

Entwicklung antigenabhängig aktivierbarer TNF-Ligand-Fusionsproteine

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Nicole Müller

aus

Reutlingen

Würzburg 2009

Eingereicht am: 12. Februar 2009

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Gross (vom Dekanat beauftragt)

1. Gutachter: Professor Dr. H. Wajant

2. Gutachter: Professor Dr. R. Benz

Tag des Promotionskolloquiums: 5. Juni 2009

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Ich erkläre weiterhin, dass ich, außer mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine akademischen Grade erworben habe, noch versucht habe, zu erwerben.

Würzburg, den 12. Februar 2009

.....

(Nicole Müller)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01. September 2004 bis 01. Februar 2009 an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Professor Dr. Harald Wajant angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Summary	3
3. Einleitung	5
3.1 Die Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Ligandenfamilie.....	5
3.2 Die Tumor Nekrose Faktor Rezeptor (TNFR)-Familie.....	8
3.2.1 Nicht-Todesrezeptoren.....	10
3.2.2 Todesrezeptoren.....	19
3.3 Mögliche Anwendungen von TNF-Liganden in der Tumorthherapie.....	25
3.4 Zielsetzung.....	28
4. Material	29
4.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien.....	29
4.1.1 Enzyme.....	30
4.1.2 Oligonukleotide.....	30
4.2 Antikörper und Antiseren.....	30
4.3 Zellen.....	31
4.3.1 Eukaryontische Zelllinien.....	31
4.3.2 Prokaryontische Zellen.....	31
4.4 Plasmide.....	32
4.4.1 Fusionsproteine.....	32
4.4.2 Rezeptoren.....	32
4.5 Lösungen und Puffer.....	33
4.6 Kommerzielle Kits.....	34
4.7 Geräte.....	34
5. Methoden	35
5.1 Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien.....	35
5.1.1 Kultivierung adhärenter und Suspensions-Zelllinien.....	35
5.1.2 Konservierung von Zellen.....	35
5.1.3 Herstellung stabil exprimierender Zelllinien.....	35
5.2 Isolierung, Kultivierung und Stimulation primärer Zellen.....	36
5.2.1 Stimulation von T-Zellen.....	36
5.2.2 Stimulierung von Monozyten und Dendritischen Zellen.....	37
5.3 Zytotoxizitätsassay.....	37
5.3.1 Adhärente Zellen.....	37
5.3.2 Suspensionszellen.....	38
5.4 IL-8-Produktions-Bestimmung mittels ELISA.....	38
5.5 Zellysate (NP40-Lysate) für Western Blot.....	39
5.6 Bestimmung von Proteinmengenverhältnissen nach Bradford.....	39
5.7 Western Blot.....	39
5.7.1 SDS-PAGE.....	39
5.7.2 Proteinelektrotransfer auf Nitrozellulosemembran.....	40
5.7.3 Immundetektion mittels ECL.....	40
5.7.3 Coomassie-Färbung.....	41
5.8 Produktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine.....	41
5.8.1 Expression.....	41
5.8.2 Ankonzentrieren von Proteinlösungen.....	41
5.8.3 Aufreinigung durch Affinitätschromatografie.....	42
5.9 Gelfiltration (Größenausschlusschromatografie).....	42
5.10 Bindungs- und Expressionsuntersuchung mittels Durchflußzytometrie (FACS).....	43
5.11 Klonierung rekombinanter Fusionsproteine.....	43
5.11.1 PCR-Amplifikation.....	43
5.11.2 DNA-Restriktionsverdau.....	44
5.11.3 Ligation.....	44
5.11.4 Transformation kompetenter Zellen.....	44

5.11.5 Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien	45
6. Ergebnisse	46
6.1 Aktivierung löslicher kostimulatorischer TNF-Liganden durch Oligomerisierung.....	46
6.1.1 Reinigung löslicher Varianten von OX40L, CD27L, CD40L, 41BBL und GITRL	46
6.1.2 Bindung der rekombinanten Liganden an ihre korrespondierenden auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren	50
6.1.3 Effekt der Oligomerisierung auf die spezifische Aktivität von CD27L, CD40L, 41BBL, OX40L und GITRL.....	52
6.2 Immobilisationsabhängige Aktivierung löslicher TNF-Ligandvarianten	56
6.2.1 Trimere scFv-TNF-Ligand-Fusionsproteine erlangen hohe Aktivität nach Zelloberflächenantigenbindung	56
6.2.2 Zelloberflächenantigenbindung verleiht trimeren Fusionsproteinen aus einer Proteinbindedomäne und einem TNF-Liganden eine hohe Aktivität	65
7. Diskussion	74
7.1 Aktivierung löslicher kostimulatorischer TNF-Liganden durch Oligomerisierung.....	76
7.2 Immobilisationsabhängige Aktivierung löslicher TNF-Ligandvarianten	80
7.2.1 Trimere scFv-TNF-Ligand-Fusionsproteine erlangen hohe Aktivität nach Zelloberflächenantigenbindung	80
7.2.2 Zelloberflächenantigenbindung verleiht trimeren Fusionsproteinen aus einer Proteinbindedomäne und einem TNF-Liganden hohe Aktivität	83
8. Literatur	86
9. Anhang	95
9.1 Abkürzungsverzeichnis	95
9.2 DNA- und Aminosäuresequenzen der Fusionsproteine.....	98
9.2.1 Flag-CD27L.....	98
9.2.2 Flag-TNC-CD27L	98
9.2.3 Fc-Flag-CD27L.....	99
9.2.4 sc40-Flag-CD27L	100
9.2.5 Flag-CD40L.....	101
9.2.6 Flag-TNC-CD40L	102
9.2.7 Fc-Flag-CD40L.....	103
9.2.8 sc40-Flag-CD40L	104
9.2.9 Flag-GITRL	105
9.2.10 Flag-TNC-GITRL.....	106
9.2.11 Fc-Flag-GITRL	106
9.2.12 sc40-Flag-GITRL.....	107
9.2.13 Flag-OX40L.....	109
9.2.14 Flag-TNC-OX40L	109
9.2.15 Fc-Flag-OX40L.....	110
9.2.16 sc40-Flag-OX40L	111
9.2.17 Flag-41BBL	112
9.2.18 Flag-TNC-41BBL.....	113
9.2.19 Fc-Flag-41BBL	114
9.2.20 sc40-Flag-41BBL.....	115
9.2.21 scFvCD19-Flag-FasL	116
9.2.22 scFvCD19-Flag-TRAIL.....	117
9.2.23 B7-2-Flag-FasL	119
9.2.24 CD40-Flag-FasL.....	120
9.2.25 RANK-Flag-FasL.....	121
9.3 Publikationen	122
9.4 Lebenslauf.....	123

1. Zusammenfassung

Von TRAIL, FasL und APRIL, drei Mitgliedern der TNF-Liganden-Familie, ist bekannt, dass Trimerstabilität und Oligomerisierungsstatus maßgeblich das Rezeptoraktivierungspotential dieser Liganden beeinflussen. Für die immunstimulatorischen TNF-Liganden CD27L, CD40L, OX40L, 41BBL und GITRL war hingegen vor der Durchführung dieser Arbeit praktisch nicht bekannt, inwieweit Trimerbildung, Stabilisierung und Oligomerisierung wichtig für deren Aktivität sind. Dies wurde in dieser Arbeit systematisch untersucht.

CD40L besaß bereits als trimeres Molekül eine hohe Aktivität, die durch sekundäre Oligomerisierung nur wenig gesteigert wurde. Die spezifische Aktivität konnte durch Stabilisierung mit Hilfe der Tenascin-C (TNC)-Trimerisierungsdomäne nur geringfügig gesteigert werden. CD27L war als lösliches Flag-markiertes sowie als hexameres Fc-Protein selbst nach Quervernetzen nicht in der Lage, seinen Rezeptor CD27 zu binden und zu aktivieren. Die TNC-stabilisierte trimere Form des CD27L hingegen induzierte nach Oligomerisierung mit einem anti-Flag-Antikörper ein starkes Signal. Trimerer OX40L und trimerer 41BBL konnten nur in oligomerisierter Form ihre Rezeptoren aktivieren, wobei die Aktivität der TNC-stabilisierten Form signifikant stärker ausgeprägt war. GITRL aktivierte seinen Rezeptor bereits als stabilisiertes Trimer und Hexamer, die Aktivität konnte durch Quervernetzen nur gering gesteigert werden. Zusammenfassend kann man sagen, dass CD27L, OX40L und 41BBL zu der Untergruppe der TNF-Ligandenfamilie gehört, für die eine Stabilisierung des trimeren Moleküls und dessen Oligomerisierung nötig sind, um eine starke Rezeptoraktivierung zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu zeigten CD40L und GITRL bereits oligomerisierungsunabhängig eine hohe Aktivität. GITRL benötigte allerdings die Stabilisierung des trimeren Moleküls durch die TNC-Domäne, um gute Aktivität zu zeigen.

Im Weiteren wurden Antikörperfragment (scFv-)-TNF-Ligand-Fusionsproteine konstruiert und untersucht, die ein Zelloberflächenantigen binden. Eine starke Zelloberflächenantigen-spezifische Aktivierung des jeweiligen Rezeptors konnte für scFv-41BBL und für scFv-OX40L gezeigt werden, wohingegen scFv-CD40L und scFv-GITRL bereits auf antigennegativen Zellen stark aktiv waren. scFv-CD27L war selbst auf antigenpositiven Zellen inaktiv. Verwendet man an Stelle des Antikörperfragments eine extrazelluläre Proteinbindedomäne, z.B. die eines TNF-Rezeptors, erhält man Fusionsproteine, die zum einen eine selektive Aktivierung der TNF-Ligandendomäne und somit die Aktivierung des korrespondierenden Rezeptors auf der Zielzelle ermöglichen, zum anderen aber durch die Bindung an den membranständigen Liganden dessen Aktivität neutralisieren können. Für CD40-, RANK- und B7-2-FasL konnte der immobilisationabhängige Aktivierungseffekt auf entsprechenden Zelloberflächenmolekül-exprimierenden Zellen gezeigt werden. Anhand von T47D-Zellen, die durch eine autokrine CD40L-CD40-Signalschleife vor Apoptose geschützt sind, konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung von CD40-FasL an membranständigen CD40L die CD40L-CD40-Interaktion gestört und gleichzeitig Apoptose verstärkt induziert werden kann. Das Prinzip der antigenabhängigen Aktivierung von TNF-Liganden könnte Anwendung in der Tumorthherapie finden, da bei Verwendung entsprechender selektiv exprimierter Marker eine lokale Rezeptoraktivierung erreicht und so Nebenwirkungen minimiert werden können.

2. Summary

Trimer stability and oligomerization status of TRAIL, FasL and APRIL, three members of the TNF ligand family, critically determine their receptor activating potential. However, detailed information for the immunostimulatory ligands CD27L, CD40L, OX40L, 41BBL and GITRL regarding the importance of trimer formation, stabilization and oligomerization for ligand activity was lacking. These aspects were investigated systematically in this work.

CD40L was highly active as a trimeric molecule. Secondary oligomerization and/or stabilization via the tenascin-C (TNC) trimerization domain slightly enhanced its specific activity. As soluble Flag-tagged and as hexameric Fc protein CD27L failed to bind and activate its cognate receptor CD27, even after crosslinking. However, the TNC stabilized form of CD27L induced a strong signal after oligomerization with anti-Flag antibody. Receptor signaling was only activated by oligomerized molecules of trimeric OX40L and 41BBL whereas the respective TNC fusion protein showed significant stronger activity. Stabilized GITRL trimers and hexamers already activated their receptor whereas oligomerization of GITRL just slightly enhanced the specific activity. Taken together, CD27L, OX40L and 41BBL belong to a TNF ligand family subgroup which requires oligomerization and stabilization of the trimeric molecule to ensure strong receptor activation. In contrast, CD40L and GITRL already display high oligomerization-independent activity, though the latter needs stabilization by the TNC domain.

Furthermore, antibody fragment (scFv)-ligand fusion proteins targeting specific cell surface antigens were designed and analyzed. Strong cell surface antigen-selective TNF receptor activation was achieved for scFv-41BBL and scFv-OX40L whereas scFv-CD40L and scFv-GITRL already induced signaling in the absence of antigen-positive cells. scFv-CD27L lacked activity even on antigen-positive cells. Using an extracellular protein binding domain for example the ligand binding domain of a TNF receptor instead of an

antibody fragment resulted in fusion proteins that on the one hand activate the TNF ligand domain and thus the corresponding receptor on target cells and on the other hand neutralize membrane ligand activity by binding. The effect of cell surface immobilization-mediated activation of these fusion proteins on cells expressing the corresponding target molecule was shown here for CD40-, RANK- and B7-2-FasL. The CD40-FasL fusion protein simultaneously blocked CD40L-CD40 interaction and induced strong apoptosis in T47D cells displaying an antiapoptotic autocrine CD40L-CD40 signaling loop. The principle of antigen-dependent activation of TNF ligands could be of use in tumor treatment due to the fact that tumor specific marker targeting leads to locally restricted receptor activation on antigen positive cells, promising a reduction in potential off target effects.

3. Einleitung

Die Liganden und Rezeptoren der Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie sind an einer Vielzahl von immunregulatorischen Prozessen beteiligt, können aber auch Differenzierungs- und Aktivierungsprozesse kontrollieren (Locksley *et al.*, 2001). In ungefähr der Hälfte der Fälle interagiert ein bestimmter Ligand der TNF-Familie mit genau einem Rezeptor aus der TNF-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie. So bindet z.B. CD30 Ligand (CD30L) an CD30, CD40L bindet an CD40 und OX40L an OX40. Andere Liganden der TNF-Familie können hingegen mit verschiedenen Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie interagieren. So kann z.B. TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) mit den Rezeptoren TRAILR1 bis 4 und OPG (Osteoprotegerin) interagieren, und TNF, das namensgebende Zytokin dieser Proteinfamilie, bindet sowohl an TNFR1, als auch an TNFR2. Es ist auch möglich, dass derselbe TNF-Rezeptor mit verschiedenen Liganden der TNF-Familie assoziiert. So bindet z.B. TNFR2 neben TNF auch Lymphotoxin- α (LT α), und der Decoy Rezeptor DcR3 interagiert mit FasL, LIGHT und TL1A.

3.1 Die Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Ligandenfamilie

Die Zugehörigkeit eines Proteins zur TNF-Ligandenfamilie, mit bisher 19 identifizierten Mitgliedern, definiert sich durch den Besitz der sogenannten „TNF Homologie Domäne“ (THD). Bei dieser ca. 150 Aminosäuren umfassenden Domäne handelt es sich um ein phylogenetisch konserviertes Strukturmodul aus zwei antiparallelen β -Faltblättern, die sich zu einer „Biskuitrollen“ (jelly roll)-förmigen Struktur zusammenlagern. Die THD der TNF-Liganden ist für die Rezeptorbindung verantwortlich und vermittelt die Ausbildung von homotrimeren Ligandmolekülen (Bodmer *et al.*, 2002). Obwohl die Sequenzhomologie zwischen den THDs verschiedener TNF-Liganden nicht größer als 15-35% ist, sind sie sich in ihrer Tertiärstruktur sehr ähnlich (Bodmer *et al.*, 2002). Mit Ausnahme von LT α werden alle TNF-Liganden zunächst in Form von Typ-2 Transmembranproteinen (intrazellulärer Aminoterminus, extrazellulärer Carboxyterminus) exprimiert, es können

durch alternatives Spleißen aber auch lösliche Formen entstehen (Locksley *et al.*, 2001, Bodmer *et al.*, 2002). Die THD der TNF-Liganden ist carboxyterminal und damit extrazellulär lokalisiert. In der aminoterminalen intrazellulären Domäne der TNF-Liganden findet man keine homologen Bereiche, die in allen Mitgliedern der TNF-Familie konserviert sind. Für einzelne Familienmitglieder konnte jedoch gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Domäne wichtig für das intrazelluläre „Trafficking“ (Proteintransport) des Moleküls ist. Für einige TNF-Liganden wurde darüber hinaus gefunden, dass die Bindung des membranständigen Liganden an den korrespondierenden TNF-Rezeptor zu einer Aktivierung des ERK-Signalweges in der ligandexprimierenden Zelle führen kann (retrogrades „signaling“). Zwischen der THD und der Transmembrandomäne finden sich je nach TNF-Ligand unterschiedlich lange „stalk“-Regionen. Typischerweise enthalten diese „stalk“-Regionen Erkennungssequenzen für verschiedene Proteasefamilien (z.B. Furin, Matrixmetalloproteasen MMP etc.), die zur Freisetzung von löslichen Ligandmolekülen aus den membranständigen Vorläufermolekülen führen können (Abb. 1). Da die THD im Molekül extrazellulär lokalisiert ist, ist sie auch in proteolytisch prozessierten Liganden enthalten. Daher liegen auch die löslichen Ligandvarianten in aller Regel in trimerer Form vor und interagieren mit ihrem korrespondierenden Rezeptor.

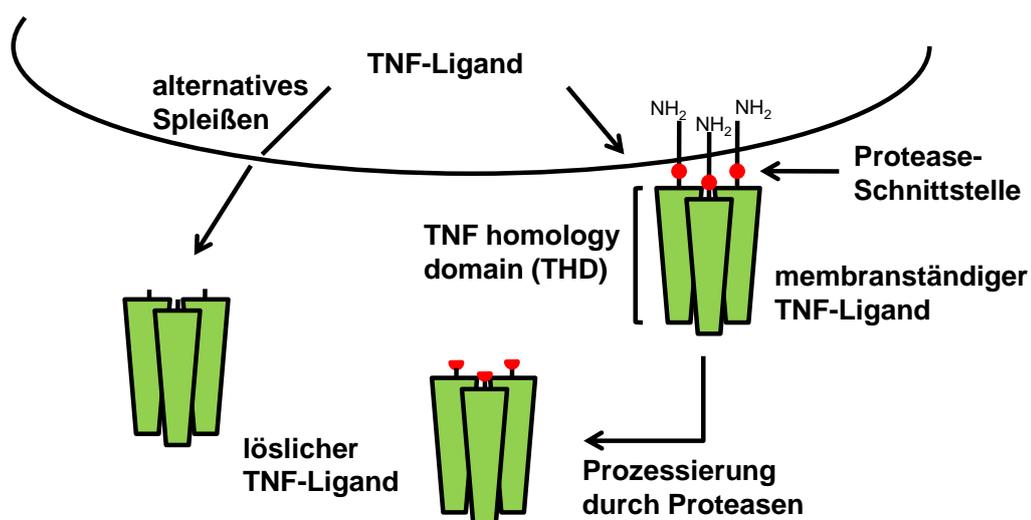


Abb. 1 TNF-Liganden können als membranständige oder auch als lösliche trimere Moleküle vorliegen.

Aus Strukturanalysen ist bekannt, dass trimere TNF-Liganden mit drei Molekülen ihres/r korrespondierenden Rezeptors/Rezeptoren interagieren. Interessanterweise ist es in Fällen, in denen ein Ligand an verschiedene TNF-Rezeptortypen binden kann z.T. so, dass ein TNF-Ligand keine heteromeren Rezeptorkomplexe induziert. Beispielsweise kommt es bei der Interaktion von TNF mit TNFR1 und TNFR2 nicht zur Bildung von TNFR1-TNFR2-Heteromeren. In anderen Fällen dagegen, wie bei TRAIL und TRAILR1 und 4, kann es auch zur Bildung von heteromeren Komplexen kommen.

Membranständige TNF-Liganden sind ausnahmslos hoch aktiv, wohingegen die löslichen Varianten in manchen Fällen auch inaktiv sind. So sind z.B. der lösliche RANKL (receptor activator of NkFB-ligand) und lösliches BAFF (B cell activating factor belonging to the TNF family) ähnlich aktiv wie ihre entsprechende membranständige Ligandvariante. Lösliche FasL-Moleküle hingegen sind, im Gegensatz zu membranständigem FasL, praktisch nicht in der Lage, ihren korrespondierenden Rezeptor zu stimulieren. Interessanterweise kann in TNF-Ligand-TNF-Rezeptor-Systemen, in denen ein Ligand mit mehreren TNF-Rezeptoren zu interagieren vermag, die Aktivität des löslichen Liganden an den verschiedenen Rezeptoren sehr unterschiedlich sein. So bindet z.B. lösliches TNF sowohl an TNFR1 als auch an TNFR2, ist aber nicht in der Lage, letzteren adäquat zu stimulieren, wohingegen die Aktivierung des TNFR1 durch lösliches TNF höchst effizient im pM-Bereich erfolgt (Grell, 1995-1996). Ein weiteres Beispiel dafür, dass ein Ligand seine verschiedenen Rezeptoren unterschiedlich gut zu aktivieren vermag, ist BAFF. Lösliches BAFF kann den BAFF-R aktivieren, auf TACI (transmembrane activator and CAML-interactor) allerdings zeigt derselbe Ligand trotz Bindung keine stimulatorische Wirkung (Bossen *et al.*, 2008). Ähnlich verhält es sich im TRAIL-TRAILR-System. TRAILR1 und TRAILR2 werden beide durch Membran-TRAIL getriggert, lösliches TRAIL induziert jedoch intrazelluläre Signalwege bevorzugt über TRAILR1 (Wajant *et al.*, 2001). Offensichtlich bestimmt also der TNF-Rezeptortyp darüber, ob der entsprechende korrespondierende Ligand bereits in löslicher Form für eine Aktivierung ausreichend ist oder ob dessen Membranständigkeit Voraussetzung hierfür ist.

Für Forschungszwecke und für mögliche therapeutische Anwendungen ist es wünschenswert, über lösliche TNF-Liganden mit hoher Aktivität zu verfügen. Da von TNF-Rezeptor-spezifischen Antikörpern bekannt ist, dass diese nach Protein G-Quervernetzung eine höhere agonistische Aktivität erlangen können, wurde untersucht, ob auch lösliche trimere TNF-Liganden durch Oligomerisierung eine Steigerung ihrer Aktivität erfahren. Tatsächlich zeigte sich, dass löslicher FasL oder lösliches TRAIL, die gentechnisch mit einem Flag-Epitop versehen wurden, nach Quervernetzen mit einem anti-Flag-Antikörper sehr viel aktiver sind als die jeweiligen nicht-aggregierten Moleküle. Die Oligomerisierung von inaktiven, löslichen TNF-Ligand-Varianten kann offensichtlich dazu führen, dass diese die ihrem membranständigen Vorläufermolekül vergleichbare Bioaktivität erlangen (siehe Ergebnisteil dieser Arbeit). Im Gegensatz zu den TNF-Rezeptoren, die in den meisten Fällen konstitutiv auf vielerlei Zellen exprimiert sind, werden die Liganden der TNF-Familie in der Regel erst nach Induktion synthetisiert.

3.2 Die Tumor Nekrose Faktor Rezeptor (TNFR)-Familie

Die humane TNF-Rezeptorfamilie umfasst 29 Mitglieder. TNF-Rezeptoren werden typischerweise als Typ 1-Transmembranproteine (extrazellulärer Aminoterminus, intrazellulärer Carboxyterminus) exprimiert (Locksley *et al.*, 2001, Bodmer *et al.*, 2002). Es gibt aber auch Ausnahmen, wie TRAILR3, der carboxyterminal durch einen Glykolipidanker mit der Zellmembran verbunden ist (Degli-Esposti *et al.*, 1997), sowie OPG (Osteoprotegerin) und DcR3 (Decoy-Rezeptor 3), die ausschließlich in löslicher Form vorkommen (Emery *et al.*, 1998, Bodmer *et al.*, 2002). Lösliche TNF-Rezeptoren können auch durch proteolytische Prozessierung (z.B. TNFR1, TNFR2, CD40, CD30, CD27) oder durch alternatives Spleißen des Exons, das für die Transmembrandomäne kodiert (z.B. Fas und 41BB) entstehen (Bodmer *et al.*, 2002). Das charakteristische Merkmal der TNF-Rezeptoren sind die extrazellulär lokalisierten zwei bis sechs konservierten cysteinreichen Domänen (CRD), von denen jede drei Cysteinbrücken ausbildet (Naismith und Sprang, 1998, Locksley *et al.*, 2001, Bodmer *et al.*, 2002).

Darüberhinaus verfügen die TNF-Rezeptoren über eine sogenannte PLAD („Pre-Ligand Assamby Domain“). Dieser aminoterminalen Bereich ist nicht an der Ligandenbindung beteiligt, vermittelt aber die Bildung inaktiver homotrimerer Rezeptorkomplexe (Chan, 2000). Erst nach Ligandenbindung kommt es zu einer Reorganisation der vorgeformten TNF-Rezeptorkomplexe und zur Aktivierung von intrazellulären Signalwegen. In ihrer zytoplasmatischen, carboxyterminalen Domäne besitzen die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie keine intrinsische enzymatische Aktivität, verfügen dafür aber über Bindestellen für verschiedene zytoplasmatische Adapterproteine. Dabei werden die einzelnen Rezeptoren in zwei Gruppen eingeteilt, die Todesrezeptoren und die Nicht-Todesrezeptoren (Abb. 2).

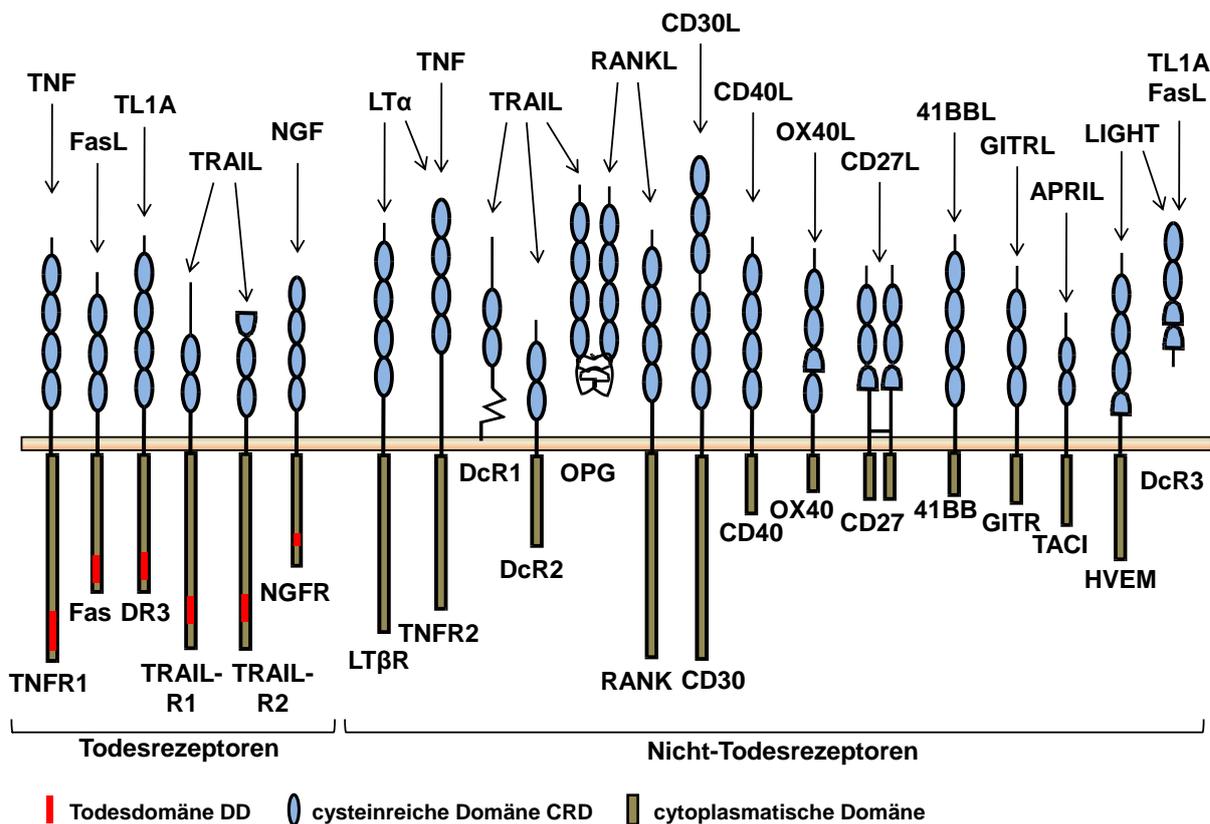


Abb. 2 Einige Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie und ihre korrespondierenden Liganden.

Die Todesrezeptoren sind durch eine konservierte Protein-Protein-Interaktionsdomäne im carboxyterminalen Bereich charakterisiert, die sogenannte Todesdomäne („Death Domain“, DD). Dieser Bereich erlaubt den Rezeptormolekülen, DD-tragende

Adapterproteine und proapoptotische Proteasen, wie z.B. Caspase-8, zu rekrutieren, und vermittelt so die Übertragung apoptotischer Signale (Bodmer *et al.*, 2002). Die Nicht-Todesrezeptoren besitzen keine Todesdomäne, interagieren aber mit Adapterproteinen der TNF-Rezeptor Assoziierten Faktoren (TRAF)-Familie, die an der Aktivierung von NFκB und verschiedenen Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) beteiligt sind (Locksley *et al.*, 2001). Bei diesen Rezeptoren wurden, abgesehen von kurzen „TRAF binding“-Motiven keine Homologien im intrazellulären Bereich gefunden. Die Funktionen der Nicht-Todesrezeptoren sind sehr unterschiedlich.

3.2.1 Nicht-Todesrezeptoren

Die meisten TNF-Rezeptoren ohne Todesdomäne (DD) sind an der Regulation des Immunsystems beteiligt. Die TRAF-bindenden Rezeptoren CD27, 41BB, GITR und OX40 zum Beispiel unterstützen die Zellteilung initial aktivierter T-Zellen und kontrollieren die T-Zell-Differenzierung (Croft, 2003a und b, Sugamura *et al.*, 2004, Barr *et al.*, 2006, Vinay *et al.*, 2006, Nocentini *et al.*, 2007), während CD40 eine wichtige Rolle bei der Kostimulation antigenpräsentierender Zellen, z.B. von Dendritischen Zellen und B-Zellen (Vonderheide, 2007) spielt (Abb. 3).

3.2.1.1 CD40 und CD40L

CD40 (TNFRSF5) wird als 50 kDa Typ 1-Transmembranrezeptor exprimiert (Armitage, 1994). Extrazellulär besitzt das Molekül vier CRDs (Gardnerova *et al.*, 2000), intrazellulär kann es mit Adaptermolekülen wie TRAF1, 2, 3 und 6 oder JAK3 interagieren. Diese Interaktionen bedingen die Aktivierung verschiedener Signalwege, die zur Aktivierung von NFκB, p38, c-Jun-NH₂-Kinase, Janus-Kinasen/Signal-Transducer und Aktivatoren der Transkription (JNK/STAT)- und Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) führen (Vonderheide, 2007). Wie andere TNF-Rezeptoren, z.B. Fas und TNFR1, so liegt auch CD40 als vorgeformter Rezeptorkomplex in der Plasmamembran vor (Bodmer *et al.*, 2002). Es ist auch eine lösliche Form von CD40 bekannt, sie entsteht durch proteolytische

Prozessierung und wird von mitogenaktivierten primären B-Zellen und Epstein-Barr Virus (EBV) -transformierten B-Zelllinien gebildet (Banchereau *et al.*, 1994, Bodmer *et al.*, 2002).

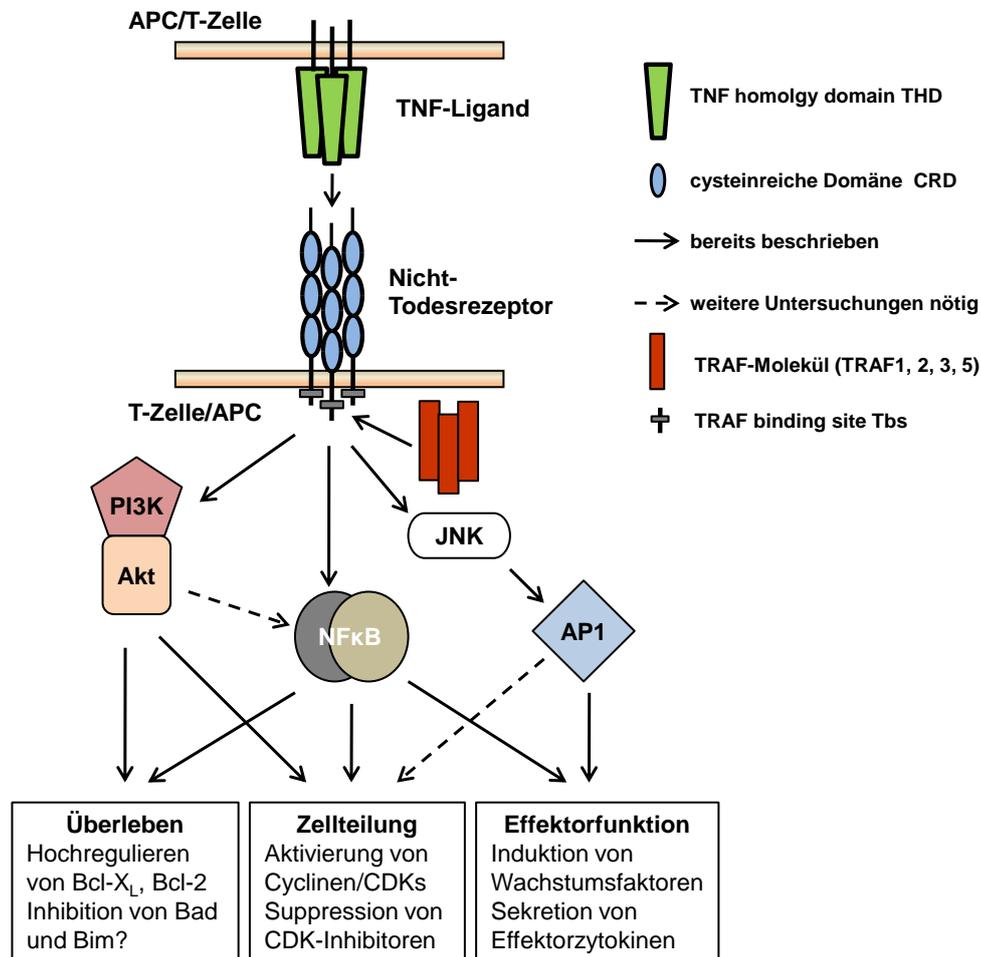


Abb. 3 Modell der kostimulierenden Signalwege durch TNF-Nicht-Todesrezeptoren.

CD40 wird auf B-Zellen in fast allen Differenzierungsstadien, auf Thymusepithel, Dendritischen Zellen, Monozyten und, auf niedrigem Level, auch auf T-Zellen exprimiert (Clark, 1990, Alderson *et al.*, 1993). Auf B-Zellen kann die Expression von CD40 durch Interleukin (IL)-4, Immunglobulin (Ig) M-spezifische Antikörper, monoklonale CD20-spezifische Antikörper, Phorbol ester oder Interferon (INF) γ verstärkt werden (Clark, 1990). Im Allgemeinen wird die Oberflächenexpression von CD40 nach Aktivierung von B-Zellen induziert, bei der Differenzierung zu Plasmazellen aber herunter reguliert (Gruss und Dower, 1995). Die Stimulation von CD40 hat auf B-Zellen verschiedene Effekte, wie

z.B. Induktion der kurz- oder langfristigen Proliferation, die IgE-Sekretion in Anwesenheit von IL-4, und in Kombination mit IL-2 oder IL10 die Sekretion anderer Ig-Isotypen (Banchereau *et al.*, 1994). Des Weiteren kann die Expression von Bcl-2 induziert werden (Liu *et al.*, 1991), und B-Zellen der Keimzentren können *in vitro* vor spontaner Apoptose geschützt werden (Liu *et al.*, 1989). Zusätzlich zur Wirkung auf B-Zellen kann die Aktivierung von CD40 die Proliferation und Zytokinsekretion in T-Zellen kostimulieren, sowie die Expression von CD25 und CD40L verstärken (Armitage *et al.*, 1993). Primäre Blutmonozyten exprimieren CD40 nur in geringen Mengen, durch Zytokine wie den Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF), IL3 oder INF γ wird die Oberflächenexpression von CD40 hochreguliert, durch Stimulation mit CD40L wird die Produktion von TNF α , IL6 und IL-8 und die tumorbekämpfende Aktivität von Monozyten induziert bzw. verstärkt (Alderson *et al.*, 1993).

CD40L (CD154, TNFSF5) ist ein Typ 2-Transmembranprotein mit einer Molekülmasse von 33 kDa (Armitage, 1994). Der Ligand wird nach Aktivierung auf T-Zellen sehr schnell exprimiert (Maximum nach acht bis zehn Stunden) und ist straff reguliert (24 Stunden nach Aktivierung auf Anfangsniveau) (Armitage *et al.*, 1993, Gruss und Dower, 1995), dabei scheint die Expression auf aktivierte CD4⁺ T-Zellen beschränkt zu sein. Allerdings konnte das Transkript auch in Basophilen- und Mastzelllinien (Gauchat *et al.*, 1993) sowie in CD8⁺ T-Zellen, Natürlichen Killer (NK)-Zellen und Monozyten (Cocks *et al.*, 1993) nachgewiesen werden. Durch Mutationen im *CD40L*-Gen kann es zum Expressionsverlust von CD40L oder zur Expression eines funktionslosen Ligandmoleküls auf der T-Zell-Oberfläche kommen. Da der CD40L auf dem X-Chromosom kodiert ist, hat dies das sogenannte „X-linked hyper-IgM syndrome“ (HIGM) zur Folge. Es zeichnet sich aus durch: erhöhte Serum-IgM-Spiegel bei gleichzeitiger Abwesenheit von anderen Ig-Isotypen, der Ausbildung von Keimzentren in lymphatischen Geweben und der Anfälligkeit Betroffener gegenüber opportunistischen Infektionen. *In vitro*-Experimente mit B-Zellen von HIGM-Patienten deuten darauf hin, dass das CD40L-Signal essentiell für den Ig-Isotypwechsel und die Ig-Sekretion *in vivo* ist (Spriggs *et al.*, 1993).

Für CD40L ist schon lange bekannt, dass er durch retrograde Signale auch die eigene Zelle kostimulieren kann (Banchereau *et al.*, 1994). Diese Kostimulation ist wichtig für die Entwicklung von CD4⁺ T-Zell-Effektorfunktionen. Der molekulare Mechanismus der retrograden CD40L-Signaltransduktion ist bisher noch unklar. Aber es gibt Hinweise darauf, dass die Stimulation von CD40L in T-Zellen die Phosphorylierung von zellulären Proteinen wie Lck und Phospholipase C γ (PLC γ) induziert, was nachfolgend zur Aktivierung von Proteinkinase C γ (PKC γ) führt (Sun und Fink, 2007). Es kann auch die Aktivierung von JNK und p38 induziert werden (Brenner *et al.*, 1997a und b).

3.2.1.2 OX40 und OX40L

OX40 (CD134, ACT35, TNFRSF4) ist ein Typ 1-Transmembranprotein, das in seiner extrazellulären Domäne vier der für TNF-Rezeptoren typischen CRDs aufweist. Intrazellulär besitzt der Rezeptor keine DD, dafür aber Bindestellen für TRAF-Proteine. OX40 wird ausschließlich auf aktivierten T-Zellen exprimiert, in naiven T-Zellen erfolgt die Induktion innerhalb von 12 bis 24 Stunden nach Antikörperkontakt, Gedächtnis-T-Zellen können den Rezeptor bereits nach vier Stunden hochregulieren (So und Croft, 2007). Die Expression wird dabei bevorzugt auf CD4⁺ T-Zellen induziert. Auf CD8⁺ T-Zellen kommt es nur nach einem starken Antigenstimulus zur OX40-Induktion (Tone *et al.*, 2007). Intrazelluläre Interaktionspartner sind TRAF2, 3 und 5. TRAF2 und 5 sind für die Aktivierung des NF κ B-Signalwegs verantwortlich, wobei TRAF2 MAP3-Kinasen rekrutiert und aktiviert, TRAF5 hingegen das OX40-Signal moduliert und so Änderungen der Zytokinproduktion oder der Proliferation hervorruft. TRAF3 tritt als Gegenspieler von TRAF2 auf, da TRAF3 die TRAF2-vermittelte NF κ B-Aktivierung inhibiert. Das kostimulatorische OX40-Signal führt nach initialer T-Zell-Aktivierung zur Stimulation des JNK-, p38- und NF κ B-Signalwegs, parallel kann PI3K induziert werden, was die Aktivierung der Proteinkinase B (PKB) und eine Hochregulierung antiapoptotischer Moleküle, z.B. Bcl-X_L, zur Folge hat. Dies liefert den aktivierten T-Zellen ein Überlebenssignal und induziert die Produktion von Zytokinen (Watts, 2005). OX40 ist ein wichtiger Faktor in der Stimulation von Immunantworten, er vermittelt einen „cross-talk“

zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie Zell-Zell-Adhäsion. OX40 liefert aber auch einen Feedback-Mechanismus für die Regulation der Immunantwort, indem nach einer Absättigung mit funktionellem OX40 in OX40⁺ T-Zellen auf ein Signal durch OX40L von APCs nicht mehr geantwortet wird (Kondo *et al.*, 2007).

OX40L (gp34, TNFSF4) wird als Mitglied der TNF-Ligandenfamilie als Typ 2-Transmembranprotein exprimiert und besitzt carboxyterminal die extrazellulär lokalisierte THD, welche die Trimerisierung und Rezeptorbindung vermittelt (Bodmer *et al.*, 2002). Auf ruhenden Zellen ist OX40L nicht detektierbar, wird aber nach Aktivierung von DCs, Langerhans-Zellen, B-Zellen, Natürlichen Killer (NK)-Zellen, vaskulären Endothelzellen, Mastzellen und aktivierten T-Zellen auf diesen hochreguliert (Kondo *et al.*, 2007). In T-Zellen führt eine Aktivierung des Liganden zu keinem retrograden Signal *in vitro*, für APCs ist allerdings bekannt, dass nach OX40-Bindung z.B. DCs verstärkt IL12 produzieren, und es in B-Zellen zu einer verstärkten Differenzierung kommt (Kondo *et al.*, 2007).

3.2.1.3 CD27 und CD27L

CD27 (Tp55, TNFRSF7) wird als 242 Aminosäuren großes Typ 1-Transmembran exprimiert, extrazellulär besteht es aus zwei vollständigen CRDs mit je 6 Cysteinresten und einer CRD mit nur 4 Cysteinresten, alle drei bilden zusammen die Ligandenkontaktstelle (Gardnerova *et al.*, 2000, Croft, 2003b). Das Molekül formt sich zu Homodimeren, die über eine extrazelluläre Disulfidbrücke nahe der Transmembrandomäne verbunden sind (Armitage, 1994). Durch proteolytische Abspaltung kann ein lösliches Produkt von 28 bis 32 kDa entstehen (Armitage, 1994, Gruss und Dower, 1995). Intrazellulär besitzt der Rezeptor keine DD, seine 47 Aminosäuren umfassende cytoplasmatische Domäne besitzt ein konserviertes Motiv, woran TRAF-Moleküle binden können (TRAF2, 3, 5). Der Hauptbindungspartner ist TRAF2, er vermittelt die Aktivierung von NFκB und des JNK/AP-1-Transkriptionskomplexes (Croft, 2003a und b, Borst *et al.*, 2005). Nach CD27-Stimulation wird sowohl der klassische, als auch der alternative NFκB-Signalweg aktiviert, was zur

Induktion von Schutzfaktoren gegen Apoptose führt. Es wurde aber auch gezeigt, dass der CD27-Rezeptor mit Siva (CD27-Bindeprotein) interagieren kann, wodurch proapoptische Proteine, wie z.B. Fas, hochreguliert und die Induktion von Apoptose begünstigt werden kann (Borst *et al.*, 2005). CD27 wird konstitutiv auf ruhenden (naiven) T-Zellen exprimiert (Croft, 2003a und b), dabei ist eine Expression von CD27 mit dem T-Helferzell-Phänotyp assoziiert. Ebenso findet man den Rezeptor auf aktivierten B- und T-Zellen (medulläre Thymozyten, periphere Blut-T-Zellen, teilweise auf maturaen T-Zellen und NK-Zellen) (Armitage, 1994, Gruss und Dower, 1995). Eine Hochregulation der CD27-Expression erfolgt nach CD3-abhängiger T-Zell-Aktivierung. Dabei wird sowohl die membranständige als auch die lösliche Form (sCD27) des Rezeptors induziert (Armitage, 1994, Croft, 2003a und b). sCD27 dient als ein *in vivo*-Marker für die Aktivität des Immunsystems (Gruss und Dower, 1995). Die Aktivierung von CD27 führt zu einer Kostimulation aktivierter T-Zellen (Gruss und Dower, 1995, Gardnerova *et al.*, 2000, Croft, 2003a und b), zu einer Generierung von Gedächtniszellen, zur Expansion zytotoxischer T-Zellen (CTL), zu einer verstärkten Proliferation und Zytokinsekretion sowie bei B-Zellen zu einer erhöhten Immunglobulinsekretion (Armitage, 1994, Gruss und Dower, 1995) und sie unterstützt die primäre klonale Teilung und Expansion (Croft, 2003a und b). Da sowohl der Ligand als auch der Rezeptor auf aktivierten Lymphozyten exprimiert werden, ist auch eine autokrine T-Zell-Aktivierung und -Wachstumskontrolle möglich (Gruss und Dower, 1995).

Der Ligand CD27L (CD70, TNFSF7) wird als Typ 2-Transmembranprotein mit 193 Aminosäuren exprimiert, dabei bildet er, vermittelt durch seine carboxyterminale THD, homotrimere bzw. -multimere Komplexe (Gruss und Dower, 1995, Gardnerova *et al.*, 2000, Bossen *et al.*, 2006). CD27L wird auf verschiedenen Immunzellen exprimiert, z.B. auf aktivierten B- und T-Zellen, Monozyten und Makrophagen, professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs), ebenso auf peripheren T- und B-Zell-Lymphomen, allerdings ist CD27L weder auf DCs noch auf ruhenden Zellen nachweisbar (Armitage, 1994, Gruss und Dower, 1995, Gardnerova *et al.*, 2000, Croft, 2003a). Die CD27L-

Expression wird auf T-Zellen nach deren Aktivierung induziert, wobei sie ihr Maximum nach ca. sechs Stunden erreicht (Gruss und Dower, 1995). Eine Regulation erfolgt in B- und T-Zellen durch exogenes IL-4, woraufhin das Expressionslevel sinkt (Croft, 2003a und b). Die intrazelluläre Domäne von CD27L kann mit Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) und Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) interagieren. In primären B-Zellen reguliert CD27L den Zellzyklus (Arens *et al.*, 2004), in T-Zellen und NK-Zellen induziert es Zytotoxizität (Garcia *et al.*, 2004). Der Ligand besitzt in seinem zytoplasmatischen Teil fünf konservierte Reste und zwei Cysteine innerhalb der Transmembrandomäne. Allerdings ist die Relevanz dieser Reste für retrograde Signaltransduktion noch nicht vollständig geklärt (Borst *et al.*, 2005).

3.2.1.4 GITR und GITRL

Der „Glucocorticoid Induced TNF family Receptor“ GITR (murin) bzw. „Activation Induced TNF family Receptor“ AITR (human) (TNFRSF18) kodiert für ein 234 Aminosäuren umfassendes Typ 1-Transmembranprotein. Es besteht im extrazellulären Teil aus drei CRDs, wobei die erste Domäne acht Cysteine, die zweite Domäne sieben Cysteine und die dritte Domäne nur 3 Cysteine enthält (Kwon *et al.*, 1999, Gurney *et al.*, 1999, Gardnerova *et al.*, 2000). Auch dieser Rezeptor besitzt keine intrazelluläre DD (Gardnerova *et al.*, 2000). Als Interaktionspartner binden an die zytoplasmatische Domäne TRAF1, 2 und 3, wobei TRAF2 die Aktivierung von NFκB induziert, TRAF1 und 3 hingegen als negative Regulatoren auf die NFκB-Induktion wirken (Kwon *et al.*, 1999). Die Expression ist assoziiert mit dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem (NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen, DCs, Mastzellen, B- und T-Zellen) (Nocentini 2005, *et al.* 2007). Auf T-Zellen wird GITR stärker auf CD4⁺ als auf CD8⁺ Zellen exprimiert, in regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) ist GITR konstitutiv hoch exprimiert (Gardnerova *et al.*, 2000, Nocentini, 2005). Der Rezeptor wird nach Stimulation bzw. Aktivierung von peripheren Blutmonozyten (PBMCs) innerhalb von 24 bis 48 Stunden induziert (Kwon *et al.*, 1999), in T-Zellen erfolgt eine Hochregulierung durch aktivierende Stimuli (Gardnerova *et al.*, 2000 Nocentini 2005, *et al.* 2007). Die Aktivierung von GITR führt zu einer erhöhten

Resistenz gegenüber Apoptose (Gardnerova *et al.*, 2000). Werden Effektor-T-Zellen durch GITR-Stimulation koaktiviert, führt das zu einer verstärkten T-Zell-Rezeptor-induzierten Proliferation und Zytokinproduktion, gleichzeitig vermittelt das Signal einen Schutz vor dem aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) (Gurney *et al.*, 1999, Nocentini *et al.*, 2007). Durch die Stimulation von GITR wird die Aktivität von T_{reg}S moduliert, z.B. kann die Suppressoraktivität von regulatorischen T-Zellen durch die Aktivierung von GITR inhibiert, aber auch verstärkt werden (Nocentini 2005, *et al.* 2007). Findet die GITR-Aktivierung auf T-Zellen durch GITRL auf Endothelzellen statt, kann dies zum T-Zell-Trafficking beitragen (Kwon *et al.*, 1999, Gardnerova *et al.*, 2000). Die Aktivierung von GITR erhöht die Resistenz gegenüber Tumoren und viralen Infektionen und ist beteiligt an Autoimmun- und inflammatorischen Prozessen (Nocentini *et al.*, 2007).

Der zu GITR korrespondierende Ligand GITRL (TL6, TNFSF18) wird als Typ 2-Transmembranprotein mit 169 Aminosäuren exprimiert und bildet, im Fall des humanen Moleküls, an der Zelloberfläche über seine THD Homotrimere aus (Kwon *et al.*, 1999, Gurney *et al.*, 1999, Bossen *et al.*, 2006). Muriner GITRL bildet interessanterweise nur Dimere, die aber aktiv sind. GITRL wird auf APCs (Makrophagen, B-Zellen und DCs) sowie Endothelzellen, im Pankreas und konstitutiv auf HUVECs („Human Umbilical Vein Endothelial Cells“) exprimiert (Kwon *et al.*, 1999, Gardnerova *et al.*, 2000, Nocentini *et al.*, 2007). Induziert wird GITRL nach T-Zell-Aktivierung sowie in APCs durch pro-inflammatorische Faktoren (Nocentini *et al.*, 2007), in HUVECs kann die Expression durch Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) noch zusätzlich gesteigert werden (Kwon *et al.*, 1999). Für den Liganden sind keine intrazellulären Interaktionspartner bekannt, es können trotzdem retrograde Signale in die Zelle weitergegeben werden: In Makrophagen induziert GITRL die Produktion von pro-inflammatorischen Faktoren, und für DCs ist durch retrogrades Signaling eine Modulation der Zellaktivität bekannt (Nocentini *et al.*, 2007).

3.2.1.5 41BB und 41BBL

41BB (CD137, ILA, TNFRSF9) ist ein 255 Aminosäuren umfassendes Typ 1-Transmembran-Glykoprotein (Schwarz *et al.*, 1993), das auf humanen PBMCs (Pollok *et al.*, 1994), NK-Zellen und Monozyten (Melero *et al.*, 1998), aktivieren T-Zellen (Hurtado *et al.*, 1995), aber auch auf hepatozellulären Karzinomen, bei Morbus Crohn und Rheumatoider Arthritis (Maerten *et al.*, 2004, Jung *et al.*, 2004) exprimiert wird. Die Induktion der 41BB-Expression auf T-Zellen erfolgt CD3/CD28-abhängig (Pollok *et al.*, 1994, Hurtado *et al.*, 1995) und wird durch NFκB und AP-1 reguliert (Kim *et al.*, 2003). Durch die Interaktion mit TRAF-Proteinen (TRAF1, 2, 3) wird durch 41BB der NFκB-Signalweg aktiviert. Dies führt zu der Expression von antiapoptotischen Proteinen und damit zum besseren Überleben der Zelle (Schwarz *et al.*, 1993, Lee *et al.*, 2002), indem es den aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) verhindert. Des Weiteren verstärkt die 41BB-Aktivierung die T-Zell-Expansion und die Induktion der Zytokinproduktion (Shin *et al.*, 2007).

41BBL (TNFSF9) ist ein Typ 2-Transmembranprotein, bestehend aus 254 Aminosäuren, mit einer Molekülmasse von ca. 25 kDa. Es lässt sich eine lösliche Form von ca. 20 kDa ableiten, die in ihrer biologisch aktiven Form einen trimeren Komplex (ca. 60 kDa) bildet (Armitage, 1994, Smith *et al.*, 1994). Exprimiert wird 41BBL auf aktivierten APCs (Makrophagen, Dendritischen Zellen, B-Zellen) und aktivierten T-Zellen und kann durch LPS, Immunglobuline oder CD40L induziert werden (Armitage, 1994, Croft, 2003a und b, Kang *et al.*, 2007). Es ist bekannt, dass 41BBL mit Hilfe des Toll-like Rezeptor (TLR) 4 intrazellulär Signale generiert. So induziert 41BBL retrograde Signale in B-Zellen die Zellproliferation, in Makrophagen hingegen wird die Produktion von IL-8 und TNFα und die Zelladhäsion induziert (Kang *et al.*, 2007). Da die Expression sowohl des Liganden wie auch des Rezeptors induzierbar ist und ihren Höhepunkt erst Tage nach der initialen Antigenerkennung erreicht, ist anzunehmen, dass die 41BBL-41BB-Interaktion zu diesem späteren Zeitpunkt wichtig für die Aufrechterhaltung des Immunsignals ist (Croft, 2003b).

3.2.2 Todesrezeptoren

Die apoptoseinduzierenden TNF-Rezeptoren zeichnen sich durch einen homologen, 60 AS umfassenden Abschnitt in ihrer zytoplasmatischen Domäne aus, die Todesdomäne (DD) (Itoh und Nagata, 1993, Tartaglia *et al.*, 1993). TNF-Rezeptoren, die eine solche DD besitzen, sind TNFR1, Fas, TRAILR1, TRAILR2, DR3, DR6, EDAR und NGFR (Bodmer *et al.*, 2002). Durch Rekrutierung von Adapterproteinen und proapoptischen Proteasen können diese Rezeptoren Apoptose induzieren. Die Apoptose ist ein Mechanismus, bei dem auf geregelte Art und Weise Zellen ohne Entzündungsreaktion eliminiert werden. Die Integrität der Plasmamembran der Zelle bleibt dabei erhalten und es bilden sich apoptotische Vesikel, die von Makrophagen aufgenommen und entsorgt werden (Hengartner, 2000). Merkmale der Apoptose sind ein Schrumpfen der Zelle, Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien (Kluck *et al.*, 1997) sowie die Kondensation der DNA mit anschließender Fragmentierung in ca. 180 Basenpaar große Bruchstücke (Wyllie *et al.*, 1984). Eine entscheidende Rolle in der Apoptose spielen die Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Proteasen (Caspasen) (Thornberry und Lazebnik, 1998, Kidd *et al.*, 2000). Bindet ein „Todesligand“ an seinen Todesrezeptor, bedingt diese Interaktion eine Reorganisation der Rezeptoreinheiten, was zur Ausbildung des „death inducing signaling complex“ (DISC) führt (Kischkel *et al.*, 1995). Teil dieses speziellen Komplexes sind neben dem Todesliganden und dem Todesrezeptor selbst die folgenden Komponenten: das Adaptermolekül „Fas associated death domain“ (FADD) und die Initiatorcaspase-8 und -10. Das Adapterprotein FADD enthält neben der Todesdomäne, die für die Interaktion mit dem Todesrezeptor benötigt wird, eine sogenannte „death effector domain“ (DED). Dieser Bereich ist verantwortlich für die Rekrutierung der Pro-Caspase-8, die aminoterminal ebenfalls zwei DEDs besitzt (Muzio *et al.*, 1996, Boldin *et al.*, 1996). In dem „induced proximity“ Modell geht man davon aus, dass bei der Bildung eines DISCs zahlreiche Procaspase-8-Monomere in räumliche Nähe zueinander gebracht werden und dies zu einer aktivierenden Dimerisierung und anschließender autoproteolytischer Spaltung und Stabilisierung der Caspase-8 führt (Boatright *et al.*, 2003). Die Caspase-8-

Reifung kann allerdings durch zelluläre „FADD-like Interleukin-1 β -converting enzyme“ (FLICE)-inhibitorische Proteine (FLIP) inhibiert werden (Wajant *et al.*, 2003). Die prozessierten Caspase-8-Heterotetramere lösen sich vom DISC und können weitere Signalwege aktivieren (Walczak *et al.*, 1999, Peter und Krammer, 2003). Hier unterscheidet man zwei Typen, den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg der Apoptose. Beim extrinsischen Apoptoseweg werden Effektorcaspasen, wie die Caspase-3, direkt aktiviert. Diese spalten wiederum verschiedene zelluläre Substrate (z.B. Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase, Lamine, Cytokeratine) und bedingen somit den eigentlichen Zelltod (Walczak *et al.*, 1999). Der intrinsische Signalweg wird durch ein weiteres Caspase-8-Substrat vermittelt, das proapoptotische „BH3-only“-Protein Bid, ein Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie. Wird dieses Molekül von Caspase-8 gespalten, entsteht eine verkürzte Form, das sogenannte „truncated Bid“ (tBid). tBid wandert zum Mitochondrium und bewirkt die Aggregation der proapoptotischen Bcl-2-Proteine Bax und Bak. Daraufhin werden Cytochrom C und andere proapoptotische Faktoren, wie Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI) und HtrA2/Omi, aus dem Mitochondrium freigesetzt (Vaux und Silke, 2003, Vande *et al.*, 2008). Zusammen mit dem „Apoptosis Inducing Factor 1“ (Apaf-1), ATP und der Procaspase-9 bildet Cytochrom C das Apoptosom, innerhalb dessen die Caspase-9 aktiviert wird, welche wiederum die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 spaltet und dadurch die Apoptose einleitet (Sprick und Walczak, 2004, Kelley und Ashkenazi, 2004). Freigesetztes Smac/DIABLO und HtrA2/Omi binden an „Inhibitors of Apoptosis Proteins“ (IAPs), wie z.B. XIAP, und verhindern dadurch, dass die IAPs an Effektorcaspasen binden und diese inhibieren können. Dadurch wird die Caspase-3-Aktivierung weiter verstärkt (Kelley und Ashkenazi, 2004) (Abb. 4).

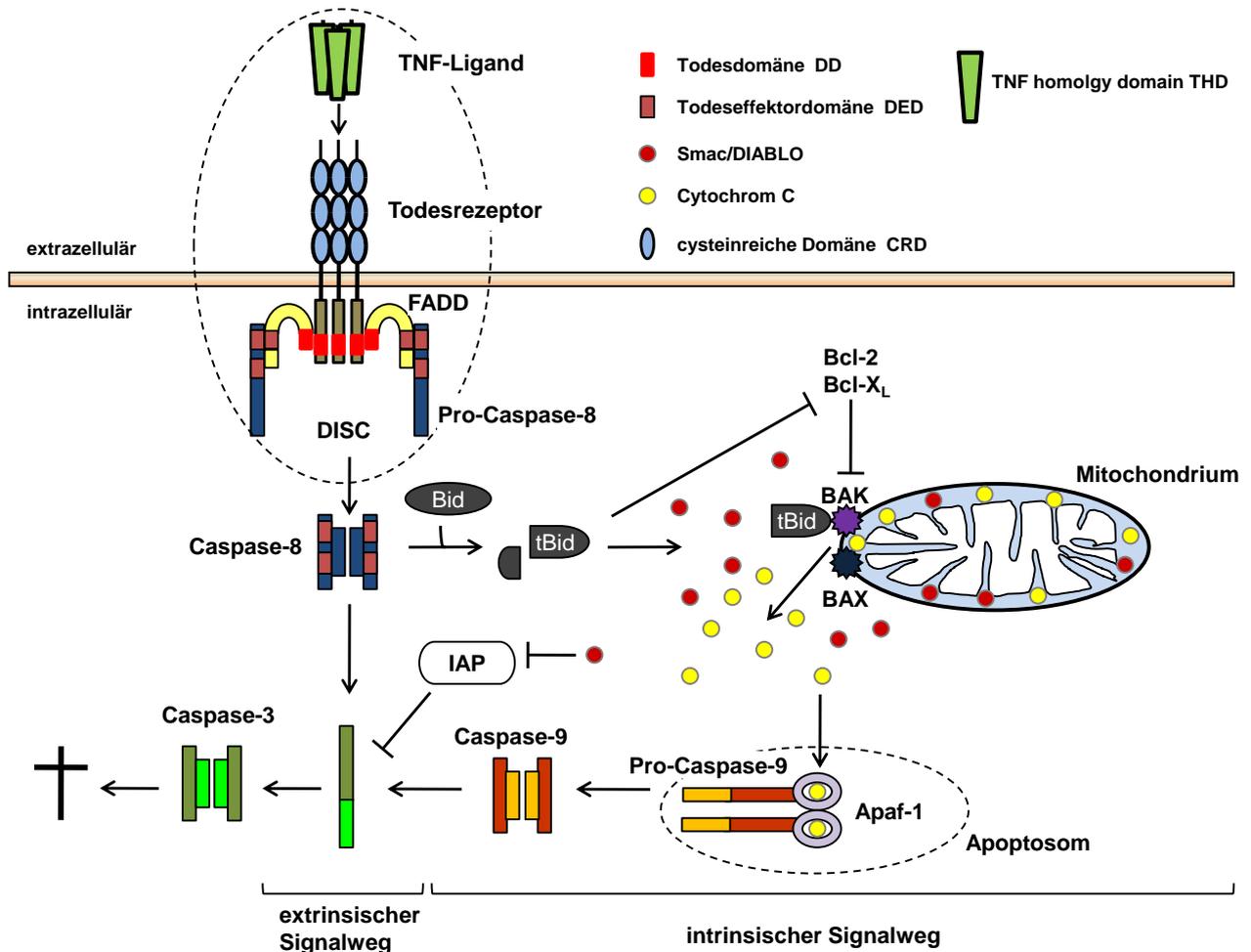


Abb. 4 Aktivierung des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalwegs durch Todesrezeptoren.

3.2.2.1 Das Fas-FasL-System

Fas (FS7-associated cell surface antigen) (CD95, APO-1, TNFRSF6) wurde 1989 entdeckt. Die Gruppen von Shin Yonehara und Peter Kramer waren die ersten, die von der Induktion eines exzessiven apoptotischen Zelltods berichteten, nachdem Zellen mit Fas-spezifischen monoklonalen Antikörpern inkubiert wurden (Traut *et al.*, 1989, Yonehara *et al.*, 1989). Fas repräsentiert den Prototyp der Todesrezeptoruntergruppe der TNF-Rezeptorfamilie. Der Rezeptor wird als Typ 1-Transmembranprotein exprimiert und besitzt wie alle Mitglieder der TNF-Rezeptorsuperfamilie innerhalb der extrazellulären Domäne cysteinreiche Motive (CRD). Im Fall von Fas sind es drei CRDs (Locksley *et al.*, 2001, Zhang, 2004) und eine „Pre Ligand Assambly Domain“ (PLAD) (Chan, 2000). Diese Domänen sind essentiell für die Ausbildung vorgeformter, inaktiver Rezeptorkomplexe

sowie für die Bindung des Liganden (Orlinick *et al.*, 1997). Die intrazelluläre Todesdomäne (DD) ist, wie bereits zuvor ausgeführt, ein gemeinsames Strukturmotiv aller Todesrezeptoren (Itoh und Nagata, 1993, Chan *et al.*, 2000). Aufgrund von alternativen Spleißvorgängen sind bis jetzt sieben mRNA-Varianten bekannt, die für verschiedene lösliche Formen von Fas kodieren. Diese besitzen *in vivo* negativ-regulatorische Effekte (Cheng *et al.*, 1994, Wajant *et al.*, 2003). Exprimiert wird der Fas-Rezeptor von vielen verschiedenen Zelltypen, einschließlich Fibroblasten, epithelialen Zellen und von Zellen des hämatopoetischen Systems. Bei letzteren konnte eine Verbindung zwischen Fas-Expression und dem Reifungsstatus hergestellt werden (Stahnke *et al.*, 1998). Durch die Aktivierung von Fas können verschiedene Effekte induziert werden: Apoptose, NFκB-Aktivierung und JNK-Aktivierung. Bindet Membran-FasL, ein agonistischer Fas-Antikörper oder immobilisierter löslicher FasL an Fas, kommt es zur Ausbildung supramolekularer Rezeptor-Cluster und der Formierung des DISC (death inducing signaling complex) (Aoki *et al.*, 2001, Algeciras-Schimmich *et al.*, 2002) und der Induktion von Apoptose (Abb. 4). Die Aktivierung von Fas kann aber nicht nur Apoptose auslösen, sie kann auch den NFκB-Signalweg aktivieren. Da im Fall der Apoptoseinduktion die Aktivierung von Caspasen den NFκB-Signalweg inhibiert, ist die Fas-vermittelte Aktivierung dieses Signalwegs vor allem in apoptoseresistenten Zellen relevant. An der Fas-vermittelten NFκB-Aktivierung sind FADD, Caspase-8 und Receptor Interacting Protein (RIP) beteiligt (Wajant *et al.*, 2000, Kreuz *et al.*, 2004). Weitere von Fas induzierte Signalwege führen zur Aktivierung der cJun N-terminalen Kinase (JNK), dies kann apoptoseassoziiert erfolgen, aber abhängig oder unabhängig von aktiven Caspasen sein. Im ersten Fall führen aktive Caspasen zur Spaltung und Aktivierung von Komponenten des JNK-Signalwegs, wie z.B. der MAP3-Kinase MEKK1 (Cardone *et al.*, 1997, Widmann *et al.*, 1997, Widmann *et al.*, 1998), oder zur Spaltung und Inaktivierung von JNK-assoziiertem inhibitorischem p21^{waf1/cip1} (Ham *et al.*, 2003). Im zweiten, caspaseunabhängigen Szenario erfolgt die JNK-Aktivierung durch Bindung von Death Domain Associated Protein 6 (DAXX) an den aktivierten Fas-Rezeptor und anschließender Rekrutierung von Apoptosis

Signaling Kinase-1 (ASK1, MAP3K5), einer MAP3-Kinase, welche den JNK-Signalweg aktiviert. Fas-vermittelte JNK-Aktivierung kann auch schon unter nicht-apoptischen Bedingungen beobachtet werden.

Als ein Mitglied der TNF-Liganden wird auch FasL (CD178, CD95L, TNFSF6) als ein Typ 2-Transmembranprotein, mit einem Molekulargewicht von 40 kDa, exprimiert. Die extrazelluläre Domäne von FasL enthält die charakteristische THD, die die Homotrimerisierung des Liganden und die Rezeptorbindung vermittelt (Bodmer *et al.*, 2002). Der intrazelluläre Bereich von FasL hat eine Prolin-reiche Domäne (PRD), die eine Interaktion mit Proteinen ermöglicht, die über Prolin-Bindemotive, z.B. die Src homology 3 (SH3)- oder WW-Domänen, verfügen (Wenzel *et al.*, 2001, Blott *et al.*, 2001). Zusätzlich sind einige Tyrosinphosphorylierungsstellen und ein „doppeltes“ Caseinkinase-Phosphorylierungsmotiv vorhanden (Janssen *et al.*, 2003). Diese Domänen sind funktionell am FasL-Sorting und an der reversen Signaltransduktion beteiligt (Blott *et al.*, 2001, Janssen *et al.*, 2002). FasL kann sowohl als membrangebundenes, als auch als lösliches Protein vorkommen. Die lösliche Variante entsteht durch alternatives Spleißen oder durch proteolytische Prozessierung des membranständigen Liganden, z.B. durch Metalloprotease-3 und -7, die das FasL-Molekül zwischen Lysin129 und Glutamin130 spalten und dadurch von der Membran entfernen (Tanaka *et al.*, 1998). Obwohl beide Formen des Liganden Fas binden können, zeigt nur membrangebundener oder immobilisierter FasL eine robuste Fas-Aktivierung (Schneider *et al.*, 1998, Shudo *et al.*, 2001). Löslicher FasL kann zum Einen mit membrangebundenem FasL um die Rezeptorbindung konkurrieren und daher antagonistisch wirken (Tanaka *et al.*, 1998, Schneider *et al.*, 1998). Zum Anderen ist es möglich, dass er nach die Bindung an extrazelluläre Matrixkomponenten zu einem Antagonisten wird (Aoki *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde berichtet, dass löslicher FasL als Chemoattraktant wirkt und bei neutrophilen Granulozyten und Phagozyten zu einer gesteigerten Migration in entzündetes Gewebe führt (Seino *et al.*, 1998, Ottonello *et al.*, 1999). Diese Befunde wurden in anderen Studien aber nicht bestätigt.

3.2.2.2 Die TRAIL-Rezeptoren und ihr Ligand TRAIL

„TNF Related Apoptosis Inducing Ligand“ (TRAIL) kann mit fünf Rezeptoren interagieren: TRAILR1 (DR4, TNFRSF10a), TRAILR2 (DR5, KILLER, TRICK2, Apo2, TNFRSF10b), TRAILR3 (DcR1, TRIDD, LID, TNFRSF10c) und TRAILR4 (DcR2, TRUNND, TNFRSF10d) und Osteoprotegerin (OPG, TNFRSF11B). Alle Rezeptoren weisen die für TNF-Rezeptoren typischen CRDs auf. Besonders ausgeprägte Homologien finden sich zwischen den extrazellulären Domänen von TRAILR1 bis TRAILR4 (Almasan und Ashkenazi, 2003). Ein weiterer, entfernt verwandter Rezeptor ist das lösliche OPG. TRAILR1 und TRAILR2 besitzen beide eine zytoplasmatische Todesdomäne (DD) und können Apoptose induzieren. TRAILR3, TRAILR4 und OPG werden als „decoy“ Rezeptoren bezeichnet, da sie den Liganden TRAIL zwar binden, aber keine Apoptose auslösen können. TRAILR4 besitzt nur eine verkürzte, nicht-funktionelle DD. TRAILR3 besitzt keine cytoplasmatische Region und ist mit der Plasmamembran nur durch einen Glykophospholipidanker verbunden, und OPG ist ein löslicher TRAIL-Rezeptor, der TRAIL mit nur vergleichsweise niedriger Affinität bindet, aber hocheffektiv RANKL neutralisiert (Kelley und Ashkenazi, 2004).

TRAIL (Apo2L, TNFSF10) wurde 1995 aufgrund seiner Sequenzhomologie zu den damals bereits bekannten Mitgliedern der TNF-Familie entdeckt (Wiley *et al.*, 1995, Pitti *et al.*, 1996). Die Aminosäuresequenz von TRAIL besitzt 29% Homologie zu FasL und 23% Homologie zu TNF. TRAIL wird als Typ 2-Transmembranprotein exprimiert, besteht aus 281 Aminosäuren und besitzt eine kurze aminoterminal, zytoplasmatische Domäne (17 Aminosäuren) sowie eine lange carboxyterminale, extrazelluläre Domäne, die mit den TRAIL-Rezeptoren interagiert. TRAIL bildet homotrimere Moleküle, welche durch ein Zink-Atom stabilisiert werden. Dieses Zink-Atom ist an die drei Cysteinreste an Position 230 jeder Liganduntereinheit koordiniert und besitzt eine wichtige Rolle für die optimale biologische Aktivität und die trimere Stabilität von TRAIL (Bodmer *et al.*, 2000, Hymowitz *et al.*, 2000). Die mRNA von TRAIL kann in vielen verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, allerdings scheint die Proteinexpression auf Immunzellen

beschränkt zu sein, z.B. auf aktivierte T-Zellen oder Interferon (INF)- γ -stimulierte Makrophagen (Kelley und Ashkenazi, 2004).

3.3 Mögliche Anwendungen von TNF-Liganden in der Tumorthherapie

Ein großes Interesse bezüglich einer möglichen tumortherapeutischen Anwendung haben vor allem die apoptoseinduzierenden TNF-Rezeptoren Fas, TRAILR1 und TRAILR2 sowie die immunstimulierenden TNF-Rezeptoren CD40, OX40, CD27, GITR und 41BB auf sich gezogen. Es konnte in einer Reihe von tierexperimentellen, präklinischen und klinischen Studien gezeigt werden, dass die Aktivierung dieser TNF-Rezeptoren *in vivo* eine antitumorale Wirkung entwickeln kann. Allerdings ist der therapeutische Effekt, der durch die bloße Aktivierung von den genannten TNF-Rezeptoren induziert wird, meist sehr gering. Daher erscheint der Einsatz entsprechender Agonisten in einer Kombinationstherapie sinnvoller. Es gilt in jedem Fall zu beachten, dass in den Nebenwirkungen, die durch die systemische Wirkung der TNF-Rezeptoren induziert werden können, ein großes Problem liegt.

Die systemische Applikation von Fas-aktivierenden Substanzen (Membran-FasL exprimierende Viren, aggregierter löslicher FasL, agonistische Fas-Antikörper) ist nicht möglich, da Hepatozyten sehr sensitiv gegenüber Fas-induzierter Apoptose sind und es daher durch Gabe dieser Substanzen zu einer Schädigung der Leber kommt. Es gibt aber Ansätze, die eine Rezeptoraktivierung lokal im Tumorgewebe verfolgen, z.B. tumortropische virale Vektoren, die für ein induzierbares Membran-FasL-Gen kodieren, oder lösliche, autoinhibierte FasL-Prodrugs, die erst nach Prozessierung durch tumorassoziierte Proteasen aktiviert werden (Wajant *et al.*, 2005). Insbesondere erlauben auch trimere Antikörper-FasL-Fusionsproteine, deren Antikörperteil tumorspezifische Oberflächenantigene erkennen, eine tumorrestringierte Wirkung.

Das größte tumortherapeutische Interesse innerhalb der Gruppe der apoptoseinduzierenden TNF-Liganden erfährt zurzeit TRAIL bzw. agonistische TRAILR1-

und TRAILR2-spezifische Antikörper, da trimeres lösliches TRAIL auf vielen Tumorzelllinien eine zytotoxische Wirkung zeigt, auf den meisten nicht-transformierten Zellen, z.B. humanen oder nicht-humanen Primatenhepatozyten (Lawrence *et al.*, 2001) oder Keratinozyten (Lawrence *et al.*, 2001, Qin *et al.*, 2001, Ashkenazi, 2002) jedoch keine Apoptose induziert (Almasan und Ashkenazi, 2003). Auch eine systemische Applikation von trimerelem löslichen TRAIL zeigte in Mäusen und Affen keine offensichtlichen Nebenwirkungen, insbesondere keine Leberschädigung (Ashkenzi *et al.*, 1999, Walczak *et al.*, 1999). In verschiedenen Phase I-Studien zeigte trimeres lösliches TRAIL, ein stark agonistischer TRAILR1-spezifischer Antikörper sowie ein schwach agonistischer TRAILR2-spezifischer Antikörper bisher eine gute Verträglichkeit (Duiker *et al.*, 2006). Allerdings deuten Ergebnisse der letzten Jahre darauf hin, dass dieser Ansatz nur eingeschränkt zu nutzen ist. Aggregierte und nicht-aggregierte TRAIL-Trimere unterscheiden sich in ihrer Bioaktivität bezüglich der Aktivierung von TRAILR1 und TRAILR2. Aggregiertes TRAIL wirkt wesentlich toxischer auf Tumorzellen als nicht-aggregiertes, trimeres TRAIL, kann aber auch in einer Reihe von normalen Zellen Apoptose auslösen, z.B. in Keratinozyten, Endothelzellen, Astrozyten und unter bestimmten Bedingungen in Hepatozyten (Jo *et al.*, 2000, Lawrence *et al.*, 2001). Dadurch erhöht sich auch das Risiko von Nebenwirkungen (Koschny *et al.*, 2007). Für TRAIL konnte weiterhin *in vitro* und in Mausmodellen gezeigt werden, dass es vor allem in apoptoseresistenten Tumorzellen entzündliche Prozesse in Gang setzt, welche eine erhöhte Metastasierung und Invasivität dieser Zellen zur Folge haben können (Siegmond *et al.*, 2005, Trauzold *et al.*, 2006, Koschny *et al.*, 2007). In einer Vielzahl von Tumorzellen induziert TRAIL nur in Kombination mit Chemotherapeutika effektiv Apoptose. Dass diese Chemotherapeutika aber auch normale, nicht transfizierte Zellen für die apoptotische TRAIL-Wirkung sensitivieren, wurde bereits an Keratinozyten, Hepatozyten und Osteoblasten beobachtet (Koschny *et al.*, 2007). Eine Möglichkeit, die genannten Probleme zu vermeiden, bieten tumorlokal wirkende TRAIL-Varianten.

CD40 ist für die Aktivierung antigenpräsentierender Zellen (APCs), wie z. B. Dendritische Zellen und B-Zellen, sehr wichtig. Es wurde gezeigt, dass durch eine systemische Aktivierung von CD40 die T-Zell-Toleranz in tumortragenden Mäusen überwunden und dadurch eine wirkungsvolle antitumorale Antwort des adaptiven Immunsystems induziert werden kann, bzw. die Wirkung von koapplizierten Vakzinen verstärkt wird. Unabhängig davon kann, durch einen bisher noch wenig verstandenen Mechanismus, die Aktivierung von CD40 in Tumorzellen Apoptose induzieren (Vonderheide, 2007). Da die Expression von CD40 auch auf malignen B-Zellen, wie z.B. bei Lymphomen (B-Zell-Non-Hodgkin Lymphom, NHL) oder Leukämien (B-Zell chronische lymphatische Leukämie, CLL), häufig nachzuweisen ist, wäre dies ein potentieller Kandidat für alternative Behandlungsansätze, wie z.B. das Tumor-Targeting (Gruss und Dower, 1995). In Phase I-Studien mit Membran-CD40 exprimierenden adenoviralen Vektoren, agonistischen CD40-spezifischen Antikörpern und einem rekombinanten löslichen CD40L-Molekül konnten teilweise therapeutische Effekte erzielt werden, allerdings zeigten sich auch signifikante systemische Nebenwirkungen wie Fieber oder das Zytokin-Freisetzungssyndrom („Cytokine Storm“) (Vonderheide, 2007).

Weitere wichtige kostimulatorische TNF-Rezeptoren sind CD27, OX40 und 41BB. Sie werden von T-Zellen exprimiert und sind z.B. wichtig für das Überleben aktivierter T-Zellen oder die Bildung von Gedächtniszellen (Sugamura *et al.*, 2004, Vinay *et al.*, 2006, Barr *et al.*, 2006). In verschiedenen syngenem Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass mit agonistischen OX40- und 41BB-spezifischen Antikörpern gegen wenig immunogene Tumorzellen eine starke antitumorale Immunantwort induziert werden kann (Sugamura *et al.*, 2004, Vinay *et al.*, 2006). Durch systemische Applikation von agonistischen OX40- oder 41BB-spezifischen Antikörpern können allerdings auch Nebenwirkungen auftreten, so z.B. die Induktion einer INF γ -Freisetzung durch CD8⁺/CD11⁺ T-Zellen, was zu einer Inhibition von CD4⁺ T-Zellen sowie zu einer Depletion von B-Zellen führt (Vinay *et al.*, 2006). Im Tiermodell bisher kaum untersucht ist die antitumorale Wirkung von CD27-Agonisten. Allerdings konnte in einer Studie ein starker expansiver Effekt auf

antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen gezeigt werden (Barr *et al.*, 2006). Die Aktivierung von GITR, ein TNF-Rezeptor, der vor allem auf regulatorischen T-Zellen exprimiert wird, führt zu einer reduzierten Aktivität dieser regulatorischen T-Zellen, was mit einer erhöhten Immunantwort verbunden ist. Es konnte vor kurzem bereits eine antitumorale Wirkung durch Membran-GITRL exprimierende Viren nachgewiesen werden (Nocentini *et al.*, 2007). Es gilt jedoch für alle immunstimulatorischen TNF-Rezeptoren, dass eine länger andauernde systemische Aktivierung dieser Rezeptoren zu Autoimmunprozessen führen kann. Daher ist es für eine therapeutische Anwendung sinnvoll, wenn die entsprechenden Liganden ihre immunstimulatorische Wirkung nur lokal im Tumor ausüben.

3.4 Zielsetzung

In der Arbeitsgruppe von Prof. Wajant konnte bereits an einigen Beispielen gezeigt werden, dass es möglich ist, lösliche trimere FasL - bzw. TRAIL-Varianten, die *per se* inaktiv bzw. nur sehr schwach aktiv sind, durch genetische Fusion mit einem geeigneten Antikörperfragment funktionell so zu modifizieren, dass sie nach antigenvermittelter Immobilisierung an Zielzellen eine ähnliche Wirkung wie ihre korrespondierende membranständige Form haben. Die antigenabhängige Aktivierbarkeit solcher Antikörper-FasL/TRAIL-Fusionsproteine konnte ebenfalls *in vivo* gezeigt werden (Samel *et al.*, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte im Weiteren untersucht werden, ob sich das Prinzip der Aktivierung durch antigenvermittelte Immobilisierung auch auf andere Liganden der TNF-Familie anwenden lässt, insbesondere auf die nicht-apoptotischen, kostimulatorischen TNF-Liganden. Zudem sollte geklärt werden, ob neben Antikörperfragmenten auch andere Proteindomänen zur Ligandenimmobilisierung genutzt werden können, da dies die Entwicklung bifunktionaler Moleküle möglich machen könnte. Solche Moleküle könnten auf der einen Seite ihren entsprechenden TNF-Rezeptor aktivieren, zum anderen aber auch das für die Zelloberflächenimmobilisierung genutzte Protein blockieren oder aktivieren.

4. Material

4.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien

Acrylamid (30%)	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Anti-Flag mAK M2-Agarose	Sigma, Deisenhofen
APS	Sigma, Deisenhofen
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
CIAP	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Coomassie-Färbelösung	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Cyclohexamid	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
DTT	Applichem, Darmstadt
ECL-Kit	Amersham, Braunschweig
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
FCS	PAA, Pasching
Flag-Peptid	Sigma, Deisenhofen
G418	Carl Roth, Karlsruhe
Gelfiltrationsmarker SEC 1	Phenomenex, Aschaffenburg
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
IL-2	Chiron, Ratingen
IL-4	Immunotools, Friesoythe
Milchpulver	Applichem, Darmstadt
MTT	Sigma, Deisenhofen
Nitrozellulose-Membran	Schleicher und Schuell, Dassel
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Pasching
Pepton	Carl Roth, Karlsruhe
PHA	Sigma, Deisenhofen

Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
Prestained Protein Marker (Broad Range)	New England Biolabs, Frankfurt
RPMI 1640-Medium	PAA, Pasching
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
TWEEN-20	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	PAA, Pasching
z-VAD-fmk	Bachem, Heidelberg

4.1.1 Enzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden von Fermentas GmbH, St. Leon-Rot bezogen.

Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
T4-Ligase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

4.1.2 Oligonukleotide

Die für die Klonierungen der rekombinanten Liganden und der Fusionsproteine notwendigen PCR-Primer wurden von MWG (Ebersberg, Deutschland) und Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisiert.

4.2 Antikörper und Antiseren

Anti-Flag M2, Maus IgG1 monoklonal	Sigma, Deisenhofen
Anti-Caspase-8, Kaninchen polyklonal	Schulze-Osthoff, Universität Düsseldorf
Anti-Maus HRP, Kaninchen polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark
Anti-Kaninchen HRP, Ziege polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark
Anti-IL-8 (OptEIA ELISA)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-IL-8, biotinyliert	BD Biosciences, Heidelberg
Streptavidin-HRP	BD Biosciences, Heidelberg

Anti-CD27, Maus IgG1 monoklonal	R&D, Minneapolis, MN, USA
Anti-GITR, Maus IgG1 monoklonal	R&D, Minneapolis, MN, USA
Anti-OX40, Maus IgG1 monoklonal	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-CD40, Maus IgG2B monoklonal	R&D, Minneapolis, MN, USA
Anti-41BB PE, Maus IgG1 monoklonal	R&D, Minneapolis, MN, USA
Anti-Maus IgG (whole molecule)-PE Ziege polyklonal	Sigma, Deisenhofen
anti-CD3-Beads	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
anti-CD14-Beads	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach

4.3 Zellen

4.3.1 Eukaryontische Zelllinien

Alle humanen Zelllinien, bis auf Ramos-Zellen, waren in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden. Die Ramos Ra1-Zelllinie wurden von Prof. Dr. W. Helfrich, Universität Groningen, Niederlande zu Verfügung gestellt.

Bjab	B-Zelllinie (Burkitt-Lymphom)
HEK293	embryonale Nierenzelllinie
HT1080/HT1080-CD40	Fibroblastenzelllinie (Fibrosarkoma)
Jurkat	T-Zelllinie (akute lymphatische Leukämie ALL)
KB/KB-CD40L	Keratinocytenzelllinie
Ramos Ra1	B-Zelllinie (Burkitt-Lymphom)

4.3.2 Prokaryontische Zellen

One Shot^R Top10
chemically competent *E.coli*

Invitrogen, Karlsruhe

Genotyp:

F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*araleu*) 7697
galU galK rpsL (Str^R) *endA1 nupG*

4.4 Plasmide

4.4.1 Fusionsproteine

Folgende Fusionsproteine wurden von den Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Innere Medizin, Würzburg kloniert und in HEK293-Zellen produziert:

Fusionsproteine	rekombinante Proteine
sc40-Flag-CD27L	Flag-/-TNC-/Fc-Flag-CD27L
sc40-Flag-OX40L	Flag-/-TNC-/Fc-Flag-OX40L
sc40-Flag-41BBL	Flag-/-TNC-/Fc-Flag-41BBL
sc40-Flag-GITRL	Flag-/-TNC-/Fc-Flag-GITRL
	Flag-TNC-/Fc-Flag-CD40L
α CD19-Flag-FasL	
α CD19-Flag-TRAIL	
B7-2-Flag-FasL	

Desweiteren wurde mit Flag-CD40L, sc40-Flag-CD40L, Flag-FasL, CD40-Flag-FasL, RANK-Flag-FasL, TNFR1-Flag-FasL und TNFR2-Flag-FasL (Prof. Dr. K. Pfizenmaier, Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart), gearbeitet.

Die Gensequenz der einzelnen Fusionsproteine ist im Anhang angegeben.

4.4.2 Rezeptoren

Die Plasmide zur Expression der Rezeptoren auf eukaryontischen Zellen wurden von Dr. Topp (Klinische Forschungsgruppe, Medizinische Klinik und Poliklinik II, Würzburg) (CD28, CD19) und Pascal Schneider (Universität von Lausanne, Epalinges, Schweiz) (CD27, OX40, 41BB, GITR) zur Verfügung gestellt.

4.5 Lösungen und Puffer

Assay Diluent	PBS, 10% FCS
Blotpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, pH 8,3
Coating Buffer	0,1 M Natriumcarbonat, pH 9,5
Dialyseschlauch-Kochlösung	2% Natriumhydrogencarbonat, 1 mM EDTA
Kristallviolettlösung	20% Methanol, 0.5% Kristallviolett
Laufpuffer SDS-PAGE	50 mM Tris, 380 mM Glycin, 4 mM SDS, pH 8,3
LB-Medium	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl pro 1 l
LB-Platten	LB-Medium, 15 g/l Agar
NP40-Lysispuffer	30 mM Tris pH 7,5, 10% Glycerin, 120 mM NaCl, 1% NP40
MACS-Puffer	PBS, 0,5% BSA, 2 mM EDTA
MTT-Stocklösung (5x)	50 mg/ml MTT in DMSO
MTT-Färbelösung	MTT-Stocklösung 1:5 in PBS verdünnt
MTT-Lysispuffer	50% Dimethylformamid, 15% SDS, pH 4,7 (mit Essigsäure)
PBS	20 mM Na-Phosphat, 0,7% NaCl, pH 7,2
PBS-EDTA	PBS, 0,2 mM EDTA
PBST	PBS, 0,05% Tween-20
PBST-Milch	PBS, 0,05% Tween-20, 5% Magermilch
4x Probenpuffer SDS-PAGE	10% Glycerin, 0,1 M Tris pH 8,0, 1% SDS, 0,1 M DTT, Bromphenolblau
6x Probenpuffer DNA-Gel	10 mM Tris-HCl pH 7,6, 60% Glycerin, 0,03% Bromphenolblau, 0,03% Xylencyanol
Sammelgelpuffer SDS-PAGE	0,5 M Tris, 0,015 M SDS, pH 6,8
Trenngelpuffer SDS-PAGE	1,5 M Tris, 0,015 M SDS, pH 8,8
TAE-Puffer (50-fach)	2 M Tris, 1 M Essigsäure, 0,1 M EDTA pH 8,3

4.6 Kommerzielle Kits

NucleoSpin Extract II Kit	Machery-Nagel, Düren
OptEIA IL-8-ELISA	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Pure Yield Plasmid Miniprep/ Midiprep System	Promega, Mannheim
T4-DNA-Ligase-Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

4.7 Geräte

BioSep-SEC 3000 (Gelfiltrationssäule)	Phenomenex, Aschaffenburg
Elektroporator Equibio EasyjecT Plus	PeqLab, Erlangen
ELISA-Reader Lucy 2	Anthos, Cambridge, UK
FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Gellaufkammern (SDS-PAGE, DNA-Gel)	PeqLab, Erlangen
HPLC-Anlage BioLogic Duoflow	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Semi-Dry-Blotkammer	PeqLab, Erlangen

5. Methoden

5.1 Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien

5.1.1 Kultivierung adhärenter und Suspensions-Zelllinien

Alle verwendeten Zellen wurden in RPMI 1640-Medium, 10 % hitzeinaktiviertes FCS (30 min bei 55°C), bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden, abhängig von ihrer Konfluenz, nach verschiedenen Zeitabständen und in einem bestimmten Verhältnis verdünnt. Adhärenente Zellen wurden ohne Medium mit Trypsin (0,025 %) und EDTA (10 mM) in PBS für wenige Minuten inkubiert und durch Spülen mit RPMI-Medium, 10 % FCS abgelöst. Suspensionszellen konnten direkt aus der Flasche im Medium entnommen werden. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt.

5.1.2 Konservierung von Zellen

Für eine langfristige Lagerung von Zelllinien wurden die geernteten Zellen kryokonserviert, d.h. nach Zentrifugation der Zellen wurde das Zellpellet in FCS mit 10 % DMSO aufgenommen und in einem Kryoröhrchen bei -80°C gelagert.

5.1.3 Herstellung stabil exprimierender Zelllinien

Damit Zellen ein Protein stabil exprimieren, wurden sie mit einem entsprechenden Expressionsplasmid durch Elektroporation transfiziert, welches zum einen für das gewünschte Protein kodiert, zum anderen ein Resistenzgen für die stabile Selektion trägt. Um HT1080-Zellen herzustellen, die stabil CD40, OX40, 41BB, GITR, CD27, CD40L, CD28 und RANKL auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurden die Zellen mit dem jeweils dafür kodierenden pCR3-Vektor elektroporiert und für 16 bis 24 h in RPMI 1640; 10 % FCS; 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin (PAA) kultiviert. Da der Vektor pCR3 das Neomycin^R-Gen trägt, konnte die Selektion mit G418 durchgeführt werden. Dafür wurden ab dem Tag nach der Transfektion die transfizierten Zellen unter Selektionsdruck gehalten

(RPMI 1640; 10% FCS, 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin (PAA); 500 µg/ml G418).

Nach 2-3 Wochen wurde die stabile Expression mittels FACS-Analyse verifiziert (siehe 3.10). Anschließend wurden durch Verdünnungsklonierung Einzelklone selektioniert, d.h. Zellen wurden im 96 well-Format bis auf rechnerisch eine Zelle pro Kammer verdünnt und weiterhin unter Selektionsdruck kultiviert. Sobald die Zellen dicht genug gewachsen waren, wurden sie wiederum auf Oberflächenexpression des jeweiligen Proteins durch FACS-Färbung untersucht. Hieraus wurde dann ein Klon ausgewählt, der für die weiteren Versuche eingesetzt wurde.

5.2 Isolierung, Kultivierung und Stimulation primärer Zellen

Periphere Blut-monozytäre Zellen (PBMC) wurden aus Blut von gesunden Spendern durch Ficoll-Zentrifugation isoliert. Dafür wurde das Blut 1:1 mit PBS verdünnt und in einem Falcon-Röhrchen die Ficoll-Lösung (Lymphocyte Isolation Medium, PAA) damit überschichtet. Anschließend wurde bei 1800 rpm für 15 min bei RT und ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Die Schicht über der Ficoll-Lösung enthält die gewünschten PBMCs. Aus diesen Zellen wurden nach Herstellerangaben mit Metall-Beads, welche mit α CD3-Antikörper, für T-Zellisolierung, bzw. α CD14-Antikörper, für Monozytenisolierung, beladen sind (MACS, Miltenyi), nach 20-minütiger Inkubation bei 4°C und anschließender Aufreinigung über eine magnetische Säule die jeweiligen Zellen separiert.

5.2.1 Stimulation von T-Zellen

Die isolierten CD3⁺ T-Zellen wurden im Folgenden mittels des Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kits (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) für 15 min gefärbt und danach in RPMI 1640-Medium kultiviert, das 10% humanes Serum sowie 100 U/ml Penicillin/ 100 µg/ml Streptomycin (PAA), 5 µg/ml PHA (Sigma) und 20 U/ml IL-2 (Proleukin; Chiron, Ratingen, Deutschland) enthielt. Den Zellen wurden jeden zweiten Tag mit Flag-TNC-CD27L (50 ng/ml) in mit 1 µg/ml anti-Flag mAk M2 (Sigma) quervernetzter Form und nicht-

quervernetzter Form zugegeben. Alle vier Tage erhielten sie zusätzliche 20 U/ml IL-2. Nach 9 Tagen wurde die CFDA-Färbung durch Messung am FACSCalibur (BD Biosciences) detektiert.

5.2.2 Stimulierung von Monozyten und Dendritischen Zellen

Von den aufgereinigten CD14⁺ Monozyten wurden 3×10^6 Zellen in 2 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS und 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin in einer 6-well-Platte ausgesät und für die Ausdifferenzierung zu Dendritischen Zellen (DC) jeden zweiten Tag mit 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 (beides ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland) behandelt. Nach 7 Tagen wurden die Zellen mit Flag-TNC-CD40L (200 ng/ml) mit und ohne quervernetzenden Antikörper M2 (1 µg/ml) oder unbehandelt bis Tag 10 weiterkultiviert. Anschließend wurden die Zellen nach 30-minütiger Inkubation auf Eis durch Abgespülen mit eiskaltem PBS geerntet und abzentrifugiert. Die Zellen wurden, wie in 3.10 beschrieben, durch FACS-Färbung auf die Expression der Marker für reife DCs (CD83 und CD86) hin analysiert.

5.3 Zytotoxizitätsassay

Um zu ermitteln, innerhalb welcher Konzentrationsbereiche verschiedene Apoptose-induzierende Proteine aktiv sind, wurde ihre zytotoxische Wirkung auf lebenden Zellen ermittelt.

5.3.1 Adhärenente Zellen

Von den adhärenenten Zelllinien (HT1080, T47D) wurden jeweils 2×10^4 Zellen/well in einer 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit anschließender 30-minütiger Vorinkubation mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid (CHX, 2,5 µg/ml). Mit den zu testenden Proteinen wurden separat Verdünnungsreihen angesetzt und den Zellen anschließend zugegeben. Nach 16 h wurde die Menge an lebenden Zellen durch Kristallviolett-Färbung ermittelt. Dafür wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden für 20

min mit 50 µl Kristallviolett-Färbelösung bei RT inkubiert und anschließend mehrmals mit Wasser gewaschen. Nachdem die Platten an der Luft getrocknet waren, konnten sie mit dem ELISA-Reader Lucy 2 bei 595 nm ausgelesen werden.

5.3.2 Suspensionszellen

Die Suspensionszelllinien Jurkat, Bjab und Ramos wurden mit 6×10^4 Zellen/well, die primären CLL-Zellen mit 1×10^7 Zellen/well in einer 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatte ausgesät und anschließend direkt mit dem in einer Verdünnungsreihe vortitrierten Protein für 16 h stimuliert. Pro Well wurden 10 µl der MTT-Färbelösung (10 mg/ml) zupipettiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 90 µl/well MTT-Lysispuffer versetzt und für mindestens 4 h bei RT geschüttelt. Die Messung erfolgte im ELISA-Reader bei 570 nm.

5.4 IL-8-Produktions-Bestimmung mittels ELISA

Die gewünschten HT1080-Zellen (wt, Transfektanten: -FAP, -CD19, -CD40, -CD27, -OX40, -41BB, -GITR) wurde mit 2×10^4 Zellen/well in eine 96-well-Flachbodenplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, wobei die Zellen für 30 min mit z-VAD (20 mM) vorbehandelt wurden. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit dem entsprechenden Liganden titriert und damit die Zellen für 6 h stimuliert. Der Mediumüberstand wurde abgenommen und konnte bei -20°C gelagert werden. Die mit Antikörper gegen IL-8 vorbeschichteten ELISA-Platten wurden mit dem Überstand der Zellen und IL-8-Standardlösungen (2 ng/ml, 1 ng/ml, 0,5 ng/ml) für 2 h bei RT inkubiert. Nachdem eine Mischung aus biotinyliertem anti-IL-8-Antikörper und Streptavidin-Meerrettichperoxidase (-HRP) für eine Stunde binden konnte, wurde die Platte nach Zugabe eines farbigen HRP-Substrates (ABTS) am ELISA-Reader photometrisch bei 405 nm gemessen und dadurch die Menge an IL-8 ermittelt.

5.5 Zelllysate (NP40-Lysate) für Western Blot

Die Zellen wurden in benötigter Zellzahl in Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit dem gewünschten Liganden in verschiedenen Konzentrationen und/oder zu verschiedenen Zeitpunkten stimuliert. Die Zellernte erfolgte auf Eis durch Abkratzen mit einem Zellschaber, Überführen in ein 15 ml-Falcon und Nachspülen mit eiskaltem PBS. Nach Zentrifugation (4°C, 3 min, 2000 rpm) wurde das Zellpellet in NP40-Lysispuffer, der mit Proteaseinhibitor versetzt wurde, aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (4°C, 10 min, 14000 rpm) wurde der Überstand in ein neues Eppi überführt. Zur Bestimmung der relativen Proteinmenge in den Proben erfolgte ein Bradford-Assay.

5.6 Bestimmung von Proteinmengenverhältnissen nach Bradford

Das Farbreagenzkonzentrat wurde mit Wasser 1:5 verdünnt. In einer Einmal-Küvette wurde 1 ml Färbelösung mit 1,5 µl Lysatprobe versetzt und für wenige Minuten inkubiert. Die OD der Mischung wurde gegen eine entsprechende Pufferkontrolle (1 ml Färbelösung mit 1,5 µl Lysispuffer) bei 595 nm photometrisch gemessen. Anhand der Messwerte konnten die Mengenverhältnisse an Gesamtprotein der verschiedenen Proben zueinander ermittelt werden.

5.7 Western Blot

5.7.1 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem SDS-Polyacrylamidgel. Das Trenngel wurde aus einer Trenngellösung (375 mM Tris pH 8,8; 3,75 mM SDS; 0,1 % APS) und 12 % Acrylamid hergestellt, die Polymerisation des Gels wurde mit 0,1 % TEMED gestartet. Das feste Trenngel wurde anschließend mit Sammelgel (6 % Acrylamid in 125 mM Tris pH 6,8; 3,75 mM SDS; 0,1 % APS; 0,1 % TEMED) überschichtet und der gewünschte Kamm eingesetzt. Die Proben wurden mit ¼ ihres Volumens an 4-fach Probenpuffer (10 % Glycerin; 0,1 M Tris pH 8,0; 1 % SDS; 0,1 M DTT; Bromphenolblau) versetzt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Proteinproben sowie ein vorgefärbter

Molekulargewichtsstandard (Prestained Protein Marker (Broad Range), New England Biolabs) wurden aufgetragen und bei 90 bis 120 V in SDS-Laufpuffer (50 mM Tris; 380 mM Glycin; 4 mM SDS; pH 8,3) elektrophoretisch aufgetrennt.

5.7.2 Proteinelektrotransfer auf Nitrozellulosemembran

Der Proteintransfer wurde in einer horizontalen „semi-dry“-Blotkammer (Peqlab, Erlangen) durchgeführt. Hierfür wurde eine entsprechend große Nitrozellulosemembran und vier Whatman-Filterpapiere in Blotpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; pH 8,3) getränkt und wie folgt auf die Blotkammer gelegt:



Der Transfer der Proteine erfolgte bei RT und einer Stromstärke von 1,5 mA pro cm² Gelfläche für 90 bis 120 min.

5.7.3 Immundetektion mittels ECL

Folgende Schritte wurden alle auf einem Schüttler durchgeführt: Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde diese zunächst für eine Stunde bei RT in Blockpuffer (PBST-Milch) geschwenkt und anschließend für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper in PBST und 0,02 % Na-Azid (Konzentration nach Herstellerangaben) inkubiert. Nachdem die Membran 3x für 5 min mit PBST gewaschen wurde, erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem entsprechenden Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper (Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark, Verdünnung 1:10000 in PBST). Nachdem die Membran erneut dreimal gewaschen wurde, erfolgte die Nachweisreaktion mittels des ECL-Systems (Amersham) und Röntgenfilmen (Amersham, Kodak-Entwicklermaschine).

5.7.3 Coomassie-Färbung

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung von jeweils 500 ng des aufgereinigten Fusionsproteins unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen wurde das Gel zunächst für 15 min in einer Fixierlösung (25 % Isopropanol; 15 % Essigsäure) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser wurde das Gel für mindestens 1h bzw. über Nacht bei RT auf einem Schüttler mit der Coomassie-Färbelösung (Fermentas) inkubiert. Das Gel wurde anschließend mehrmals in Wasser gewaschen, bis der Hintergrund des Gels genügend entfärbt war.

5.8 Produktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine

5.8.1 Expression

5×10^7 HEK293-Zellen wurden in 800 μ l RPMI-Medium mit 10 % FCS resuspendiert, mit 30 μ g Plasmid-DNA versetzt und in 4 mm-Küvetten elektroporiert (250 V, 1800 μ F, maximaler Widerstand). Die Zellen wurden anschließend in einer 15 cm Zellkulturschale ausplattiert und in RPMI-Medium mit 10 % FCS und 100 U/ml Penicillin/100 μ g/ml Streptomycin (PAA) über Nacht bei 37°C, 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und durch RPMI-Medium mit 0,5% FCS und 100 U/ml Penicillin/100 μ g/ml Streptomycin ersetzt. Nach 3-4 Tagen wurden die Überstände von den Zellen geerntet und für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Die Ermittlung der Proteinkonzentration im Überstand erfolgte anhand einer Western Blot-Analyse durch Vergleich mit einem entsprechenden Proteinstandard, der auf dem selben Gel aufgetragen wurde.

5.8.2 Ankonzentrieren von Proteinlösungen

Die Konzentration der rekombinanten Proteine in den Zellkulturüberständen konnte durch Volumensreduktion gesteigert werden. Dafür wurden Dialyseschläuche (Visking Typ 20/30, 14 kDa Ausschlußgrenze, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) von ca. 50 cm Länge zweimal für jeweils 10 min in einer 2 %igen Na₂CO₃-Lösung mit 1 mM EDTA gekocht und anschließend unter fließendem Wasser gespült. Nachdem die Schläuche in Wasser

autoklaviert wurden, wurden sie unter einer Sterilbank entnommen, mit jeweils ca. 60 ml Überstand gefüllt und danach mit einer Klammer verschlossen. Sie wurden in eine Schale mit PEG 35000-Granulat (Merck) für einige Stunden gelegt, bis sich das Volumen um das ca. 10-fache reduziert hatte. Um anhaftendes PEG 35000 zu entfernen, wurden die Schläuche unter fließendem Wasser abgespült. Das Konzentrat wurde aus den Schläuchen unter der Sterilbank entnommen, für 10 min bei 4000 rpm und RT abzentrifugiert und sterilfiltriert (0,2 µm).

5.8.3 Aufreinigung durch Affinitätschromatografie

Um rekombinante Flag-markierte Proteine aufzureinigen, wurde eine Affinitätschromatographie mit „anti-Flag M2 Affinity Gel“ von Sigma-Aldrich, Deisenhofen durchgeführt. Nach Herstellerangaben bindet 1 ml M2-Agarose ca. 600 µg Protein. Nach diesen Angaben ließ sich das benötigte Volumen an Säulenmaterial für das jeweilige Fusionsprotein abschätzen. Diese Menge wurde in eine Glassäule mit Fritte überführt und mit 10 Säulenvolumen (SV) TBS äquilibriert. Der Zellkulturüberstand, der das Protein enthielt, wurde anschließend auf die Säule aufgetragen. Nachdem der Überstand mit einer Flussrate von ca. 0,5-1 ml/min vollständig über die Säule gelaufen war, wurde diese mit 10 SV TBS gespült, um alle ungebundenen Proteine zu entfernen. Gebundene Proteine wurden durch Konkurrenz mit 100 µg/ml Flag-Peptid in TBS eluiert und anschließend, um überschüssiges Flag-Peptid zu entfernen, gegen PBS dialysiert. Dabei wurde die PBS-Lösung zweimal ausgetauscht.

5.9 Gelfiltration (Größenausschlusschromatografie)

Die aufgereinigten Liganden wurden mittels Größenausschlusschromatografie auf einer BioSep-SEC-S3000 (300 x 7,8 mm) Gelfiltrationssäule (Phenomenex, Aschaffenburg) analysiert, welche zuvor mit PBS bei einer Flussrate von 1 ml/min äquilibriert wurde. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit der „column performance check standard aqueous SEC 1“-Lösung (Phenomenex), welche als Markerproteine bovines Thyroglobulin (670 kDa), IgG (150 kDa), Ovalbumin (44 kDa) und Myoglobin (17 kDa) enthält.

5.10 Bindungs- und Expressionsuntersuchung mittels Durchflußzytometrie (FACS)

Um die Expression von Oberflächenproteinen zu bestimmen, wurden die jeweiligen Zellen geerntet, mit PBS und 0,5% BSA (PBS-BSA) gewaschen und mit den entsprechenden PE-markierten Antikörpern und den passenden Isotypkontrollantikörpern für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit eiskaltem PBS-BSA wurde die Fluoreszenz der gebundenen Antikörper am BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, Heidelberg) analysiert. Zum Nachweis der Bindung der diversen Liganden an ihren jeweiligen Rezeptor wurden die entsprechenden Zellen mit kaltem PBS-BSA gewaschen und mit 1 µg/ml der verschiedenen Ligandvarianten zusammen mit 10 µg/ml anti-Flag mAb M2 (Sigma, Steinheim) und PE-markiertem anti-Maus-Antikörper (1 µg/ml, Sigma) für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nachdem die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS-BSA gewaschen wurden, konnten die zellgebundenen Fusionsprotein-Antikörperkomplexe mit dem BD FACSCalibur™ detektiert werden.

5.11 Klonierung rekombinanter Fusionsproteine

5.11.1 PCR-Amplifikation

Die PCR („Polymerase Chain Reaktion“) wurde in 50 µl Ansätzen in einem „Primus“-PCR-Gerät (MWG-Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Für einen Ansatz wurden 10 ng DNA, 0,5 µg jedes Oligonukleotids, 1 µl dNTPs (10 mM), 5 µl 10-fach Reaktionspuffer und 1 µl Expand High Fidelity DNA-Polymerase (3,5 U/µl) eingesetzt. Die Amplifikation des gewünschten PCR-Produktes wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

Deckel vorheizen: 110°C	
Denaturierung: 3 min, 94°C	
Denaturierung: 30 sec, 94°C	30 Zyklen
Anlagerung: 30 sec, 55°C	
Elongation: 30 sec, 72°C	
finale Elongation: 7 min, 72°C	

Das PCR-Produkt wurde nach einer präparative Gelelektrophorese (1%iges Agarose-TAE-Gel) mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Machery & Nagel, Düren) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

5.11.2 DNA-Restriktionsverdau

Das gereinigte PCR-Produkt bzw. 5 µg Vektorplasmid-DNA wurden mit den entsprechenden Enzymen und einem kompatiblen Puffer (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Der verdaute Vektor wurde für weitere 30 min bei 37°C durch Zugabe des Enzyms CIAP (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) dephosphoryliert, um eine spätere Religation des Vektors zu verhindern. Dieser Vektor wurde durch eine präparative Gelelektrophorese (1 %iges Agarose-TAE-Gel) und das geschnittene PCR-Produkt direkt mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Machery & Nagel, Düren) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

5.11.3 Ligation

Die Ligation von verdaulichem Vektor und dem entsprechenden PCR-Produkt erfolgte mit Hilfe der T4-Ligase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben für 1 h bei RT.

5.11.4 Transformation kompetenter Zellen

Um DNA in *E.coli* zu transformieren, wurden 50 µl One Shot^R Top10 chemisch kompetente *E.coli* (Invitrogen, Karlsruhe) auf Eis aufgetaut und dann mit der DNA (1 µg Plasmid, 5 µl Ligationsansatz) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 sec bei 42°C wurden die Zellen für 3 min auf Eis gekühlt, anschließend mit 250 µl LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zum Schluss wurde der komplette Ansatz auf LB_{Amp}-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle einer Klonierung wurden am nächsten Tag die Kolonien durch Plasmid-Isolierung und anschließendem Restriktionsverdau auf positive Klone hin untersucht.

5.11.5 Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden von entsprechenden Klonen Übernachtskulturen in LB-Medium, komplettiert mit 100 µg/ml Ampicillin (Carl Roth, Karlsruhe), angesetzt (Miniprep in 2 ml, Midiprep in 150 ml) und bis zum nächsten Tag bei 37°C geschüttelt. Nachdem die Bakterien für 10 min bei 5000 rpm und RT abzentrifugiert wurden, erfolgte die Plasmidisolierung mit Hilfe des Pure Yield™ Plasmid Miniprep bzw. Midiprep Systems (Promega, Mannheim).

6. Ergebnisse

Eine wichtige Voraussetzung für die Konstruktion von immobilisierungsabhängig aktivierbaren TNF-Ligand-Fusionsproteinen ist die Eigenschaft, dass der entsprechende Ligand als lösliches Trimer weniger aktiv ist als seine korrespondierende membranständige Form. Obwohl in der Literatur das Prinzip der immobilisierungsabhängig Aktivierung für die TNF-Ligand-Rezeptor-Paare TNF/TNFR2, TRAIL/TRAILR2 und FasL/Fas bereits aufgezeigt werden konnte, war vor Beginn dieser Arbeit unklar, inwieweit dies auch für andere Liganden der TNF-Familie gilt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die genannten löslichen inaktiven TNF-Liganden durch sekundäre Oligomerisierung, sei es durch Quervernetzen mittels eines Antikörpers oder durch gentechnische Erzeugung hexamerer Varianten, aktivieren lassen und sich dann funktionell wie die entsprechenden membranständigen Liganden verhalten.

Der Vergleich der Aktivität von trimeren und hexameren bzw. oligomerisierten Varianten eines Liganden kann daher Aufschluss darüber geben, wie groß ein möglicher Aktivierungseffekt durch Immobilisierung sein könnte.

6.1 Aktivierung löslicher kostimulatorischer TNF-Liganden durch Oligomerisierung

6.1.1 Reinigung löslicher Varianten von OX40L, CD27L, CD40L, 41BBL und GITRL

Zunächst wurden verschiedene lösliche Varianten der membranständigen TNF-Liganden OX40L, CD27L, CD40L, 41BBL und GITRL kloniert. Dabei wurde jeweils die carboxy-terminale extrazelluläre Domäne, welche die „TNF homology domain“ (THD) beinhaltet, in Expressionsvektoren eingeführt, die amino-terminal für a) einen Flag-tag, b) einen Flag-tag, gefolgt von der Disulfidbrücken bildenden Trimerisierungsdomäne des Tenascin-C (TNC) aus dem Huhn oder c) die Fc-Domäne des humanen Immunglobulin IgG1 mit einem Flag-tag kodieren (Abb. 5a-c). Der Flag-tag, der in allen Konstrukten vorhanden ist,

wurde verwendet, da er für eine Aufreinigung der Proteine durch Affinitätschromatografie genutzt werden kann. Er diene zusätzlich als Zielstruktur für die sekundäre, anti-Flag-Antikörper-vermittelte Oligomerisierung der Moleküle.

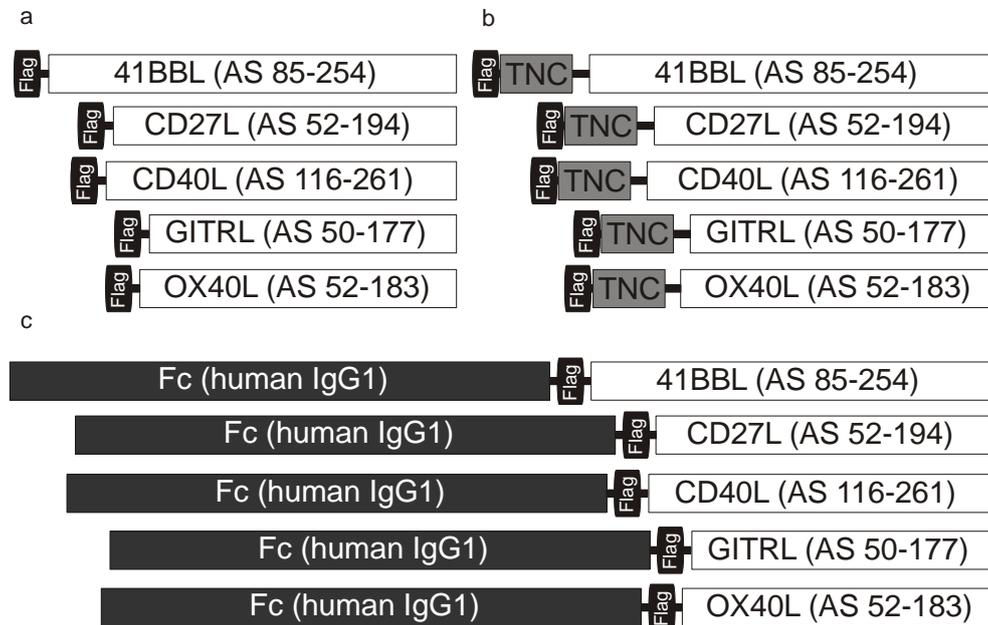


Abb. 5 Schematischer Aufbau der löslichen TNF-Ligand-Varianten. Struktur der Liganden mit a) einem Flag-Epitop (D-Y-K-D-D-D-D-K), b) einem Flag-Epitop und der TNC-Domäne (AS 110-139 des Hühner-Tenascin C) und c) der Fc-Domäne des humanen Immunglobulin G1 und einem Flag-Epitop. THD: TNF homology domain des betreffenden Liganden.

Den verschiedenen Expressionskassetten geht eine Sequenz voraus, die entweder für das Immunglobulinsignalpeptid oder das HA-Signalpeptid kodiert, wodurch es möglich war, nach transienter Transfektion (Elektroporation) von humanen HEK293-Zellen die diversen Ligandvarianten im Überstand zu erhalten. Dabei erreichten fast alle Liganden eine Konzentration von 0,5 bis 3 µg/ml im Zellüberstand, nur Flag-GITRL ließ sich weniger gut produzieren (> 50 ng/ml). Bis auf letztere Variante wurden alle anderen Proteine über eine anti-Flag mAk M2 Agarosesäule aufgereinigt. Die Analyse der gereinigten Liganden erfolgte mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen und anschließender Coomassie-Färbung des Gels oder einer Western Blot-Detektion mit anti-Flag-Antikörper (Abb. 6). Die reduzierten Flag- und Flag-TNC-Varianten von CD27L, CD40L und OX40L sowie die Flag-TNC-Variante von GITRL liefen als Doppel- und Dreifach-Banden, was ein Indiz für sekundäre Modifikationen der Proteine, z.B. durch Glykosylierungen, ist.

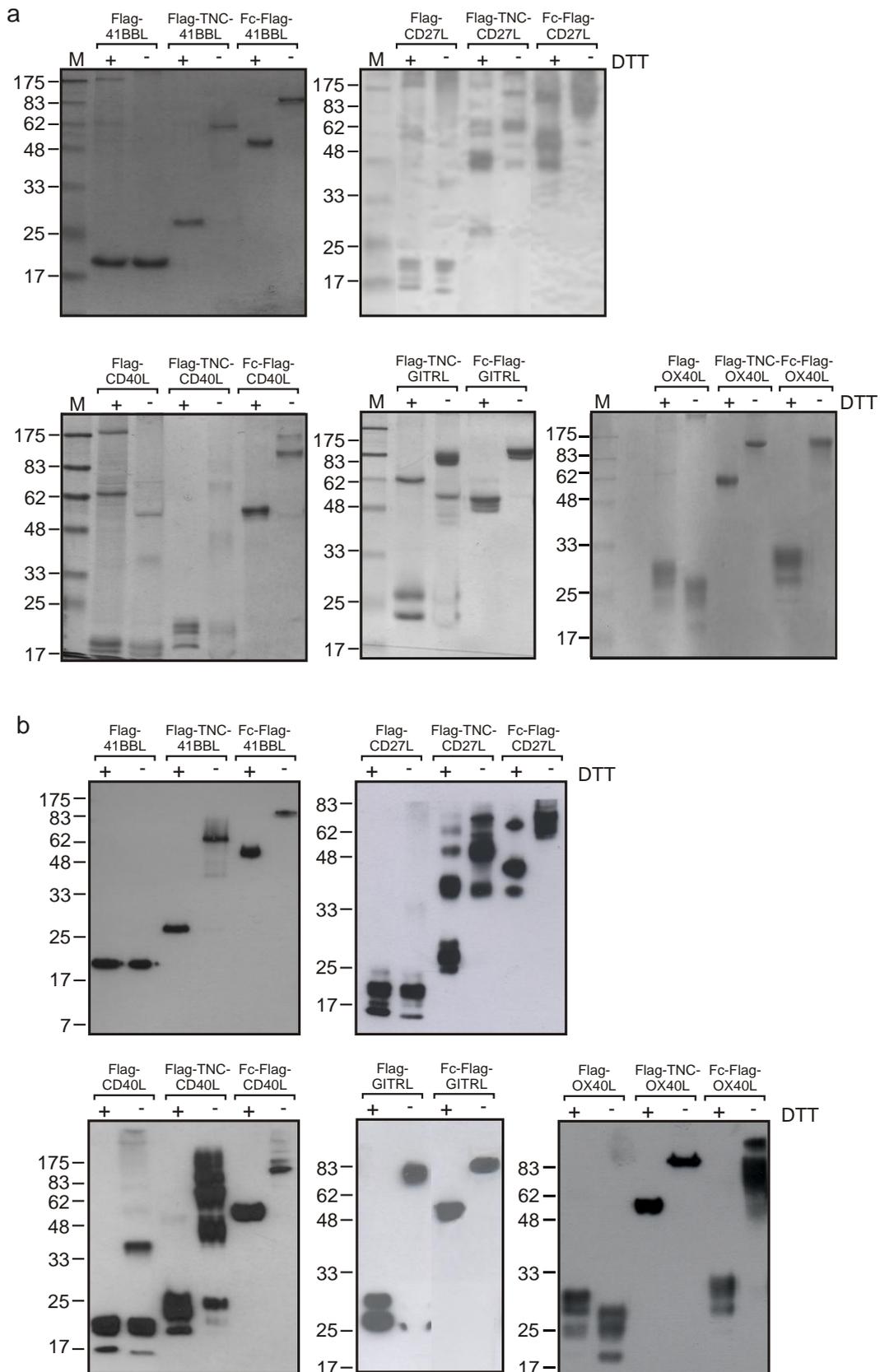


Abb. 6 Coomassiegel (a) und Western Blot Analyse (b) der gereinigten TNF-Ligand-Fusionsproteine. Die angegebenen löslichen Liganden wurden in HEK293-Zellen produziert, aufgereinigt und unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte durch Coomassie-Färbung (a) bzw. Western Blot-Detektion mit einem anti-Flag-Antikörper (b).

Die Flag-markierten Proteine wanderten alle, mit Ausnahme des Flag-CD40L, unter beiden Bedingungen als Monomere. Flag-CD40L zeigte unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine zusätzliche Bande bei der Größe des dimeren Moleküls. Alle Flag-TNC-Varianten wanderten unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf der Höhe ihres entsprechenden trimeren Moleküls, in unterschiedlichem Maße waren aber auch Monomere, Dimere und Multimere zu erkennen. Übereinstimmend damit, dass Fc-Domänen untereinander Disulfidbrücken ausbilden, liefen die nicht-reduzierten Fc-Flag-Fusionsproteine als Dimere (Abb. 6). Bei Gelfiltrationsanalysen zeigten sich für die Flag-Varianten von 41BBL, CD27L, CD40L und OX40L „peaks“, deren Molekulargewicht dem von Dimeren oder Trimeren entspricht (Abb. 7). Allerdings wurde auch die Ausbildung von hochmolekularen Aggregaten (HMW) beobachtet, welche funktionell weiter analysiert wurden (siehe 4.1.3).

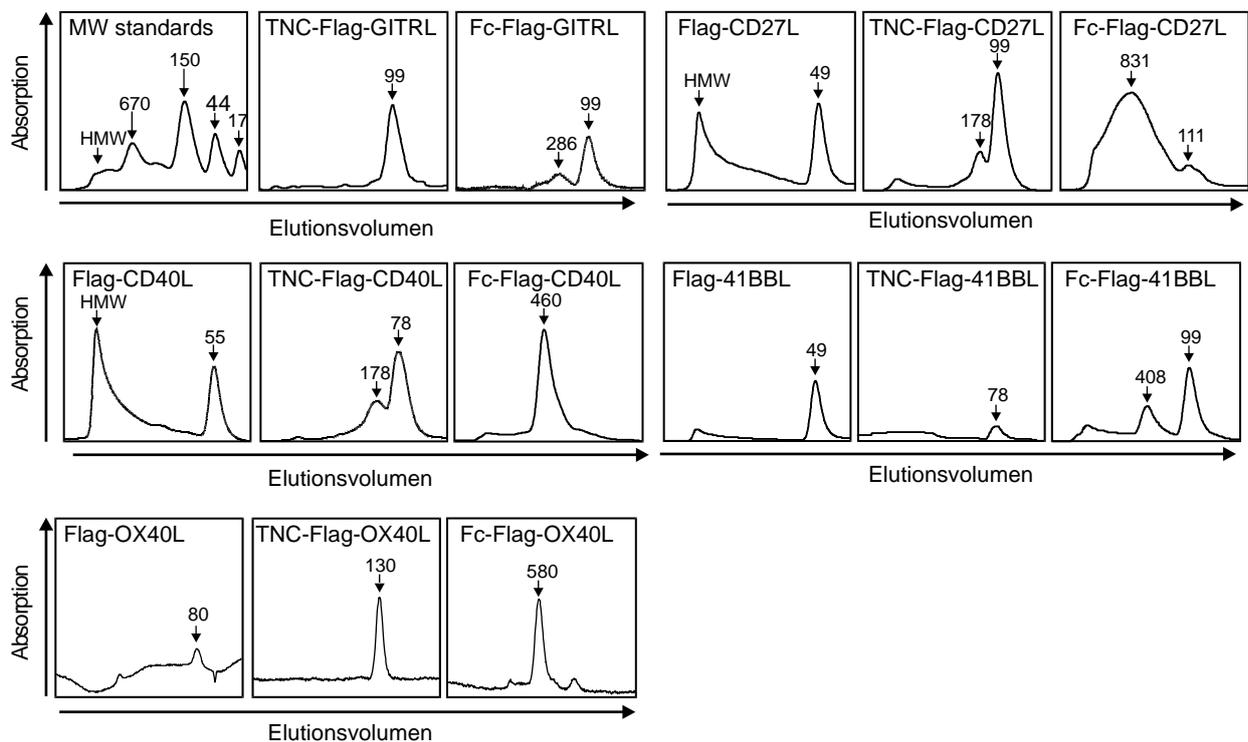


Abb. 7 Gelfiltrationsanalysen gereinigter TNF-Ligand-Varianten. 50 μ l der gereinigten Liganden wurden auf einer BioSep-SEC-S3000-Säule augetrennt. Als Standard wurde ein Proteingemisch aus Thyroglobulin (670 kDa), Immunglobulin G (150 kDa), Ovalbumin (44 kDa) und Myoglobulin (17 kDa) verwendet. Die daraus kalkulierte Molekulargewichte der diversen Liganden sind angegeben.

Die Flag-TNC-Fusionsproteine eluierten in einem dominanten „peak“ als Trimere, teilweise zeigten sie aber auch eine kleine Schulter, deren Größe dem hexameren Molekül entspricht. Die TNC-Varianten wiesen keine oder nur eine sehr geringe Bildung hochmolekularer Aggregate auf. Fc-Flag-CD40L eluierte in einem symmetrischen „peak“ von ca. 400 kDa, was für eine homogene Molekülspezies spricht. Da aufgrund der schwachen Auftrennung der Gelfiltrationssäule bei höheren Molekülmassen nur eine grobe Bestimmung des Molekulargewichtes möglich war, passt dieses gut mit der zu erwartenden Molekülmasse von ungefähr 300 kDa für ein hexameres Molekül überein. Fc-Flag-41BBL und Fc-Flag-OX40L zeigten ebenfalls einen hexameren „peak“, zusätzlich eluierte aber auch ein Teil bei ca. 95-100 kDa, was der Größe eines dimeren Moleküls entspricht. Fc-Flag-CD27L eluierte in einem weiten Molekulargewichtsbereich, was für die Bildung von Oligomeren mit einer verschiedenen Anzahl an Monomeren spricht.

6.1.2 Bindung der rekombinanten Liganden an ihre korrespondierenden auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren

Um eine Interaktion der diversen löslichen Ligandvarianten mit ihren jeweiligen Rezeptoren überprüfen zu können, wurden HT1080-Zellen mit Plasmiden, die für die TNF-Rezeptoren CD40, OX40, CD27, GITR und 41BB kodieren, transfiziert und auf stabile Expression hin selektioniert. Die Rezeptorexpression wurde durch Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern und anschließender Messung am FACS-Gerät im Vergleich zu parentalen HT1080-Zellen kontrolliert. Die Bindung der verschiedenen Ligandvarianten an parentalen HT1080-Zellen und HT1080-TNF-Rezeptor-Transfektanten wurde ebenfalls durch FACS-Messung bestimmt (Abb. 8). Dabei zeigte sich, dass alle Varianten von CD40L, 41BBL, OX40L und GITRL an die entsprechenden Rezeptorexprimierenden Zellen binden. Bei den CD27L-Konstrukten allerdings konnte nur für Flag-TNC-CD27L, nicht aber für Flag-CD27L und Fc-Flag-CD27L, eine Bindung an CD27-exprimierende HT1080-Zellen nachgewiesen werden.

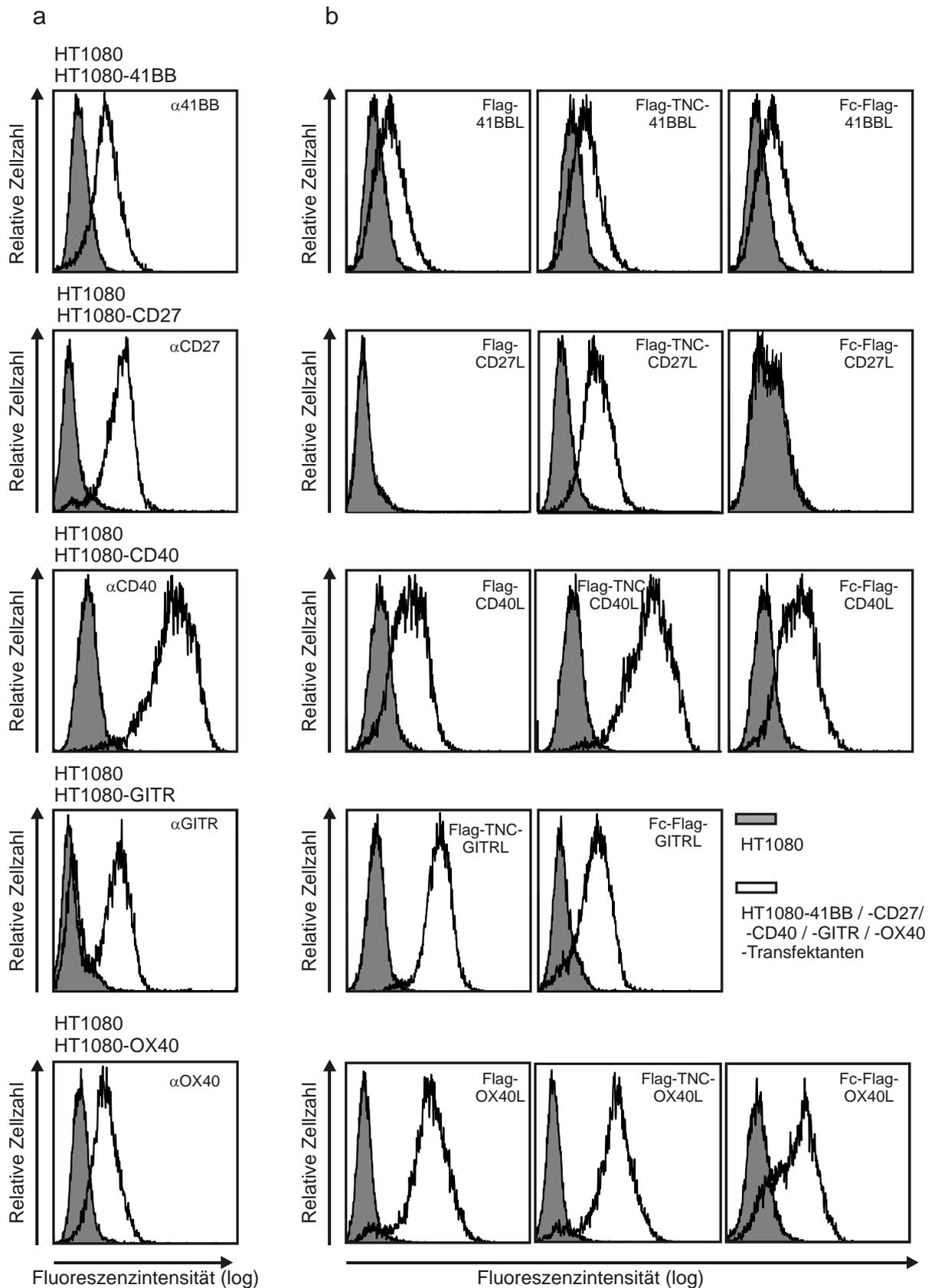


Abb. 8 Bindung der TNF-Ligand-Fusionsproteine an korrespondierende zellständige Rezeptoren. Parentale HT1080-Zellen bzw. HT1080-TNF-Rezeptor-Zellen wurden mit Antikörper bzw. löslichem Ligand inkubiert, die Bindung wurde am FACS ermittelt. a) Messung der Expression der angegebenen TNF-Rezeptoren mittels PE-markierter Antikörper im FACS, b) Messung der Bindung der diversen Liganden, Detektion durch anti-Flag mAk M2 und anti-Maus-PE im FACS-Gerät.

6.1.3 Effekt der Oligomerisierung auf die spezifische Aktivität von CD27L, CD40L, 41BBL, OX40L und GITRL

Um zu ermitteln, wie gut die verschiedenen Ligandvarianten ihren jeweiligen Rezeptor aktivieren, wurden die HT1080-Transfektanten, die CD27, CD40, 41BB, OX40 und GITR exprimieren, mit dem entsprechenden Liganden stimuliert und nach 6 Stunden die IL-8-Produktion bestimmt. Die Sekretion von IL-8 ist ein leicht messbares Produkt der Aktivierung des NF κ B-Signalweges. Um einen möglichen Einfluss der Oligomerisierung der Liganden auf die Aktivität zu erkennen, wurden die Liganden darüber hinaus nach sekundärer Quervernetzung mit einem monoklonalen anti-Flag-Antikörper auch für 6 Stunden auf die Zellen gegeben und anschließend ebenfalls die IL-8-Produktion ermittelt (Abb. 9). Alle drei CD40L-Varianten sowie Flag-TNC-GITRL und Fc-Flag-GITRL induzierten eine starke IL-8-Antwort in HT1080-CD40 bzw. -GITR-Transfektanten, die bei Ligandkonzentrationen von 0,1 und 1 ng/ml einsetzte und ihr Maximum bei 10 - 50 ng/ml erreichte. Die Oligomerisierung dieser Konstrukte mit Hilfe des anti-Flag-Antikörpers M2 hatte nur einen geringen aktivitätssteigernden Effekt. Dieser Effekt war hierbei für Flag-CD40L noch am höchsten, die ED₅₀ wurde hier ungefähr um den Faktor 10 verschoben. Im Gegensatz zu den genannten Liganden zeigten alle drei OX40L-Fusionsproteine sowie Flag-TNC-41BBL und Flag-TNC-CD27L nach anti-Flag-Antikörper-vermittelter Oligomerisierung einen sehr viel stärkeren Aktivitätsanstieg. So induzierten die genannten Liganden in oligomerisierter Form IL-8 mit ED₅₀-Werten um ca. 10 ng/ml (OX40L) bis 100 ng/ml (41BBL, CD27L). Ohne anti-Flag-Quervernetzung zeigten die Proteine keine (Flag-OX40L, Flag-TNC-CD27L) oder höchstens eine minimale (Flag-TNC-41BBL und -OX40L) Induktion der IL-8-Produktion, auch beim Einsatz sehr hoher Ligandkonzentrationen (2000 ng/ml). Flag-41BBL war ebenfalls nach Oligomerisierung aktiv, allerdings signifikant schwächer als die entsprechende TNC-Variante. Fc-Flag-41BBL zeigte eine geringe Aktivität bei höheren Konzentrationen, welche durch Oligomerisierung mit anti-Flag gesteigert werden konnte. Aber auch hier lag die Maximalantwort, verglichen mit oligomerisiertem Flag-TNC-41BBL, deutlich niedriger. Flag-CD27L und Fc-Flag-CD27L waren sowohl mit als auch ohne Oligomerisierung praktisch inaktiv (Abb. 9).

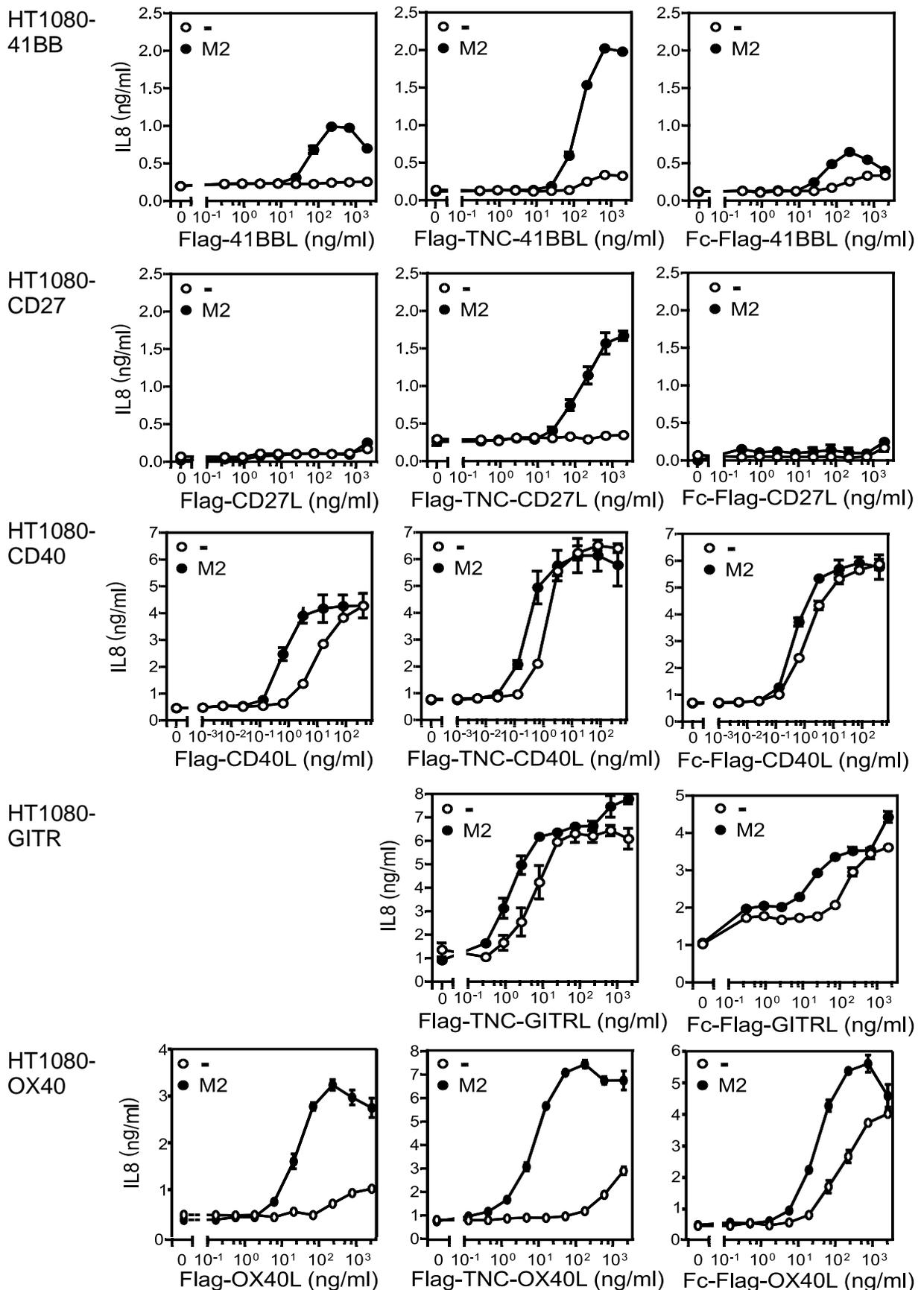


Abb. 9 Effekt der Oligomerisierung auf die Aktivität der löslichen TNF-Liganden. Rezeptor-transfizierte HT1080-Zellen wurden für 6 h mit löslichem Ligand in An- bzw. Abwesenheit von quervernetzendem M2-Antikörper stimuliert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der IL-8-Konzentration im Zellüberstand mit Hilfe eines IL-8-ELISAs.

Die aus der Gelfiltration isolierten hochmolekulare Spezies von Flag-CD40L (siehe 4.1.1, Abb. 7) wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Bioaktivität getestet. Die hochmolekulare Fraktion von Flag-CD40L war inaktiv, unabhängig davon, ob der monoklonale anti-Flag-Antikörper M2 zugegeben wurde oder nicht. Fraktion 34, die dem Trimer entspricht, verhielt sich ähnlich wie das Ausgangsmaterial (Abb. 10a). Zusätzlich zeigte sich, dass die hochmolekularen Aggregate, im Gegensatz zu den trimeren Molekülen, nicht in der Lage waren, an CD40 zu binden (Abb. 10b).

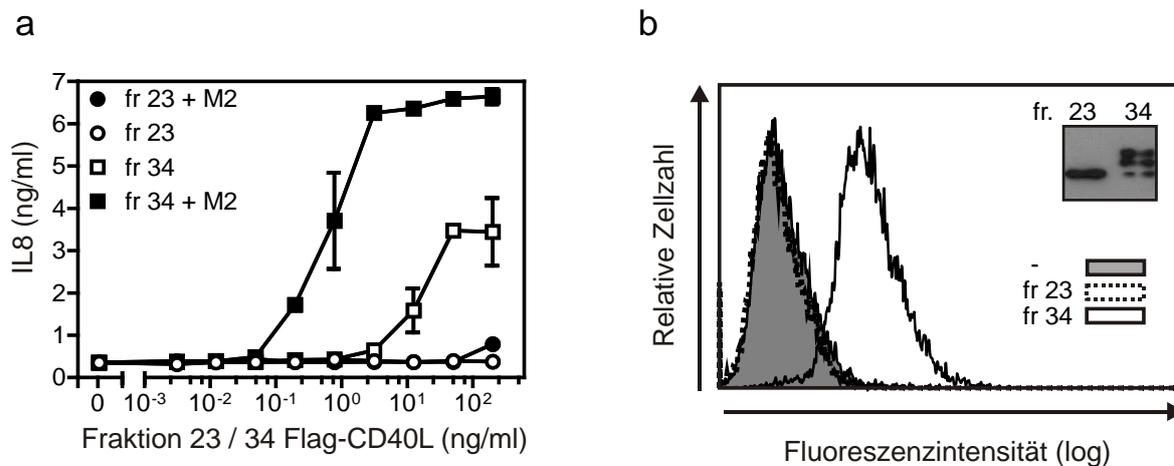


Abb. 10 Untersuchung der hochmolekularen und der trimeren Flag-CD40L-Fraktion hinsichtlich deren Bioaktivität (a) und Bindungseigenschaften (b). a) IL-8-ELISA nach Stimulation von HT1080-CD40 für 6 h mit Fraktion 23 (Aggregat) und Fraktion 34 (Trimer) aus der Gelfiltration von Flag-CD40L, b) Bindungs-Analyse von Fraktion 23 und 34 an HT1080-CD40-Zellen, die Detektion des gebundenen Liganden erfolgte durch FACS-Analyse mit einem anti-Flag M2-anti-Maus-PE-Komplex.

Da gereinigte, nicht mittels Gelfiltration separierte Flag-CD27L-Präparationen weder an CD27 binden, noch nach Oligomerisierung aktiv werden, ist anzunehmen, dass die hochmolekulare Flag-CD27L-Fraktion, die in der Gelfiltration (Abb. 7) erhalten wird, ebenfalls kein aktives Material enthält. Die Aktivität von oligomerisiertem Flag-TNC-CD40L und Flag-TNC-CD27L bestätigte sich auch in primären Zellsystemen. Flag-TNC-CD40L induzierte effizient die Reifung von IL-4/GM-CSF behandelten CD14⁺ Monozyten zu Dendritischen Zellen (DC), was durch FACS-Analysen der CD83- und CD86-Expression gezeigt werden konnte (Abb. 11a). Oligomerisierter Flag-TNC-CD27L wirkte kostimulatorisch auf die Proliferation von T-Zellen, die mit suboptimalen Konzentrationen von PHA/IL-2 aktiviert wurden (Abb. 11b).

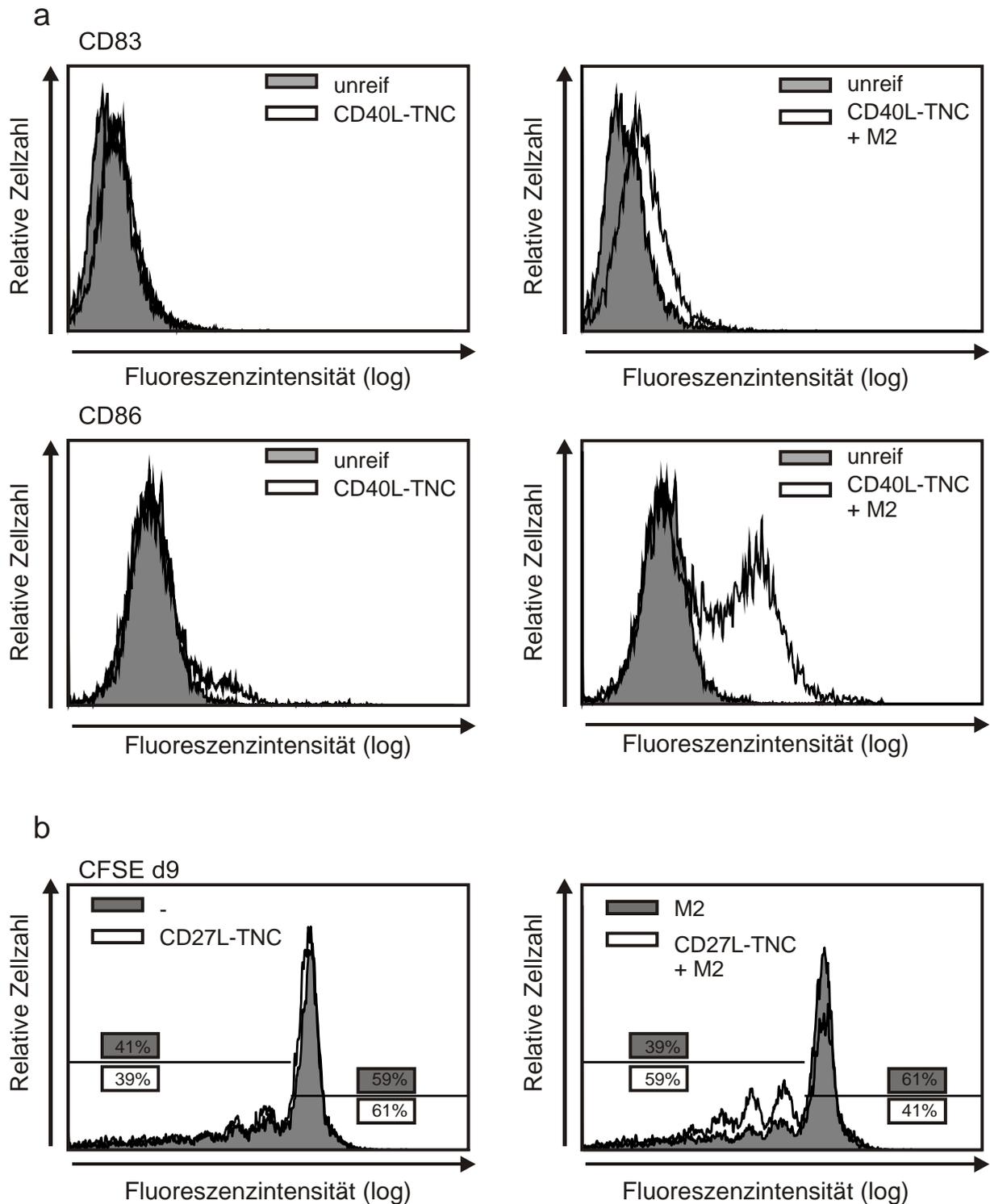


Abb. 11 Oligomerisierter Flag-TNC-CD40L und Flag-TNC-CD27L triggern DC-Aktivierung und T-Zell-Kostimulation a) mittels FACS-Analyse wurde die Flag-TNC-CD40L-induzierten Reifung von Dendritischen Zellen (DCs) nach 3 Tagen Stimulation gemessen, als Aktivierungsmarker wurden CD83 und CD86 mit Hilfe von PE-gefärbten Antikörpern untersucht, b) Für den Proliferations-Assay von CFSE-gefärbten T-Zellen wurden diese mit suboptimalen PHA/IL-2-Konzentrationen aktiviert, gleichzeitig mit und ohne oligomerisierten Flag-TNC-CD27L kostimuliert und nach 9 Tagen mittels FACS-Analyse gemessen.

Die Aktivität der unterschiedlichen Ligandvarianten korrelierte mit ihrer Rezeptorbindungsfähigkeit. Folglich konnten Liganden, die ihren Rezeptor, zumindest nach der Oligomerisierung, binden, diesen auch aktivieren. Flag-CD27L und Fc-Flag-CD27L hingegen konnten auch nach Quervernetzen CD27 nicht aktivieren und ließen auch keine Bindung am Rezeptor erkennen.

6.2 Immobilisationsabhängige Aktivierung löslicher TNF-Ligandvarianten

6.2.1 Trimere scFv-TNF-Ligand-Fusionsproteine erlangen hohe Aktivität nach Zelloberflächenantigenbindung

Ein mögliches Problem, das die Anwendung der kostimulatorischen TNF-Liganden oder entsprechender agonistische TNF-Rezeptor-Antikörper im klinischen Bereich einschränkt, liegt in der Induktion von Autoimmunität oder systemischen entzündlichen Nebenwirkungen. Es wurde schon für andere TNF-Liganden, die als lösliche Trimere nur schwach aktiv sind, gezeigt, dass diese eine hohe Aktivität erlangen, wenn sie an einer Zelloberfläche immobilisiert werden. Von Einzelketten-Antikörperfragment (single chain antibody fragment, scFv)-Fusionsproteinen von FasL und TRAIL, welche ein spezifisches Zelloberflächenantigen erkennen, ist bekannt, dass sie sich auf antigennegativen Zellen wie ihre entsprechenden löslichen trimeren Liganden verhalten und daher praktisch nicht in der Lage sind, Fas oder TRAILR2 signifikant zu aktivieren. Nach Bindung an das entsprechende Zelloberflächenantigen werden diese Fusionsproteine jedoch vergleichbar oder sogar noch stärker aktiv als nach Oligomerisierung. Da die Antigenpezifität des scFv-Teils die Aktivität dieser TNF-Ligand-Fusionsproteine auf antigenpositive Zellen begrenzt, führt dies zu einer Minderung von möglichen „off target“-Effekten. Um zu klären, ob und, wenn ja, bis zu welchem Grad die Aktivität von CD27L, CD40L, 41BBL, OX40L und GITRL durch Zelloberflächenantigenbindung gesteigert werden kann, wurden von den genannten Liganden Fusionsproteine kloniert, die amino-terminal ein Einzelketten-Antikörperfragment (sc40) besitzen, welches spezifisch das Tumorstromaantigen FAP

(fibroblast activation protein) erkennt. Alle FAP-spezifischen scFv-Fusionsproteine enthielten zudem einen Flag-tag (Abb. 12).

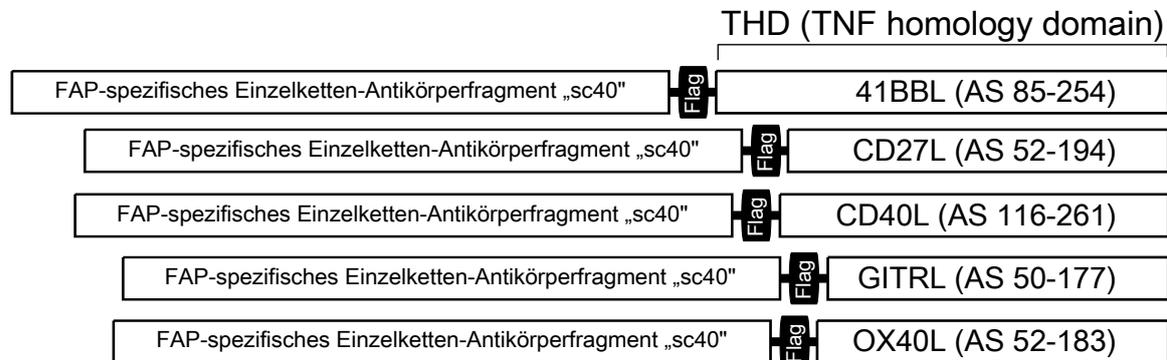


Abb. 12 Schematischer Aufbau löslicher single chain 40 (sc40)-TNF-Ligand-Fusionsproteine.

Die diversen sc40-Ligand-Fusionsproteine wurden transient in HEK293-Zellen exprimiert, durch anti-Flag-Affinitätschromatografie aufgereinigt und im Western Blot analysiert (Abb. 13).

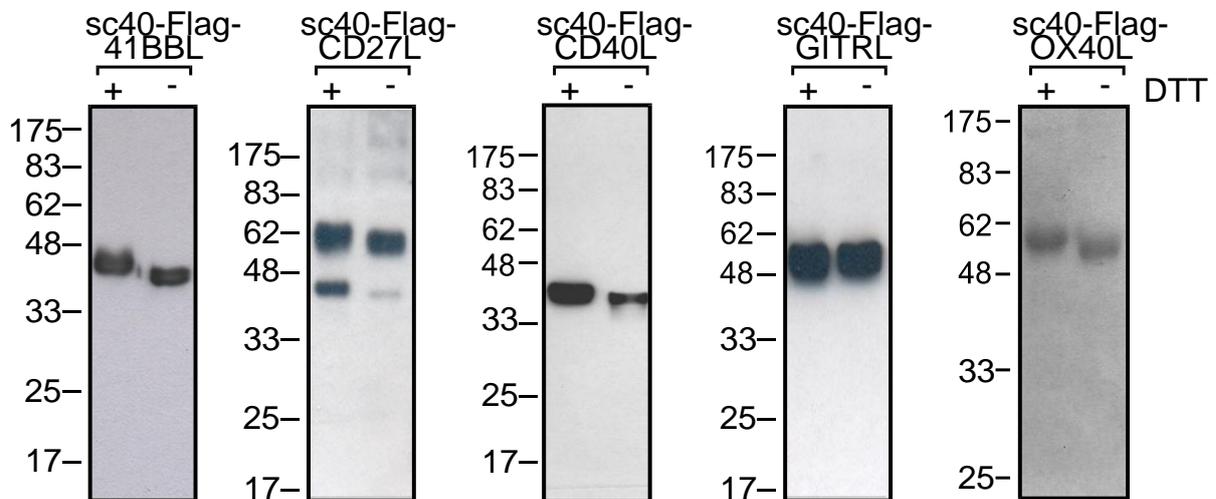


Abb. 13 Western Blot Analyse der gereinigten sc40-TNF-Ligand-Fusionsproteine. Lösliche Ligandfusionsproteine wurden transient in HEK293-Zellen produziert, aufgereinigt und unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen auf ein Proteingel aufgetragen. Die Visualisierung erfolgte durch anschließende Western Blot-Detektion mit dem anti-Flag M2-Antikörper.

Die Gelfiltration zeigte, dass sich sc40-Flag-CD40L hauptsächlich als Trimer mit einem geringen Anteil an hexameren Molekülen und hochmolekularen Aggregaten formierte, sc40-Flag-GITRL hingegen bestand aus einer Mischung von Monomeren und Tri- oder

Tetrameren. Das sc40-Flag-41BBL-Fusionsprotein eluierte in einem dominanten „peak“, der dem Molekulargewicht eines Dimers entsprach, während sc40-Flag-CD27L als Monomer und als hochmolekulares Aggregat vorlag. Die Gelfiltrationsanalyse von sc40-Flag-OX40L zeigte eine trimere Organisation des Moleküls (Abb. 14).

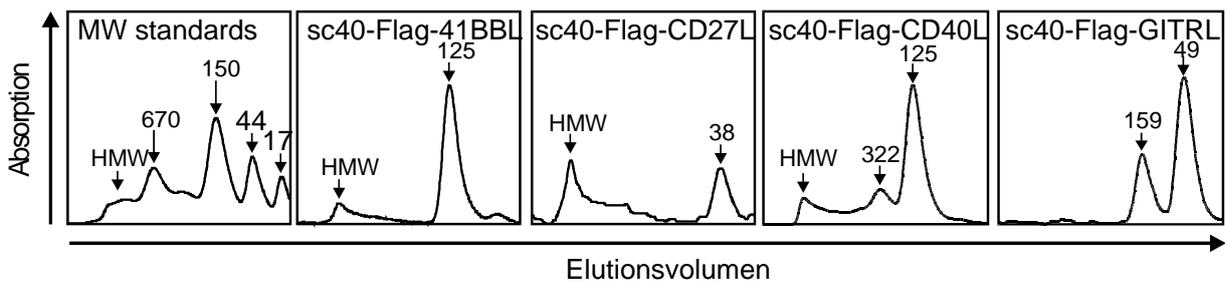


Abb. 14 Gelfiltrationsanalysen der gereinigten sc40-Fusionsproteinvarianten auf einer BioSep-SEC-S3000-Säule. Als Standardproteine diente ein Mix aus Thyroglobulin (670 kDa), Immunglobulin G (150 kDa), Ovalbumin (44 kDa) und Myoglobin (17 kDa).

FACS-Analysen mit HT1080-Transfektanten, die FAP bzw. die verschiedenen TNF-Rezeptoren exprimieren, zeigten, dass alle Fusionsproteine effizient an FAP binden konnten (Abb. 15). Mit Ausnahme von sc40-Flag-CD27L interagierten auch alle Fusionsproteine mit ihren jeweiligen Rezeptoren (Abb. 15). Ähnlich den trimeren Varianten von 41BBL (Flag-41BBL und Flag-TNC-41BBL) war löslicher sc40-Flag-41BBL nicht in der Lage, die IL-8-Produktion in HT1080-41BB-Zellen zu stimulieren. Nach Bindung an FAP-exprimierende Zellen jedoch konnte das Fusionsprotein in HT1080-41BB-Zellen eine starke IL-8-Induktion schon bei niedrigen Konzentrationen hervorrufen (Abb. 16). sc40-Flag-CD40L besaß bereits eine starke Zelloberflächenantigen-unabhängige Aktivität und verhielt sich daher im Prinzip wie Flag-CD40L. Trotzdem führte die Bindung an FAP dazu, dass sich der ED₅₀-Wert des Moleküls für die IL-8-Induktion um den Faktor 25 verringerte (Abb. 16). sc40-Flag-GITRL zeigte bei hohen Konzentrationen eine signifikante Aktivität, die nach FAP-Bindung um das 10-fache erhöht wurde. Allerdings war das maximal erreichte IL-8-Signal nur halb so stark wie das von Flag-TNC-GITRL (Abb. 16). Ähnlich wie Flag-OX40L war das sc40-Flag-OX40L-Fusionsprotein auf

HT1080-OX40-Zellen nur schwach aktiv, in Anwesenheit von FAP-positiven Zellen wurde dessen Aktivität jedoch um das 200-fache erhöht.

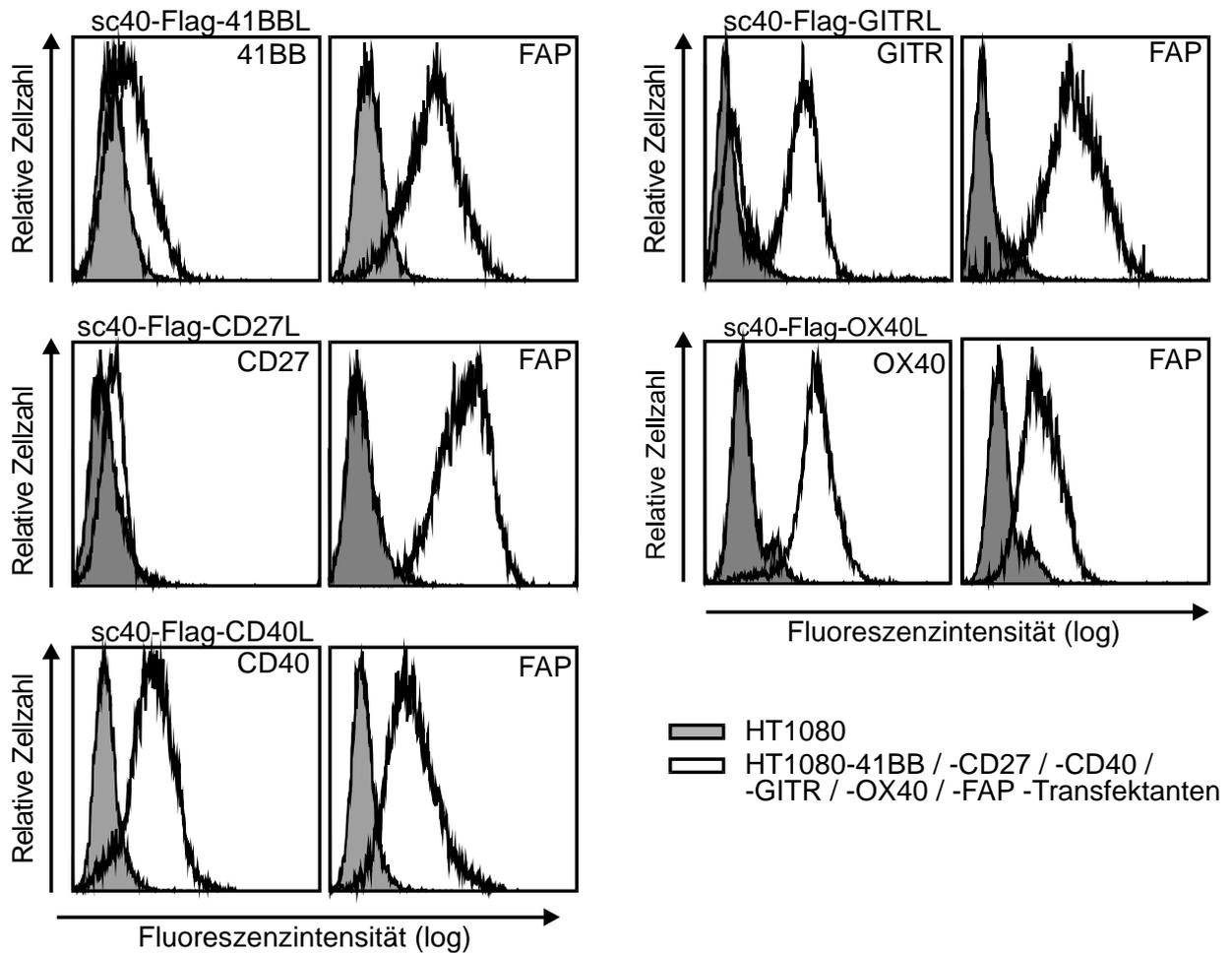


Abb. 15 FACS-Analyse der Bindung der Fusionsproteine an HT1080-FAP- bzw. HT1080-Rezeptorzellen. Die HT1080-Zellen wurden mit den verschiedenen sc40-Ligandvarianten inkubiert und deren Bindung mit komplexiertem anti-Flag M2-Antikörper und anti-Maus-PE mittels FACS-Analyse gemessen.

Das CD27L-Fusionsprotein besaß weder auf FAP-negativen noch auf FAP-Transfektanten eine detektierbare Aktivität (Abb. 16). Die fehlende Aktivität von sc40-Flag-CD27L selbst nach Antigenbindung stimmt mit den vorangegangenen Befunden überein, die zeigten, dass löslicher CD27L auch nach Oligomerisierung nicht aktiv ist. Die vergleichsweise niedrige spezifische Aktivität von FAP-gebundenem sc40-Flag-GITRL spiegelt sich in neuesten Erkenntnissen wieder, die zeigen, dass löslicher GITRL nur schwach aktiv ist, solange er nicht an eine stabilisierende Proteindomäne gekoppelt ist.

Dies passt auch zu unseren Befunden bezüglich Flag-TNC-GITRL, welches hoch aktiv ist (Abb. 16).

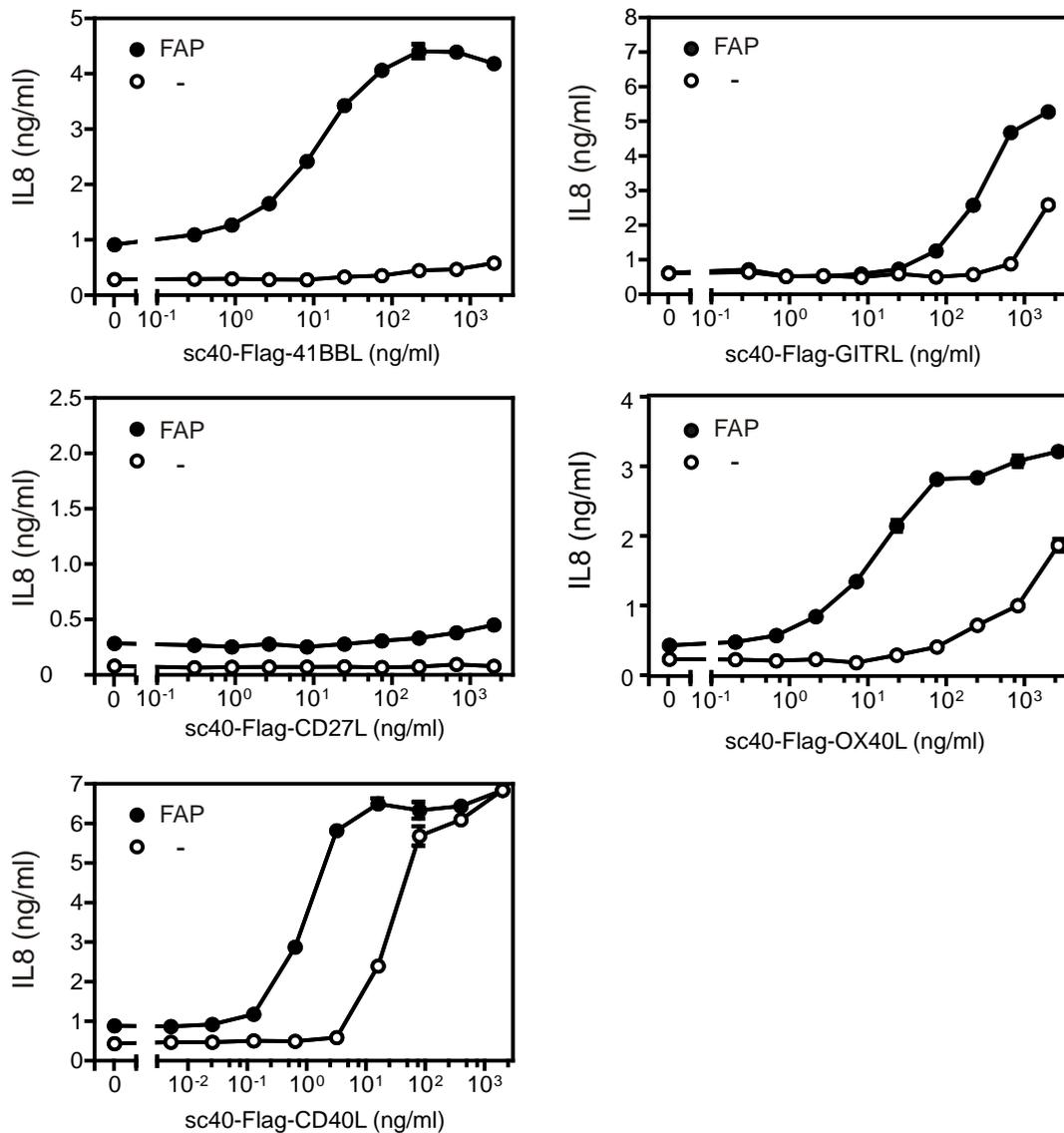


Abb. 16 Effekt der Zelloberflächenantigen-abhängigen Immobilisierung auf die Aktivität der löslichen TNF-Fusionsproteine. Nach 6-stündiger Stimulation von Rezeptor-transfizierten Zellen in Cokultur mit parentalen bzw. FAP-exprimierenden HT1080-Zellen erfolgte die Bestimmung der IL-8-Konzentration im Zellüberstand mittels eines IL-8-ELISAs.

Um zu prüfen, ob sich das Prinzip der antigenabhängigen immobilisierungsvermittelten Aktivierung auch auf TNF-Ligand-Fusionsproteine mit anderen scFv-Antikörperfragmenten anwenden lässt, haben wir weiter FasL- bzw. TRAIL-

Fusionsproteine konstruiert, die N-terminal für ein Antikörperfragment, welches CD19 erkennt, kodieren (scFvCD19-Flag-FasL bzw. scFvCD19-Flag-TRAIL) (Abb. 17). In der Literatur sind therapeutische Anwendungen von Antikörpern gegen den B-Zell-spezifische Oberflächenmarker für CD20 bereits beschrieben (Rituximab). Hierbei werden in erster Linie Erkrankungen wie Non-Hodgkin-Lymphom (NHL), B-Zell chronische lymphatische Leukämie (B-CLL) und andere B-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen behandelt. Da CD19 ebenfalls auf B-Zellen exprimiert wird, könnten sich hieraus ähnliche klinische Anwendungen wie bei CD20 ergeben.

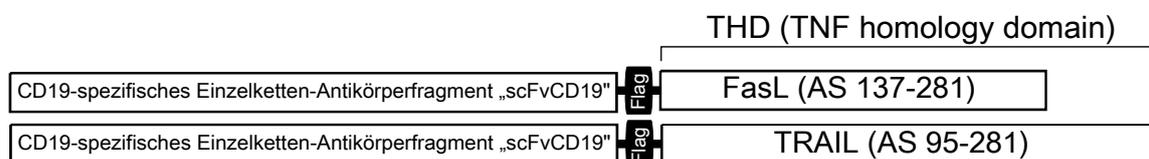


Abb. 17 Schematischer Aufbau der löslichen scFvCD19-Flag-FasL- und scFvCD19-Flag-TRAIL-Fusionsproteine.

scFvCD19-Flag-FasL und scFvCD19-Flag-TRAIL wurden zunächst auf ihr Vermögen, Apoptose zu induzieren, hin untersucht. Hierfür wurden antigennegative HT1080-Zellen mit den beiden Fusionsproteinen in unbehandelter und sekundär quervernetzter Form für 16 h stimuliert und anschließend mittels Kristallviolett färbung der Anteil noch lebender Zellen ermittelt. Es zeigte sich, dass scFvCD19-Flag-FasL bereits ohne M2-vermittelte Oligomerisierung eine hohe zytotoxische Aktivität auf HT1080-Zellen besitzt, die sich durch Zugabe des quervernetzenden Antikörpers M2 nicht weiter steigern ließ (Abb. 18). Dies spricht dafür, dass das FasL-Fusionsprotein in einer bereits aktiven, präaggregierten Form vorliegt und daher für einen Einsatz als immobilisationsabhängig aktivierbares Molekül nicht geeignet ist. Das zweite Molekül, scFvCD19-Flag-TRAIL, hingegen hatte ohne weiteres Quervernetzen nur eine moderate (HT1080) bzw. keine signifikante (Jurkat) Induktion von Apoptose, wohingegen die oligomerisierte Form eine bis zu 600-fach höhere Aktivität zeigte (Abb. 18). scFvCD19-Flag-TRAIL aggregiert daher

offensichtlich nicht und erfüllt somit eine wichtige Bedingung für die immobilisationsabhängige Aktivierbarkeit von TRAIL-Fusionsproteinen.

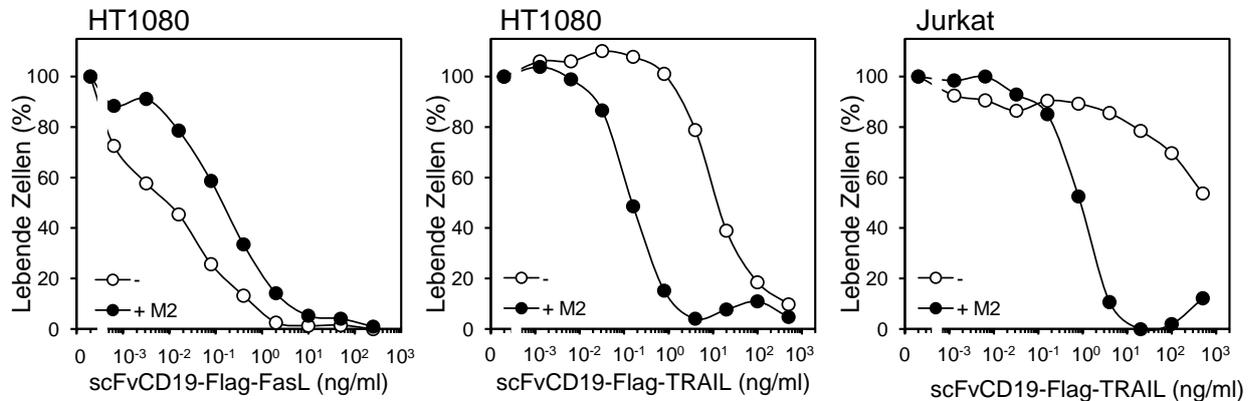


Abb. 18 Zytotoxische Aktivität der scFvCD19-Fusionsproteine auf parentalen HT1080-Zellen (FasL, TRAIL) bzw. auf Jurkat-Zellen (TRAIL). Die Zellen wurden für 16 h mit unbehandeltem und mit M2 quervernetztem scFvCD19-Flag-FasL bzw. scFvCD19-Flag-TRAIL inkubiert. Nach Kristallviolett-färbung (HT1080, in Anwesenheit von CHX (2,5 µg/ml)) bzw. MTT-Färbung (Jurkat) wurde die Vitalität der Zellen ermittelt.

Im Folgenden wurden Transfektanten von HT1080-Zellen hergestellt, die CD19 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Die erwartete Bindung des TRAIL-Fusionsproteins an seine Zielstruktur CD19 wurde mit FACS-Messungen gezeigt (Abb. 19).

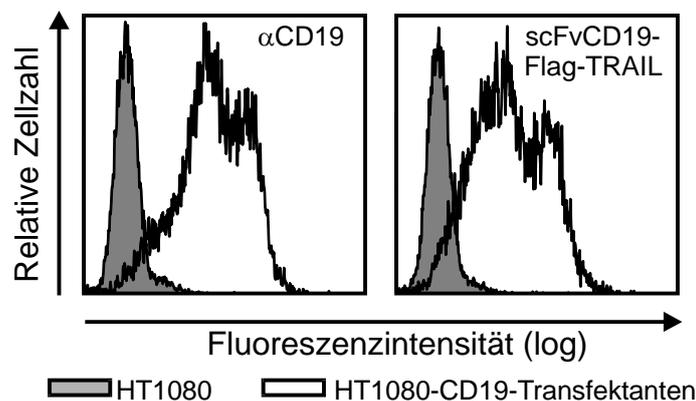


Abb. 19 FACS-Analyse der Bindung von antiCD19-Flag-TRAIL an HT1080-CD19. Die Detektion des an der Zelloberfläche gebundenen Proteins erfolgte mit einem anti-Flag M2-antiMaus-PE-Komplex. Als Negativkontrolle dienten parentale HT1080-Zellen.

Zum Nachweis einer verstärkten TRAIL-Todesrezeptor-Aktivierung durch scFvCD19-Flag-TRAIL nach Bindung an CD19 wurden parentale HT1080-Zellen und HT1080-CD19-Transfektanten parallel mit verschiedenen Konzentrationen an scFvCD19-Flag-TRAIL

stimuliert und nach 16 h mit Kristallviolett gefärbt (Abb. 20a). Es zeigte sich, dass das Fusionsprotein auf CD19-negativen parentalen HT1080-Zellen zwar noch mit 100 ng/ml toxisch war, auf HT1080-CD19-Transfektanten allerdings war die Aktivität von scFvCD19-Flag-TRAIL um das 200-fache erhöht. In weiteren Experimenten wurden dann beide Zelllinien mit z-VAD-fmk, einem pan-Caspase-Inhibitor, für 30 min vorbehandelt und anschließend mit dem Fusionsprotein für 6 h stimuliert. Nach Hemmung der Caspasen induzieren die TRAIL-Todesrezeptoren eine Aktivierung des NF κ B-Signalweges. Ein messbares Produkt dieser Aktivierung ist die Sekretion von IL-8. Das von den Zellen produzierte IL-8 wurde mit Hilfe eines IL-8-ELISAs bestimmt (Abb. 20b). Auch bei dieser nicht-apoptotischen Zellantwort zeigte sich, dass parentale HT1080-Zellen nur mit einer schwachen IL-8-Antwort auf das Fusionsprotein reagierten, wohingegen auf CD19-exprimierenden Zellen eine starke IL-8-Induktion schon bei niedrigen Konzentrationen hervorgerufen wurde.

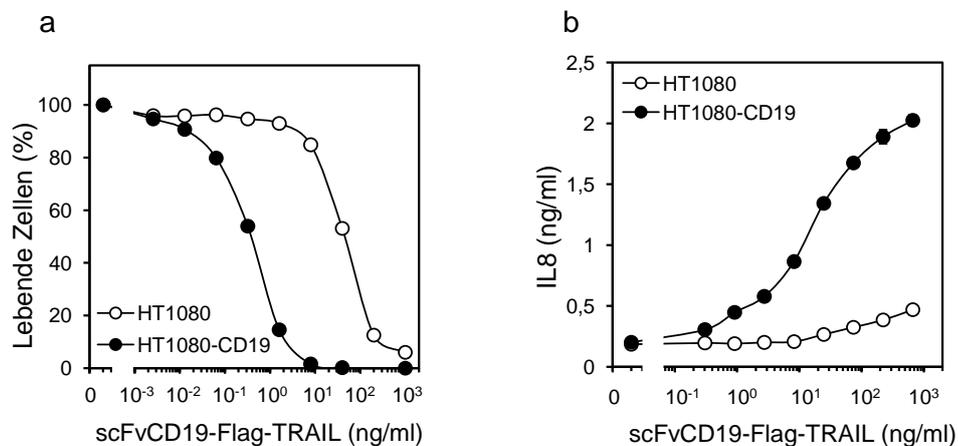


Abb. 20 Zytotoxizitätsassay (a) und IL-8-ELISA (b) von scFvCD19-Flag-TRAIL auf parentalen HT1080-Zellen und HT1080-CD19-Zellen. a) Stimulation von parentalen und CD19-transfizierten HT1080-Zellen mit scFvCD19-Flag-TRAIL in Anwesenheit von CHX (2,5 μ g/ml), nach 16 h Messung der Vitalität durch Kristallviolettfärbung, b) Nach 6-stündiger Stimulation von parentalen und CD19-exprimierenden HT1080-Zellen, welche für 30 min mit zVAD (20 μ M) vorinkubiert wurden, mit scFvCD19-Flag-TRAIL erfolgte die Bestimmung der IL-8-Konzentration im Zellüberstand mit Hilfe eines IL-8-ELISAs.

Um die antigenbindungsabhängige Aktivität des scFvCD19-Flag-TRAIL zu zeigen, wurden sowohl HT1080-CD19-Transfektanten, als auch Ramos- und Bjab-Zellen, beides B-Zell-Linien, die CD19 endogen exprimieren und TRAIL-sensitiv sind, mit dem bloßen

scFvCD19-Antikörperfragment vorinkubiert, um die Bindungsstellen für das scFvCD19-Flag-TRAIL-Fusionsprotein zu blockieren. Anschließend wurden behandelte und nicht-behandelte Zellen mit scFvCD19-Flag-TRAIL stimuliert und nach 16 h wiederum die Vitalität der Zellen durch Kristallviolett- (HT1080-CD19) bzw. MTT (Bjab, Ramos)-Färbung bestimmt (Abb. 21). Durch die Vorbehandlung mit dem löslichen Antikörperfragment wurde eine Verringerung der zytotoxischen Aktivität des scFvCD19-Fusionsproteins, je nach Zellart, um den Faktor 10 bis 125 erreicht (Abb. 21).

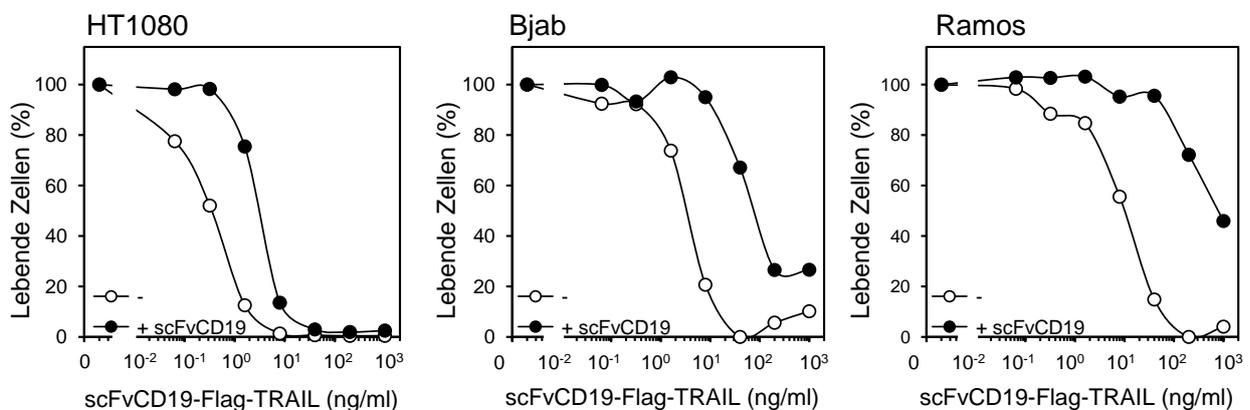


Abb. 21 Blockierung der antigenspezifischen immobilisationsabhängigen Aktivierung von TRAIL-Rezeptoren. Vorinkubation von HT1080-CD19-Zellen (Kristallviolett) bzw. den B-Zelllinien Bjab und Ramos (MTT) mit einem löslichen scFvCD19-Antikörperfragment für 1 h, anschließend 16 h Stimulation der Zellen mit scFvCD19-Flag-TRAIL.

Um untersuchen zu können, ob scFvCD19-Flag-TRAIL auch auf primären Zellen aktiv ist, wurden PBMCs (periphere Blut-Monozyten) aus Blutproben von CLL-Patienten isoliert, auf CD19-Expression hin überprüft und mit scFvCD19-Flag-TRAIL sowie mit unbehandeltem und quervernetztem Flag-TNC-TRAIL für 20 h stimuliert. Anschließend wurden die noch lebenden Zellen mittels des MTT-Assays quantifiziert. Es zeigte sich, dass das TRAIL-Fusionsprotein durchaus den Zelltod induzieren konnte, allerdings reagierten die Zellen der einzelnen getesteten Patienten hierbei sehr heterogen. So zeigte scFvCD19-Flag-TRAIL zwar auf einem Teil der Proben eine toxische Wirkung (Abb. 22a), ein Großteil der Proben erwies sich jedoch als vollkommen resistent gegenüber der TRAIL-vermittelten Apoptose (Abb. 22b).

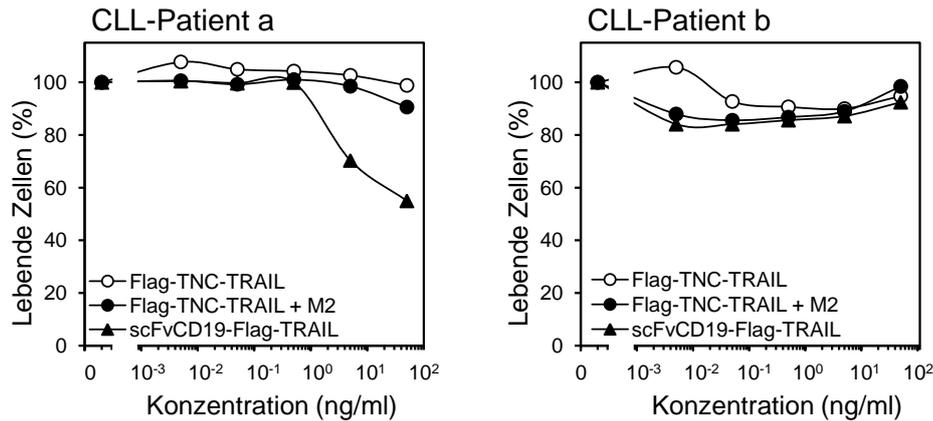


Abb. 22 Zytotoxizitätsassay von scFvCD19-Flag-TRAIL auf primären Zellen. Stimulation von peripheren Blutmonozyten (PBMCs) aus Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) mit verschiedenen Konzentrationen von scFvCD19-Flag-TRAIL, Flag-TNC-TRAIL und Flag-TNC-TRAIL, oligomerisiert mit anti-Flag mAk M2, a) mit zytotoxischer Wirkung, b) ohne zytotoxische Wirkung.

Die bisherigen Befunde zeigten, dass die latent vorhandenen rezeptoraktivierenden Eigenschaften inaktiver bzw. wenig aktiver löslicher TNF-Ligandentrimere durch Bindung an eine Oberfläche, z.B. die Zelloberfläche, realisiert werden können. Diese Immobilisierung wurde dadurch erreicht, dass der entsprechende trimere Ligand mit einer Antikörperdomäne gentechnisch fusioniert wurde, die ein bestimmtes Zelloberflächenantigen erkennt. Die so erhaltenen trimeren Fusionsproteine wurden daher durch die Bindung an das entsprechende Zelloberflächenantigen immobilisiert. Dies spricht dafür, dass die bloße „Präorganisation“ inaktiver TNF-Liganden in zwei Dimensionen bzw. die durch die Immobilisierung erreichte lokale Konzentrationserhöhung hinreichend ist, um eine Aktivierung der korrespondierenden Rezeptoren zu erreichen.

6.2.2 Zelloberflächenantigenbindung verleiht trimeren Fusionsproteinen aus einer Proteinbindedomäne und einem TNF-Liganden eine hohe Aktivität

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob es auch möglich ist, die durch Immobilisierung an eine Zelloberfläche vermittelte Aktivierung trimerer TNF-Ligand-Fusionsproteine mit Nicht-Antikörperdomänen zu realisieren. So sollten insbesondere auch Bindungsdomänen von Molekülen für eine Immobilisation genutzt werden, die physiologisch mit

membranständigen Proteinen interagieren, also z.B. auch mit Rezeptorbindungsdomänen verschiedener immunregulatorischer Liganden. Da solche Bindedomänen agonistisch/antagonistisch auf das membranständige Molekül wirken können, erschien es so möglich, bifunktionelle Fusionsproteine herzustellen.

Es wurden daher im Folgenden FasL-Fusionsproteine kloniert, die N-terminal eine Bindungsdomäne für immunregulatorische Moleküle enthalten. Im Einzelnen wurden FasL-Fusionsproteine mit den extrazellulären Domänen des TNFR1, TNFR2, RANK, CD40 sowie B7-2 (CD86) hergestellt und untersucht. Die Verwendung der verschiedenen extrazellulären Domänen der Rezeptoren TNFR1 und 2, RANK und CD40 sollte im Prinzip die Bindung an deren membranständige Liganden ermöglichen. B7-2 (CD86) ist ein Ligand, dessen zelluläre Zielstrukturen das CD28- und das CTLA4-Molekül auf T-Zellen sind. Membran-TNF, -CD40L und -RANKL, die Liganden der genannten TNF-Rezeptoren, sind ihrerseits auf diversen immunologischen Zellen exprimiert.

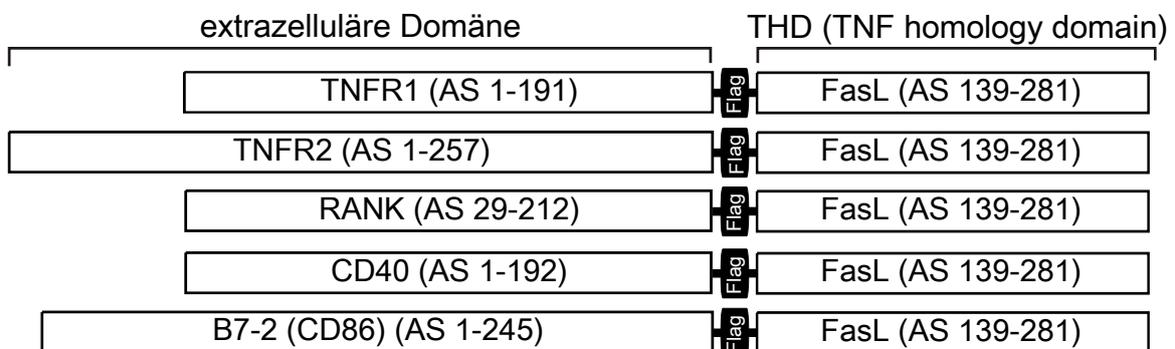


Abb. 23 Schematischer Aufbau der löslichen Bindedomänen-FasL-Fusionsproteine.

Alle Fusionsproteine wurden mit einem internen Flag-tag hergestellt (Abb. 23), wodurch es möglich war, sie nach der Produktion in HEK293-Zellen über eine anti-Flag M2-Agarosesäule zu reinigen. Die Fas-aktivierenden Eigenschaften der verschiedenen Fusionsproteine wurden zunächst auf Zellen, die keine Expression des entsprechenden Liganden aufweisen, getestet. Dabei wurde das FasL-Fusionsprotein in unbehandelter Form und in sekundär oligomerisierter Form, d.h. mittels des monoklonalen anti-Flag-

Antikörpers M2 quervernetzt, eingesetzt. Bei Zytotoxizitäts-Experimenten mit HT1080-Zellen zeigte sich, dass einige Varianten (TNFR1-Flag-FasL, TNFR2-Flag-FasL) bereits ohne Quervernetzen eine hohe Aktivität besaßen, die durch Oligomerisierung mit dem anti-Flag M2-Antikörper nicht weiter gesteigert werden konnte (Abb. 24). Dies spricht für die Ausbildung von bereits aktiven Autoaggregaten, deren zytotoxische Aktivität durch sekundäres Oligomerisieren kaum oder gar nicht weiter gesteigert werden oder sogar z.T. dadurch etwas verringert werden kann. Da diese Fusionsproteine für das Prinzip der immobilisationsabhängigen Fas-Aktivierung ungeeignet waren, wurden sie nicht weiter untersucht.

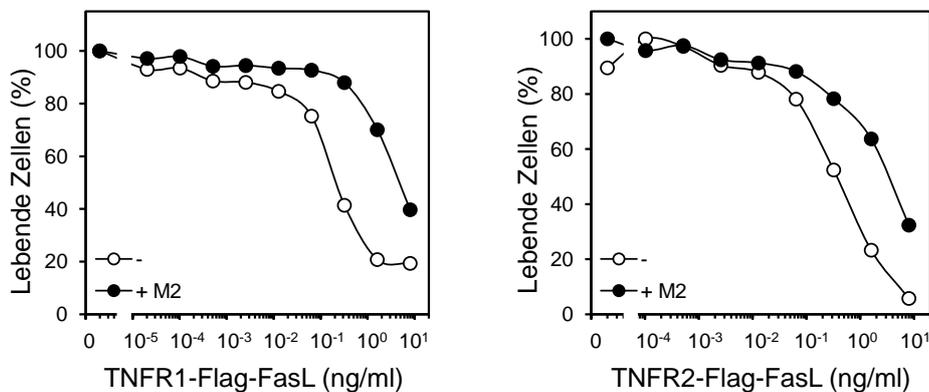


Abb. 24 Zytotoxische Aktivität der TNFR1-/TNFR2-FasL-Fusionsproteine auf parentale HT1080-Zellen. Nach Stimulation von parentalen, mit CHX (2,5 µg/ml) vorinkubierten HT1080-Zellen mit unbehandelten und mit M2 quervernetztem TNFR1- bzw. TNFR2-Flag-FasL für 16 h wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt.

Die anderen FasL-Fusionsproteine (RANK-, CD40-, B7-2-Flag-FasL) hingegen zeigten, im Unterschied zu ihrer nicht-aggregierten Form, nach Quervernetzen mit dem anti-Flag mAk M2 eine deutliche Aktivitätssteigerung um das 25 bis 50-fache (Abb. 25), was darauf schließen lässt, dass diese Fusionsproteine in trimerer Form und nicht als Aggregate vorliegen. Diese Proteine erscheinen daher grundsätzlich für die immobilisationsabhängige Aktivierung geeignet.

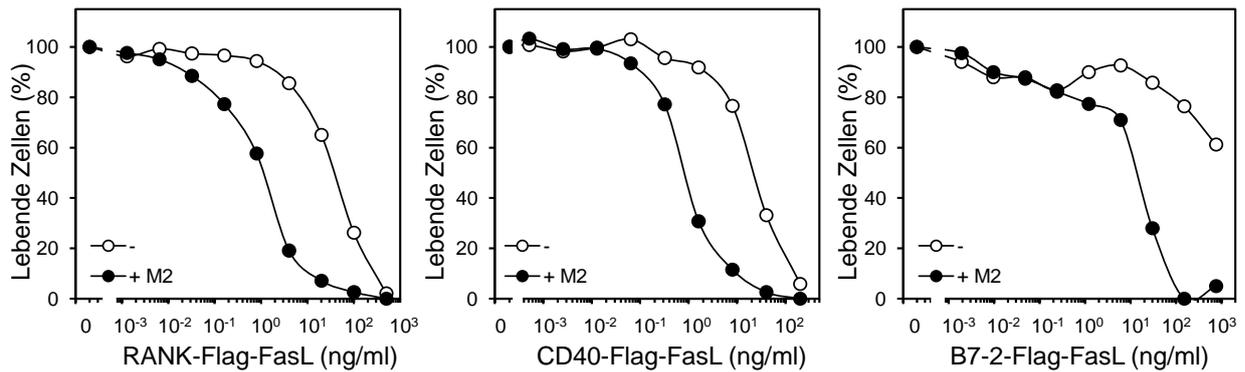


Abb. 25 Zytotoxische Aktivität der RANK-/CD40-/B7-2-Flag-FasL-Fusionsproteine auf parentalen HT1080-Zellen. Nach Stimulation von parentalen HT1080-Zellen mit unbehandelten und mit M2 quervernetzten RANK-, CD40- und B7-2-FasL-Fusionsproteinen für 16 h, in Anwesenheit von CHX (2,5 µg/ml), wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt.

Um diese Möglichkeit weiter zu untersuchen, wurden HT1080- bzw. KB-Transfektanten, die RANKL, CD40L oder CD28 überexprimieren, hergestellt. Die Expression der jeweiligen Moleküle auf diesen Zellen wurde anschließend mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierten Antikörpern im FACS getestet. Als Negativkontrolle wurden parentale HT1080- bzw. KB-Zellen verwendet (Abb. 26).

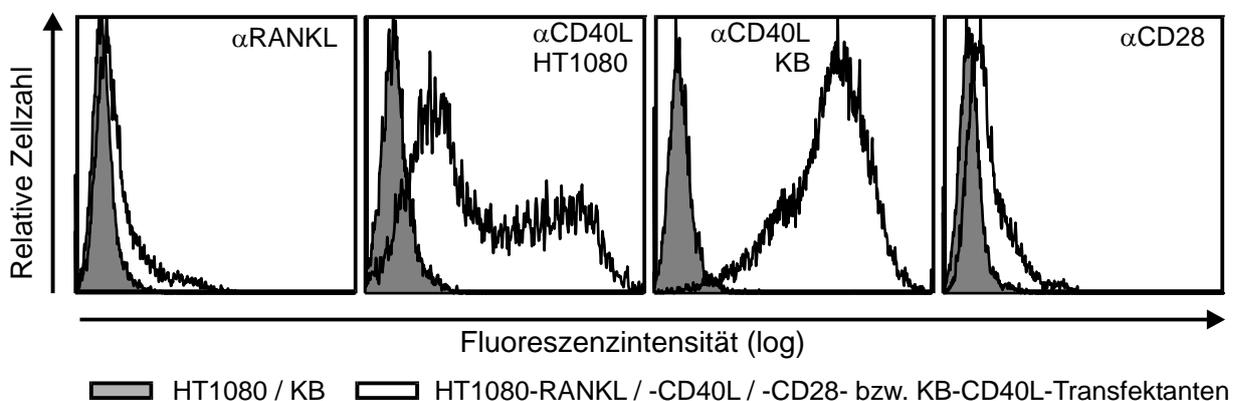


Abb. 26 FACS-Analyse der Expression von RANKL, CD40L und CD28 auf der Zelloberfläche. Parentale HT1080-Zellen und HT1080-Transfektanten (RANKL, CD40L, CD28) bzw. parentale KB- und KB-CD40L-Zellen wurden mit den entsprechenden Fluoreszenz-markierten Antikörper inkubiert, die Detektion erfolgte am BD FACSCalibur.

Um zu ermitteln, ob die CD40L-/RANKL- bzw. CD28-abhängige Immobilisierung der Fusionsproteine eine verstärkte Aktivierung von Fas zur Folge hat, wurden zum Einen in Zytotoxizitäts-Experimenten parallel parentale HT1080- bzw. KB-Zellen und die jeweiligen Transfektanten mit den entsprechenden Liganden stimuliert und nach 16 h eine Kristallviolettgefärbung aller noch lebenden Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, dass im Fall

von RANK-Flag-FasL und CD40-Flag-FasL die Aktivität der Fusionsproteine auf RANKL- bzw. CD40L-positiven Zellen um den Faktor 600 im Vergleich zu parentalen Zellen gesteigert werden konnte. Auf HT1080-CD28-Zellen wurde mit dem B7-2-Flag-FasL-Konstrukt eine um das ca. 50-fach niedrigere ED₅₀ erreicht (Abb. 27).

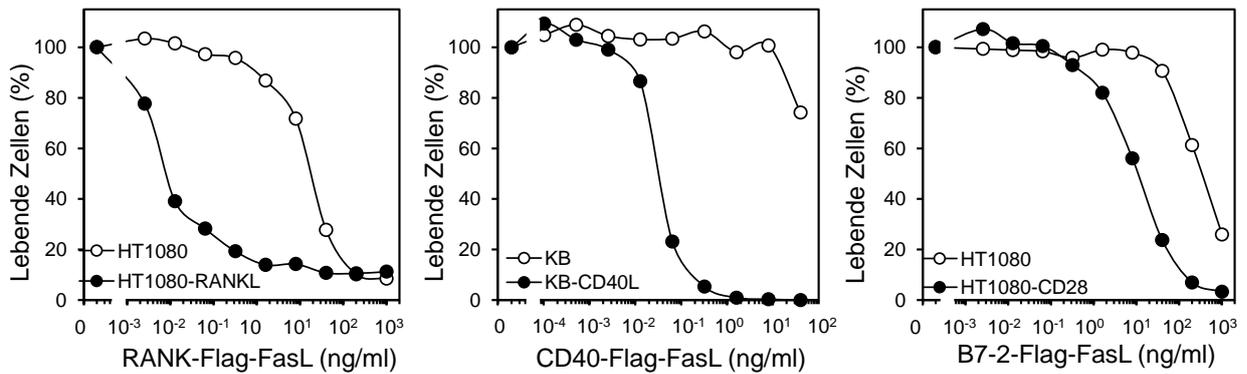


Abb. 27 Zytotoxizitätsassay von RANK-/CD40-/B7-2-Flag-FasL auf parentalen HT1080- bzw. KB-Zellen und HT1080-RANKL-/CD28 bzw. KB-/CD40L-Zellen. Die Messung des zytotoxischen Effekts der jeweiligen Fusionsproteine auf parentalen bzw. transfizierten Zellen erfolgte nach 16-stündiger Stimulation in Kombination mit CHX (2,5 µg/ml) und anschließender Kristallviolett-färbung der Zellen.

Am Beispiel des B7-2-Flag-FasL und des CD40-Flag-FasL wurde weiterhin untersucht, ob die durch diese Fusionsproteine induzierte, immobilisationsabhängige Apoptose nach Aktivierung des Fas-Rezeptors durch die Aktivierung der Caspase-8 abläuft. Mit einem Kokulturrexperiment und anschließender Westernblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass nach der Stimulation der entsprechenden Zellen mit dem jeweiligen FasL-Fusionsprotein die Spaltung der Initiator-Caspase 8 nur in Anwesenheit von Oberflächenantigen-positiven Zellen (HEK293-CD28 bzw. KB-CD40L) induziert werden konnte (Abb. 28).

Zum Anderen wurden die Zellen mit zVAD für 30 min vorinkubiert und anschließend mit dem jeweiligen Konstrukt stimuliert. Nach 6 h wurde die IL-8-Produktion der Zellen mit Hilfe eines IL-8-ELISAs bestimmt. Alle drei untersuchten Fusionsproteine (CD40-Flag-FasL, RANK-Flag-FasL, B7-2-Flag-FasL) induzierten in den entsprechenden Membranligand- bzw. den CD28-exprimierenden Zielzellen mit hoher Effizienz die

Produktion von IL-8, in nicht-transfizierten Kontrollzellen jedoch keine oder nur eine sehr geringe IL-8-Produktion (Abb. 29).

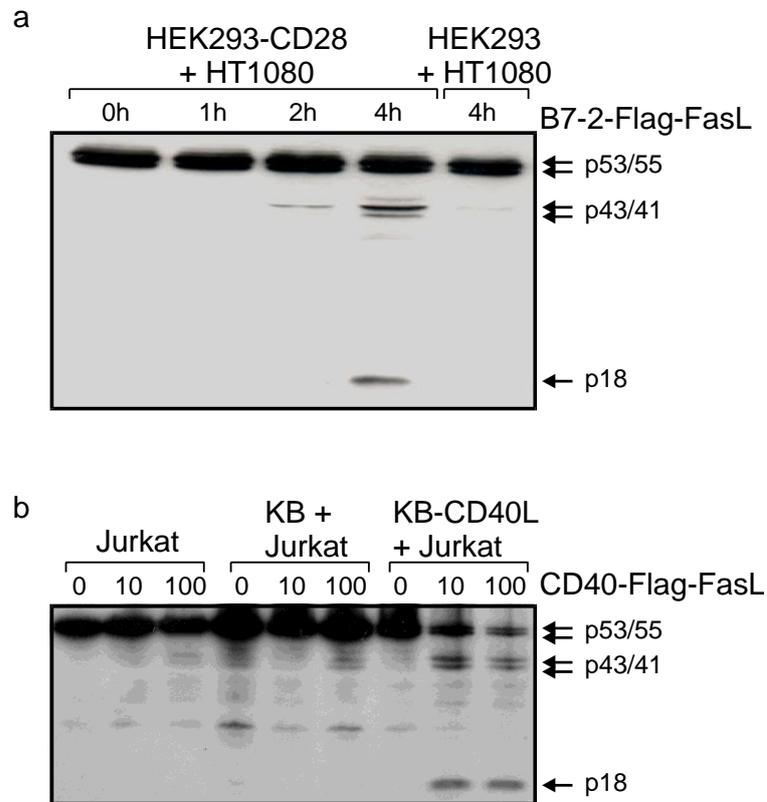


Abb. 28 Immobilisationsabhängige Aktivierung von Caspase 8 nach Stimulation mit dem FasL-Fusionsprotein. a) HT1080-Zellen wurden in Kokultur mit parentalen bzw. CD28-transfizierten HEK293-Zellen mit B7-2-Flag-FasL (200 ng/ml) für die angegebene Dauer in Anwesenheit von CHX (2,5 µg/ml) stimuliert. b) CD40-Flag-FasL wurde in den angegebenen Konzentrationen (in ng/ml) mit parentalen KB-Zellen und KB-CD40L-Zellen in Kokultur mit Jurkat-Zellen in Abwesenheit von CHX für 4 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend geerntet und Caspase-8-Spaltung wurde mittels Western Blot analysiert.

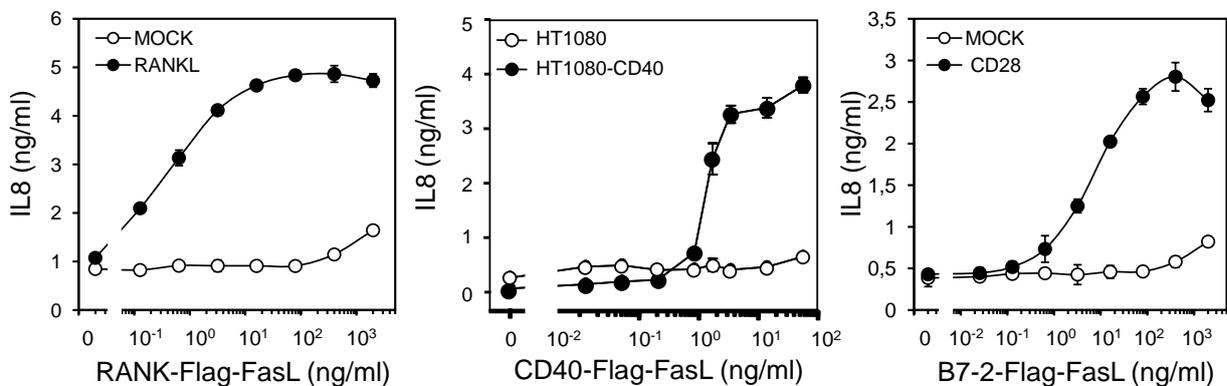


Abb. 29 Effekt der zelloberflächenantigenabhängigen Immobilisierung auf die Induktion von IL-8 durch lösliche FasL-Fusionsproteine. Nachdem parentale HT1080- und transfizierten HT1080-CD40-Zellen, bzw. HT1080-Zellen in Kokultur mit MOCK- und RANKL- bzw. CD28-transfizierten HEK293-Zellen, für 6 h, in Anwesenheit von zVAD (20 µM), mit RANKL-/CD40-/B7-2-Flag-FasL stimuliert wurden, erfolgte die Bestimmung der IL-8-Menge im Zellüberstand mittels IL-8-ELISA.

Der Umstand, dass sowohl apoptotische, als auch nicht-apoptotische Fas-assoziierte Signalwege aktiviert wurden, zeigt auch an diesem Beispiel wieder, dass das Prinzip der zelloberflächenabhängigen TNF-Rezeptor-Aktivierung nicht für einen einzelnen intrazellulären Signalweg, z.B. Apoptose, selektiv ist, sondern eine grundsätzliche Eigenschaft dieser Rezeptoren widerspiegelt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass T-Zell-Lymphome, B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome und Brustkrebszellen eine autokrine CD40L-CD40-Signalschleife nutzen, um NF κ B-abhängig eine hohe Resistenz gegenüber Todesrezeptor-vermitteltem Zelltod zu entwickeln (Storz *et al.*, 2001, Pham *et al.*, 2002, Voorzanger-Rousselot und Blay, 2004). Für die Brustkrebszelllinie T47D, die sowohl CD40L, als auch seinen Rezeptor CD40 exprimiert, konnte gezeigt werden, dass selbst quervernetzter und somit aktiver löslicher FasL nur einen Teil der Zellen töten konnte (Abb. 30). Wurden diese Zellen allerdings mit CD40-Flag-FasL stimuliert, welches nach Bindung an CD40L auf der Zelloberfläche ebenfalls aktiv ist, reagierten die Zellen mit einer viel stärkeren Apoptoseantwort auf das FasL-Fusionsprotein (Abb. 30).

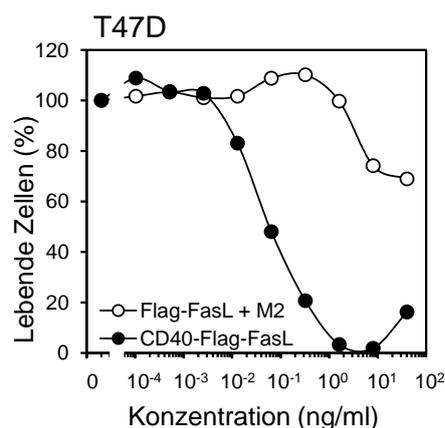


Abb. 30 Zytotoxische Aktivität von Flag-FasL und CD40-Flag-FasL auf T47D-Zellen. T47D-Zellen wurden in Kombination mit CHX (2,5 μ g/ml) und mit M2 quervernetztem Flag-FasL sowie mit CD40-Flag-FasL für 16 h stimuliert.

Wurde bei T47D-Zellen dieser antiapoptotische Signalweg durch eine Blockierung des membranständigen CD40L mittels eines CD40L-spezifischen Antikörpers inhibiert, zeigte auch der quervernetzte FasL eine verstärkte zytotoxische Wirkung. Dies lässt vermuten, dass T47D-Zellen durch das autokrine CD40-Signal vor Fas-induzierter Apoptose geschützt sind. Für CD40-Flag-FasL konnte gleichzeitig gezeigt werden, dass die Inhibition der Bindung an die Zelle durch α CD40L-Antikörper-vermittelte Blockierung des membranständigen CD40-Liganden zu einer verringerten Apoptoseinduktion führte (Abb. 31).

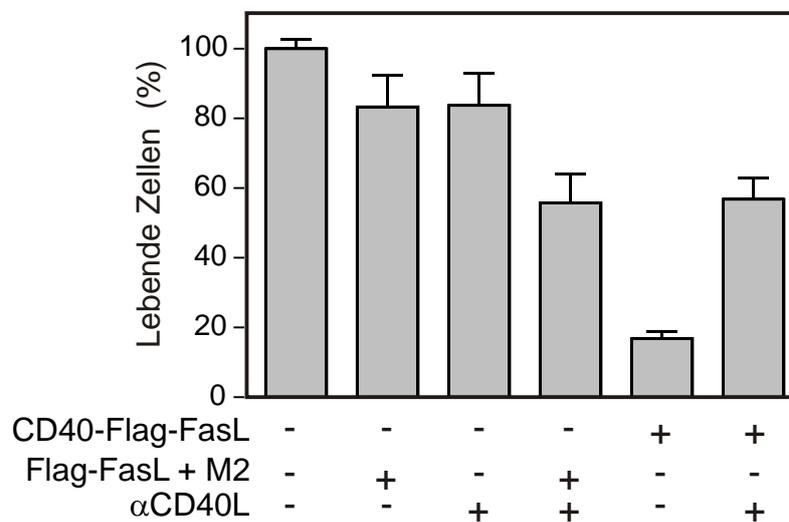


Abb. 31 Einfluss der Inhibierung des CD40-Signalwegs auf die Fas-vermittelte Apoptose und Blockierung der Apoptoseinduktion von CD40-Flag-FasL durch Bindung des α CD40L-Antikörpers. T47D-Zellen wurden in Anwesenheit von CHX (2,5 μ g/ml) für 16 h mit CD40-Flag-FasL und quervernetztem Flag-FasL (200 ng/ml), mit und ohne Vorinkubation des α CD40L-Antikörpers (4 μ g/ml), stimuliert und nach Kristallviolettffärbung analysiert.

Diese Experimente zeigten, dass CD40-Flag-FasL sowohl immobilisationsabhängig Fas-vermittelte Apoptose induzieren konnte und gleichzeitig durch die Blockierung des endogenen CD40L zu einer Inhibierung des autokrinen antiapoptotischen CD40-Signalweges führte. Der Synergismus aus agonistischer Fas-Aktivierung und antagonistischer CD40-Inhibierung zeichnet das Fusionsprotein CD40-Flag-FasL als ein bifunktionelles Molekül aus.

Zusammenfassend kann man sagen: Im Fall von FasL-Fusionsproteinen mit den extrazellulären Domänen verschiedener TNF-Rezeptoren kann man durch die Bindung der Fusionsproteine an den entsprechenden Liganden, zusätzlich zur immobilisationsabhängigen FasL-vermittelten Fas-Aktivierung, erwarten, dass durch die Rezeptordomäne des Fusionsproteins der entsprechende membranständige Ligand blockiert und dadurch eine Aktivierung des endogenen zellständigen Rezeptors inhibiert wird. Dies konnte hier für CD40-Flag-FasL bereits gezeigt werden. Derartige bifunktionellen Moleküle ermöglichen somit die Aktivierung von Fas und gleichzeitig die Inhibition des jeweiligen TNF-Ligand-TNF-Rezeptor-Signalsystems. Da das B7-2-Flag-FasL-Fusionsprotein die extrazelluläre Domäne des Liganden B7-2 enthält, sollte dessen Bindung an CTLA4 dazu führen, dass dieser inhibitorische Rezeptor auf aktivierten T-Zellen stimuliert wird und es, durch die Immobilisation an der Zelloberfläche, gleichzeitig zu einer Aktivierung von Fas auf diesen Zellen kommt. Beide Signale sollten somit zu einer Eliminierung von aktivierten T-Zellen führen.

7. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Effekt der Oligomerisierung, der Zelloberflächenimmobilisierung und der Stabilisierung der trimeren Molekülformation auf die Aktivität von löslichen rekombinanten TNF-Ligand-Varianten analysiert und verglichen. Die Oligomerisierung der trimeren Liganden wurde durch sekundäres Quervernetzen mit dem monoklonalen Antikörper M2 herbeigeführt. Dieser Antikörper erkennt das Flag-Epitop, welches in allen untersuchten Ligandfusionsproteinen vorhanden ist. Die Oligomerisierung führte zur Bildung von Aggregaten höherer Ordnung mit einer nicht definierten Stöchiometrie. Um Liganden mit einer genau definierten Stöchiometrie der trimeren Moleküluntereinheiten untersuchen zu können, wurden im Weiteren TNF-Liganden mit der dimerisierenden Fc-Domäne des humanen Immunglobulin G1 gentechnisch fusioniert, was in der Ausbildung von hexameren Proteinen resultierte (Holler *et al.*, 2003) (Abb. 32).

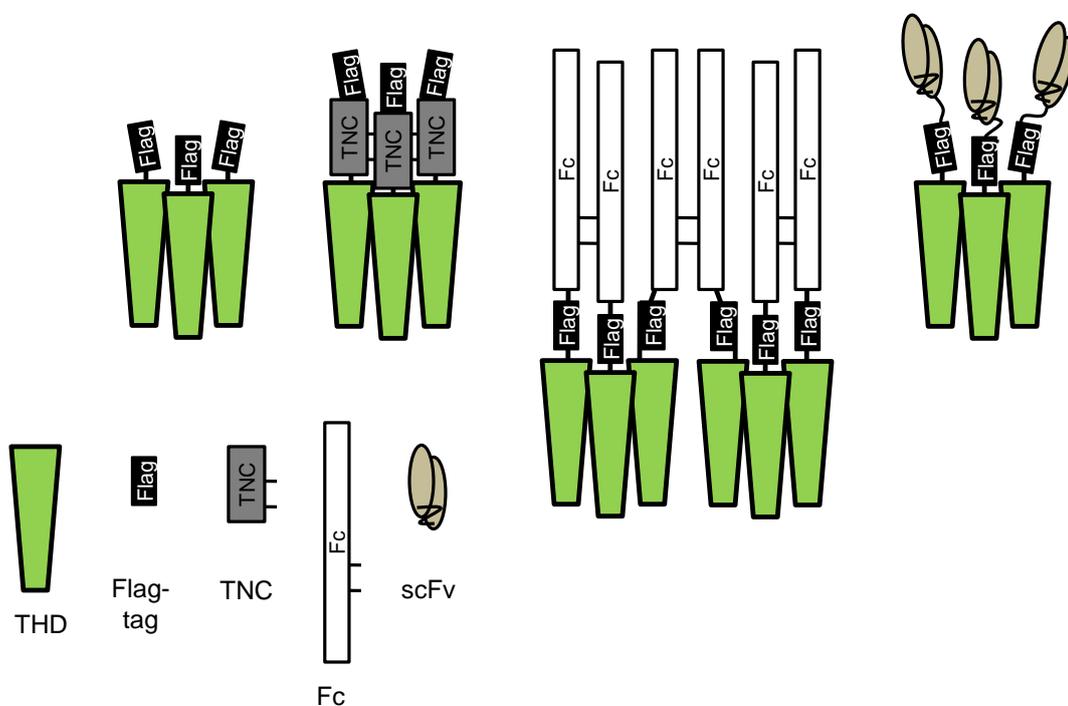


Abb. 32 Schematische Darstellung der Molekülstruktur von Flag-, Flag-TNC-, Fc-Flag- und scFv-Flag-Varianten von TNF-Liganden.

Um die trimeren TNF-Liganden zu stabilisieren, wurde eine 30 Aminosäuren kurze Domäne des Tenascin-C (TNC) verwendet, welche aufgrund von starken nicht-kovalenten Interaktionen und Disulfidbrückenbindungen eng gepackte Trimere formt (Kammerer *et al.*, 1998). Die Stabilisierung der trimeren Konformation wird vermutlich dadurch hervorgerufen, dass die Dissoziation der Ligandentrimere in ihre Monomere, wie sie für lösliches TNF und GITRL gezeigt wurde, verhindert wird (Corti *et al.*, 1992, Poesi *et al.*, 1993, Chattopadhyay *et al.*, 2007, Zhou *et al.*, 2008). In einem weiteren Ansatz wurden TNF-Liganden mit Einzelketten-Antikörperfragmenten (scFv) fusioniert (Abb. 32), welche das Zelloberflächenantigen FAP bzw. den B-Zell-Marker CD19 erkennen. Diese Fragmente dienten als Verbindung zwischen der Oberfläche von antigenpositiven Zellen und dem jeweiligen Liganden. Durch die Immobilisierung an der Zelloberfläche wirkten die ansonsten inaktiven löslichen Ligandfusionsproteine wie ihre korrespondierenden membranständigen Formen (Abb. 33).

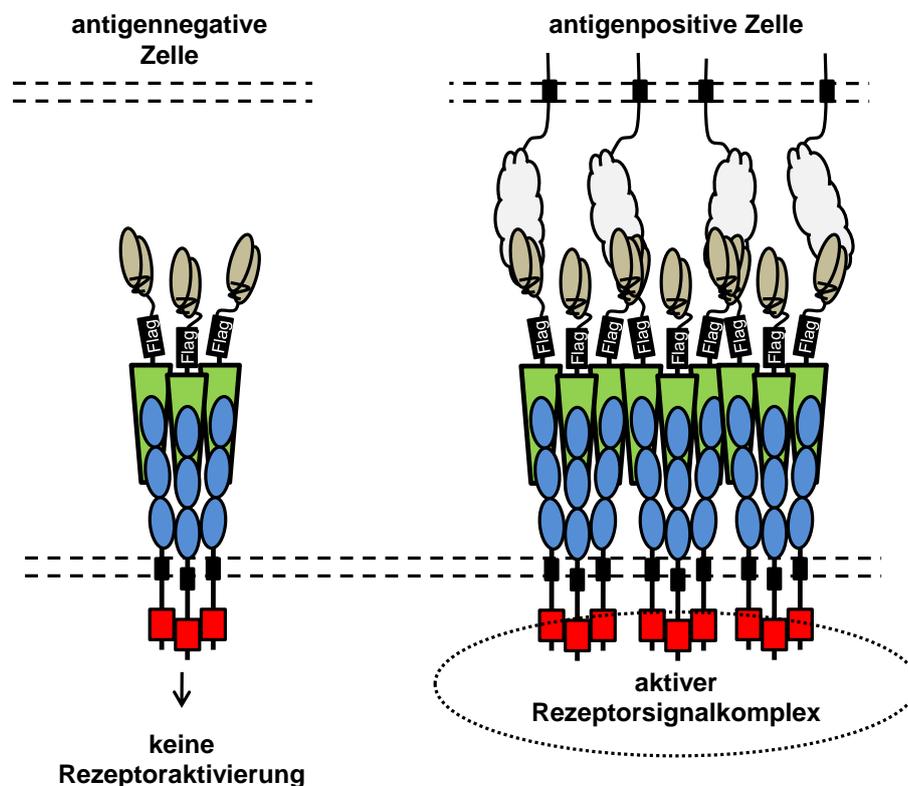


Abb. 33 Aktivierung von schwach aktiven scFv-TNF-Ligand-Fusionsproteinen durch Bindung des entsprechenden Antigens und Immobilisierung an der Zelloberfläche.

Das Prinzip der Ligandenaktivierung durch zelloberflächenantigenvermittelte Immobilisierung wurde bereits für einige Mitglieder der TNF-Familie beschrieben (Wajant *et al.*, 2001, Wuest *et al.*, 2002, Samel *et al.*, 2003, Bauer *et al.*, 2004, Bremer *et al.*, 2004, Bremer *et al.*, 2005). Im nächsten Schritt wurde die Antikörperdomäne gegen die Bindedomäne von Molekülen, die physiologisch mit membranexprimierten Proteinen interagieren, ausgetauscht, z.B. Ligandenbindedomänen verschiedener TNF-Rezeptoren. Die TNF-Ligand-Domäne dieser chimären Moleküle wurde durch die Membranbindung ebenfalls selektiv aktiviert.

7.1 Aktivierung löslicher kostimulatorischer TNF-Liganden durch Oligomerisierung

Im ersten Teil der Arbeit wurden trimere Flag- und Flag-TNC- sowie hexamere Fc-Flag-Varianten von CD40L, OX40L, CD27L, GITRL und 41BBL hinsichtlich ihrer nativen Struktur (Abb. 6, 7), der Bindung an ihren korrespondierenden Rezeptor (Abb. 8) und der Aktivierung des Rezeptors abhängig vom Oligomerisierungsgrad des Liganden (Abb. 9) verglichen. In SDS-PAGE-Analysen zeigten unter nicht-reduzierenden Bedingungen alle Flag-Ligandvarianten eine Bande, die dem monomeren Molekül entspricht. Die meisten Liganden wiesen Doppel- oder Dreifachbanden auf, ein Indiz für die bekannte Modifikation dieser Proteine durch Glykosylierung (Abb. 6). Aufgrund der Größe stellten die Banden mit dem niedrigsten Molekulargewicht dabei wohl nicht-glykosylierte Moleküle dar. Die TNF-Liganden mit einer Flag-TNC-Domäne wanderten unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf Höhe der entsprechenden Trimergröße, CD27L, GITRL und CD40L zeigten in unterschiedlichem Ausmaß aber auch die Ausbildung von Mono-, Di- und Multimere (Abb. 6). Aufgrund der Bildung von Disulfidbrücken zwischen den Fc-Domänen wanderten alle Fc-Flag-Fusionsproteine unter nicht-reduzierenden Bedingungen im SDS-Page als Dimere (Abb. 6). Basierend auf Gelfiltrationsanalysen konnten die Molekülmassen der einzelnen Ligandvarianten abgeschätzt werden. Alle Flag-markierten

Liganden zeigten trimere, eventuell auch dimere Organisation, allerdings konnten auch hochmolekulare (HMW-) Aggregate nachgewiesen werden (Abb. 7). Am Beispiel des Flag-CD40L wurde sowohl die trimere als auch die aggregierte Fraktion auf ihre Rezeptorbindungs- und Rezeptor-aktivierungsfähigkeit hin untersucht. Es zeigte sich, dass nur die trimeren Moleküle in der Lage waren, den Rezeptor zu binden und oligomerisierungsabhängig zu aktivieren (Abb. 10a und b). Die HMW-Aggregate waren trotz ihrer bereits offensichtlichen Aggregation inaktiv. Dies lässt darauf schließen, dass es sich vermutlich um fehlgefaltete oder unzureichend modifizierte Ligandmoleküle handelt, da durch fehlende Glykosylierung z.B. die Löslichkeit eines Proteins stark beeinflusst wird. Die Varianten, die eine Flag-TNC-Domäne enthielten, eluierten fast ausschließlich als Trimere ohne wesentliche Zeichen von Aggregatbildung. Nur Flag-TNC-CD40L und -CD27L zeigten eine zweite kleine Schulter bei der Größe eines Hexamers. Dies könnte daran liegen, dass zwei TNC-Domänen zweier unterschiedlicher Trimere miteinander interagieren und so analog zu den Fc-Liganden ein Hexamer bilden.

Alle Varianten von OX40L, CD40L, 41BBL und GITRL zeigten Bindung an ihre korrespondierenden Rezeptoren. Im Fall von CD27L konnte allerdings nur Flag-TNC-CD27L, aber weder Flag-CD27, noch Fc-Flag-CD27L, an CD27 binden. Das Unvermögen von Flag-CD27L und Fc-Flag-CD27L, mit CD27 zu interagieren, beruht offensichtlich nicht darauf, dass Aminosäuren außerhalb der THD des Liganden fehlen, die für die Rezeptorbindung wichtig sind, da die CD27L-Variante mit der TNC-Domäne in der Lage war, an CD27 zu binden (Abb. 8). Vielmehr scheint also die räumliche Fixierung des freien Aminoterminus des löslichen CD27L durch die TNC-Domäne eine Stabilisierung des Moleküls hervorzurufen und somit die Rezeptorbindung zu erleichtern. Multimere Proteinkomplexe sind i.d.R. stabiler als monomere Moleküle, da diese mit der Zeit irreversibel denaturieren können. In Proteinlösungen mit niedriger Konzentration erfolgt die Reassoziations der Ligandmoleküle viel langsamer, da das Gleichgewicht zwischen Monomer und Trimer sich zu der Seite der monomeren Form hin verschiebt und Monomere viel schneller denaturieren. Bei höheren Konzentrationen begünstigt die

Moleküldichte eine schnellere Reassoziaton der monomeren Untereinheiten, dadurch kommt es zu keiner oder zumindest deutlich geringeren Denaturierung des Proteins. Durch Einfügen der TNC-Domäne schafft man eine Verknüpfung der drei Moleküle des jeweiligen TNF-Liganden. Da die einzelnen Liganden sich nach Dissoziation nicht voneinander entfernen können, ist die Wahrscheinlichkeit der Reassoziaton gleichbleibend hoch, unabhängig von der Konzentration. Dies führt zu einer reduzierten Denaturierung und einer höheren Stabilität des Liganden. Zusätzlich könnte die TNC-vermittelte Trimerisierung den „strukturellen Stress“, der innerhalb des trimeren Ligandenkomplexes durch Rezeptorbindung entsteht, abbauen. Eine ähnliche Wiederherstellung der Rezeptorbindung durch Vermittlung der TNC-Domäne wurde bereits für eine lösliche Variante des murinen FasL beschrieben (Berg *et al.*, 2007).

Trimere Flag- oder Flag-TNC-Varianten von CD40L und GITRL lösten Signale über ihre korrespondierenden Rezeptoren bereits bei niedrigen Ligandkonzentrationen von 0,1-5 ng/ml aus und zeigten nach sekundärer Oligomerisierung mit dem anti-Flag Antikörper nur eine geringfügige Verschiebung der entsprechenden ED₅₀-Werte hin zu niedrigeren Konzentrationen (Abb. 9). Im Fall von CD27L, OX40L und 41BBL jedoch hatte die Oligomerisierung der löslichen Liganden einen enormen Effekt. Während nicht-quervernetzte Moleküle sogar bei hohen Konzentrationen (bis 2000 ng/ml) nahezu inaktiv waren, zeigten oligomerisierte CD27L-, OX40L- und 41BBL-Trimere bereits bei Konzentrationen unter 100 ng/ml gute Aktivität (Abb. 9). Für eine Variante von 41BBL mit einem N-terminalen AviTag wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass für die Aktivierung des Rezeptors eine Oligomerisierung des Liganden mittels Streptavidin unbedingt erforderlich ist (Rabu *et al.*, 2005). Die TNC-Trimerisierungsdomäne konnte in unterschiedlichem Ausmaß (10- bis > 100-fache Verringerung der ED₅₀-Werte) die intrinsische Aktivität aller in dieser Arbeit untersuchten TNF-Liganden steigern. Entsprechende Aktivierungssteigerungen wurden bereits auch für TRAIL und FasL gezeigt (Berg *et al.*, 2007). Es ist auch möglich, innerhalb eines Fusionsproteins die TNC-Domäne mit einer Fc-Domäne zu kombinieren. Diese zweiteilige Fc-TNC-Domäne wäre

das Mittel der Wahl, um rekombinante TNF-Liganden mit konstitutiv hoher Aktivität zu konstruieren. Die TNC-Domäne hat sich somit als ein vielseitig anwendbares Mittel erwiesen, um die Aktivität rekombinanter TNF-Liganden zu steigern. Die Ergebnisse mit Flag-TNC-GITRL passen zu einer Studie, die zeigt, dass ein GITRL-Leuzin-Zipper-Fusionsprotein gleichfalls stabilisiert und in seiner Aktivität verstärkt wurde. Auch hier konnte die Trimerdissoziation verhindert werden, was ein wichtiger Mechanismus bei der Inaktivierung von löslichem GITRL ist (Chattopadhyay *et al.*, 2007). Allerdings benötigten die genannten TNF-Liganden trotz Einführung der TNC-Domäne die Oligomerisierung, um eine maximale, hohe Aktivität zu zeigen (Abb. 9). Die Fusion von löslichen TNF-Liganden mit der dimerisierenden Fc-Domäne des humanen Immunglobulin G1 führte zur Bildung von hexameren Liganden mit hoher Bioaktivität. Im Gegensatz zu den trimeren Ligandvarianten waren die Fc-Fusionsproteine bereits in Abwesenheit des quervernetzenden anti-Flag-spezifischen Antikörpers hoch aktiv, nach der Oligomerisierung der Liganden zeigten sie nur einen schwachen Anstieg in der Aktivität (Abb. 9).

Zusammenfassend kann man sagen, dass CD27L, OX40L und 41BBL zu der Untergruppe der TNF-Ligandenfamilie gehört, für die eine Stabilisierung des trimeren Moleküls und dessen Oligomerisierung nötig sind, um eine deutliche, starke Rezeptoraktivierung zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu zeigten CD40L und GITRL bereits oligomerisierungs-unabhängig eine hohe Aktivität. GITRL benötigte allerdings die Stabilisierung des trimeren Moleküls durch die TNC-Domäne, um gute Aktivität zu zeigen.

7.2 Immobilisationsabhängige Aktivierung löslicher TNF-Ligandvarianten

7.2.1 Trimere scFv-TNF-Ligand-Fusionsproteine erlangen hohe Aktivität nach Zelloberflächenantigenbindung

Ein unabhängiger, klinisch interessanter Ansatz, um auf die Oligomerisierung schwach aktiver trimerer TNF-Liganden verzichten zu können, liegt in der Immobilisierung der Liganden an eine Zelloberfläche. Dies wurde bereits am Beispiel des FasL demonstriert (Samel *et al.*, 2003). Anhand eines Fusionsproteins aus 41BBL und einem „single chain“-Antikörperfragment (scFv), welches den zelloberflächenexprimierten Tumorstromamarker FAP erkennt (sc40), konnte gezeigt werden, dass diese Strategie auch für 41BBL anwendbar ist. Die Aktivität des sc40-Flag-41BBL-Fusionsproteins konnte durch Anwesenheit von FAP-exprimierenden Zellen um das 100-fache gesteigert werden (Abb. 16). Für sc40-Flag-OX40L konnte ein ähnlich gutes Ergebnis erzielt werden, wobei auch schon die trimeren Moleküle in Abwesenheit von FAP-exprimierenden Zellen bei hohen Konzentrationen eine schwache Aktivität zeigten (Abb. 16). Im Fall von CD40L jedoch, dass bereits als Trimer eine hohe Aktivität aufweist, bewirkte die FAP-Bindung nur eine weniger deutliche Aktivitätssteigerung (Abb. 16). Auch bei sc40-Flag-GITRL zeigte die Bindung an FAP nur eine schwache Erhöhung der Aktivität, allerdings war die spezifische Aktivität des Fusionsproteins vergleichsweise niedrig. Das CD27L-Fusionsprotein besaß als Einziges weder auf FAP-negativen noch auf FAP-positiven Zellen eine messbare Aktivität (Abb. 16). Dies korreliert mit den vorausgegangenen Befunden, dass löslicher CD27L auch nach Oligomerisierung nicht aktiv ist und nur nach Stabilisierung seiner trimeren Struktur CD27 binden und aktivieren kann (Abb. 8, 9).

Anhand von FasL- und TRAIL-Fusionsproteinen wurde gezeigt, dass auch andere scFv-Antikörperfragmente für das Prinzip der antigenabhängigen immobilisationsvermittelten Aktivierung von TNF-Liganden anwendbar sind. Dies wurde in dieser Arbeit am Beispiel des scFvCD19, einem Antikörperfragment, welches den B-Zell-spezifischen Oberflächenmarker CD19 erkennt, bestätigt. Es wurde zunächst die zytotoxische Aktivität

von scFvCD19-Flag-FasL und scFvCD19-Flag-TRAIL verglichen. Es zeigte sich, dass das FasL-Fusionsprotein bereits ohne Quervernetzen sehr aktiv war, diese Aktivität lies sich auch durch sekundäres Quervernetzen nicht weiter steigern (Abb. 19). Dies spricht dafür, dass scFvCD19-Flag-FasL als präaggregierter, bereits aktiver Ligand vorliegt. Daher ist der Einsatz als immobilisationsabhängig-aktivierbares Molekül nicht möglich. scFvCD19-Flag-TRAIL allerdings konnte als trimeres Molekül kaum Apoptose induzieren, die oligomerisierte Form hingegen wies zelltypabhängig eine um das 100- bis 600-fach höhere Aktivität auf (Abb. 19). Auf CD19-positiven Zellen konnte die Aktivität des TRAIL-Fusionsproteins nach Zelloberflächenimmobilisierung sowohl unter apoptotischen (Abb. 20a) als auch unter nicht-apoptotischen Bedingungen (Abb. 20b) ebenfalls gesteigert werden. Mit Hilfe des löslichen scFvCD19-Fragments konnte auf CD19-exprimierenden Zelllinien demonstriert werden, dass sich durch Blockierung des membranständigen CD19 die zytotoxische Aktivität von scFvCD19-Flag-TRAIL stark verringert (Abb. 21). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass scFvCD19-Flag-TRAIL auch in peripheren Blutmonozyten von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie Apoptose induzieren konnte. Allerdings wurde die toxische Wirkung des Fusionsproteins nur bei einem Teil der Proben beobachtet (Abb. 22a). Ein Großteil der Proben zeigte sich jedoch vollkommen resistent gegenüber der TRAIL-vermittelten Apoptose. Es konnte aber vor kurzem gezeigt werden, dass TRAIL in Tumorzellen nicht nur Apoptose, sondern auch den NF κ B-Signalweg und die MAP-Kinasen aktivieren kann. Diese TRAIL-vermittelten proinflammatorischen Signalwege können vor allem aufgrund ihrer protumoralen und antiapoptotischen Wirkung von Bedeutung sein. So wurde gezeigt, dass die Metastasierung von Bcl_{xL}-geschützten Pankreas-Tumorzellen durch TRAIL verstärkt und die Invasivität von apoptoseresistenten Cholangiokarzinomzellen unterstützt wird (Ishimura *et al.*, 2006, Trauzold *et al.*, 2006). Daher kann es notwendig sein, eine Kombinationstherapie zu entwickeln, um zum Einen TRAIL-Rezeptoren durch scFv-TRAIL-Fusionsproteine lokal zu aktivieren und zum Anderen eine effektive Apoptoseinduktion in Tumorzellen, z.B. durch Blockierung proinflammatorischer, antiapoptotischer Signalwege, zu ermöglichen.

Mögliche Komplikationen, die während einer klinischen Anwendung von immunaktivierenden Strategien erwartet werden können, sind systemische entzündliche Nebenwirkungen und Autoimmunität durch Einflussnahme auf die CD40L-CD40-, CD27L-CD27-, 41BBL-41BB-, OX40L-OX40- oder GITRL-GITR-Systeme (Croft, 2003a und b, Sugamura *et al.*, 2004, Vinay *et al.*, 2006, Vonderheide, 2007, Nocentini *et al.*, 2007). Auch die Applikation der apoptoseinduzierenden TNF-Liganden FasL und TRAIL kann mit schweren Nebenwirkungen verbunden sein. Die Aktivierung von Fas in der Leber führt zu einer raschen Apoptoseinduktion in Hepatozyten und zu akutem Leberversagen (Wajant *et al.*, 2005). Präklinische Studien mit trimerem TRAIL lieferten keine Hinweise auf systemische Toxizität (Walczak *et al.*, 1999, Ashkenazi *et al.*, 1999), und TRAIL kann Apoptose zwar in einer Vielzahl von Tumorzellen, nicht aber in den meisten nicht-transformierten Zellen induzieren (Almasan und Ashkenazi, 2003). Es konnte aber gezeigt werden, dass normale Zellen nach Behandlung mit Chemotherapeutika ebenfalls für TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert werden können (Leverkus *et al.*, 2003), was den systemische Einsatz von TRAIL in der Therapie limitieren kann. Aus diesem Grund bietet die immobilisationsabhängige Aktivitätssteigerung von TNF-Ligand-Fusionsproteinen, die Zelloberflächenantigene erkennen, die Möglichkeit, zum Einen ohne Oligomerisierung der Liganden auszukommen, und zum Anderen eine lokal begrenzte Aktivität zu ermöglichen. Dadurch kann die maximal tolerierte Dosis erhöht und gleichzeitig das Risiko von systemischen Nebenwirkungen verringert werden. Im Fall der immunmodulierenden scFv-TNF-Ligand-Fusionsproteine, welche ein tumorspezifisches Zelloberflächenantigen erkennen und deren Aktivität von der Zelloberflächenimmobilisation abhängt, können diese die Induktion einer lokalen, auf den Tumor abzielenden Immunantwort sicherstellen (Sugamura *et al.*, 2004, Vinay *et al.*, 2006, Barr *et al.*, 2006, Nocentini *et al.*, 2007).

7.2.2 Zelloberflächenantigenbindung verleiht trimeren Fusionsproteinen aus einer Proteinbindedomäne und einem TNF-Liganden hohe Aktivität

Mitglieder der TNF-Liganden-Familie sind oft selektiv auf bestimmten Zelltypen exprimiert. So findet man RANKL hauptsächlich auf T-Zellen, Osteoblasten und dem Knochenstroma. CD40L sowie die kostimulatorischen Moleküle CD28 bzw. CTLA4 werden auf aktivierten T-Zellen exprimiert (Quezada *et al.*, 2004, Wittrant *et al.*, 2004, Greenwald *et al.*, 2005, Watts, 2005). Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass ein Eingriff in die Funktion dieser Moleküle bei der Behandlung von Erkrankungen des Immunsystems, wie z.B. Autoimmunkrankheiten, Autotransplantatabstoßung oder „graft versus host“-Erkrankung, nützlich sein kann (Quezada *et al.*, 2004, Wittrant *et al.*, 2004, Watts, 2005). Der neutralisierende Effekt auf die Signalweiterleitung dieser membranständigen Moleküle könnte durch einen begleitenden apoptotischen Trigger, z.B. durch FasL, verstärkt werden, indem die signalgebende Zelle zerstört wird. Da das Prinzip der TNF-Ligand-Aktivierung nach Immobilisation an einer Zelloberfläche bereits für scFv-Fusionsproteine im letzten Abschnitt ausführlich demonstriert werden konnte, wurden Fusionsproteine aus löslichem FasL und der extrazellulären Domäne von TNFR-Familienmitgliedern (TNFR1, TNFR2, CD40, RANK) bzw. dem kostimulatorischen Rezeptor CD28 entwickelt. TNFR1- und TNFR2-Flag-FasL induzierten bereits ohne Quervernetzen deutlich Apoptose, eine Steigerung der Aktivität konnte durch Oligomerisierung nicht erreicht werden (Abb. 24). Die hohe Aktivität dieser Konstrukte ist sehr wahrscheinlich die Konsequenz aus der Autoaggregation in hochmolekulare Komplexe. Im Gegensatz dazu nahm die Aktivität der FasL-Fusionsproteine mit der extrazellulären Domäne von CD40, RANK und B7-2 durch antikörpervermitteltes Quervernetzen um das 25 bis 50-fache zu (Abb. 25). Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich durch Zelloberflächenbindung die Aktivität der Fusionsproteine eventuell steigern lässt. Im Folgenden konnte der immobilisationsabhängige Aktivierungseffekt von membranexprimiertem CD40L, RANKL und CD28 auf die Fusionsproteine CD40-, RANK- bzw. B7-2-Flag-FasL gezeigt werden. Nach Bindung an das korrespondierende Zelloberflächenmolekül induzierten CD40- und RANK-Flag-FasL

mit einer 600-fach, B7-2-Flag-FasL mit einer 50-fach niedrigeren ED_{50} Apoptose in den Zielzellen (Abb. 27). Unter nicht-apoptotischen Bedingungen induzierte in parentalen Zellen keines der drei Fusionsproteine eine signifikante IL-8-Produktion, auf CD40L-, RANKL- bzw. CD28-exprimierenden Zellen jedoch erfolgte die IL-8-Induktion mit hoher Effizienz (Abb. 29). Die Induktion des Zelltodes wird von der Prozessierung der Caspase-8 begleitet. Die Fas-vermittelte Spaltung der Caspase-8 erfolgte bei B7-2-Flag-FasL und CD40-Flag-FasL ausschließlich in Oberflächenantigen-positiven Zellen (Abb. 28). Aus der Literatur ist bekannt, dass verschiedene Krebszellen eine autokrine CD40L-CD40-Signalschleife nutzen, wodurch sie NF κ B-abhängig vor Todesrezeptor-induziertem Zelltod geschützt sind (Storz *et al.*, 2001, Pham *et al.*, 2002, Voorzanger-Rousselot und Blay, 2004). Am Beispiel der Brustkrebszelllinie T47D, die CD40 und CD40L exprimiert, konnte gezeigt werden, dass durch quervernetzten, aktiven FasL nur ein kleiner Teil der Zellen getötet wurde. CD40-Flag-FasL hingegen induzierte Apoptose bereits mit 1 ng/ml (Abb. 30). Inhibiert man die CD40L-CD40-Interaktion durch einen CD40L-neutralisierenden Antikörper, wurden T47D-Zellen für die apoptotische Wirkung durch quervernetzten FasL sensitiviert. Dies lässt auf ein autokrines CD40-Signal schließen, das diese Zellen vor Fas-vermittelter Apoptose schützt (Abb. 31). Durch das Fusionsprotein CD40-Flag-FasL wurden somit durch die Bindung an den T47D-exprimierten CD40L zum Einen die anti-apoptotischen CD40-Signale reduziert, zum Anderen wurde gleichzeitig die FasL-Domäne des Moleküls aktiviert. Beide Faktoren führten gemeinsam zu einer effektiven Induktion der Apoptose. Es wurden somit neue bifunktionelle Reagenzien entwickelt, die nicht nur eine selektive Aktivierung auf einem definierten Zelltyp ermöglichen, sondern auch die Funktion des membranständigen Liganden, der für die Zelloberflächenimmobilisations-abhängige Aktivierung genutzt wird, neutralisieren.

Diese Art von bifunktionellen Molekülen wäre z.B. für den Einsatz in der Behandlung von Tumorerkrankungen, die durch einen autokrinen CD40L-CD40-Signalweg eine Resistenz gegenüber Apoptose entwickelt haben, geeignet. Da aktivierte T-Zellen CD40L, RANKL und CD28/CTLA4 exprimieren, wären auch sie ein potentielles Ziel für diese

bifunktionellen proapoptotischen FasL-Fusionsproteine. CD40L- bzw. RANKL-Signale würden durch eine Bindung des jeweiligen FasL-Fusionsproteins neutralisiert, durch die Bindung von B7-2-Flag-FasL an CTLA4 würde ein inhibitorisches Signal an die T-Zelle weitergeleitet. In beiden Fällen würde die FasL-Domäne in aktivierten T-Zellen, die sensitiv gegenüber Todesrezeptor-induzierter Apoptose sind, den Zelltod induzieren. Daher ist auch eine Anwendung bei T-Zell bedingten Erkrankungen, z.B. Autoimmunkrankheiten, denkbar.

8. Literatur

Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK (1993). CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med.* Aug 1;178(2):669-74.

Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME (2002). Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol.* Jan;22(1):207-20.

Almasan A, Ashkenazi A (2003). Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* Jun-Aug;14(3-4):337-48.

Aoki K, Kurooka M, Chen JJ, Petryniak J, Nabel EG, Nabel GJ (2001). Extracellular matrix interacts with soluble CD95L: retention and enhancement of cytotoxicity. *Nat Immunol.* Apr;2(4):333-7.

Arens R, Nolte MA, Tesselaar K, Heemskerk B, Reedquist KA, van Lier RA, van Oers MH (2004). Signaling through CD70 regulates B cell activation and IgG production. *J Immunol.* Sep 15;173(6):3901-8.

Armitage RJ, Maliszewski CR, Alderson MR, Grabstein KH, Spriggs MK, Fanslow WC (1993). CD40L: a multi-functional ligand. *Semin Immunol.* Dec;5(6):401-12.

Armitage RJ (1994). Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol.* Jun;6(3):407-13.

Ashkenazi A (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer.* Jun;2(6):420-30.

Assouhou-Luty C, Gerspach J, Siegmund D, Müller N, Huard B, Tiegs G, Pfizenmaier K, Wajant H (2006). A CD40-CD95L fusion protein interferes with CD40L-induced prosurvival signaling and allows membrane CD40L-restricted activation of CD95. *J Mol Med.* Sep;84(9):785-97.

Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Brière F, Galizzi JP, van Kooten C, Liu YJ, Rousset F, Saeland S (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol.*;12:881-922.

Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME (2003). The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol.* Jun;15(3):185-93.

Barr TA, Carlring J, Heath AW (2006). Co-stimulatory agonists as immunological adjuvants. *Vaccine.* Apr 24;24(17):3399-407.

Berg D, Lehne M, Müller N, Siegmund D, Münkel S, Sebald W, Pfizenmaier K, Wajant H (2007). Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L. *Cell Death Differ.* Dec;14(12):2021-34.

Blott EJ, Bossi G, Clark R, Zvelebil M, Griffiths GM (2001). Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. *J Cell Sci.* Jul;114(Pt 13):2405-16.

- Boatright KM, Renshaw M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherland DP, Green DR, Salvesen GS (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell*. Feb;11(2):529-41.
- Bodmer JL, Meier P, Tschopp J, Schneider P (2000). Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*. Jul 7;275(27):20632-7.
- Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci*. Jan;27(1):19-26.
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. Jun 14;85(6):803-15.
- Borst J, Hendriks J, Xiao Y (2005). CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Curr Opin Immunol*. Jun;17(3):275-81.
- Bossen C, Ingold K, Tardivel A, Bodmer JL, Gaide O, Hertig S, Ambrose C, Tschopp J, Schneider P (2006). Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *J Biol Chem*. May 19;281(20):13964-71.
- Bossen C, Cachero TG, Tardivel A, Ingold K, Willen L, Dobles M, Scott ML, Maquelin A, Belnoue E, Siegrist CA, Chevrier S, Acha-Orbea H, Leung H, Mackay F, Tschopp J, Schneider P (2008). TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. *Blood*. Feb 1;111(3):1004-12.
- Cardone MH, Salvesen GS, Widmann C, Johnson G, Frisch SM (1997). The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell*. Jul 25;90(2):315-23.
- Chan FK (2000). The pre-ligand binding assembly domain: a potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function. *Ann Rheum Dis*. Nov;59 Suppl 1:i50-3.
- Chattopadhyay K, Ramagopal UA, Mukhopadhyaya A, Malashkevich VN, Dilorenzo TP, Brenowitz M, Nathenson SG, Almo SC. Assembly and structural properties of glucocorticoid-induced TNF receptor ligand: Implications for function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 4;104(49):19452-7.
- Chattopadhyay K, Ramagopal UA, Brenowitz M, Nathenson SG, Almo SC (2008). Evolution of GITRL immune function: murine GITRL exhibits unique structural and biochemical properties within the TNF superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 15;105(2):635-40.
- Chaudhary PM, Eby MT, Jasmin A, Kumar A, Liu L, Hood L (2000). Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs. *Oncogene*. Sep 14;19(39):4451-60.
- Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD (1994). Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*. Mar 25;263(5154):1759-62.
- Clark EA (1990). CD40: a cytokine receptor in search of a ligand. *Tissue Antigens*. Jul;36(1):33-6.
- Cocks BG, de Waal Malefyt R, Galizzi JP, de Vries JE, Aversa G (1993). IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. *Int Immunol*. Jun;5(6):657-63.

- Corti A, Fassina G, Marcucci F, Barbanti E, Cassani G (1992). Oligomeric tumour necrosis factor alpha slowly converts into inactive forms at bioactive levels. *Biochem J.* Jun 15;284 (Pt 3):905-10.
- Croft M (2003 a). Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev.* Jun-Aug;14(3-4):265-73.
- Croft M (2003 b). Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol.* Aug;3(8):609-20.
- Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, Goodwin RG, Smith CA (1997). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med.* Oct 6;186(7):1165-70.
- Duiker EW, Mom CH, de Jong S, Willemse PH, Gietema JA, van der Zee AG, de Vries EG (2006). The clinical trail of TRAIL. *Eur J Cancer.* Sep;42(14):2233-40.
- Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem.* Jun 5;273(23):14363-7.
- García P, De Heredia AB, Bellón T, Carpio E, Llano M, Caparrós E, Aparicio P, López-Botet M (2004). Signalling via CD70, a member of the TNF family, regulates T cell functions. *J Leukoc Biol.* Jul;76(1):263-70.
- Gardnerova M, Blanqué R, Gardner CR (2000). The use of TNF family ligands and receptors and agents which modify their interaction as therapeutic agents. *Curr Drug Targets.* Dec;1(4):327-64.
- Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G, Aubry JP, Brunner T, Blasey H, Life P, Talabot D, Flores-Romo L, Thompson J, et al (1993). Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature.* Sep 23;365(6444):340-3.
- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2005). The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.*;23:515-48.
- Grell M (1995-1996). Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *J Inflamm.*;47(1-2):8-17.
- Gruss HJ, Dower SK (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood.* Jun 15;85(12):3378-404.
- Gurney AL, Marsters SA, Huang RM, Pitti RM, Mark DT, Baldwin DT, Gray AM, Dowd AD, Brush AD, Heldens AD, Schow AD, Goddard AD, Wood WI, Baker KP, Godowski PJ, Ashkenazi A (1999). Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GITR. *Curr Biol.* Feb 25;9(4):215-8.
- Ham YM, Choi JS, Chun KH, Joo SH, Lee SK (2003). The c-Jun N-terminal kinase 1 activity is differentially regulated by specific mechanisms during apoptosis. *J Biol Chem.* 2003 Dec 12;278(50):50330-7.
- Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature.* Oct 12;407(6805):770-6.

- Holler N, Tardivel A, Kovacsovics-Bankowski M, Hertig S, Gaide O, Martinon F, Tinel A, Deperthes D, Calderara S, Schulthess T, Engel J, Schneider P, Tschopp J (2003). Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol.* Feb;23(4):1428-40.
- Hu WH, Johnson H, Shu HB (2000). Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8. *J Biol Chem.* Apr 14;275(15):10838-44.
- Hurtado JC, Kim SH, Pollok KE, Lee ZH, Kwon BS. Potential role of 4-1BB in T cell activation (1995). Comparison with the costimulatory molecule CD28. *J Immunol.* Oct 1;155(7):3360-7.
- Hymowitz SG, O'Connell MP, Ultsch MH, Hurst A, Totpal K, Ashkenazi A, de Vos AM, Kelley RF (2000). A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry.* Feb 1;39(4):633-40.
- Ishimura N, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ (2006). Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Jan;290(1):G129-36.
- Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis (1993). Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem.* May 25;268(15):10932-7.
- Janssen O, Qian J, Linkermann A, Kabelitz D (2003). CD95 ligand--death factor and costimulatory molecule? *Cell Death Differ.* Nov;10(11):1215-25.
- Jo M, Kim TH, Seol DW, Esplen JE, Dorko K, Billiar TR, Strom SC (2000). Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med.* May;6(5):564-7.
- Jung HW, Choi SW, Choi JI, Kwon BS (2004). Serum concentrations of soluble 4-1BB and 4-1BB ligand correlated with the disease severity in rheumatoid arthritis. *Exp Mol Med.* Feb 29;36(1):13-22.
- Kammerer RA, Schulthess T, Landwehr R, Lustig A, Fischer D, Engel J (1998). Tenascin-C hexabrachion assembly is a sequential two-step process initiated by coiled-coil alpha-helices. *J Biol Chem.* Apr 24;273(17):10602-8.
- Kang YJ, Kim SO, Shimada S, Otsuka M, Seit-Nebi A, Kwon BS, Watts TH, Han J (2007). Cell surface 4-1BBL mediates sequential signaling pathways 'downstream' of TLR and is required for sustained TNF production in macrophages. *Nat Immunol.* Jun;8(6):601-9.
- Kelley SK, Ashkenazi A (2004). Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. *Curr Opin Pharmacol.* Aug;4(4):333-9.
- Kidd VJ, Lahti JM, Teitz T (2000). Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol.* Jun;11(3):191-201.
- Kim JO, Kim HW, Baek KM, Kang CY (2003). NF-kappaB and AP-1 regulate activation-dependent CD137 (4-1BB) expression in T cells. *FEBS Lett.* Apr 24;541(1-3):163-70.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* Nov 15;14(22):5579-88.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. Feb 21;275(5303):1132-6.

Kondo K, Okuma K, Tanaka R, Zhang LF, Kodama A, Takahashi Y, Yamamoto N, Ansari AA, Tanaka Y (2007). Requirements for the functional expression of OX40 ligand on human activated CD4+ and CD8+ T cells. *Hum Immunol*. Jul;68(7):563-71.

Koschny R, Walczak H, Ganten TM (2007). The promise of TRAIL--potential and risks of a novel anticancer therapy. *J Mol Med*. Sep;85(9):923-35.

Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H (2001). NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol*. Jun;21(12):3964-73.

Kwon B, Yu KY, Ni J, Yu GL, Jang IK, Kim YJ, Xing L, Liu D, Wang SX, Kwon BS (1999). Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. *J Biol Chem*. Mar 5;274(10):6056-61.

Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley S, Fox JA, Thomas D, Ashkenazi A (2001). Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med*. Apr;7(4):383-5.

Lee HW, Park SJ, Choi BK, Kim HH, Nam KO, Kwon BS (2002). 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol*. Nov 1;169(9):4882-8.

Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan IC (1989). Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature*. Dec 21-28;342(6252):929-31.

Liu YJ, Mason DY, Johnson GD, Abbot S, Gregory CD, Hardie DL, Gordon J, MacLennan IC (1991). Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. *Eur J Immunol*. Aug;21(8):1905-10.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. Feb 23;104(4):487-501.

Maerten P, Geboes K, De Hertogh G, Shen C, Cadot P, Bullens DM, Van Assche G, Penninckx F, Rutgeerts P, Ceuppens JL (2004). Functional expression of 4-1BB (CD137) in the inflammatory tissue in Crohn's disease. *Clin Immunol*. Sep;112(3):239-46.

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*. Jun 14;85(6):817-27.

Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family (1998). *Trends Biochem Sci*. Feb;23(2):74-9.

Nocentini G, Riccardi C (2005). GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Eur J Immunol*. Apr;35(4):1016-22. Review.

Nocentini G, Ronchetti S, Cuzzocrea S, Riccardi C (2007). GITR/GITRL: more than an effector T cell co-stimulatory system. *Eur J Immunol*. May;37(5):1165-9.

- Orlinick JR, Vaishnav A, Elkon KB, Chao MV (1997). Requirement of cysteine-rich repeats of the Fas receptor for binding by the Fas ligand. *J Biol Chem.* Nov 14;272(46):28889-94.
- Ottoneo L, Tortolina G, Amelotti M, Dallegri F (1999). Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* Mar 15;162(6):3601-6.
- Peter ME, Krammer PH (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* Jan;10(1):26-35.
- Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lo P, Terry N, Reid PS, Ford RJ (2002). A CD40 Signalosome anchored in lipid rafts leads to constitutive activation of NF-kappaB and autonomous cell growth in B cell lymphomas. *Immunity.* Jan;16(1):37-50.
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem.* May 31;271(22):12687-90.
- Poiesi C, Albertini A, Ghielmi S, Cassani G, Corti A (1993). Kinetic analysis of TNF-alpha oligomer-monomer transition by surface plasmon resonance and immunochemical methods. *Cytokine.* Nov;5(6):539-45.
- Pollok KE, Kim YJ, Hurtado J, Zhou Z, Kim KK, Kwon BS (1994). 4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulates anti-mu-primed splenic B cells. *Eur J Immunol.* Feb;24(2):367-74.
- Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ (2004). CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.*;22:307-28.
- Qin J, Chaturvedi V, Bonish B, Nickoloff BJ (2001). Avoiding premature apoptosis of normal epidermal cells. *Nat Med.* Apr;7(4):385-6.
- Rabu C, Quémener A, Jacques Y, Echasserieau K, Vusio P, Lang F (2005). Production of recombinant human trimeric CD137L (4-1BBL). Cross-linking is essential to its T cell co-stimulation activity. *J Biol Chem.* Dec 16;280(50):41472-81.
- Samel D, Muller D, Gerspach J, Assouhou-Luty C, Sass G, Tiegs G, Pfizenmaier K, Wajant H (2003). Generation of a FasL-based proapoptotic fusion protein devoid of systemic toxicity due to cell-surface antigen-restricted Activation. *J Biol Chem.* Aug 22;278(34):32077-82.
- Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J (1998). Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med.* Apr 20;187(8):1205-13.
- Schwarz H, Tuckwell J, Lotz M (1993). A receptor induced by lymphocyte activation (ILA): a new member of the human nerve-growth-factor/tumor-necrosis-factor receptor family. *Gene.* Dec 8;134(2):295-8.
- Seino K, Iwabuchi K, Kayagaki N, Miyata R, Nagaoka I, Matsuzawa A, Fukao K, Yagita H, Okumura K (1998). Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes. *J Immunol.* Nov 1;161(9):4484-8.
- Shin SM, Kim YH, Choi BK, Kwon PM, Lee HW, Kwon BS (2007). 4-1BB triggers IL-13 production from T cells to limit the polarized, Th1-mediated inflammation. *J Leukoc Biol.* Jun;81(6):1455-65.

- Shudo K, Kinoshita K, Imamura R, Fan H, Hasumoto K, Tanaka M, Nagata S, Suda T (2001). The membrane-bound but not the soluble form of human Fas ligand is responsible for its inflammatory activity. *Eur J Immunol.* Aug;31(8):2504-11.
- Siegmund D, Wicovsky A, Schmitz I, Schulze-Osthoff K, Kreuz S, Leverkus M, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Wajant H (2005). Death receptor-induced signaling pathways are differentially regulated by gamma interferon upstream of caspase 8 processing. *Mol Cell Biol.* Aug;25(15):6363-79.
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell.* Mar 25;76(6):959-62.
- So T, Croft M (2007). Cutting edge: OX40 inhibits TGF-beta- and antigen-driven conversion of naive CD4 T cells into CD25+Foxp3+ T cells. *J Immunol.* Aug 1;179(3):1427-30.
- Spriggs MK, Fanslow WC, Armitage RJ, Belmont J (1993). The biology of the human ligand for CD40. *J Clin Immunol.* Nov;13(6):373-80.
- Sprick MR, Walczak H (2004). The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* Mar 1;1644(2-3):125-32.
- Stahnke K, Hecker S, Kohne E, Debatin KM (1998). CD95 (APO-1/FAS)-mediated apoptosis in cytokine-activated hematopoietic cells. *Exp Hematol.* Aug;26(9):844-50.
- Storz M, Zepter K, Kamarashev J, Dummer R, Burg G, Häffner AC (2001). Coexpression of CD40 and CD40 ligand in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides). *Cancer Res.* Jan 15;61(2):452-4.
- Sugamura K, Ishii N, Weinberg AD (2004). Therapeutic targeting of the effector T-cell costimulatory molecule OX40. *Nat Rev Immunol.* Jun;4(6):420-31.
- Sun M, Fink PJ (2007). A new class of reverse signaling costimulators belongs to the TNF family. *J Immunol.* Oct 1;179(7):4307-12.
- Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S (1998). Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med.* Jan;4(1):31-6.
- Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell.* Sep 10;74(5):845-53.
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science.* Aug 28;281(5381):1312-6.
- Tone Y, Kojima Y, Furuuchi K, Brady M, Yashiro-Ohtani Y, Tykocinski ML, Tone M (2007). OX40 gene expression is up-regulated by chromatin remodeling in its promoter region containing Sp1/Sp3, YY1, and NF-kappa B binding sites. *J Immunol.* Aug 1;179(3):1760-7.
- Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Möller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science.* Jul 21;245(4915):301-5.
- Trauzold A, Siegmund D, Schniewind B, Sipos B, Egberts J, Zorenkov D, Emme D, Röder C, Kalthoff H, Wajant H (2006). TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene.* Nov 30;25(56):7434-9.

- Vande Walle L, Lamkanfi M, Vandenabeele P (2008). The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death Differ.* Mar;15(3):453-60.
- Vaux DL, Silke J (2003). Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* May 9;304(3):499-504.
- Vinay DS, Cha K, Kwon BS (2006). Dual immunoregulatory pathways of 4-1BB signaling. *J Mol Med.* Sep;84(9):726-36.
- Vonderheide RH (2007). Prospect of targeting the CD40 pathway for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* Feb 15;13(4):1083-8.
- Voorzanger-Rousselot N, Blay JY (2004). Coexpression of CD40 and CD40L on B lymphoma and carcinoma cells: an autocrine anti-apoptotic role. *Leuk Lymphoma.* Jun;45(6):1239-45.
- Wajant H, Haas E, Schwenzer R, Muhlenbeck F, Kreuz S, Schubert G, Grell M, Smith C, Scheurich P (2000). Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J Biol Chem.* Aug 11;275(32):24357-66.
- Wajant H, Moosmayer D, Wüest T, Bartke T, Gerlach E, Schönherr U, Peters N, Scheurich P, Pfizenmaier K (2001). Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene.* Jul 5;20(30):4101-6.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003). Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* Feb;14(1):53-66.
- Wajant H, Gerspach J, Pfizenmaier K (2005). Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* Feb;16(1):55-76.
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med.* Feb;5(2):157-63.
- Watts TH (2005). TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol.*;23:23-68.
- Wenzel J, Sanzenbacher R, Ghadimi M, Lewitzky M, Zhou Q, Kaplan DR, Kabelitz D, Feller SM, Janssen O (2001). Multiple interactions of the cytosolic polyproline region of the CD95 ligand: hints for the reverse signal transduction capacity of a death factor. *FEBS Lett.* Dec 7;509(2):255-62.
- Widmann C, Johnson NL, Gardner AM, Smith RJ, Johnson GL (1997). Potentiation of apoptosis by low dose stress stimuli in cells expressing activated MEK kinase 1. *Oncogene.* Nov 13;15(20):2439-47.
- Widmann C, Gerwins P, Johnson NL, Jarpe MB, Johnson GL (1998). MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* Apr;18(4):2416-29.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, et al (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* Dec;3(6):673-82.

Wittrant Y, Théoleyre S, Chipoy C, Padrines M, Blanchard F, Heymann D, Rédini F (2004). RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta*. Sep 20;1704(2):49-57.

Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol*. Jan;142(1):67-77.

Yonehara S, Ishii A, Yonehara M (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med*. May 1;169(5):1747-56.

Zhang G (2004). Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding. *Curr Opin Struct Biol*. Apr;14(2):154-60.

Zhou Z, Song X, Berezov A, Zhang G, Li Y, Zhang H, Murali R, Li B, Greene MI (2008). Human glucocorticoid-induced TNF receptor ligand regulates its signaling activity through multiple oligomerization states. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 8;105(14):5465-70.

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AITR	activation induced TNF receptor, TNFRSF18
AITRL	AITR Ligand, TNFSF18
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bzw.	beziehungsweise
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Caspase	cysteinyll aspartat specific proteinase
CD	cluster of differentiation
CD27	Tp55, TNFRSF7
CD27L	CD27 Ligand, CD70, TNFSF7
CD40	TNFRSF5
CD40L	CD40 Ligand, CD154, TNFSF5
cm ²	Quadratcentimeter
CHX	Cyclohexamid
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase, alkalische Phosphatase
Da	Dalton
DcR1	decoy receptor 1, TRAILR3, TNFRSF10c
DcR2	decoy receptor 2, TRAILR4, TNFRSF10d
DD	death domain, Todesdomäne
DED	death effector domain, Todeseffektordomäne
DISC	death inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DR3	death receptor 3
DR4	death receptor 4, TRAILR1, TNFRSF10a
DR5	death receptor 5, TRAILR2, TNFRSF10b
DR6	death receptor 6
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fas	FS7-associated cell surface antigen, CD95, Apo1, TNFRSF6
FasL	Fas Ligand, Apo1L, CD95L, CD178, TNFSF6
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FADD	Fas associating protein with a death domain
FLICE	FADD-like ICE, Caspase-8
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
GITR	glucocorticoid induced TNF receptor, TNFRSF18
GITRL	GITR Ligand, TL6, TNFSF18
h	Stunde(n)
HDAC	Histondeacetylase
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
ICE	Interleukin-1 β -converting enzyme
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase, SAPK, stress-activated protein kinase
k	Kilo, tausend
l	Liter
LB	lysogeny broth (Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien)
M	molar (Mol/Liter)
m	milli (tausendster Teil; 10 ⁻³)
μ	mikro (millionster Teil, 10 ⁻⁶)
min	Minute(n)
mAK	monoklonaler Antikörper

MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid
n	nano (milliardster Teil, 10 ⁻⁹)
NFκB	nuclear factor kappa B
OD	optische Dichte
OX40	CD134, ACT35, TNFRSF4
OX40L	OX40 Ligand, gp34, TNFSF4
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
rpm	rounds/revolutions per minute
sec	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris buffered Saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor, TNFSF2
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor, TNFRSF1
TRAF	TNF receptor associated factor
TRADD	TNFR1 associated death domain
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand, Apo2L, TNFSF10
TRAILR1	TRAIL Rezeptor, DR 4 TNFRSF10a
TRAILR2	TRAIL Rezeptor, DR 5, TNFRSF10b
TRAILR3	TRAIL Rezeptor, DcR 1, TNFRSF10c
TRAILR4	TRAIL Rezeptor, DcR 2, TNFRSF10d
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem, und andere
z.B.	zum Beispiel
z-VAD-fmk	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-Keton (pan-Caspaseinhibitor)
4-1BB	CD137, ILA, TNFRSF9
4-1BBL	4-1BB Ligand, CD137L, TNFSF9

9.2 DNA- und Aminosäuresequenzen der Fusionsproteine

Es ist sowohl die kodierende Nukleotidsequenz (NT) als auch die translatierte Aminosäuresequenz (AS) des jeweiligen Fusionsproteins angegeben.

9.2.1 Flag-CD27L

Ig-Signalpeptid:	NT 1-78	AS 1-26
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 85-108	AS 29-36
extrazelluläre Domäne (AS 52-193) des humanen CD27L (fett):	NT 115-543	AS 39-180

```

1   atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg ctg aag ggc gtg cag tgc gag
1   M  N  F  G  F  S  L  I  F  L  V  L  V  L  K  G  V  Q  C  E

61  gtg aag ctg gtg cca cgc gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa gaa ttc tca ctt
21  V  K  L  V  P  R  G  S  D  Y  K  D  D  D  D  K  E  F  S  L

121 ggg tgg gac gta gct gag ctg cag ctg aat cac aca gga cct cag cag gac ccc agg cta
41  G  W  D  V  A  E  L  Q  L  N  H  T  G  P  Q  Q  D  P  R  L

181 tac tgg cag ggg ggc cca gca ctg ggc cgc tcc ttc ctg cat gga cca gag ctg gac aag
61  Y  W  Q  G  G  P  A  L  G  R  S  F  L  H  G  P  E  L  D  K

241 ggg cag cta cgt atc cat cgt gat ggc atc tac atg gta cac atc cag gtg acg ctg gcc
81  G  Q  L  R  I  H  R  D  G  I  Y  M  V  H  I  Q  V  T  L  A

301 atc tgt tcc tcc acg acg gcc tcc agg cac cac ccc acc acc ctg gcc gtg gga atc tgc
101 I  C  S  S  T  T  A  S  R  H  H  P  T  T  L  A  V  G  I  C

361 tct ccc gcc tcc cgt agc atc agc ctg ctg cgt ctc agc ttc cac caa ggt tgt acc att
121 S  P  A  S  R  S  I  S  L  L  R  L  S  F  H  Q  G  C  T  I

421 gcc tcc cag cgc ctg acg ccc ctg gcc cga ggg gac aca ctc tgc acc aac ctc act ggg
141 A  S  Q  R  L  T  P  L  A  R  G  D  T  L  C  T  N  L  T  G

481 aca ctt ttg cct tcc cga aac act gat gag acc ttc ttt gga gtg cag tgg gtg cgc ccc
161 T  L  L  P  S  R  N  T  D  E  T  F  F  G  V  Q  W  V  R  P

541 tga
    -

```

9.2.2 Flag-TNC-CD27L

Ig-Signalpeptid:	NT 1-78	AS 1-26
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 85-108	AS 29-36
Trimerisierungsdomäne TNC (AS 100-139) des Hühner Tenascin-C) (unterstrichen):	NT 115-204	AS 39-68
extrazelluläre Domäne (AS 52-193) des humanen CD27L (fett):	NT 241-669	AS 81-222

```

1   atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg ctg aag ggc gtg cag tgc gag
1   M  N  F  G  F  S  L  I  F  L  V  L  V  L  K  G  V  Q  C  E

```

61 gtg aag ctg gtg cca cgc gga tcc **gat tac aaa gac gat gac gat aaa** gat atc gcc tgt
 21 V K L V P R G S **D Y K D D D D K** D I A C

121 ggc tgt gcg gct gcc cca gac atc aag gac ctg ctg agc aga ctg gag gag ctg gag ggg
 41 G C A A A P D I K D L L S R L E E L E G

181 ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag ggt acc gga ggt ggg tct ggc ggc cgc ggt gaa ttc
 61 L V S S L R E Q G T G G G S G G R G E F

241 **tca ctt ggg tgg gac gta gct gag ctg cag ctg aat cac aca gga cct cag cag gac ccc**
 81 S L G W D V A E L Q L N H T G P Q Q D P

301 **agg cta tac tgg cag ggg ggc cca gca ctg ggc cgc tcc ttc ctg cat gga cca gag ctg**
 101 R L Y W Q G G P A L G R S F L H G P E L

361 **gac aag ggg cag cta cgt atc cat cgt gat ggc atc tac atg gta cac atc cag gtg acg**
 121 D K G Q L R I H R D G I Y M V H I Q V T

421 **ctg gcc atc tgt tcc tcc acg acg gcc tcc agg cac cac ccc acc acc ctg gcc gtg gga**
 141 L A I C S S T T A S R H H P T T L A V G

481 **atc tgc tct ccc gcc tcc cgt agc atc agc ctg ctg cgt ctc agc ttc cac caa ggt tgt**
 161 I C S P A S R S I S L L R L S F H Q G C

541 **acc att gcc tcc cag cgc ctg acg ccc ctg gcc cga ggg gac aca ctc tgc acc aac ctc**
 181 T I A S Q R L T P L A R G D T L C T N L

601 **act ggg aca ctt ttg cct tcc cga aac act gat gag acc ttc ttt gga gtg cag tgg gtg**
 201 T G T L L P S R N T D E T F F G V Q W V

661 **cgc ccc tga**
 221 R P -

9.2.3 Fc-Flag-CD27L

HA-Signalpeptid:	NT 1-45	AS 1-15
Fc-Domäne des humanen Immunglobulin 1 (unterstrichen):	NT 52-729	AS 18-243
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 814-837	AS 272-279
extrazelluläre Domäne (AS 52-193) des humanen CD27L (fett):	NT 844-1272	AS 282-423

1 atg gct atc atc tac ctc atc ctc ctg ttc acc gct gtg cgg ggc ctc gac aaa act cac
 1 M A I I Y L I L L F T A V R G L D K T H

61 aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc
 21 T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P

121 cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg
 41 P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V

181 gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg
 61 D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V

241 cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc
 81 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S

301 gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc
 101 V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S

361 aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga
 121 N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R

421 gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc
141 E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S

481 ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat
161 L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N

541 ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ttg gac tcc gac ggc tcc ttc
181 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F

601 ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca
201 F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S

661 tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct
221 C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S

721 ccg ggt aaa aga tct ccg cag ccg cag ccg aaa ccg cag ccg aaa ccg gaa ccg gaa gga
241 P G K R S P Q P Q P K P Q P K P E P E G

781 tct ctg gag gtg ctg ttc cag ggg ccc gga tcc **gat tac aaa gac gat gac gat aaa** gaa
261 S L E V L F Q G P G S **D Y K D D D D K** E

841 ttc tca ctt ggg tgg gac gta gct gag ctg cag ctg aat cac aca gga cct cag cag gac
281 F S L G W D V A E L Q L N H T G P Q Q D

901 ccc agg cta tac tgg cag ggg ggc cca gca ctg ggc cgc tcc ttc ctg cat gga cca gag
301 P R L Y W Q G G P A L G R S F L H G P E

961 ctg gac aag ggg cag cta cgt atc cat cgt gat ggc atc tac atg gta cac atc cag gtg
321 L D K G Q L R I H R D G I Y M V H I Q V

1021 acg ctg gcc atc tgt tcc tcc acg acg gcc tcc agg cac cac ccc acc acc ctg gcc gtg
341 T L A I C S S T T A S R H H P T T L A V

1081 gga atc tgc tct ccc gcc tcc cgt agc atc agc ctg ctg cgt ctc agc ttc cac caa ggt
361 G I C S P A S R S I S L L R L S F H Q G

1141 tgt acc att gcc tcc cag cgc ctg acg ccc ctg gcc cga ggg gac aca ctc tgc acc aac
381 C T I A S Q R L T P L A R G D T L C T N

1201 ctc act ggg aca ctt ttg cct tcc cga aac act gat gag acc ttc ttt gga gtg cag tgg
401 L T G T L L P S R N T D E T F F G V Q W

1261 gtg cgc ccc tga
421 V R P -

9.2.4 sc40-Flag-CD27L

Signalpeptid:	NT 1-57	AS 1-19
Einzelkettenantikörperfragment (scFv) sc40:	NT 58-801	AS 20-267
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 823-846	AS 275-282
extrazelluläre Domäne (AS 52-193) des humanen CD27L (fett):	NT 853-1281	AS 285-426

1 atg gac tgg acc tgg cgc gtg ttt tgc ctg ctc gcc gtg gct cct ggg gcc cac agc cag
1 M D W T W R V F C L L A V A P G A H S Q

61 gta cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc atg gta gag cct ggg ggg tcc ctt aga ctc tcc
21 V Q L V Q S G G G M V E P G G S L R L S

121 tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt aat gcc tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct cca
41 C A A S G F T F S N A W M S W V R Q A P

181 ggg aag ggg ctg gag tgg gtt ggc cgt ata aaa agc aaa gct ggt ggt ggg aca gca gag
 61 G K G L E W V G R I K S K A G G G T A E
 241 tac gct gca ccc gtg aaa ggc aga ttc acc atc tca aga gat gat tca caa aac acg ctg
 81 Y A A P V K G R F T I S R D D S Q N T L
 301 tat ctg caa atg aac agc ctg aaa acc gac gac aca gcc gtg tat tac tgt acc aca cat
 101 Y L Q M N S L K T D D T A V Y Y C T T H
 361 gtc tac ggt gcc ccc cgg aac tgg ggc cag gga tcc ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc
 121 V Y G A P R N W G Q G S L V T V S S A S
 421 acc aag ggc cca aag ctt gaa gaa ggt gaa ttt tca gaa gca cgc gta cag tct gtg ttg
 141 T K G P K L E E G E F S E A R V Q S V L
 481 act cag ccg ccc tca gtg tct gcg gcc cca gga cag aag gtc acc atc tcc tgc tct gga
 161 T Q P P S V S A A P G Q K V T I S C S G
 541 agc agc tcc aac att gga aat aat tat gtc tcc tgg tac gtt caa ctc cca gga aca gcc
 181 S S S N I G N N Y V S W Y V Q L P G T A
 601 ccc aaa ctc ctc att tat gac aat aat aag cga ttc tca gga gtt cct gac cga ttc tct
 201 P K L L I Y D N N K R F S G V P D R F S
 661 ggc tcc aag tct ggc acg tca gcc acc ctg ggc atc acc ggg ctc cag act ggg gac gag
 221 G S K S G T S A T L G I T G L Q T G D E
 721 gcc gat tat tac tgc gga gca tgg gat ggc agc ctg cgt gaa gcg gta ttc ggc gga ggg
 241 A D Y Y C G A W D G S L R E A V F G G G
 781 acc aag gtc acc gtc cta ggt gcg gcc gca gga tcc aga tcc **gat tac aaa gac gat gac**
 261 T K V T V L G A A A G S R S **D Y K D D D**
 841 **gat aaa** gaa ttc **tca ctt ggg tgg gac gta gct gag ctg cag ctg aat cac aca gga cct**
 281 **D K** E F **S L G W D V A E L Q L N H T G P**
 901 cag cag gac ccc agg cta tac tgg cag ggg ggc cca gca ctg ggc cgc tcc ttc ctg cat
 301 Q Q D P R L Y W Q G G P A L G R S F L H
 961 gga cca gag ctg gac aag ggg cag cta cgt atc cat cgt gat ggc atc tac atg gta cac
 321 G P E L D K G Q L R I H R D G I Y M V H
 1021 atc cag gtg acg ctg gcc atc tgt tcc toc acg acg gcc tcc agg cac cac ccc acc acc
 341 I Q V T L A I C S S T T A S R H H P T T
 1081 ctg gcc gtg gga atc tgc tct ccc gcc tcc cgt agc atc agc ctg ctg cgt ctc agc ttc
 361 L A V G I C S P A S R S I S L L R L S F
 1141 cac caa ggt tgt acc att gcc tcc cag cgc ctg acg ccc ctg gcc cga ggg gac aca ctc
 381 H Q G C T I A S Q R L T P L A R G D T L
 1201 tgc acc aac ctc act ggg aca ctt ttg cct tcc cga aac act gat gag acc ttc ttt gga
 401 C T N L T G T L L P S R N T D E T F F G
 1261 gtg cag tgg gtg cgc ccc tga
 421 V Q W V R P -

9.2.5 Flag-CD40L

Ig-Signalpeptid:	NT 1-78	AS 1-26
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 85-108	AS 29-36
extrazelluläre Domäne (AS 116-261) des humanen CD40L (fett):	NT 115-555	AS 39-184

1 atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg ctg aag ggc gtg cag tgc gag
 1 M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E

```

61  gtg aag ctg gtg cca cgc gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa gaa ttc ggt gat
21  V  K  L  V  P  R  G  S  D  Y  K  D  D  D  D  K  E  F  G  D

121 cag aat cct caa att gcg gca cat gtc ata agt gag gcc agc agt aaa aca aca tct gtg
41  Q  N  P  Q  I  A  A  H  V  I  S  E  A  S  S  K  T  T  S  V

181 tta cag tgg gct gaa aaa gga tac tac acc atg agc aac aac ttg gta acc ctg gaa aat
61  L  Q  W  A  E  K  G  Y  Y  T  M  S  N  N  L  V  T  L  E  N

241 ggg aaa cag ctg acc gtt aaa aga caa gga ctc tat tat atc tat gcc caa gtc acc ttc
81  G  K  Q  L  T  V  K  R  Q  G  L  Y  Y  I  Y  A  Q  V  T  F

301 tgt tcc aat cgg gaa gct tcg agt caa gct cca ttt ata gcc agc ctc tgc cta aag tcc
101 C  S  N  R  E  A  S  S  Q  A  P  F  I  A  S  L  C  L  K  S

361 ccc ggt aga ttc gag aga atc tta ctc aga gct gca aat acc cac agt tcc gcc aaa cct
121 P  G  R  F  E  R  I  L  L  R  A  A  N  T  H  S  S  A  K  P

421 tgc ggg caa caa tcc att cac ttg gga gga gta ttt gaa ttg caa cca ggt gct tcg gtg
141 C  G  Q  Q  S  I  H  L  G  G  V  F  E  L  Q  P  G  A  S  V

481 ttt gtc aat gtg act gat cca agc caa gtg agc cat ggc act ggc ttc acg tcc ttt ggc
161 F  V  N  V  T  D  P  S  Q  V  S  H  G  T  G  F  T  S  F  G

541 tta ctc aaa ctc tga
181 L  L  K  L  -

```

9.2.6 Flag-TNC-CD40L

Ig-Signalpeptid:	NT 1-78	AS 1-26
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 85-108	AS 29-36
Trimerisierungsdomäne TNC (AS 100-139 des Hühner Tenascin-C) (unterstrichen):	NT 115-204	AS 39-68
extrazelluläre Domäne (AS 116-261) des humanen CD40L (fett):	NT 241-681	AS 81-226

```

1  atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg ctg aag ggc gtg cag tgc gag
1  M  N  F  G  F  S  L  I  F  L  V  L  V  L  K  G  V  Q  C  E

61  gtg aag ctg gtg cca cgc gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa gat atc gcc tgt
21  V  K  L  V  P  R  G  S  D  Y  K  D  D  D  D  K  D  I  A  C

121 ggc tgt gcg gct gcc cca gac atc aag gac ctg ctg agc aga ctg gag gag ctg gag ggg
41  G  C  A  A  A  P  D  I  K  D  L  L  S  R  L  E  E  L  E  G

181 ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag ggt acc gga ggt ggg tct ggc ggc cgc ggt gaa ttc
61  L  V  S  S  L  R  E  Q  G  T  G  G  G  S  G  G  R  G  E  F

241 ggt gat cag aat cct caa att gcg gca cat gtc ata agt gag gcc agc agt aaa aca aca
81  G  D  Q  N  P  Q  I  A  A  H  V  I  S  E  A  S  S  K  T  T

301 tct gtg tta cag tgg gct gaa aaa gga tac tac acc atg agc aac aac ttg gta acc ctg
101 S  V  L  Q  W  A  E  K  G  Y  Y  T  M  S  N  N  L  V  T  L

361 gaa aat ggg aaa cag ctg acc gtt aaa aga caa gga ctc tat tat atc tat gcc caa gtc
121 E  N  G  K  Q  L  T  V  K  R  Q  G  L  Y  Y  I  Y  A  Q  V

421 acc ttc tgt tcc aat cgg gaa gct tcg agt caa gct cca ttt ata gcc agc ctc tgc cta
141 T  F  C  S  N  R  E  A  S  S  Q  A  P  F  I  A  S  L  C  L

481 aag tcc ccc ggt aga ttc gag aga atc tta ctc aga gct gca aat acc cac agt tcc gcc
161 K  S  P  G  R  F  E  R  I  L  L  R  A  A  N  T  H  S  S  A

```

541 **aaa cct tgc ggg caa caa tcc att cac ttg gga gga gta ttt gaa ttg caa cca ggt gct**
 181 **K P C G Q Q S I H L G G V F E L Q P G A**

601 **tgc gtg ttt gtc aat gtg act gat cca agc caa gtg agc cat ggc act ggc ttc acg tcc**
 201 **S V F V N V T D P S Q V S H G T G F T S**

661 **ttt ggc tta ctc aaa ctc tga**
 221 **F G L L K L -**

9.2.7 Fc-Flag-CD40L

HA-Signalpeptid:	NT 1-45	AS 1-15
Fc-Domäne des humanen Immunglobulin 1 (unterstrichen):	NT 52-729	AS 18-243
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 814-837	AS 272-279
extrazelluläre Domäne (AS 116-261) des humanen CD40L (fett):	NT 844-1284	AS 282-427

1 atg gct atc atc tac ctc atc ctc ctg ttc acc gct gtg cgg ggc ctc gac aaa act cac
 1 M A I I Y L I L L F T A V R G L D K T H

61 aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc
 21 T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P

121 cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg
 41 P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V

181 gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg
 61 D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V

241 cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc
 81 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S

301 gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc
 101 V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S

361 aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga
 121 N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R

421 gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc
 141 E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S

481 ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat
 161 L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N

541 ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ttg gac tcc gac ggc tcc ttc
 181 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F

601 ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca
 201 F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S

661 tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct
 221 C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S

721 ccg ggt aaa aga tct ccg cag ccg cag ccg aaa ccg cag ccg aaa ccg gaa ccg gaa gga
 241 P G K R S P Q P Q P K P Q P K P E P E G

781 tct ctg gag gtg ctg ttc cag ggg ccc gga tcc **gat tac aaa gac gat gac gat aaa** gaa
 261 S L E V L F Q G P G S **D Y K D D D D K** E

841 ttc **ggt gat cag aat cct caa att gcg gca cat gtc ata agt gag gcc agc agt aaa aca**
 281 F **G D Q N P Q I A A H V I S E A S S K T**

901 aca tct gtg tta cag tgg gct gaa aaa gga tac tac acc atg agc aac aac ttg gta acc
301 T S V L Q W A E K G Y Y T M S N N L V T

961 ctg gaa aat ggg aaa cag ctg acc gtt aaa aga caa gga ctc tat tat atc tat gcc caa
321 L E N G K Q L T V K R Q G L Y Y I Y A Q

1021 gtc acc ttc tgt tcc aat cgg gaa gct tog agt caa gct cca ttt ata gcc agc ctc tgc
341 V T F C S N R E A S S Q A P F I A S L C

1081 cta aag tcc ccc ggt aga ttc gag aga atc tta ctc aga gct gca aat acc cac agt tcc
361 L K S P G R F E R I L L R A A N T H S S

1141 gcc aaa cct tgc ggg caa caa tcc att cac ttg gga gga gta ttt gaa ttg caa cca ggt
381 A K P C G Q Q S I H L G G V F E L Q P G

1201 gct tcg gtg ttt gtc aat gtg act gat cca agc caa gtg agc cat ggc act ggc ttc acg
401 A S V F V N V T D P S Q V S H G T G F T

1261 tcc ttt ggc tta ctc aaa ctc tga
421 S F G L L K L -

9.2.8 sc40-Flag-CD40L

Signalpeptid:	NT 1-57	AS 1-19
Einzelkettenantikörperfragment (scFv) sc40:	NT 58-801	AS 20-267
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 823-846	AS 275-282
extrazelluläre Domäne (AS 116-261) des humanen CD40L (fett):	NT 853-1293	AS 285-430

1 atg gac tgg acc tgg cgc gtg ttt tgc ctg ctc gcc gtg gct cct ggg gcc cac agc cag
1 M D W T W R V F C L L A V A P G A H S Q

61 gta cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc atg gta gag cct ggg ggg tcc ctt aga ctc tcc
21 V Q L V Q S G G G M V E P G G S L R L S

121 tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt aat gcc tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct cca
41 C A A S G F T F S N A W M S W V R Q A P

181 ggg aag ggg ctg gag tgg gtt ggc cgt ata aaa agc aaa gct ggt ggt ggg aca gca gag
61 G K G L E W V G R I K S K A G G G T A E

241 tac gct gca ccc gtg aaa ggc aga ttc acc atc tca aga gat gat tca caa aac acg ctg
81 Y A A P V K G R F T I S R D D S Q N T L

301 tat ctg caa atg aac agc ctg aaa acc gac gac aca gcc gtg tat tac tgt acc aca cat
101 Y L Q M N S L K T D D T A V Y Y C T T H

361 gtc tac ggt gcc ccc cgg aac tgg ggc cag gga tcc ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc
121 V Y G A P R N W G Q G S L V T V S S A S

421 acc aag ggc cca aag ctt gaa gaa ggt gaa ttt tca gaa gca cgc gta cag tct gtg ttg
141 T K G P K L E E G E F S E A R V Q S V L

481 act cag ccg ccc tca gtg tct gcg gcc cca gga cag aag gtc acc atc tcc tgc tct gga
161 T Q P P S V S A A P G Q K V T I S C S G

541 agc agc tcc aac att gga aat aat tat gtc tcc tgg tac gtt caa ctc cca gga aca gcc
181 S S S N I G N N Y V S W Y V Q L P G T A

601 ccc aaa ctc ctc att tat gac aat aat aag cga ttc tca gga gtt cct gac cga ttc tct
201 P K L L I Y D N N K R F S G V P D R F S

661 ggc tcc aag tct ggc acg tca gcc acc ctg ggc atc acc ggg ctc cag act ggg gac gag
221 G S K S G T S A T L G I T G L Q T G D E

721 gcc gat tat tac tgc gga gca tgg gat ggc agc ctg cgt gaa gcg gta ttc ggc gga ggg
241 A D Y Y C G A W D G S L R E A V F G G G

781 acc aag gtc acc gtc cta ggt gcg gcc gca gga tcc aga tcc **gat tac aaa gac gat gac**
261 T K V T V L G A A A G S R S **D Y K D D D**

841 **gat aaa** gaa ttc **ggt gat cag aat cct caa att gcg gca cat gtc ata agt gag gcc agc**
281 **D K** E F **G D Q N P Q I A A H V I S E A S**

901 **agt aaa aca aca tct gtg tta cag tgg gct gaa aaa gga tac tac acc atg agc aac aac**
301 **S K T T S V L Q W A E K G Y Y T M S N N**

961 **ttg gta acc ctg gaa aat ggg aaa cag ctg acc gtt aaa aga caa gga ctc tat tat atc**
321 **L V T L E N G K Q L T V K R Q G L Y Y I**

1021 **tat gcc caa gtc acc ttc tgt tcc aat cgg gaa gct tcg agt caa gct cca ttt ata gcc**
341 **Y A Q V T F C S N R E A S S Q A P F I A**

1081 **agc ctc tgc cta aag tcc ccc ggt aga ttc gag aga atc tta ctc aga gct gca aat acc**
361 **S L C L K S P G R F E R I L L R A A N T**

1141 **cac agt tcc gcc aaa cct tgc ggg caa caa tcc att cac ttg gga gga gta ttt gaa ttg**
381 **H S S A K P C G Q Q S I H L G G V F E L**

1201 **caa cca ggt gct tcg gtg ttt gtc aat gtg act gat cca agc caa gtg agc cat ggc act**
401 **Q P G A S V F V N V T D P S Q V S H G T**

1261 **ggc ttc acg tcc ttt ggc tta ctc aaa ctc tga**
421 **G F T S F G L L K L -**

9.2.9 Flag-GITRL

Ig-Signalpeptid:	NT 1-78	AS 1-26
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 85-108	AS 29-36
extrazelluläre Domäne (AS 50-177) des humanen GITRL (fett):	NT 115-501	AS 39-166

1 atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg ctg aag ggc gtg cag tgc gag
1 M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E

61 gtg aag ctg gtg cca cgc gga tcc **gat tac aaa gac gat gac gat aaa** gaa ttc **caa tta**
21 V K L V P R G S **D Y K D D D D K** E F **Q L**

121 **gag act gct aag gag ccc tgt atg gct aag ttt gga cca tta ccc tca aaa tgg caa atg**
41 **E T A K E P C M A K F G P L P S K W Q M**

181 **gca tct tct gaa cct cct tgc gtg aat aag gtg tct gac tgg aag ctg gag ata ott cag**
61 **A S S E P P C V N K V S D W K L E I L Q**

241 **aat ggc tta tat tta att tat ggc caa gtg gct ccc aat gca aac tac aat gat gta gct**
81 **N G L Y L I Y G Q V A P N A N Y N D V A**

301 **cct ttt gag gtg cgg ctg tat aaa aac aaa gac atg ata caa act cta aca aac aaa tct**
101 **P F E V R L Y K N K D M I Q T L T N K S**

361 **aaa atc caa aat gta gga ggg act tat gaa ttg cat gtt ggg gac acc ata gac ttg ata**
121 **K I Q N V G G T Y E L H V G D T I D L I**

421 **ttc aac tct gag cat cag gtt cta aaa aat aat aca tac tgg ggt atc att tta cta gca**
141 **F N S E H Q V L K N N T Y W G I I L L A**

481 **aat ccc caa ttc atc tcc tag**
161 **N P Q F I S -**

9.2.10 Flag-TNC-GITRL

Ig-Signalpeptid:	NT 1-78	AS 1-26
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 85-108	AS 29-36
Trimerisierungsdomäne TNC (AS 100-139 des Hühner Tenascin-C) (unterstrichen):	NT 115-204	AS 39-68
extrazelluläre Domäne (AS 50-177) des humanen GITRL (fett):	NT 241-627	AS 81-208

```

1   atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg ctg aag ggc gtg cag tgc gag
1   M  N  F  G  F  S  L  I  F  L  V  L  V  L  K  G  V  Q  C  E

61  gtg aag ctg gtg cca cgc gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa gat atc gcc tgt
21  V  K  L  V  P  R  G  S  D  Y  K  D  D  D  D  K  D  I  A  C

121 ggc tgt gcg gct gcc cca gac atc aag gac ctg ctg agc aga ctg gag gag ctg gag ggg
41  G  C  A  A  A  P  D  I  K  D  L  L  S  R  L  E  E  L  E  G

181 ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag ggt acc gga ggt ggg tct ggc ggc cgc ggt gaa ttc
61  L  V  S  S  L  R  E  Q  G  T  G  G  G  S  G  G  R  G  E  F

241 caa tta gag act gct aag gag ccc tgt atg gct aag ttt gga cca tta ccc tca aaa tgg
81  Q  L  E  T  A  K  E  P  C  M  A  K  F  G  P  L  P  S  K  W

301 caa atg gca tct tct gaa cct cct tgc gtg aat aag gtg tct gac tgg aag ctg gag ata
101 Q  M  A  S  S  E  P  P  C  V  N  K  V  S  D  W  K  L  E  I

361 ctt cag aat ggc tta tat tta att tat ggc caa gtg gct ccc aat gca aac tac aat gat
121 L  Q  N  G  L  Y  L  I  Y  G  Q  V  A  P  N  A  N  Y  N  D

421 gta gct cct ttt gag gtg cgg ctg tat aaa aac aaa gac atg ata caa act cta aca aac
141 V  A  P  F  E  V  R  L  Y  K  N  K  D  M  I  Q  T  L  T  N

481 aaa tct aaa atc caa aat gta gga ggg act tat gaa ttg cat gtt ggg gac acc ata gac
161 K  S  K  I  Q  N  V  G  G  T  Y  E  L  H  V  G  D  T  I  D

541 ttg ata ttc aac tct gag cat cag gtt cta aaa aat aat aca tac tgg ggt atc att tta
181 L  I  F  N  S  E  H  Q  V  L  K  N  N  T  Y  W  G  I  I  L

601 cta gca aat ccc caa ttc atc tcc tag
201 L  A  N  P  Q  F  I  S  -

```

9.2.11 Fc-Flag-GITRL

HA-Signalpeptid:	NT 1-45	AS 1-15
Fc-Domäne des humanen Immunglobulin 1 (unterstrichen):	NT 52-729	AS 18-243
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 814-837	AS 272-279
extrazelluläre Domäne (AS 50-177) des humanen GITRL (fett):	NT 844-1230	AS 282-409

```

1   atg gct atc atc tac ctc atc ctc ctg ttc acc gct gtg cgg ggc ctc gac aaa act cac
1   M  A  I  I  Y  L  I  L  L  F  T  A  V  R  G  L  D  K  T  H

```

61 aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc
 21 T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P

121 cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg
 41 P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V

181 gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg
 61 D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V

241 cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc
 81 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S

301 gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc
 101 V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S

361 aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga
 121 N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R

421 gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc
 141 E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S

481 ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat
 161 L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N

541 ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ttg gac tcc gac ggc tcc ttc
 181 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F

601 ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca
 201 F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S

661 tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct
 221 C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S

721 ccg ggt aaa aga tct ccg cag ccg cag ccg aaa ccg cag ccg aaa ccg gaa ccg gaa gga
 241 P G K R S P Q P Q P K P Q P K P E P E G

781 tct ctg gag gtg ctg ttc cag ggg ccc gga tcc **gat tac aaa gac gat gac gat aaa** gaa
 261 S L E V L F Q G P G S **D Y K D D D D K** E

841 ttc **caa tta gag act gct aag gag ccc tgt atg gct aag ttt gga cca tta ccc tca aaa**
 281 **F Q L E T A K E P C M A K F G P L P S K**

901 tgg **caa atg gca tct tct gaa cct cct tgc gtg aat aag gtg tct gac tgg aag ctg gag**
 301 **W Q M A S S E P P C V N K V S D W K L E**

961 ata ctt cag aat ggc tta tat tta att tat ggc **caa gtg gct ccc aat gca aac tac aat**
 321 I L Q N G L Y L I Y G Q V A P N A N Y N

1021 gat gta gct cct ttt gag gtg cgg ctg tat **aaa aac aaa gac atg ata caa act cta aca**
 341 D V A P F E V R L Y K N K D M I Q T L T

1081 aac aaa tct aaa atc caa aat gta gga ggg act tat gaa ttg cat gtt ggg gac acc ata
 361 N K S K I Q N V G G T Y E L H V G D T I

1141 gac ttg ata ttc aac tct gag cat cag gtt cta **aaa aat aat aca tac tgg ggt atc att**
 381 D L I F N S E H Q V L K N N T Y W G I I

1201 tta cta gca aat **occ caa ttc atc tcc tag**
 401 L L A N P Q F I S -

9.2.12 sc40-Flag-GITRL

Signalpeptid:	NT 1-57	AS 1-19
Einzelkettenantikörperfragment (scFv) sc40:	NT 58-801	AS 20-267
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 823-846	AS 275-282

extrazelluläre Domäne (AS 50-177)
des humanen GITRL (fett):

NT 853-1239

AS 285-412

```

1   atg gac tgg acc tgg cgc gtg ttt tgc ctg ctc gcc gtg gct cct ggg gcc cac agc cag
1   M   D   W   T   W   R   V   F   C   L   L   A   V   A   P   G   A   H   S   Q

61  gta cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc atg gta gag cct ggg ggg tcc ctt aga ctc tcc
21  V   Q   L   V   Q   S   G   G   G   M   V   E   P   G   G   S   L   R   L   S

121 tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt aat gcc tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct cca
41  C   A   A   S   G   F   T   F   S   N   A   W   M   S   W   V   R   Q   A   P

181 ggg aag ggg ctg gag tgg gtt ggc cgt ata aaa agc aaa gct ggt ggt ggg aca gca gag
61  G   K   G   L   E   W   V   G   R   I   K   S   K   A   G   G   G   T   A   E

241 tac gct gca ccc gtg aaa ggc aga ttc acc atc tca aga gat gat tca caa aac acg ctg
81  Y   A   A   P   V   K   G   R   F   T   I   S   R   D   D   S   Q   N   T   L

301 tat ctg caa atg aac agc ctg aaa acc gac gac aca gcc gtg tat tac tgt acc aca cat
101 Y   L   Q   M   N   S   L   K   T   D   D   T   A   V   Y   Y   C   T   T   H

361 gtc tac ggt gcc ccc cgg aac tgg ggc cag gga tcc ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc
121 V   Y   G   A   P   R   N   W   G   Q   G   S   L   V   T   V   S   S   A   S

421 acc aag ggc cca aag ctt gaa gaa ggt gaa ttt tca gaa gca cgc gta cag tct gtg ttg
141 T   K   G   P   K   L   E   E   G   E   F   S   E   A   R   V   Q   S   V   L

481 act cag ccg ccc tca gtg tct gcg gcc cca gga cag aag gtc acc atc tcc tgc tct gga
161 T   Q   P   P   S   V   S   A   A   P   G   Q   K   V   T   I   S   C   S   G

541 agc agc tcc aac att gga aat aat tat gtc tcc tgg tac gtt caa ctc cca gga aca gcc
181 S   S   S   N   I   G   N   N   Y   V   S   W   Y   V   Q   L   P   G   T   A

601 ccc aaa ctc ctc att tat gac aat aat aag cga ttc tca gga gtt cct gac cga ttc tct
201 P   K   L   L   I   Y   D   N   N   K   R   F   S   G   V   P   D   R   F   S

661 ggc tcc aag tct ggc acg tca gcc acc ctg ggc atc acc ggg ctc cag act ggg gac gag
221 G   S   K   S   G   T   S   A   T   L   G   I   T   G   L   Q   T   G   D   E

721 gcc gat tat tac tgc gga gca tgg gat ggc agc ctg cgt gaa gcg gta ttc ggc gga ggg
241 A   D   Y   Y   C   G   A   W   D   G   S   L   R   E   A   V   F   G   G   G

781 acc aag gtc acc gtc cta ggt gcg gcc gca gga tcc aga tcc gat tac aaa gac gat gac
261 T   K   V   T   V   L   G   A   A   A   G   S   R   S   D Y K D D D

841 gat aaa gaa ttc caa tta gag act gct aag gag ccc tgt atg gct aag ttt gga cca tta
281 D K E F Q L E T A K E P C M A K F G P L

901 ccc tca aaa tgg caa atg gca tct tct gaa cct cct tgc gtg aat aag gtg tct gac tgg
301 P   S   K   W   Q   M   A   S   S   E   P   P   C   V   N   K   V   S   D   W

961 aag ctg gag ata ctt cag aat ggc tta tat tta att tat ggc caa gtg gct ccc aat gca
321 K   L   E   I   L   Q   N   G   L   Y   L   I   Y   G   Q   V   A   P   N   A

1021 aac tac aat gat gta gct cct ttt gag gtg cgg ctg tat aaa aac aaa gac atg ata caa
341 N   Y   N   D   V   A   P   F   E   V   R   L   Y   K   N   K   D   M   I   Q

1081 act cta aca aac aaa tct aaa atc caa aat gta gga ggg act tat gaa ttg cat gtt ggg
361 T   L   T   N   K   S   K   I   Q   N   V   G   G   T   Y   E   L   H   V   G

1141 gac acc ata gac ttg ata ttc aac tct gag cat cag gtt cta aaa aat aat aca tac tgg
381 D   T   I   D   L   I   F   N   S   E   H   Q   V   L   K   N   N   T   Y   W

1201 ggt atc att tta cta gca aat ccc caa ttc atc tcc tag
401 G   I   I   L   L   A   N   P   Q   F   I   S   -

```

9.2.13 Flag-OX40L

Ig-Signalpeptid:	NT 1-78	AS 1-26
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 85-108	AS 29-36
extrazelluläre Domäne (AS 52-183) des humanen OX40L (fett):	NT 115-513	AS 39-170

```

1   atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg ctg aag ggc gtg cag tgc gag
1   M  N  F  G  F  S  L  I  F  L  V  L  V  L  K  G  V  Q  C  E

61  gtg aag ctg gtg cca cgc gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa gaa ttg gta tca
21  V  K  L  V  P  R  G  S  D  Y  K  D  D  D  D  K  E  L  V  S

121 cat cgg tat cct cga att caa agt atc aaa gta caa ttt acc gaa tat aag aag gag aaa
41  H  R  Y  P  R  I  Q  S  I  K  V  Q  F  T  E  Y  K  K  E  K

181 ggt ttc atc ctc act tcc caa aag gag gat gaa atc atg aag gtg cag aac aac tca gtc
61  G  F  I  L  T  S  Q  K  E  D  E  I  M  K  V  Q  N  N  S  V

241 atc atc aac tgt gat ggg ttt tat ctc atc tcc ctg aag ggc tac ttc tcc cag gaa gtc
81  I  I  N  C  D  G  F  Y  L  I  S  L  K  G  Y  F  S  Q  E  V

301 aac att agc ctt cat tac cag aag gat gag gag ccc ctc ttc caa ctg aag aag gtc agg
101 N  I  S  L  H  Y  Q  K  D  E  E  P  L  F  Q  L  K  K  V  R

361 tct gtc aac tcc ttg atg gtg gcc tct ctg act tac aaa gac aaa gtc tac ttg aat gtg
121 S  V  N  S  L  M  V  A  S  L  T  Y  K  D  K  V  Y  L  N  V

421 acc act gac aat acc tcc ctg gat gac ttc cat gtg aat ggc gga gaa ctg att ctt atc
141 T  T  D  N  T  S  L  D  D  F  H  V  N  G  G  E  L  I  L  I

481 cat caa aat cct ggt gaa ttc tgt gtc ctt tga
161 H  Q  N  P  G  E  F  C  V  L  -

```

9.2.14 Flag-TNC-OX40L

Ig-Signalpeptid:	NT 1-78	AS 1-26
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 85-108	AS 29-36
Trimerisierungsdomäne TNC (AS 100-139) des Hühner Tenascin-C) (unterstrichen):	NT 115-204	AS 39-68
extrazelluläre Domäne (AS 52-183) des humanen OX40L (fett):	NT 241-639	AS 81-212

```

1   atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg ctg aag ggc gtg cag tgc gag
1   M  N  F  G  F  S  L  I  F  L  V  L  V  L  K  G  V  Q  C  E

61  gtg aag ctg gtg cca cgc gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa gat atc gcc tgt
21  V  K  L  V  P  R  G  S  D  Y  K  D  D  D  D  K  D  I  A  C

121 ggc tgt gcg get gcc cca gac atc aag gac ctg ctg agc aga ctg gag gag ctg gag ggg
41  G  C  A  A  A  P  D  I  K  D  L  L  S  R  L  E  E  L  E  G

181 ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag ggt acc gga ggt ggg tct ggc ggc cgc ggt gaa ttg
61  L  V  S  S  L  R  E  Q  G  T  G  G  G  S  G  G  R  G  E  L

```

```

241 gta tca cat cgg tat cct cga att caa agt atc aaa gta caa ttt acc gaa tat aag aag
81  v s h r y p r i q s i k v q f t e y k k

301 gag aaa ggt ttc atc ctc act tcc caa aag gag gat gaa atc atg aag gtg cag aac aac
101 e k g f i l t s q k e d e i m k v q n n

361 tca gtc atc atc aac tgt gat ggg ttt tat ctc atc tcc ctg aag ggc tac ttc tcc cag
121 s v i i n c d g f y l i s l k g y f s q

421 gaa gtc aac att agc ctt cat tac cag aag gat gag gag ccc ctc ttc caa ctg aag aag
141 e v n i s l h y q k d e e p l f q l k k

481 gtc agg tct gtc aac tcc ttg atg gtg gcc tct ctg act tac aaa gac aaa gtc tac ttg
161 v r s v n s l m v a s l t y k d k v y l

541 aat gtg acc act gac aat acc tcc ctg gat gac ttc cat gtg aat ggc gga gaa ctg att
181 n v t t d n t s l d d f h v n g g e l i

601 ctt atc cat caa aat cct ggt gaa ttc tgt gtc ctt tga
201 l i h q n p g e f c v l -

```

9.2.15 Fc-Flag-OX40L

HA-Signalpeptid:	NT 1-45	AS 1-15
Fc-Domäne des humanen Immunglobulin 1 (unterstrichen):	NT 52-729	AS 18-243
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 814-837	AS 272-279
extrazelluläre Domäne (AS 52-183) des humanen OX40L (fett):	NT 844-1242	AS 282-413

```

1 atg gct atc atc tac ctc atc ctc ctg ttc acc gct gtg cgg ggc ctc gac aaa act cac
1 m a i i y l i l l f t a v r g l d k t h

61 aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc
21 t c p p c p a p e l l g g p s v f l f p

121 cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg
41 p k p k d t l m i s r t p e v t c v v v

181 gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg
61 d v s h e d p e v k f n w y v d g v e v

241 cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc
81 h n a k t k p r e e q y n s t y r v v s

301 gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc
101 v l t v l h q d w l n g k e y k c k v s

361 aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga
121 n k a l p a p i e k t i s k a k g q p r

421 gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc
141 e p q v y t l p p s r d e l t k n q v s

481 ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat
161 l t c l v k g f y p s d i a v e w e s n

541 ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ttg gac tcc gac ggc tcc ttc
181 g q p e n n y k t t p p v l d s d g s f

601 ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca
201 f l y s k l t v d k s r w q q g n v f s

```

```

661 tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct
221 C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S

721 ccg ggt aaa aga tct ccg cag ccg cag ccg aaa ccg cag ccg aaa ccg gaa ccg gaa gga
241 P G K R S P Q P Q P K P Q P K P E P E G

781 tct ctg gag gtg ctg ttc cag ggg ccc gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa gaa
261 S L E V L F Q G P G S D Y K D D D D K E

841 ttg gta tca cat cgg tat cct cga att caa agt atc aaa gta caa ttt acc gaa tat aag
281 L V S H R Y P R I Q S I K V Q F T E Y K

901 aag gag aaa ggt ttc atc ctc act tcc caa aag gag gat gaa atc atg aag gtg cag aac
301 K E K G F I L T S Q K E D E I M K V Q N

961 aac tca gtc atc atc aac tgt gat ggg ttt tat ctc atc tcc ctg aag ggc tac ttc tcc
321 N S V I I N C D G F Y L I S L K G Y F S

1021 cag gaa gtc aac att agc ctt cat tac cag aag gat gag gag ccc ctc ttc caa ctg aag
341 Q E V N I S L H Y Q K D E E P L F Q L K

1081 aag gtc agg tct gtc aac tcc ttg atg gtg gcc tct ctg act tac aaa gac aaa gtc tac
361 K V R S V N S L M V A S L T Y K D K V Y

1141 ttg aat gtg acc act gac aat acc tcc ctg gat gac ttc cat gtg aat ggc gga gaa ctg
381 L N V T T D N T S L D D F H V N G G E L

1201 att ctt atc cat caa aat cct ggt gaa ttc tgt gtc ctt tga
401 I L I H Q N P G E F C V L -

```

9.2.16 sc40-Flag-OX40L

Signalpeptid:	NT 1-57	AS 1-19
Einzelkettenantikörperfragment (scFv) sc40:	NT 58-801	AS 20-267
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 823-846	AS 275-282
extrazelluläre Domäne (AS 52-183) des humanen OX40L (fett):	NT 853-1251	AS 285-416

```

1 atg gac tgg acc tgg cgc gtg ttt tgc ctg ctc gcc gtg gct cct ggg gcc cac agc cag
1 M D W T W R V F C L L A V A P G A H S Q

61 gta cag ctg gtg cag tct ggg gga gcc atg gta gag cct ggg ggg tcc ctt aga ctc tcc
21 V Q L V Q S G G G M V E P G G S L R L S

121 tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt aat gcc tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct cca
41 C A A S G F T F S N A W M S W V R Q A P

181 ggg aag ggg ctg gag tgg gtt ggc cgt ata aaa agc aaa gct ggt ggt ggg aca gca gag
61 G K G L E W V G R I K S K A G G G T A E

241 tac gct gca ccc gtg aaa ggc aga ttc acc atc tca aga gat gat tca caa aac acg ctg
81 Y A A P V K G R F T I S R D D S Q N T L

301 tat ctg caa atg aac agc ctg aaa acc gac gac aca gcc gtg tat tac tgt acc aca cat
101 Y L Q M N S L K T D D T A V Y Y C T T H

361 gtc tac ggt gcc ccc ccg aac tgg ggc cag gga tcc ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc
121 V Y G A P R N W G Q G S L V T V S S A S

421 acc aag ggc cca aag ctt gaa gaa ggt gaa ttt tca gaa gca cgc gta cag tct gtg ttg
141 T K G P K L E E G E F S E A R V Q S V L

```

481 act cag ccg ccc tca gtg tct gcg gcc cca gga cag aag gtc acc atc tcc tgc tct gga
161 T Q P P S V S A A P G Q K V T I S C S G

541 agc agc tcc aac att gga aat aat tat gtc tcc tgg tac gtt caa ctc cca gga aca gcc
181 S S S N I G N N Y V S W Y V Q L P G T A

601 ccc aaa ctc ctc att tat gac aat aat aag cga ttc tca gga gtt cct gac cga ttc tct
201 P K L L I Y D N N K R F S G V P D R F S

661 ggc tcc aag tct ggc acg tca gcc acc ctg ggc atc acc ggg ctc cag act ggg gac gag
221 G S K S G T S A T L G I T G L Q T G D E

721 gcc gat tat tac tgc gga gca tgg gat ggc agc ctg cgt gaa gcg gta ttc ggc gga ggg
241 A D Y Y C G A W D G S L R E A V F G G G

781 acc aag gtc acc gtc cta ggt gcg gcc gca gga tcc aga tcc **gat tac aaa gac gat gac**
261 T K V T V L G A A A G S R S **D Y K D D D**

841 **gat aaa** gaa ttg **gta tca cat cgg tat cct cga att caa agt atc aaa gta caa ttt acc**
281 **D K** E L **V S H R Y P R I Q S I K V Q F T**

901 **gaa tat aag aag gag aaa ggt ttc atc ctc act tcc caa aag gag gat gaa atc atg aag**
301 **E Y K K E K G F I L T S Q K E D E I M K**

961 **gtg cag aac aac tca gtc atc atc aac tgt gat ggg ttt tat ctc atc tcc ctg aag ggc**
321 **V Q N N S V I I N C D G F Y L I S L K G**

1021 **tac ttc toc cag gaa gtc aac att agc ctt cat tac cag aag gat gag gag ccc ctc ttc**
341 **Y F S Q E V N I S L H Y Q K D E E P L F**

1081 **caa ctg aag aag gtc agg tct gtc aac tcc ttg atg gtg gcc tct ctg act tac aaa gac**
361 **Q L K K V R S V N S L M V A S L T Y K D**

1141 **aaa gtc tac ttg aat gtg acc act gac aat acc tcc ctg gat gac ttc cat gtg aat ggc**
381 **K V Y L N V T T D N T S L D D F H V N G**

1201 **gga gaa ctg att ctt atc cat caa aat cct ggt gaa ttc tgt gtc ctt tga**
401 **G E L I L I H Q N P G E F C V L -**

9.2.17 Flag-41BBL

Ig-Signalpeptid: NT 1-78 AS 1-26

Flag-Epitop (fett-kursiv): NT 85-108 AS 29-36

extrazelluläre Domäne (AS 85-254) NT 115-627 AS 39-208
des humanen 41BBL (fett):

1 atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg ctg aag ggc gtg cag tgc gag
1 M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E

61 gtg aag ctg gtg cca cgc gga tcc **gat tac aaa gac gat gac gat aaa** gaa ttc **ttg gac**
21 V K L V P R G S **D Y K D D D D K** E F **L D**

121 **ctg cgg cag ggc atg ttt gcg cag ctg gtg gcc caa aat gtt ctg ctg atc gat ggg ccc**
41 **L R Q G M F A Q L V A Q N V L L I D G P**

181 **ctg agc tgg tac agt gac cca ggc ctg gca ggc gtg tcc ctg acg ggg ggc ctg agc tac**
61 **L S W Y S D P G L A G V S L T G G L S Y**

241 **aaa gag gac acg aag gag ctg gtg gtg gcc aag gct gga gtc tac tat gtc ttc ttt caa**
81 **K E D T K E L V V A K A G V Y Y V F F Q**

301 **cta gag ctg cgg cgc gtg gtg gcc ggc gag ggc tca ggc tcc gtt tca ctt gcg ctg cac**
101 **L E L R R V V A G E G S G S V S L A L H**

```

361  ctg  cag  cca  ctg  cgc  tct  gct  gct  ggg  gcc  gcc  gcc  ctg  gct  ttg  acc  gtg  gac  ctg  cca
121  L   Q   P   L   R   S   A   A   G   A   A   A   L   A   L   T   V   D   L   P

421  ccc  gcc  tcc  tcc  gag  gct  cgg  aac  tcg  gcc  ttc  ggt  ttc  cag  ggc  cgc  ttg  ctg  cac  ctg
141  P   A   S   S   E   A   R   N   S   A   F   G   F   Q   G   R   L   L   H   L

481  agt  gcc  ggc  cag  cgc  ctg  ggc  gtc  cat  ctt  cac  act  gag  gcc  agg  gca  cgc  cat  gcc  tgg
161  S   A   G   Q   R   L   G   V   H   L   H   T   E   A   R   A   R   H   A   W

541  cag  ctt  acc  cag  ggc  gcc  aca  gtc  ttg  gga  ctc  ttc  cgg  gtg  acc  ccc  gaa  atc  cca  gcc
181  Q   L   T   Q   G   A   T   V   L   G   L   F   R   V   T   P   E   I   P   A

601  gga  ctc  cct  tca  ccg  agg  tcg  gaa  taa
201  G   L   P   S   P   R   S   E   -

```

9.2.18 Flag-TNC-41BBL

Ig-Signalpeptid:	NT 1-78	AS 1-26
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 85-108	AS 29-36
Trimerisierungsdomäne TNC (AS 100-139 des Hühner Tenascin-C) (unterstrichen):	NT 115-204	AS 39-68
extrazelluläre Domäne (AS 85-254) des humanen 41BBL (fett):	NT 241-753	AS 81-250

```

1   atg  aac  ttc  ggg  ttc  agc  ttg  att  ttc  ctg  gtc  ctg  gtg  ctg  aag  ggc  gtg  cag  tgc  gag
1   M   N   F   G   F   S   L   I   F   L   V   L   V   L   K   G   V   Q   C   E

61  gtg  aag  ctg  gtg  cca  cgc  gga  tcc  gat  tac  aaa  gac  gat  gac  gat  aaa  gat  atc  gcc  tgt
21  V   K   L   V   P   R   G   S   D   Y   K   D   D   D   D   K  D   I   A   C

121 ggc  tgt  gcg  gct  gcc  cca  gac  atc  aag  gac  ctg  ctg  agc  aga  ctg  gag  gag  ctg  gag  ggg
41  G   C   A   A   A   P   D   I   K   D   L   L   S   R   L   E   E   L   E   G

181 ctg  gta  tcc  tcc  ctc  cgg  gag  cag  ggt  acc  gga  ggt  ggg  tct  ggc  ggc  cgc  ggt  gaa  ttc
61  L   V   S   S   L   R   E   Q   G   T   G   G   G   S   G   G   R   G   E   F

241 ttg  gac  ctg  cgg  cag  ggc  atg  ttt  gcg  cag  ctg  gtg  gcc  caa  aat  gtt  ctg  ctg  atc  gat
81  L   D   L   R   Q   G   M   F   A   Q   L   V   A   Q   N   V   L   L   I   D

301 ggg  ccc  ctg  agc  tgg  tac  agt  gac  cca  ggc  ctg  gca  ggc  gtg  tcc  ctg  acg  ggg  ggc  ctg
101 G   P   L   S   W   Y   S   D   P   G   L   A   G   V   S   L   T   G   G   L

361 agc  tac  aaa  gag  gac  acg  aag  gag  ctg  gtg  gtg  gcc  aag  gct  gga  gtc  tac  tat  gtc  ttc
121 S   Y   K   E   D   T   K   E   L   V   V   A   K   A   G   V   Y   Y   V   F

421 ttt  caa  cta  gag  ctg  cgg  cgc  gtg  gtg  gcc  ggc  gag  ggc  tca  ggc  tcc  gtt  tca  ctt  gcg
141 F   Q   L   E   L   R   R   V   V   A   G   E   G   S   G   S   V   S   L   A

481 ctg  cac  ctg  cag  cca  ctg  cgc  tct  gct  gct  ggg  gcc  gcc  gcc  ctg  gct  ttg  acc  gtg  gac
161 L   H   L   Q   P   L   R   S   A   A   G   A   A   A   L   A   L   T   V   D

541 ctg  cca  ccc  gcc  tcc  tcc  gag  gct  cgg  aac  tcg  gcc  ttc  ggt  ttc  cag  ggc  cgc  ttg  ctg
181 L   P   P   A   S   S   E   A   R   N   S   A   F   G   F   Q   G   R   L   L

601 cac  ctg  agt  gcc  ggc  cag  cgc  ctg  ggc  gtc  cat  ctt  cac  act  gag  gcc  agg  gca  cgc  cat
201 H   L   S   A   G   Q   R   L   G   V   H   L   H   T   E   A   R   A   R   H

661 gcc  tgg  cag  ctt  acc  cag  ggc  gcc  aca  gtc  ttg  gga  ctc  ttc  cgg  gtg  acc  ccc  gaa  atc
221 A   W   Q   L   T   Q   G   A   T   V   L   G   L   F   R   V   T   P   E   I

721 cca  gcc  gga  ctc  cct  tca  ccg  agg  tcg  gaa  taa
241 P   A   G   L   P   S   P   R   S   E   -

```

9.2.19 Fc-Flag-41BBL

HA-Signalpeptid:	NT 1-45	AS 1-15
Fc-Domäne des humanen Immunglobulin 1 (unterstrichen):	NT 52-729	AS 18-243
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 814-837	AS 272-279
extrazelluläre Domäne (AS 85-254) des humanen 41BBL (fett):	NT 844-1356	AS 282-451

```

1   atg gct atc atc tac ctc atc ctc ctg ttc acc gct gtg cgg ggc ctc gac aaa act cac
1   M  A  I  I  Y  L  I  L  L  F  T  A  V  R  G  L  D  K  T  H

61  aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc
21  T  C  P  P  C  P  A  P  E  L  L  G  G  P  S  V  F  L  F  P

121 cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg
41  P  K  P  K  D  T  L  M  I  S  R  T  P  E  V  T  C  V  V  V

181 gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg
61  D  V  S  H  E  D  P  E  V  K  F  N  W  Y  V  D  G  V  E  V

241 cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc
81  H  N  A  K  T  K  P  R  E  E  Q  Y  N  S  T  Y  R  V  V  S

301 gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc
101 V  L  T  V  L  H  Q  D  W  L  N  G  K  E  Y  K  C  K  V  S

361 aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga
121 N  K  A  L  P  A  P  I  E  K  T  I  S  K  A  K  G  Q  P  R

421 gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc
141 E  P  Q  V  Y  T  L  P  P  S  R  D  E  L  T  K  N  Q  V  S

481 ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat
161 L  T  C  L  V  K  G  F  Y  P  S  D  I  A  V  E  W  E  S  N

541 ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ttg gac tcc gac ggc tcc ttc
181 G  Q  P  E  N  N  Y  K  T  T  P  P  V  L  D  S  D  G  S  F

601 ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca
201 F  L  Y  S  K  L  T  V  D  K  S  R  W  Q  Q  G  N  V  F  S

661 tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct
221 C  S  V  M  H  E  A  L  H  N  H  Y  T  Q  K  S  L  S  L  S

721 ccg ggt aaa aga tct ccg cag ccg cag ccg aaa ccg cag ccg aaa ccg gaa ccg gaa gga
241 P  G  K  R  S  P  Q  P  Q  P  K  P  Q  P  K  P  E  P  E  G

781 tct ctg gag gtg ctg ttc cag ggg ccc gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa gaa
261 S  L  E  V  L  F  Q  G  P  G  S  D  Y  K  D  D  D  D  K  E

841 ttc ttg gac ctg cgg cag ggc atg ttt gcg cag ctg gtg gcc caa aat gtt ctg ctg atc
281 F  L  D  L  R  Q  G  M  F  A  Q  L  V  A  Q  N  V  L  L  I

901 gat ggg ccc ctg agc tgg tac agt gac cca ggc ctg gca ggc gtg tcc ctg acg ggg ggc
301 D  G  P  L  S  W  Y  S  D  P  G  L  A  G  V  S  L  T  G  G

961 ctg agc tac aaa gag gac acg aag gag ctg gtg gtg gcc aag gct gga gtc tac tat gtc
321 L  S  Y  K  E  D  T  K  E  L  V  V  A  K  A  G  V  Y  Y  V

1021 ttc ttt caa cta gag ctg cgg cgc gtg gtg gcc ggc gag ggc tca ggc tcc gtt tca ctt
341 F  F  Q  L  E  L  R  R  V  V  A  G  E  G  S  G  S  V  S  L

1081 gcg ctg cac ctg cag cca ctg cgc tct got get ggg gcc gcc gcc ctg got ttg acc gtg
361 A  L  H  L  Q  P  L  R  S  A  A  G  A  A  A  L  A  L  T  V

```

1141 **gac ctg cca ccc gcc tcc tcc gag gct cgg aac tcg gcc ttc ggt ttc cag ggc cgc ttg**
 381 **D L P P A S S E A R N S A F G F Q G R L**

1201 **ctg cac ctg agt gcc ggc cag cgc ctg ggc gtc cat ctt cac act gag gcc agg gca cgc**
 401 **L H L S A G Q R L G V H L H T E A R A R**

1261 **cat gcc tgg cag ctt acc cag ggc gcc aca gtc ttg gga ctc ttc cgg gtg acc ccc gaa**
 421 **H A W Q L T Q G A T V L G L F R V T P E**

1321 **atc cca gcc gga ctc cct tca ccg agg tcg gaa taa**
 441 **I P A G L P S P R S E -**

9.2.20 sc40-Flag-41BBL

Signalpeptid:	NT 1-57	AS 1-19
Einzelkettenantikörperfragment (scFv) sc40 (unterstrichen):	NT 58-801	AS 20-267
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 823-846	AS 275-282
extrazelluläre Domäne (AS 85-254) des humanen 41BBL (fett):	NT 853-1365	AS 285-454

1 atg gac tgg acc tgg cgc gtg ttt tgc ctg ctc gcc gtg gct cct ggg gcc cac agc cag
 1 M D W T W R V F C L L A V A P G A H S Q

61 gta cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc atg gta gag cct ggg ggg tcc ctt aga ctc tcc
 21 V Q L V Q S G G G M V E P G G S L R L S

121 tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt aat gcc tgg atg agc tgg gtc cgc cag gct cca
 41 C A A S G F T F S N A W M S W V R Q A P

181 ggg aag ggg ctg gag tgg gtt ggc cgt ata aaa agc aaa gct ggt ggt ggg aca gca gag
 61 G K G L E W V G R I K S K A G G G T A E

241 tac gct gca ccc gtg aaa ggc aga ttc acc atc tca aga gat gat tca caa aac acg ctg
 81 Y A A P V K G R F T I S R D D S Q N T L

301 tat ctg caa atg aac agc ctg aaa acc gac gac aca gcc gtg tat tac tgt acc aca cat
 101 Y L Q M N S L K T D D T A V Y Y C T T H

361 gtc tac ggt gcc ccc cgg aac tgg ggc cag gga tcc ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc
 121 V Y G A P R N W G Q G S L V T V S S A S

421 acc aag ggc cca aag ctt gaa gaa ggt gaa ttt tca gaa gca cgc gta cag tct gtg ttg
 141 T K G P K L E E G E F S E A R V Q S V L

481 act cag ccg ccc tca gtg tct gcg gcc cca gga cag aag gtc acc atc tcc tgc tct gga
 161 T Q P P S V S A A P G Q K V T I S C S G

541 agc agc tcc aac att gga aat aat tat gtc tcc tgg tac gtt caa ctc cca gga aca gcc
 181 S S S N I G N N Y V S W Y V Q L P G T A

601 ccc aaa ctc ctc att tat gac aat aat aag cga ttc tca gga gtt cct gac cga ttc tct
 201 P K L L I Y D N N K R F S G V P D R F S

661 ggc tcc aag tct ggc acg tca gcc acc ctg ggc atc acc ggg ctc cag act ggg gac gag
 221 G S K S G T S A T L G I T G L Q T G D E

721 gcc gat tat tac tgc gga gca tgg gat ggc agc ctg cgt gaa gcg gta ttc ggc gga ggg
 241 A D Y Y C G A W D G S L R E A V F G G G

781 acc aag gtc acc gtc cta ggt gcg gcc gca gga tcc aga tcc **gat tac aaa gac gat gac**
 261 T K V T V L G A A A G S R S **D Y K D D D**

841 *gat aaa gaa ttc ttg gac ctg cgg cag ggc atg ttt gcg cag ctg gtg gcc caa aat gtt*
 281 *D K E F L D L R Q G M F A Q L V A Q N V*

901 *ctg ctg atc gat ggg ccc ctg agc tgg tac agt gac cca ggc ctg gca ggc gtg tcc ctg*
 301 *L L I D G P L S W Y S D P G L A G V S L*

961 *acg ggg ggc ctg agc tac aaa gag gac acg aag gag ctg gtg gtg gcc aag gct gga gtc*
 321 *T G G L S Y K E D T K E L V V A K A G V*

1021 *tac tat gtc ttc ttt caa cta gag ctg cgg cgc gtg gtg gcc ggc gag ggc tca ggc tcc*
 341 *Y Y V F F Q L E L R R V V A G E G S G S*

1081 *gtt tca ctt gcg ctg cac ctg cag cca ctg cgc tct gct gct ggg gcc gcc gcc ctg gct*
 361 *V S L A L H L Q P L R S A A G A A A L A*

1141 *ttg acc gtg gac ctg cca ccc gcc tcc tcc gag gct cgg aac tcg gcc ttc ggt ttc cag*
 381 *L T V D L P P A S S E A R N S A F G F Q*

1201 *ggc cgc ttg ctg cac ctg agt gcc ggc cag cgc ctg ggc gtc cat ctt cac act gag gcc*
 401 *G R L L H L S A G Q R L G V H L H T E A*

1261 *agg gca cgc cat gcc tgg cag ctt acc cag ggc gcc aca gtc ttg gga ctc ttc cgg gtg*
 421 *R A R H A W Q L T Q G A T V L G L F R V*

1321 *acc ccc gaa atc cca gcc gga ctc cct tca ccg agg tcg gaa taa*
 441 *T P E I P A G L P S P R S E -*

9.2.21 scFvCD19-Flag-FasL

HA-Signalpeptid:	NT 1-45	AS 1-15
Einzelkettenantikörperfragment scFv19 (unterstrichen):	NT 58-843	AS 20-281
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 850-873	AS 284-291
extrazelluläre Domäne (AS 139-281) des humanen FasL (fett):	NT 895-1326	AS 299-441

1 *atg gct atc atc tac ctc atc ctc ctg ttc acc gct gtg cgg ggc ctc gag aga tct ggg*
 1 *M A I I Y L I L L F T A V R G L E R S G*

61 *gcc cag ccg gcc atg gcc gac tac aaa gac att cag atg acg cag tct cca tcc tcc atg*
 21 *A Q P A M A D Y K D I Q M T Q S P S S M*

121 *tct gta tct ctg gga gac aca gtc agc atc act tgc cat gca agt cag ggc att agc agt*
 41 *S V S L G D T V S I T C H A S Q G I S S*

181 *aat ata ggg tgg ttg cag cag aaa cca ggg aaa tca ttt aag ggc ctg atc tat cat gga*
 61 *N I G W L Q Q K P G K S F K G L I Y H G*

241 *acc aac ttg gaa gat gga gtt cca tca agg ttc agt ggc agt gga tct gga gca gat tat*
 81 *T N L E D G V P S R F S G S G S G A D Y*

301 *tct ctc acc atc agc agc ctg gaa tct gaa gat ttt gca gac tat tac tgt gta cag tat*
 101 *S L T I S S L E S E D F A D Y Y C V Q Y*

361 *gct cag ttt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgt ggt ggt ggt*
 121 *A Q F P Y T F G G G T K L E L K R G G G*

421 *ggt tct ggt ggt ggt ggt tct ggc gcc ggc gcc tcc agt ggt ggt gga tcc cag gtt cag*
 141 *G S G G G G S G G G S S G G G S Q V Q*

481 *ctg cag caa tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gcc tca gtg aag att tcc tgc aaa*
 161 *L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K*

541 gct tct ggc tac gca ttc agt agc tct tgg atg gac tgg gtg aag cag agg cct gga cag
 181 A S G Y A F S S S W M D W V K Q R P G Q

601 ggg ctt gag tgg att gga cgg att tat cct gga gat gga gat act aac tac aat ggg aag
 201 G L E W I G R I Y P G D G D T N Y N G K

661 ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac atg cag ctc
 221 F K G K A T L T A D K S S S T A Y M Q L

721 agc agc ctg acc tct gtg gac tct gcg gtc tat ttc tgt gca agg tcc att act acg gta
 241 S S L T S V D S A V Y F C A R S I T T V

781 gta ggg tgg tac ttc gat gtc tgg ggc gca ggg acc acg gtc acc gtt tcc tcc gcg gcc
 261 V G W Y F D V W G A G T T V T V S S A A

841 ggg gtc cag gat tac aaa gac gat gac gat aaa gcg gcc gca ggt gag ctc gag **gaa aaa**
 281 A V Q **D Y K D D D D K** A A A G E L E **E K**

901 **aag gag ctg agg aaa gtg gcc cat tta aca ggc aag tcc aac tca agg tcc atg cct ctg**
 301 **K E L R K V A H L T G K S N S R S M P L**

961 **gaa tgg gaa gac acc tat gga att gtc ctg ctt tct gga gtg aag tat aag aag ggt ggc**
 321 **E W E D T Y G I V L L S G V K Y K K G G**

1021 **ctt gtg atc aat gaa act ggg ctg tac ttt gta tat tcc aaa gta tac ttc cgg ggt caa**
 341 **L V I N E T G L Y F V Y S K V Y F R G Q**

1081 **tct tgc aac aac ctg ccc ctg agc cac aag gtc tac atg agg aac tct aag tat ccc cag**
 361 **S C N N L P L S H K V Y M R N S K Y P Q**

1141 **gat ctg gtg atg atg gag ggg aag atg atg agc tac tgc act act ggg cag atg tgg gcc**
 381 **D L V M M E G K M M S Y C T T G Q M W A**

1201 **cgc agc agc tac ctg ggg gca gtg ttc aat ctt acc agt gct gat cat tta tat gtc aac**
 401 **R S S Y L G A V F N L T S A D H L Y V N**

1261 **gta tct gag ctc tct ctg gtc aat ttt gag gaa tct cag acg ttt ttc ggc tta tat aag**
 421 **V S E L S L V N F E E S Q T F F G L Y K**

1321 **ctc taa**
 441 L -

9.2.22 scFvCD19-Flag-TRAIL

HA-Signalpeptid:	NT 1-45	AS 1-15
Einzelkettenantikörperfragment scFv19 (unterstrichen):	NT 58-843	AS 20-281
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 850-873	AS 284-291
extrazelluläre Domäne (AS 95-281) des humanen TRAIL (fett):	NT 880-1443	AS 294-480

1 atg gct atc atc tac ctc atc ctc ctg ttc acc gct gtg cgg ggc ctc gag aga tct ggg
 1 M A I I Y L I L L F T A V R G L E R S G

61 gcc cag ccg gcc atg gcc gac tac aaa gac att cag atg acg cag tct cca tcc tcc atg
 21 A Q P A M A D Y K D I Q M T Q S P S S M

121 tct gta tct ctg gga gac aca gtc agc atc act tgc cat gca agt cag ggc att agc agt
 41 S V S L G D T V S I T C H A S Q G I S S

181 aat ata ggg tgg ttg cag cag aaa cca ggg aaa tca ttt aag ggc ctg atc tat cat gga
 61 N I G W L Q Q K P G K S F K G L I Y H G

241 acc aac ttg gaa gat gga gtt cca tca agg ttc agt ggc agt gga tct gga gca gat tat
 81 T N L E D G V P S R F S G S G S G A D Y
 301 tct ctc acc atc agc agc ctg gaa tct gaa gat ttt gca gac tat tac tgt gta cag tat
 101 S L T I S S L E S E D F A D Y Y C V Q Y
 361 gct cag ttt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgt ggt ggt ggt
 121 A Q F P Y T F G G G T K L E L K R G G G
 421 ggt tct ggt ggt ggt ggt tct ggc ggc ggc ggc tcc agt ggt ggt gga tcc cag gtt cag
 141 G S G G G G S G G G G S S G G G S Q V Q
 481 ctg cag caa tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gcc tca gtg aag att tcc tgc aaa
 161 L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K
 541 gct tct ggc tac gca ttc agt agc tct tgg atg gac tgg gtg aag cag agg cct gga cag
 181 A S G Y A F S S S W M D W V K Q R P G Q
 601 ggt ctt gag tgg att gga cgg att tat cct gga gat gga gat act aac tac aat ggg aag
 201 G L E W I G R I Y P G D G D T N Y N G K
 661 ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac atg cag ctc
 221 F K G K A T L T A D K S S S T A Y M Q L
 721 agc agc ctg acc tct gtg gac tct gcg gtc tat ttc tgt gca agg tcc att act acg gta
 241 S S L T S V D S A V Y F C A R S I T T V
 781 gta ggg tgg tac ttc gat gtc tgg ggc gca ggg acc acg gtc acc gtt tcc tcc gcg gcc
 261 V G W Y F D V W G A G T T V T V S S A A
 841 gcg gtc gac gat tac aaa gac gat gac gat aaa gcg ttc acc tct gag gaa acc att tct
 281 A V D D Y K D D D D K A F T S E E T I S
 901 aca gtt caa gaa aag caa caa aat att tct ccc cta gtg aga gaa aga ggt cct cag aga
 301 T V Q E K Q Q N I S P L V R E R G P Q R
 961 gta gca gct cac ata act ggg acc aga gga aga agc aac aca ttg tct tct cca aac tcc
 321 V A A H I T G T R G R S N T L S S P N S
 1021 aag aat gaa aag gct ctg ggc cgc aaa ata aac tcc tgg gaa tca tca agg agt ggg cat
 341 K N E K A L G R K I N S W E S S R S G H
 1081 tca ttc ctg agc aac ttg cac ttg agg aat ggt gaa ctg gtc atc cat gaa aag ggg ttt
 361 S F L S N L H L R N G E L V I H E K G F
 1141 tac tac atc tat tcc caa aca tac ttt cga ttt cag gag gaa ata aaa gaa aac aca aag
 381 Y Y I Y S Q T Y F R F Q E E I K E N T K
 1201 aac gac aaa caa atg gtc caa tat att tac aaa tac aca agt tat cct gac cct ata ttg
 401 N D K Q M V Q Y I Y K Y T S Y P D P I L
 1261 ttg atg aaa agt gct aga aat agt tgt tgg tct aaa gat gca gaa tat gga ctc tat tcc
 421 L M K S A R N S C W S K D A E Y G L Y S
 1321 atc tat caa ggg gga ata ttt gag ctt aag gaa aat gac aga att ttt gtt tct gta aca
 441 I Y Q G G I F E L K E N D R I F V S V T
 1381 aat gag cac ttg ata gac atg gac cat gaa gcc agt ttt ttc ggg gcc ttt tta gtt ggc
 461 N E H L I D M D H E A S F F G A F L V G
 1441 taa
 -

9.2.23 B7-2-Flag-FasL

extrazelluläre Domäne (AS 1-239) NT 1-717 AS 1-239
des humanen B7-2 (unterstrichen):

Flag-Epitop (fett-kursiv): NT 718-741 AS 240-247

extrazelluläre Domäne (AS 139-281) NT 763-1194 AS 255-397
des humanen FasL (fett):

```

1   atg gga ctg agt aac att ctc ttt gtg atg gcc ttc ctg ctc tct ggt gct gct cct ctg
1   M G L S N I L F V M A F L L S G A A P L

61  aag att caa gct tat ttc aat gag act gca gac ctg cca tgc caa ttt gca aac tct caa
21  K I Q A Y F N E T A D L P C Q F A N S Q

121 aac caa agc ctg agt gag cta gta gta ttt tgg cag gac cag gaa aac ttg gtt ctg aat
41  N Q S L S E L V V F W Q D Q E N L V L N

181 gag gta tac tta ggc aaa gag aaa ttt gac agt gtt cat tcc aag tat atg ggc cgc aca
61  E V Y L G K E K F D S V H S K Y M G R T

241 agt ttt gat tcg gac agt tgg acc ctg aga ctt cac aat ctt cag atc aag gac aag ggc
81  S F D S D S W T L R L H N L Q I K D K G

301 ttg tat caa tgt atc atc cat cac aaa aag ccc aca gga atg att cgc atc cac cag atg
101 L Y Q C I I H H K K P T G M I R I H Q M

361 aat tct gaa ctg tca gtg ctt gct aac ttc agt caa cct gaa ata gta cca att tct aat
121 N S E L S V L A N F S Q P E I V P I S N

421 ata aca gaa aat gtg tac ata aat ttg acc tgc tca tct ata cac ggt tac cca gaa cct
141 I T E N V Y I N L T C S S I H G Y P E P

481 aag aag atg agt gtt ttg cta aga acc aag aat tca act atc gag tat gat ggt att atg
161 K K M S V L L R T K N S T I E Y D G I M

541 cag aaa tct caa gat aat gtc aca gaa ctg tac gac gtt tcc atc agc ttg tct gtt tca
181 Q K S Q D N V T E L Y D V S I S L S V S

601 ttc cct gat gtt acg agc aat atg acc atc ttc tgt att ctg gaa act gac aag acg cgg
201 F P D V T S N M T I F C I L E T D K T R

661 ctt tta tct tca cct ttc tct ata gag ctt gag gac cct cag cct ccc cca gac cac gat
221 L L S S P F S I E L E D P Q P P P D H D

721 tac aaa gac gat gac gat aaa gcg gcc gca ggt gag ctc gag gaa aaa aag gag ctg agg
241 Y K D D D D K A A A G E L E E K K E L R

781 aaa gtg gcc cat tta aca ggc aag tcc aac tca agg tcc atg cct ctg gaa tgg gaa gac
261 K V A H L T G K S N S R S M P L E W E D

841 acc tat gga att gtc ctg ctt tct gga gtg aag tat aag aag ggt ggc ctt gtg atc aat
281 T Y G I V L L S G V K Y K K G G L V I N

901 gaa act ggg ctg tac ttt gta tat tcc aaa gta tac ttc cgg ggt caa tct tgc aac aac
301 E T G L Y F V Y S K V Y F R G Q S C N N

961 ctg ccc ctg agc cac aag gtc tac atg agg aac tct aag tat ccc cag gat ctg gtg atg
321 L P L S H K V Y M R N S K Y P Q D L V M

1021 atg gag ggg aag atg atg agc tac tgc act act ggg cag atg tgg gcc cgc agc agc tac
341 M E G K M M S Y C T T G Q M W A R S S Y

1081 ctg ggg gca gtg ttc aat ctt acc agt gct gat cat tta tat gtc aac gta tct gag ctc
361 L G A V F N L T S A D H L Y V N V S E L

1141 tct ctg gtc aat ttt gag gaa tct cag acg ttt ttc ggc tta tat aag ctc taa
381 S L V N F E E S Q T F F G L Y K L -

```

9.2.24 CD40-Flag-FasL

extrazelluläre Domäne (AS 1-192) NT 52-576 AS 1-192
des humanen CD40 (unterstrichen):

Flag-Epitop (fett-kursiv): NT 583-606 AS 195-202

extrazelluläre Domäne (AS 137-281) NT 613-1050 AS 205-349
des humanen FasL (fett):

```

1   atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc gct gtc cat cca
1   M V R L P L Q C V L W G C L L T A V H P

61  gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta ata aac agt cag tgc tgt tct ttg
21  E P P T A C R E K Q Y L I N S Q C C S L

121 tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt
41  C Q P G Q K L V S D C T E F T E T E C L

181 cct tgc ggt gaa agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac
61  P C G E S E F L D T W N R E T H C H Q H

241 aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc tca gaa aca gac
81  K Y C D P N L G L R V Q Q K G T S E T D

301 acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc
101 T I C T C E E G W H C T S E A C E S C V

361 ctg cac cgc tca tgc tcg ccc ggc ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat
121 L H R S C S P G F G V K Q I A T G V S D

421 acc atc tgc gag ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa
141 T I C E P C P V G F F S N V S S A F E K

481 tgt cac cct tgg aca agc tgt gag acc aaa gac ctg gtt gtg caa cag gca ggc aca aac
161 C H P W T S C E T K D L V V Q Q A G T N

541 aag act gat gtt gtc tgt ggt ccc cag gat cgg ctg gga tcc gat tac aaa gac gat gac
181 K T D V V C G P Q D R L G S D Y K D D D

601 gat aaa gaa ttc ccc cct gaa aaa aag gag ctg agg aaa gtg gcc cat tta aca ggc aag
201 D K E F P P E K K E L R K V A H L T G K

661 tcc aac tca agg tcc atg cct ctg gaa tgg gaa gac acc tat gga att gtc ctg ctt tct
221 S N S R S M P L E W E D T Y G I V L L S

721 gga gtg aag tat aag aag ggt ggc ctt gtg atc aat gaa act ggg ctg tac ttt gta tat
241 G V K Y K K G G L V I N E T G L Y F V Y

781 tcc aaa gta tac ttc cgg ggt caa tct tgc aac aac ctg ccc ctg agc cac aag gtc tac
261 S K V Y F R G Q S C N N L P L S H K V Y

841 atg agg aac tct aag tat ccc cag gat ctg gtg atg atg gag ggg aag atg atg agc tac
281 M R N S K Y P Q D L V M M E G K M M S Y

901 tgc act act ggg cag atg tgg gcc cgc agc agc tac ctg ggg gca gtg ttc aat ctt acc
301 C T T G Q M W A R S S Y L G A V F N L T

961 agt gct gat cat tta tat gtc aac gta tct gag ctc tct ctg gtc aat ttt gag gaa tct
321 S A D H L Y V N V S E L S L V N F E E S

1021 cag acg ttt ttc ggc tta tat aag ctc taa
341 Q T F F G L Y K L -

```

9.2.25 RANK-Flag-FasL

HA-Signalpeptid:	NT 1-45	AS 1-15
extrazelluläre Domäne (AS 29-213) des humanen RANK (unterstrichen):	NT 82-636	AS 28-212
Flag-Epitop (fett-kursiv):	NT 643-666	AS 215-222
extrazelluläre Domäne (AS 139-281) des humanen FasL (fett):	NT 688-1119	AS 230-372

```

1   atg gct atc atc tac ctc atc ctc ctg ttc acc gct gtg cgg ggc ctc gag aga tct ctg
1   M  A  I  I  Y  L  I  L  L  F  T  A  V  R  G  L  E  R  S  L

61  cag gaa ttc agg tta gga tcc cag atc gct cct cca tgt acc agt gag aag cat tat gag
21  Q  E  F  R  L  G  S  Q  I  A  P  P  C  T  S  E  K  H  Y  E

121 cat ctg gga cgg tgc tgt aac aaa tgt gaa cca gga aag tac atg tct tct aaa tgc act
41  H  L  G  R  C  C  N  K  C  E  P  G  K  Y  M  S  S  K  C  T

181 act acc tct gac agt gta tgt ctg ccc tgt ggc ccg gat gaa tac ttg gat agc tgg aat
61  T  T  S  D  S  V  C  L  P  C  G  P  D  E  Y  L  D  S  W  N

241 gaa gaa gat aaa tgc ttg ctg cat aaa gtt tgt gat aca ggc aag gcc ctg gtg gcc gtg
81  E  E  D  K  C  L  L  H  K  V  C  D  T  G  K  A  L  V  A  V

301 gtc gcc ggc aac agc acg acc ccc cgg cgc tgc gcg tgc acg gct ggg tac cac tgg agc
101 V  A  G  N  S  T  T  P  R  R  C  A  C  T  A  G  Y  H  W  S

361 cag gac tgc gag tgc tgc cgc cgc aac acc gag tgc gcg ccg ggc ctg ggc gcc cag cac
121 Q  D  C  E  C  C  R  R  N  T  E  C  A  P  G  L  G  A  Q  H

421 ccg ttg cag ctc aac aag gac aca gtg tgc aaa cct tgc ctt gca ggc tac ttc tct gat
141 P  L  Q  L  N  K  D  T  V  C  K  P  C  L  A  G  Y  F  S  D

481 gcc ttt tcc tcc acg gac aaa tgc aga ccc tgg acc aac tgt acc ttc ctt gga aag aga
161 A  F  S  S  T  D  K  C  R  P  W  T  N  C  T  F  L  G  K  R

541 gta gaa cat cat ggg aca gag aaa tcc gat gcg gtt tgc agt tct tct ctg cca gct aga
181 V  E  H  H  G  T  E  K  S  D  A  V  C  S  S  S  L  P  A  R

601 aaa cca cca aat gaa ccc cat gtt tac ttg ccc ggt gtc cag gat tac aaa gac gat gac
201 K  P  P  N  E  P  H  V  Y  L  P  G  V  Q  D  Y  K  D  D  D

661 gat aaa gcg gcc gca ggt gag ctc gag gaa aaa aag gag ctg agg aaa gtg gcc cat tta
221 D  K  A  A  A  G  E  L  E  E  K  K  E  L  R  K  V  A  H  L

721 aca ggc aag tcc aac tca agg tcc atg cct ctg gaa tgg gaa gac acc tat gga att gtc
241 T  G  K  S  N  S  R  S  M  P  L  E  W  E  D  T  Y  G  I  V

781 ctg ctt tot gga gtg aag tat aag aag ggt ggc ctt gtg atc aat gaa act ggg ctg tac
261 L  L  S  G  V  K  Y  K  K  G  G  L  V  I  N  E  T  G  L  Y

841 ttt gta tat tcc aaa gta tac ttc cgg ggt caa tct tgc aac aac ctg ccc ctg agc cac
281 F  V  Y  S  K  V  Y  F  R  G  Q  S  C  N  N  L  P  L  S  H

901 aag gtc tac atg agg aac tct aag tat ccc cag gat ctg gtg atg atg gag ggg aag atg
301 K  V  Y  M  R  N  S  K  Y  P  Q  D  L  V  M  M  E  G  K  M

961 atg agc tac tgc act act ggg cag atg tgg gcc cgc agc agc tac ctg ggg gca gtg ttc
321 M  S  Y  C  T  T  G  Q  M  W  A  R  S  S  Y  L  G  A  V  F

1021 aat ctt acc agt gct gat cat tta tat gtc aac gta tct gag ctc tct ctg gtc aat ttt
341 N  L  T  S  A  D  H  L  Y  V  N  V  S  E  L  S  L  V  N  F

1081 gag gaa tct cag acg ttt ttc ggc tta tat aag ctc taa
361 E  E  S  Q  T  F  F  G  L  Y  K  L  -

```

9.3 Publikationen

Assouhou-Luty C, Gerspach J, Siegmund D, Müller N, Huard B, Tiegs G, Pfizenmaier K, Wajant H (2006). A CD40-CD95L fusion protein interferes with CD40L-induced pro-survival signaling and allows membrane CD40L-restricted activation of CD95. *J Mol Med. Sep*;84(9):785-97.

Wicovsky A, Müller N, Daryab N, Marienfeld R, Kneitz C, Kavuri S, Leverkus M, Baumann B, Wajant H (2007). Sustained JNK activation in response to tumor necrosis factor is mediated by caspases in a cell type-specific manner. *J Biol Chem. Jan 26*;282(4):2174-83.

Berg D, Lehne M, Müller N, Siegmund D, Münkel S, Sebald W, Pfizenmaier K, Wajant H (2007). Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L. *Cell Death Differ. Dec*;14(12):2021-34.

Bremer E, ten Cate B, Samplonius DF, Mueller N, Wajant H, Stel AJ, Chamuleau M, van de Loosdrecht AA, Stieglmaier J, Fey GH, Helfrich W (2008). Superior activity of fusion protein scFvRit:sFasL over cotreatment with rituximab and Fas agonists. *Cancer Res. Jan 15*;68(2):597-604

Müller N, Wyzgol A, Münkel S, Pfizenmaier K, Wajant H (2008). Activity of soluble OX40 ligand is enhanced by oligomerization and cell surface immobilization. *FEBS J. May*;275(9):2296-304.

9.4 Lebenslauf

Name: Nicole Susanne Müller
 Geburtsdatum: 24.04.1979
 Geburtsort: Reutlingen
 Familienstand: ledig

Schulbildung

09.1985 - 06.1989 Wartbergschule Heilbronn (Grundschule)
 09.1989 - 06.1998 Justinus-Kerner-Gymnasium Heilbronn
 06.1998 Abitur am Justinus-Kerner-Gymnasium Heilbronn (Note: 2,4)

Studium und Promotion

09.1998 - 08.2000 Grundstudium Biologie Diplom an der Universität Hohenheim
 08.2000 Abschluss Grundstudium mit dem Vordiplom (Note: 2,59)
 09.2000 - 06.2004 Hauptstudium Biologie Diplom
 Hauptfach: Mikrobiologie
 Nebenfächer: Zoophysiologie, Biochemie, Virologie
 12.2003 - 06.2004 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Hohenheim unter Leitung von Prof. Dr. A. Kuhn
 Titel: „Expression, Reinigung und molekulare Interaktion eines cytoplasmatischen Fragments des CD44-Rezeptors mit Merlin“
 06.2004 Abschluß des Biologie-Studiums mit dem Diplom (Note: 1,2)
 seit 09.2004 Promotion an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg unter Leitung von Prof. Dr. H. Wajant, Abteilung für Molekulare Innere Medizin:
 Titel: „Entwicklung antigenabhängig aktivierbarer TNF-Ligand-Fusionsproteine“

Danksagung

Ich möchte mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Bei Prof. Dr. Harald Wajant bedanke ich mich für die Möglichkeit, meine Arbeit an seinem Institut und unter seiner wissenschaftlichen Betreuung und Leitung durchführen zu können, ebenso für seine stetige Diskussionsbereitschaft und die professionelle Zusammenarbeit.

Ich danke Prof. Dr. Roland Benz für seine Bereitschaft, die Begutachtung meiner Arbeit als Zweitkorrektor zu übernehmen.

Ein großer Dank geht auch an die Mitarbeiter der Abteilung für Molekulare Innere Medizin, die mich bei einer Vielzahl von theoretische und praktische Fragen unterstützt und motiviert haben. Für eine sehr gute Zusammenarbeit danke ich: Agnes, Andrea, Andreas, Claudia, Daniela I, Daniela II, Daniela III, Frank, Hilka, Isabell, Martin, Matthias, Melitta, Sabine, Steffen, Susanne, Tina, Viktoria sowie allen jetzigen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe Topp.

Ich danke meinen Eltern, meinen Geschwistern und meine Großeltern für ihre liebevolle Unterstützung und andauernde Bestätigung während meiner Doktorarbeit. Mein Dank gilt auch meinem Freund Arnold für seine endlose Geduld und die Motivation.

Insbesondere danke ich meinem Opa Emil, der den Verlauf dieser Arbeit immer mit Spannung mitverfolgt und sein ganzes Vertrauen in mich gesetzt hat, dem es aber nicht vergönnt war, das Ende meiner Promotion mitzuerleben.

Vielen Dank!