

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung geeigneter Zelllinien

Immunotoxine zeichnen sich durch zwei Eigenschaften besonders aus: durch eine hohe Cytotoxizität und durch eine selektive Zielzellerkennung mittels Antikörpern, Antikörperfragmenten oder zellspezifischen Liganden. Im Rahmen dieser Arbeit stehen Tumorzellen als Zielzellen im Mittelpunkt. Geeignete Zelllinien sollten den tumorzellspezifischen Rezeptor, in diesem Falle Transferrinrezeptor (TfR), in möglichst großer Dichte auf der Oberfläche tragen. Eine weitere unabdingbare Eigenschaft ist die Endocytose des Rezeptors. Deshalb wurden HepG2-Zellen, eine humane Hepatokarzinomzelllinie, die diesbezüglich gut charakterisiert ist,¹³⁶ als humanes Modellsystem ausgewählt.

Um die Spezifität der herzustellenden Immunoadaptortoxine für TfR-tragende Zellen zu überprüfen, wurde ein CHO-Zelllinienpaar verwendet: TRVb-wt-Zellen besitzen keine endogene TfR-Aktivität, während TRVb-hTfR-Zellen, die durch Transfektion mit der cDNA des humanen Transferrinrezeptors aus TRVb-wt-Zellen hergestellt wurden, eine solche aufweisen.¹³⁷

3.1.1 Qualitativer Nachweis des Transferrinrezeptors

Für einen qualitativen Nachweis des exprimierten hTfR wurden Zellsolubilisate von HepG2-, TRVb-wt- und TRVb-hTfR-Zellen hergestellt und per Immunoblot mit dem monoklonalen Antikörper OKT9 detektiert. Dieser Antikörper ist gegen die extrazelluläre Domäne des hTfR gerichtet.¹³⁸ Als Kontrolle wurde aus humaner Plazenta gereinigter TfR aufgetragen (Abb. 3-1, humaner TfR aus Plazenta wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Hendrik Fuchs, Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, UKBF, FU-Berlin zur Verfügung gestellt).

Humaner TfR läßt sich mit OKT9 als eine Bande bei circa 84 kDa in HepG2- und TRVb-hTfR-Zellen detektieren (Spuren 2 und 4), TfR aus humaner Plazenta zeigt das gleiche Laufverhalten (Spur 1), allerdings ist hier eine weitere Bande sichtbar (182 kDa, vermutlich das Dimer). In den nichttransfizierten TRVb-wt-Zellen läßt sich erwartungsgemäß mit OKT9 kein hTfR nachweisen (Spur 3).

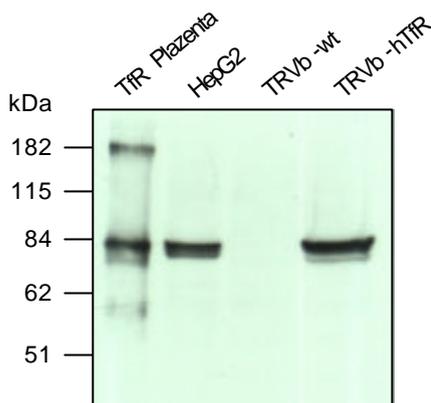


Abb. 3-1: Qualitativer Nachweis von hTfR in verschiedenen Zelllinien – HepG2-, TRVb-wt- und TRVb-hTfR-Zellen wurden solubilisiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (je 60 µg Gesamtprotein, 7.5%iges Gel). Nach Westernblot erfolgte eine Immunodetektion mit den Antikörpern OKT 9 / RAM*. Zur Kontrolle wurde aus humaner Plazenta gereinigter TfR (0.3 µg) aufgetragen.

3.1.2 Quantitativer Nachweis des Transferrinrezeptors

Der quantitative Nachweis von funktionellem TfR auf der Zelloberfläche wurde über die Bindung von biotinyliertem Tf bestimmt. Nach Inkubation mit den zu untersuchenden Zelllinien wurde gebundenes Tf durch Imitation des natürlichen TfR-Cyclus vollständig vom TfR abgelöst (siehe Abb. 2-3, Seite 36). Die Quantifizierung erfolgte mittels eines ELISA anhand einer Standardkurve mit biotinyliertem Transferrin (siehe Abb. 2-4 A, Seite 42). Zur Berechnung der Tf-Bindungsstellen wurde von einem Molekulargewicht von 80 kDa für Tf ausgegangen (1.33×10^{-10} ng / Tf-Molekül).

Für TRVb-Zellen war der Nachweis von Tf-Bindungsstellen nicht möglich, sofern zunächst eventuell störendes Kälber-Tf entfernt wurde (siehe Abschnitt 2.11.9, Seite 35: Ablösen des aus dem FCS (im Medium) stammenden Kälber-Tf). Die Unterlassung dieses Schrittes blieb bei HepG2-Zellen ohne Einfluß auf die Ergebnisse. Daher wurde dieser Schritt in Folgeexperimenten für keine der Zelllinien mehr durchgeführt. Zur Kontrolle, ob Tf eventuell schon während der Waschschrte vom Rezeptor gelöst wird, wurden die Überstände nach Inkubation mit Desferal bei pH 5.5 zunächst gesammelt und im ELISA untersucht. In diesen Proben befand sich erwartungsgemäß kein biotinyliertes Tf. Zur Quantifizierung wurden die Überstände der ersten beiden Inkubationsschritte bei pH 8.0 herangezogen (Abb. 3-2).

Für HepG2-Zellen konnte mit einer Dichte von circa 35 000 Tf-Bindungsstellen pro Zelle ein Wert nachgewiesen werden, der im Bereich von Literaturangaben liegt (50 000 auf der Oberfläche und 100 000 im Zellinneren).¹³⁶ TRVb-hTfR-Zellen zeigten mit circa 30 000 Tf-Bindungsstellen eine ähnlich hohe Dichte. In beiden Fällen sind die Schwankungen wahrscheinlich mit dem Ablösen einzelner Zellen vom Kulturgefaß durch die Waschvorgänge zu begründen. Wie schon im Westernblot gezeigt (Abb. 3-1), so konnte auch hier fast kein TfR in den nichttransfizierten TRVb-wt-Zellen nachgewiesen werden.

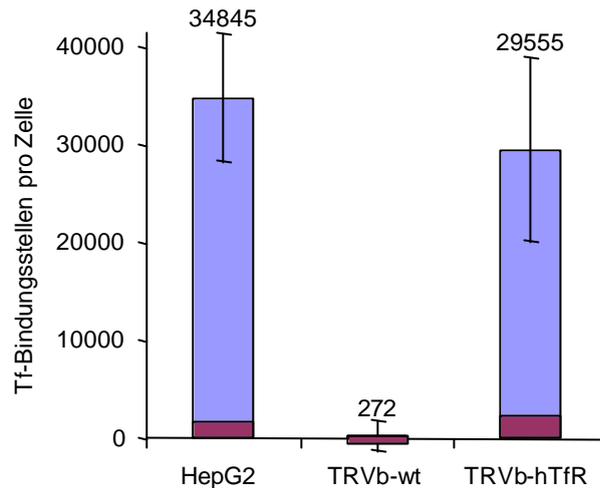


Abb. 3-2: Vergleich der Tf-Bindungsstellen pro Zelle bei verschiedenen Zelllinien – HepG2-, TRVb-wt- und TRVb-hTfR-Zellen wurden mit biotinyliertem Tf (1 µg) inkubiert. Mit Desferal wurden Eisenionen (Fe^{3+}) bei pH 5.5 von Tf gelöst, welches daraufhin bei pH 8.0 vom Rezeptor dissoziierte. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert, wobei RATf immobilisiert wurde und der Nachweis mittels Streptavidin-HRP erfolgte. Die in der Vertiefung verbliebenen Zellen wurden gezählt und die Anzahl an Tf-Bindungsstellen pro Einzelzelle berechnet. Die angegebenen Werte geben den Mittelwert und die Standardabweichung aus fünf Einzelbestimmungen an, wobei im ELISA jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Der dunkle Abschnitt im unteren Bereich stellt die gemessenen Tf-Bindungsstellen bei Konkurrenz mit nichtbiotinyliertem Tf (100 µg pro Ansatz) dar.

Sowohl bei HepG2- als auch bei TRVb-hTfR-Zellen konnte durch Zusatz eines 100fachen Überschusses an nichtbiotinyliertem Tf eine Konkurrenz im Bindungsverhalten detektiert werden, woraus auf eine spezifische Bindung von biotinyliertem Tf an seinen Rezeptor geschlossen werden kann.

3.2 Aktivitätsbestimmungen für Toxine

Neben einer selektiven Tumorzellerkennung ist für Immunotoxine ein effektiver Membrantransfer und eine hohe intrazelluläre Cytotoxizität entscheidend. Zur Detektion und Quantifizierung dieser beiden Parameter sind verschiedene Aktivitätsbestimmungen unerlässlich. Sie dienen der funktionellen Charakterisierung von Toxinen, einzelnen Toxin-domänen und Toxininfusionsproteinen. Neben einem zellfreien Testsystem, bei dem weder eine Rezeptorbindung noch ein Membrantransfer Voraussetzung für die Aktivität sind, sollte ferner ein geeignetes Zellsystem zur Verfügung gestellt werden.

3.2.1 ADP-Ribosylierung

Bakterielle Proteintoxine wie Diphtheriatoxin und *Pseudomonas* Exotoxin sind aufgrund ihrer enzymatisch aktiven Domäne dazu in der Lage, Elongationsfaktor II (EF II) in Anwesenheit von NAD^+ an einem modifizierten Histidin (Diphthamid-715, siehe Abschnitt 1.6.2, Seite 9

und folgende) durch ADP-Ribosylierung so zu verändern, daß er inaktiviert und die Proteinbiosynthese eingestellt wird. Diese Eigenschaft wurde zur Etablierung eines zellfreien Testsystems genutzt.

Unter Verwendung von biotinmarkiertem NAD^+ konnte die Aktivität durch Nachweis einer EF II-Bande bei circa 100 kDa im Immunoblot gezeigt werden (Abb. 3-3). Der Vorteil dieser Methode gegenüber anderen, wie z. B. der Verwendung von $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$ oder der Translationsinhibition in Retikulocytenlysat,^{62,118} ist die einfache und nichtradioaktive Vorgehensweise.

Das Auftreten einer Bande bei circa 100 kDa zeigt, daß der Test auf ADP-Ribosylierung von EF II zur Überprüfung der katalytischen Aktivität von DT und PE gut geeignet ist, wobei für DT auch eine quantitative Abstufung des Effekts nachgewiesen werden konnte (Spuren 1–4, 100–0.1 ng). Bei höheren Toxinkonzentrationen werden weitere Proteine von circa 40 und 90 kDa per NAD^+ biotinyliert. Der Ansatz ohne Toxin zeigt, daß in den angereicherten EF II-Proben keine störende ADP-ribosylierende Aktivität vorhanden ist. Erwartungsgemäß erfolgt durch die A-Kette von Ricin keine ADP-Ribosylierung von EF II, da dieses Proteintoxin mit pflanzlichem Ursprung einen gänzlich anderen Mechanismus hat, in die Proteinbiosynthese einzugreifen (siehe Abschnitt 1.6.2, Seite 9).

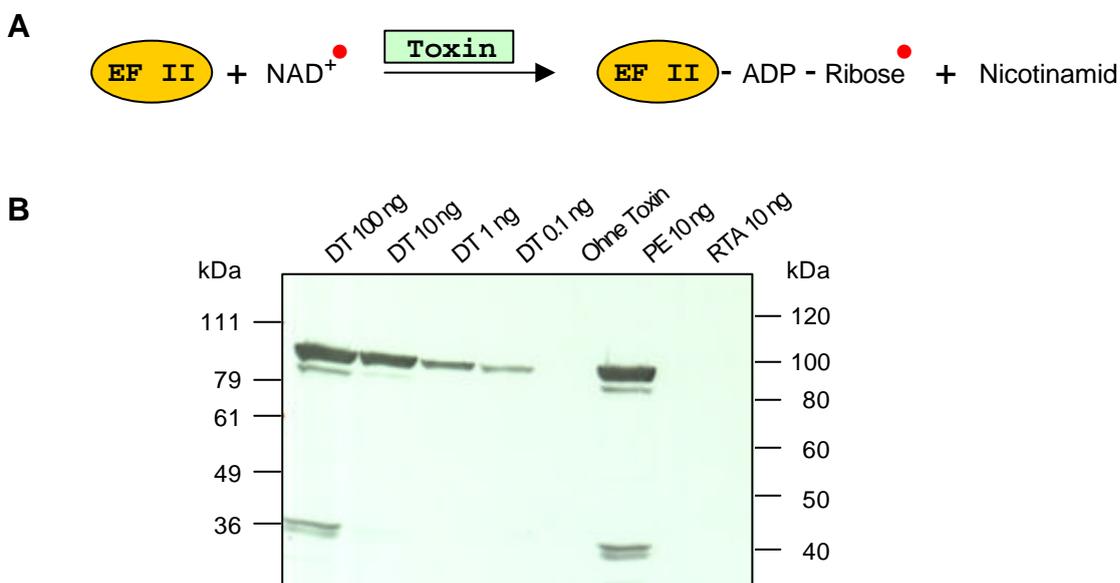


Abb. 3-3: ADP-Ribosylierungsassay – **A** Schematische Darstellung der ADP-Ribosylierung von EF II, wobei die Biotinmarkierung von NAD^+ in Punktform dargestellt ist. **B** Pro Ansatz (20 μl) wurden angereicherter EF II (10 μl), biotinyliertes NAD^+ (5 μl , Endkonzentration 50 μM), verschiedene Toxinverdünnungen und EF II-Puffer zusammengegeben und inkubiert (1 h, 37 °C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 \times Probenpuffer gestoppt, bevor 20 μl gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden (7.5%iges Gel). Nach Westernblot erfolgte eine Immunodetektion mit Anti-Biotin / RAG*. Von Diphtheriatoxin (DT) wurden Konzentrationen im Bereich von 0.1–100 ng eingesetzt; zur Spezifitätskontrolle wurde ein Ansatz ohne Toxin, einer mit *Pseudomonas* Exotoxin (PE) und einer mit der A-Kette von Ricin (RTA, pflanzliches Toxin mit anderem Wirkungsmechanismus) durchgeführt.

3.2.2 Cytotoxizitätstest

Neben dem Nachweis der bloßen Enzymaktivität kann in einem Cytotoxizitätstest die tatsächliche Wirkung der Toxine auf einen Zellverband überprüft werden. Man mißt in der Regel auf unterschiedliche Weise die Zellproliferation und schließt daraus auf das Ausmaß an Toxizität.

Der FDA-Assay wurde als nichtradioaktive Methode ausgewählt und zunächst mit dem mechanistisch verschiedenen, käuflichen CyQuant-Zellproliferationskit verglichen. Bei beiden Tests konnten erfolgreich 0–25 000 Zellen detektiert werden. Aufgrund der geringeren Kosten und der ebenfalls einfachen Handhabung wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit nur noch der FDA-Assay eingesetzt. Für ihn konnten lineare Beziehungen für die resultierenden Fluoreszenzsignale im Bereich von 0–50 000 Zellen nachgewiesen werden. Die Korrelationskoeffizienten lagen für HepG2-Zellen bei $r^2 = 0.95$, für TRVb-wt- und TRVb-hTfR-Zellen bei $r^2 = 0.98$ bzw. $r^2 = 0.97$ (Abb. 3-4).

Um den Zellen im Falle einer Cytotoxizitätsbestimmung innerhalb der Inkubationszeit mit den Toxinen eine ausreichende Kapazität zum Wachstum zu lassen, wurde in Folgeexperimenten eine Ausgangszellichte von 5 000 Zellen pro Vertiefung gewählt (damit sind mehr als drei Verdoppelungen innerhalb der Inkubationszeit von 48 h möglich, die Verdopplungszeit beträgt circa 20 h nach initialer *lag*-Phase).

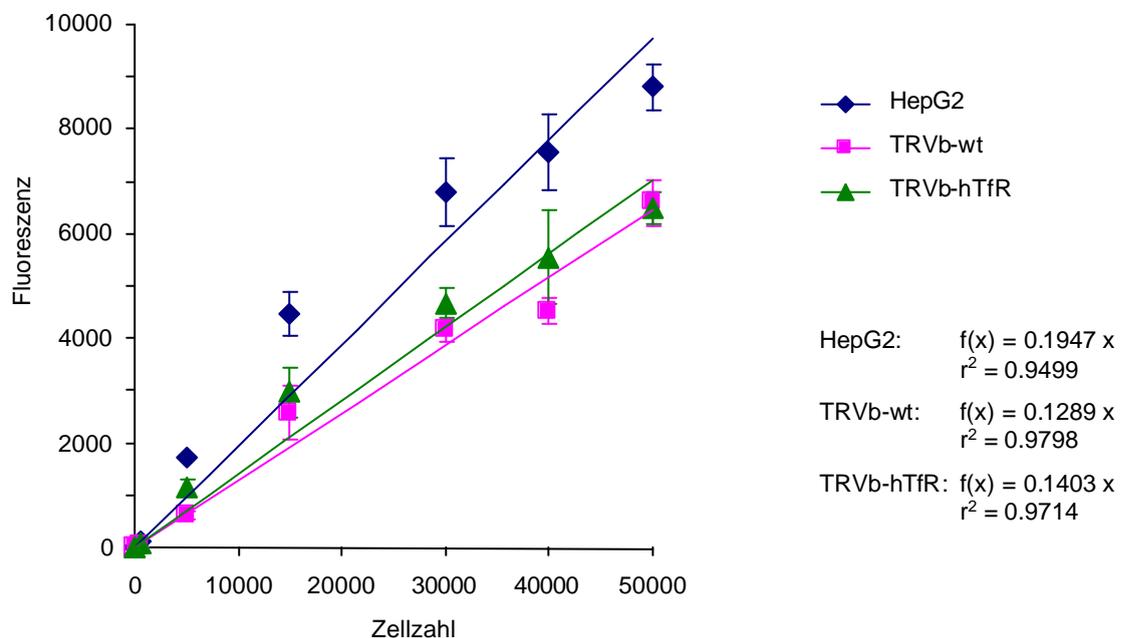


Abb. 3-4: Quantifizierung verschiedener Zellzahlen mit Hilfe des FDA-Assays – HepG2-, TRVb-wt- und TRVb-hTfR-Zellen wurden in Dichten von 0–50 000 Zellen/Vertiefung ausgesät. Nach 16stündiger Inkubation im Brutschrank waren die Zellen adhären, aber noch nicht in der Wachstumsphase. Nach zweimaligem Waschen mit Dulbecco-PBS⁺⁺ und Trockenklopfen wurden die Zellen mit 200 µl FDA-Lösung versetzt. Nach Inkubation im Brutschrank (1 h) wurden die Fluoreszenzsignale gemessen (Exzitation 485 nm, Emission 538 nm). Dargestellt sind die aus drei Messungen erhaltenen, gemittelten Werte und deren Standardabweichungen.

3.3 Toxinfindung und Darstellung der funktionellen Domänen

3.3.1 Proteinsyntheseinhibitoren

Im Rahmen einer antitumoralen Anwendung, die sich durch minimale Effekte auf andere Zellen auszeichnet und ein großes Spektrum an Tumorzellen zu erfassen vermag, sollten die eingesetzten Toxine oder deren funktionelle Domänen vorwiegend intrazelluläre Vorgänge beeinflussen, die nicht zelltypspezifisch sind. Neben einer sehr hohen Aktivität durften die zu verwendenden Toxindomänen nicht zu groß sein, um einen Membrantransfer mittels Trojanischer Peptide zu gewährleisten. Darüber hinaus sollten die Toxine solche Aminosäuren, die für die selektive Kopplung mittels eines Crosslinkers geeignet sind, nur in geringer Stückzahl enthalten (optimal ist ein einzelner Cysteinrest, da die Membrantransfersequenzen entsprechend aktiviert vorliegen, siehe Abschnitt 3.4, Seite 70).

Wie in der Einleitung beschrieben, sind bestimmte, die Proteinsynthese inhibierende Toxine am besten für die Verwendung in Immunotoxinen geeignet. Unter diesen waren die A-Kette von Ricin, Diphtheriatoxin und *Pseudomonas* Exotoxin kommerziell verfügbar. Alle drei Toxine haben eine A-B-Struktur und weisen in ihrem enzymatisch aktiven Teil einen zur Kopplung geeigneten Cysteinrest auf. Ricin A, die katalytische Domäne von Ricin, wurde zunächst als sehr geeignet angesehen, da sie in einer Form vorlag, die eine direkte Kopplung an eine Transfersequenz erlaubte. Allerdings zeigte sich, daß Ricin aufgrund unterschiedlicher Glykosylierungsmuster im SDS-Polyacrylamidgel als Doppelbande auftritt, was durch die Angaben von Li *et al.* bestätigt wird.⁶⁰ Damit war ein Kopplungsnachweis sehr schwierig, zumal auch entsprechende Antikörper nicht kommerziell verfügbar waren. Von Diphtheriatoxin und *Pseudomonas* Exotoxin konnten dagegen sowohl das Holotoxin als auch entsprechende Antikörper erworben werden. Obwohl bei beiden Toxinen zunächst die enzymatisch aktiven Domänen isoliert werden mußten, boten sie den Vorteil, daß für die verschiedenen, durchzuführenden Aktivitätsbestimmungen immer eine Positivkontrolle in Form des Holotoxins zur Verfügung stand.

3.3.2 Isolierung der aktiven Domäne von Diphtheriatoxin

Die Isolierung der katalytischen Domäne (A-Kette) von Diphtheriatoxin (DT) erfolgte auf proteinchemischem Weg nach einem Verfahren von Moskaug *et al.*¹²⁹ Sowohl Diphtheriatoxin als auch *Pseudomonas* Exotoxin verfügen über eine natürliche Spaltstelle innerhalb einer proteasesensitiven Schleife (Abb. 3-5 A, siehe auch Abb. 1-6, Seite 18). Diese wird normalerweise im Rahmen der intrazellulären Aktivierung dieser Toxine von furinähnlichen Enzymen umgesetzt.¹³⁹

Experimentell erfolgte die Spaltung von A- und B-Kette mit Hilfe von Trypsin. Die instabile B-Kette wurde nachfolgend durch Hitze denaturiert und abgetrennt. Die A-Kette von DT mit

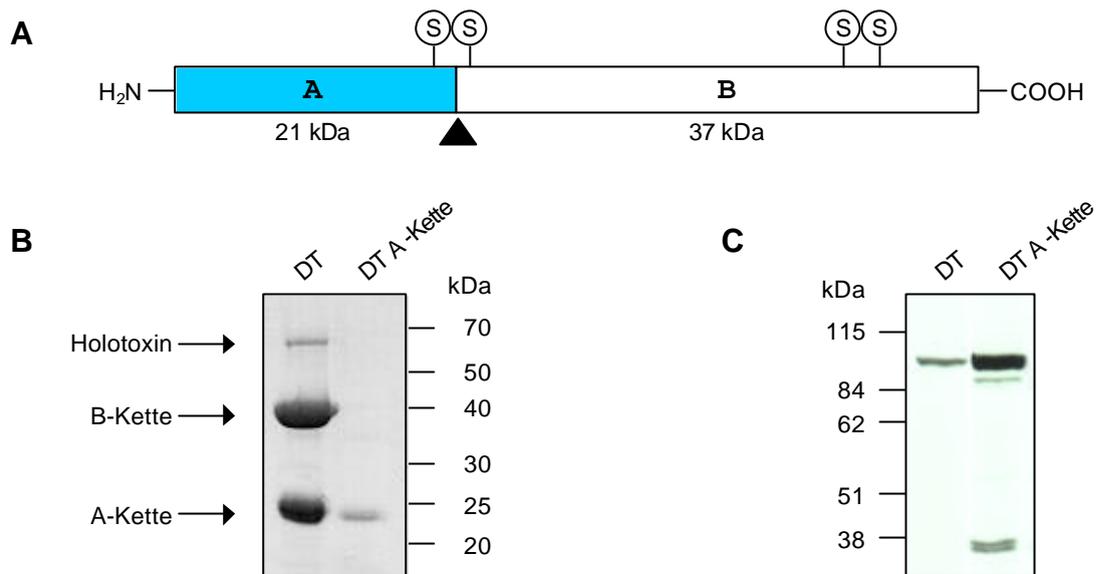


Abb. 3-5: Tryptische Spaltung von Diphtheriatoxin (DT) und Aktivitätskontrolle – **A** Schematische Darstellung von DT. Die N-terminal gelegene A-Kette vermittelt die Proteinsyntheseinhibition durch ADP-Ribosylierung, die B-Kette die rezeptorvermittelte Endocytose. Das Dreieck deutet die Position der physiologischen Spaltstelle im Molekül an. **B** Kommerziell erworbenes DT wurde nach der Methode von Moskaug *et al.* mit Trypsin gespalten.¹²⁹ Die stabile A-Kette wurde durch Erwärmen und Dialyse von der B-Kette abgetrennt (siehe Abschnitt 2.13.4, Seite 46). Reduzierend aufgetragen, gelelektrophoretisch getrennt (12%iges Gel) und mit Coomassie angefärbt wurden 12 µg DT und 2,5 µg gereinigte A-Kette von DT (DTA). **C** 10 ng DT und 75 ng DTA wurden mit Hilfe des ADP-Ribosylierungsassays (siehe Abb. 3-3, Seite 62) bezüglich ihrer enzymatischen Aktivität geprüft.

einer Größe von 21 kDa konnte auf diese Weise mit Ausbeuten von 30–50 % isoliert werden (Abb. 3-5 B), wobei ihre hohe ADP-Ribosylierungsaktivität auch nach der Reinigung nachgewiesen werden konnte (Abb. 3-5 C).

Grundsätzlich ist für *Pseudomonas* Exotoxin (PE) eine Spaltung auf die gleiche Weise denkbar.¹⁴⁰ Da aber die katalytische Domäne von PE im Gegensatz zur A-Kette von DT hitzelabil ist, konnte das aus der Trypsinspaltung resultierende, aktive PE-Fragment von circa 37 kDa (siehe Abb. 1-4, Seite 13) nicht durch Hitzedenaturierung der Zellbindungsdomäne gereinigt werden. Auch unter Anwendung anderer, geeigneterer Reinigungsstrategien (z. B. Anionenaustauschchromatographie, Gelfiltration) erwies sich eine solche Vorgehensweise für PE wegen der geringen Ausbeuten als wenig effizient, so daß nach einer Alternative gesucht wurde.

3.3.3 Rekombinante Synthese von *Pseudomonas* Exotoxin-Fragmenten

Im Gegensatz zu Diphtheriatoxin wird bei *Pseudomonas* Exotoxin (PE) durch die natürliche Spaltstelle nicht nur die katalytische Domäne sondern auch ein Teil der Translokationsdomäne freigesetzt. Derartige Fragmente aus der enzymatisch aktiven Komponente und einem Teil der Translokationssequenz sind zwar wertvolle funktionelle Kontrollen für die geplanten

Kopplungen an verschiedene Membrantransfersequenzen, aber für die mechanistischen Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von Immunoadaptertoxinen nicht unbedingt erforderlich.

Die rekombinante Synthese von PE-Fragmenten erlaubte die Darstellung unterschiedlicher, enzymatisch aktiver Komponenten. Neben der Generierung von einheitlichen Fragmenten bietet die rekombinante Synthese zusätzlich den Vorteil, daß größere Mengen der enzymatisch aktiven Domäne darstellbar sind, die mit PE als Ausgangsmaterial wegen des relativ hohen Preises nur begrenzt zur Verfügung gestanden hätten.

Da sowohl PE als auch DT ausschließlich eukaryontischen EF II inaktivieren, wurde für die Expression ein *E. coli*-System vorgesehen. Das entsprechende cDNA-Stück (analog den Aminosäuren 1–3 und 253–613 von PE, also Translokations- und katalytische Domäne) wurde freundlicherweise von Dr. Ira Pastan (National Institute of Health, Bethesda, USA) in Form des Vektors pVC 8 zur Verfügung gestellt.¹⁴¹ Zur Kontrolle der erhaltenen cDNA wurde über vorhandene Restriktionsschnittstellen das Fragment PE 253 (*Xba* I / *Eco*R I-Insert) zunächst in pBluescript II KS kloniert (pJK 1) und sequenziert (Abb. 3-6).

Erst beim anschließenden Umklonieren in einen Expressionsvektor wurde das gewünschte Teilstück ohne toxineigene Translokationssequenz hergestellt. Der aktiven Domäne III mußte dazu allerdings ein Teil der Domäne Ib – deren Funktion bislang unbekannt ist – hinzugefügt werden, da im Gegensatz zur isolierten Domäne III nur ein solches Fragment (PE 381, Abb. 3-6) ADP-Ribosylierungsaktivität zeigt.⁷¹

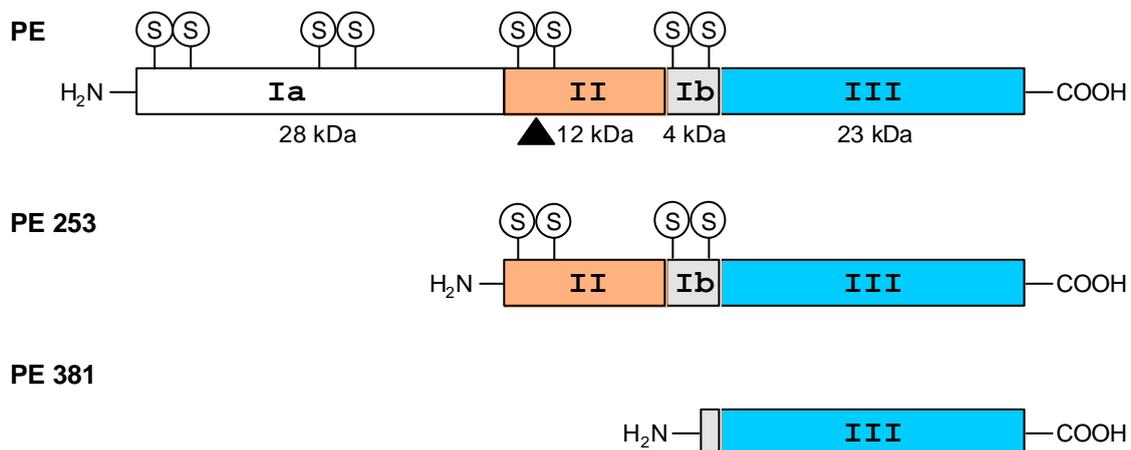


Abb. 3-6: Schematische Darstellung von *Pseudomonas* Exotoxin (PE) und verschiedenen Teilfragmenten – Vollständiges PE: Die N-terminal gelegene Domäne Ia vermittelt die Rezeptorbindung, Domäne II den Membrantransfer und Domäne III die Proteinsyntheseinhibition. Das Dreieck repräsentiert die physiologische Spaltstelle im Molekül. PE 253 entspricht dem katalytisch aktiven Teil (Domäne III) und der Translokationsdomäne II nach physiologischer Spaltung von PE, PE 381 entspricht der enzymatisch aktiven Domäne III und einem Teil von Domäne Ib. Es stellt das kleinste, enzymatisch aktive Fragment von PE dar.

Untersuchungen zur zellulären Lokalisation von exprimierten PE-Teilstücken in *E. coli* ergaben, daß 90–98 % der beiden Konstrukte PE 253 und PE 381 ins Periplasma transportiert werden.¹⁴¹ Um diese Eigenschaft zu unterstützen, wurde das Expressionssystem pRBIPDI ausgewählt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Martina Huber-Wunderlich, ETH Zürich).^{142,143} Zur Klonierung in pRBIPDI mußte am 5'-Ende der Fragmente per PCR eine *Stu* I-Schnittstelle eingefügt werden, beim kleineren Fragment zusätzlich ein Codon für einen Cysteinrest, um eine spätere chemische Kopplung zu ermöglichen. Ansonsten wurde auf eine Einführung zusätzlicher Codons verzichtet. Deshalb sind die in pRBIPDI klonierten PE-Fragmente geringfügig kleiner als PE 253 und PE 381. Die erforderliche *Hind* III-Schnittstelle am 3'-Ende wurde von der *Multiplex Cloning Site* von pBluescript II KS geliefert.

Die in Abb. 3-7 dargestellten, in pRBIPDI klonierten PE-Konstrukte wurden zur Expression zunächst in *E. coli* JM 83 transformiert. Die anschließende Expression wurde zur Minimierung proteolytischer Abbauprozesse bei 30 °C durchgeführt (Abb. 3-8 A). In beiden Fällen ist eine deutliche Überexpression der gewünschten PE-Fragmente feststellbar. JK 3 zeigt entsprechend der kalkulierten Fragmentgröße eine einzelne Bande bei 26 kDa. Bei Expression von JK 2 dagegen sind drei Banden im Immunoblot erkennbar, wobei die Bande bei circa 45 kDa der erwarteten Fragmentgröße entspricht, bei den beiden weiteren Banden (circa 30 und 35 kDa) könnte es sich um Kettenabbrüche oder Abbauprodukte handeln.

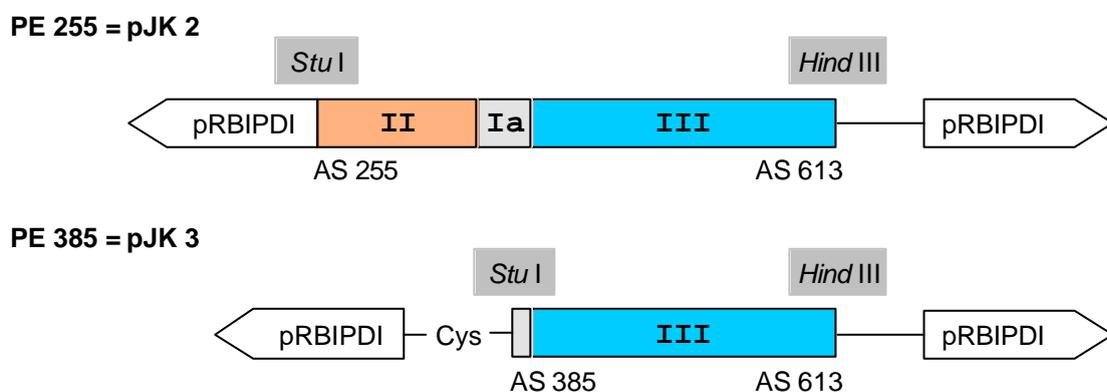


Abb. 3-7: Teilfragmente von PE, kloniert in das Expressionsplasmid pRBIPDI – Zunächst wurden mittels einer PCR aus pJK 1 die entsprechenden DNA-Stücke mit einer *Stu* I-Schnittstelle amplifiziert (PE 255: Reverse / PE-255 *Stu* for; PE 385: Reverse / PE-385 *Stu* for; PCR mit Pwo-DNA-Polymerase unter Zusatz von 5 % Formamid und folgendem Temperaturcyclus: 96 °C, 3 min; [96 °C, 1 min; 65 °C, 1 min 30 s; 72 °C, 1 min] × 25; 72 °C, 5 min; 16 °C). Anschließend wurden die gereinigten PCR-Produkte und pRBIPDI mit *Stu* I und *Hind* III verdaut (*RBI* wird aus pRBIPDI ausgeschnitten), nach Gelextraktion ligiert und in *E. coli* DH5α transformiert. Der Erfolg der Ligation wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung positiver Klone überprüft.

Zur weiteren Aufarbeitung konnte JK 3 nach Periplasmaaufschluß erfolgreich mittels einer Anti-PE-Affinitätschromatographie gereinigt werden (Abb. 3-8 B). Die zum Immunoblot analogen Elutionsfraktionen wurden ebenfalls in einer Silberfärbung untersucht. Sie zeigten dort keine Verunreinigungen, allerdings war wie im Immunoblot eine Bande bei circa 45 kDa erkennbar, die vermutlich auf eine Dimerisierung zurückzuführen ist. Unvorteilhaft an diesem Reinigungsverfahren war jedoch die geringe Ausbeute. Da die Konzentration des eluierten PE-Fragmentes unter der Nachweisgrenze der BCA-Proteinbestimmung lag, wurde ein ELISA etabliert, mit dessen Hilfe sich bis zu 2 ng/ml PE quantifizieren ließen. JK 3 wurde durch *Coating* immobilisiert und mittels Anti-PE / GAR* detektiert (siehe Abb. 2-4 C, Seite 42); die Konzentration wurde anhand von PE-Standards errechnet (unterschiedliche Mengen kommerziell erworbenes PE-Holotoxin wurden per *Coating* immobilisiert). Somit konnte schließlich die Ausbeute der Reinigung bestimmt werden, sie betrug 1.5 µg JK 3 bezogen auf 1 mg Gesamtprotein.

Eine weitere Aufarbeitung von JK 2 in größerem Maßstab wurde nicht durchgeführt, da auch nach Variation der Expression stets mindestens drei Banden im Westernblot sichtbar wurden (Abb. 3-8 A), die sich auch durch verschiedene, getestete Reinigungsstrategien nicht voneinander abtrennen ließen. Leider stand zur Aufklärung dieses Verhaltens weder ein alternatives PE-Antiserum noch ein entsprechender Antikörper für Kontrolluntersuchungen zur Verfügung. Eine kostenintensive Sequenzierung wurde nicht in Betracht gezogen, da es sich bei JK 2 nur um ein Kontrollkonstrukt handelte.

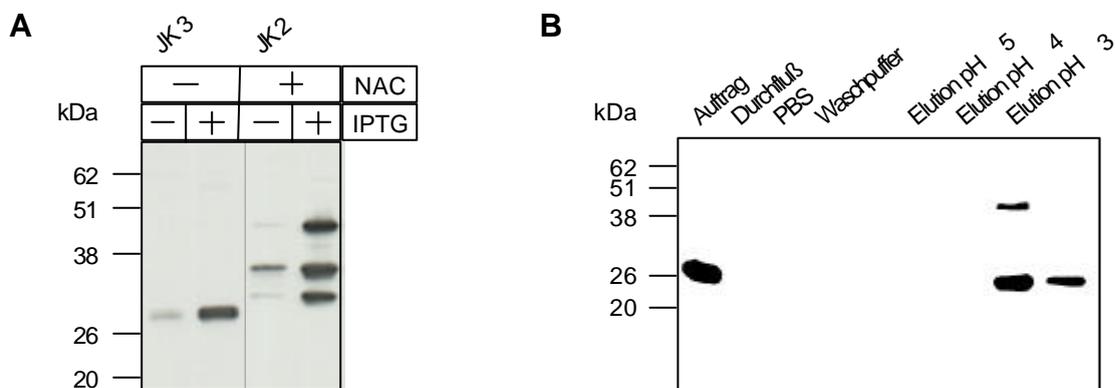


Abb. 3-8: Expression von JK 2 und JK 3, Reinigung von JK 3 – **A** Zur Expression in *E. coli* JM 83 wurde die entsprechende Hauptkultur bei 30 °C bis zu einer OD₄₅₀ von circa 1.0 geschüttelt und über Nacht induziert (1 mM IPTG, im Falle von JK 2 plus 5 mM *N*-Acetylcystein, NAC). Nach Periplasmaaufschluß wurden jeweils induzierte und nichtinduzierte Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Immunoblot (12%iges Gel, Anti-PE / GAR*) sichtbar gemacht. **B** JK 3 konnte mittels einer Anti-PE-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Gezeigt ist ein Immunoblot nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Fraktionen, wobei für Auftrag und Durchfluß nur die Hälfte des Probenvolumens eingesetzt wurde.

3.3.4 Darstellung von GFP als Pseudotoxin

Neben den Toxinadapterkonstrukten wurden auch entsprechende nichttoxische Konstrukte hergestellt. Dahinter stand die Überlegung, daß bei verschiedenen Experimenten unter Umständen Testzellen unter dem Einfluß der Toxine absterben, was eine Visualisierung der Transportvorgänge behindern könnte. Da *Green-Fluorescent-Protein* (GFP) in der Zelle bekanntermaßen keinen gravierenden Einfluß auf den Stoffwechsel hat – sonst wäre sein Einsatz als Fusionsprotein bei Transfektionen nicht möglich – eignete es sich als Pseudotoxin für diese Applikation ganz besonders. Weitere Vorteile waren seine Eigenfluoreszenz, die möglicherweise für analytische Zwecke genutzt werden konnte, und seine Größe, die mit 27 kDa in einem ähnlichen Größenbereich liegt wie die katalytischen Domänen der verwendeten Proteintoxine Diphtheriatoxin und *Pseudomonas* Exotoxin.

Mit dem freundlicherweise von Simon Topell, ETH Zürich zur Verfügung gestellten Plasmid pRBIGFPuv3-lac¹⁴⁴ wurde rekombinantes GFP in großer Ausbeute hergestellt (circa 10–30 mg/l Kultur). Abb. 3-9 zeigt die Ergebnisse der verschiedenen, durchgeführten Reinigungsschritte, wobei nach der Gelfiltration eine Reinheit von circa 95 % im Silbergel erzielt werden konnte (Spur 5).

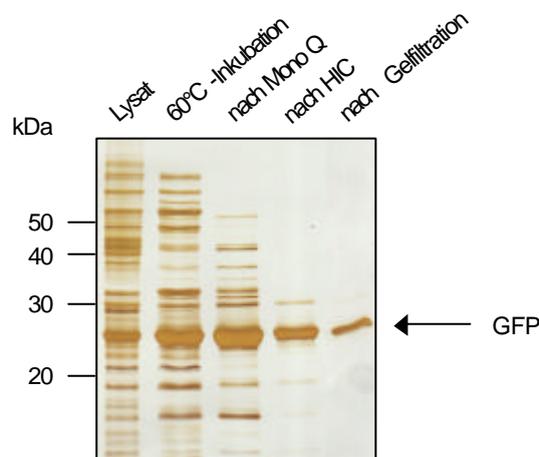


Abb. 3-9: Darstellung von GFPuv3 – Das Plasmid pRBIGFPuv3-lac wurde in *E. coli* DH5 α transformiert und in LB-Medium exprimiert (1 mM IPTG, 14 h). Das Pellet wurde in PBS (46 mM Na₂HPO₄, 17 mM NaH₂PO₄, 68 mM NaCl, pH 7.4) unter Zusatz von DNase (10 μ g/ml) und Lysozym (1 mg/ml) resuspendiert und aufgeschlossen (37 °C, 1 h und Ultraschall). Der Überstand (20 000 \times g, 30 min) wurde im Wasserbad bei 60 °C inkubiert (30 min) und von ausgefallenem Protein befreit (zunächst Filtration, dann Zentrifugation 20 000 \times g, 30 min). Der gegen Tris-Puffer (20 mM, pH 8.0) dialysierte Überstand wurde nachfolgend einer Anionenaustausch- (Mono Q, Hochsalzpuffer mit 0.5 M NaCl) und einer hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC Resource-Phenyl, Hochsalzpuffer mit 1.5 M (NH₄)₂SO₄) zugeführt. Nach Konzentrierung der Elutionsfraktionen (Centriprep 30) erfolgte als letzter Reinigungsschritt eine Gelfiltration (Superdex 75). Gezeigt sind die einzelnen Stufen der Reinigung im Silbergel (12%iges Gel).

3.4 Chemische Kopplung von Transfersequenzen und Toxinfragmenten

Zum Zeitpunkt der Experimente war nur eine einzige Membrantransfersequenz in Protein- oder Peptidform kommerziell verfügbar, nämlich Penetratin.² In Auftragsynthese wurde deshalb eine weitere Sequenz hergestellt, die MTS.¹ Mit Hilfe des Crosslinkers SPDP wurde das MTS-Peptid an seinem N-Terminus so aktiviert (siehe Abb. 2-7, Seite 47), daß es in derselben Form wie gekauftes, aktiviertes Penetratin vorlag. Beide aktivierten Sequenzen waren damit in der Lage, über ihren 2-Pyridyldisulfidsubstituenten unter Ausbildung einer Disulfidbrücke an einen Cysteinrest im Toxinmolekül zu koppeln.

3.4.1 Kopplungen an verschiedene Toxinfragmente

Kopplungen an die A-Kette von DT: Die zuvor gereinigte A-Kette von DT (siehe Abschnitt 3.3.2, Seite 64) wurde zunächst zur Ermittlung der geeigneten Reaktionsbedingungen mit der polaren Transfersequenz Penetratin (PEN) gekoppelt. Weitere Optimierungen der Kopplungsbedingungen wurden anschließend mit der MTS erforderlich, da diese aufgrund überwiegend unpolarer Aminosäurereste (Sequenzen siehe Tab. 1-3, Seite 20) ein anderes Kopplungsverhalten als Penetratin zeigte (Abb. 3-10).

Unter geeigneten Bedingungen konnten sowohl DTA-PEN als auch DTA-MTS synthetisiert werden (Spuren 3 und 4). Das Ergebnis beider Reaktionen war allerdings trotz Optimierung sehr unterschiedlich. So war mit einer nahezu vollständigen Ausbeute die Kopplung an PEN sehr effektiv, dagegen war die Kopplung an die MTS von einer sehr geringen Ausbeute gekennzeichnet. Im Silbergel ist die Kopplung in beiden Fällen in einem Molekulargewichtsshift bezogen auf DTA erkennbar (im Falle der MTS-Kopplung, Spur 4, handelt es sich um die schwache Bande bei circa 25 kDa). Das Ergebnis konnte mittels Westernblot bestätigt werden.

Kopplung an PE 385 bzw. JK 3: Da die Kopplung von aktiviertem Penetratin an DTA unter annähernd vollständiger Umsetzung verlief, wurden zunächst mit dieser Transfersequenz Kopplungsversuche für JK 3 unternommen. Unter verschiedenen Reaktionsbedingungen konnte dabei stets eine geringe Kopplungsrate erzielt werden. Trotz der Möglichkeit, eine Reinigung durchzuführen, wurde aufgrund der geringen Ausbeuten, der geringen Menge an zur Verfügung stehendem JK 3 und damit auch JK 3-PEN sowie weiteren potentiellen Proteinverlusten bei einer Aufreinigung von diesem Ansatz abgesehen.

3.4.2 Kopplung von Penetratin an GFP

Zur Kopplung von PEN an GFP wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt. Da zu dem Zeitpunkt, als die Versuche durchgeführt wurden, noch kein Antikörper gegen GFP im Labor

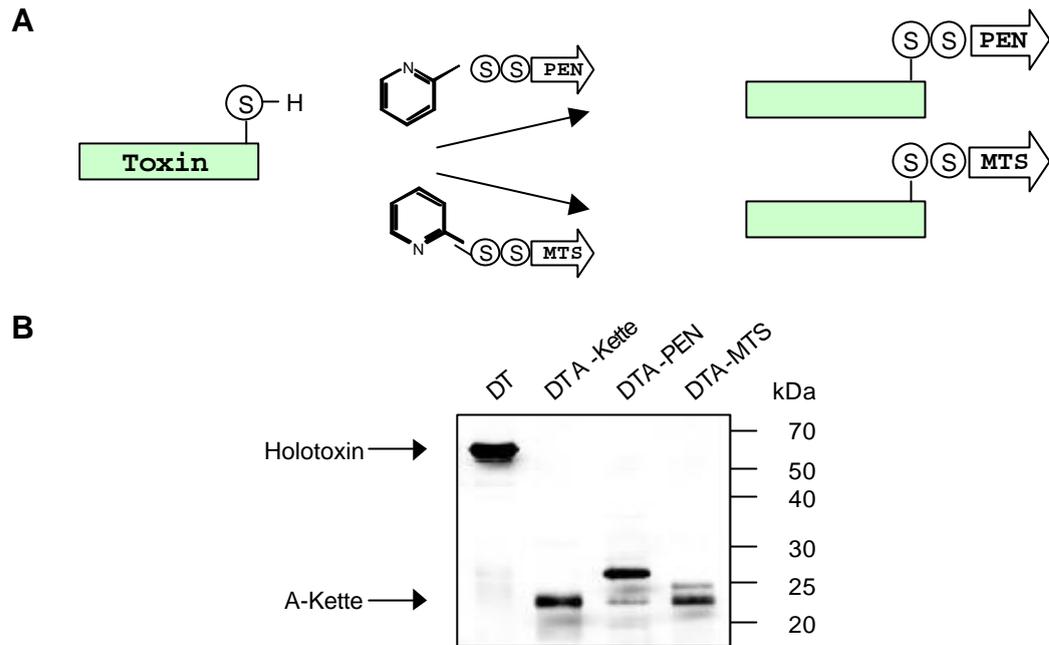


Abb. 3-10: Kopplung von DTA an verschiedene Membrantransfersequenzen – **A** Schematische Darstellung der Kopplung. Ausgegangen wird von isolierten, enzymatisch aktiven Toxinomänen, die bedingt durch einen Cysteinrest freie Sulfanylgruppen enthalten. Nach Aktivierung als 2-Pyridyldisulfid werden die Transfersequenzen MTS und PEN unter Freisetzung von Pyridin-2-thion über eine Disulfidbrücke an das Toxinmolekül gekoppelt. **B** Nachweis der Kopplung von DTA an PEN und MTS. PEN wurde in 2fach molarem Überschuß zu DTA gegeben und für 2.5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die aktivierte MTS wurde in 15fach molarem Überschuß zu DTA gegeben und für 2 h bei 45 °C inkubiert. Die Silberfärbung zeigt vollständiges DT sowie das Ausgangsprodukt DTA (je 1 µg) und die Kopplungsprodukte (jeweils 1 µg ohne weitere Aufreinigung) nach gelelektrophoretischer Auftrennung (12%iges Gel, nichtreduzierend).

verfügbar war, wurde biotinyliertes Penetratin eingesetzt, so daß eine Kopplung mit Anti-Biotin-Antikörper nachweisbar war. Da GFP über zwei Disulfidgruppen verfügt, konnten zwei Kopplungsprodukte aber auch oligomere Addukte detektiert werden (Abb. 3-11).

Mit einer sequentiellen Zugabe äquimolarer Mengen PEN konnte nach und nach eine Steigerung der Kopplungsrate erzielt werden (Spuren 2–4). Die Ausbeute ist allerdings nicht höher als die, die mit sofortiger Zugabe eines 5fachen Überschusses von PEN erzielt wird (Spur 5). Der Zusatz von TCEP (Tris-(2-carboxyethyl)phosphin) zur Reduktion von Disulfidgruppen wurde vom Penetratinhersteller empfohlen.¹⁴⁵ Die Reduktion der Disulfidgruppen von GFP führt bei pH 4 zur Ausbildung oligomerer GFP-PEN-Addukte (Spur 6), während der Zusatz von TCEP ohne Absenkung des pH-Wertes ein völliges Ausbleiben der Kopplungsreaktion zur Folge hat (Spur 7).

Trotz weiterer Optimierungsversuche konnte die Ausbeute der Kopplung von GFP mit PEN nur kaum verbessert werden. Deshalb wurden die Kopplungsansätze zur Reindarstellung von GFP-PEN einer Anionenaustauschchromatographie (Mono Q) unterzogen. Mittels dieses

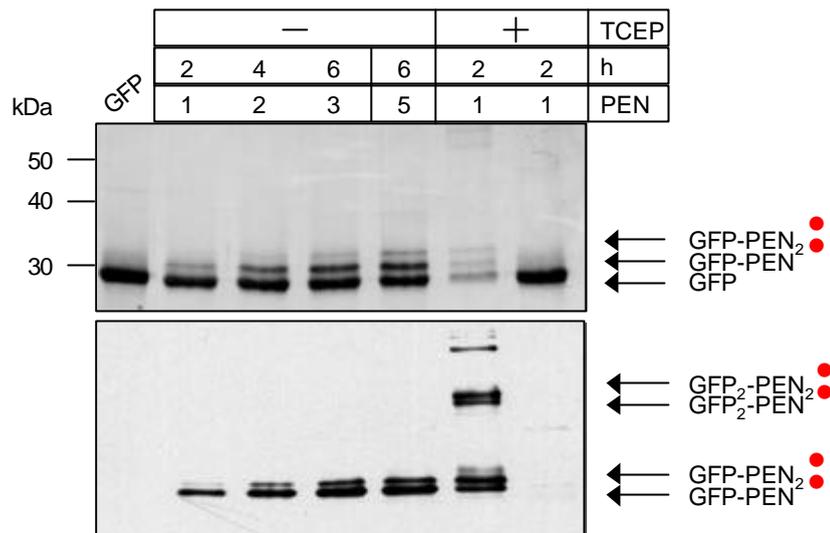


Abb. 3-11: Kopplung von biotinyliertem PEN an GFP – Die unterschiedlichen Versuchsansätze sind im oberen Teil als Silbergel (12%iges Gel) und im unteren Teil als Immunoblot (Anti-Biotin / RAG*) gezeigt. Es ist darauf zu achten, daß mit der Anti-Biotin-Detektion nur gekoppelte Produkte sichtbar gemacht werden. Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, als Vergleich wurde in Spur 1 gereinigtes GFP aufgetragen. Für die Ansätze 1–3 wurde GFP mit einer äquimolaren Menge PEN versetzt und für 2 h inkubiert (äquimolar, Inkubation 2 h), danach wurde erneut eine äquimolare Menge PEN zugegeben und für weitere 2 h inkubiert (2fach molarer Überschuß, Inkubation 4 h). Der Vorgang wurde im Anschluß noch einmal wiederholt (3fach molarer Überschuß, Inkubation 6 h). Bei Ansatz 4 wurde sofort ein 5fach molarer Überschuß PEN zugegeben und für 6 h inkubiert. Für die Ansätze 5 und 6 wurde GFP zunächst mit TCEP (Tris-(2-carboxyethyl)phosphin) vorbehandelt (Ansatz 5: pH 4.0, 5min; Ansatz 6: pH 7.4, 5min), bevor PEN in äquimolarer Menge zugegeben und für 2 h inkubiert wurde.

Verfahrens konnte GFP-PEN erfolgreich von GFP getrennt werden (Abb. 3-12). Da die Disulfidbrücken in gereinigtem GFP-PEN unter Lagerung bei 4 °C sehr leicht reduziert wurden, wurde den Elutionsfraktionen zur Stabilisierung oxidiertes Glutathion in 100fach molarem Überschuß zugesetzt. Die anschließende Lagerung erfolgte bei – 20 °C.

3.4.3 Funktionsanalyse der gekoppelten DT-Konstrukte

3.4.3.1 Cytosolische Spaltbarkeit der Disulfidgruppe

Voraussetzung für die Wirkung der hergestellten Konstrukte ist die Spaltung der Disulfidgruppe zwischen MTS bzw. PEN und Toxin im Cytosol. So wird – zur Vermeidung unspezifischer Effekte auf benachbarte Zellen – erreicht, daß die nach Membrandurchtritt cytotoxisch wirkende Toxindomäne freigesetzt und nicht wieder mittels der Transfersequenz aus dem Zellinneren hinaus geschleust wird.

Disulfidgruppen sind unter reduktiven Bedingungen spaltbar. Zur Quantifizierung der cytosolischen Spaltbarkeit wurde DTA-PEN mit Cytosol von HepG2-Zellen – präpariert nach der Methode von Dignam (ohne β -Mercaptoethanol) – versetzt und inkubiert (Abb. 3-13).

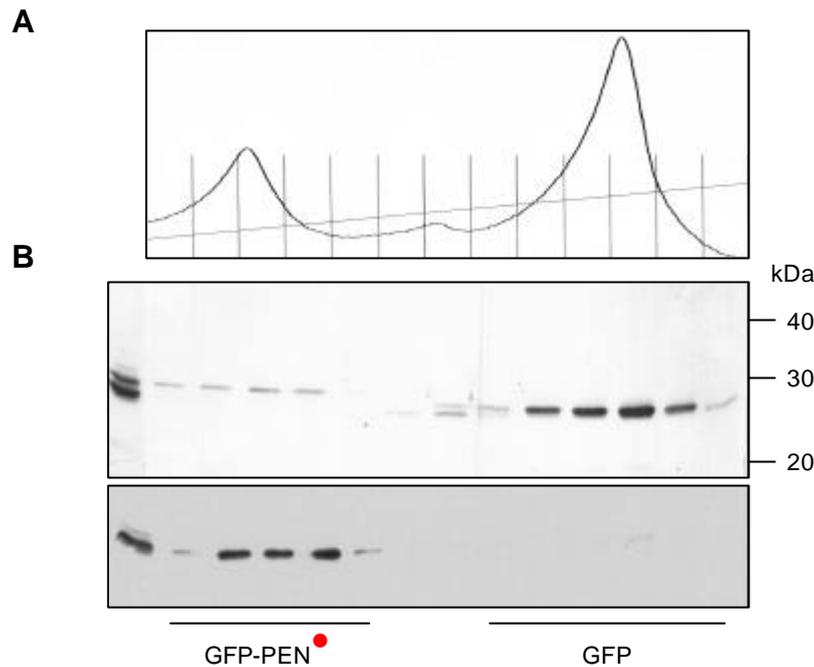


Abb. 3-12: Reinigung von GFP-PEN – Gekoppeltes GFP-PEN wurde gegen Startpuffer (20 mM Tris / HCl, pH 8.0) dialysiert und auf die ebenfalls mit diesem Puffer äquilibrierte Mono Q-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte unter kontinuierlicher Zugabe von Hochsalzpuffer (20 mM Tris / HCl, pH 8.0 + 0.5 M NaCl, 0-50% Hochsalzpuffer in 20 CV). Teil **A** zeigt das Elutionsprofil unter Anwendung des Gradienten (UV-Detektion bei 280 nm), Teil **B** zeigt die korrespondierenden Elutionsfraktionen nach gelelektrophoretischer Auftrennung (12%iges Gel) in einer Silberfärbung (oben) und als Immunoblot (unten). Die Detektion erfolgte aufgrund der Biotinylierung von PEN mit Anti-Biotin / RAG*. Deshalb werden im Immunoblot nur die Kopplungsprodukte angefärbt



Abb. 3-13: Cytosolische Spaltbarkeit der in DTA-PEN enthaltenen Disulfidbrücke – In einem Gesamtvolumen von 60 μ l wurde DTA-PEN (1.5 μ g) mit einer HepG2-Cytosolfraction nach Dignam (circa 50 μ g Gesamtprotein) in An- oder Abwesenheit von PIC-Mix (1 μ l / Ansatz, siehe Abschnitt 2.11.8, Seite 35) versetzt und bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils Proben entnommen (je 20 μ l zu den Zeitpunkten 0.5, 30, 120 min). Die Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (12%iges Gel, nichtreduzierend) und mittels eines Immunoblots (Anti-DT / RAG*) detektiert. Als Kontrolle ist in der ersten Spur DTA-PEN (0.5 μ g) aufgetragen.

Die Abspaltung der Transfersequenz wird in einem Molekulargewichtsshift deutlich (Spur 1 gegenüber allen anderen Spuren). Somit zeigt die Disulfidgruppe in allen Ansätzen die von ihr erwünschte Spaltbarkeit im reduktiven Milieu des Cytosols. Diese ist zeitabhängig, doch

ist unmittelbar nach Zugabe von Cytosol schon ein großer Teil der Bindung gespalten. Die chemisch bedingte Spaltung läßt sich, wie erwartet, nicht durch Zugabe von Proteaseinhibitoren verhindern (PIC-Mix, Spuren 2–4).

3.4.3.2 Cytotoxizitätstest mit DT-Konstrukten

Im Falle einer funktionellen Transfersequenz sollten die Konstrukte in der Lage sein, ins Cytosol zu gelangen, wo die – aufgrund des reduktiven Milieus – freigesetzte A-Kette von DT ihre proteininhibierenden Eigenschaften entfalten und cytotoxisch wirken kann. Da die A-Kette trotz der Wärmebehandlung während der Aufreinigung ADP-ribosylierende Aktivität aufweist (siehe Abb. 3-5, Seite 65), wurden die Konstrukte DTA-PEN und DTA-MTS vor dem Cytotoxizitätsassay nicht auf diese Eigenschaft hin überprüft, zumal die Transfersequenzen im Cytosol abgespalten werden und somit keinen Einfluß auf die katalytische Aktivität von DTA nehmen können.

Zur Charakterisierung der cytotoxischen Effekte wurde der FDA-Assay eingesetzt. Von den zu testenden Konstrukten (siehe Abb. 3-10, Seite 71) wurden verschiedene Verdünnungen hergestellt, mit denen HepG2-, TRVb-wt- und TRVb-hTfR-Zellen für 48 h inkubiert wurden. In Abb. 3-14 sind exemplarisch die Ergebnisse von HepG2-Zellen aufgeführt. Kommerziell

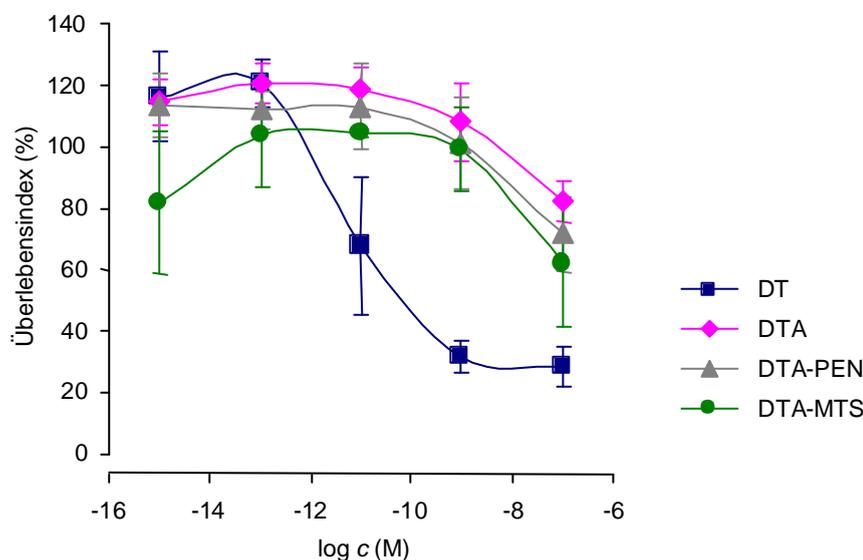


Abb. 3-14: Cytotoxizitätsbestimmung für verschiedene DT-Konstrukte an HepG2-Zellen – Die cytotoxische Aktivität von DTA-PEN und DTA-MTS wurde mittels FDA-Assay bestimmt. 5 000 Zellen / Vertiefung wurden in Endkonzentrationen (c) von 10^{-7} – 10^{-15} M mit den Konstrukten versetzt und für 48 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde gründlich gewaschen und FDA-Lösung zugesetzt. Nach Inkubation im Brutschrank (1 h) wurden die Fluoreszenzsignale (Exzitation 485 nm, Emission 538 nm) gemessen. Die gemittelten Überlebensindizes und deren Standardabweichungen wurden aus mindestens drei Messungen berechnet. Als Kontrolle wurde sowohl kommerziell erworbenes DT als auch gereinigte A-Kette von DT eingesetzt.

erworbenes DT zeigt bei allen untersuchten Zelllinien eine sehr ausgeprägte cytotoxische Aktivität, die sich in einem konzentrationsabhängigen Abfall der berechneten Überlebensindizes zeigt. Der anhand der aufgenommenen Werte abgeschätzte IC_{50} -Wert liegt im Bereich von 10^{-10} M für HepG2-Zellen, wobei bei einer Konzentration von 10^{-7} M immer noch circa 35 % der Zellen überleben. Für die beiden TRVb-Zelllinien liegen die IC_{50} -Werte circa eine Zehnerpotenz niedriger (10^{-11} M) und mindestens 90 % der Zellen werden bereits bei einer Konzentration von 10^{-9} M abgetötet.

Die A-Kette von DT zeigt im Bereich von 10^{-15} – 10^{-9} M keine cytotoxische Aktivität. Erst bei einer Konzentration von 10^{-7} M beobachtet man einen leichten Abfall der Kurve. Ähnlich verhalten sich interessanterweise auch die getesteten Konstrukte mit Transfersequenzen (DTA-PEN und DTA-MTS), alle drei Kurven laufen annähernd parallel.

3.4.3.3 Stabilität der Disulfidgruppe

Da im Cytotoxizitätstest nur eine sehr geringe Aktivität der gekoppelten DTA-Konstrukte nachgewiesen werden konnte, waren folgende Aspekte abzuklären, nämlich, ob nur der kritische Schritt des Membrantransfers nicht effektiv genug war oder ob die Konstrukte gar nicht mehr in einer transferaktiven Form vorlagen. Zur Klärung der zweiten Fragestellung wurden verschiedene Untersuchungen zur Stabilität von DTA-PEN im Zellkulturmedium durchgeführt (Abb. 3-15).

An einem Molekulargewichtsshift erkennt man den Abbau von DTA-PEN (siehe auch Abb. 3-13, Seite 73). Im zellfreien Milieu sind bei Inkubation mit Kulturmedium nach 6 h ungefähr

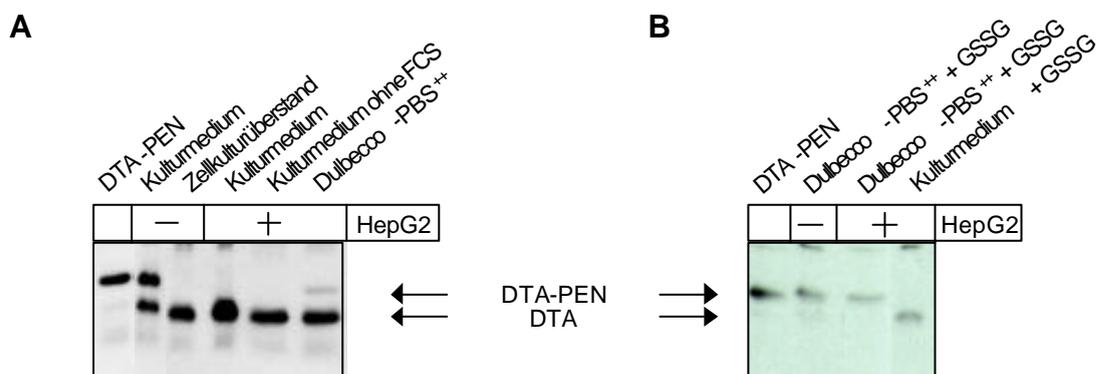


Abb. 3-15: Stabilität der in DTA-PEN enthaltenen Disulfidbrücke – Zur Stabilitätsprüfung wurden in 6-Well-Platten je 3×10^5 HepG2-Zellen pro Vertiefung ausgesät. Nach 16 h wurde das Kulturmedium abgenommen (Zellkulturüberstand), die Zellen gewaschen und DTA-PEN zugesetzt (in Kulturmedium, in Kulturmedium ohne FCS oder in Dulbecco-PBS⁺⁺, 5×10^{-7} M). **A** Zellfrei wurde DTA-PEN entweder mit Kulturmedium oder mit Zellkulturüberstand (siehe oben) versetzt, wobei jeweils für 6 h bei 37 °C inkubiert wurde. **B** Unter Zusatz eines 10^4 -fachen molaren Überschusses an oxidiertem Glutathion (GSSG) wurde DTA-PEN zellfrei mit Dulbecco-PBS⁺⁺ und in der Zellkultur in Dulbecco-PBS⁺⁺ oder Kulturmedium inkubiert (5 h, 37 °C). Alle Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunoblot (Anti-DT / RAG*) sichtbar gemacht. Als Kontrolle wurde jeweils DTA-PEN (0.1 µg) aufgetragen.

die Hälfte der Disulfidgruppen umgesetzt (A, Spur 2), verwendet man Zellkulturüberstand, so ist nach dieser Zeit gar kein Kopplungsprodukt mehr sichtbar (A, Spur 3). Denselben Effekt beobachtet man in Anwesenheit von HepG2-Zellen bei Verwendung von Kulturmedium oder Kulturmedium ohne FCS (A, Spuren 4 und 5). Einzig bei Inkubation der Zellen in Dulbecco-PBS⁺⁺ ist nach 6 h noch ein geringer Prozentsatz Kopplungsprodukt nachweisbar (A, Spur 6).

Wurde ein ähnlicher Versuch in Anwesenheit eines 10⁴fach molaren Überschusses an oxidiertem Glutathion durchgeführt, so konnte die Spaltung von DTA-PEN durch Zellkulturüberstand (also zellfrei) fast vollständig verhindert werden (B, Spur 2). In Anwesenheit von HepG2-Zellen und Inkubation in Dulbecco-PBS⁺⁺ blieb unter Glutathionzusatz über die Hälfte des Kopplungsproduktes intakt, in Kulturmedium kam es jedoch zu einer vollständigen Umsetzung (B, Spuren 3 und 4).

Der Zusatz von oxidiertem Glutathion bietet somit unter geeigneten Bedingungen einen gewissen Schutz vor ungewollter Spaltung, doch ist bei Zellen der potentiell negative Effekt eines so großen Überschusses an oxidiertem Glutathion auf Wachstum und andere Funktionen zu bedenken, welcher hier nicht weiter untersucht wurde.

3.5 Rekombinante Synthese von Toxinfragmenten mit Transfersequenz

Da bei den chemisch gekoppelten Konstrukten bei fehlender Cytotoxizität keine genauen Rückschlüsse auf einen Membrantransfer gezogen werden konnten, bot es sich an, DTA und Transfersequenz direkt rekombinant miteinander zu fusionieren und zu exprimieren. Die so in größerer Menge herstellbaren Konstrukte sollten wegen der fehlenden Spaltstelle nicht abgebaut werden und somit länger die Möglichkeit für einen Transfer bieten. Diese Versuche wurden nur für DTA durchgeführt, da bei PE in früheren Versuchen Probleme mit dem Antikörper und der Reinigung auftraten (siehe Abschnitt 3.3.3, Seite 65). Außerdem ist ein Konstrukt mit DTA für einen späteren Austausch gegen andere Toxine geeigneter, da diese (z. B. Ricin, Abrin, Viscumin oder Shigatoxin) eine identische Anordnung in der Domänenabfolge aufweisen, während ein Austausch gegen PE aufgrund dessen inverser Domänenstruktur (siehe Abb. 1-3, Seite 12) nur unter größerem Aufwand zu realisieren ist. Zusätzlich ist nicht für alle Trojanischen Peptide beschrieben, daß sie sowohl N- als auch C-terminal fusioniert einen Transfer vermitteln.

Für die Klonierung wurde zunächst nur die MTS vorgesehen, da diese im Gegensatz zu PEN in der Lage ist, größere Proteine in Zellen zu transportieren. Für Penetratin sind Transfers für Proteine von maximal 12 kDa beschrieben,² während mit der MTS bereits erfolgreich Proteine bis zu 45 kDa in Zellen geschleust werden konnten.¹

3.5.1 Klonierung von DTA

Die cDNA der A-Kette von Diphtheriatoxin wurde freundlicherweise von Dr. Sjur Olsnes (Institute for Cancer Research, Oslo, Norwegen) in Form des Vektors pKD 52 zur Verfügung gestellt (analog DT-Aminosäuren 2–189, katalytische Domäne). Ariansen *et al.* zeigten, daß das resultierende Fragment nach Assoziation mit der ebenfalls durch *In-vitro*-Translation hergestellten B-Kette von DT einen mit natürlichem DT vergleichbaren IC₅₀-Wert an Vero-Zellen aufweist.¹⁴⁶

Das Expressionsplasmid sollte die Eigenschaften haben, das Zielprotein in größeren Mengen zu produzieren und eine einfache Reinigung zu ermöglichen. Große Mengen an gut löslichem Protein erhält man oft, indem man Fusionsproteine mit z. B. Glutathion-S-Transferase, Thioredoxin oder Maltosebindungsprotein exprimiert. Alle drei Varianten erlauben eine Reinigung über den Fusionsteil, der sich anschließend durch gezielte Proteolyse (Enterokinase, Thrombin) entfernen läßt. Für die vorliegende Arbeit wurde Thioredoxin (TRX, 11.7 kDa) als Fusionspartner ausgewählt, und zwar ein modifiziertes, sogenanntes His-Patch-TRX,¹³² welches durch gezielte Veränderungen eine erhöhte Affinität zu zweiwertigen Metallionen aufweist. Somit bot sich die Möglichkeit einer Reinigung über eine Metallchelator-Affinitätsmatrix an; alternativ waren Reinigungen über eine Thio-Bond-Matrix, die auf der Affinität von redoxsensitiven, vicinalen Disulfidgruppen an Arsen beruht, oder eine Antikörperaffinitätschromatographie mit Anti-Thio-Antikörpern denkbar.

Der Vektor pThioHis, der für die Expression von His-Patch-Fusionsproteinen geeignet ist, liegt in drei unterschiedlichen Leserahmen vor. Für die Klonierung von DTA wurde pThioHis B eingesetzt. Auf diese Weise konnte DTA aus dem erhaltenen Vektor pKD 52 über *Nco* I/*Xho* I im richtigen Leserahmen direkt in das Expressionsplasmid kloniert werden (pJK 4). Im Falle einer Abspaltung des Fusionsanteils durch Enterokinase verbleiben am N-Terminus von DTA zwei zusätzliche Aminosäuren (Val, Pro). In pKD 52 befindet sich hinter dem Stopcodon noch eine Sequenz von circa 270 Basenpaaren, deren Bedeutung unklar ist, die aber aufgrund der gewählten Klonierungsstrategie auch in pJK 4 enthalten ist. Zum Abschluß wurde die Klonierung durch Sequenzierung bestätigt (siehe unten, Abb. 3-16).

3.5.2 Klonierung von DTA-MTS

Zunächst wurde die MTS, die je zwei Restriktionsschnittstellen am 5'- und am 3'-Ende (*Kpn* I/*Nde* I bzw. *Apa* I/*Eco*R I) enthält, in pBluescript II KS kloniert. Dazu wurden zwei komplementäre Oligonukleotide mit überhängenden Enden für die terminalen Schnittstellen kommerziell synthetisiert (MTS for und MTS rev), einzeln mit T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert und abschließend bei Raumtemperatur hybridisiert. Der Vektor pBluescript II KS wurde für die Klonierung mit *Kpn* I und *Eco*R I linearisiert. Die nach der Klonierung erhaltenen Klone wurden über eine vorhandene *Apa* I-Schnittstelle auf Anwesenheit des Inserts geprüft (pBluescript II KS alleine hat diese Schnittstelle nicht) und zur Kontrolle sequenziert (pJK 5).

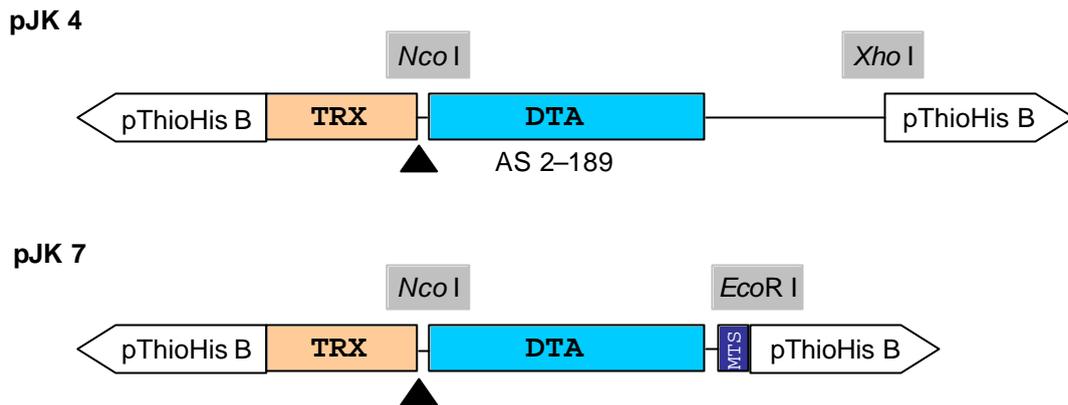


Abb. 3-16: Klonierte DTA-Konstrukte zur Expression – pJK 4 repräsentiert das Expressionsplasmid für DTA, hergestellt durch Klonierung über *Nco* I / *Xho* I aus pKD 52. pJK 7 repräsentiert das Expressionsplasmid für DTA-MTS, wobei zunächst die MTS alleine (pJK 5), dann zusammen mit DTA (pJK 6, PCR aus pJK 4) in pBluescript II KS kloniert wurde. Nach PCR aus pJK 6 (Reverse / MTS *EcoR* S rev; 96 °C, 3 min; [96 °C, 1 min; 60 °C, 1 min 30 s; 72 °C, 2 min] × 25; 72 °C, 5 min; 16 °C) konnte das Produkt über *Nco* I / *EcoR* I in pThioHis B kloniert werden. Die Striche stellen zusätzlich eingefügte Aminosäuren dar, das Dreieck zeigt die Position der im Vektor enthaltenen Enterokinase-schnittstelle.

Zur Klonierung von DTA in pJK 5 wurde zunächst DTA mittels PCR aus pJK 4 mit einer C-terminalen *Nde* I-Schnittstelle amplifiziert (Trx for / DTA *Nde* rev), anschließend über *Kpn* I und *Nde* I inkloniert und zur Kontrolle sequenziert (pJK 6).

Zur späteren Expression wurde dem DTA-MTS-Insert aus pJK 6 in einer weiteren PCR ein C-terminales Stopcodon hinzugefügt (Reverse / MTS *EcoR* S rev), so daß es schließlich über *Nco* I / *EcoR* I in pThioHis B kloniert werden konnte (pJK 7, Abb. 3-16). Wie auch bei pJK 4 wurden durch die Klonierungen – im Falle einer Abspaltung des Fusionsanteils durch Enterokinase – am N-Terminus von DTA zwei (Val, Pro) und zwischen DTA und MTS durch die *Nde* I-Schnittstelle ebenfalls zwei zusätzliche Aminosäuren (His, Ile) eingefügt.

3.5.3 Expression der DTA-MTS-Konstrukte

Da alle Klonierungsansätze standardmäßig in *E. coli* DH5 α transformiert wurden, wurden die Konstrukte pJK 4 und pJK 7 zunächst in diesem Stamm exprimiert. Er ist ebenso wie der TOP 10-Stamm, der vom Hersteller empfohlen wird, rekombinations- (*recA1*) und endonukleasedefizient (*endA1*). In Optimierungsversuchen zeigte sich allerdings (wie auch bei Lu *et al.* beschrieben),¹³² daß ein proteasedefizienter *E. coli*-Stamm zur Expression am geeignetsten ist. In diesem Fall wurden BL21-Zellen verwendet. Es handelt sich dabei um einen *OmpT*-defizienten Stamm, d. h. ihm fehlt die Protease der äußeren Membran in *E. coli*, die zwischen Arg-Arg schneidet (Abb. 3-17).

Bei JK 4 (jeweils Spuren 1–3) sieht man im Coomassiegel eine deutliche, mit Induktion zunehmende Bande zwischen 30 und 40 kDa (DTA 21 kDa, TRX 12 kDa). Im Westernblot

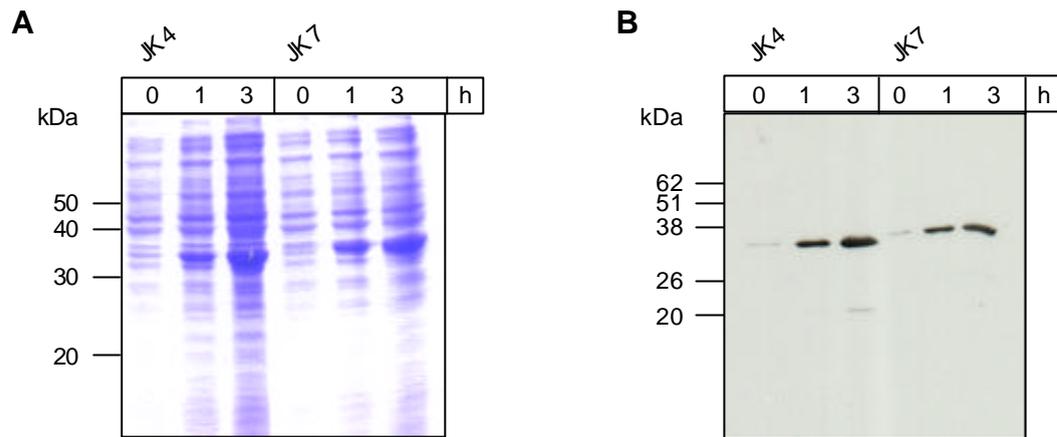


Abb. 3-17: Expression von JK 4 und JK 7 in *E. coli* BL21 – Zur Expression wurden die Konstrukte in BL21-Zellen transformiert. Positive Klone wurden über Nacht in einer Flüssigkultur (4 ml) angezogen, am Morgen 1:25 mit 2YT-Medium verdünnt und bis zu einer OD_{550} von 0.5 bei 37 °C geschüttelt. Nach Abnahme einer Kontrollprobe (1 ml, 0h) wurde mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Weitere Proben wurden nach 1 h und nach 3 h entnommen. Nach Zentrifugation wurden die Pellets in Lysepuffer (je 300 μ l, 50 mM Tris / HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl) resuspendiert, mittels Ultraschall aufgeschlossen und abzentrifugiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung (12%iges Gel) wurden die exprimierten Proteine (jeweils nichtinduziert, 1 h induziert, 3 h induziert) entweder mittels Coomassiefärbung (**A**, 25 μ l Lysat) oder im Immunoblot (**B**, Anti-DT / RAG*, 5 μ l Lysat) sichtbar gemacht.

wird bestätigt, daß es sich dabei um das zu exprimierende DTA-Fusionsprotein handelt. Im Falle von JK 7 (jeweils Spuren 4–6) kann man ein vergleichbares Verhalten beobachten. Auch hier kommt es zu einer Überexpression des Fusionsproteins. Die durch die MTS verursachte höhere Masse kann man in einem geringen Molekulargewichtsshift im Gel erkennen. Im Falle von JK 4 sieht man im Blot nach 3h Induktion eine schwache Bande bei 20 kDa. Es könnte sich hierbei um DTA handeln, welches während der Expression von einer bakteriellen Protease im Bereich der Enterokinaschnittstelle umgesetzt wurde. Um weitere Abbaureaktionen zu verhindern, wurde für die Expression von JK 4 und JK 7 deshalb die Induktionsdauer von 3 h nicht überschritten.

3.5.4 Reinigung rekombinanter DTA-MTS-Konstrukte

3.5.4.1 Reinigung über den TRX-Fusionsanteil

Im Anschluß an die Expression konnten die DTA-Fusionsproteine über die Metallaffinität des veränderten TRX (His-Patch) gereinigt werden. Dabei war zu beachten, daß die Fusionsproteine während der gesamten Aufarbeitung und Reinigung nicht unter denaturierende Bedingungen gelangen durften (Hitze, Detergens), da die His-Patch-Metallaffinität auf der richtigen Lage zweier Histidine zueinander beruht, also auf einer intakten Tertiärstruktur.

Als Affinitätsmatrix wurde Ni-NTA-Agarose verwendet, die Reinigung erfolgte nativ (siehe Abschnitt 2.14.4.2, Seite 49). Abb. 3-18 zeigt das Ergebnis einer solchen Reinigung für JK 4 (Spuren 1–6) und JK 7 (Spuren 8–13).

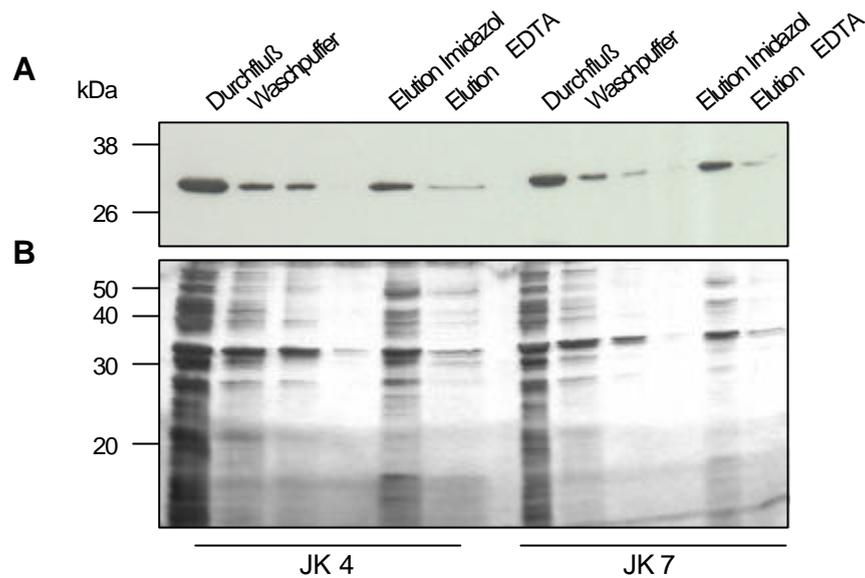


Abb. 3-18: Reinigung von TRX-Fusionsproteinen über Ni-NTA – Die Reinigung wurde im Batch-Verfahren durchgeführt. Die exprimierten Fusionsproteine JK 4 und JK 7 wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und abzentrifugiert. Die Lysate wurden mit der Affinitätsmatrix inkubiert (45 min über Kopf geschüttelt, Raumtemperatur), dann dreimal gewaschen und eluiert (100 mM Imidazol und anschließend 100 mM EDTA). Die Fraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (12%iges Gel) und mittels Immunoblot (**A**, Überstand und Waschfraktion 10 μ l, Elutionsfraktionen 25 μ l) sowie durch Silberfärbung sichtbar gemacht (**B**, 20 μ l pro Fraktion).

In beiden Fällen kann eine Bindung des modifizierten TRX-Anteils an die Affinitätsmatrix nachgewiesen werden (JK 4 bzw. JK 7 befindet sich nicht in der 3. Waschfraktion wohl aber in den Elutionsfraktionen). Allerdings ist diese Bindung nur sehr schwach (Fusionsprotein auch in den Waschfraktionen, Spuren 2–3 und 9–10) und nicht sehr spezifisch für die TRX-Fusionsproteine (Elutionsfraktionen im Silbergel, Spur 5 bzw. 12). Das Bindungs- und Elutionsverhalten ließ sich weder durch veränderte Waschbedingungen noch durch einen langsamen Imidazolgradienten zur Elution optimieren.

3.5.4.2 Reinigung über Anionenaustauschchromatographie

Da die geringe Affinität in der Metallchelatchromatographie nur dem His-Patch-Fusionsteil zugeschrieben werden konnte, wurde von den anderen, möglichen Reinigungsstrategien über diesen Proteinanteil abgesehen. Statt dessen wurde aufgrund eines Übergewichts an sauren Aminosäuren in beiden Fusionsproteinen, JK 4 und JK 7, eine Anionenaustauschchromatographie angestrebt. Mit dieser Methode konnten gute Reinigungseffekte in nur einem einzigen Schritt erzielt werden (Abb. 3-19). Die Bindungskapazität der verwendeten Säule war so hoch, daß mit einem Säulenlauf aus einer Expression von 20 ml circa 30 μ g JK 4 gereinigt werden konnten. JK 7 wurde nicht ganz so rein von der Säule eluiert wie JK 4, lag aber mengenmäßig in einem ähnlichen Bereich vor.

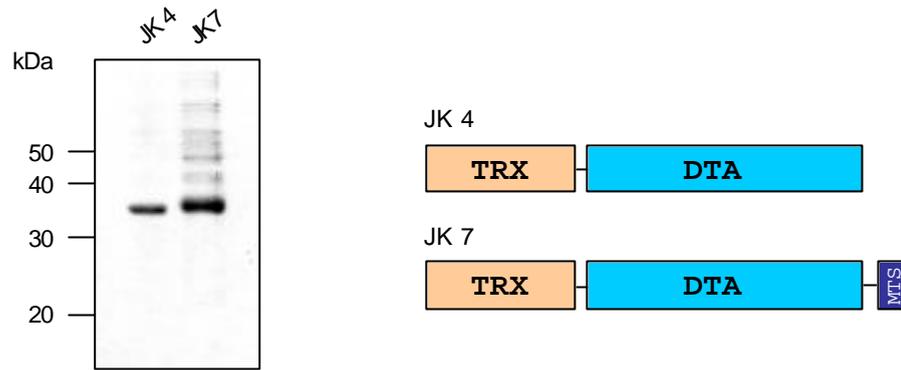


Abb. 3-19: Reinigung von TRX-Fusionsproteinen mittels Anionenaustauschchromatographie – Die exprimierten Fusionsproteine JK 4 und JK 7 wurden in PBS mittels Ultraschall aufgeschlossen und anschließend über eine Mono Q-Säule gereinigt (siehe Abschnitt 2.14.2, Seite 48). Unter Anwendung eines NaCl-Gradienten eluierten beide Proteine bei circa 25–30 mS/cm. Die Hauptelutionsfraktionen (je 10 μ l) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (12%iges Gel) und in einer Coomassiefärbung sichtbar gemacht.

3.5.4.3 Abspaltung des TRX-Fusionsanteils

In dem Vektor pThioHis B ist am C-Terminus des TRX-Moleküls eine Enterokinaseschnittstelle integriert (Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, siehe Abb. 3-16, Seite 78), über deren Spaltung der Fusionsanteil abgetrennt werden kann. Die durch Anionenaustauschchromatographie teilgereinigten Fraktionen wurden nach der Methode von Lu *et al.*¹³² mit rekombinanter Enterokinase umgesetzt (Abb. 3-20).

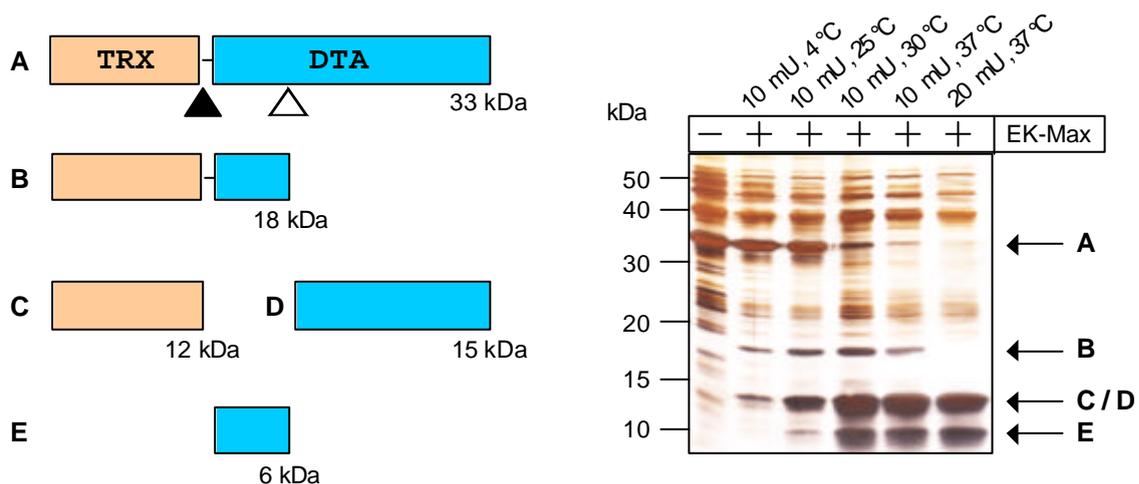


Abb. 3-20: Enterokinasespaltung von JK 4 – Das Fusionsprotein JK 4 (nach Mono Q-Säule, dialysiert gegen EK-Puffer (siehe Abschnitt 2.16.4, Seite 58), circa 1 μ g pro Ansatz) wurde mit verschiedenen Mengen Enterokinase (EK-Max) versetzt und bei unterschiedlichen Temperaturen für 16 h inkubiert. Die Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (12%iges Gel) und mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Schematisch dargestellt sind potentielle Spaltprodukte von JK 4. Das schwarz ausgefüllte Dreieck zeigt die Enterokinaseschnittstelle, das nichtausgefüllte Dreieck zeigt die Position einer ähnlichen Sequenz in DTA.

Erwartet wurde, daß nach Zugabe von Enterokinase je eine Bande bei 21 kDa (DTA) und bei 12 kDa (TRX) auftritt. Bei den unterschiedlich gewählten Spaltungsbedingungen (Spuren 2–6) sieht man zwar tatsächlich eine Abnahme des Fusionsproteins JK 4 (A, bei 33 kDa), doch tauchen Abbaufragmente in anderen Molekulargewichtsbereichen als erwartet auf. Ein Fragment liegt im Bereich zwischen 15 und 20 kDa (B), ein weiteres zwischen 10 und 15 kDa (C/D) und ein drittes bei weniger als 10 kDa (E). Nach Erscheinen dieses unerwarteten Musters wurde die Sequenz von DTA auf eine Homologie zur Enterokinaseschnittstelle hin untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß die Aminosäuren 47–51 mit der Sequenz Asp-Asp-Asp-Trp-Lys der Konsensussequenz von Enterokinase sehr ähnlich sind. Die möglichen Spaltfragmente aufgrund beider potentieller Schnittstellen sind im linken Teil von Abb. 3-20 dargestellt. Vergleicht man diese mit dem tatsächlich erhaltenen Fragmentmuster, so erscheint eine Spaltung der Sequenz aus DTA sogar begünstigt gegenüber der Enterokinaseschnittstelle aus dem Vektor. Eine Detektion der Abbaufragmente gelang weder mit einem Anti-DT- noch mit einem Anti-Thio-Antikörper, weshalb für die Darstellung eine Silberfärbung gewählt wurde. Die zahlreichen Nebenbanden sind durch die Verwendung anderer Elutionsfraktionen als der in Abb. 3-19 gezeigten bedingt.

3.5.5 Funktionsanalyse von rekombinanten DTA-MTS-Konstrukten

Auch wenn eine Abspaltung des TRX-Fusionsteils nicht erreicht werden konnte, so sollten die Konstrukte dennoch auf ihre Funktion hin untersucht werden. Nachdem im FDA-Assay keine cytotoxische Wirkung nachgewiesen werden konnte, lag besonderes Interesse auf dem Nachweis der zellulären Lokalisation der Proteine nach Inkubation mit HepG2-Zellen. Da sich beide DT-Antikörper (Anti-DT und Mab DTA) für diese Applikation als nicht sensitiv genug erwiesen, wurden die nach Mono Q-Reinigung erhaltenen JK 4- und JK 7-Fractionen zunächst biotinyliert.

3.5.5.1 Nachweis von DTA-MTS-Konstrukten im Zellsolubilisat

Dadurch, daß keine Spaltstelle (Disulfidbrücke) im Molekül vorhanden ist, konnten die Konstrukte ohne Bedenken über eine längere Zeit mit den Zellen inkubiert werden. Ein möglicher Transfer ist zwar grundsätzlich schon nach etwa 30 min feststellbar, nimmt aber mit der Zeit zu.¹ Deshalb wurde eine Inkubationsdauer von 7 h gewählt. Zur Untersuchung, ob die Konstrukte von HepG2-Zellen aufgenommen werden oder zumindest an diese binden, wurde zunächst ein Nachweis im Zellsolubilisat durchgeführt.

Abb. 3-21 zeigt, daß JK 4 und JK 7 gleichermaßen biotinyliert wurden (Spuren 1 und 4), wobei die zahlreichen Begleitbanden bei JK 7 auf den geringeren Reinheitsgrad der Elutionsfraktionen der Anionenaustauschchromatographie zurückzuführen sind. Während in den Überständen (Spuren 2 und 5) vergleichbare Bandenmuster wie vor der Inkubation zu

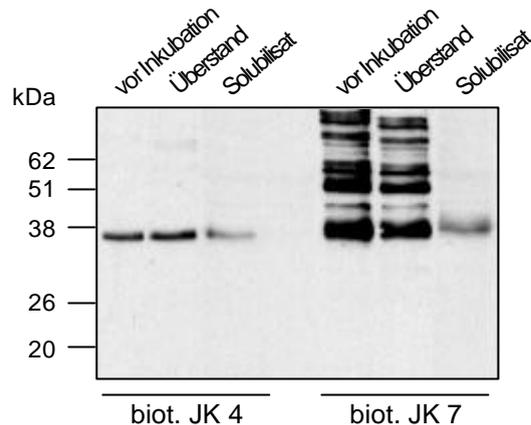


Abb. 3-21: HepG2-Zellsolubilisate nach Inkubation mit DTA- und DTA-MTS-Konstrukten – Die mittels einer Mono Q-Anionenaustauschchromatographie gereinigten Lysate von JK 4 und JK 7 wurden mit einem 50fachen molarem Überschuß an Sulfo-NHS-LC-Biotin inkubiert (3 h über Kopf geschüttelt, Raumtemperatur) und zur Abtrennung von überschüssigem Biotinylierungsreagens dialysiert. Anschließend wurden HepG2-Zellen (5×10^5 Zellen pro 6Well) mit biotinyliertem JK 4 und JK 7 (Endkonzentration jeweils $0.1 \mu\text{M}$) versetzt und für 7 h im Brutschrank unter gelegentlichem Schwenken des Überstandes inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen sorgfältig mit Dulbecco-PBS⁺⁺ gewaschen, in Solubilisierungspuffer abgeschabt und solubilisiert (150 μl /Vertiefung, über Kopf bei 4°C für 16 h inkubiert, abzentrifugiert 20 min, $20\,000 \times g$). Die biotinylierten Fusionsproteine (vor Inkubation, 10 μl), die Zellkulturüberstände nach 7 h Inkubation (20 μl) und die Solubilisate (Überstände nach Zentrifugation, 30 μl) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (12%iges Gel) und mittels Immunoblot (Anti-Biotin / RAG*) detektiert. Eine Inkubation der Zellen mit Dulbecco-PBS⁺⁺ zeigte kein Signal.

beobachtet sind, ist sowohl bei JK 4 (Spur 3) als auch bei JK 7 (Spur 6) im Solubilisat nur eine Bande in Höhe der entsprechenden TRX-Fusionsproteine zu erkennen. Die einzelne Bande bei JK 7 zeigt, daß dieses MTS-enhaltende Fusionsprotein anders als die vorhandenen Begleitproteine mit HepG2-Zellen wechselwirkt. Jedoch dürfte dieses Verhalten eher auf den TRX- oder den DTA-Anteil zurückzuführen sein, da auch JK 4 eine Bande im Solubilisat aufweist.

3.5.5.2 Nachweis von DTA-MTS-Konstrukten in unterschiedlichen Zellfraktionen

Aus dem Vorhandensein beider Konstrukte (JK 4 ohne und JK 7 mit MTS) im Solubilisat konnte nicht unbedingt darauf geschlossen werden, daß kein Membrantransfer stattgefunden hatte. Es besteht nämlich die Möglichkeit, daß nur die Verteilung der Konstrukte in der Zelle unterschiedlich ist, daß z. B. JK 4 mit der Membran assoziiert ist während JK 7 ins Cytosol gelangt. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden HepG2-Zellen mit JK 4 und JK 7 inkubiert und anschließend verschiedenen Methoden der Zellfraktionierung unterzogen (siehe Abschnitt 2.11.7, Seite 33 und Abb. 3-22).

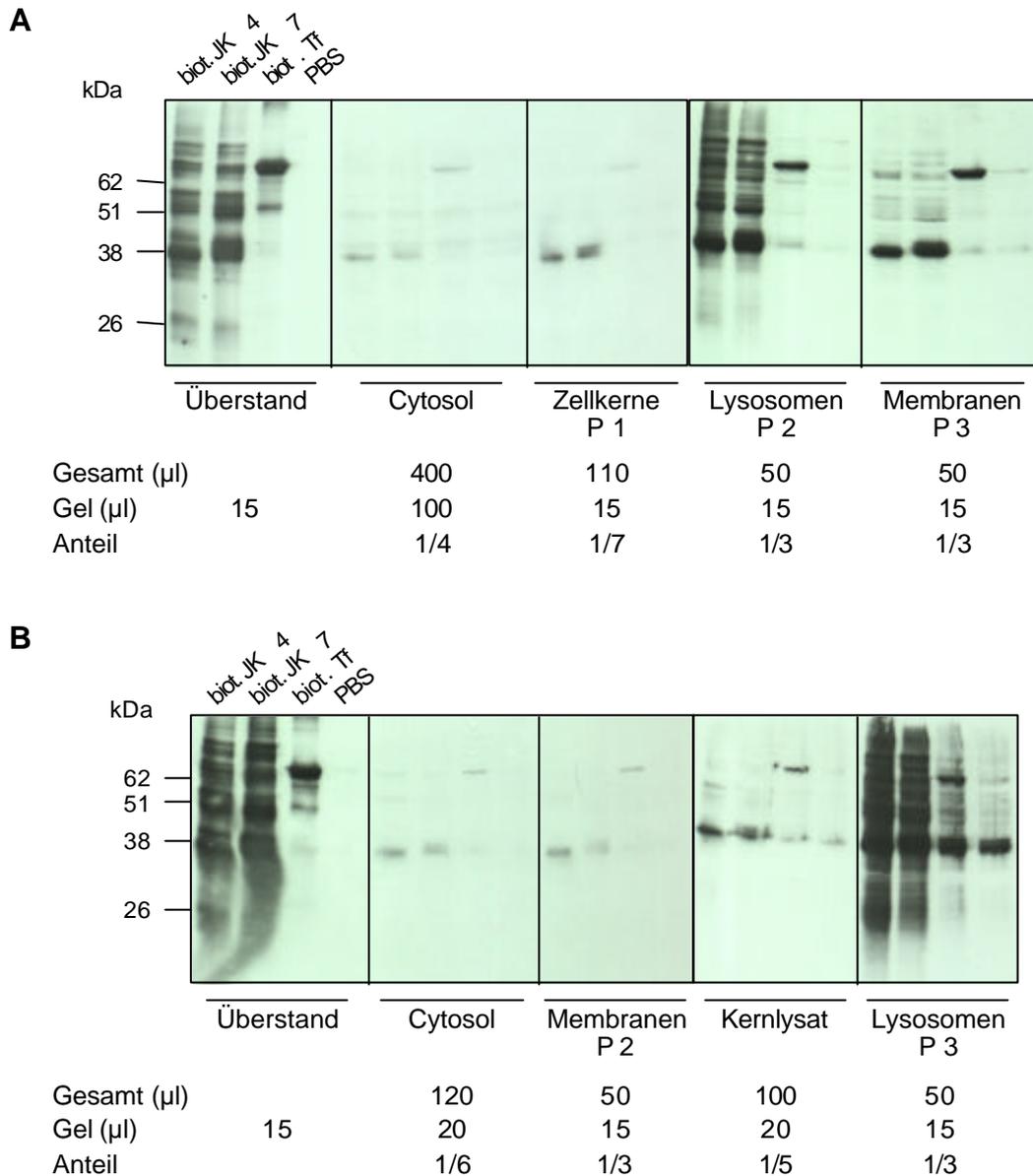


Abb. 3-22: HepG2-Zellfraktionierung nach Inkubation mit DTA- und DTA-MTS-Konstrukten – HepG2-Zellen wurden ausgesät und mit biotinyliertem JK 4, JK 7, Tf oder Dulbecco-PBS⁺⁺ inkubiert (für 4,5–6 h, 37 °C). Biotinyliertes Tf diente anhand seiner Verteilung als Kontrolle für die verschiedenen Zentrifugationsschritte während der Fraktionierung. Anschließend wurden verschiedene Anteile der erhaltenen Zellfraktionen gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Anti-Biotin / RAG* im Immunoblot detektiert (immer JK 4, JK 7, Tf, PBS). **A** Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation; circa 2×10^6 Zellen wurden für 4,5 h mit den Konstrukten inkubiert, gewaschen, in Fraktionierungspuffer resuspendiert und per *Douncing* homogenisiert. Die Pellets P1, P2 und P3 wurden jeweils in PBS T_x solubilisiert. Die Cytosolfraktion wurde vor dem Auftrag mittels Acetonfällung konzentriert. **B** Zellfraktionierung nach Dignam; circa 1×10^5 Zellen wurden für 6h mit den Konstrukten inkubiert, gewaschen und in Dignam A-Puffer homogenisiert (Inkubation 16 h, 4 °C). Aus P 1 wurde durch Zugabe von Dignam C-Puffer Kernlysate hergestellt, P 2 und P 3 wurden jeweils in PBS T_x solubilisiert.

Betrachtet man zunächst die Verteilung von biotinyliertem Tf (jeweils die 3. Spur), so findet es sich in Teil A der Abbildung überwiegend in den Pellets P 2 und P 3 wieder, was einer Lokalisation in der Membran und in den leichten Organellen entspricht. In Teil B befindet sich biotinyliertes Tf vorwiegend in der Fraktion der leichten Organellen (P 3). In beiden Fällen stimmt die Verteilung mit der Erwartung überein, da Tf an den Tf-Rezeptor bindet und sich daher wie ein membranständiger, endocytoseaktiver Rezeptor verhält.

Für die Konstrukte läßt sich in beiden Fällen vor allem eine Anhäufung in der Fraktion der leichten Organellen beobachten (in A: P 2, in B: P 3). Nach differentieller Zentrifugation (A) läßt sich ebenfalls ein beachtlicher Teil der Konstrukte in der Membran wiederfinden (P 3). Jedoch zeigt sich in beiden Fällen – ähnlich wie bei den entsprechenden Zellsolubilisaten – kein mengenmäßiger Unterschied zwischen JK 4 ohne MTS und JK 7 mit MTS. Zu vermuten ist, daß der nicht entfernte TRX-Fusionsteil einen negativen Einfluß auf die Funktion der Proteine hat und somit einen MTS-bedingten Transfer direkt durch die Cytoplasmamembran verhindert.

3.6 Klonierung, Expression und Reinigung von Adaptertoxinen

Mit der direkten Fusion der toxischen Domäne von DTA und der Transfersequenz MTS konnte – vermutlich durch den nicht entfernten TRX-Anteil im exprimierten Protein – ein Membrantransfer nicht klar gezeigt werden. Mit solchen Konstrukten wäre aber ohnehin nur ein Transfer durch die Zellmembran nachweisbar gewesen. Zwar kann man durch Absenken des pH-Wertes im Zellkulturmedium endosomale Verhältnisse nachahmen, so daß z. B. die A-Kette von Diphtheriatoxin direkt von der Zelloberfläche ins Cytosol gelangen kann,⁴² doch kämen diese artifiziellen Bedingungen für einen Einsatz *in vivo* nicht in Betracht. Daher wurden im folgenden Konstrukte hergestellt, die einen gerichteten Transport von den Endosomen ins Cytosol bewirken.

Dazu wurden zwei funktionelle Gruppen benötigt, die zusammen mit der Transfersequenz einen Adapter bilden (siehe Abb. 1-8, Seite 23): erstens eine cytosolisch spaltbare Sequenz (CCU) und zweitens eine endosomal spaltbare Sequenz (ECU). Da weiterhin die rekombinante Synthese als rationeller und damit vorteilhafter angesehen wurde, mußten beide funktionellen Gruppen peptidischen Ursprungs sein. Es wurde mit und ohne einen *Tag* gearbeitet, um einerseits die Möglichkeiten einer anschließenden Reinigung zu vergrößern und andererseits den Einfluß des *Tag* auf die Proteinfunktion überprüfen zu können. Allerdings sollte der *Tag* am Molekül verbleiben können, um Abspaltungsprobleme zu verhindern. Dazu bot sich ein 6 × His-*Tag* an, für den eine N-terminale Lokalisation vorgesehen wurde. Dies ermöglichte das Einfügen eines Cysteinrestes am C-Terminus, über den der tumorzell-spezifische Ligand entweder direkt oder über einen pH-labilen Crosslinker (Spaltung im Endosom, also additiv zur peptidischen Sequenz) gekoppelt werden könnte.

3.6.1 Klonierung von DTA-MTS-Adaptertoxinen

Da DTA-MTS als Insert bereits im Vektor pJK 6 vorlag (siehe Abschnitt 3.5.2, Seite 77), wurde zunächst aus diesem ein Adaptertoxin kloniert. Begonnen wurde mit der Klonierung der endosomal spaltbaren Sequenz, die die natürlichen Spaltsequenzen der proteasesensitiven Bereiche von PE und DT enthält (ESP = endosomal spaltbares Peptid, RHRQPRGNRVRRS, siehe Abschnitt 7.2, Seite 148). Außerdem ist in ihr eine weitere Restriktionsschnittstelle für *Sma* I und *Xma* I enthalten, über die ein tumorspezifischer Ligand auch direkt fusioniert werden kann. Am 3'-Ende befinden sich ein Cystein und zwei Stop-Codons. Das ESP wurde in Form von zwei komplementären Oligonukleotiden passend zu pJK 6 mit Überhängen für eine *Apa* I- und eine *Eco*R I-Schnittstelle kommerziell synthetisiert (ESP for/ESP rev), anschließend phosphoryliert und schließlich hybridisiert. Der Vektor pJK 6 wurde mittels Restriktionsverdau mit *Apa* I und *Eco*R I für die Ligation vorbereitet. Die Kontrolle der Ligation erfolgte durch Kolonie-PCR mit den Primern T 7 und DTA-265 for (Abb. 3-23). Von den im Agarosegel gezeigten, getesteten Klonen beinhalten zwei die ESP, nämlich die, bei denen ein größeres PCR-Fragment zu sehen ist (Spuren sind mit einem Stern gekennzeichnet). Von diesen Klonen wurde Plasmid-DNA präpariert, die zur Kontrolle sequenziert wurde (pJK 8).

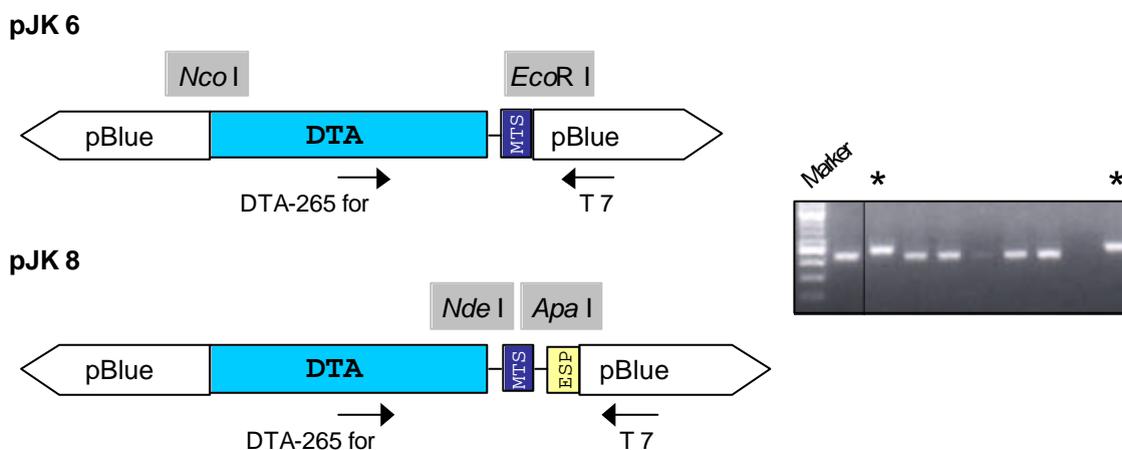


Abb. 3-23: Kolonie-PCR zur Kontrolle der Klonierung ESP in pJK 6 – Der Vektor pJK 8 wurde aus pJK 6 wie folgt kloniert: Die Oligonukleotide ESP for und ESP rev wurden einzeln phosphoryliert (2 h, 37 °C) und nach Inaktivierung der Kinase (15 min, 72 °C) hybridisiert (Abkühlprogramm siehe Abschnitt 2.15.11.2, Seite 55). pJK 6 wurde zunächst mit *Apa* I (2 h, 25 °C), dann mit *Eco*R I (2 h, 37 °C) geschnitten, per Gelextraktion gereinigt und mit dem hybridisierten ESP ligiert (16 h, 14 °C). Anschließend wurde in kompetente *E. coli* DH5 α transformiert. Als Ligationskontrolle wurde eine Kolonie-PCR mit den Primern T 7 / DTA-265 for durchgeführt (Temperaturcyclus: 96 °C, 5 min; [96 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 2 min] \times 35; 72 °C, 2 min; 16 °C). Die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Ansätze der getesteten Klone sind rechts gezeigt (2%iges Agarosegel), auf der linken Seite sind die Vektoren pJK 6 und pJK 8 dargestellt. Die Pfeile zeigen die Lage der für die Kolonie-PCR verwendeten Primer und somit die Größe des zu erwartenden PCR-Produktes an. Die Bezeichnung pBlue steht für pBluescript II KS.

Für die Klonierung der cytosolisch spaltbaren Sequenz (CSP = cytosolisch spaltbares Peptid, YVHDEVDRGP, siehe Abschnitt 7.2, Seite 148), die unter anderem Erkennungsmotive für die Caspasen 1 und 3 enthält, stand in pJK 6 und pJK 8 nur noch eine *Nde* I-Schnittstelle (3'-Ende DTA, 5'-Ende MTS) zur Verfügung. Mit einer Klonierungsstrategie vergleichbar der für das ESP erwies sich der Einbau des CSP über diese eine Schnittstelle als schwierig. Außerdem war darauf zu achten, daß die einzelnen Komponenten des Adaptertoxins stets getrennt voneinander auswechselbar bleiben. Da dies im Falle eines Austausches der Toxindomäne bei einer solitären *Nde* I-Schnittstelle nicht gewährleistet werden konnte, wurde von Herrn Iring Heisler (Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, UKBF, FU-Berlin) ein CSP mit einer *Nhe* I- und einer *Nde* I-Schnittstelle (5'- bzw. 3'-Ende) in ein entsprechendes Toxinkonstrukt kloniert (pIH, Abb. 3-24).

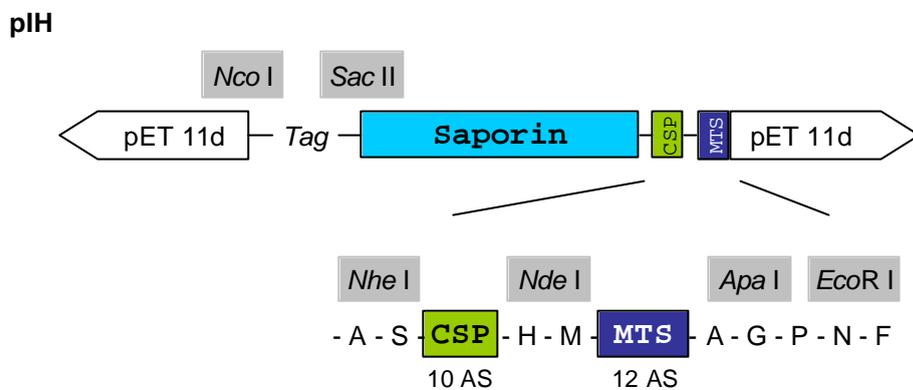


Abb. 3-24: Toxinkonstrukt pIH mit CSP – Dieses Konstrukt wurde freundlicherweise von Herrn Iring Heisler (Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, UKBF, FU-Berlin) zur Verfügung gestellt. Zwischen eine *Nco* I- und *Nhe* I-Schnittstelle ist ein 6× His-Tag und die Toxinkomponente (Saporin) kloniert, zwischen *Nhe* I und *Nde* I befindet sich das CSP, dem sich die MTS mit einer *Apa* I- und einer *EcoR* I-Schnittstelle anschließt. Das gesamte Konstrukt befindet sich in dem zur Expression geeigneten Vektor pET 11d; die Ausschnittsvergrößerung zeigt die durch die Klonierung zusätzlich eingebrachten Aminosäuren im 1-Buchstabencode (siehe Abschnitt 7.3.2, Seite 149).

Das Toxinkonstrukt pIH diente zur vollständigen Klonierung des Adapters. Aus pJK 8 wurde mit Hilfe einer PCR ein DNA-Abschnitt amplifiziert, der sowohl MTS und als auch ESP enthielt. Nach Gelextraktion wurde das Fragment mit *Nde* I und *EcoR* I verdaut und in den ebenso aufgeschnittenen Vektor pIH kloniert, um das ESP einzufügen. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Kolonie-PCR kontrolliert. Von positiven Klonen wurde Plasmid-DNA präpariert und sequenziert. Das resultierende Plasmid pJK 9 im Vektor pET 11d setzt sich zusammen aus Tag, Toxin (Saporin), CSP, MTS und ESP (Abb. 3-25).

Zur Fertigstellung der vollständigen DTA-Konstrukte mußte in einem letzten Schritt der Toxinanteil in pJK 9 durch die A-Kette von DT ersetzt werden. Für ein Konstrukt ohne 6 × His-Tag wurde DTA aus pJK 6 mit einer *Nhe* I-Schnittstelle am 3'-Ende amplifiziert und über *Nco* I/*Nhe* I inkloniert (pJK 10). Ein 6 × His-Tag am 5'-Ende von DTA wurde mit Hilfe von entsprechenden Primern (DTA *Nhe* rev/*Nco* H DTA for) durch Amplifikation aus pJK 6 und Klonierung über *Nco* I/*Nhe* I eingefügt (pJK 11). In beiden Fällen wurde die

Klonierung mittels einer Kolonie-PCR mit einem DTA- und einem vektorspezifischen Primer überprüft, positive Klone wurden zusätzlich sequenziert. In Abb. 3-25 sind die vollständigen, in pET 11d klonierten DTA-Adapterkonstrukte dargestellt.

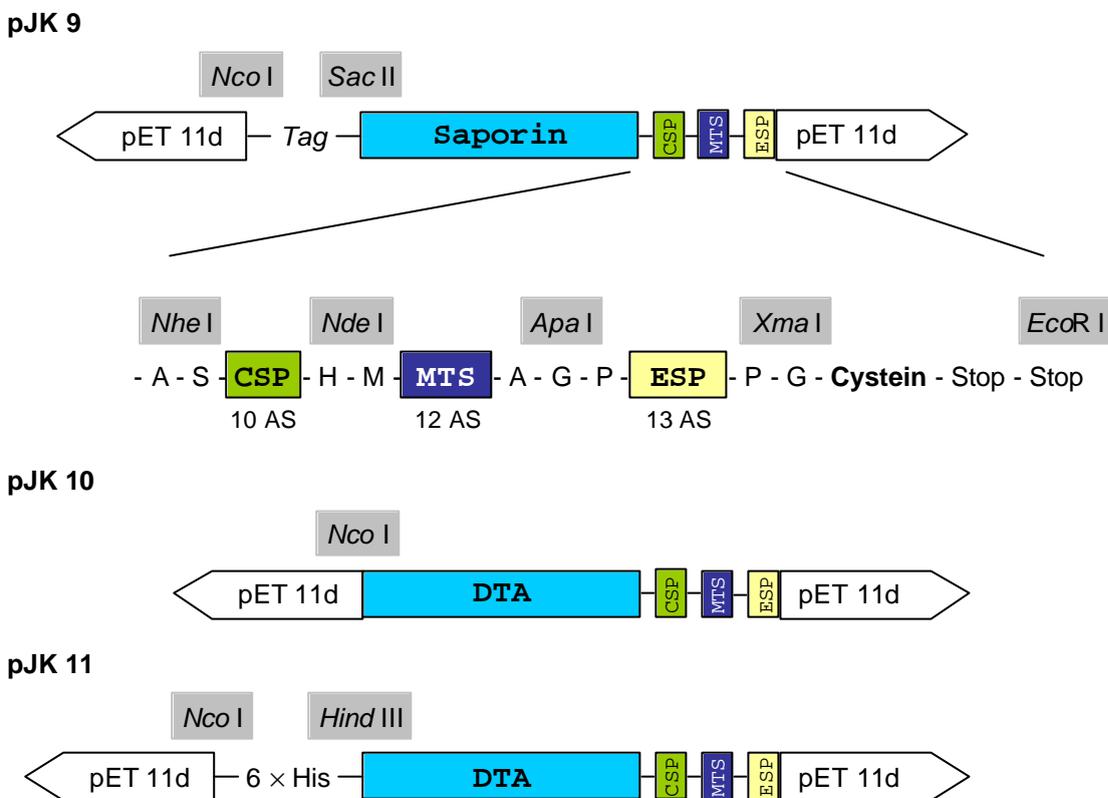


Abb. 3-25: pJK 9 und klonierte DTA-Adapterkonstrukte mit MTS – Für die Klonierung von pJK 9 (ESP in pIH) wurde zunächst aus pJK 8 ein DNA-Abschnitt mit MTS und ESP amplifiziert (T 7 / DTA-265 for, siehe Abb. 3-23, Temperaturcyclus: 96 °C, 3min; [96 °C, 1min; 60 °C, 30 s; 72 °C, 1min] × 25; 72 °C, 5min; 16 °C) und mittels Gelextraktion gereinigt. Nach Verdau mit *Nde* I und *EcoR* I (2 h, 37 °C, anschließend Enzyminaktivierung 20 min, 65 °C) erfolgte die Klonierung in den ebenso geschnittenen Vektor pIH. Für die Klonierung von pJK 10 wurde DTA mit einer *Nhe* I-Schnittstelle am 3'-Ende aus pJK 6 amplifiziert (Pwo-Polymerase, Reverse / DTA *Nhe* rev, Temperaturcyclus: 96 °C, 3min; [96 °C, 1min; 65 °C, 1min 30 s; 72 °C, 2min] × 25; 72 °C, 5min; 16 °C). Das PCR-Produkt wurde mittels GeneClean gereinigt und mit *Nhe* I und *Nco* I verdaut (2 h, 37 °C, anschließend Enzyminaktivierung 20 min, 65 °C). Der Vektor pJK 9 wurde ebenfalls mit *Nhe* I / *Nco* I verdaut. Um eine Reinigung zu umgehen, wurde diesem Verdau *Hind* III zugefügt, welches innerhalb des Saporinbereiches schneidet (2 h, 37 °C, anschließend Enzyminaktivierung 20 min, 65 °C). In der anschließenden Ligation wurde bevorzugt DTA eingebaut, da eine Religation aus drei Teilen seltener vorkommt. Für die Klonierung von pJK 11 wurde ebenfalls eine PCR aus pJK 6 durchgeführt, allerdings unter Verwendung von Taq-Polymerase. Durch entsprechende Primer konnte so am 5'-Ende von DTA ein 6 × His-Tag mit einer *Nco* I- und einer *Hind* III-Schnittstelle eingefügt werden (*Nco* H DTA for / DTA *Nhe* rev, Temperaturcyclus siehe Pwo-PCR). Die folgenden Schritte wurden analog zu denen der Klonierung von pJK 10 durchgeführt. Die Abbildung zeigt das Saporinkonstrukt pJK 9 und die beiden klonierten DTA-Adapterkonstrukte pJK 10 und pJK 11, wobei für pJK 9 die Adapterregion vergrößert dargestellt ist. Bei pJK 10 und pJK 11 schließt sich die aufgeführte Sequenz unmittelbar an Asparagin-189 von DTA an. Die durch die Schnittstellen zusätzlich eingefügten Aminosäuren sind im 1-Buchstabencode dargestellt (siehe Abschnitt 7.3.2, Seite 149 und Abschnitt 7.2, Seite 148).

3.6.2 Klonierung weiterer DTA-Adaptertoxine

Eine der Hauptvoraussetzungen für die Funktionsweise von vollständigen Immunoadaptertoxinen ist ein effizienter Membrantransfer. Unter Annahme einer Spaltung des ESP (wegen der enthaltenen natürlich vorkommenden Sequenzen) ist somit die Testung verschiedener Transfersequenzen ein wichtiger Schritt zur Entwicklung eines optimalen Konstruktes. Deshalb wurde die Transfersequenz von Rojas *et al.* (MTS) im folgenden entweder durch Penetratin (PEN) oder durch ein sogenanntes TLM ersetzt.³ Bei letzterem handelt es sich bei um das Translokationsmotiv der PreS2-Domäne von Oberflächenantigenen des *Hepatitis-B-Virus* (siehe Tab. 1-3, Seite 20, Sequenzen aller verwendeten Transferpeptide siehe Abschnitt 7.2, Seite 148).

Für die Klonierung der beiden Transfersequenzen PEN und TLM wurde eine etwas andere Strategie als für die Klonierung von MTS und ESP verfolgt. Da die zur späteren Hybridisierung einzeln bestellten, verhältnismäßig langen Oligonukleotide oft sehr fehlerhaft waren, wurden in diesem Falle solche Oligonukleotide bestellt, die als Primer für eine PCR verwendet werden konnten. Da eine Klonierung über *Apa I* am 3'-Ende der MTS wegen eines weiteren Vorkommens dieser Schnittstelle im Vektor pET 11d nicht empfehlenswert war, wurde über die *Nde I*-Schnittstelle am 5'-Ende der MTS kloniert. Dazu wurde mit entsprechenden Oligonukleotiden für PEN und TLM (*Nde I* PEN ESP for, *Nde I* TLM ESP for) und einem Vektorprimer (pET 11d-200 rev) eine PCR durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend, wie auch der Vektor, *Nde I*/*EcoR I* verdaut und ligiert. Unter Verwendung von pJK 10 als Vektor konnten Adaptertoxine ohne *Tag*, unter Verwendung von pJK 11 solche mit *Tag* kloniert werden (pJK 12–15, Abb. 3-26).

Wegen der großen Mengen RNA in den DNA-Präparationen von Plasmiden mit pET 11d-Ursprung erwies sich eine Sequenzierung bereits bei pJK 10 und pJK 11 als problematisch (siehe oben). Dennoch mußten die Sequenzen wegen der durchgeführten PCR bestätigt werden. Dazu wurden die vollständigen Inserts über die Restriktionsschnittstellen *Nco I*/*EcoR I* in den Klonierungsvektor pLitmus 28 umklontiert, der beide Schnittstellen innerhalb seiner *Multiple Cloning Site* trägt. Dieser Schritt eröffnete die Möglichkeit einer DNA-Präparation mit geringer RNA-Verunreinigung und zusätzlich höherer Ausbeute. Auf diese Weise konnten die Sequenzen von pJK 12–15 bestätigt werden. Als zusätzliche Kontrolle für pJK 10 und pJK 11 wurde nachträglich ebenfalls eine derartige Klonierung mit anschließender Sequenzierung durchgeführt. Die resultierenden Plasmide in pLitmus 28 sind durch ein zusätzliches „L“ gekennzeichnet (pJK 10L–pJK 15L).

3.6.3 Klonierung der DTA-Kontrollen

Im Falle einer Expression der Konstrukte pJK 10–15 ist eine Kontrolle in Form der enzymatisch aktiven A-Kette alleine für die funktionelle Charakterisierung unerlässlich. Durch diese Kontrolle ist man in der Lage, den Einfluß des Adapters auf die enzymatische Aktivität im

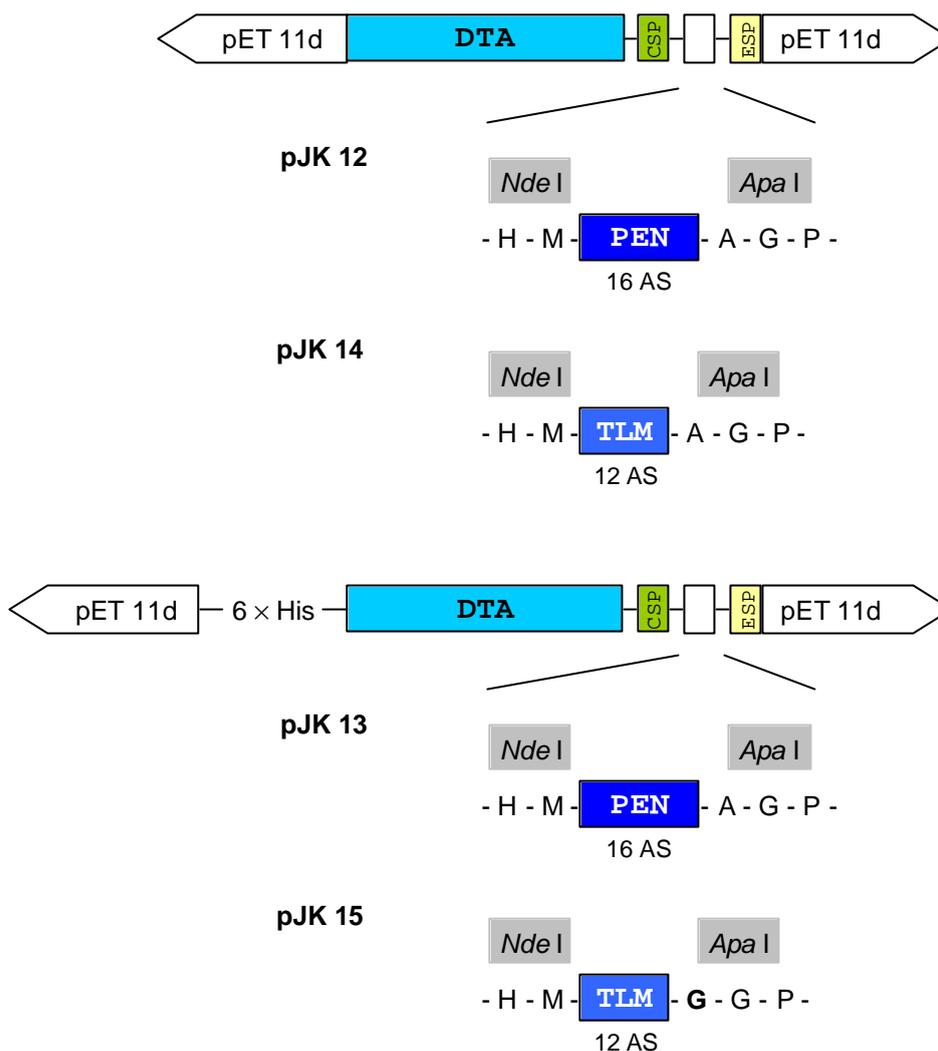


Abb. 3-26: Adaptertoxine mit den Transfersequenzen PEN und TLM in pET 11d – Zur Klonierung der Transfersequenzen PEN und TLM wurden PCRs mit den spezifischen Primern Nde PEN ESP for bzw. Nde TLM ESP for und dem Vektorprimer pET 11d-200 rev durchgeführt (Pwo-Polymerase, Temperaturecyclus: 96 °C, 3 min; [96 °C, 1 min; 68 °C, 1 min 30 s; 72 °C, 2 min] × 25; 72 °C, 5 min; 16 °C, Template pJK 10). Nach Reinigung mittels GeneClean wurden die PCR-Produkte sequentiell mit *Nde* I (2 h) und *Eco*R I (1 h) verdaut und die Enzyme anschließend hitzeinaktiviert (20 min, 65 °C). Als Vektoren dienten pJK 10 und pJK 11, die vor der Ligation ebenfalls mit *Nde* I / *Eco*R I verdaut und per Gelextraktion gereinigt wurden. Dargestellt sind die aus den Klonierungen resultierenden Plasmide. pJK 12 und pJK 14 stammen aus der Klonierung in pJK 10 ohne *Tag*, pJK 13 und pJK 15 stammen ab von pJK 11 mit 6× His-*Tag*. In den Ausschnittsvergrößerungen sieht man die durch die Klonierung eingebrachten Aminosäuren (siehe Abschnitt 7.3.2, Seite 149 und Abschnitt 7.2, Seite 148). Hierbei ist bei JK 15 das Glycin gegenüber dem sonst immer vorkommenden Alanin am C-Terminus der TLM zu beachten.

zellfreien Milieu und in der Zellkultur zu untersuchen. Gekauftes, vollständiges DT stellt in beiden Fällen die Positivkontrolle dar.

Für die Klonierung von DTA wurden mittels entsprechender Primer (Reverse / DTA *Eco*R S rev (ohne *Tag*) bzw. *Nco* H DTA for / DTA *Eco*R S rev (mit *Tag*)) aus dem Template pJK 6 solche DNA-Stücke amplifiziert, die an ihrem 3'-Ende zwei Stop-Codons und eine *Eco*R I-

Schnittstelle aufweisen. Nach Restriktionsverdau mit *Nco* I und *Eco*R I wurden diese in den ebenso verdauten Vektor pJK 10 ligiert (pJK 16 und pJK 17, Abb. 3-27).

Der Erfolg der Ligation wurde durch Restriktionsverdau überprüft. Die Inserts von positiven Klonen wurden über *Nco* I/*Eco*R I in pLitmus 28 kloniert und zur Kontrolle sequenziert (pJK 16L und pJK 17L).

3.6.4 Expression der Adaptertoxine

Die Serie der pET-Vektoren stellt ein bakterielles Expressionssystem dar, welches unter der Kontrolle des T7-Promotors und des Laktose-Operons steht. In speziellen *E. coli*-Stämmen mit der Zusatzbezeichnung „DE3“ ist das T7 RNA-Polymerasegen unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors und des Laktose-Operons in das Bakteriengenom integriert (z. B. BL21(DE3)). Unter Zusatz von IPTG, einem nicht metabolisierbaren Pseudosubstrat für den *lac*-Repressor (physiologisch Laktose oder Allolaktose, Metabolit des Laktosestoffwechsels), wird T7 RNA-Polymerase gebildet, die anschließend zur Transkription des Zielgenes – kloniert in pET 11d – beiträgt.

Für die Optimierung der Expression wurde vor allem mit pJK 10 gearbeitet. Nach Transformation in *E. coli* BL21(DE3), einen proteasedefizienten Bakterienstamm (siehe Abschnitt 3.5.3, Seite 78), wurden verschiedene Ansätze zur Expression durchgeführt. Nachdem erste Experimente ohne weitere Zusätze nur zu einer geringen Überexpression führten, wurde versucht, durch Zugabe von Glucose oder Rifampicin, eine Hintergrundexpression zu unter-

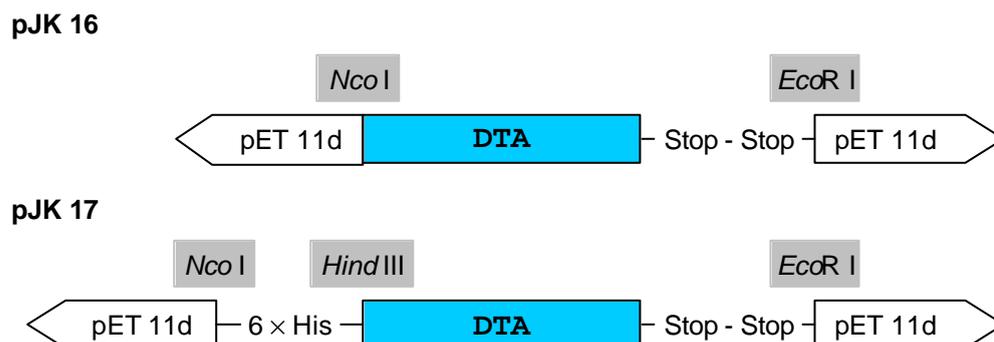


Abb. 3-27: DTA-Kontrollen – Dargestellt sind pJK 16 und pJK 17, die nur die codierende Sequenz von DTA enthalten (mit oder ohne *Tag*) und für die Expression in pET 11d kloniert wurden. Zur Klonierung von pJK 16 wurde aus pJK 6 eine PCR mit den Primern Reverse / DTA *Eco*R S rev durchgeführt, für pJK 17 fanden *Nco* H DTA for und DTA *Eco*R S rev Verwendung (Pwo-Polymerase, Temperaturecyclus: 96 °C, 3 min; [96 °C, 1 min; 60 °C, 1 min 30 s; 72 °C, 2 min] × 25; 72 °C, 5 min; 16 °C). Nach GeneClean-Reinigung wurden die PCR-Produkte mit *Nco* I und *Eco*R I verdaut (1.5 h) und danach die Enzyme hitzeinaktiviert (20 min, 65 °C). Für die Ligation diente pJK 10 als Vektor, der ebenso verdaut und über Gelextraktion gereinigt wurde.

drücken. Solange ausreichend Glucose im Medium ist, wird eine durch Laktoseverunreinigungen bedingte Hintergrundexpression reduziert. Rifampicin dagegen führt durch eine Inhibition der RNA-Polymerase des Wirtes zu einer verminderten Expression von bakteriellen Proteinen, so daß Transkription und Translation des Zielgenes effizienter ablaufen können.¹⁴⁷ Die Ergebnisse der entsprechenden Optimierungsversuche sind in Abb. 3-28 gezeigt.

Die Expression unter Zusatz von Rifampicin zum Zeitpunkt der Induktion (Spur 2) unterscheidet sich nur minimal von der ohne weitere Zusätze (Spur 1). Gibt man Rifampicin erst 25 min nach Induktionsstart zu (Spur 3), so ist zwar die Hintergrundexpression an bakteriellen Proteinen geringer, dafür aber auch die Expression des Zielgenes. Unter Glucosezugabe (Spur 4) ist die beste Expression zu beobachten, allerdings werden auch deutlich mehr bakterielle Proteine exprimiert, was eine anschließende Reinigung erschwert.

Daher wurden weitere Ansätze zur Optimierung der Expression unternommen. pJK 10 wurde zusammen mit pREP 4 (Qiagen) transformiert und exprimiert. pREP 4 codiert für den *lac*-Repressor und begrenzt somit – wie auch Glucose – unerwünschte Transkriptionsprozesse vor der IPTG-Induktion. Außerdem wurde das Insert aus pJK 10 über *Nco* I und *Eco*R I in den

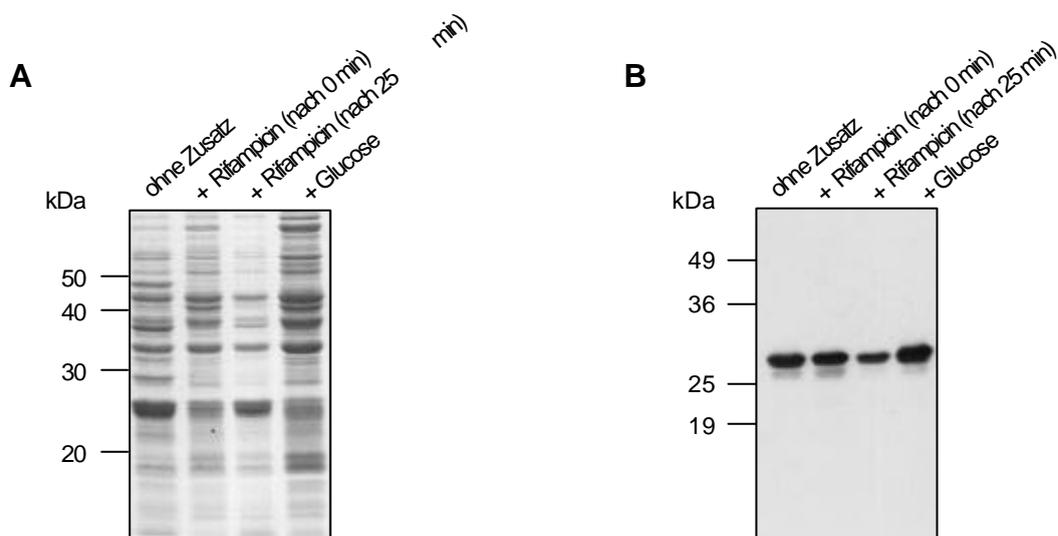


Abb. 3-28: Expression von pJK 10 unter Zusatz von Glucose oder Rifampicin – Aus einer Übernachtskultur von pJK 10-tragenden BL21(DE3)-Zellen wurden vier Ansätze (je 20 ml) zur Expression angeimpft (CircleGrow-Medium plus Ampicillin). Alle Ansätze wurden bei 37 °C bis zu einer OD_{550} von circa 1.1 geschüttelt und mit 1mM IPTG induziert. Ansatz 1 enthielt keine weiteren Zusätze, Ansatz 2 wurde zusammen mit der Zugabe von IPTG Rifampicin (100 µg/ml) zugesetzt, Ansatz 3 wurde 25 min nach IPTG-Zugabe mit Rifampicin (100 µg/ml) versetzt und Ansatz 4 wurde von Beginn an Glucose (0.5 % (w/v)) zugefügt. Nach 3 h Induktion wurde jeweils eine Probe entnommen (1 ml), abzentrifugiert und das Pellet in Tris-Puffer (100 µl, 20 mM, pH 7.5) mit Lysozym aufgeschlossen (0.5 µg, 15 min, 30 °C). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung (12%iges Gel) von jeweils 10 µl Lysat wurde in **A** eine Coomassiefärbung, in **B** eine Immunofärbung mit Anti-DT / RAG* durchgeführt.

ebenso aufgeschnittenen Expressionsvektor pBadMycHis C kloniert (pJK 10B) und sowohl in TOP 10- als auch in LMG 194-Zellen exprimiert (Abb. 3-29). Dieses Vektorsystem wurde deshalb ausgewählt, da es mit sehr geringem Aufwand eine Umklonierung ermöglichte und da es mit einem arabinoseinduzierbaren Promotor über einen völlig anderen Aktivierungsmechanismus verfügt als das pET-System.

Beim Vergleich der verschiedenen Ansätze läßt sich erkennen, daß die Expression unter Kotransformation von pREP 4 (Spur 1) am stärksten ist. Im Coomassiegel sieht man eine deutliche Bande bei circa 25 kDa, allerdings sind im Vergleich zu dem Ansatz ohne pREP 4 (Spur 2) verstärkt Abbaubanden im Immunoblot zu beobachten. Beide Expressionen im pBadMycHis-System (Spuren 3 und 4) zeigen eine mit pET 11d (Spur 2) vergleichbare Expressionsrate, wobei hauptsächlich ein kleineres Produkt entsteht. Da beide Bakterienstämme nicht proteasedefizient sind, lassen die kleineren Fragmente auf eine Abbaureaktion schließen (Spaltung innerhalb des ESP, potentielle Spaltstelle für *OmpT*).

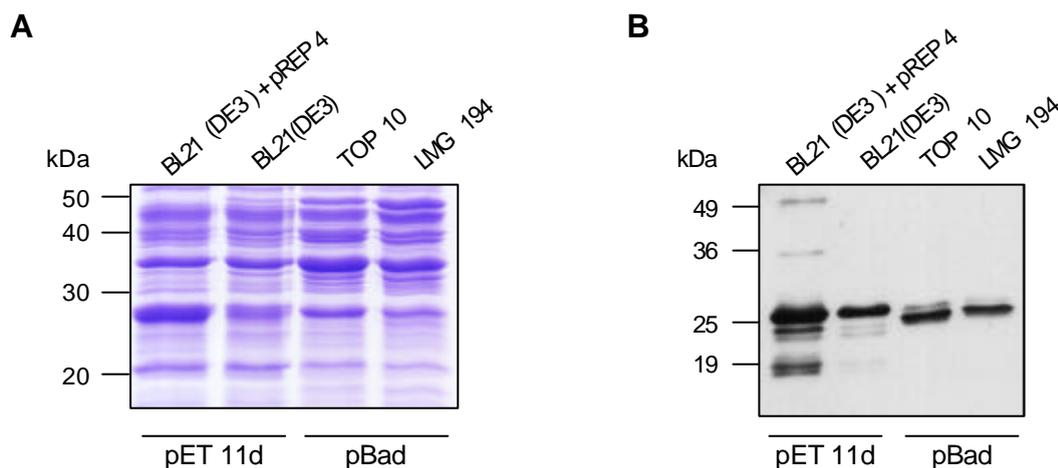


Abb. 3-29: Koexpression von pJK 10 mit pREP 4 in BL21(DE3) und Expression von pJK 10B in TOP 10- und LMG 194-Zellen – Zur Expression wurde pJK 10 einmal alleine und einmal mit pREP 4 zusammen in BL21(DE3) transformiert. Zur Klonierung von pJK 10B (in pBadMycHis C) wurde das Insert zunächst aus pJK 10 herausgeschnitten (*Nco* I / *Eco*R I) und in den ebenso aufgeschnittenen Vektor kloniert. Der Erfolg der Ligation wurde durch Restriktionsverdau überprüft und positive Klone wurden sowohl in TOP 10- als auch in LMG 194-Zellen transformiert. Zur Expression wurden folgende Übernachtskulturen angeimpft (alle mit Ampicillinzusatz): pJK 10 mit pREP 4 in CircleGrow-Medium und zusätzlichem Kanamycinzusatz, pJK 10 in CircleGrow-Medium, pJK 10B / TOP 10 in CircleGrow-Medium und pJK 10B / LMG 194 in RM-Medium. Die Ansätze wurden am Morgen 1:1 mit den entsprechenden Medien verdünnt und bis zu einer OD_{600} von circa 0.5–0.8 geschüttelt. Zur Induktion wurde den pET 11d-Ansätzen 1 mM IPTG, den pBad-Ansätzen 0.002 % (w/v) Arabinose zugesetzt. Nach 2.5 h Induktion wurden die Bakterienpellets in Tris-Puffer resuspendiert (20 mM, pH 7.5) und mit Lysozym aufgeschlossen (15 min, 30 °C). Jeweils 50 µg (A) oder 25 µg (B) Gesamtprotein wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (12%iges Gel) und mittels Coomassiefärbung (A) bzw. Immunodetektion mit Anti-DT / RAG* (B) sichtbar gemacht.

Aus den Ergebnissen der verschiedenen Expressionsversuche wurde geschlossen, daß ohne weitere Zusätze eine Expression der pET 11d-Konstrukte in *E. coli* BL21(DE3) zwar nicht die höchsten Ausbeuten erbringt, doch aufgrund der geringen proteolytischen Abbauprozesse trotzdem vorteilhaft ist.

Zeitgleich sollte in einer weiteren Versuchsreihe geklärt werden, ob es durch eine Variation des Bakterienaufschlusses möglich ist, die Ausbeute an Zielprotein zu erhöhen. Dazu wurde pJK 10 mit pREP 4 in *E. coli* BL21(DE3) kotransformiert und exprimiert. In einer Versuchsreihe wurden die Bakterienpellets zunächst mit Ultraschall aufgeschlossen und anschließend verschiedene Ammoniumsulfatfällungen (22–45 % (w/v)) durchgeführt. In einer anderen Serie wurden die Pellets mit Lysozym aufgeschlossen und anschließend unterschiedlich lange mit Ultraschall behandelt. Die verschiedenen Lysate wurden im Immunoblot auf freigesetzte Menge an Zielprotein und im Coomassiegel auf freigesetztes Gesamtprotein getestet. Ein DNA-Agarosegel zeigte gleichzeitig freigesetzte Nukleinsäuren, die wegen ihrer negativen Ladung eine Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie erheblich erschweren können (Abb. 3-30).

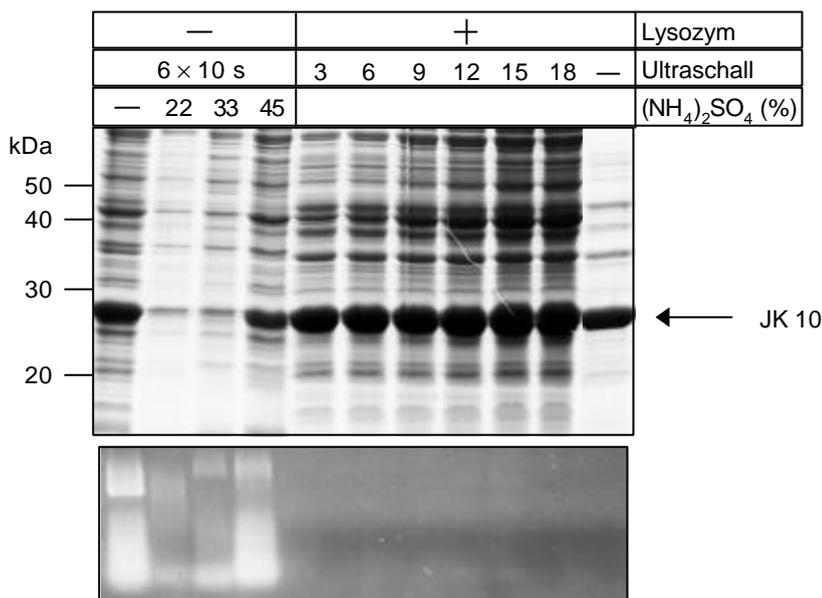


Abb. 3-30: Versuchsreihen zur Effizienz verschiedener Methoden des Bakterienaufschlusses – pJK 10 wurde mit pREP 4 in BL21(DE3) kotransformiert und in zwei Ansätzen unter Anwesenheit von Kanamycin als Selektionsantibiotikum für pREP 4 exprimiert. Ein Ansatz wurde zunächst mit Ultraschall behandelt (6×10 s mit der Geräteeinstellung Stufe 3–4, Intensität 30–40 %), dann mit unterschiedlichen Mengen Ammoniumsulfat gefällt und resuspendiert. Der zweite Ansatz wurde zunächst mit Lysozym inkubiert ($5 \mu\text{g/ml}$ Lysat, 15 min, 30°C), anschließend unterschiedlich oft mit Ultraschall behandelt (Ultraschall gibt hier die Anzahl an einzelnen Ultraschallstößen mit der Geräteeinstellung Stufe 3–4, Intensität 30–40 % an) und abzentrifugiert (4°C). Im oberen Teil der Abbildung sind die verschiedenen Lysate in einer Coomassiefärbung nach gelelektrophoretischer Auftrennung (12%iges Gel) zu sehen, im unteren Teil ist ein entsprechendes Agarosegel gezeigt.

Im Immunoblot (nicht gezeigt) sind unter Aufschluß mit Lysozym nur kleine Unterschiede in der Expressionsrate erkennbar. Mit zunehmender Intensität der Ultraschallbehandlung steigt die Ausbeute langsam an, jedoch lassen sich auch vermehrt Abbauprodukte wie in Abb. 3-29 B, Spur 1 erkennen. Zur Beurteilung der verschiedenen Lysemethoden ist es daher sinnvoll, das Coomassiegel heranzuziehen. Nach Ultraschallbehandlung und anschließender Fällung sieht man mit einer steigenden Menge Ammoniumsulfat sowohl eine Zunahme an Zielprotein wie auch eine Zunahme an freigesetzten bakteriellen Proteinen (Spuren 2–4). Das Ausmaß der bakteriellen Verunreinigung ist im Falle eines Aufschlusses allein mit Lysozym am geringsten (Spur ganz rechts). Unter Anwendung von Ultraschall erhöht sich zwar die Ausbeute an Zielprotein, allerdings auch die Freisetzung bakterieller Proteine. Das DNA-Agarosegel im unteren Teil zeigt, daß im Falle einer intensiven Ultraschallbehandlung große Mengen an Nukleinsäuren freigesetzt werden (Spuren 1–4), die sich auf eine anschließende Reinigung negativ auswirken können. Eine Lysozymbehandlung führt jedoch nicht zur Freisetzung von Nukleinsäuren und stellt deshalb die geeignetere Aufschlußtechnik dar.

Zusammenfassend ergab die Abwägung der Faktoren Ausbeute an Zielprotein, proteolytischer Abbau und bakterielle Verunreinigungen bei verschiedenen Lyseprozessen folgende Strategie für die Expression der übrigen Adaptertoxine: Expression als pET 11d-Konstrukte in BL21(DE3), Induktion bei einer OD_{550} von circa 0.8 über eine Dauer von 2–3 h, anschließend Aufschluß mit Lysozym und eventuell eine sanfte Ultraschallbehandlung. In Abb. 3-31 ist eine derartige Expression nebeneinander für alle Adaptertoxine ohne *Tag* dargestellt.

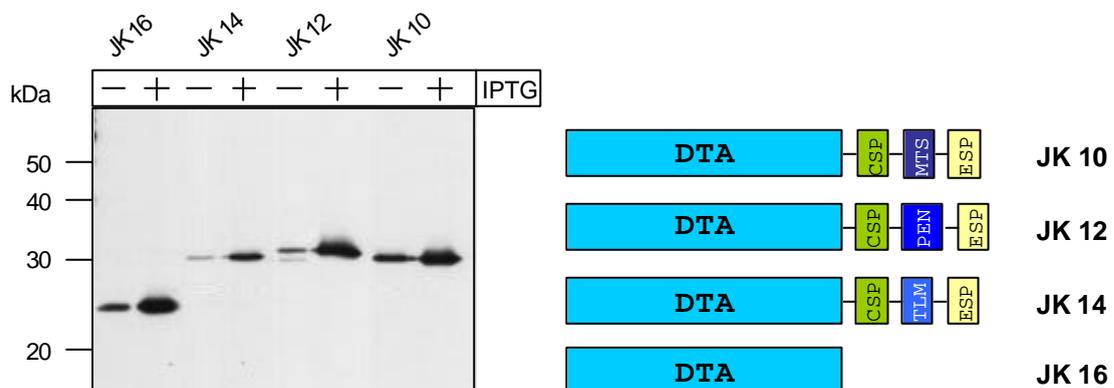


Abb. 3-31: Expression von pJK 10, pJK 12, pJK 14 und pJK 16 in BL21(DE3) – Aus entsprechenden Übernachtskulturen wurden Hauptkulturen (je 100 ml, LB-Medium mit Ampicillin) angeimpft und bis zu einer OD_{550} von circa 0.8 geschüttelt. Nach Entnahme einer Probe (1 ml) wurde nach Zugabe von IPTG (1 mM) für 2 h induziert. Eine weitere Probe wurde entnommen, bevor der Rest der Kultur für spätere Versuche abzentrifugiert und das Pellet bei -20°C eingefroren wurde. Die abzentrifugierten Proben wurden in Tris-Puffer (300 μl , 20 mM, pH 7.5) resuspendiert und kurz (2 Intervalle) mit Ultraschall behandelt. Nebeneinander aufgetragen sind jeweils die Proben vor (–) und nach (+) Induktion (je 20 μl), gezeigt nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Detektion im Immunoblot (Anti-DT / RAG*).

3.6.5 Reinigung der Adaptertoxine

Für die Reinigung der verschiedenen Adaptertoxine standen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Da alle Konstrukte so kloniert wurden, daß sie auch mit $6 \times \text{His-Tag}$ exprimiert werden können, wurde zunächst die Reinigung mit Hilfe einer Metallaffinitätschromatographie durchgeführt. Unter nativen Bedingungen konnte für JK 11 im Immunoblot zwar eine Bindung an Ni^{2+} -Chelatsepharose gezeigt werden, allerdings kam es nicht zu einer für eine Detektion im Silbergel ausreichenden Anreicherung des Zielproteins.

Eine weitere Möglichkeit der Reinigung bietet eine Anti-DT-Antikörperaffinitätschromatographie. Da für eine solche Reinigung größere Mengen Antiserum nötig gewesen wären (nur kommerziell erhältlich, deshalb sehr kostenintensiv) und da bei der Reinigung von JK 3 eine vergleichbare Matrix nur über eine geringe Bindungskapazität verfügte, wurde von dieser Strategie abgesehen. Es konnte jedoch trotzdem eine auf dem Toxinanteil basierende Affinitätschromatographie ohne Zuhilfenahme des *Tags* angewendet werden. Aufgrund der Bindungsaffinität der A-Kette von DT zu NAD^+ wurde eine Blaugel-Affinitätschromatographie durchgeführt, bei der ein mit NAD^+ strukturell verwandtes Farbstoffmolekül (Cibacron Blue) als Ligand für die Affinitätsmatrix fungiert. Dieses Verfahren ist insofern vorteilhaft, da es neben der Reinigung auch Rückschlüsse auf eine enzymatische Aktivität der Proteine zuläßt, für die die Bindung von NAD^+ eine zentrale Rolle spielt. Wiederum wurde für eine Optimierung des Verfahrens zunächst nur pJK 10 herangezogen. Nach Expression in *E. coli* BL21(DE3) wurde das Lysat auf eine HiTrap Blue-(Blaugel-)Säule aufgetragen, mit detergentshaltigem Puffer gewaschen und anschließend mit Hochsalzpuffer eluiert (Abb. 3-32 A).

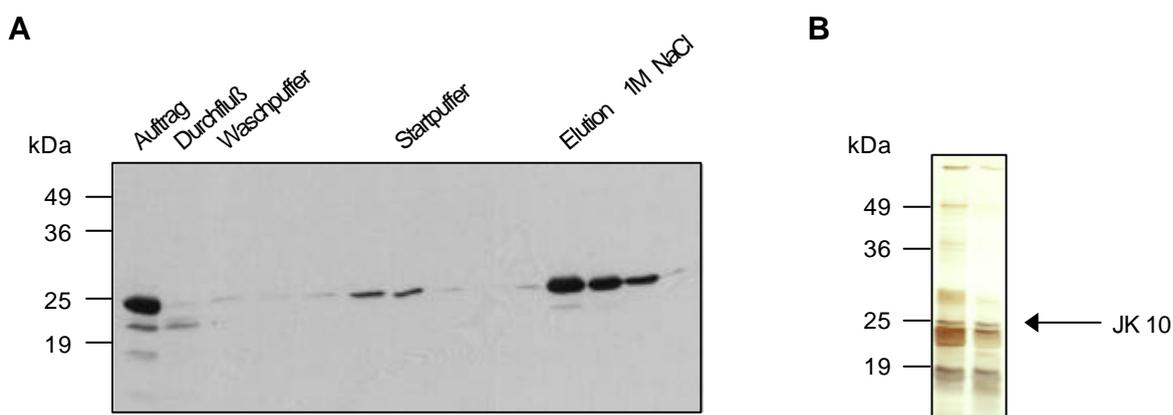


Abb. 3-32: Reinigung von JK 10 über HiTrap Blue und Gelfiltration – pJK 10 wurde in BL21(DE3) transformiert und exprimiert (20 ml-Ansatz). Das Pellet wurde in Tris-Puffer (20 mM, pH 7.5) aufgeschlossen (Lysozym, 10 min, 30 °C, 15 Ultraschallstöße). Anschließend wurde dem Lysat 150 mM NaCl und 0.2 % (w/v) Brij 58 zugesetzt und die Reinigung durchgeführt (siehe Abschnitt 2.14.4.1, Seite 49). Die Endreinigung der vereinigten Elutionsfraktionen erfolgte nach Dialyse (20 mM Tris, pH 7.5) und Konzentrierung (Centriprep 30) mit Hilfe einer Gelfiltration (Superdex 75 in PBS). In **A** sind in einem Immunoblot die unterschiedlichen Fraktionen der Blaugel-Affinitätschromatographie nach gelelektrophoretischer Auftrennung dargestellt (12%iges Gel, Anti-DT / RAG*), Teil **B** der Abbildung zeigt die Elutionsfraktionen der Gelfiltration nach gelelektrophoretischer Auftrennung (12%iges Gel) und Silberfärbung.

Zur Endreinigung wurde mit den vereinigten Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie eine Gelfiltration durchgeführt. Die eluierten, JK 10 enthaltenden Fraktionen wurden schließlich im Silbergel analysiert (Abb. 3-32 B).

Die Reinigung mittels einer Blaugel-Affinitätschromatographie konnte für das Adaptertoxin JK 14 ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden. JK 16 (DTA-Kontrolle) dagegen zeigte überraschenderweise unter denselben Reinigungsbedingungen nur eine geringe Bindungsaffinität gegenüber der Matrix. Die Konstrukte JK 10 und 14 besitzen jeweils zwei Cysteinreste, die zur Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke fähig sind. Da JK 16 nur über einen einzelnen Cysteinrest (Cys-186) verfügt, wurde vermutet, daß sich eventuell Dimere bilden, die nicht NAD⁺-bindungsfähig sind. Allerdings konnte auch nach Zugabe von DTT (5 mM) oder reduziertem Glutathion (10 mM) keine gesteigerte Affinität zur Blaugelmatrix gezeigt werden. Nachdem auch in weiteren Optimierungsversuchen (Auftrag ohne NaCl und / oder ohne Detergens) keine wesentliche Bindung an die Matrix festgestellt werden konnte, wurde eine andere Reinigungsstrategie – anwendbar für alle Adapterkonstrukte – entwickelt. Hier bot sich die Anionenaustauschchromatographie an, die bereits für die DTA-MTS-Konstrukte erfolgreich eingesetzt werden konnte (siehe Abschnitt 3.5.4.2, Seite 80).

Unter Anwendung einer Kombination aus Mono Q-Anionenaustauschchromatographie und anschließender Gelfiltration (Superdex 75) konnten alle Adaptertoxine ohne *Tag* mit hinreichender Ausbeute und Reinheit dargestellt werden, so daß im Anschluß funktionelle Tests durchgeführt werden konnten.

3.6.6 Darstellung von eGFP-Adaptertoxinen

Aufgrund der Randlage der endosomal spaltbaren Sequenz in den klonierten Adaptertoxinen erschien es sinnvoll, ebenfalls Konstrukte mit einem veränderten C-Terminus herzustellen. Durch Fusion eines relativ inerten Proteins C-terminal zum ESP wurden solche Adaptertoxine hergestellt, bei denen einerseits eine Spaltung des ESP gut nachweisbar ist (deutlicher Molekulargewichtsshift im Gel) und bei denen andererseits der sterische Einfluß eines späteren Liganden untersucht werden kann.

Als Fusionspartner wurde das *enhanced-Green-Fluorescent-Protein* (eGFP) ausgewählt, dessen cDNA in Form des Vektors pEGFP-N3 zur Verfügung stand. Dieser Vektor wird normalerweise für eine eukaryontische Expression von GFP-Fusionsproteinen eingesetzt. Das enthaltene eGFP ist durch verschiedene, stille Mutationen für eine solche Expression optimiert und verfügt im Gegensatz zu GFP (natürliche Form aus *Aequorea victoria*) über eine intensivere Fluoreszenz (Exzitation 488 nm, Emission 507 nm; bedingt durch die Mutationen: Leu-64 statt Phe und Thr-65 statt Ser). Mit den durchgeführten Veränderungen wurden jedoch keine seltenen Codons für eine Expression in *E. coli* in die Sequenz eingebracht.

Somit konnte eGFP aus dem vorhandenen Vektor in einer solchen Weise amplifiziert werden, daß es über *Xma* I und *Eco*RI in pJK 10L kloniert werden konnte (pJK 18L). Das resultierende Konstrukt enthält den vollständigen Adapter, flankiert von DTA und eGFP. Zur

Kontrolle einer ESP-spezifischen Spaltung wurden zusätzlich Konstrukte ohne funktionelle Peptide hergestellt. Dazu wurde das Insert aus pJK 8 über *Nco* I/*Eco*R I zunächst in pLitmus 28 kloniert (pJK 8L). Anschließend konnte eGFP genauso wie bei pJK 10L fusioniert werden (pJK 19L). Nach Bestätigung der Sequenzen wurden die *Nco* I/*Eco*R I-Inserts von positiven Klonen in den ebenso aufgeschnittenen Vektor pJK 10 (also pET 11d-Basis) kloniert. Die entsprechenden Plasmide pJK 18 und pJK 19 sind in Abb. 3-33 dargestellt. Das Konstrukt pMS, welches weder ESP noch CSP enthält wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Mark Sutherland (Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, UKBF, FU-Berlin) zur Verfügung gestellt.

Zur Expression wurden die Plasmide pJK 18, pJK 19 und pMS in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und in CircleGrow-Medium zur Expression gebracht. Für alle drei Konstrukte konnten wesentlich bessere Expressionsraten erzielt werden als für die Adapttoxine alleine (als visuelle Kontrolle konnte die Fluoreszenz des Bakterienpellets herangezogen werden). Unter Umständen hat die Fusion mit eGFP einen ähnlichen Effekt wie die TRX-Fusion bei den DTA-MTS-Konstrukten, nämlich daß die Affinität der MTS gegenüber lipophilen Strukturen durch einen Fusionspartner reduziert wird. Nach Bakterienlyse (Lysozym und Ultraschall, dann Ultrazentrifugation $100\,000 \times g$, 30 min) wurden die Konstrukte mittels einer Mono Q-Anionenaustauschchromatographie und anschließender Gelfiltration (Superdex 75) gereinigt.

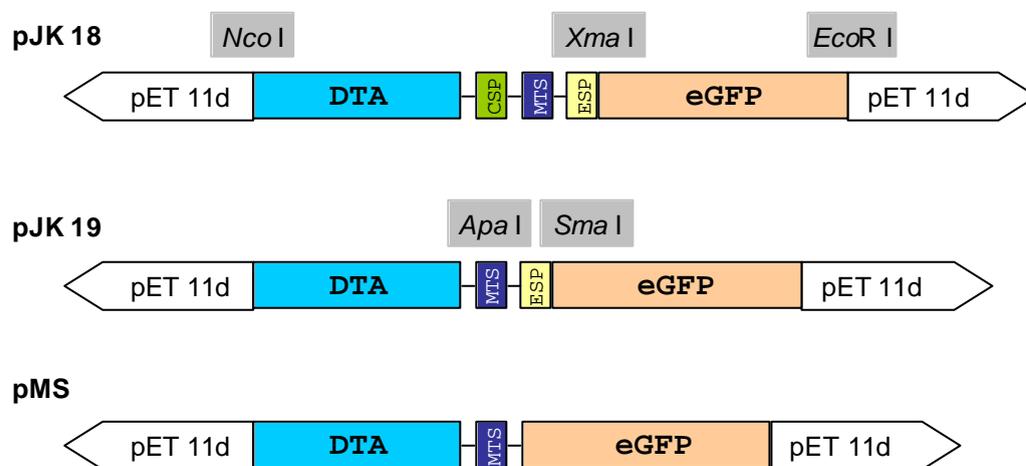


Abb. 3-33: eGFP-Adapttoxine zur funktionellen Charakterisierung des ESP – Zur Klonierung wurde zunächst aus pEGFP-N3 die cDNA von eGFP so amplifiziert, daß am 5'-Ende eine *Xma* I- und am 3'-Ende neben einem Stop-Codon eine *Eco*R I-Schnittstelle vorlag (Pwo-Polymerase, Primer: *Xma* eGFP for und eGFP *Eco*R S rev, Temperaturcyclus: $96\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 min; $[96\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min; 60 oder 62 $^{\circ}\text{C}$, 1 min 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 2 min] \times 25; 72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 16 $^{\circ}\text{C}$). Das PCR-Produkt wurde über GeneClean gereinigt und ebenso wie die entsprechenden Vektoren pJK 10L und pJK 8L mit *Xma* I und *Eco*R I geschnitten und nach Gelextraktion ligiert. Eine Kontrolle der Ligation erfolgte über Restriktionsverdau mit *Nco* I und *Eco*R I, wobei positive Klone durch ein um die DNA von eGFP größeres Insert gekennzeichnet waren. Nach Kontrollsequenzierung wurden die entsprechenden *Nco* I/*Eco*R I-Inserts in den ebenso vorbereiteten Vektor pJK 10 (also pET 11d-Basis) kloniert. Für die Konstruktion von pMS wurde pJK 19 zunächst mit *Apa* I aufgeschnitten und mit Klenow-Fragment inkubiert (3'-5'-Exonukleaseaktivität), anschließend wurde mit *Sma* I verdaut und nach Reinigung religiert.

3.7 Funktionsanalyse der Adaptertoxine

Der Adapter besteht neben einer Membrantransfersequenz im Zentrum aus zwei funktionellen Gruppen, die in unterschiedlichen Zellkompartimenten gespalten werden sollen (siehe Abschnitt 3.6.1, Seite 86). Der tumorspezifische Ligand vermittelt über die Endocytose des Ligand-Rezeptor-Komplexes die zelluläre Aufnahme des Immunoadaptertoxins. In den Endosomen erfolgt eine Spaltung der funktionellen Gruppe C-terminal der Transfersequenz, wodurch diese aktiviert wird. Nach erfolgreichem Membrandurchtritt ins Cytosol wird hier die enzymatisch aktive Toxindomäne N-terminal der Transfersequenz abgespalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktionsweise des endosomal spaltbaren Peptids (ESP) genauer untersucht. Entsprechende Untersuchungen für die cytosolisch spaltbare Sequenz (CSP) wurden von Herrn Iring Heisler (Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, UKBF, FU-Berlin) durchgeführt. Mit unterschiedlich präparierten Cytosolfraktionen aus HepG2-Zellen (mit und ohne Induktion einer Apoptose durch Staurosporin) konnte eine Spaltung des funktionellen Peptids CSP nachgewiesen werden.¹⁾

3.7.1 Funktionsanalyse der enzymatischen Aktivität von Adaptertoxinen

Da die Adaptertoxine noch nicht über einen tumorzellspezifischen Liganden verfügen, sollte im Rahmen einer Funktionsanalyse weniger ihre zellgebundene Wirkung als vielmehr ihre enzymatische Aktivität im zellfreien Milieu untersucht werden. Dies war insbesondere aus zwei Gründen von speziellem Interesse: Es galt zu zeigen, daß die in *E. coli* exprimierte adapterfreie A-Kette von DT (JK 16) enzymatisch aktiv ist (auch wenn keine Bindung an Blaugel festzustellen war, siehe Abschnitt 3.6.5, Seite 96) und daß der hinzugefügte Adapter keinen Einfluß auf ihre Aktivität hat.

Zum Nachweis einer Aktivität im zellfreien Milieu wurde mit den gereinigten Adapterkonstrukten ein ADP-Ribosylierungsassay durchgeführt (Abb. 3-34). Als Positivkontrolle diente gekauftes DT und als Negativkontrolle diente ein Lysat aus einer pET 11d-Kultur in BL21(DE3).

Am Auftreten einer Bande bei circa 100 kDa erkennt man die Umsetzung von EF II mit biotinyliertem NAD⁺, was auf eine enzymatische Aktivität der Toxinkonstrukte hinweist. Neben der Positivkontrolle DT (Spur 1) sind auch JK 10, JK 12, JK 14 und JK 16 aktiv (Spuren 2–5). An der fehlenden EF II-Bande in der pET 11d-Kontrolle (Spur 7) erkennt man, daß die in den Adaptertoxinfraktionen vorhandenen bakteriellen Verunreinigungen keine ADP-ribosylierende Aktivität aufweisen. Somit zeigt sich, daß die in BL21(DE3) exprimierte A-Kette von DT trotz fehlender Bindung an Blaugel enzymatische Aktivität besitzt. Die verschiedenen Adapter nehmen keinen Einfluß auf ihre Aktivität.

¹⁾ siehe Publikationsverzeichnis Heisler, I. *et al.* A specific cytosolic cleavable peptide for improved trapping inside the cytosol. *Eur J Biochem* **268** S 1, 178 (2001)

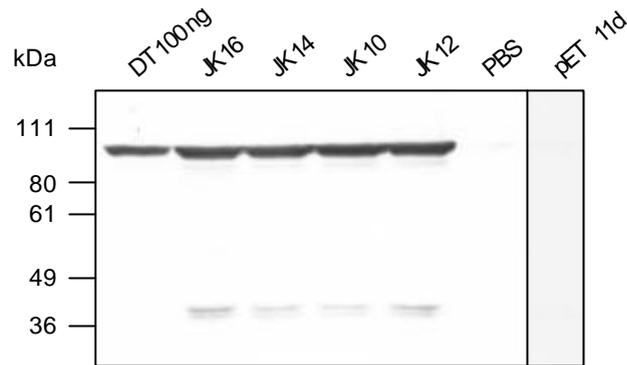


Abb. 3-34: ADP-Ribosylierungsassay mit gereinigten Adaptertoxinen – Nach Mono Q-Säule und Gelfiltration wurden gleiche Mengen der verschiedenen Adaptertoxine (Immunoblot und Silbergel dienten zur Abschätzung) im ADP-Ribosylierungsassay (siehe Abb. 3-3, Seite 62) eingesetzt. Als Positivkontrolle diente DT (100 ng), als Negativkontrolle wurde ohne Toxin (nur mit PBS) oder mit einem pET 11d-Lysat aus BL21(DE3) gearbeitet. Gezeigt ist der Immunoblot (Anti-Biotin / RAG*) nach gelelektrophoretischer Auftrennung (7.5%iges Gel).

3.7.2 Funktionsanalyse der spaltbaren Sequenzen im Adapter

Mit JK 18, JK 19 und MS stand eine Serie von Konstrukten zur Verfügung, mit denen die tatsächliche Spaltung der endosomal spaltbaren Sequenz ESP sehr genau untersucht werden konnte. Mit JK 18 war der Nachweis der Spaltbarkeit im Gesamtkonstrukt möglich, wobei der Einfluß eines Liganden von circa 25 kDa untersucht werden konnte. Experimente zur Spaltung von JK 19 und MS ermöglichten Rückschlüsse auf die Spezifität.

Für die funktionelle Charakterisierung des ESP wurden die Konstrukte entweder mit rekombinantem Furin oder mit Membranfraktionen aus HepG2-Zellen inkubiert. Rekombinantes humanes Furin diente als Positivkontrolle dafür, daß diese Protease tatsächlich in der Lage ist, die proteasesensitiven Bereiche im ESP (wie auch in DT und PE) zu spalten. Mit einer Spaltung des ESP durch HepG2-Membranfraktionen sollte das Vorkommen dieser Protease in dem überwiegend verwendeten zellulären Modellsystem nachgewiesen werden. Weitere Rückschlüsse auf die Spezifität der Spaltung durch Furin erbrachte die Zugabe eines kompetitiven Furinconvertaseinhibitors (Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chlormethylketon, Abb. 3-35).

Betrachtet man zunächst die linke Hälfte des Immunoblots, so sieht man bei den Spuren ohne Furinconvertaseinhibitor (Spuren 1, 3, 5), daß sowohl JK 18 als auch JK 19 furinsensitiv ist. Dies wird am Auftreten einer kleineren eGFP-Bande bei circa 28 kDa deutlich, die dem schematisch aufgezeigten Fragment in Teil A der Abbildung entspricht. MS wird erwartungsgemäß nicht verdaut. Unter Zugabe des Inhibitors (Spuren 2, 4, 6) wird der furinbedingte Abbau von JK 18 und JK 19 durch Konkurrenz vollständig unterdrückt, bei MS hat die Zugabe keinen Einfluß.

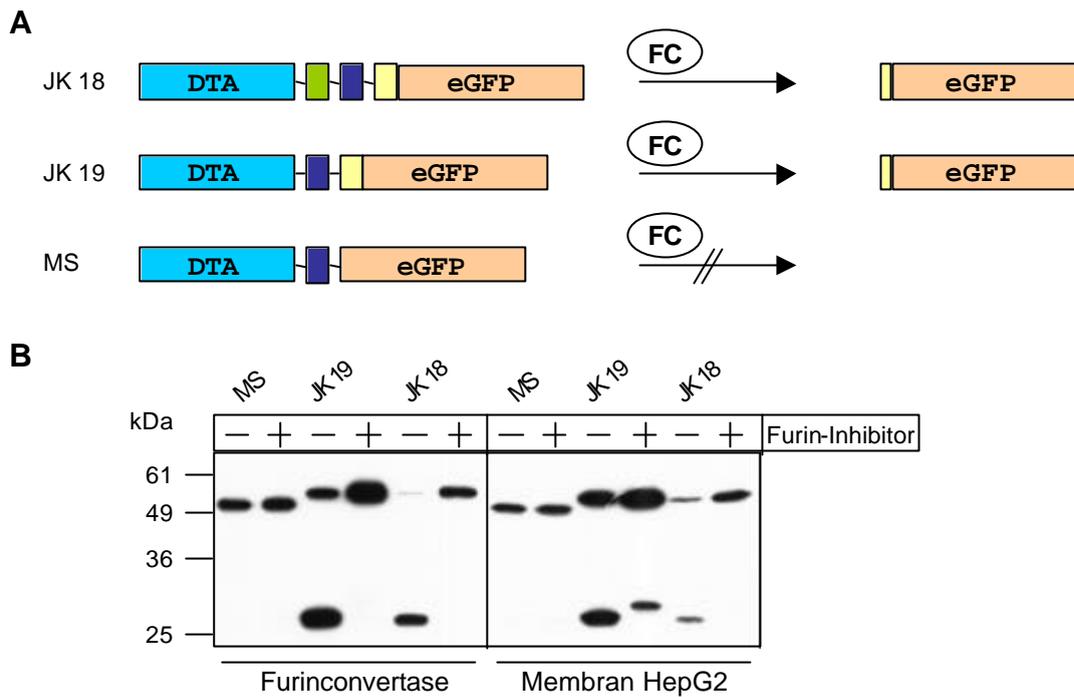


Abb. 3-35: ESP-Spaltung durch rekombinantes Furin oder HepG2-Membranfraktionen in An- oder Abwesenheit des Furinconvertaseinhibitors Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chlormethylketon – Circa 0.5 μg gereinigtes Protein (JK 18, 19 oder MS in 20 mM Tris, pH 7.4 unter Zusatz von 150 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 und 1.2 mM MgCl_2) wurden entweder mit 0.1 U rekombinanter Furinconvertase oder 25 μg HepG2-Membranfraktion (Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation, siehe Abschnitt 2.11.7.2, Seite 35) versetzt und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Bei Inhibitionsstudien wurde zunächst 10 min mit Furinconvertaseinhibitor vorinkubiert (Endkonzentration 100 μM). In **A** ist schematisch eine durch Furinconvertase (FC) bedingte Spaltung der verschiedenen Konstrukte mit den resultierenden eGFP-Anteilen dargestellt, falls die Spaltung erwartungsgemäß innerhalb des ESP erfolgt. **B** zeigt den Immunoblot (Anti-GFP / RAM*) nach gelelektrophoretischer Auftrennung der verschiedenen Ansätze jeweils ohne (-) und mit (+) Zusatz von Furinconvertaseinhibitor.

Ähnliche Verhältnisse lassen sich im rechten Teil des Immunoblots unter Verwendung von HepG2-Membranen beobachten. Die in der Membranfraktion vorhandenen Proteasen haben keinen Einfluß auf MS (Spur 7), während JK 18 und JK 19 gespalten werden. Es entsteht jeweils ein Spaltprodukt derselben Größe wie bei der Inkubation mit Furin (Spuren 9, 11). Somit ist anzunehmen, daß beide Konstrukte an derselben Stelle durch Furinconvertase oder im Falle von HepG2-Membranen auch durch eine andere furinähnliche Proproteinconvertase geschnitten werden. Unter Zugabe des Furinconvertaseinhibitors läßt sich für MS kein Effekt erkennen, während sich der Abbau von JK 18 vollständig inhibieren läßt (Spur 8 bzw. 12). Bei JK 19 beobachtet man ebenfalls eine Inhibition der furinspezifischen Spaltung. Allerdings tritt ein anderes, größeres eGFP-Fragment auf, welches möglicherweise auf eine Spaltung innerhalb der Konsensussequenz der spaltbaren Region von PE zurückzuführen ist (Spur 10).

In weiteren Versuchen konnte nachgewiesen werden, daß JK 18 auch bei pH 5.5 unter Zugabe von Furin oder HepG2-Membranfraktionen gespalten wird (nicht gezeigt). Die Versuche wurden im Gegensatz zu den hier gezeigten mit Anti-DT-Antikörper durchgeführt. Dabei fiel

auf, daß unter Zugabe von Membranen bei pH 5.5 (ähnlich wie hier bei JK 19) ein zweites, kleineres Fragment auftrat. Auch dieses könnte auf eine alternative Spaltung der PE-Schnittstelle zurückzuführen sein.

Eine sehr schnell ablaufende Spaltungsreaktion ist für die endosomal spaltbare Sequenz nicht so essentiell wie für die cytosolisch spaltbare, da ein Ausbleiben der Spaltung allenfalls zu einem Recycling des unveränderten Immunoadaptertoxins führt, so daß die unspezifische Toxizität nicht erhöht wird. Da aber die gezeigten Inhibitionsversuche als Endpunktbestimmungen mit einer relativ langen Inkubationszeit von 4 h durchgeführt wurden, wurde im folgenden der Reaktionsverlauf vor allem unter kürzeren Inkubationszeiten untersucht, die einer Verweildauer in den Endosomen näher kommen. Um eine Spaltung im Zellsystem nachzuahmen, wurden für diese Versuche als Proteasequelle nur HepG2-Membranfraktionen verwendet. Die Kinetik wurde exemplarisch für JK 19 untersucht (Abb. 3-36).

An der Intensität der Bande des eGFP-Fragments (circa 28 kDa) kann man den Zeitverlauf der Spaltung ablesen. Wesentliche Veränderungen zeigen sich hier vor allem bei den frühen Zeitwerten (15 min, 30 min und 1 h), wobei das Ausmaß der Spaltung von der Konzentration der HepG2-Membranen abhängig ist. Die densitometrische Analyse ergab, daß bereits nach 15minütiger Inkubation 10 % (40 µg Membranfraktion, Spur 2) bzw. 3% JK 19 (20 µg Membran, Spur 7) als Spaltprodukt vorliegt. Nach einer einstündigen Inkubation liegen die Werte bei 37 bzw. 23 % (Spuren 4 bzw. 9). Nach 4 h liegen in Anwesenheit von 40 µg Membran 49, in Anwesenheit von 20 µg Membran 35 % JK 19 als Spaltprodukt vor (Spuren 6 bzw. 11).

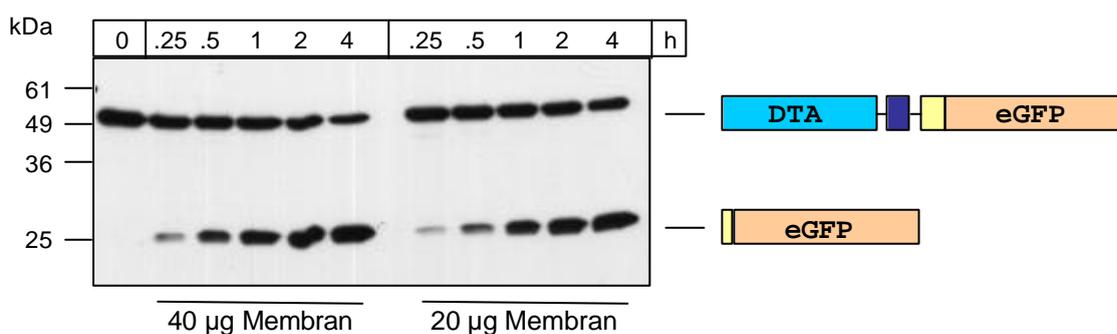


Abb. 3-36: Kinetischer Verlauf der ESP-Spaltung durch Membranfraktionen aus HepG2-Zellen – Jeweils 3 µg gereinigtes JK 19 wurden in einem Endvolumen von 100 µl (20 mM Tris, pH 7.4 unter Zusatz von 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ und 1.2 mM MgCl₂) entweder mit 200 µg oder 100 µg Membranen aus HepG2-Zellen versetzt und bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 20 µl abgenommen (also pro Zeitwert 0.6 µg JK 19 und 40 bzw. 20 µg Membran), mit 4 × Probenpuffer versetzt und anschließend auf Eis gelagert. Gezeigt ist der Immunoblot nach gelelektrophoretischer Auftrennung (12%iges Gel) und Detektion mit Anti-GFP / RAM*, wobei rechts die den Banden entsprechenden Konstrukte schematisch dargestellt sind.

Sowohl das unterschiedliche Ausmaß der Spaltungsreaktion bei verschiedenen Konzentrationen der Enzymquelle wie auch das Auftreten einer Sättigung weisen eindeutig auf eine spezifische, enzymatisch bedingte Spaltung hin, deren Geschwindigkeitsverlauf für eine Anwendung in Immunoadaptotoxinen als geeignet angesehen werden kann.

Ein weiterer entscheidender Faktor für die Eignung der einzelnen spaltbaren Sequenzen für Immunoadaptotoxine ist ihre Stabilität. Die Wichtigkeit dieser Eigenschaft wurde bereits bei dem chemisch gekoppelten DTA-PEN deutlich (siehe Abschnitt 3.4.3.3, Seite 75). Deshalb erfolgte zum Abschluß der funktionellen Charakterisierung des ESP ebenfalls eine Stabilitätsuntersuchung im Zellkulturmedium. Dazu wurden HepG2-Zellen ausgesät und in An- oder Abwesenheit von FCS jeweils mit JK 18, 19 und MS für 1–48 h inkubiert. Da in Gegenwart von FCS keine veränderte Stabilität festgestellt werden konnte, sind in Abb. 3-37 nur die Ergebnisse der Experimente mit FCS-freiem im Zellkulturmedium dargestellt.

Am Beispiel von JK 18 und JK 19 läßt sich eine gewisse Instabilität des ESP bereits nach einer Stunde in der Zellkultur nachweisen (nach densitometrischer Analyse 8 % Abbau). Zum Zeitpunkt 4 h sind im Fall von JK 18 noch 42 % der Bindungen intakt, bei JK 19 liegen noch 60 % intaktes Konstrukt vor. Nach 8 h ist nur im Falle von JK 19 noch circa 20 % vollständiges Konstrukt vorhanden. MS (ohne spaltbare Sequenzen) bleibt erwartungsgemäß über die gesamte Dauer der Inkubation sehr stabil. Allerdings tritt nach 24 h eine schwache Abbaubande auf, die auf der Höhe der Spaltprodukte von JK 18 und JK 19 liegt. Da MS jedoch keine ESP enthält, muß hier an einer anderen Stelle geschnitten werden. Für die beiden anderen Konstrukte mit ESP bleibt ein solcher, unspezifischer Effekt allerdings ohne Bedeutung, da ihre Halbwertszeit bei circa 4 h liegt.

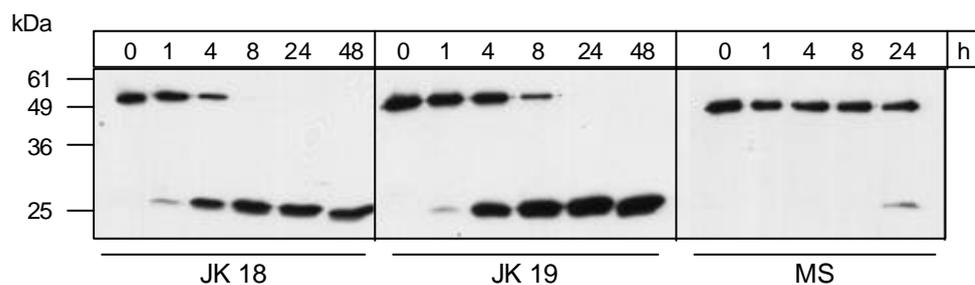


Abb. 3-37: Stabilität des ESP in der Zellkultur – HepG2-Zellen (3×10^5 Zellen / Vertiefung, angewachsen in Kulturmedium mit FCS) wurden mit JK 18, JK 19 oder MS (circa $30 \mu\text{g/ml}$ in Kulturmedium) in Abwesenheit von FCS im Brutschrank inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen ($25 \mu\text{l}$) und gelelektrophoretisch (12%iges Gel) aufgetrennt. Nach Westernblot wurde eine Immunodetektion mit Anti-GFP / RAM* durchgeführt.

3.8 Immunoadaptortoxine mit Transferrinrezeptor-Bindungspeptid

Um vollständige Immunoadaptortoxine herzustellen, fehlte – ausgehend von den Adaptortoxinen – nur noch der tumorzellspezifische Ligand. Obwohl der Transferrinrezeptor (TfR) nicht ausschließlich auf Tumorzellen vorkommt, liegt er dort in deutlich höherer Dichte vor, da diese Zellen für ihre schnelle Proliferation große Mengen an Eisenionen benötigen, welche ihnen über Transferrin zur Verfügung gestellt werden.

Auch wenn unter diesen Voraussetzungen zunächst der natürliche Ligand Transferrin (Tf) als tumorzellspezifischer Ligand am geeignetsten erscheint, wurde von seiner Verwendung abgesehen. Mehrere Argumente waren dafür ausschlaggebend: Die Expression und Reinigung der verschiedenen Adaptortoxine war trotz Optimierung nicht so effizient, daß man eine chemische Kopplung über einen Crosslinker unter weiteren Produktverlusten in Betracht ziehen konnte. Eine rekombinante Fusion der Adaptortoxine mit Tf erschien zwar grundsätzlich möglich, war aber deswegen ungeeignet, da die cDNA von Tf sehr viele seltene Codons für eine Expression in *E. coli* enthält. Ein weiteres Kriterium waren die bei einer bakteriellen Expression fehlenden Glykanstrukturen. Bei de Smit *et al.* konnte zwar eine rekombinante Expression von Tf in *E. coli* mit Ausbeuten von circa 60 mg/l gezeigt werden, doch bilden sich Einschlusskörper, in denen Tf in einer denaturierten Form vorliegt.¹⁴⁸ Eine Renaturierung ist nur in einem sehr geringen Umfang möglich, die Ausbeuten liegen bei circa 5%.¹⁴⁹ Da die – in den hier beschriebenen Adaptortoxinen – ebenfalls zu exprimierende A-Kette von DT inaktivierend auf die Proteinsynthese von Eukaryonten wirkt, mußte zusätzlich der Wechsel in ein anderes Expressionssystem ausgeschlossen werden. Als weiterer Einflußfaktor war die Größe des Liganden Tf zu beachten. Zwar sollte der Ligand so groß sein, daß er in der Lage ist, die Transfersequenz zunächst zu blockieren, doch sollte er nicht so groß sein, daß seine Expression zu komplex und seine Gewebepenetration zu gering sein würde. Unter diesen Gesichtspunkten erschien Tf mit einer Größe von 80 kDa ebenfalls nur bedingt geeignet.

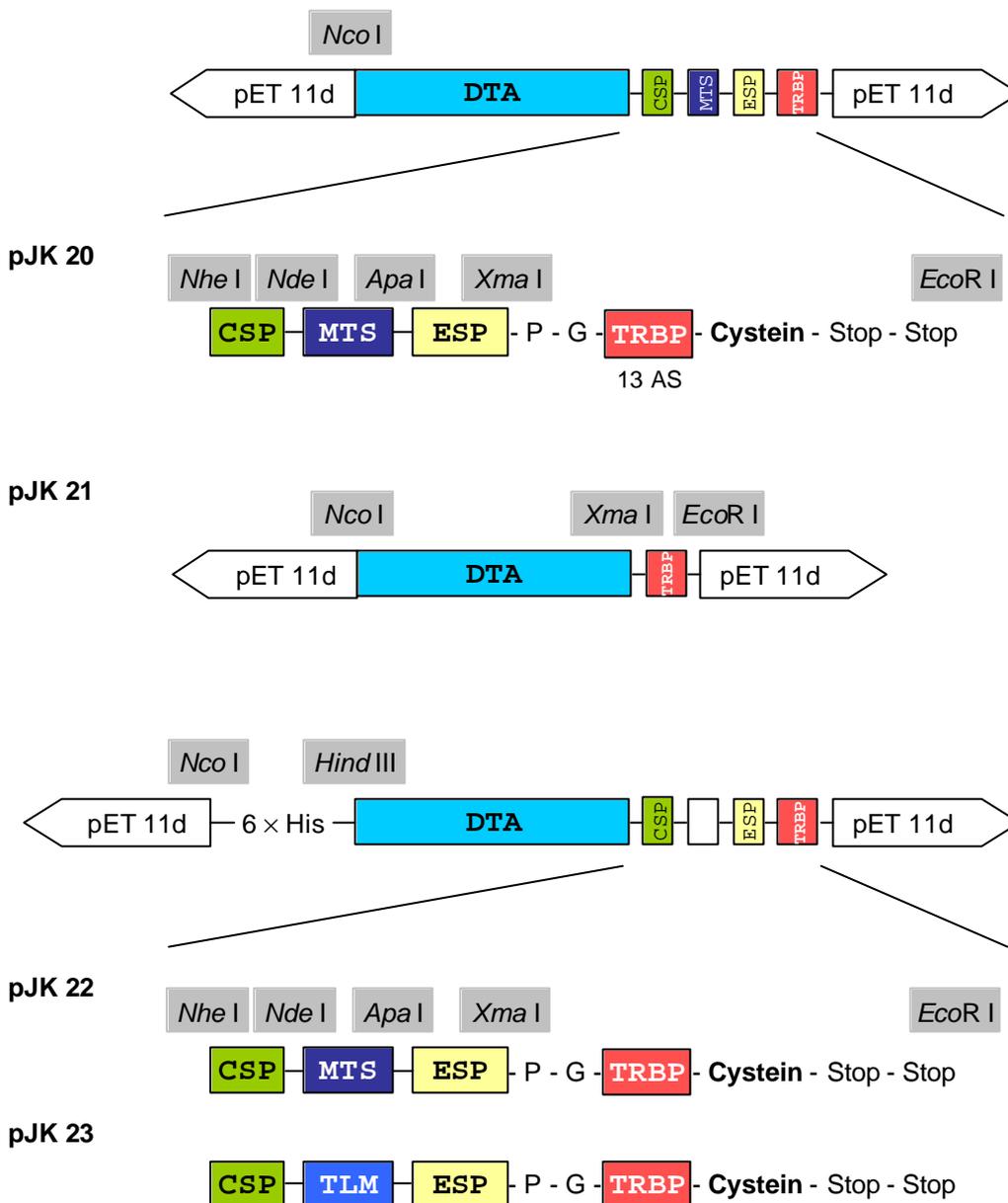
Da von Transferrin selbst nur sehr wenig darüber bekannt ist, welche Sequenzabschnitte für seine Bindung an TfR verantwortlich sind,¹⁵⁰ war es nicht möglich, auf kleinere Tf-Fragmente als tumorzellspezifische Liganden zurückzugreifen. Eine vergleichbare Verfahrensweise eröffnete sich allerdings mit einem Tf-unabhängigem Peptid (THRPPMWSPVWP, 12 Aminosäuren), für das eine TfR-Bindung mit anschließender Endocytose beschrieben wird.¹⁵¹ Dieses sogenannte Transferrinrezeptor-Bindungspeptid (TRBP) erfüllte damit die wichtigsten Voraussetzungen für seine Anwendung als tumorspezifischer Ligand – klein, endocytoseaktiv und exprimierbar in *E. coli* – und wurde daher zur Herstellung vollständiger Immunoadaptortoxine herangezogen.

3.8.1 Klonierung von DTA-Immunoadapterkonstrukten

Für die Klonierung von vollständigen Immunoadaptertoxinen wurde zunächst nur von Adaptertoxinen mit den Transfersequenzen MTS und TLM (pJK 10 und pJK 14) ausgegangen, da diese gegenüber PEN einen Transfer auch von größeren Proteinen zulassen (siehe Abschnitt 1.8, ab Seite 19). Zur vollständigen Charakterisierung der entsprechenden Immunoadaptertoxine wurde neben den vorhandenen Kontrollen (DT, DTA, DTA-Adapter) auch eine solche bestehend aus Toxin und Ligand ohne Adapter zur Verfügung gestellt.

Da sich das Einklonieren von Peptiden über eine PCR mit anschließendem Restriktionsverdau im Rahmen der Klonierung der einzelnen Transfersequenzen als günstig erwiesen hatte, wurde nun eine ähnliche Vorgehensweise gewählt. Mit den Primern DTA-265 for und TRBP EcoR S rev (hybridisiert mit der ESP) wurde mittels PCR aus pJK 10L ein DTA-Immunoadapterfragment mit MTS amplifiziert, welches nach Restriktionsverdau über die Schnittstellen *Nhe I*/*EcoR I* in pJK 10L kloniert wurde (pJK 20L). Das Konstrukt aus Toxin und TRBP ohne Adapter wurde nach Einfügen einer *Xma I*-Schnittstelle am 3'-Ende von DTA (DTA *Xma rev*/Universal) über *Nco I*/*Xma I* in pJK 20L kloniert (pJK 21L). Nach Sequenzierung wurden beide Konstrukte über die Schnittstellen *Nco I*/*EcoR I* zur Expression in pET 11d kloniert (pJK 20 und 21). Um für das vollständige Immunoadapterkonstrukt pJK 20 die Möglichkeiten einer anschließenden Reinigung zu vergrößern, wurde aus pJK 11L über *Nco I*/*Nhe I* das 6 × His-DTA-Insert in den ebenso geschnittenen Vektor pJK 20 kloniert (pJK 22). Das analoge TLM-Konstrukt wurde über *Nco I*/*Xma I* aus pJK 20L und pJK 14L dargestellt (pJK 23L) und anschließend zur Expression über *Nco I*/*EcoR I* in pET 11d kloniert (pJK 23, Abb. 3-38).

Abb. 3-38: (folgende Seite) Klonierte TRBP-Konstrukte in pET 11d – Zur Klonierung des Transferrinrezeptor-Bindungspeptids (TRBP) wurde eine PCR mit den Primern DTA-265 for und TRBP EcoR S rev durchgeführt (Pwo-Polymerase, Temperaturcyclus: 96 °C, 3 min; [96 °C, 1 min; 55 °C, 1 min 30 s; 72 °C, 2 min] × 25; 72 °C, 5 min; 16 °C, Template pJK 10L). Das PCR-Produkt wurde nach Reinigung mittels GeneClean mit *Nhe I*/*EcoR I* verdaut (2 h, 37 °C, Enzyminaktivierung 15 min, 65 °C) und in den entsprechend geschnittenen Vektor pJK 10L ligiert. Das eingebaute TRBP wurde durch Sequenzierung bestätigt, anschließend wurde über *Nco I*/*EcoR I* in pET 11d umklont (pJK 20). Zur Klonierung von pJK 21 wurde zunächst eine PCR mit den Primern Universal und DTA *Xma rev* aus pJK 10L durchgeführt (Pwo-Polymerase, Temperaturcyclus: 96 °C, 3 min; [96 °C, 1 min; 58 °C, 1 min 30 s; 72 °C, 1 min] × 25; 72 °C, 5 min; 16 °C). Das PCR-Produkt wurde mittels GeneClean gereinigt und ebenso wie der Vektor pJK 20L *Nco I*/*Xma I* (2 h, 37 °C) verdaut, über Gelextraktion gereinigt und ligiert. Nach Sequenzierung wurde über *Nco I*/*EcoR I* in pET 11d umklont (pJK 21). Der His-Tag in pJK 22 wurde aus dem *Nco I*/*Nhe I*-Insert (2 h, 37 °C) von pJK 11L und dem ebenso geschnittenen Vektor pJK 20 kloniert (pJK 22). Das entsprechende TLM-Konstrukt wurde nach *Nco I*/*Xma I*-Verdau (1.5 h, 37 °C) und Gelextraktion aus pJK 20L (Vektor) und pJK 14L (Insert) kloniert und anschließend in pET 11d umklont (pJK 23). Die Abbildung zeigt schematisch die klonierten TRBP-Konstrukte mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen im Expressionsvektor pET 11d. In der Ausschnittsvergrößerung sind die durch die Klonierung zusätzlich eingebrachten Aminosäuren zwischen dem ESP und dem TRBP im 1-Buchstabencode dargestellt (siehe Abschnitt 7.3.2, Seite 149).



(Abbildungsbeschriftung siehe vorherige Seite)

3.8.2 Expression und Reinigung von DTA-Immunoadapterkonstrukten

Für spätere funktionelle Tests wurden folgende Konstrukte exprimiert und gereinigt: DTA (pJK 16), DTA-TRBP (pJK 21) und die Adapter- sowie Immunoadaptertoxine mit den Transfersequenzen MTS (pJK 10, 11 und pJK 20, 22) und TLM (pJK 14, 15 und pJK 23).

Die DTA-Konstrukte ohne Adapter (pJK 16 und 21) wurden in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und exprimiert. Die jeweiligen Proteine wurden deutlich überexprimiert und konnten mit Hilfe einer Mono Q-Anionenaustauschchromatographie gereinigt werden. Ähnlich wurde bei dem Adapter- und dem Immunoadapterkonstrukt pJK 10 bzw. pJK 20 verfahren. Die Reinigung der Lysate mittels Anionenaustauschchromatographie war jedoch insbesondere bei

pJK 20 von einer so geringen Ausbeute gekennzeichnet, daß sich diese Methode als ungeeignet erwies.

Da die klonierten, His-Tag-tragenden Adapterkonstrukte mittels einer Metallaffinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen in hoher Reinheit und ohne Aktivitätsverlust dargestellt werden können,¹⁾ wurde diese Strategie ebenso für die übrigen, bereits klonierten Konstrukte verfolgt. Die Adaptortoxine pJK 11 und 15 sowie die Immunoadaptortoxine pJK 22 und 23 wurden dazu in BL21(DE3)-Zellen transformiert und in CircleGrow-Medium exprimiert. Die Bakterienpellets wurden unter 8 M Harnstoff aufgeschlossen, und die Konstrukte über eine Ni-NTA-Matrix gereinigt. Anschließend wurde zur Renaturierung mehrfach gegen PBS dialysiert.

Abb. 3-39 zeigt exemplarisch die Reinigung von JK 15 mittels einer Nickel-Affinitätschromatographie. Im Auftrag (Spur 1, entspricht dem Lysat) ist bei circa 30 kDa eine sehr intensiv gefärbte Doppelbande zu erkennen. Die obere der beiden Banden entspricht dem

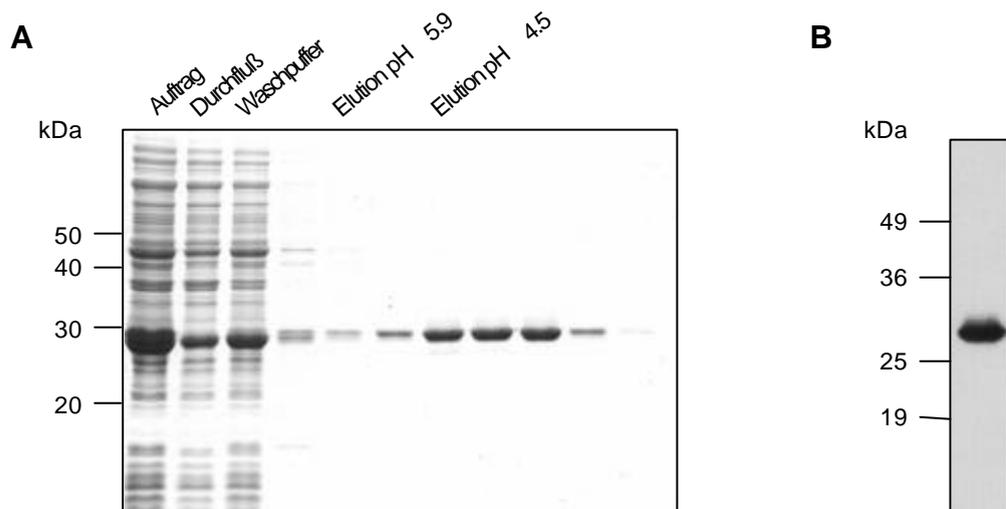


Abb. 3-39: Metallaffinitätschromatographische Reinigung von JK 15 – Der Vektor pJK 15 wurde zur Expression in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Zur Expression wurden 100 ml Medium (CircleGrow mit Ampicillin) mit einer Übernachtskultur angeimpft, bei 37 °C bis zu einer OD₅₅₀ von circa 1.0 geschüttelt und unter Zusatz von 1 mM IPTG für 2.5 h induziert. Das Bakterienpellet wurde in Startpuffer (5 ml/g Pellet) resuspendiert und aufgeschlossen (siehe Abschnitt 2.16.3.5, Seite 58). Anschließend wurde das Lysat auf eine mit Ni-NTA-Agarose gefüllte Säule aufgetragen und unter denaturierenden Bedingungen gereinigt (siehe Abschnitt 2.14.4.2, Seite 49). Um eine Vermischung der einzelnen Elutionsfraktionen zu verhindern, wurde jeweils die erste Fraktion bei pH 5.9 und pH 4.5 in zwei Anteilen gesammelt. Teil **A** zeigt die einzelnen Fraktionen der Reinigung nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Coomassiefärbung, wobei jeweils gleiche Volumina aufgetragen wurden. In Teil **B** sind die vereinigten Elutionsfraktionen im Immunoblot gezeigt (Anti-DT / RAG*).

¹⁾ siehe Publikationsverzeichnis Sutherland, M. *et al.* A novel molecular adaptor for the site-specific trapping of immunotoxins – Is it functional? *Clin Chem Lab Med* **39** (9), A76 (2001)

überexprimierten Zielprotein JK 15, die untere aller Wahrscheinlichkeit nach der resistenzvermittelnden β -Laktamase (tatsächliche Größe circa 31 kDa). JK 15 zeigt eine vollständige Bindung an Ni-NTA-Agarose, während β -Laktamase und bakterielle Proteine bereits durch den Waschpuffer vollständig von der Säule gewaschen werden (Spuren 2–4). Nach einem weiteren Waschschritt bei pH 5.9, eluiert der Hauptteil des Zielproteins JK 15 bei pH 4.5 in einer Reinheit von circa 95 % (Nachweis im Coomassiegel).

In Abb. 3-40 sind alle hergestellten TRBP-Konstrukte und die entsprechenden Kontrollproteine dargestellt, die für eine Funktionsanalyse nötig sind. Man kann erkennen, daß die

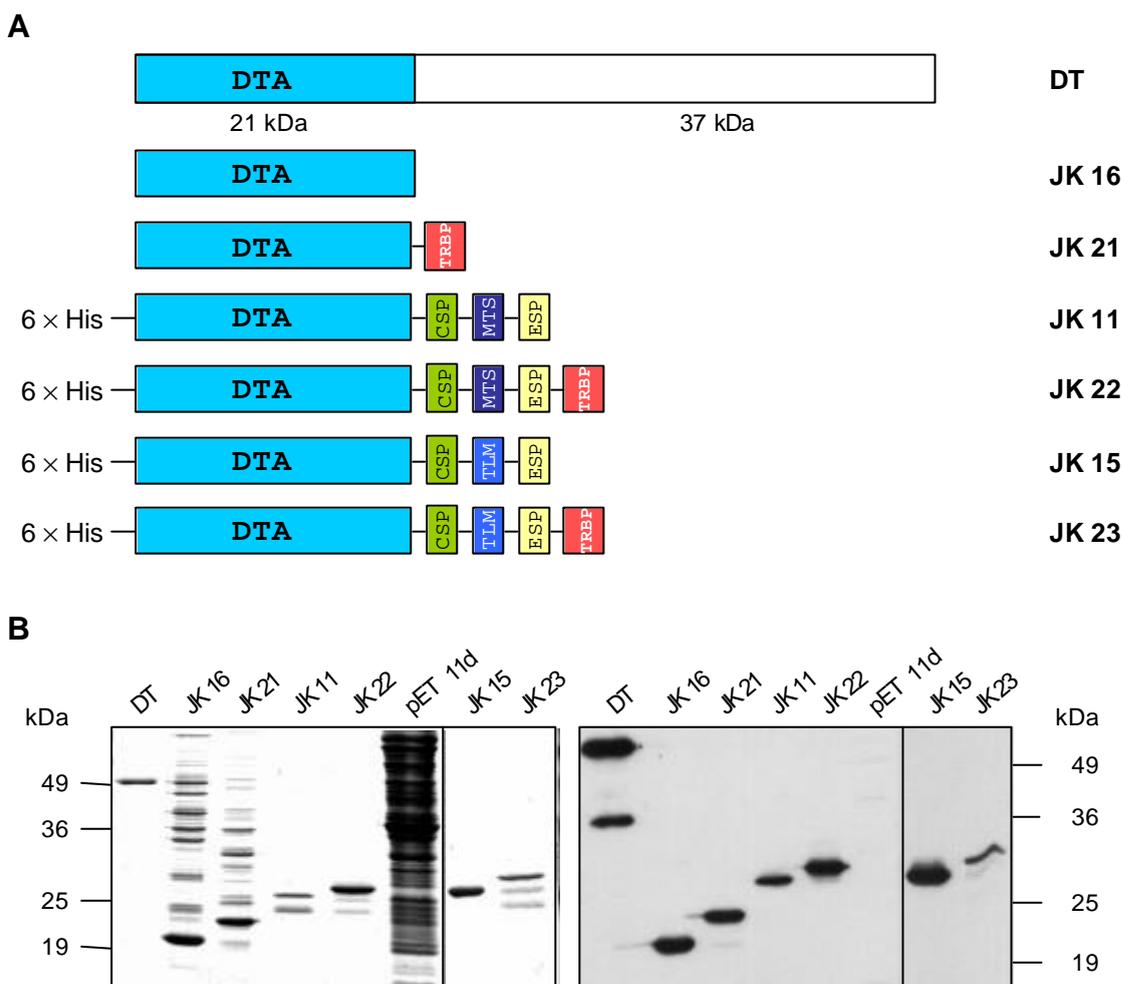


Abb. 3-40: Exprimierte und gereinigte TRBP-Konstrukte und entsprechende Kontrollen – Teil **A** zeigt den schematischen Aufbau der hergestellten Toxinkonstrukte. In Teil **B** sind die entsprechend gereinigten Proteine links in einer Coomassie- und rechts in einer Immunofärbung (Anti-DT / RAG*) nach gelelektrophoretischer Auftrennung (12%ige Gele) zu sehen. Aufgetragen wurden kommerziell erhältliches DT (100 ng), JK 16 und JK 21 nach Mono Q-Reinigung (siehe unter Adapterproteine, Abschnitt 2.14.2, Seite 48), JK 11 und JK 22 nach Reinigung über ihre Metallaffinität (siehe Abb. 3-39) und ein Lysat aus pET 11d in BL21(DE3) (circa 10 μ g). In einem zweiten Gel wurden JK 15 und JK 23 aufgetragen, die ebenfalls durch ihre Metallaffinität gereinigt wurden (siehe oben). Die Konzentrationsabschätzung erfolgte jeweils anhand von DT und den Ni-NTA gereinigten Konstrukten, deren Konzentrationen aufgrund der hohen Reinheit auch per BCA-Proteinbestimmung zu ermitteln waren.

über Anionenaustauschchromatographie gereinigten DTA-Konstrukte JK 16 und JK 21 in einer Reinheit von circa 30–70 % – gemessen am Gesamtprotein – hergestellt werden konnten (Spuren 2, 3). Um bei diesen Fraktionen den Einfluß der verbliebenen bakteriellen Proteine auf die folgenden Tests auszuschließen, wurde zusätzlich ein Kontrolllysate hergestellt, für das der Vektor pET 11d (ohne Insert) in BL21(DE3) angezogen wurde (Spur 6). Die über ihre Metallaffinität gereinigten Konstrukte konnten mit einer wesentlich höheren Reinheit aufgearbeitet werden. Aufgrund der verbliebenen bakteriellen Verunreinigungen konnte bei einigen Konstrukten die tatsächliche Konzentration nicht mittels einer BCA-Proteinbestimmung gemessen werden, deshalb erfolgte eine Konzentrationsabschätzung anhand der gezeigten Gele.

3.8.3 Klonierung, Expression und Reinigung von eGFP-Immunoadapterkonstrukten

Neben den DTA-Immunoadapterkonstrukten wurden zur funktionellen Charakterisierung des TRBP auch entsprechende Konstrukte mit GFP hergestellt. Da die GFP-Konstrukte im Gegensatz zu den Toxinkonstrukten kein Gefahrenpotential aufweisen, konnten sie zunächst einer Optimierung der Testsysteme dienen. Aufgrund der erfolgreichen Expression und Reinigung der eGFP-tragenden Konstrukte JK 18, 19 und MS wurde für die folgenden Klonierungen ebenfalls eGFP und nicht das von Lee *et al.* beschriebene GFP aus dem Vektor pGFPuv der Firma Clontech verwendet.¹⁵¹

Zunächst wurde aus dem Vektor pEGPN-3 mittels PCR und entsprechenden Primern (eGFP Hind for / eGFP Nhe rev) ein solches eGFP-Fragment amplifiziert, das einen *Hind* III / *Nhe* I-vermittelten Austausch des DTA-Anteils in pJK 11L erlaubte (pJK 24, Abb. 3-41). Da der Primer eGFP Hind for neben der *Hind* III-Schnittstelle noch eine weitere für *Nco* I enthält, konnte im folgenden durch die Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme die Umklonierung in pET 11d entweder mit *Tag* (*Hind* III / *Eco*R I in *His-Tag*-tragende pET 11d-Basis) oder ohne *Tag* (*Nco* I / *Eco*R I in *His-Tag*-tragende pET 11d-Basis) durchgeführt werden. Im vorliegenden Fall wurde das Insert ohne *His-Tag* in pET 11d kloniert (pJK 25). Die anschließende Klonierung des Bindungspeptids TRBP in den Vektor pJK 25 erfolgte analog der Klonierung des TRBP in pJK 20 (pJK 26).

Die Konstrukte pJK 25 und 26 wurden nach Transformation in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Nach enzymatischer Lyse mit Lysozym erfolgte eine Mono Q-Anionenaustauschchromatographie. Die eluierten Konstrukte wurden mittels Anti-GFP-Antikörper im Immunoblot sichtbar gemacht, wobei stets mehrere Banden mit geringeren Molekulargewichten als erwartet beobachtet werden konnten. Dieses Verhalten ließ auf einen Abbau schließen, für den – anhand von Größenvergleichen – eine Instabilität im Bereich des ESP verantwortlich gemacht wurde. Um das Bindungspeptid TRBP dennoch in Verbindung mit eGFP auf seine TfR-Bindungseigenschaften untersuchen zu können, wurde im folgenden ein TRBP-eGFP-Konstrukt ohne Adapter (pJK 28) und eine nur aus eGFP bestehende Kontrolle (pJK 27) kloniert (Abb. 3-42).

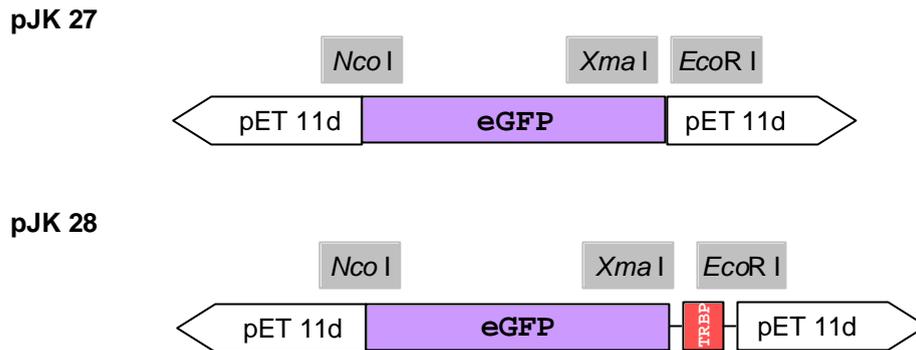


Abb. 3-42: Kloniertes eGFP-Immunokonstrukt und die eGFP-Kontrolle – Zur Klonierung von pJK 27 wurde die DNA von eGFP so amplifiziert, daß am 5'-Ende eine *Nco* I- und am 3'-Ende eine *Xma* I-Schnittstelle vorhanden war (Pwo-Polymerase, Primer: eGFP Hind for und eGFP Xma rev, Temperaturcyclus: 96 °C, 3 min; [96 °C, 1 min; 58 °C, 1 min 30 s; 72 °C, 2 min] × 25; 72 °C, 5 min; 16 °C), über die das Fragment anschließend unter Ausschluß des Adapters in pJK 24 kloniert wurde (pJK 27L). Nach Sequenzierung erfolgte die *Nco* I/*Eco*R I-vermittelte Klonierung in pET 11d (pJK 27). Zur Klonierung von pJK 28 wurde das *Nco* I/*Xma* I-geschnittene eGFP-Fragment in den ebenso verdauten Vektor pJK 26 ligiert.

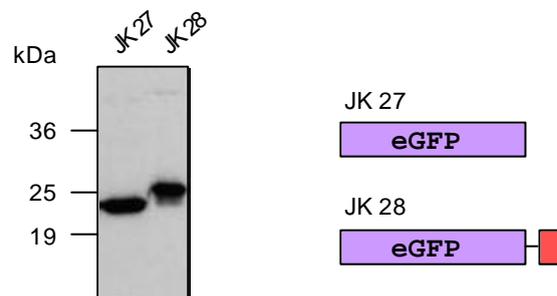


Abb. 3-43: Reinigung von JK 27 und JK 28 mittels Mono Q-Anionenaustauschchromatographie – Die beiden Plasmide JK 27 und 28 wurden nach Transformation in *E. coli* BL21(DE3) in CircleGrow-Medium exprimiert (1mM IPTG, 3h). Anschließend wurden die Pellets in Tris-Puffer resuspendiert und lysiert (20 mM Tris / HCl, pH 8, Lysozymzusatz und Ultraschallbehandlung, 100 000 × g). Der Überstand wurde auf die mit Tris-Puffer äquilibrierte Mono Q-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte unter kontinuierlicher Zugabe von Hochsalzpuffer (20 mM Tris / HCl, pH 8.0 + 1 M NaCl, 0-50% Hochsalzpuffer in 25 CV). Gezeigt ist jeweils eine Elutionsfraktion von JK 27 und JK 28 nach gelelektrophoretischer Auftrennung (12%iges Gel) und Immunofärbung mittels Anti-GFP / RAM*.

Adapter enthalten, war davon auszugehen, daß nur JK 28 mit TRBP über den TfR an die Zellen bindet und dabei ein ähnliches Verteilungsmuster wie der natürliche Ligand Transferrin zeigt. An HepG2-Zellen konnten unter Methanolfixierung die von Lee *et al.* beschriebenen Verteilungsmuster jedoch nicht reproduziert werden. Nach persönlicher Rücksprache wurde das Experiment nach den genauen Vorschriften der Autoren wiederholt. Zur Fixierung wurden die Zellen in einer 3%igen Paraformaldehydlösung inkubiert, anschließend folgte die Permeabilisierung mittels einer 0.01%igen Tween 20-Lösung. Aller-

dings konnten auch bei dieser Vorgehensweise nur wenig aussagekräftige Ergebnisse zur TRBP-Bindung an den zellulären TfR erhalten werden. Unter Verwendung von Tf resultierte bei der von den Autoren vorgegebenen Versuchsgestaltung ein Verteilungsmuster, bei dem eine Permeabilisierung der Zellen sehr unwahrscheinlich erschien.

Bei einer Untersuchung der DTA-basierten TRBP-Konstrukte mittels Immunfluoreszenz hätte man für das Toxinconstruct JK 21 mit TRBP eine Färbung und zusätzlich ein ähnliches Verteilungsmuster wie bei Tf beobachten können. Der Toxinanteil von JK 22 und JK 23 wäre unter den Versuchsbedingungen bei Funktionalität des gesamten Adapters im Cytosol zu finden gewesen. Allerdings zeigten sich die zur Verfügung stehenden Antikörper Anti-DT und Mab DTA – auch wenn für beide entsprechende Anwendungen beschrieben sind – als ungeeignet und ergaben keine eindeutigen Ergebnisse.

Ebenfalls uneindeutig waren die Ergebnisse verschiedener Immunpräzipitationen mit TfR-beladener Tf-Sepharose oder Anti-DT-Agarose. Als weitere Möglichkeit kam in Betracht, die Bindung an zellulären TfR durch das Vorhandensein von TRBP-Konstrukten im Lysat nachzuweisen. Dieser Ansatz war allerdings aufgrund der potentiellen TRBP-Bindungsstellen auf HepG2-Zellen (siehe Abschnitt 3.1.2, Seite 60), der beschriebenen TRBP-Dissoziationskonstante und der Nachweisgrenze eines Immunoblots nicht realisierbar.

Dagegen gelang die Entwicklung eines ELISA, der im Gegensatz zu den beschriebenen Methoden für die DTA-basierten Konstrukte bessere Ergebnisse lieferte. Immobilisiert wurde entweder Tf, an das im Folgeschritt TfR gebunden wurde, oder es wurde direkt TfR immobilisiert. Die zweite Alternative führte in der abschließenden Farbreaktion zu höheren Absorptionssignalen, so daß dem TfR-*Coating* der Vorzug gegeben wurde (siehe Abschnitt 2.12.6, Seite 41). Als Liganden wurden verschiedene Konzentrationen der einzelnen TRBP- und Kontrollkonstrukte (10–1 000 ng) auf ihre TfR-Bindung getestet (Abb. 3-44).

Beim Holotoxin (DT) bleibt die Bindung an TfR über den gesamten Konzentrationsbereich wie erwartet aus. Betrachtet man die jeweils zusammengehörenden Paare aus Toxin und Toxinadapterkonstrukt mit und ohne TRBP, so zeigen alle Konstrukte mit TRBP bei den höheren, getesteten Konzentrationen eine deutlich verstärkte TfR-Bindung gegenüber dem Konstrukt ohne TRBP. Das Bindungsverhalten der TRBP-Konstrukte ist im gesamten Bereich konzentrationsabhängig, wobei die Kurve ab 500 ng Konstrukt pro Vertiefung langsam flacher wird, was auf eine Sättigung hinweist. Die stärkste Bindung an TfR zeigt JK 22, gefolgt von JK 21 und JK 23. Daraus läßt sich folgern, daß die Bindung nicht durch das alleinige Vorhandensein eines Abstandhalters in Form des Adapters beeinflussbar ist, sondern vielmehr von dessen Beschaffenheit abhängig ist. Mit der Testung eines pET 11d-Lysates konnte ein Einfluß der vorhandenen bakteriellen Verunreinigungen in JK 16 und 21 auf das Bindungsverhalten ausgeschlossen werden.

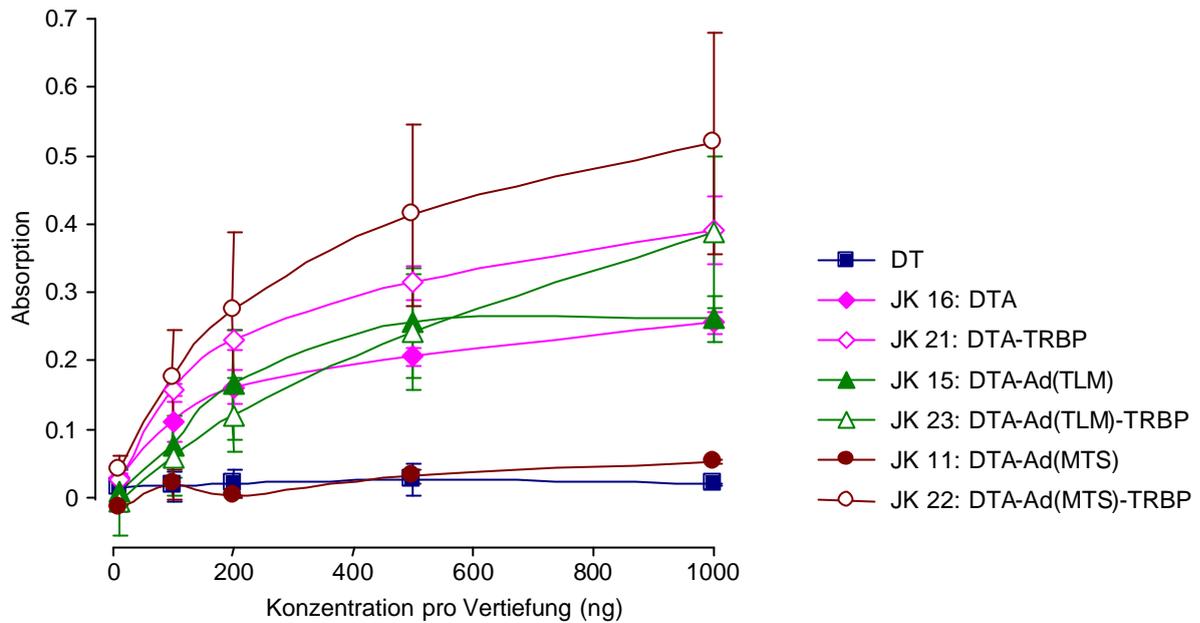


Abb. 3-44: Konzentrationsabhängige Bindung von TRBP-Konstrukten an TfR – Für die verschiedenen TRBP-Konstrukte und Kontrollen (siehe Abb. 3-40, Ad(Transfersequenz) steht für CSP-Transfersequenz-ESP) wurde mittels eines ELISA ihre Bindungsaffinität für humanen TfR bestimmt. Dazu wurde zunächst aus Plazenta gereinigter TfR immobilisiert (500 ng / Vertiefung, 90 min). Die Konstrukte wurden in verschiedenen Konzentrationen von 10–1 000 ng / Vertiefung zugegeben (in PBST, 2 h). Anschließend wurde nacheinander mit Anti-DT und RAG* (in PBST, je 30 min) inkubiert. Nach Färbung mit TMB-Lösung wurden die Absorptionssignale gemessen (450 nm, Referenz 492 nm). Dargestellt sind – aufgetragen gegen die Konzentration – die gemittelten Absorptionswerte und deren Standardabweichungen aus einer (JK 11) bzw. drei unabhängigen Meßreihen (alle anderen Konstrukte), wobei jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Als Kontrollwert für den Einfluß bakterieller Proteine auf eine TRBP-Bindung wurde ein Lysat aus pET 11d in BL21(DE3) getestet, welches Absorptionssignale im Bereich der Negativkontrolle (PBST) ergab (nicht dargestellt).

3.8.5 Funktionsanalyse von Immunoadaptortoxinen

Zur Funktionsanalyse von vollständigen Immunoadapterkonstrukten sind sehr vielfältige Ansätze denkbar. Nach einem Nachweis der enzymatischen Aktivität der im Molekül enthaltenen A-Kette von DT sind beispielsweise Cytotoxizitätstests, Immunfluoreszenzuntersuchungen sowie weitere Lokalisationsstudien vorstellbar.

3.8.5.1 ADP-Ribosylierungsaktivität von TRBP-Adaptortoxinen

Nachdem der Adapter alleine ohne Einfluß auf die enzymatische Aktivität der A-Kette von DT blieb (Adaptortoxine, siehe Abschnitt 3.7.1, Seite 99), war auch durch das Hinzufügen des TfR-Bindungspeptids TRBP nicht mit einer Abnahme der ADP-Ribosylierungsaktivität zu rechnen. Allerdings war die Untersuchung trotzdem von besonderem Interesse, da die Tag-Konstrukte JK 11, 22, 15 und 23 bei der Aufarbeitung denaturiert vorlagen. Zwar wurden die gereinigten Konstrukte zur Renaturierung gegen PBS dialysiert, doch wurde bisher nicht der Nachweis erbracht, daß dieses Verfahren für die dargestellten Konstrukte erfolgreich war.

In Abb. 3-45 sind die Ergebnisse des ADP-Ribosylierungsassays mit den verschiedenen TRBP-Konstrukten gezeigt. Alle getesteten Adapter- und Immunoadapterkonstrukte besitzen enzymatische Aktivität (Spuren 1–6). Dieses Ergebnis zeigt, daß weder der Adapter alleine noch der Adapter inklusive TRBP Einfluß auf die Aktivität von DTA nimmt. Ebenfalls ist ersichtlich, daß ein N-terminaler His-Tag keinen Effekt hat und daß eine Dialyse gegen PBS nach der denaturierenden Reinigung der Konstrukte mit *Tag* als Renaturierungsmaßnahme ausreicht. DT, von dem verschiedene Mengen eingesetzt wurden, zeigt – wie schon zuvor – eine konzentrationsabhängige ADP-ribosylierende Aktivität (Spuren 8–10, vergleiche Abb. 3-3, Seite 62), während ein pET 11d-Lysat keine Aktivität aufweist (Spur 7).

Vergleicht man abschließend die Intensitäten der einzelnen Banden im Immunoblot, so weisen die Banden, die aus der Testung von je circa 10 ng TRBP-Konstrukt resultieren, ungefähr dieselbe Intensität auf wie die Bande, die aus der Umsetzung von EF II mit 10 ng DT stammt. Auch wenn die molaren Verhältnisse nicht exakt übereinstimmen, zeigt dieser Vergleich, daß es weder durch Veränderungen im Molekül noch bei einer Expression der A Kette von DT in *E. coli* zu einer Einbuße ihrer ADP-Ribosylierungsaktivität kommt.

3.8.5.2 Cytotoxizitätstest mit TRBP-Adaptertoxinen

Für die vollständigen Immunoadaptertoxine JK 22 und 23 konnte eine TRBP-bedingte Bindung an den TfR, der im Rahmen dieser Arbeit als tumorspezifischer Rezeptor Verwendung findet, gezeigt werden (siehe Abschnitt 3.8.4, Seite 110). Ebenfalls konnte für alle derartigen Konstrukte eine ADP-Ribosylierungsaktivität nachgewiesen werden. Diese wird verursacht durch die enzymatisch aktive A-Kette von Diphtheriatoxin, die intrazellulär zu einer Inhibition der Proteinbiosynthese führt. Mit eGFP-Hilfskonstrukten konnte außerdem die Umsetzung der endosomal spaltbaren Sequenz ESP durch Membranfraktionen von HepG2-Zellen gezeigt werden (siehe Abschnitt 3.7.2, Seite 100).

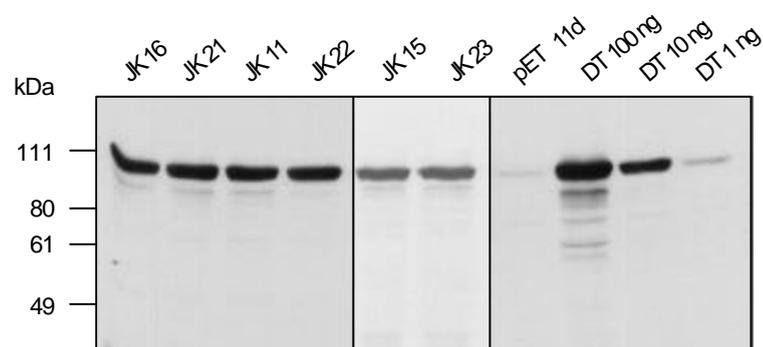


Abb. 3-45: ADP-Ribosylierungsaktivität von TRBP-Konstrukten – Die enzymatische Aktivität der A-Kette von DT in den verschiedenen TRBP-Konstrukten und Kontrollen (siehe Abb. 3-40, Seite 108) wurde im ADP-Ribosylierungsassay überprüft. Von den Konstrukten wurden jeweils 10 ng eingesetzt, für DT wurden Konzentrationen von 1–100 ng getestet. Als Negativkontrolle diente ein pET 11d-Lysat aus BL21(DE3), von dem 1 µg eingesetzt wurde. Dargestellt sind die einzelnen Ansätze im Immunoblot (Anti-Biotin / RAG*) nach gelelektrophoretischer Auftrennung (7.5%iges Gel).

Damit fehlte zu diesem Zeitpunkt für eine vollständige Charakterisierung noch der Nachweis der Funktionalität der Transfersequenzen MTS und TLM. Bereits mit einem direkt fusionierten DTA-MTS-Konstrukt war ein solcher Versuch unternommen worden. Mit dieser Studie konnte allerdings nur die Assoziation der Konstrukte an die Zellen und der Membrandurchtritt durch die Cytoplasmamembran detektiert werden (siehe Abschnitt 3.5.5, Seite 82). Mit der Herstellung von vollständigen Immunoadaptortoxinen bestand nun jedoch die Möglichkeit, MTS und TLM bezüglich ihrer Transferaktivität gegenüber der endosomalen Membran zu testen. Dazu wurde ein Cytotoxizitätstest durchgeführt, der durch die katalytische Aktivität des Toxinanteils eine höhere Sensitivität als z. B. Immunfluoreszenzuntersuchungen versprach. Unter der Annahme, daß TRBP, ESP, CSP und DTA ihre jeweiligen Funktionen erfüllen, wurde somit untersucht, ob die Immunoadaptortoxine JK 22 und 23 bei Transferaktivität von MTS oder TLM eine deutliche cytotoxische Aktivität besitzen.

Als Cytotoxizitätsassay wurde wiederum der FDA-Assay eingesetzt. HepG2-, TRVb-wt- und TRVb-hTfR-Zellen wurden dazu mit TRBP-Adaptortoxinen und entsprechenden Kontrollen in verschiedenen Konzentrationen (10^{-7} – 10^{-15} M) versetzt und für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Überlebensindizes bestimmt (Abb. 3-46).

DT zeigt bei allen getesteten Zelllinien eine ausgeprägte cytotoxische Aktivität, die sich in einem konzentrationsabhängigen, starken Abfall der Überlebensraten äußert. Erneut auffällig ist die höhere Restüberlebensrate von HepG2-Zellen gegenüber TRVb-Zellen, die bereits beschrieben wurde (siehe Abschnitt 3.4.3.2, Seite 74). DTA (JK 16) verfügt – wie erwartet – im gewählten Konzentrationsbereich nicht über eine cytotoxische Aktivität. Das entsprechende TRBP-Konstrukt (JK 21) sollte – ohne Transfersequenz und Adapter – erwartungsgemäß auch ohne Einfluß auf das Zellwachstum bleiben. Dies wird durch den parallelen Verlauf zur DTA-Kurve deutlich. Das Verhalten der Adaptortoxine (JK 11 und 15) war nur schwer vorherzusehen, da nicht klar war, ob das alleinige Anfügen des ESP für eine Blockierung der Transferaktivität von MTS und TLM ausreichte. Dies scheint aber der Fall zu sein, denn beide Adaptortoxine sind nicht cytotoxisch aktiv (ebenfalls paralleler Verlauf zu DTA). Interessanterweise konnte im Rahmen dieser Untersuchung jedoch auch für die TRBP-Adaptortoxine (JK 22 und 23) kein Einfluß auf das Zellwachstum von HepG2-, TRVb-wt- und TRVb-hTfR-Zellen nachgewiesen werden.

Um einen Verlust der enzymatischen Aktivität der getesteten Konstrukte auszuschließen, wurden die entsprechenden Kulturüberstände gesammelt und auf ihre ADP-Ribosylierungsaktivität hin untersucht. Alle Konstrukte waren auch nach der Inkubation mit HepG2-Zellen (48 h, 37 °C) weiterhin enzymatisch aktiv, wobei das entsprechende Kulturmedium alleine keine Aktivität zeigte. Ebenfalls aus diesen Überständen wurde die Stabilität der Konstrukte per Immunoblot getestet, wobei alle Konstrukte bis auf JK 22 und 23 unverändert waren. Bei den beiden TRBP-Adaptortoxinen war erwartungsgemäß eine Abnahme des Molekulargewichts zu erkennen, die mit der Halbwertszeit des ESP im Kulturmedium erklärt werden kann.

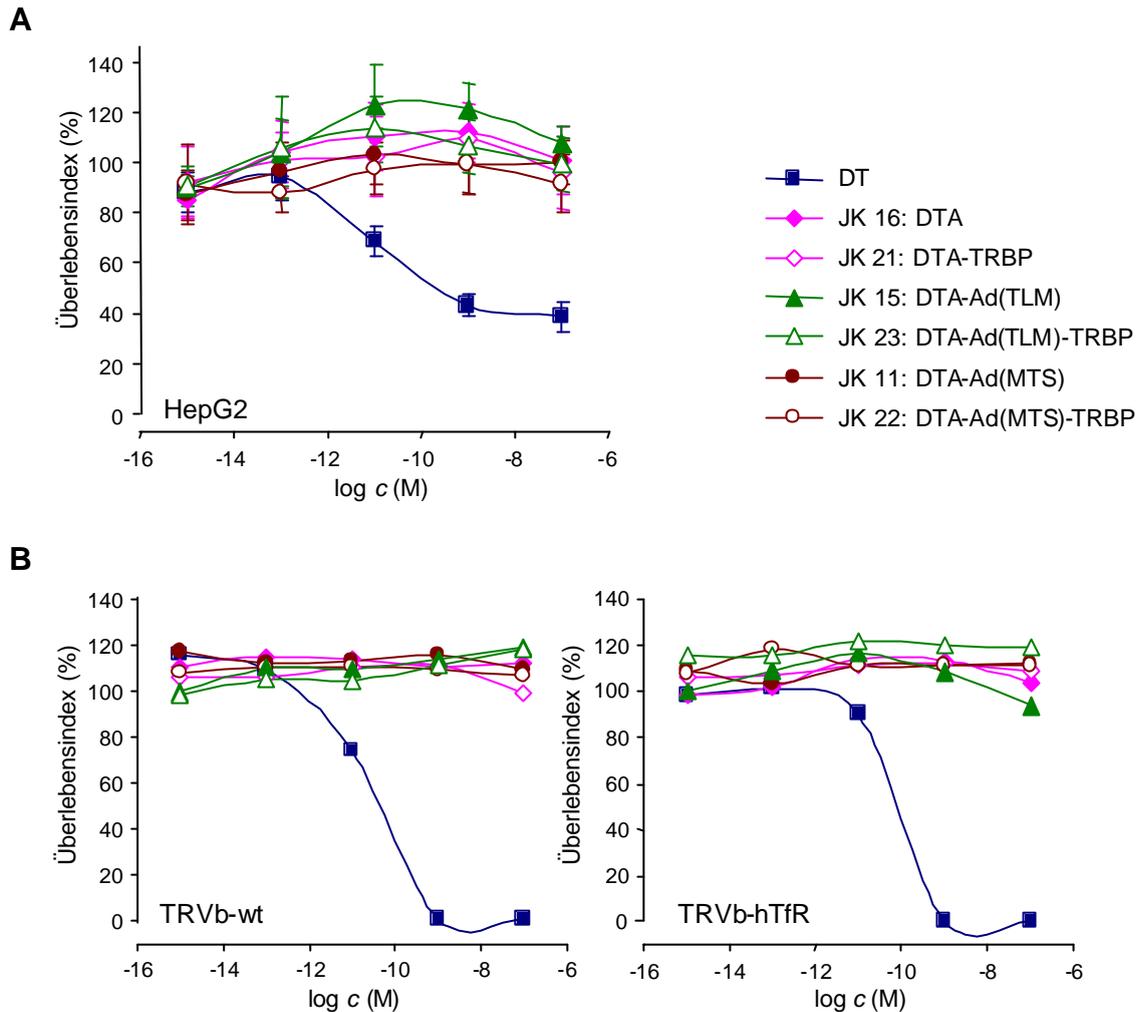


Abb. 3-46: Cytotoxizitätsbestimmung von TRBP-Adaptertoxinen und Kontrollkonstrukten an verschiedenen Zelllinien – Zur Bestimmung der cytotoxischen Aktivität der unterschiedlichen Toxin-konstrukte (JK 11, 15, 16, 21, 22 und 23, Ad(Transfersequenz) steht für CSP-Transfersequenz-ESP) wurde der FDA-Assay durchgeführt. Die verschiedenen Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät (5 000 / Vertiefung; HepG2-, TRVb-wt- oder TRVb-hTfR-Zellen) und mit den Konstrukten in Endkonzentrationen (c) von 10^{-7} – 10^{-15} M versetzt. Nach 48stündiger Inkubation wurde gründlich gewaschen und FDA-Lösung zugesetzt. Nach Inkubation im Brutschrank (1 h) wurden die Fluoreszenzsignale gemessen (Exzitation 485 nm, Emission 538 nm) und die prozentualen Überlebensindizes sowie deren Standardabweichungen berechnet (für HepG2-Zellen aus mindestens vier, für die TRVb-Zelllinien aus zwei Messungen). Als Positivkontrolle diente gekauftes DT. In Teil **A** sind die Ergebnisse für HepG2-Zellen dargestellt. Teil **B** zeigt die ermittelten Werte für TRVb-wt und TRVb-hTfR-Zellen.

Die dargestellten Ergebnisse lassen verschiedene Schlußfolgerungen zu: die Bindungsaffinität der TRBP-Adaptertoxine gegenüber TfR und ihre Endocytoseaktivität reichen nicht aus, genügend Moleküle an die Zelle zu binden und zu internalisieren oder aber die – von Beginn an als kritischer Faktor angesehene – Membrantransferaktivität der hier getesteten Sequenzen MTS und TLM ist nicht für einen Transfer von DTA aus den Endosomen ins Cytosol geeignet (siehe Diskussion Abschnitt 4.4, ab Seite 125). Durch die Gesamtkonzeption der in dieser Arbeit vorgestellten Adapterkonstrukte wird es jedoch stets unter geringem Aufwand

möglich sein, die jeweilige Struktur auszutauschen, die sich als ausschlaggebend für die erwünschte zielzellspezifische Toxizität herausstellt. Dies gilt sowohl für den tumorspezifischen Liganden, die einzelnen Adapterkomponenten als auch für das Toxin.