



CD70-abhängige und spezifische Aktivierung von TRAILR1 oder TRAILR2 durch scFv:CD70-TRAIL-Mutanten

CD70-restricted specific activation of TRAILR1
or TRAILR2 using scFv:CD70-TRAIL mutants

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

vorgelegt von

Johannes Trebing

geb. 10.12.1981 in D-Hanau

Würzburg 2014

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Harald Wajant (Med. Fakultät)

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Müller (Biol. Fakultät)

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation „CD70-abhängige spezifische Aktivierung von TRAILR1 oder TRAILR2 durch scFv:CD70-TRAIL-Mutanten" eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig mit einhalt der Regeln über gute wissenschaftliche Praxis und ohne Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung angefertigt, sowie keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 03.11.14

Datum



Unterschrift (Johannes Trebing)

Affidavit

I hereby confirm that my disseratation entitled "CD70-restricted specific activation of TRAILR1 or TRAILR2 using scFv:CD70-TRAIL mutants" is the result of my own work without help or support from commercial consultants. All sources and materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, 03.11.14

Date



Signature (Johannes Trebing)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01. April 2010 bis 26.Oktober.2014 in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin der Universitätsklinik Würzburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Harald Wajant angefertigt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich vor allem bei Herrn Prof. Dr. Harald Wajant dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit hatte in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit unter seiner wissenschaftlichen Leitung und Betreuung anzufertigen und mich dadurch mit einem solch interessanten Themen zu beschäftigen. Danke für die wertvollen Ratschläge und Hilfestellungen bei Problemlösungen.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Müller für die Zeit bedanken, die er sich für diese Arbeit genommen hatte, um mich während meiner Promotion als Zweitgutachter zu betreuen.

Zudem bedanke ich mich für eine sehr gute professionelle Zusammenarbeit während der gesamten Arbeitszeit bei allen Mitarbeitern und Kollegen der Molekularen Inneren Medizin. Insbesondere bedanke ich mich für die warme freundliche Atmosphäre im und außerhalb des Labors; ich werde euch sehr vermissen!!!

Besonders danken möchte ich meinen Eltern, Geschwistern und Freunden, die mich jederzeit unterstützt und motiviert haben. Danke an alle Vergessenden für den Rückhalt, die Geduld und die Unterstützung während der Promotion.

Für meine Familie

Litterarum radices amaras esse, fructus incundores

(Das Wissen hat bittere Wurzeln, aber seine Früchte sind umso süßer)

Marcus Porcius Cato, d.Ä. (234-149 v. Chr.)

röm. Feldherr, Staatsmann und Historiker

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Die TNF-Rezeptor und -Liganden Superfamilie	1
1.1.1 TNF-Rezeptor Superfamilie	2
1.1.2 TNF-Liganden Superfamilie	3
1.2 Das CD27/CD70-System	4
1.2.1 CD27 (<i>Cluster of differentiation 27</i>)	4
1.2.2 CD70 (CD27L).....	4
1.2.2.1 CD70 und klinische Anwendung	5
1.2.3 CD27-assoziierte Signalwege.....	6
1.3 Das TRAIL/TRAILR-System	9
1.3.1 TRAIL (<i>Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand</i>).....	9
1.3.1.1 TRAIL in der klinischen Anwendung	10
1.3.2 TRAIL-Rezeptoren (<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors</i>)	11
1.3.3 Apoptose	13
1.3.3.1 Typ-1- versus Typ-2-Zellen.....	14
1.4 Antikörper (Immunglobuline) und medizinische Anwendung	16
1.4.1 Herstellung monoklonaler- und scFv-Antikörper	18
1.5 Zielsetzung	19
2. MATERIAL	20
2.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien	20
2.2 Enzyme	21
2.3 Antikörper	21
2.4 Kits	22
2.5 Verbrauchsmaterial und Geräte	23
2.6 Lösungen und Puffer	24
2.7 Zellen	26
2.7.1 Prokaryotische Zellen	26

2.7.2 Eukaryotische Zellen	26
2.8 Plasmide und Fusionsproteine	26
3. METHODEN	28
3.1 Zellkultur und Kultivierung eukaryotischer Zellen	28
3.1.1 Konservierung und Revitalisierung eukaryotischer Zellen	28
3.2 Klonierung und Amplifikation der Fusionsprotein-Expressionsvektoren	29
3.3 Produktion und Aufreinigung der Fusionsproteine.....	31
3.3.1 Protein-Produktion	31
3.3.2 Aufreinigung	31
3.4 Westernblot (WB).....	32
3.4.1 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)	32
3.4.2 Elektrotransfer (blotting) von Proteinen auf die Nitrozellulosemembran	32
3.4.3 Immundetektion	33
3.5 Silberfärbung	33
3.6 Durchflusszytometrie und Detektion von Zelloberflächenmarker	34
3.7 IL8-ELISA in der Kokultur.....	34
3.8 Zytotoxizitätsassay	35
3.9 Herstellung von Gesamtzelllysaten nach Stimulation.....	36
3.10 Gleichgewichtsbindungsstudien mittels GpL-Fusionsproteinen	36
3.10.1 Gleichgewichtsbindungsstudien mit GpL-TNC-TRAIL-Varianten.....	36
3.10.2 Gleichgewichtsbindungsstudien mit mono- und trimeren scFv:lahCD70-GpL	37
3.11 <i>In vitro</i> GpL-Bindungsstudien.....	38
3.12 Heterologe Kompetitionsassay mit CD27_{ed}-Fc-GpL(w/o)	38
3.13 Analyse und Darstellung der Bindungsdaten	39
4. ERGEBNISSE	40
4.1 CD70-Zelloberflächenexpression.....	40

4.2 Charakterisierung des in Lamas generierten humanen CD70-spezifischen Antikörpers 27B3 (lahCD70)	43
4.3 Gleichgewichtsbindungsstudien mit monomeren und trimeren GpL-Fusionsproteinen der lahCD70-abgeleiteten scFv-Domäne	45
4.4 Charakterisierung von TRAILR1- und TRAILR2-spezifischen TRAIL-Mutanten mittels zellulären Bindungsstudien	47
4.5 Charakterisierung der TRAILR1- und TRAILR2-spezifischen TRAIL- Mutanten in Zytotoxizitätsexperimenten	50
4.6 Generierung & Charakterisierung der scFv:lahCD70-TRAIL-Fusionsproteine....	54
4.7 scFv:lahCD70-TRAIL-Varianten zeigten eine CD70-abhängige Aktivierung des TRAILR1 und TRAILR2.....	56
4.8 Aktivität von scFv:lahCD70-TNC-TRAIL auf CD70 und CD27 koexprimierenden Zellen	62
4.9 Apoptoseinduktion mittels scFv:lahCD70-Flag-TNC-FasL.....	63
4.10 scFv:lahCD70-TNC-TRAIL Fusionsproteine induzieren parakrin Apoptose	63
7. DISKUSSION	66
7.1 CD70- <i>targeting</i> und Tumorthherapie	66
7.2 TRAILR- <i>targeting</i> und Tumorthherapie	67
7.3 scFv-TRAIL als komplementäre Tumorthherapie	67
7.4 TRAILR-Antikörper und scFv:CD70-TRAIL-Mutanten	69
7.5 Ausblick.....	71
8. ZUSAMMENFASSUNG	73
9. SUMMARY	75
10. LITERATURVERZEICHNIS	76
11. ANHANG	86

11.1 DNA-Sequenzen	86
11.1.1 Gaussia-Flag-TNC-hTRAIL-pCR3	86
11.1.2 Gaussia-Flag-TNC-hTRAILmutR1-pCR3	87
11.1.3 Gaussia-Flag-TNC-hTRAILmutR2-pCR3	88
11.1.4 Flag-TNC-hTRAIL-pCR3.....	89
11.1.5 Flag-TNC-hTRAILmutR1-pCR3	90
11.1.6 Flag-TNC-hTRAILmutR2-pCR3	90
11.1.7 TRAILR1 _{ed} -2xFlag-Fc	91
11.1.8 TRAILR2 _{ed} -2xFlag-Fc	92
11.1.9 CD27 _{ed} -Flag-Fc-Gaussia(w/o).....	93
11.1.10 scFv:CD70(27B3)-Flag-TNC-TRAILwt	95
11.1.11 scFv:CD70(27B3)-Flag-TNC-TRAILmutR1	96
11.1.12 scFv:CD70(27B3)-Flag-TNC-TRAILmutR2	97
11.1.13 scFv:CD70(27B3)-TNC-Flag-Gaussia.....	99
11.1.14 scFv:CD70(27B3)-2xFlag-Gaussia	100
11.1.15 scFv:CD70(27B3)-Flag-TNC-FasL.....	101
11.2 Abkürzungsverzeichnis.....	102
11.3 Publikationen	108
11.4 Lebenslauf	109

1. Einleitung

1.1 Die TNF-Rezeptor und -Liganden Superfamilie

Die Tumornekrosefaktor(TNF)-Superfamilie umfasst 19 Liganden (TNFSF) und die TNF-Rezeptor-Superfamilie 29 Rezeptoren (TNFRSF), wovon drei Rezeptoren noch keinem der TNF-Liganden zuzuordnen ist (Tab. 1). Die TNF-Superfamilienmitglieder regulieren die Gewebemöostase, Entwicklungsprozesse sowie das Immunsystem und die lymphoide Organogenese (Bodmer et al., 2002; Locksley et al., 2001). Die TNF-Liganden, welche zumeist von Zellen des Immunsystems z.B. den T- und B-Lymphozyten gebildet werden, steuern insbesondere auch Differenzierungsprozesse, Zellproliferation und Apoptose (Hehlgans and Pfeffer, 2005). Die TNFR-Signaltransduktion wird durch membrangebundene oder lösliche TNF-Liganden vermittelt (Hehlgans and Pfeffer, 2005).

Zusammenfassend stimulieren die Liganden der TNF-Familie über TNF-Rezeptoren verschiedene zelluläre Signalwege, welche Apoptose, Nekrose, Angiogenese, aber auch Differenzierung und Zellproliferation induzieren (Wajant et al., 2003). In den folgenden Abschnitten werden die für die Studie relevanten Liganden und ihre Signalwege genauer beschrieben.

Tab.1 TNF-Liganden und ihre TNF-Rezeptoren (Bodmer et al. 2002)

TNF-Liganden	TNF-Rezeptoren	
	Todesrezeptoren	Nicht-Todesrezeptoren
APRIL		BCMA, TACI
BAFF		BCMA, TACI, BAFF-R
CD27L		CD27
CD30L		CD30
CD40L		CD40
EDA-A1	EDAR	
EDA-A2		XEDAR
FasL	Fas	DcR3
GITRL		GITR
LIGHT		LTβR, HVEM, DcR3
LTα	TNFR1	LTβR, TNFR2, HVEM
LTα1β2		LTβR
OX40L		OX40
RANKL		RANK, OPG
TL1A	DR3	
TNF	TNFR1	TNFR2
TRAIL	TRAILR1/2	TRAILR3/4, OPG
TWEAK		Fn14
4-1BBL		4-1BB
-	NGFR	
?	DR6	
?		RELT
?		TROY

1.1.1 TNF-Rezeptor Superfamilie

Die Rezeptoren der TNF-Familie sind überwiegend Typ-1 Transmembranproteine. Die Ausnahmen bilden die Typ-3 Transmembranproteine XEDAR, BAFFR, BCMA und TACI sowie der GPI-verankerte TRAILR3 bzw. die löslichen Rezeptoren OPG (Osteoprotegerin) und DcR3 (*Decoy-Receptor 3*). Alle Rezeptoren der TNFR-Superfamilie besitzen eine bis sechs extrazellulär gelegene cysteinreiche Domänen (CRDs), welche u.a. die Bindung der Liganden an den Rezeptor ermöglichen (Bodmer et al., 2002; Locksley et al., 2001; MacEwan, 2002; Naismith and Sprang, 1998). Lösliche TNFR können auch durch Proteolyse (TNFR1, TNFR2, CD40, CD30, CD27) oder alternatives Spleißen des Exons, welches für die Transmembrandomäne kodiert (z.B. CD95 und 4-1BB) entstehen (Aderka, 1996; Gruss and Dower, 1995). Diese Moleküle können durch Ligand-Neutralisation auch inhibierend wirken (Hehlhans and Pfeffer, 2005). Die Liganden der TNF-Superfamilie bilden Trimere. Für einige der TNF-Rezeptoren, wie z.B. TNFR1, TNFR2 und CD40, wurde gezeigt, dass diese bereits vor der Ligandenbindung aufgrund der am N-Terminus vorhandenen "*pre-ligand assembly domain*" (PLAD), welche die erste CRD beinhaltet und die Aggregation von inaktiven Rezeptoroligomeren in der Plasmamembran vermittelt, di- oder trimerisieren können (Chan et al., 2000; Papoff et al., 1999; Siegel et al., 2000). Wenn es zu einer Ligand-Rezeptor-Interaktion kommt, führt dies zur Aktivierung dieser Rezeptorkomplexe. Es binden dann zytoplasmatische Adaptermoleküle an die intrazelluläre Domäne der TNF Rezeptoren, die dann kontextabhängig unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden auslösen. Bestimmte Rezeptoren wie z.B. TNFR1 können dabei sehr verschiedene und sogar gegensätzliche zelluläre Signalkaskaden induzieren (Hehlhans and Pfeffer, 2005). Entsprechend ihrer Struktur lassen sich die Mitglieder der TNFR-Superfamilie in drei Gruppen einteilen:

1) Todesrezeptoren (TNFR1, CD95, TRAILR1 und 2, DR3, DR6, EDAR und NGFR) mit einer konservierten Todesdomäne (*death domain*, DD) in ihrem intrazellulären Teil, wo sich verschiedene DD-tragende Adaptermoleküle anlagern und oft apoptotische Signalwege initiieren (Hehlhans and Pfeffer, 2005).

2) *Decoy*-Rezeptoren (DcR1, DcR3 und OPG) welche keine Signale weiterleiten, da sie keine funktionellen intrazellulären Domänen besitzen. Rezeptoren dieser Gruppe konkurrieren mit den signaltransduzierenden Rezeptoren um die Liganden und regulieren dadurch ihre Aktivität (Dempsey et al., 2003).

3) TRAF-bindende TNF-Rezeptoren, die mit Hilfe des TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor (TRAF)-interagierenden Motiv (TIMs) in ihrer zytoplasmatischen Domäne, TRAF-Proteine rekrutieren. Die Anlagerung von TRAFs an die TIM-Domäne dieser TNF-Rezeptoren initiiert Signaltransduktionswege die zur Aktivierung von verschiedenen MAPK-Kaskaden (*mitogen-activated protein kinase*) oder den NFκB-Signalwegen führt (Locksley et al., 2001)

1.1.2 TNF-Liganden Superfamilie

Mit Ausnahme von LT α (*Lymphotoxin-alpha*) handelt es sich bei den TNF-Liganden um Typ-2 Transmembranproteine, die aus einem kürzeren intrazellulären N-Terminus, einer Transmembrandomäne und einem längeren extrazellulären C-Terminus bestehen. Die membranständigen TNF-Liganden können durch proteolytische Spaltung mittels Metalloproteasen lösliche Formen bilden. Mit Ausnahmen des membranverankerten heterotrimeren LT α β 2-Liganden liegen alle löslichen oder membranständigen TNF-Liganden, als nicht-kovalent verbundene Trimere vor (Hehlhans and Pfeffer, 2005). Dieser trimere Aufbau wird durch die extrazellulär liegende konservierte "TNF-Homologe-Domäne" (THD) gewährleistet, die eine *jelly roll*-Topologie bildet und für die Bindung an die TNF-Rezeptoren verantwortlich ist (Bodmer et al., 2002; Fesik, 2000). Die Rezeptorspezifität entsteht durch die unterschiedliche extrazelluläre Struktur der Liganden. Zwischen der THD und der Transmembrandomäne liegt die *stalk*-Region, die Erkennungssequenzen für Proteasen z.B. für die Metalloprotease Matrylinin oder Furin besitzen, die die membranständigen Proteine prozessieren und dadurch lösliche Liganden freisetzen (Bodmer et al., 2002). Bemerkenswert ist, dass membranständige trimere Liganden immer eine starke TNF-Rezeptoraktivierung auslösen. Im Gegensatz dazu können lösliche trimere Liganden meist keine bzw. nur eine schwache Stimulation hervorrufen. Der CD95L hat z.B. in der membranständigen Form eine vielfach höhere Bioaktivität als in der löslichen Variante, obwohl der lösliche Ligand in der Lage ist seinen Rezeptor CD95 zu binden (Schneider et al., 1998). Eine Ausnahme bilden z.B. TNF- α , LT α und TL1A die sowohl als membranständiges als auch als lösliches Molekül in der Lage sind TNFR1 bzw. DR3 zu aktivieren (Grell et al., 1995; Migone et al., 2002; Wajant et al., 2003). Durch Liganden-Oligomerisierung kann eine massive Aktivitätsverstärkung der ansonsten inaktiven löslichen trimeren Liganden herbeigeführt werden. Durch die kovalente Vernetzung der THDs des CD95L mit der Fc-Domäne des humanen Immunglobulins G1 entsteht z.B. ein CD95L-Hexamer, das den CD95-Rezeptor aktiviert und Apoptose induziert (Holler et al., 2003). Lösliche, inaktive TNF-Liganden können folglich in aktive Formen überführt werden, welche für therapeutische Zwecke von Nutzen sein könnten (Muller et al., 2008; Roos et al., 2010; Wyzgol et al., 2009).

1.2 Das CD27/CD70-System

1.2.1 CD27 (*Cluster of differentiation 27*)

Der CD27 (TNFRSF7) ist ein Mitglied der TNFR-Superfamilie und ein Typ-1 Transmembranglykoprotein von 55 kDa. Im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren der TNFR-Superfamilie, die nicht kovalent miteinander verbunden sind, wird CD27 als ein Disulfid-gebundenes Homodimer exprimiert. Der Lymphozyten-spezifische TNFR CD27 wird vorwiegend von ruhenden und aktivierten T-Zellen, jedoch auch von medullären Thymozyten, natürlichen Killerzellen (NK) und Subpopulationen humaner B-Zellen exprimiert. So wurde der CD27 als ein Marker für B-Gedächtniszellen identifiziert (Agematsu et al., 1997; Klein et al., 1998). Die Membranexpression sowie das Schneiden von CD27 zur löslichen Molekülform (sCD27; 32 kDa) ist nach der T-Zellaktivierung über den TCR/CD3-Komplex oder das CD2-Molekül stark erhöht, wird aber im Gegensatz dazu durch Phorbol ester deutlich herunterreguliert (Literatur R de Jong). Der Ligand für CD27 ist CD70/CD27L und wird für die Aufrechterhaltung der T-Zellimmunität benötigt (Bowman et al., 1994; Goodwin et al., 1993; Hintzen et al., 1994). CD27 spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen sowie als kostimulatorisches Signal für die T-Zellaktivierung (Nolte et al., 2005). CD27 wurde mit verschiedenen Typen von Autoimmunstörungen und bestimmten B-Zell-Tumoren in Verbindung gebracht (Yamamoto et al., 1998). Der zytoplasmatische Teil von CD27 ist relativ kurz und hat keine DD. Jedoch kann das Protein SIVA, ein proapoptotisches Protein mit DD-homologer Region, an die zytoplasmatische CD27-Domäne binden, was eine wichtige Rolle in der Apoptoseinduktion, die gelegentlich durch CD27 induziert wird, impliziert. Dennoch sind die weiteren Ereignisse von diesem apoptotischen Signalweg weitestgehend unbekannt.

1.2.2 CD70 (CD27L)

CD70/CD27L (TNFSF7) ist wie die meisten TNF-Liganden ein trimeres Typ-2 Transmembranprotein und der einzige Ligand für den CD27-Rezeptor. Die CD70-Expression ist auf Subpopulationen aktivierter T- und B-Lymphozyten sowie auf reife dendritische Zellen (DCs) begrenzt und spielt eine wichtige Rolle als Kostimulus in der Aktivierung von B-, T- und NK-Zellen, sowie in der Proliferationsstimulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten (Denoeud and Moser, 2011; Nolte et al., 2009). Die CD70-CD27-Interaktion ist weiterhin für die Initiierung der Effektorfunktionen, Differenzierung und Gedächtnisformation von T- und B-Zellen wichtig. Es wird eine enge Kontrolle der CD70-Expression benötigt um eine letale

Immunaktivierung zu verhindern. CD70 auf aktivierten T-Zellen interagiert mit CD27 auf B-Gedächtniszellen und fördert die Generierung von Plasmazellen, obwohl es einige Hinweise in CD70⁺-Zellen gibt, dass CD70 selbst eine direkte intrazelluläre Signalübertragung als Antwort auf die CD27-Bindung vermittelt (*reverse signaling*) (Lens et al., 1999). Die große Mehrzahl CD70-vermittelter Effekte basiert jedoch auf der Aktivierung von CD27-assoziierten Signalwegen.

CD70 wird auch häufig sehr stark von einer Anzahl von Lymphomen exprimiert und oft auch von soliden Tumoren (ca. 30%), speziell Nieren-, Pankreas-, Kehlkopf-, Ovarien- und Colon-Karzinomen, sowie Glioblastomen und Melanomen (Diegmann et al., 2005; Junker et al., 2005; Ryan et al., 2010; Wischhusen et al., 2002). CD70 wurde als ein diagnostischer Biomarker für das Nierenzellkarzinom identifiziert. Jedoch muss noch die Funktion dieses Proteins in der Tumorgenese und als diagnostischer Marker in Serum und Urin oder als therapeutisches Mittel, in weiteren Studien erforscht werden (Diegmann et al., 2005; Junker et al., 2005). Das limitierte Expressionsmuster von CD70 in normalen Geweben und seine breite Expression in verschiedenen Malignomen machen es zu einem attraktiven Ziel für Antikörper-basierte Therapeutika. So wurde präklinisch gezeigt, dass Ovarien- und Pankreas-Tumorzelllinien ein hohes Level an endogenem CD70 exprimieren und für die Antitumoraktivität von Auristatin(hemmt Zellteilung und Tubulin-Polymerisation)-gekoppelten anti-CD70 Antikörpern (z.B. SGN-75) empfindlich sind (Ryan et al., 2010). CD70-positive humane Gliomazellen induzierten weiterhin CD70-abhängig Apoptose in peripheren Blutmononukleären-Zellen (PBMCs). Die Neutralisierung des CD70-Moleküls auf CD70⁺-Gliomazellen verhindert die Apoptose und verstärkt die Freisetzung von TNF- α in Kokulturen von Gliomazellen und PBMCs. Auch das CD27-*shedding* von PBMCs wurde als ein möglicher Schutzmechanismus vor Gliomazell-induziertem CD70-abhängigen Zelltod identifiziert (Wischhusen et al., 2002). Die Gründe und die funktionelle Relevanz der CD70-Expression in transformierten Zellen sind aber bislang insgesamt noch wenig verstanden und könnten sich von Fall zu Fall unterscheiden.

1.2.2.1 CD70 und klinische Anwendung

Auf den ersten Blick erscheint die Expression von CD70 auf Tumorzellen nicht schlüssig, da sie in einer verstärkten Antigenizität des Tumors resultieren sollte. In der Tat wurde in Tiermodellen gefunden, dass die Behandlung mit agonistischen CD27-Antikörpern oder Vaccinia-Virus-exprimierendem CD70 die Antitumor-T-Zell-Antwort verstärkt (French et al., 2007; Lorenz et al., 1999; Nieland et al., 1998; Roberts et al., 2010). In diesen Studien wurde gezeigt, dass agonistische CD27 monoklonale Antikörper (mAk) ein vielversprechendes

Mittel für das *boosting* der Antitumor-T-Zellimmunität liefert und die Aufrechterhaltung von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen unterstützen sowie inflammatorische CD4⁺ T-Zellen stimulieren, die innerhalb der Tumore normalerweise erniedrigt sind (French et al., 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass CD70-sekretierende Tumorzellen eine verstärkte Antitumor-Immunantwort induzieren (Cormary et al., 2004; Miller et al., 2010). So wurde gefunden, dass lösliche humane CD70-Moleküle eine T-Zell-vermittelte Inhibierung des Tumorwachstums induzieren können und ein protektives Antitumorgedächtnis bildet (Cormary et al., 2004). Lösliches CD70 kann auch eine starke Antiglioma-Immunantwort induzieren und könnte deshalb ein Medikament für zukünftige Immuntherapien gegen Glioblastome sein (Miller et al., 2010). Zudem erscheinen in Situationen von persistierenden CD70-Expressionen auch immuninhibitorische Effekte durch Erschöpfung des T-Zell Pools möglich. Weitere Studien zeigten, dass CD27-Aktivierung in Tregs (regulatorischen T-Zellen) durch Tumorzell-exprimiertes CD70, deren Anzahl im Tumor erhöht und so das Tumorwachstum fördern kann (Claus et al., 2012; van Gisbergen et al., 2009). Unabhängig von seiner konkreten Funktion im Tumor stellt das CD70-Antigen ein exzellentes Ziel für therapeutische Antikörper dar. Deshalb ist es auch keine Überraschung, dass CD70-spezifische Antikörper in präklinischen und klinischen Studien erforscht werden, um Autoimmunkrankheiten und Krebs zu behandeln (<http://clinicaltrials.gov/>). Mit toxischen Medikamenten konjugierte als auch unkonjugierte CD70-Antikörper wurden in Tiermodellen mit humanen Tumoren getestet. Es zeigte sich, dass humanisierte anti-CD70-Antikörper signifikante Antitumoraktivität in präklinischen *Xenograft* Tumormodellen haben (Grewal, 2008). Zwei Konzepte zum CD70-*targeting* in Tumoren sind von Bedeutung. Erstens, die ziemlich gut etablierte und bereits in klinischen Experimenten betrachtete Idee, CD70 als ein Tumormarker zur direkten ADCC(*antibody dependent cellular cytotoxicity*)-Induktion bzw. zum Targeting von an Antikörper konjugierte Medikamente an maligne Zellen zu nutzen. Zweitens, die relativ neue Strategie, mögliche immuninhibitorischen Effekte von Tumorzell-exprimiertem CD70 zu blockieren. Obwohl letzteres Ziel auch über ADCC-vermittelte Tumorzellzerstörung erzielt werden könnte, können CD70-blockierende Antikörper diesen Effekt auch mit geringerer Konzentration hervorrufen und dadurch den inhibitorischen Effekt von engogenem Serum IgG oder ADCC-inhibitorischen Signalen kompensieren.

1.2.3 CD27-assoziierte Signalwege

Bei normalen Immunantworten scheint die CD27-Signaltransduktion überwiegend dadurch limitiert zu werden, dass CD70 nur transient exprimiert wird. Die CD27-Stimulation kann zum einen in der Rekrutierung von SIVA resultieren, einem wenig untersuchten Apoptose regulierenden Molekül, dass caspaseabhängig Apoptose induziert, zum anderen aber vor

allem zur Bindung der E3-Ligasen TRAF2 und TRAF5 führt, die die Aktivierung von NF- κ B und MAPK8/JNK vermitteln (Abb. 1) (Akiba et al., 1998; Gravestein et al., 1998; Prasad et al., 1997; Yamamoto et al., 1998). In Übereinstimmung mit der etablierten Rolle von TRAF2 und TRAF5 im NF κ B-Signalweg resultiert die CD27-CD70-Interaktion in einer verstärkten Aktivierung des klassischen und alternativen NF κ B-Signalwegs, was sowohl das Zellüberleben, die Aktivierung als auch die Differenzierung von T-Zellen zur Folge haben kann (Gerondakis et al., 2012; Ramakrishnan et al., 2004). Die starken CD27-CD70 induzierten Signale vermitteln eine robuste TH1/TC1-Effektorzellantwort, inklusive der Produktion von IFN- γ und TNF. Wenn diese Zytokine in zu großen Mengen produziert werden, kann ihre Induktion zur Zerstörung der lymphoiden Organe und Schwächung der B-Zell-Aktivierung führen. Folglich führt das zu einer verminderten Antikörper-Produktion und zur Verhinderung einer effizienten Eliminierung von Pathogenen. Somit können sich starke Effektor-T-Zell-Reaktionen und protektive antivirale Antikörper-Antworten gegenseitig ausschließen. Für die Regulierung der zellulären Immunantwort ist deshalb eine optimale Anpassung einer CD27-CD70-Interaktion wichtig.

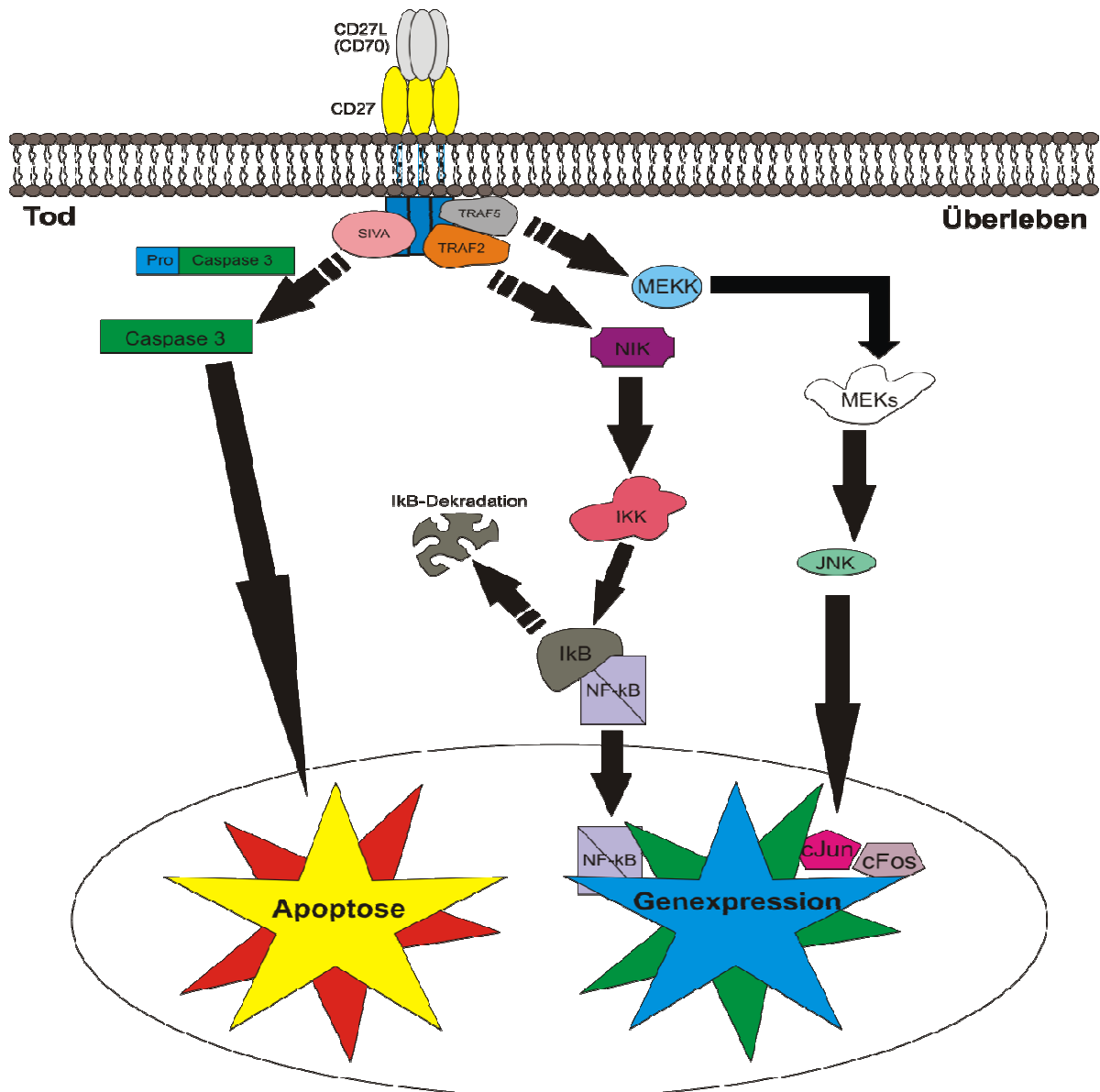


Abb.1 CD70-CD27 vermittelte Signalwege. Bindung von CD70 an CD27 rekrutiert die Adapterproteine TRAF2 und TRAF5, welche Kinasen aktivieren, die den NFκB- und den JNK-Signalweg aktivieren. Hierdurch werden Differenzierung, Proliferation, Vitalität und die Zytokin-Produktion stimuliert. CD27 bindet aber auch das proapoptotische Protein SIVA und induziert so Apoptose.

1.3 Das TRAIL/TRAILR-System

1.3.1 TRAIL (*Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand*)

TRAIL (TNFSF10) ist ein Ligand der TNF-Superfamilie und wurde als ein Typ-2 Transmembranprotein identifiziert, das eine hohe Homologie zu anderen Mitgliedern der TNF-Familie, insbesondere zu FasL/CD95L besitzt. TRAIL formt ein Homotrimer, das durch den Kofaktor Zink²⁺ im Zentrum des trimeren Moleküls, stabilisiert wird. Wie andere TNF-Liganden wird auch TRAIL als membrangebundenes trimeres Protein exprimiert, das proteolytisch als lösliches Molekül freigesetzt werden kann. TRAIL wird meist von Monozyten und B-Lymphozyten exprimiert, aber man findet es auch in vielen Geweben und besonders konzentriert in der Lunge, der Milz und der Prostata. TRAIL ist ein für das Immunsystem wichtiges Protein das Zellen inaktiviert, indem es potent Apoptose in Zielzellen auslöst. In der Tumorthherapie besteht daher ein beträchtliches Interesse für die Anwendung von TRAIL als effektives Krebstherapeutikum (Dimberg et al., 2013; Johnstone et al., 2008). TRAIL spielt vermutlich auch eine Rolle bei der Autophagozytose von Zellen und bei der Bildung von Geweben (Mills et al., 2004). Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie kann TRAIL Tumorzellen in Apoptose führen wohingegen "normale" Zellen verschont bleiben (Ashkenazi et al., 1999; Chinnaiyan et al., 2000; Gura, 1997; Wajant et al., 2002) mit Ausnahme von z.B. Hepatozyten und Thymozyten (Corazza et al., 2004; Zheng et al., 2004). Es gibt mehrere Gründe warum untransformierte Zellen vor der TRAIL-induzierten Apoptose geschützt sind, während viele entartete Zellen TRAIL-sensitiv sind. Zum einem kann die TRAIL-Apoptoseresistenz in vielen Fällen bei "normalen", untransformierten Zellen auf die Überexpression der TRAIL *Decoy*-Rezeptoren DcR1 und DcR2, welche die Zellen vor der TRAIL-Bindung an die TRAIL-Todesrezeptoren schützt, zurückgeführt werden (Degli-Esposti et al., 1997; LeBlanc and Ashkenazi, 2003; Morizot et al., 2011; Sheridan et al., 1997). Zum anderen spielen die antiapoptotischen Proteine cFLIP, IAPs und Bcl-2 die in normalen Zellen oft stark exprimiert sind, eine entscheidende Rolle. cFLIP (*cellular FLICE(FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-like inhibitory protein*) blockiert die FADD assoziierte Caspase-8 Reifung und unterbindet dadurch die Apoptosekaskade auf dem Level des Rezeptors (Irmeler et al., 1997; Safa and Pollok, 2011). Bcl-2 (*anti-apoptotic B-cell lymphoma 2*) hingegen blockiert das Caspase-8-prozessierte tBID, wodurch die Aktivierung des mitochondrialen Amplifikationsloop ausbleibt und die Zelle so vor Apoptose geschützt ist (Fulda et al., 2002; Hinz et al., 2000). Die Apoptose Inhibitoren der IAP(*inhibitor of apoptosis protein*) Familie wie XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*), c-IAP1/2 und Survivin, blockieren weiterhin die Aktivierung von Effektorcaspasen sowie deren Aktivität (Schimmer et al., 2004). Diese antiapoptotischen Proteine sind unabhängig voneinander fähig die

TRAIL-induzierte Apoptose zu inhibieren. Eine Defizienz von nur einem von diesen Proteinen reicht nicht aus, um eine TRAIL-Sensitivität auszulösen. Dieses Erkenntnis zeigt, dass in untransformierten Zellen multiple *Pathways* die TRAIL-Resistenz kontrollieren (van Dijk et al., 2013). Im Gegensatz zeigte sich, dass die meisten TRAIL-resistenten Zelllinien oft nur ein antiapoptotisches Protein in einem höheren Level exprimieren hingegen die anderen antiapoptotische Proteine meist herunterreguliert sind. Die Inhibition des überexprimierten Proteins z.B. Bcl-2 in diesen Tumorzellen ist daher oft ausreichend um die TRAIL-Sensitivität zu triggern (Li et al., 2011; Zhang et al., 2012). Im Menschen interagiert TRAIL mit dem löslichen OPG (Osteoprotegerin) und vier Membranrezeptoren: den Todesrezeptoren TRAILR1 und TRAILR2 und den sogenannten *Decoy*-Rezeptoren TRAILR3 und TRAILR4. TRAIL wird von einigen Viren und Bakterien dazu benutzt, die T-Lymphozyten-Antwort gegen infizierte Zellen zu inhibieren. Sie bringen Zellen dazu, TRAIL zu produzieren, dass dann Apoptose in T-Zellen induziert, welche ansonsten infizierte Zellen angreifen würden. So entgehen die Krankheitserreger wie z.B. das Influenza A/H5N1-, HI-, Herpes Simplex- und Masernvirus oder *Staphylococcus aureus* und *Salmonella enterica* teilweise dem T-Zell-basierten Immunsystem. Lösliches TRAIL ist auch ein trimeres Molekül das an TRAIL-Rezeptoren bindet, ist aber im Gegensatz zu dem membrangebundenen Molekül, trotz Rezeptorbindung, kaum aktiv (Kelley et al., 2005; Wajant et al., 2001). Die schwache Empfindlichkeit von TRAIL-Todesrezeptoren (hauptsächlich TRAILR2) gegenüber löslichen TRAIL-Trimeren, kann auf zwei Wegen behoben werden. Zum einen über Oligomerisierung von zwei oder mehr TRAIL-Trimeren, zum anderen über die artifizielle Zelloberflächenimmobilisierung von TRAIL-Trimeren, z.B. über das Fusionieren von löslichem TRAIL mit einem *single chain variable fragment* (scFv) gegen ein zelloberflächen exponiertes Antigen (Wajant et al., 2013). Bemerkenswert ist, dass das letzte Prinzip nicht nur eine starke TRAIL-Todesrezeptor-Aktivierung erlaubt, sondern diese Aktivierung auch von der Zelloberflächen-Antigenbindung abhängig ist.

1.3.1.1 TRAIL in der klinischen Anwendung

Dulanermin, eine rekombinante Form von löslichem TRAIL, zeigte in klinischer Anwendung ein gutes sowie sicheres Profil, aber leider auch eine sehr schwache Antitumoraktivität (Dimberg et al., 2013; Hellwig and Rehm, 2012). Vor dem Hintergrund der limitierten Aktivität von löslichem TRAIL, erscheint es in der Tat unwahrscheinlich, dass Dulanermin die volle Apoptose-induzierte Kapazität der TRAIL-Todesrezeptoren stimulieren kann. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich mit TRAILR1- und TRAILR2-Antikörpern (Drozitumab, agonistischer TRAILR2-Antikörper), welche eine Oligomerisierung oder Bindung an Fcγ-Rezeptoren (FcγRs) benötigen, um ihre agonistische Aktivität maximal zu entfalten (Jin et al., 2008; Li

and Ravetch, 2012; Natoni et al., 2007; Wilson et al., 2011; Yada et al., 2008; Zinonos et al., 2009). Eine Ausnahme bilden agonistische TRAILR1-Antikörper wie Mapatumumab (HGS-ETR1), die keine Quervernetzung benötigen. Ein agonistischer TRAILR2-Antikörper (Apomab) in Verbindung mit Chemotherapie resultiert in einer signifikanten Inhibition des Tumorwachstums und verbessert die Überlebenszeit von Lungenkrebspatienten, sowie die Entwicklung und Progression von Brustkrebspatienten (Jin et al., 2008; Zinonos et al., 2009). Ein neuer humanisierter anti-hTRAILR2-Antikörper CS-1008 induziert Apoptose in Tumorzellen, aber nicht in Hepatozyten (Yada et al., 2008). Todesrezeptor-Antikörper benötigen für ihre volle apoptotische Antitumoraktivität die Bindung an Fcγ-Rezeptoren (Li and Ravetch, 2012). Hierbei ist *in vivo* hauptsächlich der FcγRIIb von Bedeutung (Natoni et al., 2007; Zinonos et al., 2009). Der Grund für die dominante Rolle von FcγRIIb *in vivo* basiert wahrscheinlich auf seinem höheren Expressionslevel verglichen zu anderen FcγRs. Im Moment werden verschiedene TRAILR1/2-Antikörper klinisch evaluiert (Conatumumab, Mapatumumab, Tigatuzumab, PRO957890, CS-1008). Jedoch sind sie vom IgG1-Isotyp, welcher nur eine sehr schwache Affinität für den FcγRIIb aufweist. Wahrscheinlich ist deshalb auch die Fähigkeit dieser Antikörper, das TRAIL-Todesrezeptor *signaling* in Patienten zu vermitteln schwächer.

1.3.2 TRAIL-Rezeptoren (*TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors*)

TRAIL-Rezeptoren besitzen wie alle Mitglieder der TNF-Rezeptorsuperfamilie (TNFRSF), zwei bis sechs cysteinreiche *repeats* in ihrer extrazellulären Region. TRAILR1 wird gering von aktivierten T-Zellen und einigen Tumoren exprimiert. TRAILR2 wird hingegen in vielen Zelltypen und humanen Geweben wie Herz, Leber, Pankreas, Milz, Thymus, Prostata, Ovarien, Testis und durchgehend im Intestinaltrakt sowie hauptsächlich von Lymphozyten bzw. aktivierten T-Lymphozyten exprimiert. Vorallem wird TRAILR2 sehr stark von vielen Tumoren exprimiert. Studien in humanen Zellen zeigten, dass die TRAILR2-Expression unter anderem über Interferon-α hochreguliert (in Monozyten/Makrophagen) und über adenovirale E3-Proteine herunterreguliert wird. Die TRAILR2-Expression wird aber auch über den Tumorsuppressor p53 induziert (Wu et al., 1997). Die Todesdomäne-enthaltenden Rezeptoren TRAILR1 und TRAILR2 induzieren Apoptose in vielen transformierten Zelllinien, jedoch nicht im "gesunden" Gewebe. Der Prozess der Apoptose ist Caspase-8-abhängig, welche nachgeschaltete Effektorcaspasen inklusive Procaspase-3, -6, und -7 aktiviert und Apoptose induziert. Studien mit FADD(*Fas-Associated protein with Death Domain*)-defizienten Mäuse zeigen, dass das Todesdomäne-enthaltende Adapterprotein FADD zur Apoptosevermittlung über TRAILR1 und TRAILR2 benötigt wird (Kuang et al., 2000). Biochemische Experimente zeigten entsprechend die Rekrutierung des intrazellulären

Adapterproteins FADD (Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne) an die DD der TRAIL-Todesrezeptoren. Im Anschluß rekrutiert FADD durch seine Todeseffektordomäne (DED, *death effector domain*) die proapoptotischen Initiatorcaspasen Procaspase-8 bzw. -10 an den aktivierten Rezeptor und formt den so genannten DISC. Die räumliche Nähe der Procaspasen-8 bzw. Procaspasen-10 innerhalb des DISC, führt zu deren autokatalytischen Prozessierung in eine kleine und große Untereinheit (UE), welche Heterotetramere (2 große und 2 kleine UE) bilden und die aktive Caspase-Form darstellt. Die nun aktiven Initiatorcaspasen Caspase-8/10 werden ins Cytosol freigesetzt und schneiden an internen Asp-Resten ihre Substrate wie die Effektorcaspase Procaspase-3. Die aktive Caspase-3 schneidet und degradiert daraufhin eine Vielzahl von regulatorischen Proteinen und löst dadurch den Zelltod aus (Abb. 2). Weitere Studien zeigten, dass beim TRAIL-induzierten Zelltod der TRAILR2 aktiver ist als der TRAILR1 (Kelley et al., 2005). Desweiteren wurde gezeigt, dass TRAILR1 mit DAP3 (*death associated protein 3*) (Miyazaki and Reed, 2001) und TRAILR2 mit TRADD (*TNFR1 associated death domain protein*) bzw. RIPK1 (*Receptor-interacting-protein kinase 1*) interagiert. Zudem kann aber auch eine Heterokomplexbildung zwischen TRAILR1 und TRAILR2 stattfinden und dadurch das TRAIL-signaling auslösen (Clancy et al., 2005; Lee et al., 2005). Die Beiden "Köderrezeptoren" TRAILR3 und TRAILR4 werden wie TRAILR1/2 in vielen normalen Geweben wie Milz, Ovarien, Skelettmuskeln, Testis, Thymus, Intestinaltrakt, Prostata, Lunge, Herz sowie peripheren Blutlymphozyten exprimiert. Interessanterweise werden sie sehr gering in Tumorzelllinien exprimiert, was die Sensitivität von Krebszellen auf die TRAIL-induzierte Apoptose teilweise erklären könnte (LeBlanc and Ashkenazi, 2003; Pan et al., 1997). Der TRAILR3 fungiert als TRAIL-neutralisierender *Decoy*-Rezeptor und ist durch eine Glycosylphosphatidylinositol-Verankerung (GPI-Verankerung) an die Zelloberfläche gebunden. Er besitzt keine intrazelluläre Domäne und ist demnach nicht in der Lage intrazelluläre Signalwege zu induzieren. TRAILR4 hingegen besitzt eine Transmembrandomäne, aber auch nur eine verkürzte zytoplasmatische Todesdomäne, die keine Apoptose induzieren kann, aber die Möglichkeit besitzt Zelltod-unabhängige Signalwege wie z.B. NFκB zu induzieren (Lit. Degli 2007). Demnach sind beide *Decoy*-Rezeptoren TRAILR3/4 nicht fähig, die Caspasekaskade zu aktivieren und konkurrieren mit den Todesrezeptoren TRAILR1/2 um die TRAIL-Bindung. Zusätzlich kann der lösliche aber nieder affine TRAIL-Rezeptor OPG (Osteoprotegerin) der den RANK-Liganden blockieren und so die Osteoklastogenese inhibieren kann, TRAIL binden (Chamoux et al., 2008; Simonet et al., 1997; Vitovski et al., 2007). Im Gegensatz zum Menschen gibt es in der Maus nur einen membranständigen TRAIL-Rezeptor, welcher die höchste Homologie mit dem humanen TRAILR2 hat (Wu et al., 1999). Die murinen *Decoy*-Rezeptoren teilen weniger Homologie mit den humanen und haben keine intrazelluläre Domäne (Schneider et al., 2003).

1.3.3 Apoptose

Apoptose ist eine Form des kontrollierten Zelltods, der im Gegensatz zur Nekrose, ohne die Freisetzung von Zellinhalt abläuft, wodurch keine Entzündungsreaktion und Schädigung des Nachbargewebes entsteht. Sie wird für die Aufrechterhaltung der Zell-Homöostase, der embryonalen Entwicklung und für die Differenzierung sowie Funktion von hämatopoetischen und lymphoiden Zellen benötigt. Die Apoptose kann von außen angeregt (etwa durch Immunzellen) oder aufgrund zellinterner Prozesse (etwa nach starker Schädigung der Erbinformation) ausgelöst werden. Im Unterschied zu anderen Formen des programmierten Zelltods spielen bei der Apoptose proteolytische Enzyme, sogenannte Caspasen, eine zentrale Rolle (Bohm and Schild, 2003). Alle Caspasen werden in tierischen Zellen als inaktive Procaspase synthetisiert und können durch ihre proteolytische Prozessierung an den konservierten Aspartat-Resten aktiviert werden. Die Caspasen der sogenannten Initiatorcaspase-Subgruppe, z.B. Caspase-8 und Caspase-10, besitzen eine Prodomäne, die Protein-Protein-Interaktionsdomänen beinhalten und können durch Bindung an Adaptorproteine (z.B. FADD) oligomerisiert und dadurch ohne Prozessierung durch Dimerisierung aktiviert werden. Die Caspase-8 ist die dominante rezeptoraktivierte Caspase. Caspase-10 hingegen wirkt sowohl im TRAIL- als auch im Fas-Rezeptorweg und kann Caspase-8 funktionell komplementieren (Kischkel et al., 2001). Die Initiatorcaspasen schneiden an internen Asp-Resten der Effektorcaspasen, z.B. Caspase-3, separieren dadurch die große (p20) und kleine (p10) Untereinheiten und induzieren so die Bildung eines heterotetrameren Moleküls. Caspasen-Aktivierung tritt bei einem extrinsischen oder intrinsischen Todessignal auf. Beide Signalwege konvergieren auf der Ebene der Aktivierung von Effektorcaspasen, benötigen jedoch verschiedene Initiatorcaspasen, um den Prozess zu starten. Ein Ziel der Krebsforschung ist es, kontrolliert Apoptose bei entarteten Zellen auszulösen. Doch auch die Krebszellen nutzen den Apoptosemechanismus, um menschliche Abwehrzellen, z.B. tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs) auszuschalten. Es werden zwei Mechanismen der Apoptose unterschieden:

1) Apoptose die durch externe Signale, d.h. Liganden, induziert wird (extrinsische Apoptose). Dieser Apoptosetyp wird z.B. durch den Fas-Rezeptor, den TNFR1, sowie TRAILR1/2 induziert und verläuft wie bereits dargelegt über die Aktivierung von Caspase-8. Die aktivierte Caspase-8 stimuliert Apoptose über zwei parallele Kaskaden: erstens aktiviert sie wie oben beschrieben, proteolytisch die Effektorcaspase Caspase-3, diese wiederum die Exekutionsphase der Apoptose initiiert. Zweitens spaltet das proapoptotische Bcl-2 Familienprotein BID (*BH3 Interacting Death Domain*) zum verkürzten tBID, welches ins Mitochondrium transloziert und Bax/Bak aus der Bindung mit Bcl-2/Bcl-xL verdrängt und

dadurch aktiviert was zur zusätzlichen Stimulation des intrinsischen Signalwegs (s.u.) führt (Abb.2).

2) Apoptose durch interne Signale (intrinsische Signale). Diese Form des Zelltods wird durch mitochondriale Mediatoren, die die Bildung des sogenannten Apoptosoms auslösen stimuliert. Die Freisetzung der mitochondriale Apoptose induzierenden Faktoren wird durch Bax (*Bcl-2-associated X protein*) und Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) ausgelöst, die in die äußere Mitochondrienmembran inserieren können, dort Kanäle bilden durch die dann Cytochrom c und SMAC/DIABLO sowie weitere proapoptotische Proteine in das Cytosol gelangen (Du et al., 2000; Jurgensmeier et al., 1998). Das freigesetzte Cytochrom c bindet über seine WD40-Domäne an das zytoplasmatische Protein APAF-1 (*apoptotic Protease Activating Faktor 1*), welches eine Konformationsänderung erfährt so dass dessen CARD-Domäne (Caspase-Rekrutierungs-Domäne, *Caspase activation and recruitment domain*) exponiert wird, an die wiederum die Initiatorcaspase Procaspase-9 rekrutiert wird. In dem so gebildeten Proteinkomplex, der Apotosomen genannt wird, kommt es zur Bildung aktiver Caspase-9-Dimeren (Hu et al., 1999; Saleh et al., 1999). Diese aktive Caspase-9 kann durch Proteolyse wiederum die *downstream* Effektorcaspasen-3, -6 und -7 aktivieren, welche intrazelluläre Substrate schneiden und die Exekution der Apoptose bewerkstelligen (Abb. 2) (Nicholson, 1999). Wichtig ist weiterhin, dass das aus dem Mitochondrium freigesetzte SMAC/DIABLO das antiapoptotische XIAP-Molekül inhibiert, das seinerseits die Effektorcaspasen inhibiert sowie andere Protease-Systeme und Endonukleasen aktivieren (Chai et al., 2000; Liu et al., 2000; Nunez et al., 1998; Srinivasula et al., 2000; Wu et al., 2000). Hierdurch wird die irreversible Zerstörung der Zelle eingeleitet. Die Aktivierung von Procaspase-8 oder -10 im DISC kann aber auch über c-FLIP (*cellular FLICE-inhibitory protein*) antagonisiert werden (Tschopp et al., 1999). Ein *knockdown* von c-FLIP führt zur Anreicherung von DISC-Komplexen und nachfolgender Aktivierung und Prozessierung von Caspase-8, welche die Effektor-Caspasen-Stimulation bzw. Apoptose verstärkt (Bijangi-Vishehsaraei et al., 2010; Seo et al., 2013).

1.3.3.1 Typ-1- versus Typ-2-Zellen

Die Todeszezeptor-induzierte Caspase-8 Aktivität unterscheidet sich in vielen Zelllinien. In einigen Zellen deklariert mit Typ-1 Zellen, fördert die Procaspase-8 Aktivierung am DISC, direkt die Aktivierung von Procaspase-3 und der Apoptose in einer mitochondrial-unabhängigen Weise (Scaffidi et al., 1998). Allerdings ist die direkte Spaltung von Caspase-3 für die Apoptoseinduktion in mehreren Zelllinien und Zelltypen ineffizient. In diesen sogenannten Typ-2 Zellen reicht die Caspase-8 vermittelte Aktivierung von Caspase-3 und

anderen Exekutionscaspasen nicht aus, um effektiv die Apoptose zu vermitteln. Deshalb wird ein Amplifikationsloop/Verstärkungsschleife des initialen DR-induzierten apoptotischen Signals (extrinsischer *Pathway*) durch den mitochondrialen Signalweg (intrinsischer *Pathway*) benötigt, um eine vollständige Apoptose auszulösen (Scaffidi et al., 1998). In diesen Typ-2 Zellen, wird die Verstärkung durch eine Caspase-8-abhängige Spaltung des proapoptotischen BH3-only Protein BID initiiert, was die nachgeschaltete mitochondriale Apoptose auslöst (Luo et al., 1998). In dieser Hinsicht kann auch die mitochondriale Verstärkung zur SMAC-Freigabe dienen um dadurch die IAPs nachgeschaltete Caspasen-Hemmung zu inhibieren (Sun et al., 2002). Vor dem Hintergrund werden somit Zellen klassifiziert in Typ-1 Zellen, welche unabhängig von dem mitochondrialen *Pathway* sind und Typ-2 Zellen, welche abhängig von dem mitochondrialen *Pathway* sind, um die vollständige Apoptose zu vermitteln (Maas et al., 2010). Interessanterweise spielt der Tumorsuppressor p53 eine entscheidende Rolle bei dem intrinsischen als auch dem extrinsischen Weg. Der TF p53 ist involviert bei verschiedenen Stressreaktionen (z.B. DNA-Schäden, Bestrahlung, oxidativen Stress nach Chemotherapie). p53 kann hierbei entweder den Zellzyklus über p21 und p27 inhibieren oder die Apoptose durch Aktivierung des intrinsischen Weges induzieren, dieser über die Hochregulierung einiger proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bax, PUMA und Noxa, aber auch durch Stimulation des extrinsischen *Pathways* durch Hochregulierung von TRAILR2, CD95 und CD95L, verläuft (Chandrasekaran and Richburg, 2005; Vogelstein and Kinzler, 2004; Yu and Zhang, 2005). Daher können Resistenzen gegenüber Chemotherapien oder Bestrahlungen vielleicht den Mutationen in p53 zugeschrieben sein, welche oft in Tumorzellen detektiert werden.

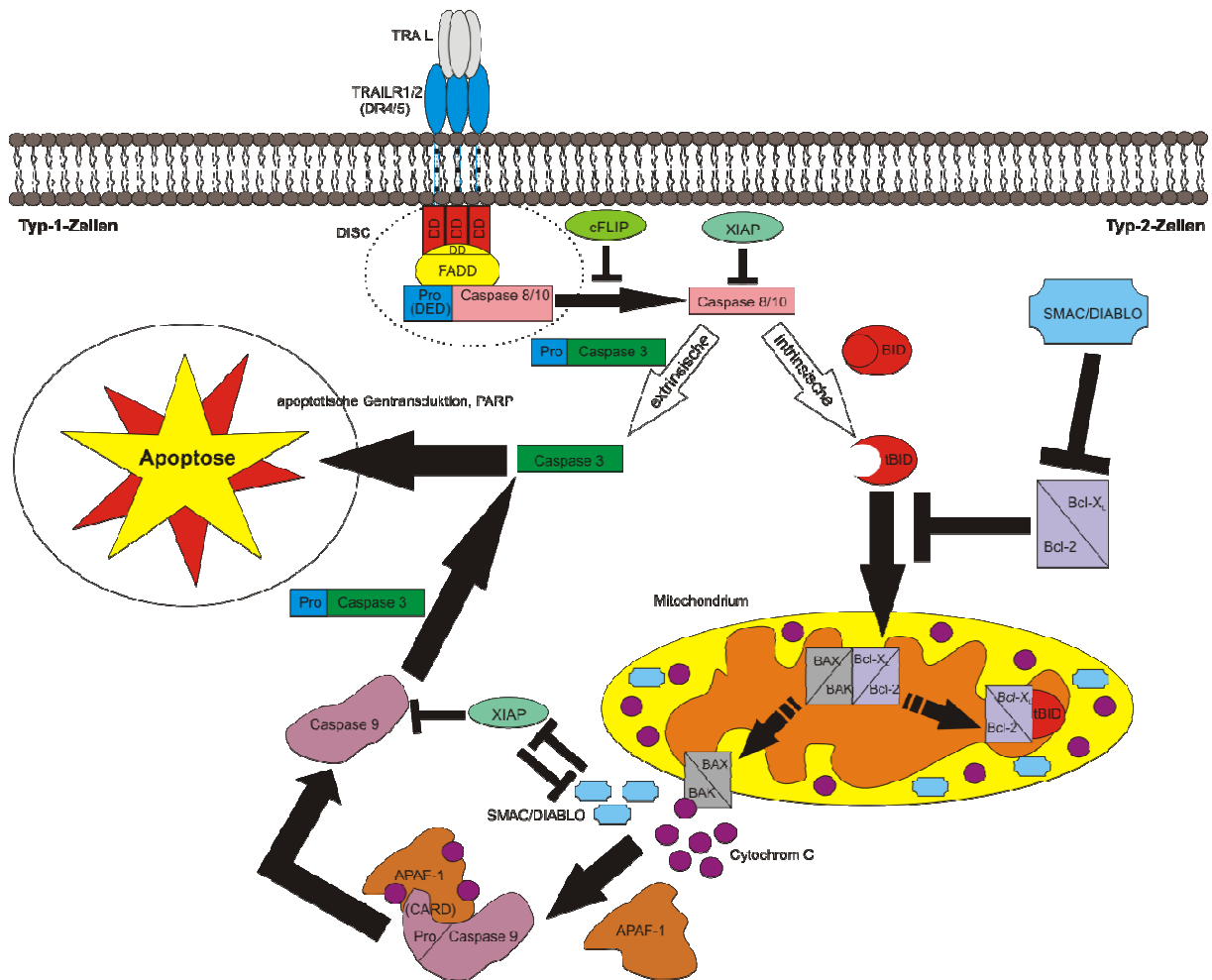


Abb.2 Mechanismus der TRAIL-Todesrezeptor-vermittelten Apoptose. Die Aktivierung von TRAIL-Todesrezeptoren über TRAIL führt zur Bildung eines DISC, der aus dem FADD Adapterprotein besteht, welches über die Todesdomänen in TRAILR1/2 rekrutiert wird. FADD stimuliert seinerseits die Rekrutierung von Procaspase-8 (Pro-C8) über die Todeseffektor-Domäne (DED) in Pro-C8, wodurch die Aktivierung von Pro-C8 zur aktiven Caspase-8 induziert wird. Anschließend aktiviert diese die Caspase-3 und BID, die die Exekutionsphase der Apoptose bewerkstelligen (weitere Details werden im obigen Text beschrieben)

1.4 Antikörper (Immunglobuline) und medizinische Anwendung

Antikörper sind spezifische globuläre Plasmaproteine des Immunsystems, die in höheren Wirbeltieren als Reaktion auf bestimmte Stoffe und Krankheitserreger (Antigene) von einer Subgruppe von B-Lymphozyten beim Antigenkontakt produziert bzw. sezerniert werden. Solche Antikörper produzierende B-Lymphozyten bezeichnet man dann als Effektorzellen bzw. Plasmazellen. Die Antikörper erkennen meist nicht die gesamte Struktur, sondern nur

einen bestimmten Teil des Antigens, die sogenannte antigene Determinante (Epitop). Jeder Antikörper besteht aus zwei identischen schweren Ketten (*heavy chains*, H) und zwei identischen leichten Ketten (*light chains*, L), die durch kovalente Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die leichten Ketten bestehen aus jeweils einer variablen (V_L) und einer konstanten (C_L) Domäne. Die schweren Ketten hingegen haben jeweils eine variable Immunglobulin(Ig)-Domäne (V_H) sowie 3-4 konstante (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , C_{H4}) Ig-Domänen, die den Fc(*crystallisable fragment*)-Teil des Antikörpers bilden. Die variablen Domänen einer leichten und einer schweren Kette bilden zusammen die Antigenbindungsstelle. Die Domäne C_{H3} ist die Fc-Rezeptor-Bindungsstelle für die Opsonierung. Die beiden leichten Ketten bilden zusammen mit dem oberhalb der Gelenkregion (*hinge region*) liegenden Anteil der schweren Ketten das antigenbindende Fragment *Fab* (*antigen-binding fragment*) (Abb. 3). Die ausgesprochene Variabilität und Spezifität der Antigenbindungsstellen (CDR, *Complementarity Determining Region*) erreicht der Organismus über die V(D)J-Rekombination. Zusammenfassend besteht ein Antikörper aus zwei strukturellen Teilen, dem variablen für die spezifische Antigenerkennung gegen Krankheitserreger (Mikroben wie Bakterien, Viren und Parasit- sowie Umweltantigenen) und ihren Produkten, sowie dem konstanten Fc-Teil, welcher Effektorzellen (z.B. Mastzellen) aktivieren kann und so z.B. die „*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*“ (ADCC) auslöst. Aus Tieren gewonnene (Antiseren) oder biotechnologisch hergestellte Antikörper können therapeutisch als passiver Impfstoff oder als spezifische monoklonale Antikörper in der Onkologie sowie zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis genutzt werden. Kurzlebige Radionuklid-gekoppelte Antikörper werden dazu verwendet Tumorzellen im Körper ausfindig zu machen. Früher war der konstante Teil der Antikörper noch murinen Ursprungs, was zu Neutralisationsreaktionen durch das Immunsystem des Patienten führen konnte. Heute werden Antikörper verwendet, deren konstante Teile von menschlichen Antikörpern angeleitet sind (*humanisierte Antikörper*).

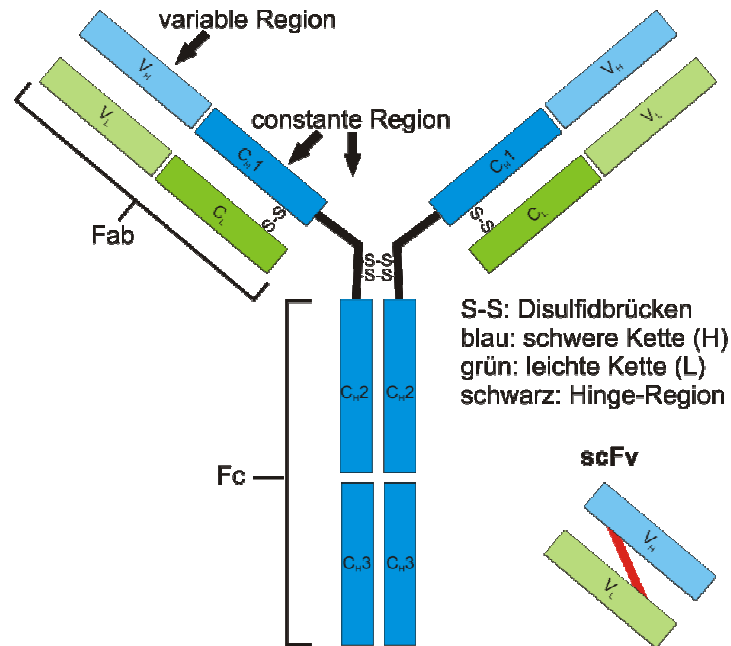


Abb.3 Schematische Darstellung eines IgG Antikörpers und ein davon abgeleitetes scFv-Fragment.

1.4.1 Herstellung monoklonaler- und scFv-Antikörper

Die Herstellung und Produktion von Antikörpern erfolgt über die Immunisierung von Wirbeltieren (Ziege, Mäuse, Ratten, Kaninchen, Lama, etc.) mit einem Antigen, das nahezu ein beliebiges Protein sein kann und zur Bildung von polyklonalen Antisera durch B-Zellen/Plasmazellen führt. Nun werden die B-Zellen/Plasmazellen meist aus Milz oder Lymphknoten entnommen. Da die Plasmazellen die Fähigkeit zur Zellteilung verloren haben, werden diese mit einer Tumorzelle verschmolzen. Die so entstandenen Zellhybriden erhalten von den Plasmazellen die Eigenschaft, einen bestimmten Antikörper zu produzieren und zu sezernieren, sowie von der Tumorzelle die Fähigkeit, sich teilen zu können. Durch eine Selektionsklonierung gewinnt man eine Zelllinie (Hybridom), die auf eine einzelne Plasmazelle zurückgeht und daher genau einen Antikörper produziert (d.h. monoklonal), welcher sich hinsichtlich seiner Eigenschaften (z.B. Bindungsstelle am Antigen, Stärke der Bindung etc.) genau definieren lässt. Die scFv-Fragmente (*single chain variable fragment*) sind gentechnisch hergestellte Antikörperfragmente, die die Antigen-erkennenden variablen Domänen der leichten und der schweren Kette eines klassischen Antikörpers kovalent verbinden. Beide variablen Domänen (V_L und V_H) werden über einen kurzen Linker, der in der Regel aus einer Folge der Aminosäure Glycin oder Serin besteht, miteinander verbunden. Diese scFv werden meist mit Fc-Einheiten verbunden, um wesentliche Effektorfunktionen initiieren zu können. Die scFv-Antikörper finden experimentelle

Anwendung in der Durchflusszytometrie und Immunhistochemie. Darüber hinaus werden einige scFv-Antikörper wie beispielsweise Pexelizumab und CC49-scFv, sowie ein bispezifischer scFv-Antikörper (Blinatumomab) in klinischen Studien für eine mögliche therapeutische Anwendung bei Patienten in späten Phasen des Non-Hodgkin-Lymphoms und mit akuter lymphoblastischer Leukämie der B-Zelllinie (B-ALL) getestet (Bargou et al., 2008; Holliger and Hudson, 2005). Zusammenfassend stellen monoklonale Antikörper für bestimmte Tumorkrankheiten eine neue und klinisch gut verträgliche Therapieoption dar. Bispezifische Antikörper mit einer Spezifität für ein Immuneffektorzellen-aktivierendes Antigen, wie z.B. CD3 und einer zweiten Spezifität gegen ein Zielantigen auf Tumorzellen, bieten die Möglichkeit, die therapeutische Effizienz von Antikörpern weiter zu steigern. Das Anwendungsspektrum zugelassener rekombinanter Antikörper reicht mittlerweile von der Diagnose und Therapie verschiedener Krebsarten bis hin zur Behandlung von Multipler Sklerose, Asthma und Alzheimer.

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den T-Zell inhibierenden Effekt eines CD70 blockierenden Antikörpers mit einer ADCC-unabhängigen Zelltod induzierenden Aktivität zu kombinieren, um so CD70-exprimierende Tumoren therapeutisch adressieren zu können. Hierfür wurden Fusionsproteine hergestellt, die einerseits aus dem Apoptose-induzierenden TNF-Familienmitglied TRAIL und andererseits einem *single chain variable fragment* (scFv) bestehen, das von einem hoch affinen Lama anti-CD70 Antikörper (IahCD70) abgeleitet wurde. Insbesondere sollte auch getestet werden ob TRAIL-Mutanten, welche zwischen der TRAILR1 und TRAILR2 Bindung diskriminieren, für den genannten Zweck nutzbar sind.

2. Material

2.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien

Reagenzien	Hersteller
1 kb DNA-Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
ABTS-Puffer	Roche, Mannheim, Deutschland
Acrylamid (30 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Anti-FLAG M2 Agarose	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Cycloheximid (CHX)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DMEM Medium	PAA, Pasching, Österreich
Dulbecco's PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	PAA, Pasching, Österreich
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Detuschland
Essigsäure	J.T. Baker, Leipzig, Deutschland
Ethanol	J.T. Baker, Leipzig, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FACSFlow™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Flag-Peptid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Geneticindisulfat (G418-Sulfat)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
KILLER-TRAIL	ENZO Life Sciences, Lörrach, Deutschland
Kristallviolett (CV-Pulver)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lipofektamine® 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	J.T. Baker, Leipzig, Deutschland
Milchpulver	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
MTT	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, TEMED	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (100 x)	PAA, Pasching, Österreich
Pepton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphataseinhibitor II	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Prestained Protein Marker (Broad Range)	NEB, Frankfurt, Deutschland
Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
RPMI 1640 Medium	PAA, Pasching, Österreich
Silbergelmarker (<i>Low Molecular Weight</i>)	GE Healthcare, Garching, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA, Pasching, Österreich
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

2.2 Enzyme

Enzym	Hersteller
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Restriktionsendonukleasen (Klonierungen)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

2.3 Antikörper

Antikörper	Isotyp und Klon	Hersteller
Anti-Caspase-3	Kaninchen polyklonal, #9662	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-Caspase-8	Maus IgG2b monoklonal, Klon C15	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
Anti-Caspase-9	Kaninchen polyklonal, #9502	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-CD27-PE	Klon 57703, Hamster IgG	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD70	Maus IgG1 Klon Ki-24	Ancell, Bayport, MN 55003, USA
Anti-Flag (M2)	Maus IgG1 monoklonal	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anti-IL8 (OptEIA ELISA)	OptEIA ELISA Kit; keine Info	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA

Anti-Kaninchen-HRP	Ziege polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark
Anti-Maus IRDye 800	Ziege polyklonal	LI-COR Bioscience, Bad Homburg, Deutschland
Anti-Maus,Hamster, Ratte-PE	Klon LG.7F9	eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland
Anti-Maus-HRP	Kaninchen polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark
Anti-Maus-PE	Klon FR70	eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland
Anti-PARP	Maus IgG1, Klon 7D3-6	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Anti-TRAILR1-PE	Mouse IgG1, Klon 69036	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Anti-TRAILR2-PE	Mouse IgG2B, Klon 71908	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Anti-TRAILR3-PE	Mouse IgG1, Klon 90906	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Anti-TRAILR4-PE	Maus IgG1, Klon 104918	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Anti-Tubulin	Maus monoklonal	Dunn Labortechnik, Ansbach, Deutschland
Anti-Ziege-HRP	Kaninchen polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark
Mouse IgG1-PE	Klon 11711	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Mouse IgG2B-PE	Klon 133303	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

2.4 Kits

System	Hersteller
BioLux <i>Gaussia</i> Luciferase Assay Kit	NEB, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
DNA-Gelextraktion NucleoSpin® Extract II Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland
OptEIA IL8-ELISA Kit	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Pierce Silver Stain Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PureYield Plasmid Miniprep/Midiprep-System	Promega, Mannheim, Deutschland

2.5 Verbrauchsmaterial und Geräte

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-, 24-, 6-Well Platten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
96-Well ELISA-Platten (<i>high binding</i>)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Blotting-Papier (0,35 mm, 195 g/m ²)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Dialyseschlauch "Visking", MWCO 15kDa	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Durchflusszytometrie Röhrchen	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Nitrozellulosemembran (0,2 µM Porengröße)	Whatman, Dassel, Deutschland
Parafilm M (38 m x 10 cm)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Petrischalen (35, 60 und 100 mm)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Polyallomerröhrchen	Seton, Los Gatos, CA, USA
Polypropylenröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röntgenfilme, Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Garching, Deutschland
schwarze 96-well Platten (<i>high binding</i>)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Whatman-Papier	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Zellkulturflaschen (75 und 175 cm ²)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (145 mm)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen (35 und 60 mm)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber mit Drehkopf	Hartenstein, Würzburg, Deutschland

Geräte	Hersteller
Agfa Curix 60 Entwicklungsmaschine	Agfa, Düsseldorf, Deutschland
CO ₂ -Inkubator Heraeus Cell Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer BD FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektrophoresesystem "Mini-Protean-Tetra-Cell"	BioRad, München, Deutschland
Elektroporator Equibio Easyject Plus	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Feinwaage	Sartorius Acculab Atilon, Göttingen Deutschland
Gellaufkammern SDS-PAGE	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Heizblock	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Lichtmikroskop	EVOSxL AMG Digital inverted Microscope
LI-COR Odyssey® <i>Infrared Imaging system</i>	Biosciences, Lincoln, USA
Luminometer Lucy 2	Anthos Labtec, Krefeld, Deutschland
Mikrozentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR-Thermocycle Primus	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Schüttler/Kippwippe	Hartenstein, Würzburg, Deutschland

Semi-Dry-Blotkammer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Stromquelle EPS 301	GE Healthcare, Garching, Deutschland
Ultraschallprozessor UP100H	Hielscher Ultrasonics, Teltow, Deutschland
Ultrazentrifuge OPTIMA-L70	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Vortexer	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Wet-Blotkammer	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.6 Lösungen und Puffer

Die benötigten Lösungen und Puffer wurden in demineralisiertem Wasser hergestellt. Temperaturempfindliche Lösungen wurden steril filtriert (Porengröße 0,20 µm) und hitzeunempfindliche Lösungen wurden autoklaviert (20 min bei 120°C und 10⁵ Pa unter feuchter Hitze). Um Kontaminationen durch genetisches Material oder Mikroorganismen zu verhindern, wurden die Gebrauchswaren (z.B. Glaswaren, Pipettenspitzen und Eppendorf-Gefäße) ebenfalls autoklaviert.

Lösungen	Zubereitung
Assay Diluent	1 x PBS 10 % (v/v) FCS
Blotpuffer (10x)	0,025 M Tris 0,192 M Glycin 20 % (v/v) Methanol pH 8,3
ELISA <i>Coating Buffer</i>	0,1 M Natrimcarbonat 8,4 g/l NaHCO ₃ 3,56 g/l Na ₂ CO ₃ pH 9,5
Kristallviolettlösung	20 % (v/v) Methanol 0,5 % (w/v) Kristallviolett
Lämmli-Puffer (4x)	8 % (w/v) SDS 10 % β-Mercaptoethanol 40 % Glycerol 0,2 M Tris, pH 8 0,04 % Bromphenolblau
Laufpuffer (10x)	0,05 M Tris 0,38 M Glycin 0,004 M SDS pH 8,3

LB Medium	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g/l NaCl
MTT-Stocklösung (5x)	500 mg MTT-Pulver 10 ml DMSO
MTT-Arbeitslösung	MTT-Stocklösung 1:5 in PBS verdünnt und steril filtriert
MTT-Lysispuffer	50 % N,N-Dimethylformamid 15 % SDS (75g) pH 4,7 (mit Essigsäure) auf 500 ml mit destilliertem Wasser auffüllen
PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>)	0,02 M Na-Phosphat 0,7 % (w/v) NaCl pH 7,2
PBST	1 x PBS 0,05 % (v/v) Tween-20
PBST in Milch	1 x PBS 0,05 % (v/v) Tween-20 5 % (w/v) Magermilch
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	0,5 M Tris 0,015 M SDS pH 6,8
TAE-Puffer	2 M Tris 1 M Essigsäure 0,1 M EDTA pH 8,3
TBS (<i>Tris buffered saline</i>)	0,02 M Tris 8 % (w/v) NaCl pH 7,6
TBST	1 x TBS 0,05 % (v/v) Tween-20
TBST in Milch	1 x TBS 0,05 % (v/v) Tween-20 5 % (w/v) Magermilch
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1,5 M Tris 0,015 M SDS pH 8,8

2.7 Zellen

2.7.1 Prokaryotische Zellen

NEB 5-alpha Competent *E.Coli* (*High Efficiency*) wurden von der Firma New England Biolabs in Frankfurt (Deutschland) erworben.

2.7.2 Eukaryotische Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien waren entweder in der Abteilung Molekulare Innere Medizin (MIM) des Universitätsklinikums Würzburg bereits vorhanden oder wurden wie unten angegeben erworben. Alle stockeigenen Zelllinien wurden von der *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (Braunschweig, Deutschland) oder von der ATCC bezogen.

Zelllinie (Wachstumstyp)	Quelle	Ursprung/Typ
BCL1 (Suspension)	arGEN-X	murines B-Zelllymphom
HEK293 (Adhärent)	Institutseigener Stock	Humane embryonale Nierenzelle
HT1080 (Adhärent)	Institutseigener Stock	humanes Fibrosarkom
HT1080-CD27 (Adhärent)	Stabil transfizierte Zelllinie etabliert in der MIM	humanes Fibrosarkom
Jurkat (Suspension)	Institutseigener Stock	humanes T-Zelllymphom
KMS-12-BM (Suspension)	Institutseigener Stock	Multiplres Myelom
Mino (Suspension)	Institutseigener Stock	Mantelzelllymphom
OVCAR3 (Adhärent)	University Medical Center Groningen, Niederlande	humanes Ovarienkarzinom
Raji (Suspension)	Institutseigener Stock	Non-Hodgkin-Lymphom
Rec-1 (Suspension)	Institutseigener Stock	Mantelzelllymphom
U-266 (Semiadhärent)	Institutseigener Stock	Multiplres Myelom

2.8 Plasmide und Fusionsproteine

Die Expressionsvektoren der Fusionsproteine wurden selbst oder mit Hilfe anderer Mitarbeiter der Abteilung für Molekulare Innere Medizin (MIM) des Universitätsklinikums Würzburg kloniert oder waren hier bereits vorhanden. Die Transformation und anschließende Plasmid-Amplifikation wurde in kompetenten *E.coli* vorgenommen (siehe Methoden).

Anschließend wurden für die Proteinproduktion HEK293-Zellen mit dem entsprechenden Expressionsvektor transfiziert (siehe Methoden). cDNA, die für TRAILmutR1 und TRAILmutR2 kodieren, wurden als synthetische Gene von Life Technologies Company in Darmstadt bezogen.

Protein-Konstrukte und Expressionsvektoren
1F6 (arGEN-X)
CD27 _{ed} -Fc-Flag-GpL(w/o)
lahCD70(27B3) (arGEN-X)
scFv:lahCD70(27B3)-2xFlag-GpL
scFv:lahCD70(27B3)-Flag-TNC-FasL
scFv:lahCD70(27B3)-Flag-TNC-GpL
scFv:lahCD70(27B3)-Flag-TNC-TRAIL
scFv:lahCD70(27B3)-Flag-TNC-TRAILmutR1
scFv:lahCD70(27B3)-Flag-TNC-TRAILmutR2
TRAILmutR1(G131R/R149I/S159R/N199R/K201H/S215D)-TNC-Flag
TRAILmutR1-TNC-Flag-GpL
TRAILmutR2(Y189Q/R191K/Q193R/H264R/I266L/D267Q)-TNC-Flag
TRAILmutR2-TNC-Flag-GpL
TRAILR1 _{ed} -2xFlag-Fc
TRAILR2 _{ed} -2xFlag-Fc
TRAIL-TNC-Flag
TRAIL-TNC-Flag-GpL
Expressionsvektor: TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3, TRAILR4, pcDNA3.1, pCR3

3. Methoden

3.1 Zellkultur und Kultivierung eukaryotischer Zellen

Mit Ausnahme der OVCAR-3-Zellen wurden alle in dieser Arbeit verwendete Zelllinien, unter standardisierten Bedingungen (5 % CO₂, 37 °C) in RPMI1640-Medium mit Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem FCS (ca. 45 min bei 56 °C) in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Ausnahme bildeten die adhärennten OVCAR-3-Zellen die in DMEM Medium mit 10 % FCS kultiviert wurden. Suspensions- und semiadhärente-Zellen wurden in schräg lagernden Zellkulturflaschen kultiviert. In Abhängigkeit der Proliferationsrate wurden die Zellen ein- bis zweimal pro Woche geteilt. Adhärennte Zellen (HT1080±CD27, HEK293 und OVCAR3) wurden mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung für 15 min bzw. bis zum Ablösen der Zellen vom Zellboden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und bei 1200 rpm für 4 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 20-40 ml 10 % FCS supplementiertem Medium gelöst und die Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Die Suspensionszellen konnten hingegen direkt zentrifugiert und gezählt werden. Bei den U-266-Zellen handelt es sich um semiadhärent wachsende Zellen, welche aus gelösten und adhärennten Zellen bestehen. Zum Ernten der Zellen wurden die adhärennten Zellen mittels eines Zellschabers abgekratzt und so in das Medium mit den gelösten Zellen überführt. Im Folgenden wurden die Zellen den Erfordernissen des Experiments entsprechend ausplattiert. Die restlichen Zellen wurden entweder in frischem Medium weiter kultiviert oder in einem Kryoröhrchen mit 1 ml Gefriermedium (10 % DMSO in FCS) bei -80 °C gelagert.

3.1.1 Konservierung und Revitalisierung eukaryotischer Zellen

Um die Zellen längerfristig zu lagern, wurden die Zellpellets in 1 ml Einfriermedium (FCS mit 10 % DMSO) resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und anschließend bei -80 °C eingefroren. Zur Revitalisierung wurden die Zellen schnell aufgetaut, in Zellkulturmedium resuspendiert, abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt, um das DMSO zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS aufgenommen und in eine entsprechende Zellkulturflasche für die weitere Kultivierung überführt.

3.2 Klonierung und Amplifikation der Fusionsprotein-Expressionsvektoren

Ein pCR3-basiertes (Invitrogen) Expressionsplasmid welches Flag-TNC-TRAIL mit einer Ig Leader-Sequenz kodiert (Berg et al., 2007), wurde zum Einführen von publizierten Mutationen genutzt, welche eine Diskriminierung der TRAILR1- und TRAILR2-Bindung erlauben. Hierbei wurde der TRAIL-Teil im pCR3-Flag-TNC-TRAIL Expressionsvektor durch die folgenden synthetischen TRAILR-spezifischen Gene ersetzt: Die TRAIL-Mutante Y189Q/R191K/Q193R/H264R/I266L/D267Q (TRAILmutR2) mit stark reduzierter TRAILR1-Bindung (Sprick et al., 2000), sowie die TRAIL-Mutante G131R/R149I/S159R/N199R/K201H/S215D (TRAILmutR1) mit stark reduzierter Bindung an TRAILR2 (MacFarlane et al., 2005b). Zur Herstellung von *Gaussia princeps Luciferase* (GpL) TRAIL-Fusionsproteinen wurde die Ig Leader-Sequenz in den zuvor klonierten pCR3-Flag-TNC-TRAIL/mutR1/mutR2 Expressionskonstrukten durch ein DNA-Fragment ersetzt, welches eine humanisierte Form von GpL inklusive der vollen Leader-Sequenz kodiert. Der CD70-spezifische humane IgG1 Antikörper 1F6 wurde mit Hilfe von synthetischen Genen, die für die variablen Domäne dieses Antikörper (US 2006/0083736A1) kodieren, sowie der konstanten Region der humanen IgG1 schweren Antikörperkette (*accession number* P01857) und der konstanten Domäne des V-J-C Segments der Immunoglobulin κ -Kette (*accession number* AAA59000), hergestellt. Um das Fab-Fragment IahCD70 (27B3) zu erhalten, wurde dieses aus einer Phagenbibliothek von mit 786-O Zellen (ATCC) immunisierten Lamas gewonnen. Hierbei wurde auf eine CD70-CD27 interferierende Antikörperinteraktion bzw. hohe Affinität für CD70 hin gescreent (de Haard et al., 1999). Die variable Region von IahCD70 wurde mit Expressionskassetten aus konstanten Regionen der humanen λ -leichten Kette und der schweren Kette des IgG1 verbunden. Zur Generierung der Expressionsplasmide für die scFv:IahCD70-TNC-TRAIL Varianten, wurde die Ig Leader-Sequenz der pCR3-Flag-TNC-TRAIL/mutR1/mutR2 Plasmide durch das scFv:IahCD70 Fragment ersetzt. Letzteres besteht aus dem Ig-Leader und der V_L-Region, welche über einen (GGGGS)₃-Linker mit der V_H-Region des IahCD70 verbunden wurde. Das Expressionsplasmid für CD27_{ed}-Fc-Flag-GpL(w/o) wurde durch Assemblierung einer Expressionskassette hergestellt, welche die extrazelluläre Domäne von CD27 inklusive Leader-Sequenz (Aa 1-191), gefolgt von Aa 244-469 des hIgG1 Fragments und einem Flag-tag, sowie die detektierbare GpL (*Gaussia princeps Luciferase*) ohne Leader beinhaltet. Alle nicht genannten Konstrukte wurden wie in unterer Tabelle beschrieben kloniert. Die sekretierbaren Protein-Varianten wurden transient in HEK293-Zellen produziert (Fick et al., 2012).

Alle verwendeten Vektoren besitzen als Selektionsmarker eine Ampicillinresistenz

Fusionsprotein	Parentalvektor	Vektorverdau	Insert	Insertverdau
CD27 _{ed} -Fc-Flag-GpL	CD27 _{ed} -TNC Flag-Gaussia (w/o)-pCR3	EcoRI+BamHI (entfernt TNC- Domäne)	HA signal Fc linker PreScission (<i>accession number AF019036</i>)	EcoRI+BamHI
scFv:lahCD70(27B3) -2xFlag-GpL	Fn14 _{ed} -2xFlag- Gaussia(w/o)- pCR3	Hind3+BamHI (entfernt Fn14 _{ed} - Domäne)	scFv:ahCD70 (27B3)-pMA- T	Hind3+BamHI
scFv:lahCD70(27B3) -Flag-TNC-GpL	CD40-TNC-Flag Gaussia(w/o)- pCR3	Hind3+BamHI	scFv:CD70(2 7B3)-pMA-T	Hind3+BamHI
scFv:lahCD70(27B3) -Flag-TNC-TRAIL	scFv:CD70(27B 3)-Flag-TNC- FasL-pCR3	EcoRI+Xbal (entfernt FasL- Domäne)	TRAIL (Aa 95-281) (Accession number U37518)- pMA-T	EcoRI+Xbal
scFv:lahCD70(27B3) -Flag-TNC- TRAILmutR1	scFv:CD70(27B 3)-Flag-TNC- FasL-pCR3	EcoRI+Xbal (entfernt FasL- Domäne)	TRAILmutR1 -pMA-T	EcoRI+Xbal
scFv:lahCD70(27B3) -Flag-TNC- TRAILmutR2	scFv:CD70(27B 3)-Flag-TNC- FasL-pCR3	EcoRI+Xbal (entfernt FasL- Domäne)	TRAILmutR1 -pMA-T	EcoRI+Xbal
scFv:lahCD70(27B3) -Flag-TNC-FasL	Gaussia-Flag- TNC-FasL- pCR3	Hind3+BamHI	scFv:CD70(2 7B3)-pMA-T	Hind3+BamHI

Zur Klonierung der Fusionkonstrukte wurden zunächst der Parentalvektor und das zu inserierende Insert mit entsprechenden Restriktionsenzymen präpariert (siehe obige Tabelle). Anschließend erfolgte die Ligation des linearisierten Vektors mit dem entsprechend präparierten Insert mittels der T4-Ligase nach Herstellerangaben. Der Ligationsansatz wurde danach in kompetente *E. coli* Bakterienzellen Hitzeschock transformiert und die Klone auf die richtige DNA hin mittels Antibiotika (hier Ampicilin) über Nacht auf LB-Platten selektioniert. Die Plasmid-DNA-Isolierung aus den gepickten über Nacht gewachsenen *E.coli*-Klonen erfolgte durch eine alkalische Lyse. Im Folgenden wurden die Klone mittels eines entsprechenden Kontrollverdaus und der Gelelektrophorese auf die richtige DNA-Fragmentgröße hin überprüft. Ein positiver *E. coli* Plasmid-Klon wurde bei 37 °C über Nacht in einer Schüttelkultur mit selektivem LB-Flüssigmedium amplifiziert und die Plasmid-DNA mittels Midipräp-Kit nach Herstellerangaben isoliert sowie aufgereinigt. Zuletzt erfolgte eine DNA-Sequenzierung zur Kontrolle und Produktion der Plasmid kodierten Fusionsproteine in HEK293-Zellen.

3.3 Produktion und Aufreinigung der Fusionsproteine

3.3.1 Protein-Produktion

Die Expressionsplasmide der Fusionsproteine wurden mittels Elektroporation in HEK293-Zellen transfiziert. Dazu wurden die HEK293-Zellen (30×10^6 Zellen/ml) zuvor mit einer Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, geerntet und abzentrifugiert (1200 rpm, 4 min, RT). Das Zellpellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert in eine Elektroporationsküvette (4 mm, dick) überführt und mit 40 µg des entsprechenden Expressionsplasmids versetzt. Anschließend erfolgte die Elektroporation mit dem Easyject Plus Electroporator (PeqLab: 250 V, 1800 µF, maximaler Widerstand). Die elektrotransfizierten Zellen wurden in einer großen Zellkulturschale (Greiner) in RPMI 1640 Medium mit 2 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin über Nacht im Inkubator bei 37 °C kultiviert. Nach 5-7 Tagen wurden die Zellüberstände abgenommen und für 10 min bei 4600 rpm abzentrifugiert, um die Zellreste zu entfernen. Für die Herstellung von stabil transfizierten HEK293-Zellen wurden diese direkt nach der Elektroporation mit den entsprechenden Expressionsplasmids in eine große Zellkulturflasche mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep in RPMI 1640 Medium transferriert und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die transfizierten Zellen mittels G418-Sulfat (500 µg/ml) für 4 Wochen selektioniert. Die transient und stabil produzierten rekombinanten Proteine wurden über anti-Flag Western *blotting* analysiert (siehe WB 3.4) oder wenn möglich ihre GpL-Luziferaseaktivität (siehe GpL-Messung 3.10) ermittelt.

3.3.2 Aufreinigung

Die Proteinüberstände der scFv:IchCD70-TNC-TRAIL Fusionsproteine wurden durch Affinitätschromatographie mit Hilfe anti-Flag M2-Agarose *beads* gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Für die Aufreinigung wurden pro 600 µg aufzureinigendem Protein 1 ml anti-Flag M2 Affinity Gel (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Die M2-Agarosebeads wurden in eine Säule überführt und zunächst mit autoklavierten TBS gewaschen. Im Anschluss wurde der entsprechende Proteinüberstand über die *beads*-Säule gegeben. Die Bindung der Flag-getaggen Proteine erfolgte mit einer Tropfgeschwindigkeit von etwa 1 Tropfen pro 30 Sekunde bei 4°C. Die Säule wurde bei 4 °C und maximal für 2 Tage beladen. Anschließend wurde die Säule erneut mit TBS gewaschen und die gebundenen Proteine eluiert. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte in Fraktionen von 0,5 ml nach Zugabe von 100 µg/ml Flag-Peptid in TBS. Dabei durfte die Tropfgeschwindigkeit höchstens 3 Tropfen pro Minute betragen. Nach der Elution wurden die Agarosebeads nochmals mit TBS gewaschen,

in eine Glycerol/TBS-Lösung (50 % Glycerol in TBS, 0,02 % Natriumazid) aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Die eluierten Proteine wurden über Nacht bei 4 °C gegen PBS dialysiert, um das Flag-Peptid und Salze zu entfernen. Am nächsten Tag wurden die Proteine steril filtriert und bei -20 °C gelagert. Der Erfolg der Proteinaufreinigung wurde mittels Western Blot mit entsprechenden anti-Flag M2 mAk und anti-mouse IRDye 800 im LI-COR Odyssey® Infrared Imager analysiert (Auftrag, Durchlauf, Wasch 1, Elutionsfraktionen, Wasch 2, Agarosebeads) und die Konzentration anhand eines Standardproteins bestimmt.

3.4 Westernblot (WB)

3.4.1 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die zuvor vorbereiteten Proteinproben wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel, welches aus einem Sammel- und Trenngel aufgebaut ist, aufgetrennt. Die Polymerisation des Trenngels (375 mM Tris pH 8,8; 3,75 mM SDS; 0,1 % APS, 12 % Acrylamid) wurde durch die Zugabe von 0,1 % TEMED induziert. Die Trenngel-Lösung wurde vor der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Gelgrenze zu erreichen und den Kontakt mit Luftsauerstoff auszuschließen. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgeschüttet und der Rest abgesaugt. Zur Sammlung der Proben wurde das Trenngel mit einem Sammelgel (6 % Acrylamid; 125 mM Tris pH 6,8; 3,75 mM SDS; 0,1 % APS) überschichtet. Die Polymerisation der Sammelgel-Lösung wurde ebenfalls mit 0,1 % TEMED induziert, allerdings wurde vor der Polymerisation des Sammelgels ein Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde der Kamm entfernt und die Gele mit den Proteinproben und dem Molekulargewichtsstandard, *Prestained Protein Marker (Broad Range)*, der Firma New England Biolabs (Frankfurt) beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit Laufpuffer in einer Gellaufkammer der Firma Peqlab (Erlangen) bei 120 V und 400 mA für ca. 110 min.

3.4.2 Elektrotransfer (blotting) von Proteinen auf die Nitrozellulosemembran

Der Transfer der über die SDS-PAGE separierten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte in einer *Wet-* oder *SemiDry*-Blotkammer (Peqlab, Erlangen). Die Nitrozellulosemembranen und *Whatman-Paper* wurden zurechtgeschnitten und in Blotpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; pH 8,3) angefeuchtet. Für den Blot-Prozess wurde die Nitrozellulosemembran, *Whatman-Paper* und das SDS-Gel in folgender

Anordnung in einer Blotkammer gepackt: Anode – 2 x *Whatman-Paper* – Nitrozellulosemembran – Gel – 2 x *Whatman-Paper*- Kathode. Der Proteintransfer erfolgte je nach Blot-System bei *Wet*- für 150 Minuten bei Raumtemperatur, 90 V und 400 mA oder bei *SemiDry*-Blotkammern von 1,5 mA pro cm² Gelfläche für 110 min bei RT und maximaler Spannung (300 V).

3.4.3 Immundetektion

Je nach Antikörper und Herstellerangaben wurden die verwendeten Lösungen bei der Immundetektion entweder in PBST oder in TBST angesetzt. Nach dem Blotten wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mittels PBST- bzw. TBST-Milch (1xPBS bzw. 1xTBST; 0,05 % (v/v) Tween-20; 5 % (w/v) Magermilchpulver) bei Raumtemperatur für 1 Stunde auf dem Schüttler geblockt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran dreimal mit PBST oder TBST für jeweils 10 Minuten gewaschen und die Membran mit dem gewünschten Primärantikörper (Bsp. Anti-Tubulin Antikörper (Maus, monoklonal), Konzentrationen nach Angaben des Herstellers) in PBST oder TBST über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Nitrozellulosemembran erneut dreimal für 10 Minuten mit PBST bzw. TBST gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden HRP (*horse redich peroxidase*)-konjugierten oder fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper in PBST oder TBST-5 % Magermilch inkubiert. Anschließend wurde die Membran nochmals drei Mal für 10 Minuten in PBST oder TBST gewaschen und dabei geschwenkt. Die Detektion erfolgte bei Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern mit dem ECL(verstärkte Chemilumineszenz, *enhanced chemiluminescence*)-System und Röntgenfilmen von GE Healthcare (Garching) in der Agfa Curix 60 Entwicklermaschine (Agfa, Düsseldorf). Der Proteinnachweis bei fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern erfolgte mittels des LI-COR Odyssey® Systems (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA).

3.5 Silberfärbung

100 ng der verschiedenen aufgereinigten rekombinanten Fusionsproteine wurden zunächst mittels SDS-PAGE fraktioniert und die Gele danach mit dem Pierce Silver Stain Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerprotokoll gefärbt.

3.6 Durchflusszytometrie und Detektion von Zelloberflächenmarker

Die geernteten Zellen wurden mit PBS gewaschen, gezählt und mindestens 10^5 Zellen/Probe auf 96-Well Rundbodenplatten überführt. Die Platten wurden für 4 min bei 1200 rpm zentrifugiert und dann mit dem entsprechenden Zelloberflächenantigenen Antikörper bzw. Isotyp-Kontrolle für 45 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen, mit 300 µl PBS in FACS(*Fluorescence Activated Cell Sorter*)-Röhrchen überführt und mittels FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg) die zellgebundenen Antikörper detektiert. Für die Detektion von endogenen TRAIL-Rezeptoren wurden Phycoerythrin(PE)-gelabelte monoklonale TRAILR-spezifische Antikörper und die entsprechenden PE-gelabelten Isotypkontroll-Antikörper verwendet. CD70 wurde mit einem ungelabelten CD70-Antikörper und anschließender anti-Maus-PE Antikörperbehandlung für jeweils 45 min inkubiert bzw. detektiert.

3.7 IL8-ELISA in der Kokultur

Zur Bestimmung der IL8-Produktion in der Kokultur wurden zunächst die Zellen (Mino und U-266) in 96-Well Flachbodenplatten und 50 µl Medium (RPMI 1640, 10 % FCS) ausgesät (2×10^4 Zellen pro Well, Triplikate) und eine halbe Stunde mit den angegebenen Konzentrationen der CD70-spezifischen monoklonalen Antikörper Varianten (IahCD70 und 1F6) behandelt. Anschließend wurden 50 µl 1×10^4 HT1080-CD27 Zellen pro Well hinzugefügt und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Der Zellüberstand der Kokultur wurde am nächsten Tag nach einer Zentrifugation abgenommen und zur Lagerung bei -20 °C weggefroren oder direkt weiterverwendet. Ein Tag zuvor wurden 96-Well ELISA-Platten mit dem humanen anti-IL8-Antikörper aus dem OptEIA IL8-ELISA-Kit (BD Biosciences, Heidelberg) nach Herstellerangaben beschichtet. Nach etwa 24 h wurden die ELISA-Platten zunächst mit Assay-Diluent für 1 h geblockt und gewaschen (5x mit PBST). Danach wurden die Zellüberstände der Kokultur zusammen mit einer IL8-Standardlösung (2-0,5 ng/ml) auf die ELISA-Platten gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde eine Mischung aus biotinyliertem anti-IL8-Antikörper und Streptavidin-HRP für 1 h auf die Platten gegeben. Nach deren Bindung konnte die Menge des in den Zellüberstand sezernierten IL8 durch Zugabe des HRP-Substrates ABTS (gelöst in ABTS Puffer) durch Messung im ELISA-Reader bei 405 nm bestimmt werden. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die ELISA-Platten mehrfach mit PBST gewaschen.

3.8 Zytotoxizitätsassay

Zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung verschiedener Stimuli wurden die verwendeten adhärenen Zelllinien (OVCAR-3, HT1080±CD27) in 96-Well Flachbodenplatten und 100 µl Medium mit 10 % FCS (RPMI 1640 für alle Zelllinien oder DMEM Medium für OVCAR-3-Zellen) ausgesät (2×10^4 Zellen/Well für adhärenen Zelllinien und 5×10^4 Zellen/Well für Suspensionszelllinien) und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit verschiedenen Proteinen und Reagenzien in den jeweils angegebenen Konzentrationen und Triplikate für 1 h im Inkubator vorstimuliert. Dies geschah in An- oder Abwesenheit von 2,5 µg/ml CHX für 30 min vor der eigentlichen TRAIL-Stimulation. Die Oligomerisierung der TRAIL-Varianten mit dem Flag-spezifischen Antikörper M2 (1 µg/ml) wurde ebenfalls 30 Minuten vor der eigentlichen Stimulation bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellvitalität bei adhärenen Zellen wurde nach 18 h mittels Kristallviolett-Färbung (CV) quantifiziert. Bei der CV-Färbung wurden die Überstände verworfen und die Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 80 µl/Well Kristallviolett-Lösung (0,5 % Kristallviolett, 20 % Methanol) behandelt. Der Überschuss der CV-Färbung wurde abgeschüttet und die Platten dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet. Im Anschluss wurde das Kristallviolett mittels Zugabe von 160 µl/Well Methanol bei RT für 20 min auf dem Schüttler gelöst. Letztendlich wurden die Platten im ELISA-Reader (Lucy 2 Luminometer, Anthos Labtec, Krefeld) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen und die Zellvitalität bestimmt. Das zelluläre Überleben von Suspensionszellen wurde mit Hilfe des MTT-Assays ermittelt. Die Suspensionszellen (Jurkat, Mino, Rec-1, KMS-12-BM, Raji) wurden gezählt (6×10^4 Zellen/Well), in 96-Well Platten ausgesät und am gleichen Tag in Triplikaten mit den angegebenen Konzentrationen der Fusionsproteine in einem Endvolumen von 125 µl/Well über Nacht stimuliert. Am nächsten Tag wurde zu jedem Well, ein Mix aus 10 µl der MTT-Färbelösung (10 mg/ml) und 25 µl DPBS hinzupipettiert und die Zellen für 2 h bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Anschließend wurden 90 µl/Well MTT-Lysispuffer hinzugegeben und die Platten mit Aluminiumfolie abgedeckt und über Nacht bei RT geschwenkt. Die Messung erfolgte am nächsten Tag bei 570 nm im ELISA-Reader. Der normalisierte Prozentsatz überlebender Zellen wurde berechnet aus unbehandelten Kontrollzellen (100% überlebende Zellen) und komplett getöteten Zellen, welche mit einem toxischen Mix (CHX 5 µg/ml, KILLER-TRAIL 100 ng/ml, Fc-CD95L 100 ng/ml, TNFwt-F 100 ng/ml, 0,5 % Natriumazid) behandelt wurden (0 % überlebende Zellen). Im MTT-Kokulturassay wurden Jurkat-Zellen (6×10^4 Zellen/Well) zusammen mit Rec-1-Zellen (6×10^4 Zellen/Well) in 96-Well Platten ausgesät. Die entsprechenden TRAIL-Varianten wurden für die Oligomerisierung, 30 min mit 1 µg/ml anti-Flag mAb M2, in einer separaten 96-Well Platte inkubiert und dann zu der Kokultur hinzugefügt. Um die CD70-bindungsabhängige

Verstärkung der Apoptose der scFv:CD70-TRAIL-Varianten zu testen, wurde scFv:CD70-TNC-GpL (5 µg/ml) als Kompetitor benutzt und 30 min zuvor zu den Zellen hinzugefügt.

3.9 Herstellung von Gesamtzelllysaten nach Stimulation

Zur Herstellung von Totalzelllysaten wurden die Zellen geerntet. Dabei wurden die adhärennten Zellen zuvor mit eiskaltem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber abgekratzt bzw. die Suspensionszellen direkt mit 1 ml eiskaltem PBS (0,02 M Natriumphosphat; 0,7 % (w/v) Natriumchlorid; pH 7,2) versetzt, um die Stimulation zu beenden und die Zellen gleichzeitig zu waschen. Die Zellen wurden anschließend in ein 15 ml Falcon überführt und 3 min bei 4 °C und 2300 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 120µl/2x10⁶ Zellen mit 1:25 Protease- (Roche, Mannheim) und 1:50 Phosphatase-Inhibitor II (Sigma, Deisenhofen) supplementiertem 4x Ladepuffer (8 % (w/v) SDS, 10 % β-Mercaptoethanol, 40 % Glycerol, 0,2 M Tris pH 8,0; 0,04 % Bromphenolblau) resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellsuspension wurde für 20 Sekunden im Probenpuffer sonifiziert und danach bei 96 °C für 5 min für die Protein-Denaturierung aufgekocht. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei RT und 14000 rpm wurden die fertigen Totalzelllysate für den weiteren Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt oder direkt für die SDS-PAGE und spätere Western Blot-Analyse weiter verwendet.

3.10 Gleichgewichtsbindungsstudien mittels GpL-Fusionsproteinen

3.10.1 Gleichgewichtsbindungsstudien mit GpL-TNC-TRAIL-Varianten

Im Fall von Gleichgewichtsbindungsstudien mit dem GpL-Fusionsprotein der TRAIL-Varianten wurden HEK293-Zellen, die wenig endogene TRAIL-Rezeptoren exprimieren, transient und parallel mit den entsprechenden TRAILR1-4-Expressionsplasmiden bzw. einem pcDNA3.1 Leervektor zur Bestimmung der unspezifische Zellbindung, mittels Elektroporation transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden in großen Platten ausgesät und über Nacht im Inkubator bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach Inkubation mit einer Trypsin/EDTA-Lösung von den Platten geerntet, gezählt und auf 8x10⁵ Zellen/Gruppe in 200 µl Medium (RPMI 1640, 10 % FCS) in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße präpariert. Um die totale Bindung zu detektieren, wurden die Zellen für 1 h mit absteigenden Konzentrationen der GpL-TRAIL-Varianten bei 37 °C inkubiert. Um die nicht gebundenen

GpL-Liganden Moleküle abzuwaschen, wurden die Zellen für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert und 5x mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 50 µl Medium (RPMI 1640, 0,5 % FCS und 1 % Pen/Strep) aufgenommen und in schwarze 96-Well Flachbodenplatten überführt. Die zellgebundene GpL-TRAIL Aktivität wurde mit Hilfe des *Gaussia Luciferase Assay Kit* (NEB) und ein Lucy 2 Luminometer gemäß Herstellerprotokoll gemessen. Hierzu wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 10 µl der Luziferaselösung (GpL-Substrat 1:100 in GpL-Puffer 10 µl/Well; *Gaussia Luciferase Assay Kit*, New England Biolabs, Frankfurt) gestartet und die Luziferase-Aktivität sofort im Luminometer (Lucy 2, Anthos Labtec, Krefeld) gemessen (Verweildauer: 1 Sekunde pro Well). Da die Luziferase-Aktivität schnell abnimmt, erfolgte die Zugabe der Luziferaselösung und die Messung spaltenweise auf der 96-Well Platte. Durch vorangegangene GpL-Fusionsprotein-Messungen mit Lösungen bekannter Konzentration wurde ein Messfehler von weniger als 5 % definiert und dieser bei den Auswertungen korrigiert. Die spezifischen GpL-TRAIL Bindungswerte wurden über die Subtraktion der unspezifischen Bindungswerten von den korrespondierenden totalen Bindungswerten kalkuliert. Die K_D -Werte wurden mit den spezifischen Bindungswerten durch nicht lineare Regression mittels des GraphPad Prism 5.0 Softwareprogramms (GraphPad Software, Inc.) berechnet.

3.10.2 Gleichgewichtsbindungsstudien mit mono- und trimeren scFv:lahCD70-GpL

Um die Gleichgewichtsbindungsstudien mit adhären Zellen (z.B. OVCAR-3) und Suspensionszellen (z.B. Mino) durchzuführen wurden die Zellen in 24-Well Platten (OVCAR-3: $2,5 \times 10^5$ Zellen pro 1 ml Well bzw. Mino: 6×10^5 Zellen pro 1 ml Well) mit dem entsprechenden Zellmedium (RPMI 1640, 10 % FCS) ausgesät und im Inkubator über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurde im Fall von OVCAR-3 das Medium vor der Stimulation abgesaugt. Eine Hälfte der Platte wurde mit frischem Medium für 1 h bei 37 °C vorbehandelt, um die totale Bindung zu detektieren und die andere Hälfte mit Medium und 10 µg/ml des konventionell kompetierenden CD70-spezifischen Antikörpers lahCD70, um dadurch die unspezifischen Bindung zu bestimmen (Antigen-Block). Anschließend wurden beide Zellgruppen paarweise mit absteigenden Konzentrationen des scFv:lahCD70-GpL- und scFv:lahCD70-TNC-GpL-Fusionsproteins für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die 24-Well Platten (OVCAR-3) 10x bzw. die in Eppendorf-Gefäße überführten Suspensionszellen 5x mit eiskaltem PBS gewaschen, um ungebundene GpL-Liganden wegzuwaschen. Nach vollständigen Entfernen des PBS wurden zu jedem Well/Eppendorfgefäß 55 µl Medium (RPMI 1640, 0,5 % FCS, Penicillin/Streptomycin) gegeben und die Zellen dann direkt bzw. abgekratzt und jeweils 50 µl in eine schwarze 96-

Well Platte überführt (Greiner), um ihre zellgebundene GpL-Aktivität zu messen. In einem Well wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst (OVCAR-3) oder direkt (Mino) verwendet und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, um später die Rezeptoranzahl pro Zelle berechnen zu können. Um die GpL-Aktivität in den verschiedenen Proben zu quantifizieren, wurde die enzymatische Reaktion mittels Zugabe von 10 µl der Luziferaselösung (GpL-Substrat 1:100 in GpL-Puffer, *Gaussia Luciferase Assay Kit*, NEB) gestartet und die Lumineszenz in einem Lucy 2 Luminometer (Anthos Labtec Instruments) sofort (Verweildauer 1 Sekunde pro Well) untersucht. Parallel wurde die Luziferaseaktivität von definierten Mengen der verwendeten scFv:IahCD70-GpL- und scFv:IahCD70-TNC-GpL-Konstrukte gemessen, um die relativen Lichteinheiten in Molekülzahlen umrechnen zu können.

3.11 *In vitro* GpL-Bindungsstudien

Schwarze 96-Well ELISA-Platten wurden mit 0,5 µg/ml Protein G über Nacht bei 4 °C ge-coated. Am nächsten Tag wurden die Platten mit PBS gewaschen und für 1 h zur Hälfte beladen mit 1 µg/ml TRAILR1_{ed}-Fc oder TRAILR2_{ed}-Fc, die andere Hälfte blieb unbehandelt, um die unspezifische Bindung zu bestimmen. Anschließend wurden die Platten für 1 h mit Assay-Diluent (PBS mit 10 % FCS) geblockt. Danach wurden die ungebundenen Moleküle mehrfach mit PBS abgewaschen und die GpL-Fusionsproteine der verschiedenen TRAIL-Varianten für 1 h bei 37 °C auf die Platten gegeben. Die ungebundenen Moleküle wurden entfernt und die Luziferase-Aktivität der gebundenen GpL-TRAIL-Varianten wiederum mittels des *Gaussia Luciferase Assay Kit* und dem Lucy 2 Luminometer nach Herstellerangaben bestimmt.

3.12 Heterologe Kompetitionsassay mit CD27_{ed}-Fc-GpL(w/o)

Für heterologe Kompetitionsassays wurden die Zellen ebenfalls gezählt über Nacht in 24-Well Platten ausgesät (OVCAR-3: $2,5 \times 10^5$ Zellen pro 1 ml Well bzw. Mino: 6×10^5 Zellen pro 1 ml Well) und am nächsten Tag mit einer Mischung aus konstant 200 ng/ml CD27_{ed}-Fc-GpL und absteigenden Konzentrationen an konventionellen hCD70-spezifischen Antikörpern (IahCD70 und 1F6) für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, wie bei den Gleichgewichtsbindungsstudien beschrieben, entsprechend 5-10 mal mit eiskaltem PBS gewaschen und die zellassozierten CD27_{ed}-Fc-GpL Moleküle mit dem *Gaussia Luciferase Assay Kit* und einem Lucy 2 Luminometer quantifiziert.

3.13 Analyse und Darstellung der Bindungsdaten

Die Regressionsanalysen und die Kalkulation der kinetischen Parameter wurden mit Hilfe der GraphPad Prism 5.0 Analyse-Software durchgeführt. Anschließend wurden die Abbildungen mit der CorelDRAW Graphics Suite X4 Software für die Enddarstellung bearbeitet.

4. Ergebnisse

In früheren Studien wurde gezeigt, dass scFv-sTRAIL Fusionsproteine durch Bindung an ein Zelloberflächenantigen, eine höhere Apoptose-induzierende Aktivität erlangen konnte sowie durch das Targeting eines Tumorantigens, eine gezielte TRAIL-Rezeptoraktivierung im Tumor möglich wird (Bremer et al., 2004; de Bruyn et al., 2010; Schneider et al., 2010; Stieglmaier et al., 2008; Wajant et al., 2001). Vor diesem Hintergrund war es das Ziel dieser Arbeit scFv:CD70-TRAIL-Fusionsproteine herzustellen, welche eine gezielte Bindung an CD70-exprimierende Zellen erlauben und dadurch eine CD70-abhängige TRAIL-Rezeptoraktivierung auslösen. Ebenso sollte die potentiell Proliferation induzierende CD27-Stimulation auf T-Zellen durch CD70-exprimierende Tumorzellen unterbunden werden, da diese zur Aktivierung von tumorassoziierten Tregs führen kann und somit zur Inhibition antitumoraler Wirkmechanismen. Hierfür musste zu Beginn der verwendete anti-humane-CD70-Antikörper im Hinblick auf die weiteren Klonierungen der scFv:CD70-TRAIL-Fusionsproteine durch Bindungsstudien bzw. Aktivitätstests charakterisiert werden. Um die entsprechenden Experimente durchführen zu können wurden zunächst Zellen durch FACS(*Fluorescence Activated Cell Sorter*)-Analyse identifiziert, welche CD70 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Tab. 1). Die CD27-Rezeptorexpression wurde ebenfalls mittels FACS-Analyse untersucht, um Rückschlüsse auf eine mögliche autogene CD70-CD27 Interaktion in der betreffenden Zelllinie ziehen zu können.

4.1 CD70-Zelloberflächenexpression

In früheren Studien wurde eine starke CD70-Expression in B-Zell-Lymphomen und in einer Vielzahl von soliden Tumoren (z.B. Ovarien, Pankreas, Renal, Cerebrum und Cutis) gefunden, was dieses Antigen als ein potentielles Ziel für Tumortherapien sowie als diagnostischen Biomarker definiert (Diegmann et al., 2005; Ryan et al., 2010; Wischhusen et al., 2002). Die meisten der angesprochenen Analysen der CD70-Expression basieren jedoch auf immunhistochemischen Techniken, welche nicht zwischen zelloberflächen- und intrazellulär-exprimiertem CD70 unterscheiden. Somit wurde zu Beginn dieser Arbeit eine große Anzahl von Tumorzelllinien mittels FACS analysiert und dadurch ermittelt, welche Zellen membranständiges CD70 bzw. CD27 exprimieren und damit für die weitere Charakterisierung des Antikörpers und der scFv:CD70-TRAIL-Fusionsproteine relevant waren (Tab. 1). Die FACS-Analyse zeigte, dass mehr als 90 % der analysierten B-Zell-Lymphom Zelllinien membranständiges CD70 stark exprimieren. Auch ein deutlicher Anteil der untersuchten Glioblastom-, Pankreas-, Ovarien-, Nieren- und Melanom-Zelllinien erwies

sich als positiv für membrangebundenes CD70 (mCD70). Eine Koexpression des CD27 war eher die Ausnahme und war nur auf KMS-12-BM, Raji- und Ramos-Zellen deutlich nachweisbar.

Tab.1 Die Zelloberflächenexpression von CD27 und CD70 in Tumorzelllinien

Die Zellen wurden mittels FACS analysiert und in verschiedene Expressionsklassen eingeteilt: +++ sehr hohe Expression (z.B. Mino, Abb. 16), ++ hohe Expression (z.B. OVCAR-3, Abb. 16), + signifikante Expression, - keine signifikante Bindung (z.B. Jurkat, Abb. 16). NHL, Non-Hodgkin-Lymphom; MM, Multiples Myelom; MCL, Mantelzell-Lymphom; CTCL, kutanes T-Zell-Lymphom; CLL, chronisch lymphatische Leukämie; DLBCL, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom; RCC, renales Zellkarzinom, SCC, Plattenepithelkarzinom.

Zelllinie	Typ	CD70	CD27
Raji	NHL	+++	+++
U-266	MM	+++	-
AMO-1	MM	+++	-
RPMI-8226	MM	++	- / +
INA-6	MM	-	-
KMS-11	MM	++	-
MM1.S	MM	++	-
KMS-12-BM	MM	+++	+++
JJN-3	MM	+++	-
Mino	MCL	+++	-
Jeko-1	MCL	+++	-
Rec-1	MCL	+++	-
Granta-519	MCL	+++	+
MJ(G11)	CTCL	+++	-
JVM-3	CLL	+++	-
Ramos (Ra1)	Burkitt-Lymphom	++	+++
BJAB	Burkitt-Lymphom	+++	-/+
Daudi	Burkitt-Lymphom	++	-
SU-DHL-6	DLBCL	++	-
PANC-1	Pankreastumor	+++	+
Panc89	Pankreastumor	++	+

PancTu1	Pankreastumor	-	-
MIA PaCa-2	Pankreastumor	-	-
Colo357	Pankreastumor	-	-
A-498	RCC	+++	-
786-O	RCC	+++	+
FaDu	SCC	-	-
HLaC-78	SCC	- / +	-
WM35	Melanom	-/+	-
WM3211	Melanom	-	-
WM115	Melanom	+++	-
WM1552C	Melanom	+ / ++	-
WM793	Melanom	-/+	-
WM3248	Melanom	++	-
SK-Mel-19	Melanom	-	-
MV3	Melanom	-	-
WM852	Melanom	+	-
WM451Lu	Melanom	-	-
WM1205Lu	Melanom	+++	-
BLM	Melanom	-	-
OAW-42	Ovarialtumor	- / +	-
SKOV-3	Ovarialtumor	+	-
OVCAR-3	Ovarialtumor	++	-
GaMG	Glioblastom	- / +	-
U87	Glioblastom	+	-
U343	Glioblastom	+	-
LN18	Glioblastom	-	-

Anhand der CD27 und CD70 FACS-Ergebnisse wurden nun die hoch CD70-exprimierenden Zelllinien U-266 und noch deutlich CD70-exprimierende Zelllinie OVCAR-3 für die weiteren Analysen des verwendeten CD70-Antikörpers ausgewählt.

4.2 Charakterisierung des in Lamas generierten humanen CD70-spezifischen Antikörpers 27B3 (IahCD70)

Aufgrund der von der Firma arGEN-X zur Verfügung gestellten Sequenzen für den humanen CD70-spezifischen Antikörper 27B3 wurde eine scFv-Variante des Antikörpers generiert. Vor der weiteren Verwendung der scFv-Domäne zur Konstruktion von scFv:CD70-TRAIL-Fusionsproteinen, wurde diese und der parentale Antikörper durch Bindungsstudien und Aktivitätsexperimente analysiert. Zur funktionellen Charakterisierung des kompletten Antikörpers 27B3, im Weiteren als IahCD70 bezeichnet, wurde zunächst mittels Competition dessen antagonistisches Potential getestet. Dazu wurde die Inhibition der Bindung von CD27_{ed}-Fc-GpL(w/o), einem Fusionsprotein bestehend aus der extrazellulären Domäne des CD27 Rezeptors, der Fc-Domäne des humanen IgG1-Moleküls, sowie der Luziferase aus *Gaussia princeps* (Abb. 1), an CD70-exprimierende Zelllinien durch IahCD70 mittels einer Bindungsstudie bestimmt. Die biolumineszente Aktivität der kleinen und sekretierbaren GpL ist über 1000 fach höher verglichen mit der Luziferase des Glühwürmchens (*Lampyris noctiluca*) oder der *Renilla* Luziferase (eine Korallenart) (Tannous et al., 2005). GpL-Konzentrationen von unter 1 femtomolar ($\sim 10^{-4}$ ng/ml) können deutlich vom Messhintergrund unterschieden werden (Lang et al., 2012). GpL-Fusionsproteine können daher ähnlich sensitiv wie iodidierte Proteine detektiert werden. Zudem zeigten die GpL-Fusionsproteine im Vergleich zu anderen Reporterdomänen, eine gute Produktivität ohne ungewollte Autoaggregationen (Lang et al., 2012). Die Experimente mit den unterschiedlichen CD70⁺-Zelllinien ergaben, dass der Antikörper IahCD70 mit hoher Effizienz die CD70-CD27 Interaktion blockiert und mindestens gleich potent ist, wie der patentierte humane CD70-spezifische Antikörper 1F6 (Abb. 2), welcher in seiner Medikament-konjugierten Variante (SGN-75) aktuell in klinischen Studien untersucht wird und zum Vergleich hier mitgeführt wurde (Oflazoglu et al., 2008). Die zelluläre IC₅₀ beider Antikörper lag bei etwa 800 pM für OVCAR-3-Zellen und bei 200 pM für Mino-Zellen (Abb. 2).



Abb.1 Aufbau des löslichen dimeren CD27 Fusionsproteins CD27_{ed}-Fc-Flag-GpL(w/o). C-terminal an die extrazelluläre Domäne des CD27-Moleküls wurde die Fc-Domäne des humanen IgG1, welches zur Ausbildung von dimeren Proteinen führt, gekoppelt. Auf die Fc-Domäne folgt weiterhin ein Flag-Epitop und die sehr gut detektierbare *Gaussia princeps* Luziferase (GpL) ohne leader (w/o).

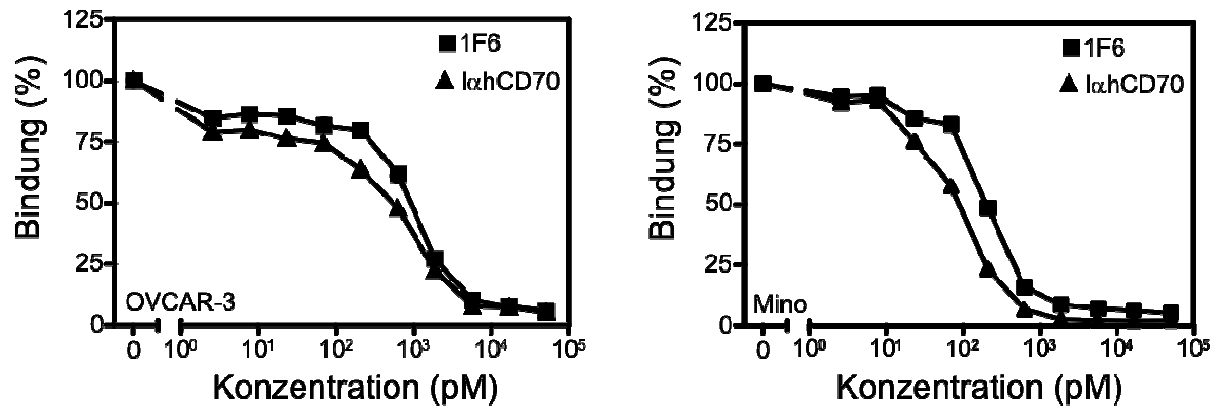


Abb.2 Der CD70-spezifische monoklonale Antikörper lahCD70 blockiert die CD27-CD70 Interaktion. OVCAR-3- und Mino-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der hCD70-spezifischen monoklonalen Antikörpern lahCD70 und 1F6 für 1 h bei 37 °C vorinkubiert. Danach wurden die Zellen eine weitere Stunde bei 37 °C konstant mit 200 ng/ml CD27_{ed}-Fc-GpL inkubiert und anschließend die ungebundenen Moleküle durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Die zellassoziierte GpL-Aktivität wurde mit Hilfe des *GpL-AssayKit* mittels Luminometer bestimmt.

Der gefundene inhibitorische Effekt von lahCD70 auf die CD70-CD27 Interaktion wurde im Weiteren in einem Aktivitätsexperiment bestätigt (Abb. 3). Hierfür wurden CD70-exprimierende Zellen benutzt, um die CD27-Rezeptoraktivität in der stabil mit CD27 transfizierten Zelllinie HT1080-CD27 zu stimulieren (Wyzgol et al., 2009). Die Stimulation der HT1080-CD27 Zellen, durch die CD70-exprimierenden Mino- und U-266-Zellen, resultiert in einer erhöhten IL8-Produktion, welche durch den klassischen NFκB-Signalweg reguliert wird. Der Antikörper lahCD70 als auch der 1F6-Antikörper inhibierten die Erhöhung der IL8-Produktion in HT1080-CD27 Zellen, welche durch die Kokultivierung mit CD70-exprimierenden U-266- oder Mino-Zellen induziert wurde (Abb. 3). Beide getesteten Antikörper zeigten starke inhibitorische Effekte, wobei der lahCD70 anscheinend sogar etwas stärker blockierte und damit bei geringeren Konzentrationen höhere inhibitorische Effekte erzielte als der klinisch untersuchte 1F6 (Abb. 2, 3).

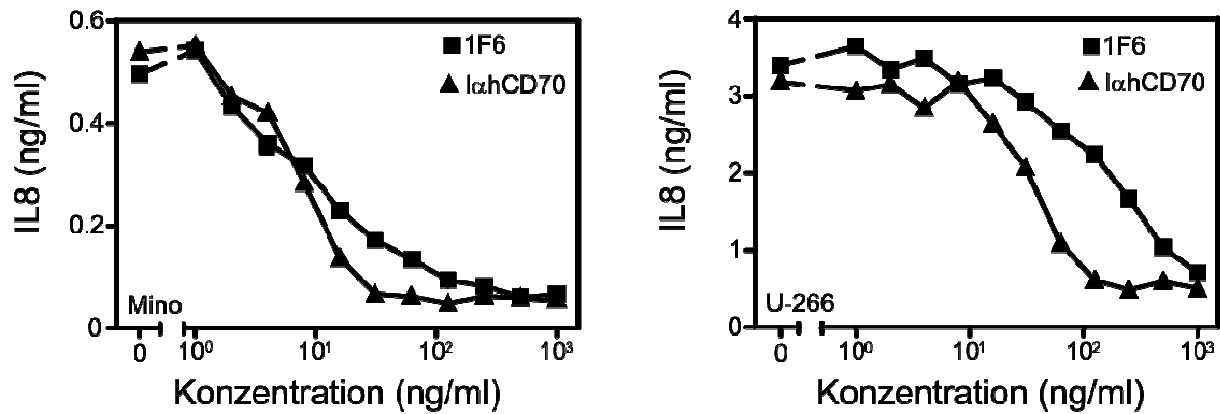


Abb.3 Der CD70-spezifische mAk IαhCD70 ist ein potenter Inhibitor der CD70-induzierten IL8-Produktion. Mino- und U-266-Zellen wurden für 1 h bei 37 °C mit den angegebenen Konzentrationen der CD70-spezifischen monoklonalen Antikörper (IαhCD70 und 1F6) inkubiert und dann verwendet, um die IL8-Produktion in HT1080-CD27 Zellen zu stimulieren. Diese Kokultivierung wurde in einer 96-Well Platte über Nacht durchgeführt. Am nächsten Tag wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Konzentration and IL8 mittels ELISA bestimmt.

4.3 Gleichgewichtsbindungsstudien mit monomeren und trimeren GpL-Fusionsproteinen der IαhCD70-abgeleiteten scFv-Domäne

Die Bindungsstudien dienen zur Quantifizierung der Anzahl an CD70-Molekülen auf Mino- und OVCAR-3-Zellen, sowie zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten (K_D). Für die Bindungsstudien wurden ein monomeres und trimeres Fusionsprotein der scFv-Variante des IαhCD70 (scFv:IαhCD70) mit der *Gaussia princeps* Luziferase (GpL) generiert (Abb. 4), um zu untersuchen, ob die Avidität der IαhCD70-CD70 Interaktion einen deutlichen Einfluss auf die Konzentrationsabhängigkeit der CD70-Belegung durch den IαhCD70 Antikörper hat. Die stabile Trimerisierung von scFv:IαhCD70 wurde durch das fusionieren des C-Terminus der scFv-Domäne an die Trimerisierungsdomäne Tenascin-C (TNC) erreicht (Berg et al., 2007). Um in den Bindungsstudien mit den mono- und trimeren scFv:IαhCD70 Varianten gebundene Molekül detektieren zu können, wurde wiederum die sehr gut nachweisbare GpL-Domäne eingebracht.

scFv: α hCD70-2xFlag-GpL (Monomer)



scFv: α hCD70-Flag-TNC-GpL (Trimer)



Abb.4 Domänenstruktur der löslichen monomeren und trimeren scFv: α hCD70-GpL Konstrukte. N-terminal befindet sich die scFv: α hCD70 Domäne, gefolgt von einem Flag-Epitop und einer oligomerisierungsfähigen bzw. stabilisierenden TNC-Struktur, sowie C-terminal der *Gaussia princeps Luziferase* (GpL).

Zelluläre Gleichgewichtsbindungsstudien mit dem monomeren scFv: α hCD70-2xFlag-GpL und dem trimeren scFv: α hCD70-TNC-GpL Protein auf Mino- und OVCAR-3-Zellen ergaben K_D -Werte von rund 2300 (120 ng/ml) und 1300 (70 ng/ml) pM für die monomere scFv-Variante und von 160 (30 ng/ml) und 240 (40 ng/ml) pM für die trimere Variante (Abb. 5). Die Trimerisierung führte in beiden Zelllinien zur deutlichen Steigerung der apparenten Affinität der scFv: α hCD70-CD70 Interaktion. Demnach hat die Avidität der scFv: α hCD70-CD70 Interaktion, einen deutlichen Effekt auf die Belegung von CD70. Zudem konnte die ungefähre Rezeptoranzahl für Mino-Zellen auf durchschnittlich etwa 110000 und bei OVCAR-3-Zellen auf ca. 25000 Antigene pro Zelle bestimmt werden.

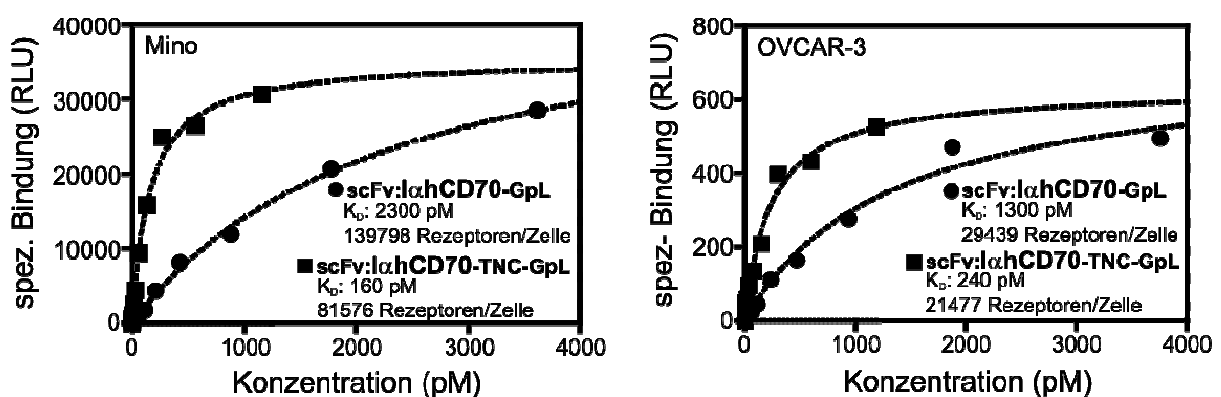


Abb.5 Die scFv-Domäne des CD70-spezifischen monoklonalen Antikörpers α hCD70 bindet an zelluläres CD70. Für die Gleichgewichtsbindungsstudien mit OVCAR-3- und Mino-Zellen wurden monomere und trimere scFv: α hCD70-GpL Fusionsproteine benutzt. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der beiden GpL-Fusionsproteine, in Anwesenheit und Abwesenheit des parentalen α hCD70 Antikörpers (10 μ g/ml), für jeweils

eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die spezifische Bindung ergab sich als Differenz aus totaler (ohne Ak) und unspezifischer Bindung (mit Ak, siehe auch Material & Methoden). Die Daten wurden mittels nicht linearer Regression mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism 5.0* gefittet.

Zusammenfassend belegen die bisherigen Daten eine hohe Affinität von l α hCD70 für zellmembrangebundenes hCD70 und demonstrieren auch die prinzipielle Funktionalität der scFv-Domäne.

4.4 Charakterisierung von TRAILR1- und TRAILR2-spezifischen TRAIL-Mutanten mittels zellulären Bindungsstudien

Kürzliche Studien zeigten, dass TRAIL-Todesrezeptor-spezifische Mutanten eine höhere spezifische Aktivität als das Wildtyp Molekül haben (Reis et al., 2010). Diese Mutanten sollten auch in unserer Arbeit verwendet werden. Aufgrund dessen wurde zunächst in das TNC-TRAIL Konstrukt, das bereits früher von unserer Arbeitsgruppe publiziert wurde (Berg et al., 2007), die kürzlich publizierten Mutationen, welche die Spezifität für TRAILR1 (G131R/R149I/S159R/N199R/K201H/S215D; TRAILmutR1) und TRAILR2 (Y189Q/R191K/Q193R/H264R/I266L/D267Q; TRAILmutR2) gewähren, eingeführt (MacFarlane et al., 2005b; Reis et al., 2010). Die Rezeptorspezifität von diesen TRAIL-Mutanten wurde bisher hauptsächlich über zellfreie Experimente analysiert. Deshalb wurde zunächst die spezifische TRAIL-Rezeptorbindung (TRAILR1-4) der TRAIL-Mutanten auch in zellulären Gleichgewichtsbindungsstudien geprüft. Hierfür wurden die TNC-TRAIL Varianten mit einer N-Terminalen GpL-Domäne versehen, um die Quantifizierung von zellgebundenen Molekülen zu erlauben. Die Gleichgewichtsbindungsstudien wurden mit TRAILR1, TRAILR2, TRAILR3 und TRAILR4 transfizierten Hek293-Zellen durchgeführt. Mock transfizierte Hek293-Zellen, welche kein TRAILR1 und TRAILR3 exprimieren und nur eine moderate endogene Expression von TRAILR2 und TRAILR4 besitzen, wurden parallel zur Bestimmung der unspezifischen Bindung analysiert (Abb. 6).

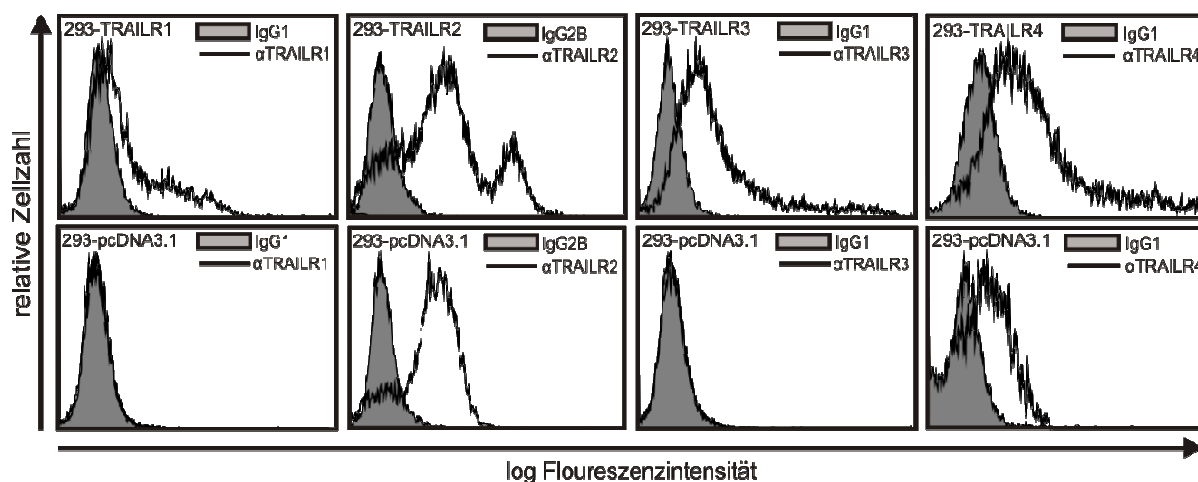


Abb.6 FACS-Analyse der TRAIL-Rezeptorexpression auf TRAILR1-, TRAILR2-, TRAILR3- und TRAILR4- sowie mock-transfizierten Hek293-Zellen. Hek293-Zellen wurden mit einem TRAILR-Expressionsvektor (TRAILR1-4) oder einem Kontrollplasmid (pcDNA3.1) transient transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen im FACS auf die TRAILR-Oberflächenexpression hin untersucht.

Für das GpL-TNC-TRAIL Konstrukt wurden K_D -Werte für TRAILR1 und TRAILR2 von 3849 und 640 pM ermittelt. Erwartungsgemäß wurden auch signifikante Bindungen in den TRAILR3- und TRAILR4-transfizierten Hek293-Zellen detektiert. Der K_D -Wert der Interaktion von GpL-TNC-TRAILmutR1 mit TRAILR1 wurde mit 1574 pM ermittelt (Abb. 7). Die signifikante Bindung von GpL-TNC-TRAILmutR1 an TRAILR2-transfizierte Zellen, war mehr als das 4 fache schwächer, als mit GpL-TNC-TRAILmutR2 und GpL-TNC-TRAIL (Abb. 7). Das Ergebnis legt nahe, dass die Bindung nicht von der Bindung an TRAILR2 herrührt, sondern das dies eher die Bindung an den endogenen TRAILR4 und/oder Heterokomplexen von TRAILR2 und TRAILR4 reflektiert (Clancy et al., 2005; Lee et al., 2005). Die Affinität der Interaktion von GpL-TNC-TRAILmutR2 mit TRAILR2 war 439 pM, während keine Bindung an den TRAILR1 detektierbar war (Abb. 7). GpL-TNC-TRAILmutR1 und -TRAILmutR2 interagieren auch mit TRAILR3 und TRAILR4. Die GpL-TNC-TRAILmutR2 Bindung ist jedoch bei beiden Rezeptoren TRAILR3 und TRAILR4 erheblich schwächer, als die Bindung von TRAILmutR1 (Abb. 7).

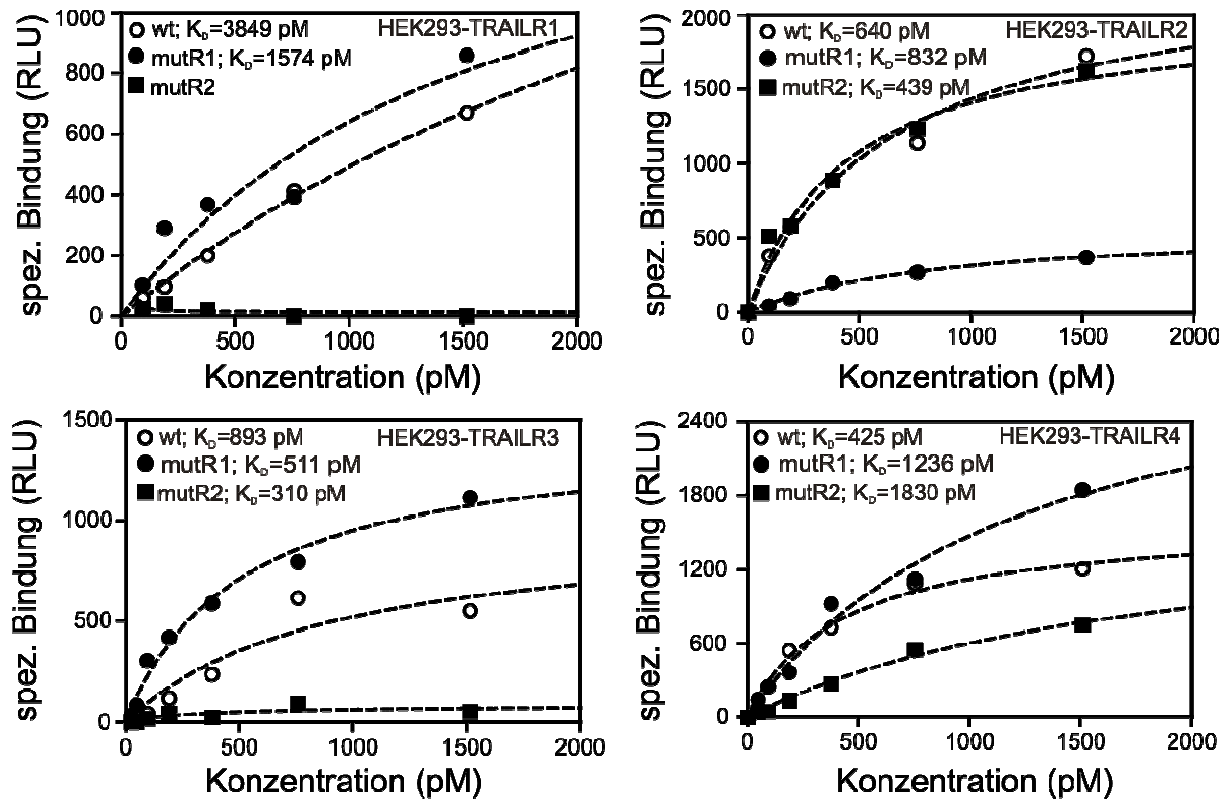


Abb.7 Bindung TRAIL-Todesrezeptor-spezifischer Mutanten an TRAILR-Transfektanten. Hek293-Zellen, welche nur TRAILR2 und TRAILR4 endogen exprimieren, wurden transient mit Expressionskonstrukten, die für die 4 Typen von TRAIL-Rezeptoren kodieren, transfiziert. Am nächsten Tag wurden bei 37 °C Gleichgewichtsbindungsstudien mit GpL-TNC-TRAIL, GpL-TNC-TRAILmutR1 und GpL-TNC-TRAILmutR2 durchgeführt. Die mock-transfizierten Zellen dienen zur Bestimmung der unspezifischen Bindung.

Die deutliche Diskriminierung von GpL-TNC-TRAILmutR1 und GpL-TNC-TRAILmutR2 zwischen den zwei TRAIL-Todesrezeptoren wurde zusätzlich und eindeutig in *in vitro* Bindungsstudien mit immobilisierten TRAILR1_{ed}-Fc und TRAILR2_{ed}-Fc bewiesen (Abb. 8). Hier zeigte sich, dass bei TRAILR1 keine Interaktion mit TRAILmutR2, sowie bei TRAILR2, keine signifikante Bindung mit TRAILmutR1 erfolgt. Nur der TRAIL-Wildtyp band signifikant an beide TRAIL-Todesrezeptoren (Abb. 8).

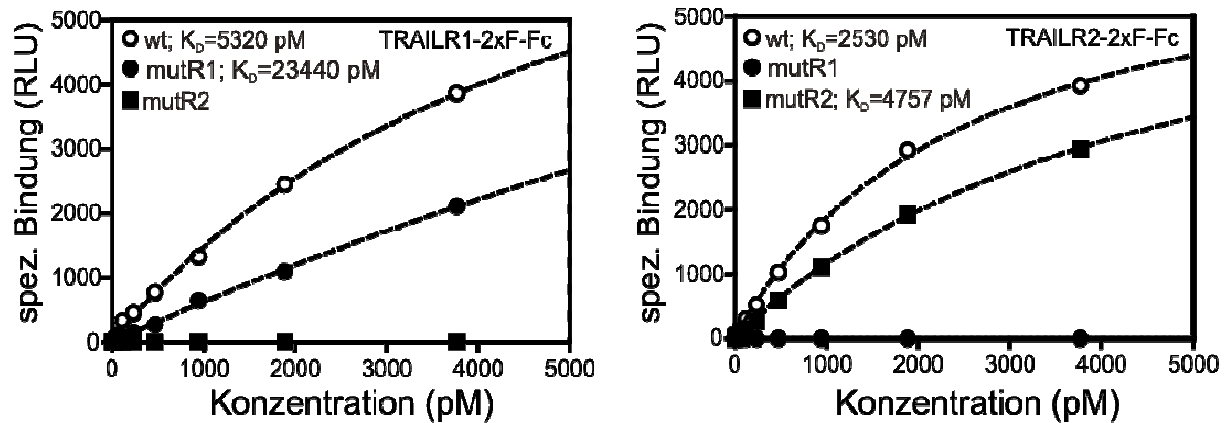


Abb.8 Bindung TRAIL-Todesrezeptor-spezifischer Mutanten an immobilisierte TRAILR-Fc-Fusionsproteine. Schwarze 96-Well ELISA-Platten wurden über Nacht mit ProteinG (0,5 $\mu\text{g/ml}$) ge-coated und für 2 h mit TRAILR1_{ed}-Fc oder TRAILR2_{ed}-Fc (~1 $\mu\text{g/ml}$) beladen. Ein Teil der Platte verblieb unbehandelt, um die unspezifischen Bindung zu detektieren. Nach Entfernung der ungebundenen TRAILR_{ed}-Fc-Moleküle, wurden die angegebenen Konzentrationen von GpL-TNC-TRAIL, GpL-TNC-TRAILmutR1 und GpL-TNC-TRAILmutR2 für 1 h bei 37 °C hinzugegeben, dann gewaschen und letztendlich die Well-assoziierte Luziferase-Aktivität quantifiziert.

4.5 Charakterisierung der TRAILR1- und TRAILR2-spezifischen TRAIL-Mutanten in Zytotoxizitätsexperimenten

Als nächstes wurde die Zelltod-induzierende Aktivität der TNC-TRAIL-Varianten mit und ohne Oligomerisierung mittels des Flag-spezifischen mAk M2 in der Jurkat T-Zelllinie, welche nur TRAILR2 exprimieren, sowie in Mino- und OVCAR-3-Zellen, welche beide sowohl TRAILR1 als auch TRAILR2 exprimieren, analysiert (Abb. 9).

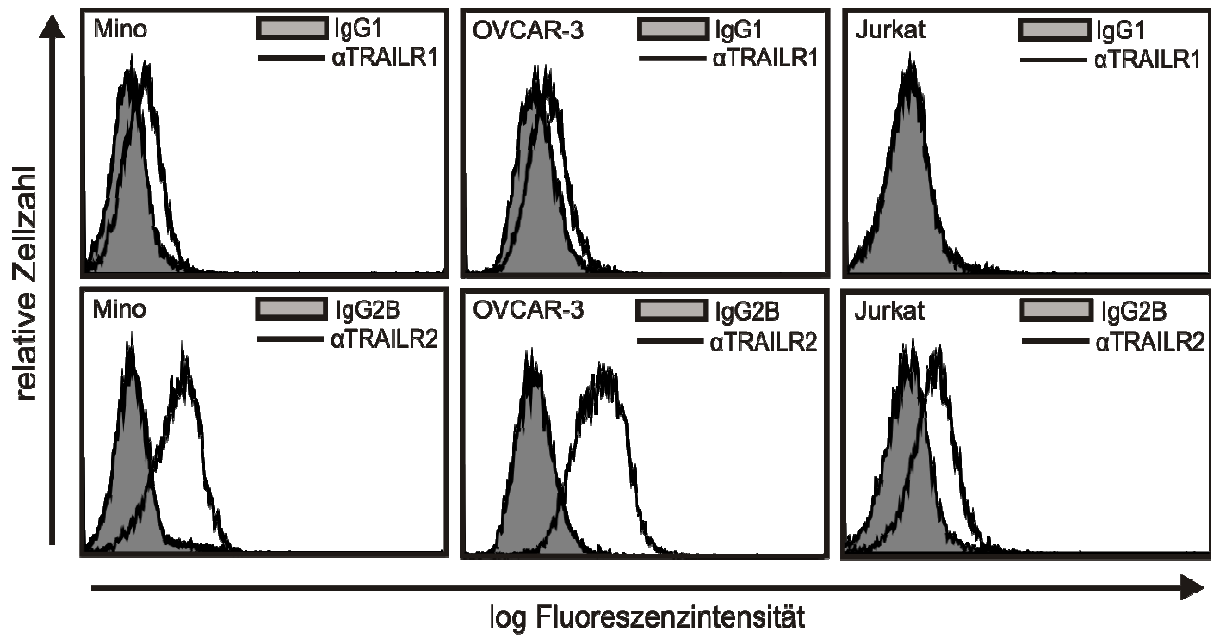


Abb.9 FACS-Analyse der endogenen TRAILR1- und TRAILR2 Zelloberflächenexpression auf Mino-, OVCAR-3- und Jurkat-Zellen. OVCAR-3-, Mino- und Jurkat-Zellen wurden mit TRAILR1- und TRAILR2-spezifischen PE-markierten Antikörpern behandelt/inkubiert und mittels FACS analysiert.

Im Folgenden wurden die verschiedenen TRAIL-TNC-Varianten auf ihre Aktivität hin getestet. Vitalitätsexperimente (Abb. 10) als auch Western-Blot Analysen der Prozessierung von Caspasen (Abb. 11) bestätigten die starke TRAILR1- bzw. TRAILR2-Präferenz der TRAILmutR1- und TRAILmutR2-Variante. Wie schon in früheren Studien beobachtet (Berg et al., 2007), resultiert die anti-Flag Oligomerisierung von Flag-getaggten TNC-TRAIL Varianten, in einer starken Erhöhung der Zelltodinduktion (Abb. 10). Die oligomerisierten TRAIL-TNC-Varianten waren sehr viel besser in der Lage eine effektive Apoptose zu induzieren als die unvernetzten Trimeren. Bei den TRAILR2-positiven Jurkat-Zellen lag die zytotoxische ED_{50} bei etwa 10 und 1 pM und wurde nur durch den TRAIL-Wildtyp(wt) sowie die TRAILmutR2-Variante vermittelt. Nur die oligomerisierten Formen von TRAILwt und TRAILmutR2 zeigten einen robusten toxischen Effekt, welcher sich in einer um das 1000 fach niederen ED_{50} widerspiegelte. Insbesondere zeigte sich eindeutig, dass die TRAILmutR1-Variante keinen Zelltod über den einzig in Jurkat-Zellen vorhandenen TRAIL-Todesrezeptor, TRAILR2, vermitteln konnte. Die Rezeptorspezifität der einzelnen TRAIL-Varianten wurde damit bestätigt. Mit den OVCAR-3-Zellen wurde eine ED_{50} von etwa 8 pM für den oligomerisierten TRAILwt- bzw. TRAILmutR1- und von 2 pM für den oligomerisierten TRAILmutR2-Typ gefunden. Die ED_{50} -Konzentrationen der oligomerisierte Formen lagen für alle Varianten um einen Faktor 100 niedriger als die der trimeren Varianten. Auf Mino-

Zellen werden beide TRAIL-Todesrezeptoren exprimiert vor allem aber der TRAILR2 wie sich im FACS zeigte (Abb. 9). Bei den Mino-Zellen induzierten alle drei TRAIL-Konstrukte nur in ihrer oligomerisierten Form effektiv Apoptose. Die TRAILmutR2-Variante war am effektivsten mit einer ED_{50} von 8 pM für die oligomerisierte Form.

Zusammenfassend zeigten sich mit allen TRAIL-Varianten eine eindeutige Verstärkung der Apoptoseinduktion nach Quervernetzung.

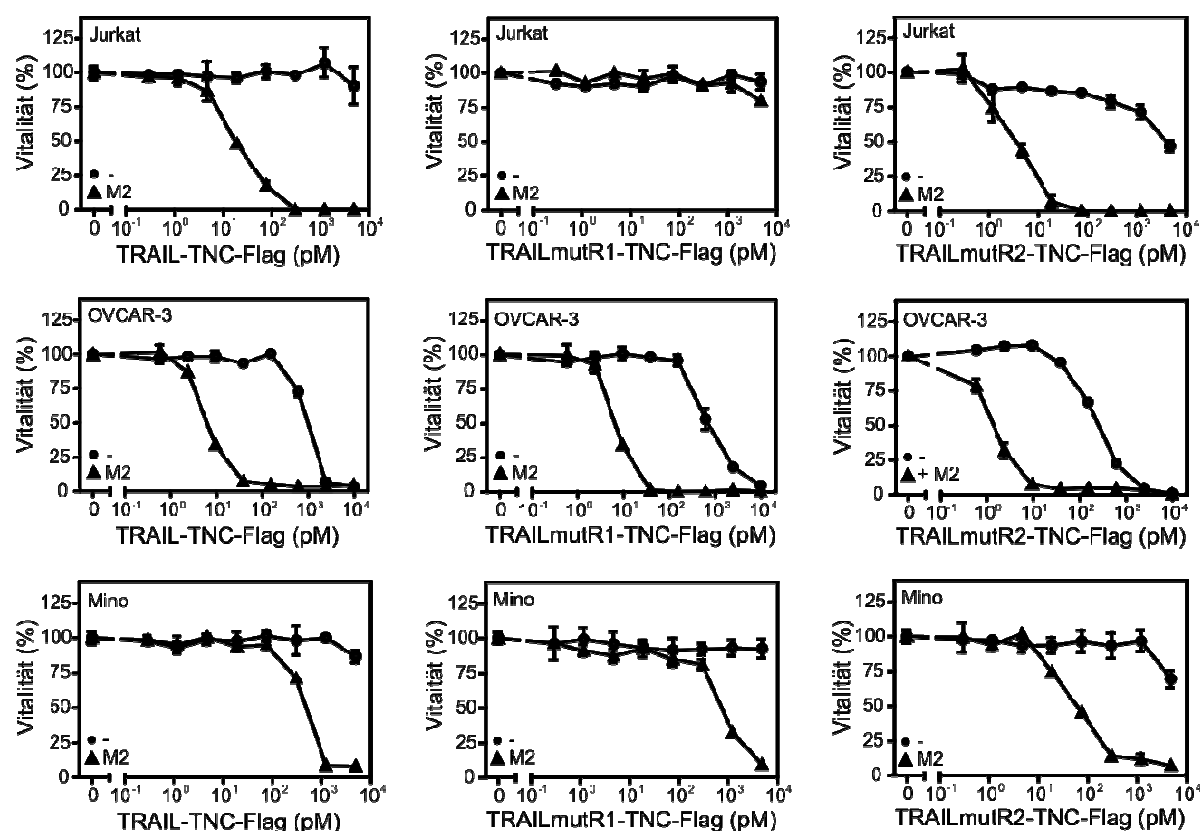


Abb.10 Apoptoseinduktion durch verschiedene TRAIL-Varianten. OVCAR-3-, Mino- und Jurkat-Zellen wurden in 96-Well Platten kultiviert (2 bzw. 6 x 10⁴ pro Well) und in Triplikaten mit den angegebenen Konzentrationen an Flag-TNC-TRAIL, Flag-TNC-TRAILmutR1 und Flag-TNC-TRAILmutR2 in Gegenwart und Abwesenheit von 1 µg/ml des anti-Flag mAk M2 über Nacht bei 37 °C stimuliert. Am nächsten Tag (20 h) wurde das zelluläre Überleben mit dem MTT-assay oder der Kristallviolett-Färbung bestimmt. OVCAR-3-Zellen wurden mit 2,5 µg/ml des Proteinbiosynthese-Inhibitors CHX (Cycloheximid) für die Apoptose-Induktion sensitiviert.

Die Apoptoseinduktion wurde weiterhin mittels WB-Analyse im Hinblick auf die Prozessierung der Initiatorcaspase Caspase-8, der Effektorcaspase Caspase-3 und PARP

bestätigt (Abb. 11). Alle TRAIL-Fusionskonstrukte zeigten auch hier eine klare apoptotische Induktion in Mino- und OVCAR-3-Zellen.

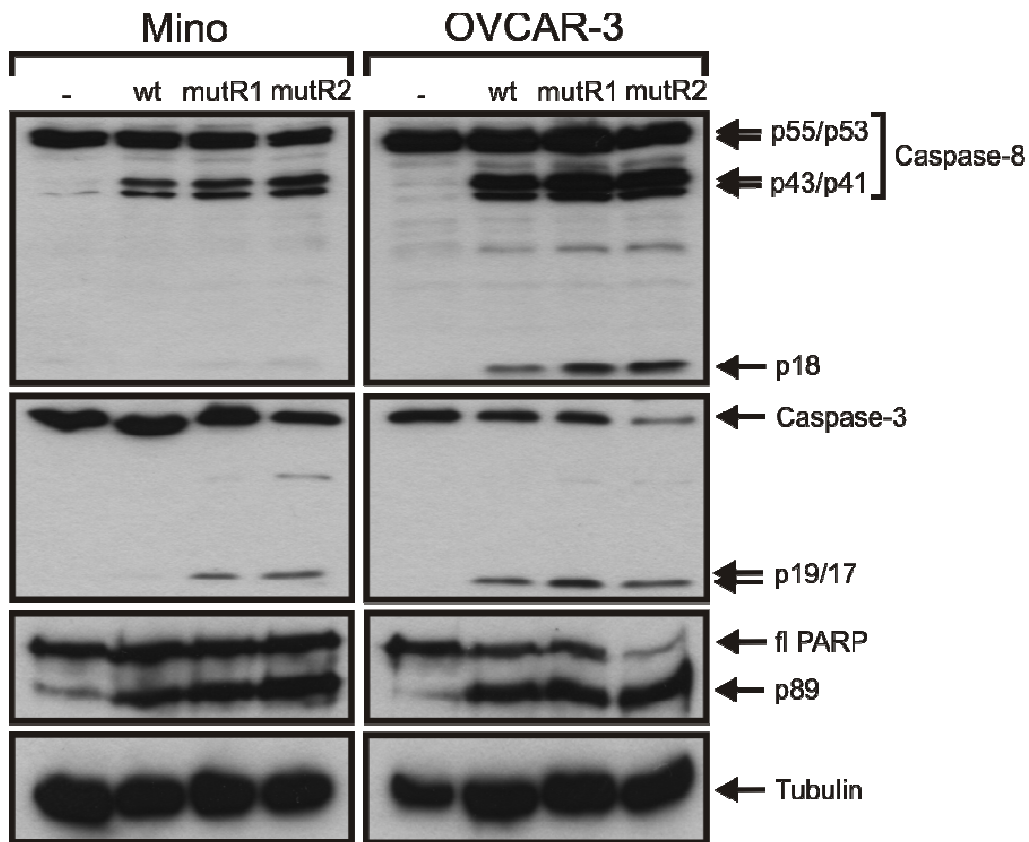


Abb.11 WB-Analyse der Prozessierung Apoptose-relevanter Proteine nach Stimulation mit quervernetzten TRAIL-Varianten. Die angegebenen Zelllinien wurden für 4-6 h mit 100 ng/ml der oligomerisierten (1 µg/ml anti-Flag mAk M2) Flag-TNC-TRAIL Varianten behandelt. Anschließend wurden Totalzelllysate mittels Western *blotting* bezüglich der Prozessierung von Apoptose-involvierten Proteinen hin getestet. OVCAR-3-Zellen wurden für die Apoptoseinduktion wiederum mit CHX (2,5 µg/ml) sensitiviert.

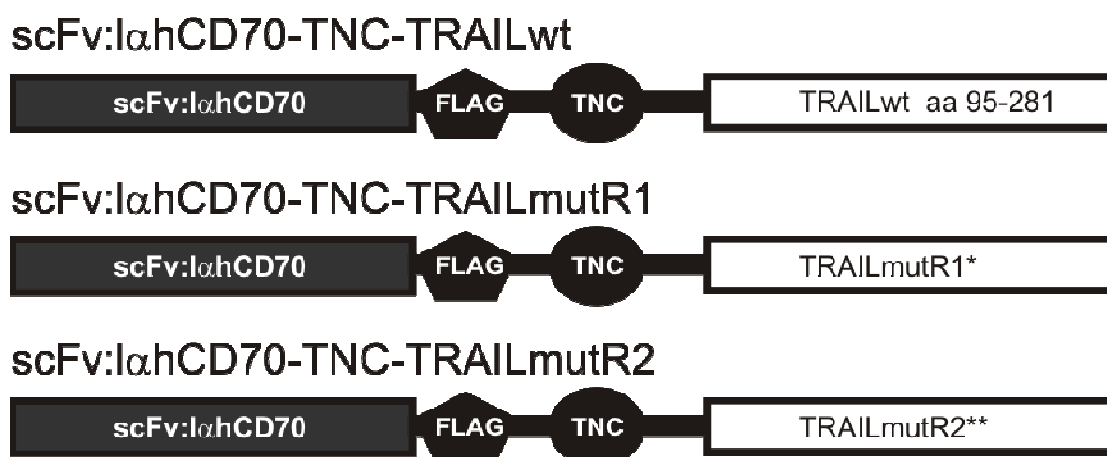
Nach der Charakterisierung der verschiedenen TRAIL-Varianten und des antagonistischen IahCD70 Antikörpers, wurden nun die gewünschten scFv-TRAIL-Fusionsproteine kloniert. Die Fusion des blockierenden CD70-spezifischen scFv mit TRAIL, sowie mit den TRAILR1- und TRAILR2-spezifischen TRAIL-Mutanten wurde aus zwei Gründen angestrebt. Der erste Grund war, die limitierte Aktivität von gelösten TRAIL über die Verankerung an CD70 zu erhöhen. Die zweite Absicht bestand darin, die Verankerungs-vermittelte Steigerung der TRAIL-Aktivität mit der Inhibierung der CD70-vermittelten protumoralen Aktivität zu verbinden. Dies sollte es erlauben, TRAIL-Todesrezeptoren in CD70-positiven Tumoren mit höherer Spezifität und weniger Nebeneffekten zu stimulieren. Denn die gerade in klinischen

Studien untersuchten TRAILR1/2-adressierenden Reagenzien erwiesen sich einerseits als sicher, aber andererseits als nur mäßig aktiv (siehe Einleitung).

Die Zelloberflächenverankerung von TRAIL erhöhte zwar stark die spezifische Aktivität, aber könnte auch unter Umständen, unvorhergesehene Nebeneffekte auf untransformierten bzw. gesunden Zellen haben. In diesem spekulativen Fall würden TRAIL-Todesrezeptor-spezifische TRAIL-Mutanten helfen, die potentiellen Nebeneffekte zu reduzieren, welche mit der Aktivierung des TRAIL-Todesrezeptortyps, der nicht oder weniger relevant für die Apoptoseinduktion in dem gezielten Tumortyp ist, verbunden sind. Tatsächlich sind eine Reihe von Tumorentitäten hauptsächlich sensitiv für Apoptoseinduktion via einen der beiden TRAIL-Todesrezeptoren. Zum Beispiel sind chronisch lymphatische Leukämiezellen (CLL) und Pankreastumore hauptsächlich TRAILR1 sensitiv, obwohl sie auch funktionellen TRAILR2 exprimieren (Lemke et al., 2010; MacFarlane et al., 2005a; Stadel et al., 2010).

4.6 Generierung und Charakterisierung der scFv:I α hCD70-TRAIL-Fusionsproteine

Nach der Charakterisierung des I α hCD70 Antikörpers (Abb. 2-5) und der verschiedenen TRAIL-TNC-Varianten (Abb. 7-11), wurden die verschiedenen scFv:I α hCD70-TRAIL-Fusionsproteine kloniert (Abb. 12), produziert und aufgereinigt (Abb. 13) sowie auf ihre Funktionalität hin getestet (Abb. 15-20).



*TRAILmutR1: G131R-R149I-S159R-N199R-K201H-S215D

**TRAILmutR2: Y189Q-R191K-Q193R-H264R-I266L-D267Q

Abb.12 Domänenstruktur der scFv:I α hCD70-TRAIL-Fusionsproteine. Schematische Darstellung der scFv:I α hCD70-TRAIL-Fusionsproteine. scFv:I α hCD70, hCD70-spezifisches scFv (*single chain variables Fragment*); Flag-tag; TNC, Trimerisierungsdomäne des

Tenascin-C-Moleküls; TRAIL, TRAILmutR1 und TRAILmutR2, Aa 95-281 TRAIL, TRAILR1- oder TRAILR2-spezifische Mutanten.

Die eukaryotisch produzierten scFv:IahCD70-Flag-TNC-TRAIL-Fusionsproteine wurden mittels Affinitätschromatographie mit anti-Flag-Agarose aufgereinigt. Die Detektion und Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Fusionsproteine wurden durch eine Silbergefärbung ermöglicht. Das Silbergel zeigte eine saubere Aufreinigung der ca. 55 kDa scFv:IahCD70-Flag-TNC-TRAIL Fusionsproteine (Abb. 13, schwarzer Pfeil). Anschließend wurden für die Integrität und Funktionalität der Fusionsproteine verschiedene *Bioassays* durchgeführt.

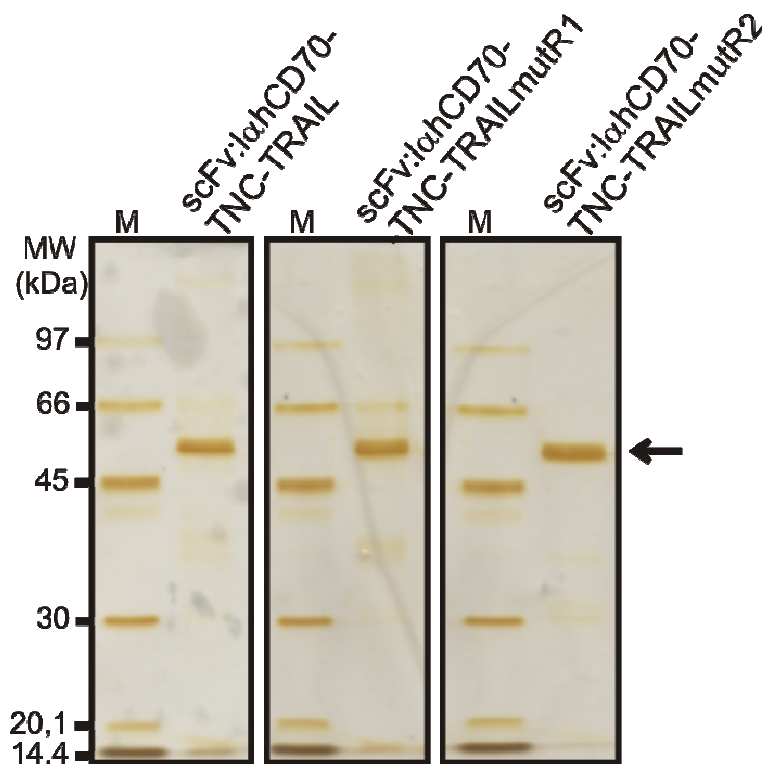


Abb.13 SDS-PAGE und Silberfärbung der aufgereinigten scFv:CD70-TNC-TRAIL Fusionsproteine. Die Zellüberstände von stabil transfizierten Hek293-Zellen, die scFv:IahCD70-TNC-TRAIL, -TNC-TRAILmutR1 und -TNC-TRAILmutR2 exprimieren, wurden mittels Affinitätschromatographie mit anti-Flag-Agarose aufgereinigt. Es wurden jeweils 100 ng von den aufgereinigten scFv:IahCD70-TNC-TRAIL-Fusionsproteinen aufgetragen.

4.7 scFv:lahCD70-TRAIL-Varianten zeigten eine CD70-abhängige Aktivierung des TRAILR1 und TRAILR2

Frühere Studien z.B. mit scFv:C54-sTRAIL und scFv:CD7-sTRAIL, die an C54 bzw. CD7 binden, demonstrierten, dass Zelloberflächenantigen-spezifische scFv-TRAIL-Fusionsproteine eine gezielte TRAIL-Todesrezeptoraktivierung auf Tumorantigen exprimierenden Zellen erlauben (Bremer et al., 2004; Bremer et al., 2005a; de Bruyn et al., 2010; Schneider et al., 2010; Stiegelmaier et al., 2008; Wajant et al., 2001). scFv-TRAIL-Fusionsproteine zeigen somit ein *Prodrug* ähnliches Verhalten, in der die Bindung der scFv Domäne die TRAIL-Domäne aktiviert. Die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie werden durch die membrangebundenen Formen ihrer Liganden potent aktiviert, hingegen die meisten TNF-Rezeptoren durch die Bindung ihrer gelösten Liganden jedoch nicht aktiviert werden. In der Vergangenheit wurde bereits gut etabliert, dass die gelösten trimeren TRAIL-Varianten nicht fähig sind eine robuste TRAILR2-vermittelte Apoptose zu vermitteln und diese nur durch Membranständigkeit oder Quervernetzung von TRAIL induziert wird (Kelley et al., 2005; Wajant et al., 2001). In dieser Studie wurde nun getestet, ob die scFv:lahCD70-TRAIL-Fusionsproteine auch eine CD70-abhängige *Prodrug*-Aktivierung des TRAILR1 und TRAILR2 zeigen.

Zu Beginn wurde die TRAILR1- und CD70-negative Zelllinie HT1080 transient mit hCD70 bzw. dem Leervektor pcDNA3.1, transfiziert (Abb. 14). scFv:lahCD70-TNC-TRAIL und scFv:lahCD70-TNC-TRAILmutR2 nicht aber scFv:lahCD70-TNC-TRAILmutR1 induzierten signifikanten Zelltod in hCD70- und mock-transfizierten HT1080-Zellen (Abb. 15). Die Apoptoseinduktion durch scFv:lahCD70-TNC-TRAIL (ED_{50} : mock 80 ng/ml; CD70: 8 ng/ml) und scFv:lahCD70-TNC-TRAILmutR2 (ED_{50} : mock 12 ng/ml; CD70 2 ng/ml) war in den hCD70-transfizierten Zellen verstärkt. Die Zugabe des blockierenden anti-CD70-Antikörpers (ahCD70) zeigte keinen Effekt auf die Dosis-Antwort-Beziehung der Apoptoseinduktion in den mock-transfizierten HT1080-Zellen, erhöhte jedoch die EC_{50} -Konzentration in den CD70-Transfektanten was die teilweise CD70-Abhängigkeit des apoptotischen Effekts bestätigte (Abb. 15). Zusammenfassend zeigte sich folglich, dass die Bindung an membranständigen hCD70 eine verstärkte Stimulation des TRAILR2 durch scFv:lahCD70-TNC-TRAIL-Fusionsproteine auslöst.

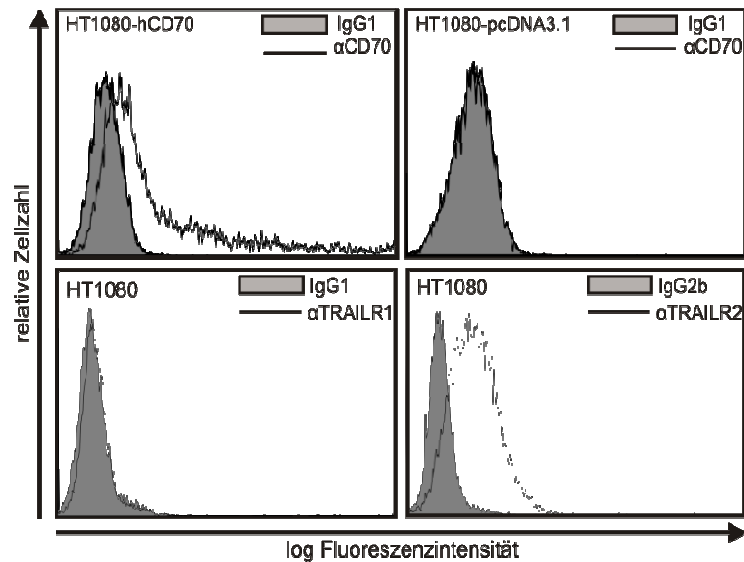


Abb.14 transiente Expression von hCD70 auf HT1080-Zellen. FACS-Analyse der CD70-Expression von HT1080-Zellen, die über Nacht transient mit einem Expressionsplasmid, das für hCD70 kodiert, sowie dem Leervektor pcDNA3.1, transfiziert wurden. Zudem wurde die endogene TRAILR1/2-Expression von HT1080 analysiert. Die Detektionen erfolgten mit entsprechenden FACS-Antikörpern.

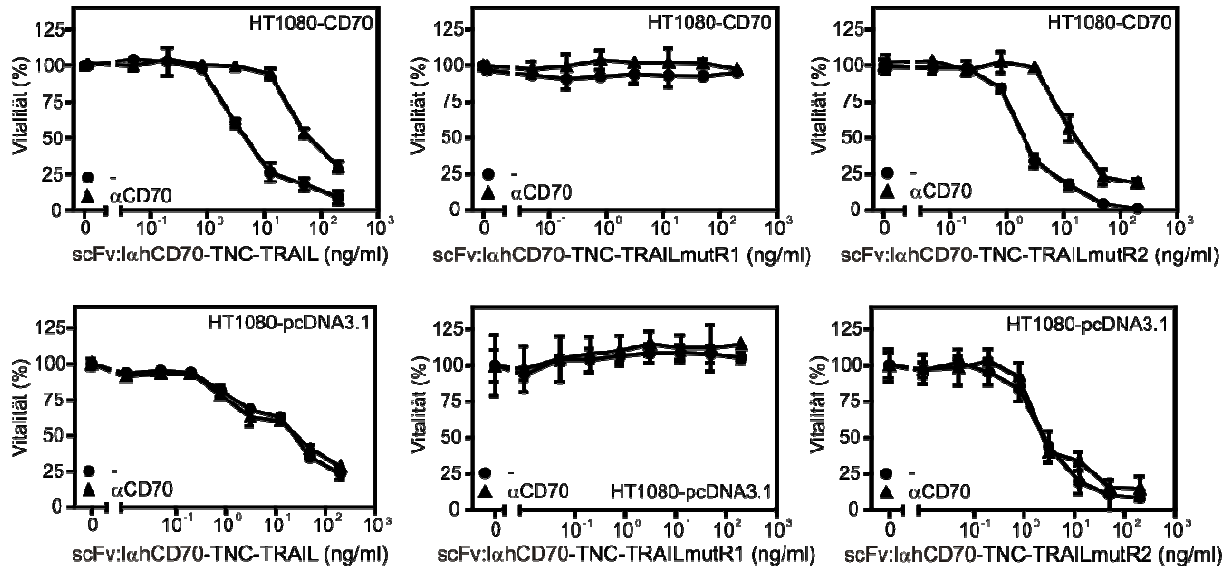


Abb.15 Apoptoseinduktion in CD70-Transfektanten durch scFv:CD70-TRAIL Fusionsproteine. HT1080-Zellen wurden mit einem CD70-Expressionsplasmid oder Kontrollplasmid transient transfiziert. Am nächsten Tag wurden die transfizierten Zellen für einen zusätzlichen Tag mit den angegebenen Konzentrationen an scFv:lahCD70-TNC-TRAIL, scFv:lahCD70-TNC-TRAILmutR1 und scFv:lahCD70-TNC-TRAILmutR2 in Abwesenheit und Präsenz des blockierenden konventionellen lahCD70-spezifischen Antikörpers (α CD70, 10 μ g/ml) stimuliert.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die scFv:CD70-TRAIL-Fusionsproteine auf CD70 endogen exprimierende und CD70-negativen Tumorzellen getestet. Hierfür wurden wiederum die CD70-negativen Jurkat-Zellen und die CD70-positiven Mino- bzw. OVCAR-3-Zellen verwendet (Abb. 16).

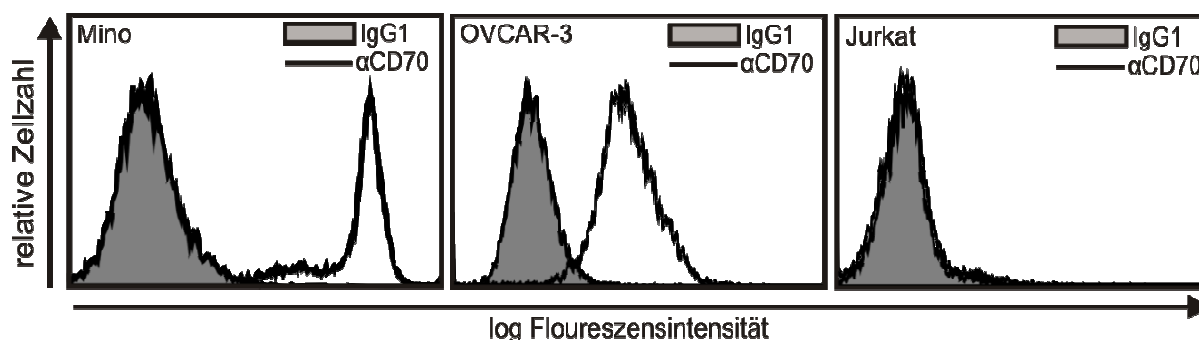


Abb.16 FACS-Analyse der CD70-Zelloberflächenexpression auf Mino-, OVCAR-3- und Jurkat-Zellen. Die angegebenen Zelllinien wurden auf die CD70-Zelloberflächenexpression hin mittels FACS und entsprechenden Antikörpern analysiert.

Um die CD70-abhängige TRAIL-vermittelte apoptotische Aktivität zu testen wurden die Zellen in Abwesenheit und in Gegenwart des kompetierenden konventionellen CD70-spezifischen Antikörpers (lahCD70) mit den Fusionsproteinen behandelt. Im Gegensatz zu der TNC-TRAIL- und TNC-TRAILmutR2-Variante (Abb. 10), zeigten die entsprechenden scFv:lahCD70-TRAIL-Fusionsproteine bei höheren Konzentrationen eine deutliche Zelltodinduktion in Jurkat-Zellen, welche sich aber nicht durch die Kobehandlung mit dem CD70-blockierenden Antikörper inhibieren lies (Abb. 17). Die CD70-bindungsunabhängige Zytotoxizität von scFv:lahCD70-TNC-TRAIL und scFv:lahCD70-TNC-TRAILmutR2 auf Jurkat-Zellen, spiegelt daher wahrscheinlich die erhöhte Aktivität einer Subfraktion aggregierter Moleküle wieder. Bedeutender ist jedoch, dass in den CD70-exprimierenden Mino- und OVACR-3-Zellen die scFv:lahCD70-TRAIL-Fusionsproteine schon bei geringen Konzentrationen CD70-abhängig effizient Apoptose induzierten (1-10 ng/ml). So erhöhten sich die EC_{50} -Werte der drei verschiedenen scFv:lahCD70-TRAIL-Varianten um etwa das 10-100 fache, wenn der Zugang der scFv-TRAIL-Fusionsproteine zu memCD70 mit dem kompetierenden hCD70-Antikörper lahCD70 blockiert wurde (Abb. 17).

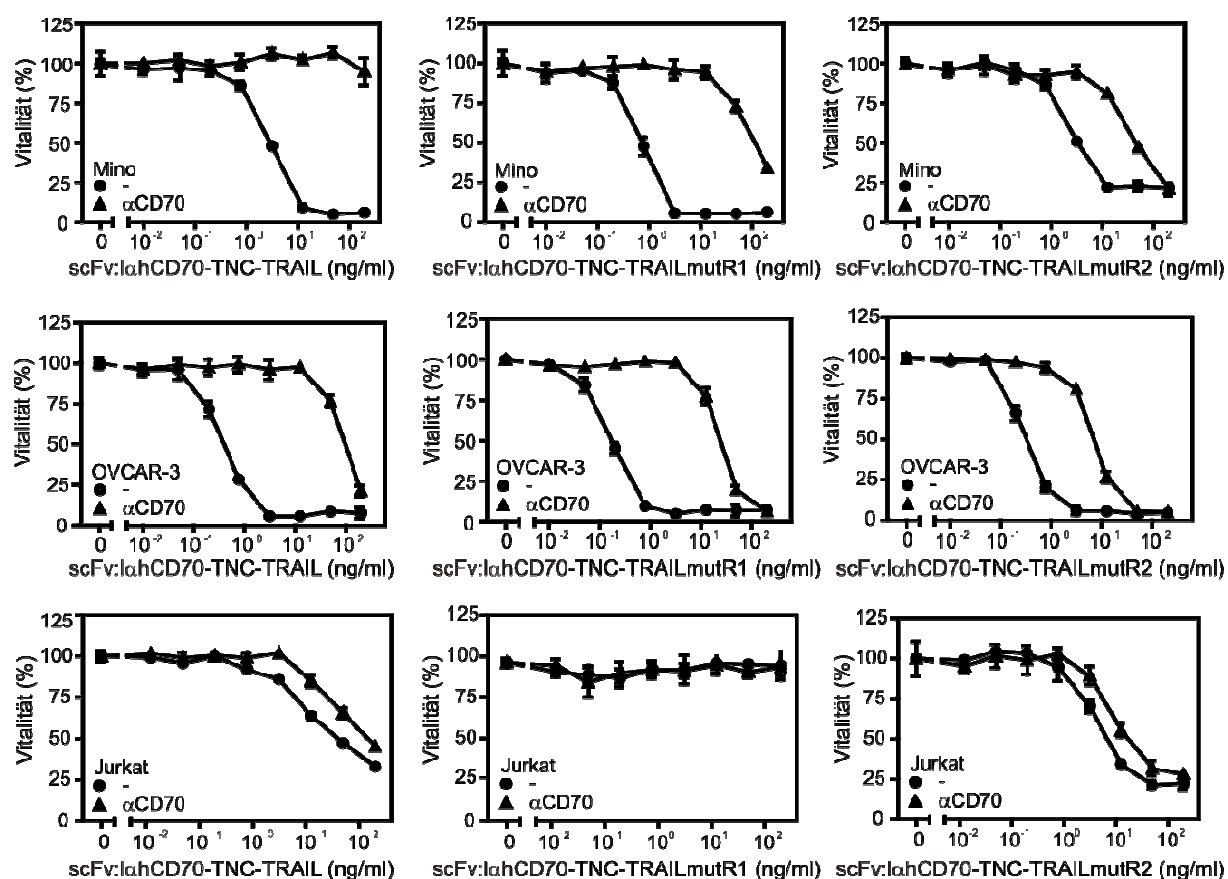


Abb.17 scFv:lahCD70-TRAIL, scFv:lahCD70-TRAILmutR1 und scFv:lahCD70-TRAILmutR2 induzieren CD70-abhängig Apoptose. OVCAR-3-, Mino- und Jurkat-Zellen wurden in 96-Well Platten kultiviert und eine Hälfte der Zellen wurde mit 10 µg/ml des kompetierenden konventionellen hCD70-Antikörpers lahCD70 (αCD70) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C in Triplikaten mit den angegebenen Konzentrationen an scFv:lahCD70-TNC-TRAIL, scFv:lahCD70-TNC-TRAILmutR1 und scFv:lahCD70-TNC-TRAILmutR2 stimuliert. Die überlebenden Zellen wurden mit Hilfe des MTT-assay oder der Kristallviolett-Färbung quantifiziert. OVCAR-3-Zellen wurden durch Zugabe von 2,5 µg/ml CHX für die Apoptesinduktion sensitiviert.

In Übereinstimmung mit der verstärkten CD70-abhängigen TRAIL-Todesrezeptor-Aktivierung durch die scFv:lahCD70-TRAIL-Fusionsproteine konnte die durch diese induzierte Prozessierung der Caspase-8 und der Caspase-3 sowie des Caspase-3-Substrats PARP, durch blockierende CD70-Antikörper inhibiert werden (Abb. 18).

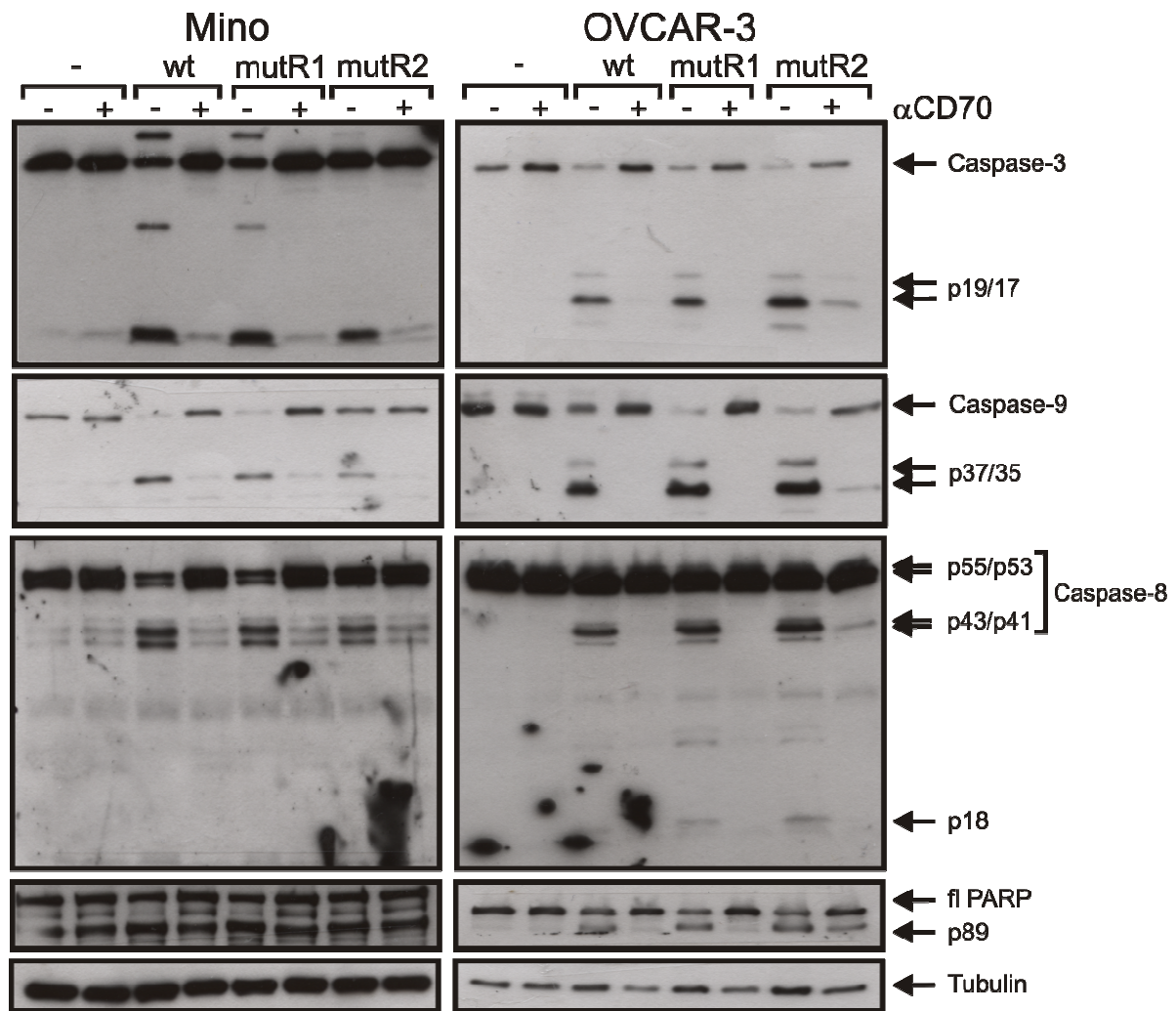


Abb.18 WB-Analyse der Apoptoseinduktion durch scFv:lahCD70-TRAIL, scFv:lahCD70-TRAILmutR1 und scFv:lahCD70-TRAILmutR2. Die angegebenen Zelllinien wurden in der Anwesenheit und Abwesenheit von 10 μ g/ml des konventionellen CD70-spezifischen Antikörpers lahCD70 (α CD70) mit 100 ng/ml scFv:lahCD70-TNC-TRAIL, scFv:lahCD70 TNC-TRAILmutR1 und scFv:lahCD70-TNC-TRAILmutR2 für 4-6 h stimuliert. Die Totalzelllysate wurden mittels Western *blotting* auf die Prozessierung der angezeigten Proteine hin untersucht.

Um zu prüfen, ob die trimere Struktur des hCD70-Antikörpers (lahCD70-TNC) in den scFv:lahCD70-TRAIL-Fusionsproteinen womöglich per se CD70-vermittelt für die TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert, wurden die CD70-positiven Mino-Zellen mit den trimeren TNC-TRAIL-Varianten in Abwesenheit und Präsenz von hohen Konzentrationen des trimeren scFv:lahCD70-TNC-GpL Fusionsproteins inkubiert und die Vitalität bestimmt (Abb. 19). In dieser Art von Experimenten zeigte sich, dass das trimere scFv:lahCD70-TNC-GpL Molekül weder selbst Zelltod auslöst, noch die Apoptose, die durch TNC-TRAIL oder oligomeres TNC-TRAIL induziert wird, beeinflusst (Abb. 19 linkes und mittleres Panel). Allerdings löste

wie erwartet vor allem nur die oligomerisierte und die zum Vergleich mituntersuchte bzw. membranverankerte TRAIL-Form (scFv:lahCD70-TRAIL-Fusionsproteine) eine robuste apoptotische Aktivität aus. Die starke apoptotische Aktivität der scFv:lahCD70-TRAIL-Fusionsproteine wurde dabei durch Zugabe des trimeren scFv:lahCD70-GpL-Moleküls wiederum inhibiert (Abb. 19 rechtes Panel). Die apoptotische Aktivität der Zelloberflächenverankerten TRAIL-Fusionsproteine zeigten eine im Vergleich zu den oligomerisierten TRAIL-Varianten sogar etwas erhöhte Aktivität. Zusammenfassend zeigte sich deutlich, dass keine CD70-abhängige Erhöhung der apoptotischen Aktivität von TRAIL erfolgt, wenn die scFv:lahCD70- und die TRAIL-Domäne getrennt, d.h. in Form zweier einzelnen Moleküle, zur Zellstimulation verwendet werden.

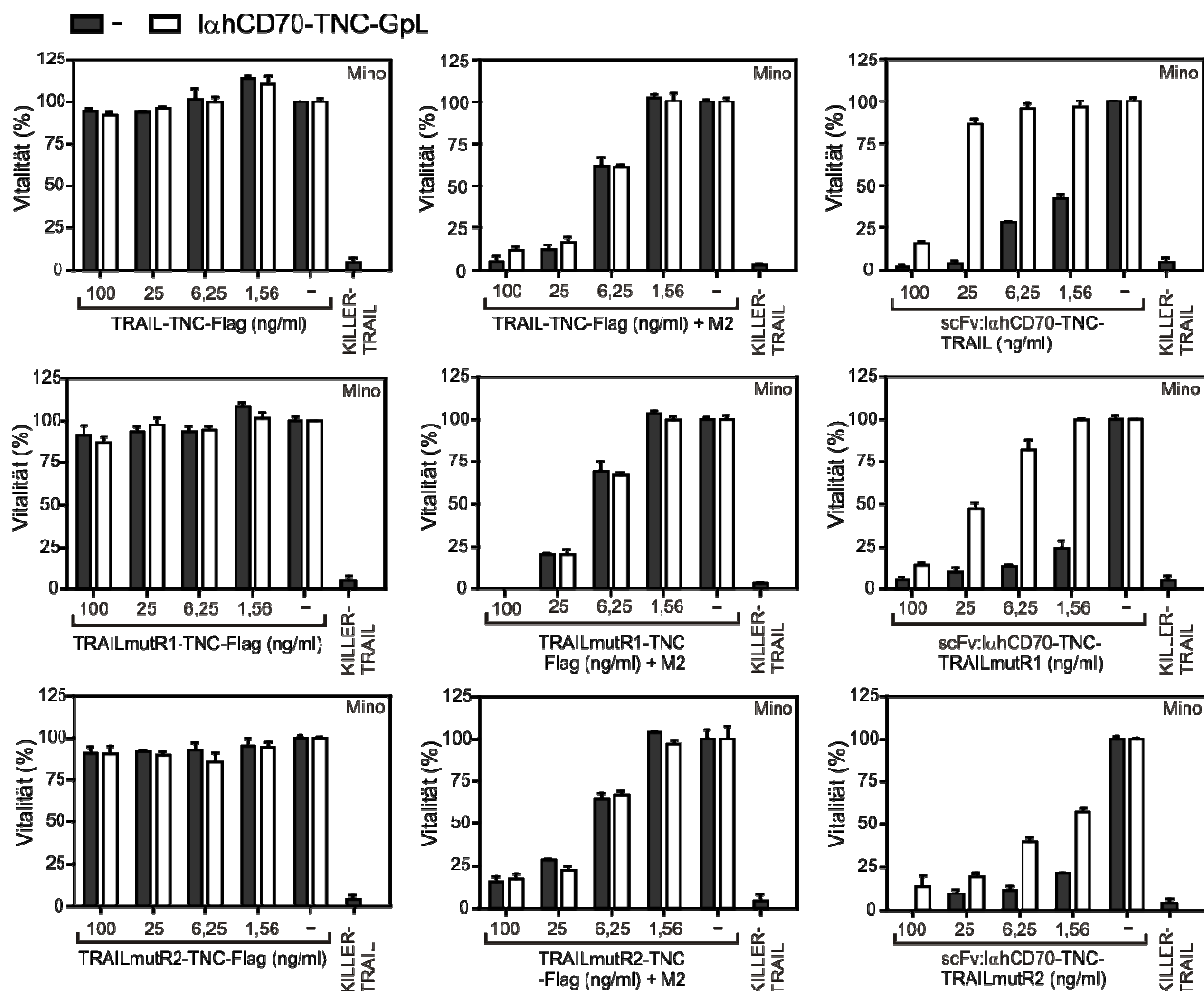


Abb.19 CD70-Blockade hat keinen Effekt auf die Zelltodinduktion durch konventionelle TRAIL-Varianten. Mino-Zellen wurden in 96-Well Platten (6×10^4 Zellen/Well) kultiviert und eine Hälfte der Zellen wurde mit $5 \mu\text{g/ml}$ scFv:lahCD70-TNC-GpL vorbehandelt. Die Zellen wurden anschließend wie angegeben in Triplikaten mit den scFv:lahCD70-TRAIL-Fusionsproteinen sowie TNC-TRAIL, TNC-TRAILmutR1 und TNC-TRAILmutR2 mit und ohne

anti-Flag (1 µg/ml) Oligomerisierung über Nacht bei 37 °C behandelt. Das zelluläre Überleben wurde mit dem MTT-assay ermittelt.

4.8 Aktivität von scFv:lahCD70-TNC-TRAIL auf CD70 und CD27 koexprimierenden Zellen

In weiteren Experimenten wurde untersucht, inwieweit scFv:lahCD70-TNC-TRAIL Zelltod in Zellen induziert, die nicht nur CD70 besitzen, sondern auch ihren Rezeptor CD27 exprimieren. Raji- und KMS-12-BM-Zellen koexprimieren CD70 und CD27 (Tab. 1, Abb. 20). Das scFv:lahCD70-TNC-TRAIL-Fusionsprotein zeigte auch in diesen Zellen eine starke Zelltodinduktion, die durch die CD70-Blockade mit dem kompetierenden CD70-spezifischen Antikörper lahCD70 reduziert wurde (Abb. 20). Jedoch erscheint der proapoptotische Effekt der CD70-Verankerung auf Raji- (50x) und KMS-12-BM (10x)-Zellen etwas weniger stark als in den CD70-positiven aber CD27-negativen Zelllinien, wie z.B. Mino (weit über 100x) und OVCAR-3 (200x). Das Ergebnis verleitet dazu zu spekulieren, dass das scFv:lahCD70-TRAIL-Fusionsprotein mit dem endogenen CD27, um die CD70-Bindung kompetiert. Dennoch können andere Faktoren (z.B. verschiedene Expressionslevel) als Ursache nicht vollständig ausgeschlossen werden.

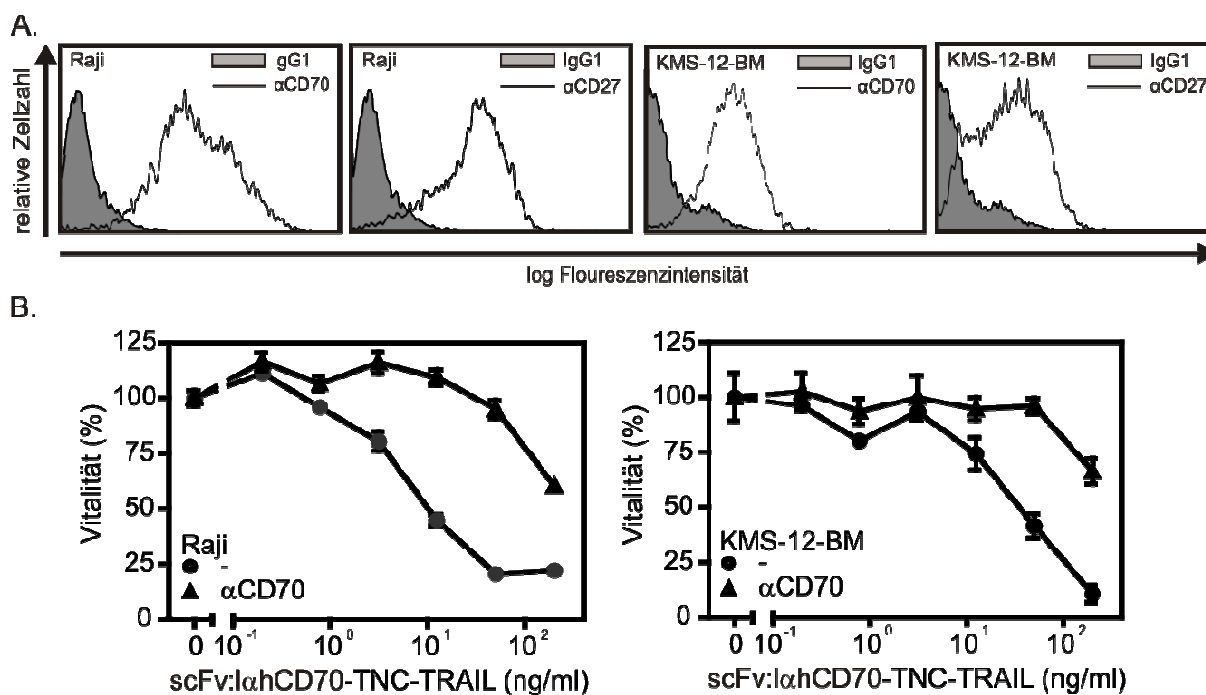


Abb.20 Zytotoxizität des scFv:lahCD70-TNC-TRAIL Konstrukts auf CD70 und CD27 koexprimierenden Zellen. (A) FACS-Analyse der CD70 und CD27 Expression auf Raji- und KMS-12-BM-Zellen. (B) Raji- und KMS-12-BM-Zellen wurden in 96-Well Platten (6×10^4

Zellen/Well) in Gegenwart und Abwesenheit von 10 µg/ml des kompetierenden lahCD70-Antikörpers (αCD70) in Triplikaten mit den angegebenen Konzentrationen des scFv:lahCD70-TRAIL-Fusionsproteins behandelt. Die Stimulation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Das zelluläre Überleben wurde mittels MTT-assay bestimmt.

4.9 Apoptoseinduktion mittels scFv:lahCD70-Flag-TNC-FasL

Neben den scFv:lahCD70-TRAIL Fusionsproteinen wurde auch ein scFv:lahCD70-FasL Fusionsprotein kloniert und bezüglich einer eventuellen CD70-abhängigen zytotoxischen Aktivität hin untersucht. In Mino- und Raji-Zellen zeigte das scFv:lahCD70-FasL Fusionsprotein eine nur geringe Abhängigkeit der Zytotoxizität von der Bindung an CD70. Im Gegensatz dazu, zeigte sich auf KMS-12-BM-Zellen eine doch sehr deutliche CD70-abhängige Apoptose (Abb. 21). Die ED₅₀ lag ohne CD70-Block bei etwa 0,1 und mit bei 8 ng/ml (Abb. 21). Der Grund für die geringe CD70-abhängige Aktivität des scFv:lahCD70-FasL-Fusionsproteins auf Raji- und Mino-Zellen könnte auf der per se schlechten Fas/CD95-Sensitivität liegen.

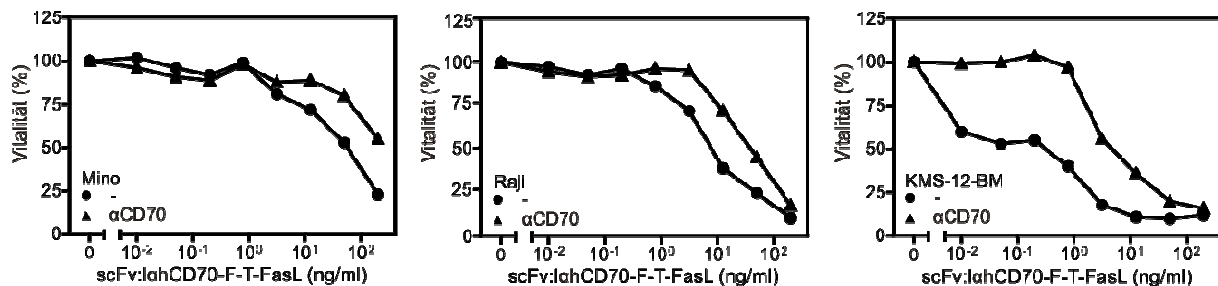


Abb.21 Zytotoxizitätsexperiment mit scFv:lahCD70-TNC-FasL auf Mino-, Raji- und KMS-12-BM-Zellen. Die angegebenen Zellen wurden in 96-Well Platten (6x10⁴ Zellen/Well) in Gegenwart und Abwesenheit von 10 µg/ml des kompetierenden scFv:lahCD70 Antikörpers (αCD70) behandelt. Die Stimulation erfolgte über Nacht bei 37 °C in Triplikaten mit den angegebenen Konzentrationen des scFv:lahCD70-Flag-TNC-FasL-Fusionsproteins. Die zelluläre Vitalität wurde mittels MTT-assay bestimmt.

4.10 scFv:lahCD70-TNC-TRAIL Fusionsproteine induzieren parakrin Apoptose

In Kokulturversuchen wurde untersucht, ob die scFv:lahCD70-TNC-TRAIL-Fusionsproteine, CD70-abhängig parakrin Apoptose induzieren können. Um dies zu prüfen wurden CD70-

exprimierende Rec-1-Zellen, welche keine TRAIL-Todesrezeptoren exprimieren (Abb. 22), mit CD70-negativen aber TRAIL-sensitiven Jurkat-Zellen kokultiviert und mit den scFv:lahCD70-TNC-TRAIL-Varianten behandelt. Zytotoxizitätsexperimente mit KILLER-TRAIL bestätigten die FACS-Ergebnisse und zeigten keine apoptotische Sensitivität bei Rec-1- und eine relativ starke auf Jurkat-Zellen (Abb. 23, A). Das scFv:lahCD70-TNC-TRAIL- und -TRAILmutR2-Fusionsprotein induziert in der Kokultur von Rec-1 und Jurkat, einen deutlichen CD70-abhängigen apoptotischen Effekt (Abb. 23, B, D). Das scFv:lahCD70-TNC-TRAILmutR1-Fusionsprotein hingegen zeigte keinen signifikanten zytotoxischen Effekt, was dazu passt, dass Jurkat-Zellen keinen TRAILR1 exprimieren (Abb. 9, Abb. 23, C). Zusammenfassend ist demnach festzustellen, dass die scFv:lahCD70-TNC-TRAIL-Varianten eine deutliche CD70-abhängige parakrine apoptotische Aktivität haben (Abb. 23).

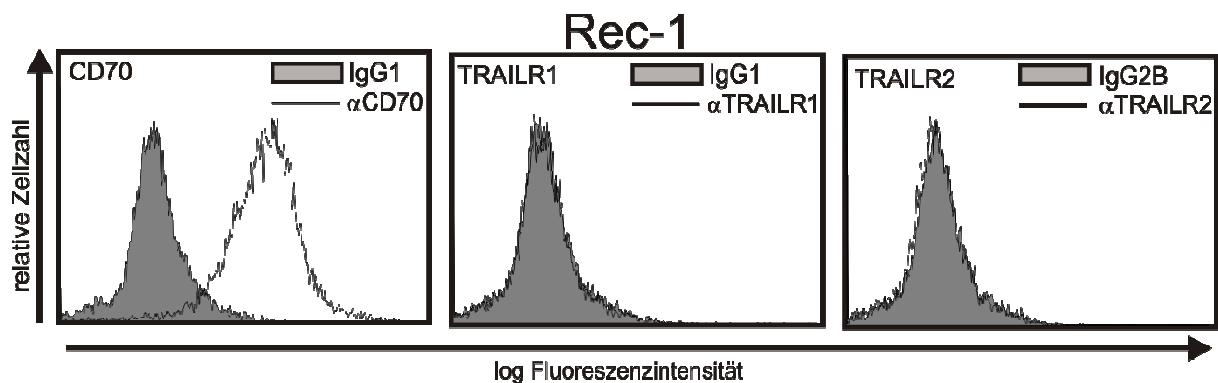


Abb.22 FACS-Analyse der CD70- und TRAILR-Expression von Rec-1 Zellen. Die Rec-1-Zellen wurden mittels FACS auf die CD70- sowie TRAILR1- und TRAILR2-Zelloberflächenexpression hin analysiert.

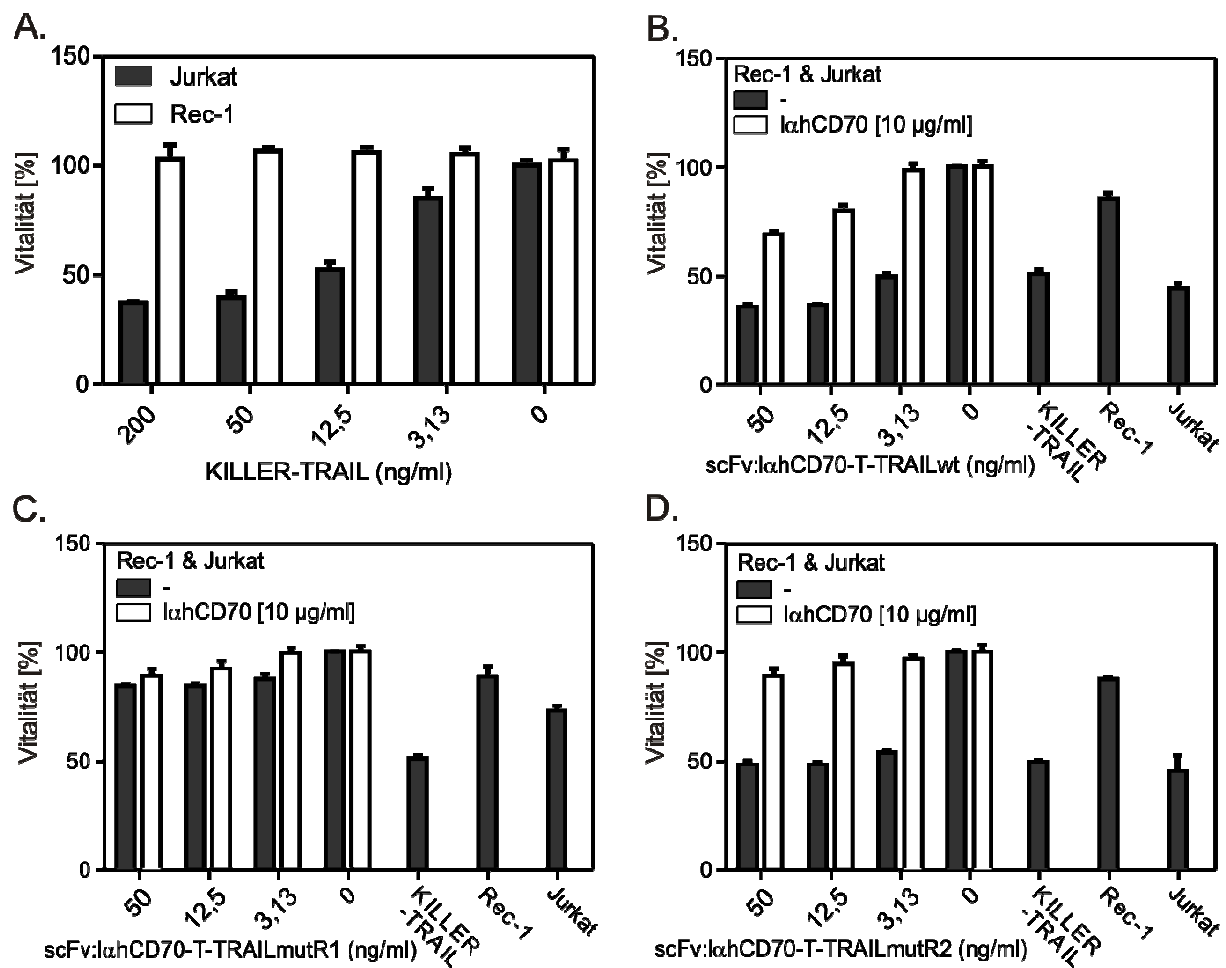


Abb.23 Die scFv:lahCD70-TNC-TRAIL Varianten können parakrin Apoptose induzieren.

(A) Die allgemeine TRAIL-Toxizität wurde mittels KILLER-TRAIL ermittelt. (B-D) Rec-1-Zellen (1×10^4 Zellen/Well) wurden in 96-Well Platten in Gegenwart und Abwesenheit von $10 \mu\text{g/ml}$ des kompetierenden CD70-spezifischen Antikörpers lahCD70 und mit den angegebenen Konzentrationen der verschiedenen scFv:lahCD70-TNC-TRAIL-Varianten für 1 h inkubiert und anschließend mit Jurkat-Zellen (5×10^4 Zellen/Well) über Nacht bei 37°C kokultiviert. Zur Kontrollen wurde Rec-1- und Jurkat-Zellen jeweils alleine mit 50 ng/ml der Konstrukt bzw. die Kokultur mit 200 ng/ml KILLER-TRAIL behandelt. Die Ansätze wurde mittels MTT-Assay analysiert.

7. Diskussion

Heutzutage ist Krebs neben Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache. Kürzlich wurde in einer Reihe von präklinischen Experimenten sowie in klinischen Phase I-Studien CD70 und die TRAIL-Todesrezeptoren als tumortherapeutische Zielstrukturen getestet.

7.1 CD70-*targeting* und Tumortherapie

Im Fall des CD70-*targetings* soll dabei die häufige und starke tumorassoziierte CD70-Expression genutzt werden, um Antikörper-abhängige Effektorfunktion gegen Tumorzellen auszulösen. Die kürzlich gemachte Beobachtung, dass CD70-exprimierende Krebszellen durch Stimulation von Tregs eine immunsuppressive Aktivität entfalten, zeigt darüberhinaus die Möglichkeit auf, eine CD70-Blockade als therapeutische Option in der Krebsbehandlung zu nutzen (Boursalian et al., 2009; Claus et al., 2012; Grewal, 2008).

In einer Studie wurde bei etwa 40 % der isolierten Multiplen Myelomen, sowie bei Non-Hodgkin- bzw. Hodgkin-Lymphomen und renalen Zellkarzinomtumoren, eine hohe CD70-Expression festgestellt (McEarchern et al., 2008; Ryan et al., 2010). Die CD70-Expression auf malignen Zellen im Vergleich zur stark limitierten Expression auf normalen bzw. gesunden Zellen, macht CD70 zu einem attraktiven Ziel für Antikörper-basierte Therapien. So wurde z.B. ein humanisierter anti-CD70 Antikörper (SGN-70) von der Firma Seattle Genetics (SGEN) entwickelt und die CD70-Bindung sowie seine Zytotoxizitätsaktivität *in vitro* mittels zellbasierten Assays nachgewiesen (McEarchern et al., 2008). SGN-70 führte zur Lyse von CD70-exprimierende Tumorzellen über Fc-abhängige Funktionen inklusive Antikörper-abhängiger Zytotoxizität (ADCC) sowie Phagozytose und Komplementaktivierung. Eine *in vivo* Behandlung mit SGN-70 erniedrigt signifikant das Tumorwachstum (CD70⁺-Tumor) und verlängerte das Überleben von tumortragenden Mäusen (McEarchern et al., 2008). ARGX-110 von der Firma arGEN-X ist ein weiterer monoklonaler anti-hCD70-Antikörper der effizient die CD70-induzierte Tumorproliferation blockiert und verhindert, dass der Tumor der Immunkontrolle entkommt. Zusätzlich induziert auch dieser Antikörper effektiv ADCC (Silence et al., 2014).

7.2 TRAILR-*targeting* und Tumorthherapie

Die beiden TRAIL-Todesrezeptoren^{1/2} werden aufgrund des Umstandes, dass sie präferentiell in Tumoren Apoptose induzieren, als interessante therapeutische Zielstrukturen erachtet. Zudem gibt es auch Hinweise, dass die Vaskulatur von Tumoren ebenfalls sehr nützliche TRAIL-*targeting* Strukturen darstellen könnten (Wilson et al., 2012). So fand man, dass in Endothelzellen von Tumoren TRAILR2 exprimiert wird und die Behandlung mit oligomerisiertem TRAIL, Apoptose in den Tumorgefäßen induziert. Die Schädigung der Tumorblutgefäße reduzierte dann signifikant das Tumorwachstum (Wilson et al., 2012). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die proapoptotische Aktivierung des TRAILR2 auf den Epithelzellen der Tumolvaskulatur, das Tumorwachstum reduziert und TRAIL somit als ein selektiv Tumorblutgefäß-zerstörendes Agens betrachtet werden kann. TRAIL bietet daher die Möglichkeit parallel Apoptose in malignen Zellen und in nicht-transformierten Tumorgefäßen zu induzieren.

CD95, TNFR1, TRAILR1 und TRAILR2 gehören zu einer Untergruppe von TNF-Rezeptoren, welche durch eine konservierte Todesdomäne charakterisiert sind. Die Aktivierung von Todesrezeptoren in malignen Zellen ist ein prinzipielles Hauptziel im Kampf gegen den Krebs. Probleme bei der Nutzung der TRAIL-induzierten Apoptose entstehen z.B. durch die geringe Serumhalbwertszeit des löslichen Ligandens sowie durch die allgemeine Expression von Todesrezeptoren und die Existenz von zusätzlichen Nicht-Todesrezeptoren bzw. *Decoy*-Rezeptoren der Todesliganden (Wajant et al., 2013).

7.3 scFv-TRAIL als komplementäre Tumorthherapie

Immunstimulation und Zelltodinduktion in Tumoren oder tumorassoziierten Zellen sind zwei komplementäre oder gar synergistische Ziele, die in der Tumorthherapie verfolgt werden können. Eine Kombinationstherapie die beide Ziele gleichzeitig anspricht ist demnach sehr attraktiv. Somit entstand die Idee, ein einziges Molekül zu entwickeln, welches die immunsuppressive Aktivität CD70-exprimierender Tumorzellen mittels CD70-Blockade inhibiert und gleichzeitig Apoptose über TRAILR-spezifische Stimulation in den Tumorzellen auslöst. Hierfür wurde ein Fusionsprotein aus rezeptorspezifischen TRAIL-Mutanten und dem CD70-blockierenden Antikörperfragment scFv:lahCD70 generiert. In einigen früheren Studien wurde schon gezeigt, dass Zelloberflächenantigen-gebundene scFv-TRAIL-Fusionsproteine eine vielfach bessere Aktivität haben als konventionelles lösliches TRAIL bzw. wie das scFv-TRAIL-Fusionsprotein in Abwesenheit des Antigens. Diese Prinzip wurde das erstmal für das Antigen FAP (*Fibroblast activation protein*) kombiniert mit TRAIL oder

CD95L gezeigt (Samel et al., 2003; Wajant et al., 2001). Desweiteren wurde eine verstärkte Antigen-abhängige Apoptoseinduktion im Pankreaskarzinom, welches verstärkt das Karzinom-assoziierte Antigen EGP2 (EPCAM, epitheliales Zelladhäsionsantigen in Endothelzellen und gastrointestinalen Karzinomen) exprimieren, mit scFvC54:TRAIL, das an EGP2 bindet, beobachtet (Bremer et al., 2004). Zusätzlich zur verstärkten Apoptose wurde bei scFv:CD40-TRAIL eine Aktivierung von Dendritischen Zellen mit nur geringen Nebeneffekten beobachtet (El-Mesery et al., 2013). CD7 auf Thymozyten und reifen T-Zellen spielt eine essentielle Rolle bei T- und B-Zell-Interaktionen während der frühen lymphoiden Entwicklung. Hier verursacht das Konstrukt scFv:CD7-sTRAIL eine begrenzte bzw. zielgerichtete Apoptose in vielen humanen T-Zelleukämie-Zellen mit geringer Toxizität für normale Blut- (ruhende Leukozyten, aktivierte T-Zellen) und vaskuläre Endothel-Zellen (Bremer et al., 2005a). Eine *in vitro* Behandlung von frischgewonnen Blutzellen aus Patienten mit akuter T-lymphoplastischer Leukämie mit scFv:CD7-sTRAIL resultiert in einer markanten Apoptoseinduktion von malignen T-Zellen, welche durch das Zytostatikum Vincristin noch verstärkt wurde. Die Apoptoseinduktion durch scFv:CD7-sTRAIL war sogar stärker als die von dem gekoppelten Immuntoxin scFv:CD7-ETA (Bremer et al., 2005a). Das Fusionsprotein scFv:425-sTRAIL führt ebenso zur Apoptoseinduktion. Es bindet spezifisch über die scFv:425-Domäne an den EGFR und induziert dadurch eine schnelle Dephosphorylierung des EGFR, was zur Inhibition der mitogenen Signaltransduktion führt und begleitet ist durch eine Herunterregulierung von cFLIP(L) und Dephosphorylierung von BAD. Folglich führt die EGFR-Inhibition zur effizienten Wiederherstellung der Sensitivität von Tumorzellen für eine therapeutische Apoptoseinduktion (Bremer et al., 2005b). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch mit scFv:MCSP-sTRAIL (MCSP, *melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan*), welches wirksam das Wachstum von Melanomen *in vitro* und *in vivo* inhibiert (de Bruyn et al., 2010). Das scFv:CD19-sTRAIL-Fusionsprotein (CD19, B-Zellkorezeptor auf B-Lymphozyten) führt zur selektiven Apoptoseinduktion von Zellen, die von Patienten mit chronischer und akuter B-lymphatischer Leukämie stammen und wird weiter verstärkt durch eine Kombination mit anderen Medikamenten (z.B. VPA, Antiepileptika Valproinsäure gehört zu den Histon-Deacetylase-Inhibitoren und verändert die Genaktivität der Zelle) (Stieglmaier et al., 2008). Zusammenfassend zeigt sich also, dass eine potente Antitumoraktivität von TRAIL durch die Generierung von tumorbindenden *single-chain*-Fusionsproteinen erreicht werden kann.

Aufgrund dieses Hintergrunds wurde in dieser Studie erwartet, dass das CD70-bindende TRAIL-Fusionsprotein, eine im Vergleich zu löslichem TRAIL verstärkte Zelltodinduktion hervorruft, wenn es gebunden an CD70 vorliegt. Tatsächlich zeigten die Ergebnisse, dass die drei Fusionsproteine scFv:lahCD70-TNC-Flag-TRAIL/TRAILmutR1/TRAILmutR2 nicht nur die CD27/CD70-Interaktion effizient blockieren (Abb. 2-5), sondern nach Bindung an

zellexprimiertes CD70 auch den TRAIL-induzierten Zelltod 10- bis 100-fach effizienter induzieren (Abb. 15-20). Um die Frage zu klären, ob beide oder nur einer der beiden TRAIL-Todesrezeptoren sensitiver auf CD70-gebundenes scFv:lahCD70-TNC-TRAIL reagiert, wurden die beschriebenen Mutationen, welche eine bevorzugte Bindung an TRAILR1 oder TRAILR2 vermitteln, in die TRAIL-Einheit des Moleküls eingeführt (Abb. 12, 13). Eine verstärkte Zelltodinduktion nach CD70-Bindung wurde mit der TRAILR1- als auch mit der TRAILR2-spezifischen Variante von scFv:lahCD70-TNC-TRAIL gefunden (Abb. 15-19). Die Resultate zeigen, dass die stärkere Aktivität von CD70-gebundenen TRAIL Fusionsproteinen auch zur Behandlung von Tumore genutzt werden kann, welche nur sensitiv für einen der beiden TRAIL-Todesrezeptoren sind. Eine bessere Rezeptoraktivierung durch an der Zelloberfläche immobilisierte oder natürlich vorkommende membrangebundenen Liganden wurde nicht nur für TRAILR2, sondern auch für eine Anzahl anderer Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie beobachtet. Dennoch repräsentiert diese Eigenschaft kein allgemeingültiges Merkmal dieser Rezeptorfamilie (Wajant et al., 2013).

7.4 TRAILR-Antikörper und scFv:CD70-TRAIL-Mutanten

Gelöstes TRAIL (Dulanermin) und TRAIL-Todesrezeptor-spezifische IgG1 Antikörper werden derzeit klinisch geprüft und zeigen bisher eine gute Verträglichkeit. Die erreichten anti-Tumoreffekte sind jedoch bisher gering und auch nur in Kombination mit anderen Medikamenten erreichbar (Dimberg et al., 2013; Hellwig and Rehm, 2012). Die beobachtete TRAIL-Resistenz ist ein allgemeines Hindernis der TRAIL-basierten Therapien und limitiert dadurch die Effizienz dieser Medikamente. In Anbetracht der limitierten Aktivität von gelöstem TRAIL und anti-TRAIL-Todesrezeptor-Antikörpern, welche erst FcγRIIb binden müssen um *in vivo* stark agonistisch zu werden, sind die moderaten klinischen Effekte vielleicht nicht verwunderlich (Li and Ravetch, 2012; Wilson et al., 2011). Andererseits sind vor diesem Hintergrund vielleicht auch die guten Ergebnisse zur Medikamentenverträglichkeit im Nachhinein keine Überraschung. So könnten effizientere Aktivatoren der TRAIL-Todesrezeptoren wie oligomerisiertes TRAIL, TRAIL-Fusionsproteine mit der Fähigkeit sich an der Zelloberfläche zu verankern oder TRAIL-Rezeptor-Antikörper mit hoher Affinität für FcγRIIb, einerseits das Potential haben die Antitumoraktivität zu verbessern, aber andererseits auch ein Risiko für bisher nicht erkannte Nebenwirkungen in sich tragen. In diesem Kontext präsentieren die Fusionsproteine in dieser Studie nicht nur die Lösung des Problems der schwachen spezifischen Aktivitäten von den löslichen TRAIL-Trimeren durch die Zelloberflächenverankerung, sondern reduzieren auch die Gefahr potentieller Nebeneffekte über die tumorassoziierte CD70-Zellverankerung sowie der TRAILR-spezifischen TRAIL-

Mutanten. Der Einsatz einer CD70-blockierenden Proteindomäne für die TRAIL-Verankerung an der Zelloberfläche verbindet weiterhin die TRAIL-Todesrezeptorstimulation mit einer möglichen Zerstörung der tumorassoziierten Immunhomöostase. In der Tat zeigten kürzlich verschiedene Studien, dass die CD27-Aktivierung die Apoptose regulatorischer T-Zellen im Thymusmark reduziert, aber auch die Apoptose in CD70-exprimierenden soliden Tumoren, was in dem späteren Fall zu einem verstärkten Tumorwachstum führt (Claus et al., 2012; Coquet et al., 2013). Ebenso werden durch das *CD27-signaling* kostimulatorische Signalwege aktiviert um T- und B-Zellantworten hervorzurufen, welche über die CD70-Expression auf Subgruppen dendritischer Zellen und Lymphozyten reguliert wird. Im Bezug auf die immunologische Kontrolle solider Tumoren, zeigte die Analyse der CD27/CD70-Interaktion in tumortragenden Wildtyp-Mäusen, eine erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen (Tregs), reduzierte tumorspezifische T-Zellantworten, sowie verstärkte Angiogenese und Tumorwachstum. Letztendlich wurde die erhöhte Anzahl von Tregs und das Wachstum solider Tumoren in CD27-defizienten Mäusen oder in Wildtyp-Mäusen, durch die Behandlung mit monoklonalen blockierenden CD27-spezifischen Antikörpern, reduziert. Folglich kann das *CD27-signaling*, vermutlich in Abhängigkeit von der Dauer und Stärke, entweder die T-Zellfunktion verbessern oder zur T-Zell-Dysfunktion führen. Die Befunde lieferten einen neuen Mechanismus über welchen das adaptive Immunsystem das Tumorwachstum verstärken kann. Deshalb könnte die Modulierung des *CD27-signaling*s ein interessantes Werkzeug darstellen, um solide Tumore und bestimmte Leukämie-Stammzellen zu behandeln (Claus et al., 2012; Denoed and Moser, 2011; Miller et al., 2010; Wischhusen et al., 2002). Insbesondere könnten Krebsarten, bei welchen die Präsenz von Tregs eine schlechte Prognose darstellt, ein bevorzugtes Einsatzgebiet für CD70-bindende TRAIL-Fusionsproteine sein. In welchem Ausmaß, bzw. unter welchen Umständen jedoch die CD70-blockierenden TRAIL-Fusionsproteine mit protumoralen CD70-Aktivitäten interferieren oder doch endogene antitumorale T-Zellaktivitäten hindern, kann letztendlich nur in Tierexperimenten mit einem humanisierten Immunsystem oder murinen CD70-bindenden TRAIL-Fusionsproteinen verifiziert werden. Zusammenfassend zeigte die vorliegende Studie, dass der verwendete lahCD70-Antikörper mit hoher signifikanter Effizienz die CD70/CD27-Interaktion blockiert und dadurch eine zellproliferative CD27-Stimulation der Tumorzellen inhibieren könnte (Abb. 2, 3). Desweiteren ermöglicht der evaluierte affine hCD70-Antikörper, eine gezielte Antigenbindung auf CD70-exprimierende Tumorzellen und kann als scFv mit TRAILR-spezifischen TRAIL-Varianten zu Fusionsproteinen mit CD70-abhängiger TRAILR1/2-stimulierender Aktivität kombiniert werden (Abb. 15-20). Zudem wurde ein CD70-abhängiger parakriner apoptotischer Effekt der scFv-TRAIL-Fusionsproteine in Kokulturrexperimente nachgewiesen (Abb. 23). Letztendlich erfüllen die hier entwickelten Fusionsproteine die Zielsetzung Reagenzien zu entwickeln, die einen inhibitorischen Effekt

auf die CD27-Stimulation haben bzw. diesen mit einer stark erhöhten CD70-abhängigen und TRAILR-spezifischen Apoptoseinduktion zu kombinieren (Abb.24).

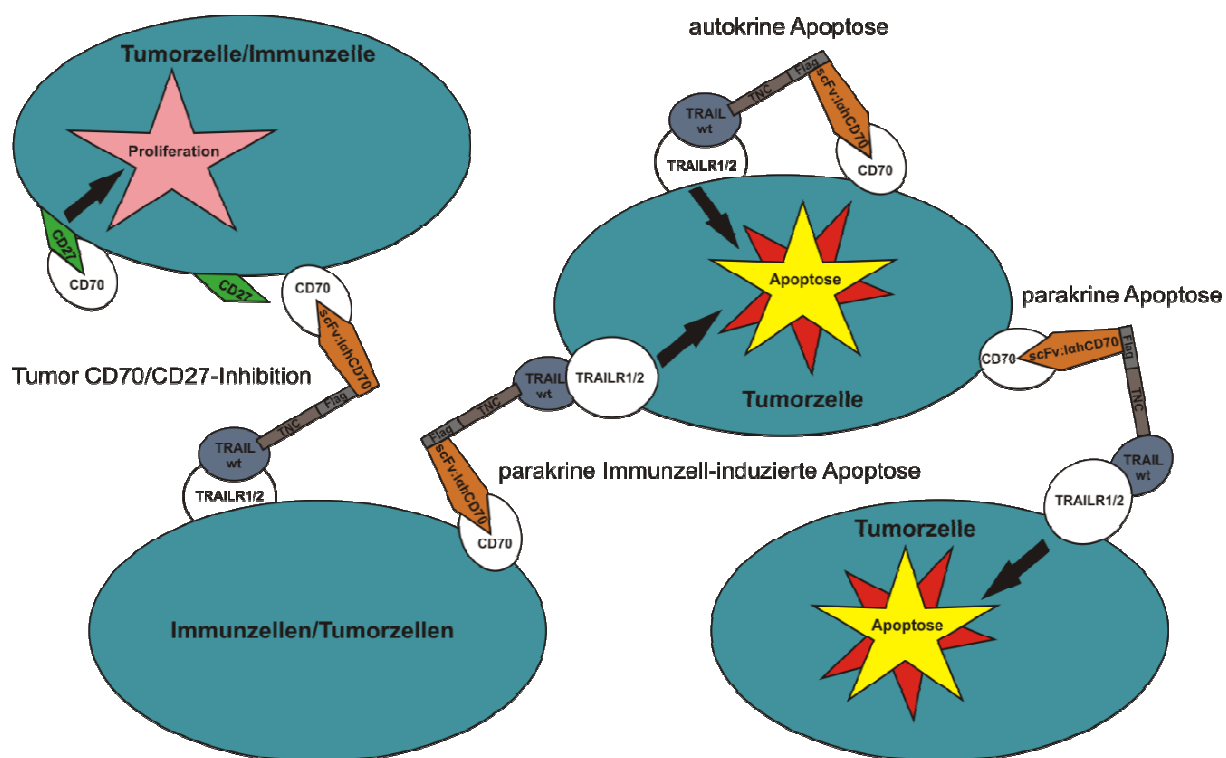


Abb.26 Schematische Zusammenfassung der Funktionweise von scFv:lahCD70-TRAIL-Fusionsproteinen anhand des TRAIL-Wildtyps. Die CD70-bindenden TRAIL-Fusionsproteine können durch die spezifische TRAILR- und CD70-Bindung einerseits selektiv autokrine oder parakrine Apoptose der Tumorzellen im Tumormilieu auslösen und andererseits die eigene oder parakrine proliferative CD27-Stimulation inhibieren. Die TRAILR-Spezifität könnte helfen bislang nicht erkannte Nebeneffekte zu verhindern/minimieren.

7.5 Ausblick

In der Praxis für die klinische Anwendung könnte man sich zunächst noch unbewiesen vorstellen, dass man einerseits eine spezifischere und dadurch weniger nebenspektreie, aber zugleich auch stärkere apoptotische Antwort in Tumorzellen hervorrufen kann (TRAIL-Mutanten), welche durch die Antigenbindung (scFv:lahCD70) eine lokale Eingrenzung mit hoher pharmakologischen Effekten, wie Apoptose und proliferative Hemmung der CD70⁺-Tumorzellen, erfährt (scFv:lahCD70-TNC-TRAIL-Fusionsproteine). Durch eine

Antigenbindung des oftmals hoch exprimierten CD70 auf Tumorzellen, könnten die scFv:IghCD70-TNC-TRAIL-Konstrukte lokal im Tumormilieu integriert werden und autokrinen sowie parakrinen Zelltod der Tumore bewirken (Abb. 24). Desweiteren könnten sie an untransformierte "normale" Zellen über den spezifischen TRAILR-Ligand binden und die CD70-abhängige proliferativen Eigenschaften der Tumorzellen mittels der CD70-Blockade verhindern (Abb. 24). Zusammenfassend lässt sich dadurch einerseits eine spezifische apoptotische Wirkung und andererseits eine proliferative Hemmung hervorrufen. Aus diesen Studienergebnishintergrund könnten zukünftig die humanen Antigene durch murine ersetzt und analoge Experimente in Mauszellen evaluiert werden, um anschließend metabolische Analysen der Fusionsproteine im Mausmodell durchführen zu können.

8. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den T-Zell-inhibierenden Effekt eines CD70-blockierenden Antikörpers mit einer Fc-unabhängigen Zelltod-induzierenden Aktivität auf CD70-exprimierende Tumoren zu kombinieren. Dazu wurden Fusionsproteine hergestellt und untersucht, die aus einer CD70-bindenden scFv-Domäne sowie aus einer TRAIL-Domäne bestehen.

Der CD70-spezifische monoklonale Antikörper lchCD70 sowie der bereits bekannte hCD70-spezifische Antikörper 1F6 blockieren mit hoher Effizienz die CD27/CD70-Interaktion von CD70-exprimierenden Zelllinien (Mino, OVCAR-3, U-266) und inhibieren dadurch die Induktion der IL8-Produktion durch diese Zellen in kokultivierten HT1080-CD27-Zellen. IL8 wird durch den klassischen NFκB-Signalweg reguliert und ist für den pro-angiogenetischen Effekt von entscheidender Bedeutung (Abb. 2, 3). Mit Hilfe zellulärer Gleichgewichtsbindungsstudien mit mono- und trimeren scFv:lchCD70-GpL-Fusionsproteinen (Abb. 4) auf Mino- und OVCAR-3-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Trimerisierung in beiden Zelllinien zu einer Steigerung der apparenten Affinität der scFv:lchCD70-CD70 Interaktion führt und damit einen Effekt auf die CD70-Belegung hat (Abb. 5). Für die Konstruktion der Fusionsproteine wurde sowohl Wildtyp-TRAIL als auch TRAIL-Mutanten mit Präferenz für den TRAILR1 oder TRAILR2 verwendet. Die TRAILR-Präferenz der verwendeten TRAIL-Mutanten (wt, mutR1, mutR2) wurde nicht nur in zellulären GpL-Bindungsstudien (Abb. 7) sondern zusätzlich auch in TRAILR Immobilisierungsexperimenten (Abb. 8) bewiesen. Hier zeigte sich, dass bei TRAILR1 keine Interaktion mit TRAILmutR2, so wie bei TRAILR2 keine signifikante Bindung mit TRAILmutR1 erfolgte. Nur der TRAIL-Wildtyp band signifikant an beide TRAIL-Todesrezeptoren. Vitalitätsexperimente (Abb. 10) und Western-Blot Analysen der Caspase-Prozessierung (Abb. 11) bestätigten die starke TRAILR1- bzw. TRAILR2-Spezifität der TRAILmutR1- und TRAILmutR2-Varianten. Im Gegensatz zu den unvernetzten löslichen TRAIL-Trimeren waren nur die quervernetzten TRAIL-TNC-Varianten in der Lage, eine signifikante Apoptose-Signalkaskade bei relativ geringen Konzentrationen zu induzieren. Die toxischen ED₅₀-Konzentrationen der unoligomerisierten TRAIL-Formen lagen um einen Faktor 100 höher als die der oligomerisierten Varianten. Zusammenfassend zeigten die ED₅₀-Werte der Zytotoxizitätsexperimente von M2-oligomerisierten zu -unoligomerisierten trimeren TRAIL-Varianten bei allen Fusionskonstrukten und Zelllinien eine eindeutige Verstärkung der Apoptoseinduktion durch die M2-Quervernetzung. Bei Jurkat- und Mino-Zellen konnte größtenteils erst nach Oligomerisierung überhaupt eine Bioaktivität bzw. eine Zelltodinduktion beobachtet werden. In OVCAR-3-Zellen zeigte sich eine 100-1000 fache

apoptotische Verstärkung durch die Oligomerisierung (Abb. 10). Weiterhin zeigten Zytotoxizitätsexperimente, dass sich durch Bindung an hCD70 das Ausmaß der Toxizität der Fusionsproteine auf allen CD70-exprimierenden Zelllinien 10-100x verstärkte (Abb. 15, 17). In Übereinstimmung mit der verstärkten TRAIL-Todesrezeptor-Aktivierung durch die CD70-Bindung der scFv-TRAIL-Fusionsproteine, konnte durch eine CD70-Blockade die Caspase-8 Aktivierung und die Prozessierung von Caspase-3 signifikant unterbunden werden (Abb. 18). Die Trimerisierung des scFv:IahCD70-Antikörpers führte zu keiner Apoptose und beeinflusste auch nicht die Aktivität von TRAIL (Abb. 19) was belegt, dass die beobachteten Effekte auf einer stärkeren TRAIL-induzierten Apoptose nach CD70-Bindung der Konstrukte beruhen muss.

Die Fusionsproteine beseitigen somit nachweislich einerseits das Problem der limitierenden Aktivität von löslichem TRAIL über ihre Verankerung an CD70 (Abb. 15-20) und andererseits die potentielle unerwünschte CD70-vermittelte protumorale CD27-Stimulation (Abb. 3). Darüber hinaus könnten die TRAILR-spezifischen TRAIL-Mutanten helfen, Nebeneffekte zu reduzieren, die primär durch den jeweils anderen TRAIL-Todesrezeptor vermittelt werden. Jedoch sind weiter Forschungen insbesondere *in vivo* Experimente notwendig, um Aussagen über Funktionalität, Halbwertszeiten, sowie Effektivität und Verträglichkeit treffen zu können.

9. Summary

The aim of this work was to generate constructs that combine the CD27 stimulation inhibitory effect of blocking CD70 antibodies with an antibody-dependent cellular cytotoxicity(ADCC)-independent, cell death inducing molecule. To reach this goal we generated fusion proteins consisting of the apoptosis-inducing TNF family member TRAIL and a single-chain variable fragment (scFv) derived from a high affinity lama anti-human CD70 antibody (lahCD70). A fusion protein of scFv:lahCD70 and TNC-TRAIL, a stabilized form of soluble TRAIL, showed strongly enhanced apoptosis induction upon CD70 binding. In addition, this construct efficiently interfered with the CD70-CD27 interaction. The introduction of recently identified TRAIL-mutations that discriminate between TRAILR1 and TRAILR2 binding into the TRAIL-part of scFv:lahCD70-TNC-TRAIL resulted in the TRAIL death receptor-specific fusion proteins with CD70-dependent activity. The fusion proteins eliminate on the one hand the problem of the limited activity of soluble TRAIL by anchoring to CD70 what confers membrane TRAIL-like activity to the constructs (Fig. 15-20). On the other hand, the constructs have the potential to block the unwanted CD70-mediated protumoral CD27 stimulation (Fig. 3). In addition, the TRAILR1-specific TRAIL mutant (Fig. 7, 8) could reduce unrecognized side effects mediated by TRAILR2 and vice versa. However, further research, particularly *in vivo* experiments are necessary to state about functionality, half-lives, as well as efficacy and tolerability of the constructs.

10. Literaturverzeichnis

Aderka, D. (1996). The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 231-240.

Agematsu, K., Nagumo, H., Yang, F.C., Nakazawa, T., Fukushima, K., Ito, S., Sugita, K., Mori, T., Kobata, T., Morimoto, C., *et al.* (1997). B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur J Immunol* 27, 2073-2079.

Akiba, H., Nakano, H., Nishinaka, S., Shindo, M., Kobata, T., Atsuta, M., Morimoto, C., Ware, C.F., Malinin, N.L., Wallach, D., *et al.* (1998). CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase. *J Biol Chem* 273, 13353-13358.

Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., *et al.* (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104, 155-162.

Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., *et al.* (2008). Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 321, 974-977.

Berg, D., Lehne, M., Muller, N., Siegmund, D., Munkel, S., Sebald, W., Pfizenmaier, K., and Wajant, H. (2007). Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L. *Cell Death Differ* 14, 2021-2034.

Bijangi-Vishehsaraei, K., Saadatzadeh, M.R., Huang, S., Murphy, M.P., and Safa, A.R. (2010). 4-(4-Chloro-2-methylphenoxy)-N-hydroxybutanamide (CMH) targets mRNA of the c-FLIP variants and induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Cell Biochem* 342, 133-142.

Bodmer, J.L., Schneider, P., and Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* 27, 19-26.

Bohm, I., and Schild, H. (2003). Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol Imaging Biol* 5, 2-14.

Boursalian, T.E., McEarchern, J.A., Law, C.L., and Grewal, I.S. (2009). Targeting CD70 for human therapeutic use. *Adv Exp Med Biol* 647, 108-119.

Bowman, M.R., Crimmins, M.A., Yetz-Aldape, J., Kriz, R., Kelleher, K., and Herrmann, S. (1994). The cloning of CD70 and its identification as the ligand for CD27. *J Immunol* 152, 1756-1761.

Bremer, E., Kuijlen, J., Samplonius, D., Walczak, H., de Leij, L., and Helfrich, W. (2004). Target cell-restricted and -enhanced apoptosis induction by a scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for the pancarcinoma-associated antigen EGP2. *Int J Cancer* 109, 281-290.

Bremer, E., Samplonius, D.F., Peipp, M., van Genne, L., Kroesen, B.J., Fey, G.H., Gramatzki, M., de Leij, L.F., and Helfrich, W. (2005a). Target cell-restricted apoptosis induction of acute leukemic T cells by a recombinant tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand fusion protein with specificity for human CD7. *Cancer Res* 65, 3380-3388.

- Bremer, E., Samplonius, D.F., van Genne, L., Dijkstra, M.H., Kroesen, B.J., de Leij, L.F., and Helfrich, W. (2005b). Simultaneous inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling and enhanced activation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor-mediated apoptosis induction by an scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for human EGFR. *J Biol Chem* 280, 10025-10033.
- Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855-862.
- Chamoux, E., Houde, N., L'Eriger, K., and Roux, S. (2008). Osteoprotegerin decreases human osteoclast apoptosis by inhibiting the TRAIL pathway. *J Cell Physiol* 216, 536-542.
- Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L., and Lenardo, M.J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351-2354.
- Chandrasekaran, Y., and Richburg, J.H. (2005). The p53 protein influences the sensitivity of testicular germ cells to mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced apoptosis by increasing the membrane levels of Fas and DR5 and decreasing the intracellular amount of c-FLIP. *Biol Reprod* 72, 206-213.
- Chinnaiyan, A.M., Prasad, U., Shankar, S., Hamstra, D.A., Shanaiah, M., Chenevert, T.L., Ross, B.D., and Rehemtulla, A. (2000). Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1754-1759.
- Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., Lenardo, M.J., and Chan, F.K. (2005). Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18099-18104.
- Claus, C., Riether, C., Schurch, C., Matter, M.S., Hilmenyuk, T., and Ochsenbein, A.F. (2012). CD27 signaling increases the frequency of regulatory T cells and promotes tumor growth. *Cancer Res* 72, 3664-3676.
- Coquet, J.M., Ribot, J.C., Babala, N., Middendorp, S., van der Horst, G., Xiao, Y., Neves, J.F., Fonseca-Pereira, D., Jacobs, H., Pennington, D.J., *et al.* (2013). Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla promote CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell development via the CD27-CD70 pathway. *J Exp Med* 210, 715-728.
- Corazza, N., Brumatti, G., Jakob, S., Villunger, A., and Brunner, T. (2004). TRAIL and thymocyte apoptosis: not so deadly? *Cell Death Differ* 11 Suppl 2, S213-215.
- Cormary, C., Gonzalez, R., Faye, J.C., Favre, G., and Tilkin-Mariame, A.F. (2004). Induction of T-cell antitumor immunity and protection against tumor growth by secretion of soluble human CD70 molecules. *Cancer Gene Ther* 11, 497-507.
- de Bruyn, M., Rybczynska, A.A., Wei, Y., Schwenkert, M., Fey, G.H., Dierckx, R.A., van Waarde, A., Helfrich, W., and Bremer, E. (2010). Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan (MCSP)-targeted delivery of soluble TRAIL potently inhibits melanoma outgrowth in vitro and in vivo. *Mol Cancer* 9, 301.
- de Haard, H.J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S.E., Roovers, R.C., Henderikx, P., de Bruine, A.P., Arends, J.W., and Hoogenboom, H.R. (1999). A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J Biol Chem* 274, 18218-18230.

- Degli-Esposti, M.A., Smolak, P.J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C.P., DuBose, R.F., Goodwin, R.G., and Smith, C.A. (1997). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 186, 1165-1170.
- Dempsey, P.W., Doyle, S.E., He, J.Q., and Cheng, G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 193-209.
- Denoeud, J., and Moser, M. (2011). Role of CD27/CD70 pathway of activation in immunity and tolerance. *J Leukoc Biol* 89, 195-203.
- Diegmann, J., Junker, K., Gerstmayer, B., Bosio, A., Hindermann, W., Rosenhahn, J., and von Eggeling, F. (2005). Identification of CD70 as a diagnostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma by gene expression profiling, real-time RT-PCR and immunohistochemistry. *Eur J Cancer* 41, 1794-1801.
- Dimberg, L.Y., Anderson, C.K., Camidge, R., Behbakht, K., Thorburn, A., and Ford, H.L. (2013). On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene* 32, 1341-1350.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- El-Mesery, M., Trebing, J., Schafer, V., Weisenberger, D., Siegmund, D., and Wajant, H. (2013). CD40-directed scFv-TRAIL fusion proteins induce CD40-restricted tumor cell death and activate dendritic cells. *Cell Death Dis* 4, e916.
- Fesik, S.W. (2000). Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 103, 273-282.
- Fick, A., Wyzgol, A., and Wajant, H. (2012). Production, purification, and characterization of scFv TNF ligand fusion proteins. *Methods Mol Biol* 907, 597-609.
- French, R.R., Taraban, V.Y., Crowther, G.R., Rowley, T.F., Gray, J.C., Johnson, P.W., Tutt, A.L., Al-Shamkhani, A., and Glennie, M.J. (2007). Eradication of lymphoma by CD8 T cells following anti-CD40 monoclonal antibody therapy is critically dependent on CD27 costimulation. *Blood* 109, 4810-4815.
- Fulda, S., Meyer, E., and Debatin, K.M. (2002). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* 21, 2283-2294.
- Gerondakis, S., Banerjee, A., Grigoriadis, G., Vasanthakumar, A., Gugasyan, R., Sidwell, T., and Grumont, R.J. (2012). NF-kappaB subunit specificity in hemopoiesis. *Immunol Rev* 246, 272-285.
- Goodwin, R.G., Alderson, M.R., Smith, C.A., Armitage, R.J., VandenBos, T., Jerzy, R., Tough, T.W., Schoenborn, M.A., Davis-Smith, T., Hennen, K., *et al.* (1993). Molecular and biological characterization of a ligand for CD27 defines a new family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Cell* 73, 447-456.
- Gravestain, L.A., Amsen, D., Boes, M., Calvo, C.R., Kruisbeek, A.M., and Borst, J. (1998). The TNF receptor family member CD27 signals to Jun N-terminal kinase via Traf-2. *Eur J Immunol* 28, 2208-2216.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., *et al.* (1995). The transmembrane form of tumor

necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83, 793-802.

Grewal, I.S. (2008). CD70 as a therapeutic target in human malignancies. *Expert Opin Ther Targets* 12, 341-351.

Gruss, H.J., and Dower, S.K. (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 85, 3378-3404.

Gura, T. (1997). How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Science* 277, 768.

Hehlgans, T., and Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1-20.

Hellwig, C.T., and Rehm, M. (2012). TRAIL signaling and synergy mechanisms used in TRAIL-based combination therapies. *Mol Cancer Ther* 11, 3-13.

Hintzen, R.Q., Lens, S.M., Koopman, G., Pals, S.T., Spits, H., and van Lier, R.A. (1994). CD70 represents the human ligand for CD27. *Int Immunol* 6, 477-480.

Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., Kalthoff, H., and Ungefroren, H. (2000). Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene* 19, 5477-5486.

Holler, N., Tardivel, A., Kovacsovics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T., *et al.* (2003). Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol* 23, 1428-1440.

Holliger, P., and Hudson, P.J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23, 1126-1136.

Hu, Y., Benedict, M.A., Ding, L., and Nunez, G. (1999). Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J* 18, 3586-3595.

Irmiler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.

Jin, H., Yang, R., Ross, J., Fong, S., Carano, R., Totpal, K., Lawrence, D., Zheng, Z., Koeppen, H., Stern, H., *et al.* (2008). Cooperation of the agonistic DR5 antibody apomab with chemotherapy to inhibit orthotopic lung tumor growth and improve survival. *Clin Cancer Res* 14, 7733-7740.

Johnstone, R.W., Frew, A.J., and Smyth, M.J. (2008). The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 8, 782-798.

Junker, K., Hindermann, W., von Eggeling, F., Diegmann, J., Haessler, K., and Schubert, J. (2005). CD70: a new tumor specific biomarker for renal cell carcinoma. *J Urol* 173, 2150-2153.

Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., and Reed, J.C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4997-5002.

- Kelley, R.F., Totpal, K., Lindstrom, S.H., Mathieu, M., Billeci, K., Deforge, L., Pai, R., Hymowitz, S.G., and Ashkenazi, A. (2005). Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling. *J Biol Chem* 280, 2205-2212.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., and Ashkenazi, A. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 276, 46639-46646.
- Klein, U., Rajewsky, K., and Kuppers, R. (1998). Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 188, 1679-1689.
- Kuang, A.A., Diehl, G.E., Zhang, J., and Winoto, A. (2000). FADD is required for DR4- and DR5-mediated apoptosis: lack of trail-induced apoptosis in FADD-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 275, 25065-25068.
- Lang, I., Fick, A., Schafer, V., Giner, T., Siegmund, D., and Wajant, H. (2012). Signaling active CD95 receptor molecules trigger co-translocation of inactive CD95 molecules into lipid rafts. *J Biol Chem* 287, 24026-24042.
- LeBlanc, H.N., and Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 10, 66-75.
- Lee, H.W., Lee, S.H., Ryu, Y.W., Kwon, M.H., and Kim, Y.S. (2005). Homomeric and heteromeric interactions of the extracellular domains of death receptors and death decoy receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 1205-1212.
- Lemke, J., Noack, A., Adam, D., Tchikov, V., Bertsch, U., Roder, C., Schutze, S., Wajant, H., Kalthoff, H., and Trauzold, A. (2010). TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5. *J Mol Med (Berl)* 88, 729-740.
- Lens, S.M., Drillenburger, P., den Drijver, B.F., van Schijndel, G., Pals, S.T., van Lier, R.A., and van Oers, M.H. (1999). Aberrant expression and reverse signalling of CD70 on malignant B cells. *Br J Haematol* 106, 491-503.
- Li, F., and Ravetch, J.V. (2012). Apoptotic and antitumor activity of death receptor antibodies require inhibitory Fcγ receptor engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 10966-10971.
- Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Betz, S.F., Oost, T., Herrmann, J., Wu, J.C., and Fesik, S.W. (2000). Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* 408, 1004-1008.
- Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- Lorenz, M.G., Kantor, J.A., Schlom, J., and Hodge, J.W. (1999). Anti-tumor immunity elicited by a recombinant vaccinia virus expressing CD70 (CD27L). *Hum Gene Ther* 10, 1095-1103.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.

- Maas, C., Verbrugge, I., de Vries, E., Savich, G., van de Kooij, L.W., Tait, S.W., and Borst, J. (2010). Smac/DIABLO release from mitochondria and XIAP inhibition are essential to limit clonogenicity of Type I tumor cells after TRAIL receptor stimulation. *Cell Death Differ* 17, 1613-1623.
- MacEwan, D.J. (2002). TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *Br J Pharmacol* 135, 855-875.
- MacFarlane, M., Inoue, S., Kohlhaas, S.L., Majid, A., Harper, N., Kennedy, D.B., Dyer, M.J., and Cohen, G.M. (2005a). Chronic lymphocytic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1. *Cell Death Differ* 12, 773-782.
- MacFarlane, M., Kohlhaas, S.L., Sutcliffe, M.J., Dyer, M.J., and Cohen, G.M. (2005b). TRAIL receptor-selective mutants signal to apoptosis via TRAIL-R1 in primary lymphoid malignancies. *Cancer Res* 65, 11265-11270.
- McEarchern, J.A., Smith, L.M., McDonagh, C.F., Klussman, K., Gordon, K.A., Morris-Tilden, C.A., Duniho, S., Ryan, M., Boursalian, T.E., Carter, P.J., *et al.* (2008). Preclinical characterization of SGN-70, a humanized antibody directed against CD70. *Clin Cancer Res* 14, 7763-7772.
- Migone, T.S., Zhang, J., Luo, X., Zhuang, L., Chen, C., Hu, B., Hong, J.S., Perry, J.W., Chen, S.F., Zhou, J.X., *et al.* (2002). TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator. *Immunity* 16, 479-492.
- Miller, J., Eisele, G., Tabatabai, G., Aulwurm, S., von Kurthy, G., Stitz, L., Roth, P., and Weller, M. (2010). Soluble CD70: a novel immunotherapeutic agent for experimental glioblastoma. *J Neurosurg* 113, 280-285.
- Mills, K.R., Reginato, M., Debnath, J., Queenan, B., and Brugge, J.S. (2004). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3438-3443.
- Miyazaki, T., and Reed, J.C. (2001). A GTP-binding adapter protein couples TRAIL receptors to apoptosis-inducing proteins. *Nat Immunol* 2, 493-500.
- Morizot, A., Merino, D., Lalaoui, N., Jacquemin, G., Granci, V., Iessi, E., Lanneau, D., Bouyer, F., Solary, E., Chauffert, B., *et al.* (2011). Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level. *Cell Death Differ* 18, 700-711.
- Muller, N., Wyzgol, A., Munkel, S., Pfizenmaier, K., and Wajant, H. (2008). Activity of soluble OX40 ligand is enhanced by oligomerization and cell surface immobilization. *FEBS J* 275, 2296-2304.
- Naismith, J.H., and Sprang, S.R. (1998). Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci* 23, 74-79.
- Natoni, A., MacFarlane, M., Inoue, S., Walewska, R., Majid, A., Knee, D., Stover, D.R., Dyer, M.J., and Cohen, G.M. (2007). TRAIL signals to apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells primarily through TRAIL-R1 whereas cross-linked agonistic TRAIL-R2 antibodies facilitate signalling via TRAIL-R2. *Br J Haematol* 139, 568-577.
- Nicholson, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-1042.

- Nieland, J.D., Graus, Y.F., Dortmans, Y.E., Kremers, B.L., and Kruisbeek, A.M. (1998). CD40 and CD70 co-stimulate a potent in vivo antitumor T cell response. *J Immunother* 21, 225-236.
- Nolte, M.A., Arens, R., van Os, R., van Oosterwijk, M., Hooibrink, B., van Lier, R.A., and van Oers, M.H. (2005). Immune activation modulates hematopoiesis through interactions between CD27 and CD70. *Nat Immunol* 6, 412-418.
- Nolte, M.A., van Offen, R.W., van Gisbergen, K.P., and van Lier, R.A. (2009). Timing and tuning of CD27-CD70 interactions: the impact of signal strength in setting the balance between adaptive responses and immunopathology. *Immunol Rev* 229, 216-231.
- Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., and Inohara, N. (1998). Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17, 3237-3245.
- Oflazoglu, E., Stone, I.J., Gordon, K., Wood, C.G., Repasky, E.A., Grewal, I.S., Law, C.L., and Gerber, H.P. (2008). Potent anticarcinoma activity of the humanized anti-CD70 antibody h1F6 conjugated to the tubulin inhibitor auristatin via an uncleavable linker. *Clin Cancer Res* 14, 6171-6180.
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y.F., Yu, G., Gentz, R., and Dixit, V.M. (1997). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277, 815-818.
- Papoff, G., Hausler, P., Eramo, A., Pagano, M.G., Di Leve, G., Signore, A., and Ruberti, G. (1999). Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem* 274, 38241-38250.
- Prasad, K.V., Ao, Z., Yoon, Y., Wu, M.X., Rizk, M., Jacquot, S., and Schlossman, S.F. (1997). CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6346-6351.
- Ramakrishnan, P., Wang, W., and Wallach, D. (2004). Receptor-specific signaling for both the alternative and the canonical NF-kappaB activation pathways by NF-kappaB-inducing kinase. *Immunity* 21, 477-489.
- Reis, C.R., van der Sloot, A.M., Natoni, A., Szegezdi, E., Setroikromo, R., Meijer, M., Sjollem, K., Stricher, F., Cool, R.H., Samali, A., *et al.* (2010). Rapid and efficient cancer cell killing mediated by high-affinity death receptor homotrimerizing TRAIL variants. *Cell Death Dis* 1, e83.
- Roberts, D.J., Franklin, N.A., Kingeter, L.M., Yagita, H., Tutt, A.L., Glennie, M.J., and Bullock, T.N. (2010). Control of established melanoma by CD27 stimulation is associated with enhanced effector function and persistence, and reduced PD-1 expression of tumor infiltrating CD8(+) T cells. *J Immunother* 33, 769-779.
- Roos, C., Wicovsky, A., Muller, N., Salzmann, S., Rosenthal, T., Kalthoff, H., Trauzold, A., Seher, A., Henkler, F., Kneitz, C., *et al.* (2010). Soluble and transmembrane TNF-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and noncanonical NF-kappa B pathway. *J Immunol* 185, 1593-1605.
- Ryan, M.C., Kostner, H., Gordon, K.A., Duniho, S., Sutherland, M.K., Yu, C., Kim, K.M., Nesterova, A., Anderson, M., McEarchern, J.A., *et al.* (2010). Targeting pancreatic and ovarian carcinomas using the auristatin-based anti-CD70 antibody-drug conjugate SGN-75. *Br J Cancer* 103, 676-684.
- Safa, A.R., and Pollok, K.E. (2011). Targeting the Anti-Apoptotic Protein c-FLIP for Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* 3, 1639-1671.

- Saleh, A., Srinivasula, S.M., Acharya, S., Fishel, R., and Alnemri, E.S. (1999). Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 274, 17941-17945.
- Samel, D., Muller, D., Gerspach, J., Assouhou-Luty, C., Sass, G., Tiegs, G., Pfizenmaier, K., and 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* 278, 32077-32082.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17, 1675-1687.
- Schimmer, A.D., Welsh, K., Pinilla, C., Wang, Z., Krajewska, M., Bonneau, M.J., Pedersen, I.M., Kitada, S., Scott, F.L., Bailly-Maitre, B., *et al.* (2004). Small-molecule antagonists of apoptosis suppressor XIAP exhibit broad antitumor activity. *Cancer Cell* 5, 25-35.
- Schneider, B., Munkel, S., Krippner-Heidenreich, A., Grunwald, I., Wels, W.S., Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Gerspach, J. (2010). Potent antitumoral activity of TRAIL through generation of tumor-targeted single-chain fusion proteins. *Cell Death Dis* 1, e68.
- Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J.L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A., and 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* 187, 1205-1213.
- Schneider, P., Olson, D., Tardivel, A., Browning, B., Lugovskoy, A., Gong, D., Dobles, M., Hertig, S., Hofmann, K., Van Vlijmen, H., *et al.* (2003). Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Biol Chem* 278, 5444-5454.
- Seo, B.R., Min, K.J., Kim, S., Park, J.W., Park, W.K., Lee, T.J., and Kwon, T.K. (2013). Anisomycin treatment enhances TRAIL-mediated apoptosis in renal carcinoma cells through the down-regulation of Bcl-2, c-FLIP(L) and Mcl-1. *Biochimie* 95, 858-865.
- Sheridan, J.P., Marsters, S.A., Pitti, R.M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C.L., Baker, K., Wood, W.I., *et al.* (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277, 818-821.
- Siegel, R.M., Frederiksen, J.K., Zacharias, D.A., Chan, F.K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R.Y., and Lenardo, M.J. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288, 2354-2357.
- Silence, K., Dreier, T., Moshir, M., Ulrichs, P., Gabriels, S.M., Saunders, M., Wajant, H., Brouckaert, P., Huyghe, L., Van Hauwermeiren, T., *et al.* (2014). ARGX-110, a highly potent antibody targeting CD70, eliminates tumors via both enhanced ADCC and immune checkpoint blockade. *MAbs* 6, 523-532.
- Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., *et al.* (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309-319.
- Sprick, M.R., Weigand, M.A., Rieser, E., Rauch, C.T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P.H., and Walczak, H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 12, 599-609.

- Srinivasula, S.M., Datta, P., Fan, X.J., Fernandes-Alnemri, T., Huang, Z., and Alnemri, E.S. (2000). Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J Biol Chem* 275, 36152-36157.
- Stadel, D., Mohr, A., Ref, C., MacFarlane, M., Zhou, S., Humphreys, R., Bachem, M., Cohen, G., Moller, P., Zwacka, R.M., *et al.* (2010). TRAIL-induced apoptosis is preferentially mediated via TRAIL receptor 1 in pancreatic carcinoma cells and profoundly enhanced by XIAP inhibitors. *Clin Cancer Res* 16, 5734-5749.
- Stiegelmaier, J., Bremer, E., Kellner, C., Liebig, T.M., ten Cate, B., Peipp, M., Schulze-Koops, H., Pfeiffer, M., Buhning, H.J., Greil, J., *et al.* (2008). Selective induction of apoptosis in leukemic B-lymphoid cells by a CD19-specific TRAIL fusion protein. *Cancer Immunol Immunother* 57, 233-246.
- Sun, X.M., Bratton, S.B., Butterworth, M., MacFarlane, M., and Cohen, G.M. (2002). Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *J Biol Chem* 277, 11345-11351.
- Tannous, B.A., Kim, D.E., Fernandez, J.L., Weissleder, R., and Breakefield, X.O. (2005). Codon-optimized *Gaussia luciferase* cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Mol Ther* 11, 435-443.
- Tschopp, J., Martinon, F., and Hofmann, K. (1999). Apoptosis: Silencing the death receptors. *Curr Biol* 9, R381-384.
- van Dijk, M., Halpin-McCormick, A., Sessler, T., Samali, A., and Szegezdi, E. (2013). Resistance to TRAIL in non-transformed cells is due to multiple redundant pathways. *Cell Death Dis* 4, e702.
- van Gisbergen, K.P., van Olfen, R.W., van Beek, J., van der Sluijs, K.F., Arens, R., Nolte, M.A., and van Lier, R.A. (2009). Protective CD8 T cell memory is impaired during chronic CD70-driven costimulation. *J Immunol* 182, 5352-5362.
- Vitovski, S., Phillips, J.S., Sayers, J., and Croucher, P.I. (2007). Investigating the interaction between osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappaB or tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: evidence for a pivotal role for osteoprotegerin in regulating two distinct pathways. *J Biol Chem* 282, 31601-31609.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.
- Wajant, H., Gerspach, J., and Pfizenmaier, K. (2013). Engineering death receptor ligands for cancer therapy. *Cancer Lett* 332, 163-174.
- Wajant, H., Moosmayer, D., Wuest, T., Bartke, T., Gerlach, E., Schonherr, U., Peters, N., Scheurich, P., and 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* 20, 4101-4106.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2002). TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy. *Apoptosis* 7, 449-459.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45-65.

- Wilson, N.S., Yang, A., Yang, B., Couto, S., Stern, H., Gogineni, A., Pitti, R., Marsters, S., Weimer, R.M., Singh, M., *et al.* (2012). Proapoptotic activation of death receptor 5 on tumor endothelial cells disrupts the vasculature and reduces tumor growth. *Cancer Cell* 22, 80-90.
- Wilson, N.S., Yang, B., Yang, A., Loeser, S., Marsters, S., Lawrence, D., Li, Y., Pitti, R., Totpal, K., Yee, S., *et al.* (2011). An Fcγ receptor-dependent mechanism drives antibody-mediated target-receptor signaling in cancer cells. *Cancer Cell* 19, 101-113.
- Wischhusen, J., Jung, G., Radovanovic, I., Beier, C., Steinbach, J.P., Rimner, A., Huang, H., Schulz, J.B., Ohgaki, H., Aguzzi, A., *et al.* (2002). Identification of CD70-mediated apoptosis of immune effector cells as a novel immune escape pathway of human glioblastoma. *Cancer Res* 62, 2592-2599.
- Wu, G., Chai, J., Suber, T.L., Wu, J.W., Du, C., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 408, 1008-1012.
- Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., *et al.* (1997). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* 17, 141-143.
- Wu, G.S., Burns, T.F., Zhan, Y., Alnemri, E.S., and El-Deiry, W.S. (1999). Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. *Cancer Res* 59, 2770-2775.
- Wyzgol, A., Muller, N., Fick, A., Munkel, S., Grigoleit, G.U., Pfizenmaier, K., and Wajant, H. (2009). Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand. *J Immunol* 183, 1851-1861.
- Yada, A., Yazawa, M., Ishida, S., Yoshida, H., Ichikawa, K., Kurakata, S., and Fujiwara, K. (2008). A novel humanized anti-human death receptor 5 antibody CS-1008 induces apoptosis in tumor cells without toxicity in hepatocytes. *Ann Oncol* 19, 1060-1067.
- Yamamoto, H., Kishimoto, T., and Minamoto, S. (1998). NF-κB activation in CD27 signaling: involvement of TNF receptor-associated factors in its signaling and identification of functional region of CD27. *J Immunol* 161, 4753-4759.
- Yu, J., and Zhang, L. (2005). The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 851-858.
- Zheng, S.J., Wang, P., Tsabary, G., and Chen, Y.H. (2004). Critical roles of TRAIL in hepatic cell death and hepatic inflammation. *J Clin Invest* 113, 58-64.
- Zinonos, I., Labrinidis, A., Lee, M., Liapis, V., Hay, S., Ponomarev, V., Diamond, P., Zannettino, A.C., Findlay, D.M., and Evdokiou, A. (2009). Apomab, a fully human agonistic antibody to DR5, exhibits potent antitumor activity against primary and metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther* 8, 2969-2980.

11. Anhang

11.1 DNA-Sequenzen

11.1.1 Gaussia-Flag-TNC-hTRAIL-pCR3

Gaussia:	1-185 Aa	1-555 Nt
Flag :	191-198 Aa	571-594 Nt
TNC:	201-230 Aa	601-690 Nt
hTRAILwt:	243-429 Aa	727-1287 Nt

```

1 atg ggc gtc aaa gtc ctg ttt gcc ctc atc tgt att gct gtc gct gag gct aaa
1 M G V K V L F A L I C I A V A E A K
55 cca acc gag aat aat gag gat ttc aac atc gtg gct gtg gca tcc aat ttt gct
19 P T E N N E D F N I V A V A S N F A
109 acc acc gac ctc gat gcc gat cgg gga aaa ctg cct ggc aaa aaa ctg ccc ctg
37 T T D L D A D R G K L P G K K L P L
163 gaa gtg ctg aaa gag atg gag gcc aac gct aga aaa gct ggc tgt act aga gga
55 E V L K E M E A N A R K A G C T R G
217 tgt ctc atc tgc ctg tcc cac atc aag tgt acc cca aaa atg aaa aaa ttc atc
73 C L I C L S H I K C T P K M K K F I
271 cct ggc cgg tgt cac aca tac gag gcc gac aag gaa tct gct cag gcc gga atc
91 P G R C H T Y E G D K E S A Q G G I
325 gga gag gct att gtg gat att cct gaa att cct gga ttc aag gac ctg gag cct
109 G E A I V D I P E I P G F K D L E P
379 atg gaa cag ttt atc gcc cag gtg gac ctc tgt gtc gat tgt aca act gcc tgc
127 M E Q F I A Q V D L C V D C T T G C
433 ctg aaa ggg ctg gcc aat gtc cag tgt agt gac ctg ctg aaa aaa tgg ctg ccc
145 L K G L A N V Q C S D L L K K W L P
487 cag aga tgt gcc act ttc gcc tct aaa att cag gcc cag gtc gac aaa atc aaa
163 Q R C A T F A S K I Q G Q V D K I K
541 ggc gct gga gga gac tct gga gct gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aa
181 G A G G D S G A G S D Y K D D D D K
595 gat atc gcc tgt ggc tgt gcg gct gcc cca gac atc aag gac ctg ctg agc aga
199 D I A C G C A A A P D I K D L L S R
649 ctg gag gag ctg gag ggg ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag ggt acc gga ggt
217 L E E L E G L V S S L R E Q G T G G
703 ggg tct ggc ggc cgc ggt gaa ttc acc agc gaa gag aca atc agc acc gtg cag
235 G S G G R G E F T S E E T I S T V Q
757 gaa aag cag cag aac atc agc ccc ctc gtg cgc gaa agg ggc cct cag aga gtg
253 E K Q Q N I S P L V R E R G P Q R V
811 gcc gcc cac atc act ggc acc aga ggc aga agc aac acc ctg agc agc ccc aac
271 A A H I T G T R G R S N T L S S P N
865 agc aag aac gag aag gcc ctg ggc cgg aag atc aac agc tgg gag tct agc aga
289 S K N E K A L G R K I N S W E S S R
919 agc ggc cac agc ttt ctg agc aac ctg cac ctg aga aac ggc gag ctc gtg atc
307 S G H S F L S N L H L R N G E L V I
973 cac gag aag ggc ttc tac tac atc tac agc cag acc tac ttc cga ttc cag gaa
325 H E K G F Y Y I Y S Q T Y F R F Q E
1027 gag atc aaa gag aat acc aag aac gac aag cag atg gtg cag tac atc tat aag
343 E I K E N T K N D K Q M V Q Y I Y K

```

```

1081 tac acc agc tac ccc gac ccc atc ctg ctg atg aag tcc gcc cgg aac agc tgc
361 Y T S Y P D P I L L M K S A R N S C
1135 tgg tcc aag gat gcc gag tac ggc ctg tac agc atc tac cag ggc ggc atc ttc
379 W S K D A E Y G L Y S I Y Q G G I F
1189 gag ctg aaa gag aac gac cgg atc ttc gtg tcc gtg acc aac gag cac ctg ata
397 E L K E N D R I F V S V T N E H L I
1243 gac atg gac cac gag gcc agc ttt ttc ggc gcc ttc ctc gtg gga tag
415 D M D H E A S F F G A F L V G -

```

11.1.2 Gaussia-Flag-TNC-hTRAILmutR1-pCR3

Gaussia: 1-185 Aa 1-555 Nt
Flag : 191-198 Aa 571-594 Nt
TNC: 201-230 Aa 601-690 Nt
hTRAILmutR1: 243-429 Aa 727-1287 Nt

Bindungsspezifische Mutation: G131R-R149I-S159R-N199R-K201H-S215D

```

1 atg ggc gtc aaa gtc ctg ttt gcc ctc atc tgt att gct gtc gct gag gct aaa
1 M G V K V L F A L I C I A V A E A K
55 cca acc gag aat aat gag gat ttc aac atc gtg gct gtg gca tcc aat ttt gct
19 P T E N N E D F N I V A V A S N F A
109 acc acc gac ctc gat gcc gat cgg gga aaa ctg cct ggc aaa aaa ctg ccc ctg
37 T T D L D A D R G K L P G K K L P L
163 gaa gtg ctg aaa gag atg gag gcc aac gct aga aaa gct ggc tgt act aga gga
55 E V L K E M E A N A R K A G C T R G
217 tgt ctc atc tgc ctg tcc cac atc aag tgt acc cca aaa atg aaa aaa ttc atc
73 C L I C L S H I K C T P K M K K F I
271 cct ggc cgg tgt cac aca tac gag ggc gac aag gaa tct gct cag ggc gga atc
91 P G R C H T Y E G D K E S A Q G G I
325 gga gag gct att gtg gat att cct gaa att cct gga ttc aag gac ctg gag cct
109 G E A I V D I P E I P G F K D L E P
379 atg gaa cag ttt atc gcc cag gtg gac ctc tgt gtc gat tgt aca act ggc tgc
127 M E Q F I A Q V D L C V D C T T G C
433 ctg aaa ggg ctg gcc aat gtc cag tgt agt gac ctg ctg aaa aaa tgg ctg ccc
145 L K G L A N V Q C S D L L K K W L P
487 cag aga tgt gcc act ttc gcc tct aaa att cag ggc cag gtc gac aaa atc aaa
163 Q R C A T F A S K I Q G Q V D K I K
541 ggc gct gga gga gac tct gga gct gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa
181 G A G G D S G A G S D Y K D D D D K
595 gat atc gcc tgt ggc tgt gcg gct gcc cca gac atc aag gac ctg ctg agc aga
199 D I A C G C A A A P D I K D L L S R
649 ctg gag gag ctg gag ggg ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag ggt acc gga ggt
217 L E E L E G L V S S L R E Q G T G G
703 ggg tct ggc ggc cgc ggt gaa ttc acc agc gaa gag aca atc agc acc gtg cag
235 G S G G R G E F T S E E T I S T V Q
757 gaa aag cag cag aac atc agc ccc ctc gtg cgc gaa agg ggc cct cag aga gtg
253 E K Q Q N I S P L V R E R G P Q R V
811 gcc gcc cac atc act ggc acc aga agg aga agc aac acc ctg agc agc ccc aac
271 A A H I T G T R R R S N T L S S P N
865 agc aag aac gag aag gcc ctg ggc atc aag atc aac agc tgg gag tct agc aga
289 S K N E K A L G I K I N S W E S S R
919 cgg ggc cac agc ttt ctg agc aac ctg cac ctg aga aac ggc gag ctc gtg atc
307 R G H S F L S N L H L R N G E L V I
973 cac gag aag ggc ttc tac tac atc tac agc cag acc cag ttc aag ttc cgg gaa
325 H E K G F Y Y I Y S Q T Q F K F R E

```

```

1027 gag atc aaa gag cgg acc cac aac gac aag cag atg gtg cag tac atc tat aag
343 E I K E R T H N D K Q M V Q Y I Y K
1081 tac acc gac tac ccc gac ccc atc ctg ctg atg aag tcc gcc cgg aac agc tgc
361 Y T D Y P D P I L L M K S A R N S C
1135 tgg tcc aag gat gcc gag tac ggc ctg tac agc atc tac cag ggc ggc atc ttc
379 W S K D A E Y G L Y S I Y Q G G I F
1189 gag ctg aaa gag aac gac cgg atc ttc gtg tcc gtg acc aac gag cgg ctg ctg
397 E L K E N D R I F V S V T N E R L L
1243 cag atg gac cac gag gcc agc ttt ttc ggc gcc ttc ctc gtg gga tag
415 Q M D H E A S F F G A F L V G -

```

11.1.3 Gaussia-Flag-TNC-hTRAILmutR2-pCR3

Gaussia:	1-185 Aa	1-555 Nt
Flag :	191-198 Aa	571-594 Nt
TNC:	201-230 Aa	601-690 Nt
hTRAILmutR2:	243-429 Aa	727-1287 Nt

Bindungsspezifische Mutation: Y189Q-R191K-Q193R-H264R-I266L-D267Q

```

1 atg ggc gtc aaa gtc ctg ttt gcc ctc atc tgt att gct gtc gct gag gct aaa
1 M G V K V L F A L I C I A V A E A K
55 cca acc gag aat aat gag gat ttc aac atc gtg gct gtg gca tcc aat ttt gct
19 P T E N N E D F N I V A V A S N F A
109 acc acc gac ctc gat gcc gat cgg gga aaa ctg cct ggc aaa aaa ctg ccc ctg
37 T T D L D A D R G K L P G K K L P L
163 gaa gtg ctg aaa gag atg gag gcc aac gct aga aaa gct ggc tgt act aga gga
55 E V L K E M E A N A R K A G C T R G
217 tgt ctc atc tgc ctg tcc cac atc aag tgt acc cca aaa atg aaa aaa ttc atc
73 C L I C L S H I K C T P K M K K F I
271 cct ggc cgg tgt cac aca tac gag ggc gac aag gaa tct gct cag ggc gga atc
91 P G R C H T Y E G D K E S A Q G G I
325 gga gag gct att gtg gat att cct gaa att cct gga ttc aag gac ctg gag cct
109 G E A I V D I P E I P G F K D L E P
379 atg gaa cag ttt atc gcc cag gtg gac ctc tgt gtc gat tgt aca act ggc tgc
127 M E Q F I A Q V D L C V D C T T G C
433 ctg aaa ggg ctg gcc aat gtc cag tgt agt gac ctg ctg aaa aaa tgg ctg ccc
145 L K G L A N V Q C S D L L K K W L P
487 cag aga tgt gcc act ttc gcc tct aaa att cag ggc cag gtc gac aaa atc aaa
163 Q R C A T F A S K I Q G Q V D K I K
541 ggc gct gga gga gac tct gga gct gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa
181 G A G G D S G A G S D Y K D D D D K
595 gat atc gcc tgt ggc tgt gcg gct gcc cca gac atc aag gac ctg ctg agc aga
199 D I A C G C A A A P D I K D L L S R
649 ctg gag gag ctg gag ggg ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag ggt acc gga ggt
217 L E E L E G L V S S L R E Q G T G G
703 ggg tct ggc ggc cgc ggt gaa ttc acc agc gaa gag aca atc agc acc gtg cag
235 G S G G R G E F T S E E T I S T V Q
757 gaa aag cag cag aac atc agc ccc ctc gtg cgc gaa agg ggc cct cag aga gtg
253 E K Q Q N I S P L V R E R G P Q R V
811 gcc gcc cac atc act ggc acc aga ggc aga agc aac acc ctg agc agc ccc aac
271 A A H I T G T R G R S N T L S S P N
865 agc aag aac gag aag gcc ctg ggc cgg aag atc aac agc tgg gag tct agc aga
289 S K N E K A L G R K I N S W E S S R
919 agc ggc cac agc ttt ctg agc aac ctg cac ctg aga aac ggc gag ctc gtg atc
307 S G H S F L S N L H L R N G E L V I

```

```

973 cac gag aag ggc ttc tac tac atc tac agc cag acc cag ttc aag ttc cgg gaa
325 H E K G F Y Y I Y S Q T Q F K F R E
1027 gag atc aaa gag aat acc aag aac gac aag cag atg gtg cag tac atc tat aag
343 E I K E N T K N D K Q M V Q Y I Y K
1081 tac acc agc tac ccc gac ccc atc ctg ctg atg aag tcc gcc cgg aac agc tgc
361 Y T S Y P D P I L L M K S A R N S C
1135 tgg tcc aag gat gcc gag tac ggc ctg tac agc atc tac cag ggc ggc atc ttc
379 W S K D A E Y G L Y S I Y Q G G I F
1189 gag ctg aaa gag aac gac cgg atc ttc gtg tcc gtg acc aac gag cgg ctg ctg
397 E L K E N D R I F V S V T N E R L L
1243 cag atg gac cac gag gcc agc ttt ttc ggc gcc ttc ctc gtg gga tag
415 Q M D H E A S F F G A F L V G -

```

11.1.4 Flag-TNC-hTRAIL-pCR3

Signalpeptid:	1-28 Aa	1-84 Nt
Flag :	29-36 Aa	85-108 Nt
TNC:	39-68 Aa	115-204 Nt
hTRAILwt:	81-267 Aa	241-801 Nt

```

1 atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg ctg aag ggc gtg cag
1 M N F G F S L I F L V L V L K G V Q
55 tgc gag gtg aag ctg gtg cca cgc gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa
19 C E V K L V P R G S D Y K D D D D K
109 gat atc gcc tgt ggc tgt gcg gct gcc cca gac atc aag gac ctg ctg agc aga
37 D I A C G C A A A P D I K D L L S R
163 ctg gag gag ctg gag ggg ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag ggt acc gga ggt
55 L E E L E G L V S S L R E Q G T G G
217 ggg tct ggc ggc gcg ggt gaa ttc acc agc gaa gag aca atc agc acc gtg cag
73 G S G G R G E F T S E E T I S T V Q
271 gaa aag cag cag aac atc agc ccc ctc gtg cgc gaa agg ggc cct cag aga gtg
91 E K Q Q N I S P L V R E R G P Q R V
325 gcc gcc cac atc act ggc acc aga ggc aga agc aac acc ctg agc agc ccc aac
109 A A H I T G T R G R S N T L S S P N
379 agc aag aac gag aag gcc ctg ggc cgg aag atc aac agc tgg gag tct agc aga
127 S K N E K A L G R K I N S W E S S R
433 agc ggc cac agc ttt ctg agc aac ctg cac ctg aga aac ggc gag ctc gtg atc
145 S G H S F L S N L H L R N G E L V I
487 cac gag aag ggc ttc tac tac atc tac agc cag acc tac ttc cga ttc cag gaa
163 H E K G F Y Y I Y S Q T Y F R F Q E
541 gag atc aaa gag aat acc aag aac gac aag cag atg gtg cag tac atc tat aag
181 E I K E N T K N D K Q M V Q Y I Y K
595 tac acc agc tac ccc gac ccc atc ctg ctg atg aag tcc gcc cgg aac agc tgc
199 Y T S Y P D P I L L M K S A R N S C
649 tgg tcc aag gat gcc gag tac ggc ctg tac agc atc tac cag ggc ggc atc ttc
217 W S K D A E Y G L Y S I Y Q G G I F
703 gag ctg aaa gag aac gac cgg atc ttc gtg tcc gtg acc aac gag cac ctg ata
235 E L K E N D R I F V S V T N E H L I
757 gac atg gac cac gag gcc agc ttt ttc ggc gcc ttc ctc gtg gga tag
253 D M D H E A S F F G A F L V G -

```

11.1.5 Flag-TNC-hTRAILmutR1-pCR3

Signalpeptid: 1-28 Aa 1-84 Nt
 Flag : 29-36 Aa 85-108 Nt
 TNC: 39-68 Aa 115-204 Nt
 hTRAILmutR1: 81-267 Aa 241-801 Nt

Bindungsspezifische Mutation: G131R-R149I-S159R-N199R-K201H-S215D

```

1 atg aac ttc ggg ttc agc ttg att ttc ctg gtc ctg gtg ctg aag ggc gtg cag
1 M N F G F S L I F L V L V L K G V Q
55 tgc gag gtg aag ctg gtg cca cgc gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa
19 C E V K L V P R G S D Y K D D D D K
109 gat atc gcc tgt ggc tgt gcg gct gcc cca gac atc aag gac ctg ctg agc aga
37 D I A C G C A A A P D I K D L L S R
163 ctg gag gag ctg gag ggg ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag ggt acc gga ggt
55 L E E L E G L V S S L R E Q G T G G
217 ggg tct ggc ggc cgc ggt gaa ttc acc agc gaa gag aca atc agc acc gtg cag
73 G S G G R G E F T S E E T I S T V Q
271 gaa aag cag cag aac atc agc ccc ctc gtg cgc gaa agg ggc cct cag aga gtg
91 E K Q Q N I S P L V R E R G P Q R V
325 gcc gcc cac atc act ggc acc aga agg aga agc aac acc ctg agc agc ccc aac
109 A A H I T G T R R R S N T L S S P N
379 agc aag aac gag aag gcc ctg ggc atc aag atc aac agc tgg gag tct agc aga
127 S K N E K A L G I K I N S W E S S R
433 cgg ggc cac agc ttt ctg agc aac ctg cac ctg aga aac ggc gag ctc gtg atc
145 R G H S F L S N L H L R N G E L V I
487 cac gag aag ggc ttc tac tac atc tac agc cag acc tac ttc cga ttc cag gaa
163 H E K G F Y Y I Y S Q T Y F R F Q E
541 gag atc aaa gag aat acc cac aac gac aag cag atg gtg cag tac atc tat aag
181 E I K E N T H N D K Q M V Q Y I Y K
595 tac acc gac tac ccc gac ccc atc ctg ctg atg aag tcc gcc cgg aac agc tgc
199 Y T D Y P D P I L L M K S A R N S C
649 tgg tcc aag gat gcc gag tac ggc ctg tac agc atc tac cag ggc ggc atc ttc
217 W S K D A E Y G L Y S I Y Q G G I F
703 gag ctg aaa gag aac gac cgg atc ttc gtg tcc gtg acc aac gag cac ctg ata
235 E L K E N D R I F V S V T N E H L I
757 gac atg gac cac gag gcc agc ttt ttc ggc gcc ttc ctc gtg gga tag
253 D M D H E A S F F G A F L V G -

```

11.1.6 Flag-TNC-hTRAILmutR2-pCR3

Signalpeptid: 1-28 Aa 1-84 Nt
 Flag : 29-36 Aa 85-108 Nt
 TNC: 39-68 Aa 115-204 Nt
 hTRAILmutR2: 81-267 Aa 241-801 Nt

Bindungsspezifische Mutation: Y189Q-R191K-Q193R-H264R-I266L-D267Q

```

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

```



```

55 tgc gag gtg aag ctg gtg cca cgc gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa
19 C E V K L V P R G S D Y K D D D D K
109 gat atc gcc tgt ggc tgt gcg gct gcc cca gac atc aag gac ctg ctg agc aga
37 D I A C G C A A A P D I K D L L S R
163 ctg gag gag ctg gag ggg ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag ggt acc gga ggt
55 L E E L E G L V S S L R E Q G T G G
217 ggg tct ggc ggc cgc ggt gaa ttc acc agc gaa gag aca atc agc acc gtg cag
73 G S G G R G E F T S E E T I S T V Q
271 gaa aag cag cag aac atc agc ccc ctc gtg cgc gaa agg ggc cct cag aga gtg
91 E K Q Q N I S P L V R E R G P Q R V
325 gcc gcc cac atc act ggc acc aga ggc aga agc aac acc ctg agc agc ccc aac
109 A A H I T G T R G R S N T L S S P N
379 agc aag aac gag aag gcc ctg ggc cgg aag atc aac agc tgg gag tct agc aga
127 S K N E K A L G R K I N S W E S S R
433 agc ggc cac agc ttt ctg agc aac ctg cac ctg aga aac ggc gag ctc gtg atc
145 S G H S F L S N L H L R N G E L V I
487 cac gag aag ggc ttc tac tac atc tac agc cag acc cag ttc aag ttc cgg gaa
163 H E K G F Y Y I Y S Q T Q F K F R E
541 gag atc aaa gag aat acc aag aac gac aag cag atg gtg cag tac atc tat aag
181 E I K E N T K N D K Q M V Q Y I Y K
595 tac acc agc tac ccc gac ccc atc ctg ctg atg aag tcc gcc cgg aac agc tgc
199 Y T S Y P D P I L L M K S A R N S C
649 tgg tcc aag gat gcc gag tac ggc ctg tac agc atc tac cag ggc ggc atc ttc
217 W S K D A E Y G L Y S I Y Q G G I F
703 gag ctg aaa gag aac gac cgg atc ttc gtg tcc gtg acc aac gag cgg ctg ctc
235 E L K E N D R I F V S V T N E R L L
757 cag atg gac cac gag gcc agc ttt ttc ggc gcc ttc ctc gtg gga tag
253 Q M D H E A S F F G A F L V G -

```

11.1.7 TRAILR1_{ed}-2xFlag-Fc

Signalpeptid:	1-23 Aa	1-69 Nt
TRAILR1 _{ed} :	24-239 Aa	70-717 Nt
Flag(2x):	242-249/252-259 Aa	724-747/754-777 Nt
Fc:	262-487 Aa	785-1461 Nt

```

1 atg gcg cca cca cca gct aga gta cat cta ggt gcg ttc ctg gca gtg act ccg
1 M A P P P A R V H L G A F L A V T P
55 aat ccc ggg agc gca gcg agt ggg aca gag gca gcc gcg gcc aca ccc agc aaa
19 N P G S A A S G T E A A A A T P S K
109 gtg tgg ggc tct tcc gcg ggg agg att gaa cca cga ggc ggg ggc cga gga gcg
37 V W G S S A G R I E P R G G G R G A
163 ctc cct acc tcc atg gga cag cac gga ccc agt gcc cgg gcc cgg gca ggg cgc
55 L P T S M G Q H G P S A R A R A G R
217 gcc cca gga ccc agg ccg gcg cgg gaa gcc agc cct cgg ctc cgg gtc cac aag
73 A P G P R P A R E A S P R L R V H K
271 acc ttc aag ttt gtc gtc gtc ggg gtc ctg ctg cag gtc gta cct agc tca gct
91 T F K F V V V G V L L Q V V P S S A
325 gca acc atc aaa ctt cat gat caa tca att ggc aca cag caa tgg gaa cat agc
109 A T I K L H D Q S I G T Q Q W E H S
379 cct ttg gga gag ttg tgt cca cca gga tct cat aga tca gaa cat cct gga gcc
127 P L G E L C P P G S H R S E H P G A
433 tgt aac cgg tgc aca gag ggt gtg ggt tac acc aat gct tcc aac aat ttg ttt
145 C N R C T E G V G Y T N A S N N L F

```

```

487 gct tgc ctc cca tgt aca gct tgt aaa tca gat gaa gaa gag aga agt ccc tgc
163 A C L P C T A C K S D E E E R S P C
541 acc acg acc agg aac aca gca tgt cag tgc aaa cca gga act ttc cgg aat gac
181 T T T R N T A C Q C K P G T F R N D
595 aat tct gct gag atg tgc cgg aag tgc agc aga ggg tgc ccc aga ggg atg gtc
199 N S A E M C R K C S R G C P R G M V
649 aag gtc aag gat tgt acg ccc tgg agt gac atc gag tgt gtc cac aaa gaa tca
217 K V K D C T P W S D I E C V H K E S
703 ggc aat gga cat aat gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa gaa ttc gat
235 G N G H N G S D Y K D D D D K E F D
757 tac aaa gac gat gac gat aaa ctc gag aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca
253 Y K D D D D K L E K T H T C P P C P
811 gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag
271 A P E L L G G P S V F L F P P K P K
865 gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg
289 D T L M I S R T P E V T C V V V D V
919 agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg
307 S H E D P E V K F N W Y V D G V E V
973 cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg
325 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V
1027 gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag
343 V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K
1081 tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa
361 C K V S N K A L P A P I E K T I S K
1135 gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat
379 A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D
1189 gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc
397 E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P
1243 agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag
415 S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K
1297 acc acg cct ccc gtg ttg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc
433 T T P P V L D S D G S F F L Y S K L
1351 acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg
451 T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M
1405 cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt
469 H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G
1459 aaa tag
487 K -

```

11.1.8 TRAILR2_{ed}-2xFlag-Fc

Signalpeptid:	1-44 Aa	1-132 Nt
TRAILR2 _{ed} :	45-199 Aa	133-597 Nt
Flag(2x):	202-209/212-219 Aa	604-627/634-657 Nt
Fc:	222-447 Aa	664-1341 Nt

```

1 atg gaa caa cgg gga cag aac gcc ccg gcc gct tcg gag gcg cgg gga gcc agg
1 M E Q R G Q N A P A A S E A R G A R
55 cct ggg ctc cgg gtc ccc aag acc ctt gtg ctc gtt gtc gcc gcg gtc ctg ctg
19 P G L R V P K T L V L V V A A V L L
109 ttg gtc tca gct gag tct gct ctg atc acc caa caa gac cta gct ccc cag cag
37 L V S A E S A L I T Q Q D L A P Q Q
163 aga gcg gcc cca caa caa aag agg tcc agc ccc tca gag gga ttg tgt cca cct
55 R A A P Q Q K R S S P S E G L C P P

```

```

217 gga cac cat atc tca gaa gac ggt aga gat tgc atc tcc tgc aaa tat gga cag
 73 G H H I S E D G R D C I S C K Y G Q
271 gac tat agc act cac tgg aat gac ctc ctt ttc tgc ttg cgc tgc acc agg tgt
 91 D Y S T H W N D L L F C L R C T R C
325 gat tca ggt gaa gtg gag cta agt ccc tgc acc acg acc aga aac aca gtg tgt
109 D S G E V E L S P C T T T R N T V C
379 cag tgc gaa gaa ggc acc ttc cgg gaa gaa gat tct cct gag atg tgc cgg aag
127 Q C E E G T F R E E D S P E M C R K
433 tgc cgc aca ggg tgt ccc aga ggg atg gtc aag gtc ggt gat tgt aca ccc tgg
145 C R T G C P R G M V K V G D C T P W
487 agt gac atc gaa tgt gtc cac aaa gaa tca ggt aca aag cac agt ggg gaa gcc
163 S D I E C V H K E S G T K H S G E A
541 cca gct gtg gag gag acg gtg acc tcc agc cca ggg act cct gcc tct ccc tgt
181 P A V E E T V T S S P G T P A S P C
595 tct gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa gaa ttc gat tac aaa gac gat
199 S G S D Y K D D D D K E F D Y K D D
649 gac gat aaa ctc gag aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc
217 D D K L E K T H T C P P C P A P E L
703 ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg
235 L G G P S V F L F P P K P K D T L M
757 atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac
253 I S R T P E V T C V V V D V S H E D
811 cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag
271 P E V K F N W Y V D G V E V H N A K
865 aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc
289 T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L
919 acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc
307 T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S
973 aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag
325 N K A L P A P I E K T I S K A K G Q
1027 ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag
343 P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K
1081 aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc
361 N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A
1135 gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc
379 V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
1189 gtg ttg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag
397 V L D S D G S F F L Y S K L T V D K
1243 agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg
415 S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L
1297 cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tag
433 H N H Y T Q K S L S L S P G K -

```

11.1.9 CD27_{ed}-Flag-Fc-Gaussia(w/o)

Signalpeptid:	1-19 Aa	1-57 Nt
CD27 _{ed} :	20-191 Aa	58-573 Nt
Fc:	194-419 Aa	580-1257 Nt
Flag:	422-429 Aa	1264-1287 Nt
Gaussia(w/o):	432-600 Aa	1294-1797 Nt

```

1 atg gca cgg cca cat ccc tgg tgg ctg tgc gtt ctg ggg acc ctg gtg ggg ctc
1 M A R P H P W W L C V L G T L V G L

```

55 tca gct act cca gcc ccc aag agc tgc cca gag agg cac tac tgg gct cag gga
 19 S A T P A P K S C P E R H Y W A Q G
 109 aag ctg tgc tgc cag atg tgt gag cca gga aca ttc ctc gtg aag gac tgt gac
 37 K L C C Q M C E P G T F L V K D C D
 163 cag cat aga aag gct gct cag tgt gat cct tgc ata ccg ggg gtc tcc ttc tct
 55 Q H R K A A Q C D P C I P G V S F S
 217 cct gac cac cac acc cgg ccc cac tgt gag agc tgt cgg cac tgt aac tct ggt
 73 P D H H T R P H C E S C R H C N S G
 271 ctt ctc gtt cgc aac tgc acc atc act gcc aat gct gag tgt gcc tgt cgc aat
 91 L L V R N C T I T A N A E C A C R N
 325 ggc tgg cag tgc agg gac aag gag tgc acc gag tgt gat cct ctt cca aac cct
 109 G W Q C R D K E C T E C D P L P N P
 379 tcg ctg acc gct cgg tcg tct cag gcc ctg agc cca cac cct cag ccc acc cac
 127 S L T A R S S Q A L S P H P Q P T H
 433 tta cct tat gtc agt gag atg ctg gag gcc agg aca gct ggg cac atg cag act
 145 L P Y V S E M L E A R T A G H M Q T
 487 ctg gct gac ttc agg cag ctg cct gcc cgg act ctc tct acc cac tgg cca ccc
 163 L A D F R Q L P A R T L S T H W P P
 541 caa aga tcc ctg tgc agc tcc gat ttt att cgc gga tcc aaa act cac aca tgc
 181 Q R S L C S S D F I R G S K T H T C
 595 cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc
 199 P P C P A P E L L G G P S V F L F P
 649 cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg
 217 P K P K D T L M I S R T P E V T C V
 703 gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac
 235 V V D V S H E D P E V K F N W Y V D
 757 ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc
 253 G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S
 811 acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc
 271 T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G
 865 aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa
 289 K E Y K C K V S N K A L P A P I E K
 919 acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc
 307 T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P
 973 cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa
 325 P S R D E L T K N Q V S L T C L V K
 1027 ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag
 343 G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E
 1081 aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ttg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc
 361 N N Y K T T P P V L D S D G S F F L
 1135 tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca
 379 Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S
 1189 tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc
 397 C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S
 1243 ctg tct ccg ggt aaa gaa ttc gat tac aaa gac gat gac gat aaa ctc gag aaa
 415 L S P G K E F D Y K D D D D K L E K
 1297 cca acc gag aat aat gag gat ttc aac atc gtg gct gtg gca tcc aat ttt gct
 433 P T E N N E D F N I V A V A S N F A
 1351 acc acc gac ctc gat gcc gat cgg gga aaa ctg cct ggc aaa aaa ctg ccc ctg
 451 T T D L D A D R G K L P G K K L P L
 1405 gaa gtg ctg aaa gag atg gag gcc aac gct aga aaa gct ggc tgt act aga gga
 469 E V L K E M E A N A R K A G C T R G
 1459 tgt ctc atc tgc ctg tcc cac atc aag tgt acc cca aaa atg aaa aaa ttc atc
 487 C L I C L S H I K C T P K M K K F I
 1513 cct ggc cgg tgt cac aca tac gag ggc gac aag gaa tct gct cag ggc gga atc
 505 P G R C H T Y E G D K E S A Q G G I
 1567 gga gag gct att gtg gat att cct gaa att cct gga ttc aag gac ctg gag cct
 523 G E A I V D I P E I P G F K D L E P
 1621 atg gaa cag ttt atc gcc cag gtg gac ctc tgt gtc gat tgt aca act ggc tgc
 541 M E Q F I A Q V D L C V D C T T G C
 1675 ctg aaa ggg ctg gcc aat gtc cag tgt agt gac ctg ctg aaa aaa tgg ctg ccc
 559 L K G L A N V Q C S D L L K K W L P

```

1729 cag aga tgt gcc act ttc gcc tct aaa att cag ggc cag gtc gac aaa atc aaa
577  Q  R  C  A  T  F  A  S  K  I  Q  G  Q  V  D  K  I  K
1783 ggt gcc ggt ggt gat taa
595  G  A  G  G  D  -

```

11.1.10 scFv:CD70(27B3)-Flag-TNC-TRAILwt

scFv:CD70:	1-282 Aa	1-846 Nt
Leader:	1-20 Aa	1-60 Nt
VH:	23-150 Aa	67-450 Nt
Linker:	151-165 Aa	451-495 Nt
VL:	166-282 Aa	496-846 Nt

Flag:	283-290 Aa	847-870 Nt
-------	------------	------------

TNC:	293-322 Aa	877-967 Nt
------	------------	------------

TRAILwt:	335-521 Aa	1003-1563 Nt
----------	------------	--------------

```

1 atg aac ttc ggc ttc agc ctg atc ttc ctg gtg ctg gtg ctg aag ggc ctg gtg
1  M  N  F  G  F  S  L  I  F  L  V  L  V  L  K  G  L  V
55 ccc cgg caa ttg gag gtg cag ctg gtg gaa tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct
19  P  R  Q  L  E  V  Q  L  V  E  S  G  G  G  L  V  Q  P
109 gtg cag tgc gaa gtg aag ggc gga tct ctg aga ctg agc tgt gcc gcc agc ggc
37  V  Q  C  E  V  K  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G
163 ttc acc ttc agc gtg tac tac atg aac tgg gtg cgc cag gcc cct ggc aag gga
55  F  T  F  S  V  Y  Y  M  N  W  V  R  Q  A  P  G  K  G
217 ctg gaa tgg gtg tcc gac atc aac aac gag ggc ggc acc acc tac tac gcc gac
73  L  E  W  V  S  D  I  N  N  E  G  G  T  T  Y  Y  A  D
271 agc gtg aag ggc cgg ttc acc atc agc cgg gac aac gcc aag aac acc ctg acc
91  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  A  K  N  T  L  T
325 ctg cag atg aac agc ctg aag ccc gag gac acc gcc ctg tac tac tgt gtg cgg
109 L  Q  M  N  S  L  K  P  E  D  T  A  L  Y  Y  C  V  R
379 gat gcc ggc tac agc aac cac gtg ccc atc ttc gat agc tgg ggc cag ggc aca
127 D  A  G  Y  S  N  H  V  P  I  F  D  S  W  G  Q  G  T
433 caa gtg atc gtg gct agc gga ggc gga gga tca ggc ggc gga gga agt ggc gga
145 Q  V  I  V  A  S  G  G  G  G  S  G  G  G  G  S  G  G
487 ggg gga tct cag gct gtc gtg acc cag gaa cct agc ctg acc gtg tct cct ggc
163 G  G  S  Q  A  V  V  T  Q  E  P  S  L  T  V  S  P  G
541 gga acc gtg acc ctg acc tgt ggc ctg aag tct ggc agc gtg acc tcc acc aac
181 G  T  V  T  L  T  C  G  L  K  S  G  S  V  T  S  T  N
595 ttc ccc acc tgg tat cag cag acc ccc gga cag gct ccc cgg ctg ctg atc tac
199 F  P  T  W  Y  Q  Q  T  P  G  Q  A  P  R  L  L  I  Y
649 aac acc aac acc aga cac agc ggc gtg ccc agc aga ttc agc ggc agc atc agc
217 N  T  N  T  R  H  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  I  S
703 gag aac aag gcc gcc ctg aca atc act ggc gcc cag cct gag gat gag gcc gag
235 E  N  K  A  A  L  T  I  T  G  A  Q  P  E  D  E  A  E
757 tac ttc tgc gcc ctg ttc atc agc aac ccc agc gtg gaa ttt gga ggc ggc acc
253 Y  F  C  A  L  F  I  S  N  P  S  V  E  F  G  G  G  T
811 cag ctg acc gtg ctg gcc tct aca aaa ggc gga tcc gat tac aaa gac gat gac
271 Q  L  T  V  L  A  S  T  K  G  G  S  D  Y  K  D  D  D
865 gat aaa gat atc gcc tgt ggc tgt gcg gct gcc cca gac atc aag gac ctg ctg
289 D  K  D  I  A  C  G  C  A  A  A  P  D  I  K  D  L  L
919 agc aga ctg gag gag ctg gag ggg ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag ggt acc
307 S  R  L  E  E  L  E  G  L  V  S  S  L  R  E  Q  G  T
973 gga ggt ggg tct ggc ggc cgc ggt gaa ttc acc tct gag gaa acc att tct aca

```

```

325 G G G S G G R G E F T S E E T I S T
1027 gtt caa gaa aag caa caa aat att tct ccc cta gtg aga gaa aga ggt cct cag
343 V Q E K Q Q N I S P L V R E R G P Q
1081 aga gta gca gct cac ata act ggg acc aga gga aga agc aac aca ttg tct tct
361 R V A A H I T G T R G R S N T L S S
1135 cca aac tcc aag aat gaa aag gct ctg ggc cgc aaa ata aac tcc tgg gaa tca
379 P N S K N E K A L G R K I N S W E S
1189 tca agg agt ggg cat tca ttc ctg agc aac ttg cac ttg agg aat ggt gaa ctg
397 S R S G H S F L S N L H L R N G E L
1243 gtc atc cat gaa aaa ggg ttt tac tac atc tat tcc caa aca tac ttt cga ttt
415 V I H E K G F Y Y I Y S Q T Y F R F
1297 cag gag gaa ata aaa gaa aac aca aag aac gac aaa caa atg gtc caa tat att
433 Q E E I K E N T K N D K Q M V Q Y I
1351 tac aaa tac aca agt tat cct gac cct ata ttg ttg atg aaa agt gct aga aat
451 Y K Y T S Y P D P I L L M K S A R N
1405 agt tgt tgg tct aaa gat gca gaa tat gga ctc tat tcc atc tat caa ggg gga
469 S C W S K D A E Y G L Y S I Y Q G G
1459 ata ttt gag ctt aag gaa aat gac aga att ttt gtt tct gta aca aat gag cac
487 I F E L K E N D R I F V S V T N E H
1513 ttg ata gac atg gac cac gag gcc agc ttt ttc ggc gcc ttc ctc gtg gga tag
505 L I D M D H E A S F F G A F L V G -

```

11.1.11 scFv:CD70(27B3)-Flag-TNC-TRAILmutR1

scFv:CD70:	1-282 Aa	1-846 Nt
Leader	1-20 Aa	1-60 Nt
VH:	23-150 Aa	67-450 Nt
Linker:	151-165 Aa	451-495 Nt
VL:	166-282-Aa	496-846 Nt
Flag:	283-290 Aa	847-870 Nt
TNC:	293-322 Aa	877-967 Nt
TRAILmutR1:	335-521 Aa	1003-1563 Nt

Bindungsspezifische Mutation: G131R-R149I-S159R-N199R-K201H-S215D

```

1 atg aac ttc ggc ttc agc ctg atc ttc ctg gtg ctg gtg ctg aag ggc ctg gtg
1 M N F G F S L I F L V L V L K G L V
55 ccc cgg caa ttg gag gtg cag ctg gtg gaa tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct
19 P R Q L E V Q L V E S G G L V Q P
109 gtg cag tgc gaa gtg aag ggc gga tct ctg aga ctg agc tgt gcc gcc agc ggc
37 V Q C E V K G G S L R L S C A A S G
163 ttc acc ttc agc gtg tac tac atg aac tgg gtg cgc cag gcc cct ggc aag gga
55 F T F S V Y Y M N W V R Q A P G K G
217 ctg gaa tgg gtg tcc gac atc aac aac gag ggc ggc acc acc tac tac gcc gac
73 L E W V S D I N N E G G T T Y Y A D
271 agc gtg aag ggc cgg ttc acc atc agc cgg gac aac gcc aag aac acc ctg acc
91 S V K G R F T I S R D N A K N T L T
325 ctg cag atg aac agc ctg aag ccc gag gac acc gcc ctg tac tac tgt gtg cgg
109 L Q M N S L K P E D T A L Y Y C V R
379 gat gcc ggc tac agc aac cac gtg ccc atc ttc gat agc tgg ggc cag ggc aca
127 D A G Y S N H V P I F D S W G Q G T
433 caa gtg atc gtg gct agc gga ggc gga gga tca ggc ggc gga gga agt ggc gga
145 Q V I V A S G G G G S G G G S G G
487 ggg gga tct cag gct gtc gtg acc cag gaa cct agc ctg acc gtg tct cct ggc

```

```

163 G G S Q A V V T Q E P S L T V S P G
541 gga acc gtg acc ctg acc tgt ggc ctg aag tct ggc agc gtg acc tcc acc aac
181 G T V T L T C G L K S G S V T S T N
595 ttc ccc acc tgg tat cag cag acc ccc gga cag gct ccc cgg ctg ctg atc tac
199 F P T W Y Q Q T P G Q A P R L L I Y
649 aac acc aac acc aga cac agc ggc gtg ccc agc aga ttc agc ggc agc atc agc
217 N T N T R H S G V P S R F S G S I S
703 gag aac aag gcc gcc ctg aca atc act ggc gcc cag cct gag gat gag gcc gag
235 E N K A A L T I T G A Q P E D E A E
757 tac ttc tgc gcc ctg ttc atc agc aac ccc agc gtg gaa ttt gga ggc ggc acc
253 Y F C A L F I S N P S V E F G G G T
811 cag ctg acc gtg ctg gcc tct aca aaa ggc gga tcc gat tac aaa gag gat gag
271 Q L T V L A S T K G G S D Y K D D D
865 gat aaa gat atc gcc tgt ggc tgt gcg gct gcc cca gac atc aag gac ctg ctg
289 D K D I A C G C A A A P D I K D L L
919 agc aga ctg gag gag ctg gag ggg ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag ggt acc
307 S R L E E L E G L V S S L R E Q G T
973 gga ggt ggg tct ggc ggc cgc ggt gaa ttc acc agc gaa gag aca atc agc acc
325 G G G S G G R G E F T S E E T I S T
1027 gtg cag gaa aag cag cag aac atc agc ccc ctc gtg cgc gaa agg ggc cct cag
343 V Q E K Q Q N I S P L V R E R G P Q
1081 aga gtg gcc gcc cac atc act ggc acc aga agg aga agc aac acc ctg agc agc
361 R V A A H I T G T R R R S N T L S S
1135 ccc aac agc aag aac gag aag gcc ctg ggc atc aag atc aac agc tgg gag tct
379 P N S K N E K A L G I K I N S W E S
1189 agc aga cgg ggc cac agc ttt ctg agc aac ctg cac ctg aga aac ggc gag ctc
397 S R R G H S F L S N L H L R N G E L
1243 gtg atc cac gag aag ggc ttc tac tac atc tac agc cag acc tac ttc cga ttc
415 V I H E K G F Y Y I Y S Q T Y F R F
1297 cag gaa gag atc aaa gag aat acc cac aac gac aag cag atg gtg cag tac atc
433 Q E E I K E N T H N D K Q M V Q Y I
1351 tat aag tac acc gac tac ccc gac ccc atc ctg ctg atg aag tcc gcc cgg aac
451 Y K Y T D Y P D P I L L M K S A R N
1405 agc tgc tgg tcc aag gat gcc gag tac ggc ctg tac agc atc tac cag ggc ggc
469 S C W S K D A E Y G L Y S I Y Q G G
1459 atc ttc gag ctg aaa gag aac gac cgg atc ttc gtg tcc gtg acc aac gag cac
487 I F E L K E N D R I F V S V T N E H
1513 ctg ata gac atg gac cac gag gcc agc ttt ttc ggc gcc ttc ctc gtg gga tag
505 L I D M D H E A S F F G A F L V G -

```

11.1.12 scFv:CD70(27B3)-Flag-TNC-TRAILmutR2

scFv:CD70:	1-282 Aa	1-846 Nt
Leader:	1-20 Aa	1-60 Nt
VH:	23-150 Aa	67-450 Nt
Linker:	151-165 Aa	451-495 Nt
VL:	166-282 Aa	496-846 Nt

Flag:	283-290 Aa	847-870 Nt
-------	------------	------------

TNC:	293-322 Aa	877-967 Nt
------	------------	------------

TRAILmutR2:	335-521 Aa	1003-1563 Nt
-------------	------------	--------------

Bindungsspezifische Mutation: Y189Q-R191K-Q193R-H264R-I266L-D267Q

```
1 atg aac ttc ggc ttc agc ctg atc ttc ctg gtg ctg gtg ctg aag ggc ctg gtg
```

1 M N F G F S L I F L V L V L K G L V
 55 ccc cgg caa ttg gag gtg cag ctg gtg gaa tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct
 19 P R Q L E V Q L V E S G G G L V Q P
 109 gtg cag tgc gaa gtg aag ggc gga tct ctg aga ctg agc tgt gcc gcc agc ggc
 37 V Q C E V K G G S L R L S C A A S G
 163 ttc acc ttc agc gtg tac tac atg aac tgg gtg cgc cag gcc cct ggc aag gga
 55 F T F S V Y Y M N W V R Q A P G K G
 217 ctg gaa tgg gtg tcc gac atc aac aac gag ggc ggc acc acc tac tac gcc gac
 73 L E W V S D I N N E G G T T Y Y A D
 271 agc gtg aag ggc cgg ttc acc atc agc cgg gac aac gcc aag aac acc ctg acc
 91 S V K G R F T I S R D N A K N T L T
 325 ctg cag atg aac agc ctg aag ccc gag gac acc gcc ctg tac tac tgt gtg cgg
 109 L Q M N S L K P E D T A L Y Y C V R
 379 gat gcc ggc tac agc aac cac gtg ccc atc ttc gat agc tgg ggc cag ggc aca
 127 D A G Y S N H V P I F D S W G Q G T
 433 caa gtg atc gtg gct agc gga ggc gga gga tca ggc ggc gga gga agt ggc gga
 145 Q V I V A S G G G G S G G G S G G
 487 ggg gga tct cag gct gtc gtg acc cag gaa cct agc ctg acc gtg tct cct ggc
 163 G G S Q A V V T Q E P S L T V S P G
 541 gga acc gtg acc ctg acc tgt ggc ctg aag tct ggc agc gtg acc tcc acc aac
 181 G T V T L T C G L K S G S V T S T N
 595 ttc ccc acc tgg tat cag cag acc ccc gga cag gct ccc cgg ctg ctg atc tac
 199 F P T W Y Q Q T P G Q A P R L L I Y
 649 aac acc aac acc aga cac agc ggc gtg ccc agc aga ttc agc ggc agc atc agc
 217 N T N T R H S G V P S R F S G S I S
 703 gag aac aag gcc gcc ctg aca atc act ggc gcc cag cct gag gat gag gcc gag
 235 E N K A A L T I T G A Q P E D E A E
 757 tac ttc tgc gcc ctg ttc atc agc aac ccc agc gtg gaa ttt gga ggc ggc acc
 253 Y F C A L F I S N P S V E F G G G T
 811 cag ctg acc gtg ctg gcc tct aca aaa ggc gga tcc gat tac aaa gac gat gac
 271 Q L T V L A S T K G G S D Y K D D D
 865 gat aaa gat atc gcc tgt ggc tgt gcg gct gcc cca gac atc aag gac ctg ctg
 289 D K D I A C G C A A A P D I K D L L
 919 agc aga ctg gag gag ctg gag ggg ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag ggt acc
 307 S R L E E L E G L V S S L R E Q G T
 973 gga ggt ggg tct ggc ggc cgc ggt gaa ttc acc tct gag gaa acc att tct aca
 325 G G G S G G R G E F T S E E T I S T
 1027 gtt caa gaa aag caa caa aat att tct ccc cta gtg aga gaa aga ggt cct cag
 343 V Q E K Q Q N I S P L V R E R G P Q
 1081 aga gta gca gct cac ata act ggg acc aga gga aga agc aac aca ttg tct tct
 361 R V A A H I T G T R G R S N T L S S
 1135 cca aac tcc aag aat gaa aag gct ctg ggc cgc aaa ata aac tcc tgg gaa tca
 379 P N S K N E K A L G R K I N S W E S
 1189 tca agg agt ggg cat tca ttc ctg agc aac ttg cac ttg agg aat ggt gaa ctg
 397 S R S G H S F L S N L H L R N G E L
 1243 gtc atc cat gaa aaa ggg ttt tac tac atc tat tcc caa aca cag ttt aag ttt
 415 V I H E K G F Y Y I Y S Q T Q F K F
 1297 cgg gag gaa ata aaa gaa aac aca aag aac gac aaa caa atg gtc caa tat att
 433 R E E I K E N T K N D K Q M V Q Y I
 1351 tac aaa tac aca agt tat cct gac cct ata ttg ttg atg aaa agt gct aga aat
 451 Y K Y T S Y P D P I L L M K S A R N
 1405 agt tgt tgg tct aaa gat gca gaa tat gga ctc tat tcc atc tat caa ggg gga
 469 S C W S K D A E Y G L Y S I Y Q G G
 1459 ata ttt gag ctt aag gaa aat gac aga att ttt gtt tct gta aca aat gag cgg
 487 I F E L K E N D R I F V S V T N E R
 1513 ttg ctc cag atg gac cac gag gcc agc ttt ttc ggc gcc ttc ctc gtg gga tag
 505 L L Q M D H E A S F F G A F L V G -

11.1.13 scFv:CD70(27B3)-TNC-Flag-Gaussia

scFv:CD70:	1-282 Aa	1-846 Nt
Leader:	1-20 Aa	1-60 Nt
VH:	23-150 Aa	67-450 Nt
Linker:	151-165 Aa	451-495 Nt
VL:	166-282-Aa	496-846 Nt
TNC:	285-314 Aa	853-942 Nt
Flag:	320-327 Aa	958-981 Nt
Gaussia:	330-497 Aa	988-1491 Nt

```

1 atg aac ttc ggc ttc agc ctg atc ttc ctg gtg ctg gtg ctg aag ggc gtg cag
1 M N F G F S L I F L V L V L K G V Q
55 tgc gaa gtg aag ctg gtg ccc cgg caa ttg gag gtg cag ctg gtg gaa tct ggc
19 C E V K L V P R Q L E V Q L V E S G
109 ggc gga ctg gtg cag cct ggc gga tct ctg aga ctg agc tgt gcc gcc agc ggc
37 G G L V Q P G G S L R L S C A A S G
163 ttc acc ttc agc gtg tac tac atg aac tgg gtg cgc cag gcc cct ggc aag gga
55 F T F S V Y Y M N W V R Q A P G K G
217 ctg gaa tgg gtg tcc gac atc aac aac gag ggc ggc acc acc tac tac gcc gac
73 L E W V S D I N N E G G T T Y Y A D
271 agc gtg aag ggc cgg ttc acc atc agc cgg gac aac gcc aag aac acc ctg acc
91 S V K G R F T I S R D N A K N T L T
325 ctg cag atg aac agc ctg aag ccc gag gac acc gcc ctg tac tac tgt gtg cgg
109 L Q M N S L K P E D T A L Y Y C V R
379 gat gcc ggc tac agc aac cac gtg ccc atc ttc gat agc tgg ggc cag ggc aca
127 D A G Y S N H V P I F D S W G Q G T
433 caa gtg atc gtg gct agc gga ggc gga gga tca ggc ggc gga gga agt ggc gga
145 Q V I V A S G G G G S G G G S G G
487 ggg gga tct cag gct gtc gtg acc cag gaa cct agc ctg acc gtg tct cct ggc
163 G G S Q A V V T Q E P S L T V S P G
541 gga acc gtg acc ctg acc tgt ggc ctg aag tct ggc agc gtg acc tcc acc aac
181 G T V T L T C G L K S G S V T S T N
595 ttc ccc acc tgg tat cag cag acc ccc gga cag gct ccc cgg ctg ctg atc tac
199 F P T W Y Q Q T P G Q A P R L L I Y
649 aac acc aac acc aga cac agc ggc gtg ccc agc aga ttc agc ggc agc atc agc
217 N T N T R H S G V P S R F S G S I S
703 gag aac aag gcc gcc ctg aca atc act ggc gcc cag cct gag gat gag gcc gag
235 E N K A A L T I T G A Q P E D E A E
757 tac ttc tgc gcc ctg ttc atc agc aac ccc agc gtg gaa ttt gga ggc ggc acc
253 Y F C A L F I S N P S V E F G G G T
811 cag ctg acc gtg ctg gcc tct aca aaa ggc gga tcc gat atc gcc tgt ggc tgt
271 Q L T V L A S T K G G S D I A C G C
865 gcg gct gcc cca gac atc aag gac ctg ctg agc aga ctg gag gag ctg gag ggg
289 A A A P D I K D L L S R L E E L E G
919 ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag ggt acc gga gaa ttc gat tac aaa gac gat
307 L V S S L R E Q G T G E F D Y K D D
973 gac gat aaa ctc gag aaa cca acc gag aat aat gag gat ttc aac atc gtg gct
325 D D K L E K P T E N N E D F N I V A
1027 gtg gca tcc aat ttt gct acc acc gac ctc gat gcc gat cgg gga aaa ctg cct
343 V A S N F A T T D L D A D R G K L P
1081 ggc aaa aaa ctg ccc ctg gaa gtg ctg aaa gag atg gag gcc aac gct aga aaa
361 G K K L P L E V L K E M E A N A R K
1135 gct ggc tgt act aga gga tgt ctc atc tgc ctg tcc cac atc aag tgt acc cca
379 A G C T R G C L I C L S H I K C T P

```

```

1189 aaa atg aaa aaa ttc atc cct ggc cgg tgt cac aca tac gag ggc gac aag gaa
397 K M K K F I P G R C H T Y E G D K E
1243 tct gct cag ggc gga atc gga gag gct att gtg gat att cct gaa att cct gga
415 S A Q G G I G E A I V D I P E I P G
1297 ttc aag gac ctg gag cct atg gaa cag ttt atc gcc cag gtg gac ctc tgt gtc
433 F K D L E P M E Q F I A Q V D L C V
1351 gat tgt aca act ggc tgc ctg aaa ggg ctg gcc aat gtc cag tgt agt gac ctg
451 D C T T G C L K G L A N V Q C S D L
1405 ctg aaa aaa tgg ctg ccc cag aga tgt gcc act ttc gcc tct aaa att cag ggc
469 L K K W L P Q R C A T F A S K I Q G
1459 cag gtc gac aaa atc aaa ggt gcc ggt ggt gat taa
487 Q V D K I K G A G G D -

```

11.1.14 scFv:CD70(27B3)-2xFlag-Gaussia

scFv:CD70:	1-282 Aa	1-846 Nt
Leader:	1-20 Aa	1-60 Nt
VH:	24-150 Aa	67-450 Nt
Linker:	151-165 Aa	451-495 Nt
VL:	166-282-Aa	496-846 Nt
Flag:	283-290/293-300 Aa	847-870/877-900 Nt
Gaussia:	303-471 Aa	907-1410 Nt

```

1 atg aac ttc ggc ttc agc ctg atc ttc ctg gtg ctg gtg ctg aag ggc gtg cag
1 M N F G F S L I F L V L V L K G V Q
55 tgc gaa gtg aag ctg gtg ccc cgg caa ttg gag gtg cag ctg gtg gaa tct ggc
19 C E V K L V P R Q L E V Q L V E S G
109 ggc gga ctg gtg cag cct ggc gga tct ctg aga ctg agc tgt gcc gcc agc ggc
37 G G L V Q P G G S L R L S C A A S G
163 ttc acc ttc agc gtg tac tac atg aac tgg gtg cgc cag gcc cct ggc aag gga
55 F T F S V Y Y M N W V R Q A P G K G
217 ctg gaa tgg gtg tcc gac atc aac aac gag ggc acc acc tac tac gcc gac
73 L E W V S D I N N E G G T T Y Y A D
271 agc gtg aag ggc cgg ttc acc atc agc cgg gac aac gcc aag aac acc ctg acc
91 S V K G R F T I S R D N A K N T L T
325 ctg cag atg aac agc ctg aag ccc gag gac acc gcc ctg tac tac tgt gtg cgg
109 L Q M N S L K P E D T A L Y Y C V R
379 gat gcc ggc tac agc aac cac gtg ccc atc ttc gat agc tgg ggc cag ggc aca
127 D A G Y S N H V P I F D S W G Q G T
433 caa gtg atc gtg gct agc gga ggc gga gga tca ggc ggc gga gga agt ggc gga
145 Q V I V A S G G G G S G G G G S G G
487 ggg gga tct cag gct gtc gtg acc cag gaa cct agc ctg acc gtg tct cct ggc
163 G G S Q A V V T Q E P S L T V S P G
541 gga acc gtg acc ctg acc tgt ggc ctg aag tct ggc agc gtg acc tcc acc aac
181 G T V T L T C G L K S G S V T S T N
595 ttc ccc acc tgg tat cag cag acc ccc gga cag gct ccc cgg ctg ctg atc tac
199 F P T W Y Q Q T P G Q A P R L L I Y
649 aac acc aac acc aga cac agc ggc gtg ccc agc aga ttc agc ggc agc atc agc
217 N T N T R H S G V P S R F S G S I S
703 gag aac aag gcc gcc ctg aca atc act ggc gcc cag cct gag gat gag gcc gag
235 E N K A A L T I T G A Q P E D E A E
757 tac ttc tgc gcc ctg ttc atc agc aac ccc agc gtg gaa ttt gga ggc ggc acc
253 Y F C A L F I S N P S V E F G G G T
811 cag ctg acc gtg ctg gcc tct aca aaa ggc gga tcc gat tac aaa gac gat gac
271 Q L T V L A S T K G G S D Y K D D D

```

```

865 gat aaa gaa ttc gat tac aaa gac gat gac gat aaa ctc gag aaa cca acc gag
289 D K E F D Y K D D D D K L E K P T E
919 aat aat gag gat ttc aac atc gtg gct gtg gca tcc aat ttt gct acc acc gag
307 N N E D F N I V A V A S N F A T T D
973 ctc gat gcc gat cgg gga aaa ctg cct ggc aaa aaa ctg ccc ctg gaa gtg ctg
325 L D A D R G K L P G K K L P L E V L
1027 aaa gag atg gag gcc aac gct aga aaa gct ggc tgt act aga gga tgt ctc atc
343 K E M E A N A R K A G C T R G C L I
1081 tgc ctg tcc cac atc aag tgt acc cca aaa atg aaa aaa ttc atc cct ggc cgg
361 C L S H I K C T P K M K K F I P G R
1135 tgt cac aca tac gag ggc gac aag gaa tct gct cag ggc gga atc gga gag gct
379 C H T Y E G D K E S A Q G I G E A
1189 att gtg gat att cct gaa att cct gga ttc aag gac ctg gag cct atg gaa cag
397 I V D I P E I P G F K D L E P M E Q
1243 ttt atc gcc cag gtg gac ctc tgt gtc gat tgt aca act ggc tgc ctg aaa ggg
415 F I A Q V D L C V D C T T G C L K G
1297 ctg gcc aat gtc cag tgt agt gac ctg ctg aaa aaa tgg ctg ccc cag aga tgt
433 L A N V Q C S D L L K K W L P Q R C
1351 gcc act ttc gcc tct aaa att cag ggc cag gtc gac aaa atc aaa ggt gcc ggt
451 A T F A S K I Q G Q V D K I K G A G
1405 ggt gat taa
469 G D -

```

11.1.15 scFv:CD70(27B3)-Flag-TNC-FasL

scFv:CD70:	1-282 Aa	1-846 Nt
Leader:	1-20 Aa	1-60 Nt
VH:	24-150 Aa	67-450 Nt
Linker:	151-165 Aa	451-495 Nt
VL:	166-282 Aa	496-846 Nt
Flag:	283-290 Aa	847-870 Nt
TNC:	293-322 Aa	877-966 Nt
FasL:	335-479 Aa	1003-1437 Nt

```

1 atg aac ttc ggc ttc agc ctg atc ttc ctg gtg ctg gtg ctg aag ggc ctg gtg
1 M N F G F S L I F L V L V L K G L V
55 ccc cgg caa ttg gag gtg cag ctg gtg gaa tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct
19 P R Q L E V Q L V E S G G G L V Q P
109 gtg cag tgc gaa gtg aag ggc gga tct ctg aga ctg agc tgt gcc gcc agc ggc
37 V Q C E V K G G S L R L S C A A S G
163 ttc acc ttc agc gtg tac tac atg aac tgg gtg cgc cag gcc cct ggc aag gga
55 F T F S V Y Y M N W V R Q A P G K G
217 ctg gaa tgg gtg tcc gac atc aac aac gag ggc ggc acc acc tac tac gcc gac
73 L E W V S D I N N E G G T T Y Y A D
271 agc gtg aag ggc cgg ttc acc atc agc cgg gac aac gcc aag aac acc ctg acc
91 S V K G R F T I S R D N A K N T L T
325 ctg cag atg aac agc ctg aag ccc gag gac acc gcc ctg tac tac tgt gtg cgg
109 L Q M N S L K P E D T A L Y Y C V R
379 gat gcc ggc tac agc aac cac gtg ccc atc ttc gat agc tgg ggc cag ggc aca
127 D A G Y S N H V P I F D S W G Q G T
433 caa gtg atc gtg gct agc gga ggc gga gga tca ggc ggc gga gga agt ggc gga
145 Q V I V A S G G G G S G G G S G G
487 ggg gga tct cag gct gtc gtg acc cag gaa cct agc ctg acc gtg tct cct ggc

```

```

163 G G S Q A V V T Q E P S L T V S P G
541 gga acc gtg acc ctg acc tgt ggc ctg aag tct ggc agc gtg acc tcc acc aac
181 G T V T L T C G L K S G S V T S T N
595 ttc ccc acc tgg tat cag cag acc ccc gga cag gct ccc cgg ctg ctg atc tac
199 F P T W Y Q Q T P G Q A P R L L I Y
649 aac acc aac acc aga cac agc ggc gtg ccc agc aga ttc agc ggc agc atc agc
217 N T N T R H S G V P S R F S G S I S
703 gag aac aag gcc gcc ctg aca atc act ggc gcc cag cct gag gat gag gcc gag
235 E N K A A L T I T G A Q P E D E A E
757 tac ttc tgc gcc ctg ttc atc agc aac ccc agc gtg gaa ttt gga ggc ggc acc
253 Y F C A L F I S N P S V E F G G G T
811 cag ctg acc gtg ctg gcc tct aca aaa ggc gga tcc gat tac aaa gac gat gac
271 Q L T V L A S T K G G S D Y K D D D
865 gat aaa gat atc gcc tgt ggc tgt gcg gct gcc cca gac atc aag gac ctg ctg
289 D K D I A C G C A A A P D I K D L L
919 agc aga ctg gag gag ctg gag ggg ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag ggt acc
307 S R L E E L E G L V S S L R E Q G T
973 gga ggt ggg tct ggc ggc cgc ggt gaa ttc ccc cct gaa aaa aag gag ctg agg
325 G G G S G G R G E F P P E K K E L R
1027 aaa gtg gcc cat tta aca ggc aag tcc aac tca agg tcc atg cct ctg gaa tgg
343 K V A H L T G K S N S R S M P L E W
1081 gaa gac acc tat gga att gtc ctg ctt tct gga gtg aag tat aag aag ggt ggc
361 E D T Y G I V L L S G V K Y K K G G
1135 ctt gtg atc aat gaa act ggg ctg tac ttt gta tat tcc aaa gta tac ttc cgg
379 L V I N E T G L Y F V Y S K V Y F R
1189 ggt caa tct tgc aac aac ctg ccc ctg agc cac aag gtc tac atg agg aac tct
397 G Q S C N N L P L S H K V Y M R N S
1243 aag tat ccc cag gat ctg gtg atg atg gag ggg aag atg atg agc tac tgc act
415 K Y P Q D L V M M E G K M M S Y C T
1297 act ggg cag atg tgg gcc cgc agc agc tac ctg ggg gca gtg ttc aat ctt acc
433 T G Q M W A R S S Y L G A V F N L T
1351 agt gct gat cat tta tat gtc aac gta tct gag ctc tct ctg gtc aat ttt gag
451 S A D H L Y V N V S E L S L V N F E
1405 gaa tct cag acg ttt ttc ggc tta tat aag ctc taa
469 E S Q T F F G L Y K L -

```

11.2 Abkürzungsverzeichnis

(w/o)	<i>without leader</i>
°C	Grad Celsius
A	Ampere
Aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ABTS	2, 2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APAF-1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
APRIL	<i>a proliferation-inducing ligand</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Asp	Asparaginsäure

BAFF	<i>B-cell-activating factor</i>
BAFF-R	<i>B-cell-activating factor receptor</i>
Bak	<i>Bcl2 agonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl2-associated X protein</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-X _L	<i>Bcl2-like protein</i>
BCMA	<i>B-cell maturation factor</i>
BH3	<i>Bcl2 Homology domain 3</i>
BID	<i>Bcl2 homology domain 3-interacting domain</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CARD	<i>caspase-associated recruitment domain</i>
Caspase	<i>cysteinylnyl aspartat specific proteinase</i>
CD	<i>cluster of Differentiation</i>
CD27	<i>T-cell activating antigen S152</i>
CD27L	<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 7</i>
CD95	<i>TNFRSF6, apoptosis-mediating surface antigen Fas</i>
CD95L	<i>apoptosis-mediating surface antigen, Fas Ligand</i>
cFLIP	<i>cellular FLICE inhibitory protein</i>
CHX	Cycloheximid
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
clAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CLL	chronische lymphatische Leukämie
cMyc	<i>avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRD	<i>cysteine-rich domain</i>
CV	<i>crystal violet</i>
d.h.	das heißt
DC(s)	<i>dendritic cell(s)</i>
DcR3	<i>decoy receptor 3</i>
DD	<i>death domain, Todesdomäne</i>
DED	<i>death effector domain, Todeseffektordomäne</i>
DIABLO	<i>Direct IAP-Binding protein with Low PI</i>
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco`s PBS
DR(s)	<i>death receptor(s)</i>
DR3	<i>death receptor 3</i>
DR6	<i>death receptor 6</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	Halbmaximale effektive Konzentration
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ed	<i>extracellular domain</i>
EDA-A1	<i>ectodermal dysplasia protein 1</i>
EDA-A2	<i>ectodermal dysplasia protein 2</i>
EDAR	<i>ectodysplasin A receptor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
ETA	<i>Pseudomonas aeruginosa exotoxin A</i>
etc.	et cetera
Fab	<i>Fragment antigen binding</i> , variabler Antikörperteil
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with Death Domain</i>
FAP	<i>Fibroblast activation protein</i>
FAP	<i>Fibroblast activation protein</i>
Fas	<i>FS7-associated surface antigen</i>
Fc	<i>Fragment crystallisable</i> , konstanter Antikörperteil
FCS	fötales Kälberserum
FcyR(s)	<i>Fcy-receptor(s)</i>
fl	<i>Full length</i>
Flag	Polypeptid Protein-tag (DYKDDDDK)
FLICE	<i>FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme</i>
Fn14-Rezeptor	<i>fibroblast growth factor-inducible 14</i>
g	Gramm
G418-Sulfate	Geneticin disulfate
GITR	<i>glucocorticoid-induced TNFR-related protein</i>
GITRL	<i>glucocorticoid-induced TNF-related ligand</i>

GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GpL	<i>Gaussia princeps</i> Luciferase
h	Stunde(n)
HCl	Chlorwasserstoff
HI	Hitze inaktiviert
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HVEM	<i>Herpes virus entry mediator A</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IKK	I κ B (<i>inhibitor of NFκB</i>) Kinasekomplex
IKK α	<i>inhibitor of NFκB-Kinase alpha</i>
IKK β	<i>inhibitor of NFκB-Kinase beta</i>
IL	Interleukin
I κ B α	<i>Inhibitor of NFκBα</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	Kilodalton = 10 ³ Dalton
l	Liter
LIGHT	<i>herpes virus entry mediator ligand</i>
LT α	<i>lymphotoxin alpha</i>
LT α 1 β 2	<i>lymphotoxin alpha 1/beta2</i>
LT β R	<i>lymphotoxin beta receptor</i>
m	milli (tausendster Teil; 10 ⁻³)
M	Molarität (Mol/Liter)
m ²	Quadratmeter
M2	Anti-Flag mAb
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MCSP	<i>Melanom-associated chondroitin sulfateproteoglycan</i>
mem	membrangebunden
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
MM	Multiples Myelom
mol	Stoffmenge

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	<i>molecular weight</i>
n	nano (milliardster Teil, 10^{-9})
n.s.	nonspecific
NEMO	<i>NFκB essential modifier</i>
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
ng	Nanogramm
NGFR	<i>nerve growth factor receptor</i>
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NIK	<i>NFκB-inducing kinase</i>
NK	natürliche Killerzellen
NKT	natürliche T-Killerzellen
NLS	Kernlokalisationssequenz
nm	Nanometer
Nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
OD600	optische Dichte bei 600 nm
OPG	Osteoprotegerin
OX40	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 4</i>
OX40L	<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 4</i>
p	pico (10^{-12})
p100	NFκB2
p105	NFκB1
p50	NFκB1, Untereinheit p50
p52	NFκB2, Untereinheit p52
p65	<i>transcription factor p65</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-ribose)-polymerase
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLAD	<i>pre-ligand assembly domain</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
RANK	<i>receptor activator of NFκB</i>

RANKL	<i>receptor activator of NFκB ligand</i>
RelB	<i>transcription factor RelB</i>
RELT	<i>receptor expressed in lymphoid tissues</i>
RHD	<i>Rel homology domain</i>
RIP-1	<i>receptor interacting protein-1</i>
RLU	<i>relative light unit</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s.u.	siehe unten
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
SMAC	<i>second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SODD	<i>silencer of death domain</i>
Tab.	Tabelle
TACI	<i>transmembrane activator and CAML interactor</i>
tBID	truncated BID
TBS	<i>Tris buffered Saline</i>
TC	<i>cytotoxic T-cells</i>
TCR	T-cell receptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TH1	T-Helferzellen 1
THD	<i>TNF homology domain</i>
TL1A	<i>TNF ligand related molecule 1</i>
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, ELISA-Farbsubstrat
TNC	Tenascin-C
TNF	Tumornekrosefaktor, TNFSF2
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor, TNFRSF1
TNFRSF	<i>Tumor necrosis factor superfamily</i>
TRADD	<i>TNFR associated death domain</i>
TRAF	<i>TNFR associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
TRAILmutR1	TRAIL-Mutante spezifisch gegen TRAILR1
TRAILmutR2	TRAIL-Mutante spezifisch gegen TRAILR2
TRAILR(1-4)	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand receptor(1-4)</i>
Tregs	regulatorische T-Zellen

Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TROY	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 19</i>
TWEAK	<i>tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis</i>
Tween	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurate
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
V _H , V _L	<i>Immunoglobulin variable region (heavy or light chain)</i>
VPA	Valproinsäure
w/v	<i>weight/volume</i>
WB	Westernblot
wt	Wildtyp
XEDAR	<i>X-linked ectodysplasin-A2 receptor</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
z.B.	zum Beispiel
α	Anti
μ	millionster Teil, 10 ⁻⁶

11.3 Publikationen

El-Mesery, M., **Trebing, J.**, Schafer, V., Weisenberger, D., Siegmund, D., and Wajant, H. (2013). CD40-directed scFv-TRAIL fusion proteins induce CD40-restricted tumor cell death and activate dendritic cells. *Cell Death Dis* 4, e916.

Fick, A., Lang, I., Schafer, V., Seher, A., **Trebing, J.**, Weisenberger, D., and Wajant, H. (2012). Studies of binding of tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) to fibroblast growth factor inducible 14 (Fn14). *J Biol Chem* 287, 484-495.

Salzmann, S., Lang, I., Rosenthal, A., Schafer, V., Weisenberger, D., Carmona Arana, J.A., **Trebing, J.**, Siegmund, D., Neumann, M., and Wajant, H. (2013a). TWEAK inhibits TRAF2-mediated CD40 signaling by destabilization of CD40 signaling complexes. *J Immunol* 191, 2308-2318.

Salzmann, S., Seher, A., **Trebing, J.**, Weisenberger, D., Rosenthal, A., Siegmund, D., and Wajant, H. (2013b). Fibroblast growth factor inducible (Fn14)-specific antibodies concomitantly display signaling pathway-specific agonistic and antagonistic activity. *J Biol Chem* 288, 13455-13466.

Trebing, J., Arana, J.A., Salzmann, S., and Wajant, H. (2014a). Analyzing the signaling capabilities of soluble and membrane TWEAK. *Methods Mol Biol* 1155, 31-45.

Trebing, J., El-Mesery, M., Schafer, V., Weisenberger, D., Siegmund, D., Silence, K., and Wajant, H. (2014b). CD70-restricted specific activation of TRAILR1 or TRAILR2 using scFv-targeted TRAIL mutants. *Cell Death Dis* 5, e1035.

Trebing, J., Lang, I., Chopra, M., Salzmann, S., Moshir, M., Silence, K., Riedel, S.S., Siegmund, D., Beilhack, A., Otto, C., *et al.* (2014c). A novel llama antibody targeting Fn14 exhibits anti-metastatic activity in vivo. *MAbs* 6, 297-308.

11.4 Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name: Johannes Trebing
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Geburtsort: Hanau
 Geburtsdatum: 10.12.1981

Promotionsstudiengang an der Julius-Maximilian-Universität Würzburg	Promotion
In der Abteilung für Molekulare Innere Medizin des Universitätsklinikums D-Würzburg, unter Betreuung von Prof. Dr. Harald Wajant Thema: „CD70-abhängige spezifische Aktivierung von TRAILR1 oder TRAILR2 durch scFv:CD70-TRAIL-Mutanten“	Seit 04/2010
Studium der Biologie an der Justus-Liebig-Universität in Gießen Abschluss zum Diplom-Biologen (Note 1,7)	Studium 04/2004 – 10/2009
Spezialisierungen im Hauptstudium: Genetik Mikrobiologie Tierphysiologie	
Diplomarbeit In der tumorgenetischen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhard Dammann zum Thema „DNA-Reparaturmechanismen und epigenetische Geninaktivierung“	
Studium der biopharmazeutischen Technologie an der Fachhochschule Gießen-Friedberg in Gießen	Studium 09/2002 – 02/2004
Zivildienst	Zivildienst

mit Hausmeistertätigkeiten im Kindergarten von Hammersbach

07/2001 – 04/2002

Georg-Christoph-Lichtenberg-Oberstufengymnasium in Bruchköbel

Schulbildung

Abschluss: Abitur (Note 2,9)

08/1998 – 05/2001

Unterschrift: