten Immunselektions-Assay wurde eine MM cDNA Expressionsbibliothek mittels anti-Wue-1 TCR exprimierenden Effektor (Jurkat) Zellen untersucht, und über einen Interferon (IFN)  $\gamma$  ELISA analysiert. Die Expression des anti-Wue-1 TCR auf den Jurkat Zellen konnte erfolgreich demonstriert werden, indem die IFN- $\gamma$  Ausschüttung durch Zugabe von Fc-spezifischem, anti-humanem IgG aktiviert wurde. Es konnte jedoch kein IFN- $\gamma$  in den Co-Kulturen von transfizierten Jurkat Effektor Zellen und WUE-1<sup>+</sup> Target Zellen (NCI-H929, ARH77) nachgewiesen werden.

Obwohl die molekulare Struktur des WUE-1 Antigens weiterhin nicht aufgeklärt ist, konnte doch gezeigt werden, dass das Expressionsprofil und seine biochemischen Eigenschaften dieses Antigen von allen bisher beschriebenen Plasmazell-Antigenen unterscheidet. Weiterhin wurde demonstriert, dass bssc anti-Wue-1xCD3 bei geringem E:T Verhältnis und ohne zusätzliche T-Zell Stimulierung effizient den T-Zell vermittelten Zelltod auslöst. WUE-1 ist daher ein viel versprechender Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Ansätze zur Behandlung des Multiplen Myeloms.



## **8.4 References**

### **Dipl. Ing. Sabine Friedl**

Max Delbrueck Centre for Molecular Medicine  
Haematology, Oncology & Tumourimmunology  
Robert Roessle Str. 10  
13125 Berlin  
Germany  
Phone: +49-30-94063244  
[sabine.friedl@mdc-berlin.de](mailto:sabine.friedl@mdc-berlin.de)

### **Prof. Petra Knaus**

Free University of Berlin  
Institute of Chemistry and Biochemistry  
Thielallee 63  
14195 Berlin  
Germany  
Phone: +49-30-838-52935  
[knaus@fu-berlin.de](mailto:knaus@fu-berlin.de)

### **Dr. rer. nat. Kurt Bommert**

Dept. of Internal Medicine II  
Division of Haematology and Oncology  
University Clinics Würzburg  
Klinikstr. 6-8  
97070 Würzburg  
Germany  
Phone: +49-931-71220  
[kurt.bommert@mail.uni-wuerzburg.de](mailto:kurt.bommert@mail.uni-wuerzburg.de)

### **Priv. Doz. Dr. med. Ralf Bargou**

Dept. of Internal Medicine II  
Division of Haematology and Oncology  
University Clinics Würzburg  
Klinikstr. 6-8  
97070 Würzburg  
Germany  
Phone: +49-931-201-70280  
[Bargou\\_R@klinik.uni-wuerzburg.de](mailto:Bargou_R@klinik.uni-wuerzburg.de)

## 8.5 Publications and Posters

Parts of this work were published in:

Honemann, D., Kufer, P., Rimpler, M. M., Chatterjee, M., **Friedl, S.**, Riecher, F., Bommert, K., Dörken, B. and Bargou, R. C., *A novel recombinant bispecific single-chain antibody, bscWue-1 x CD3, induces T-cell-mediated cytotoxicity towards human multiple myeloma cells*. *Leukemia* 2004. **18**: 636-644.

Parts of this work were presented as a poster:

**Sabine Friedl**, Dirk Hönemann, Matthäus Rimpler, Manik Chatterjee, Axel Greiner, Bernd Dörken, Ralf C. Bargou, and Kurt Bommert; *A Novel Recombinant Bispecific Single-Chain Antibody, Wue-1xCD3, Induces T-Cell Mediated Cytotoxicity Directed Against Autologous Primary Human Myeloma Cells*. Keystone Symposia “B-Cells and Antibodies: Laboratory to Clinic”, Keystone, Colorado, January 14-19, 2003

## **8.6 Declaration**

I hereby certify that I have prepared the present work independently and by using exclusively the indicated resources.

Sabine Friedl

Berlin, June 2006