
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Aus der medizinischen Klinik III
Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin
Direktor: Herr Prof. Dr. E. Thiel

Etablierung eines Expressionssystems in *Pichia pastoris*
zur Herstellung von rekombinanten Fusionsantikörpern
am Beispiel des A33rbGFP Fusionsantikörpers

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
der Charité-Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von : Ulf Petrausch
aus : Berlin

Referent : Herr Prof. Dr. U. Keilholz

Korreferent : Herr Prof. Dr. B. Wittig

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 02. April 2004

1. Einleitung	1
1.1. Das kolorektale Karzinom.....	3
1.1.1. Prognose	3
1.1.2. Diagnose	4
1.1.3. Staging	4
1.1.4. Standardtherapie	5
1.1.4.1. Kurative Operation	5
1.1.4.2. Adjuvante Therapie	6
1.1.4.3. Palliative Therapie	6
1.1.4.4. Unerwünschte Wirkungen der Chemotherapie.....	7
1.1.5. Weiterentwickelte Chemotherapeutika.....	7
1.1.6. Immunologische Therapieansätze	8
1.1.6.1. Vakzinierungstherapie	8
1.1.6.2. Antikörpertherapie.....	9
1.2. Therapeutische Antikörperkonstrukte	9
1.2.1. Antikörpergesteuerte Enzym-Prodrug-Therapie (ADEPT).....	11
1.2.2. Anwendung der antikörpergesteuerten Enzym-Prodrug-Therapie beim kolorektalen Karzinom.....	13
1.3. Expressionssysteme für rekombinante Proteine.....	15
1.3.1. Expression von A33 Fusionsantikörpern in <i>Escherichia coli</i>	15
1.3.2. Verwendung von Hefen als Expressionssystem im Vergleich zu bakteriellen Expressionssystemen.....	16
1.4. Aufgabenstellung der Arbeit	21
2. Material und Methoden	22
2.1. Material	22
2.1.1. Molekularbiologische und proteinchemische Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.2. Enzyme	23
2.1.3. Primer	23
2.1.4. Vektoren und Plasmide.....	24
2.1.5. Größenmarker	24
2.1.6. Antikörper und Nachweisreagenzien zur Proteincharakterisierung	24

2.1.7. Molekularbiochemische Puffer.....	25
2.1.8. Proteinbiochemische Puffer, Lösungen und Reagenzien	25
2.1.9. Medien	27
2.1.9.1. Zellkultur	27
2.1.9.2. Hefekultur	27
2.1.9.3. Bakterienkultur	28
2.1.10. Kompetente Zellen.....	29
2.1.10.1. Bakterien.....	29
2.1.10.2. Hefen	29
2.1.11. Zelllinien.....	29
2.1.12. Laborinventar.....	30
2.1.13. Verbrauchsmaterialien.....	31
2.2. Kits	31
2.2.1. QIAprep Miniprep Plasmidisolierung	31
2.2.2. HiSpeed Plasmid Purification Midi Kit.....	32
2.2.3. Gel-Extraktions-Kit	33
2.2.4. Topo TA Cloning Kit.....	34
2.3. Methoden.....	36
2.3.1. Molekularbiochemische Methoden	36
2.3.1.1. Restriktionsspaltung	36
2.3.1.2. Agarose-Gelelektrophorese	36
2.3.1.3. Ligation von DNA-Fragmenten.....	37
2.3.1.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	38
2.3.1.5. Hitzeschock Transformation von Bakterien.....	40
2.3.1.6. Elektroporation von Hefezellen.....	41
2.3.2. Proteinbiochemische Methoden.....	42
2.3.2.1. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	42
2.3.2.2. Transfermethode: halbtrockener (semi dry) Western Blot.....	43
2.3.2.3. Antikörper und Liganden beim Western Blot	43
2.3.2.4. Coomassie-Färbung von gelelektrophoretisch getrennten Proteinen	44
2.3.3. Kulturen von Tumorzelllinien	44
2.3.4. Bakterienkultur	45
2.3.5. Hefezellkulturen	45
2.3.6. Immunhistologie	46
2.3.6.1. Fluoreszenzmikroskopie.....	46
2.3.6.2. Fluoreszenzdurchflusszytometrie (FACS)	46
2.3.6.3. Inkubation der Zelllinien mit Antikörpern oder Fusionsantikörpern	47

3. Ergebnisse	48
3.1. Funktionsprüfung des bakteriellen Expressionssystems	48
3.2. Etablierung und Optimierung der Nachweismethoden	52
3.3. Klonierung eines pPIC 9 K-A33rbGFP-Vektorkonstrukts	53
3.4. Transformation von <i>Pichia Pastoris</i> mit dem pPIC 9 K-A33rbGFP-Konstrukt.....	57
3.5. Expression des A33rbGFP Fusionsantikörpers in <i>Pichia Pastoris</i>	57
3.6. Expressionsversuch eines pPIC 9-A33rbCD-Vektorkonstrukts	61
3.7. Klonierung eines pPIC 9 K-A33rbCD-Vektorkonstrukts	64
3.8. Kontrolle der genomischen Integration des A33rbCD-Vektorkonstrukts.....	66
3.9. Expressionsversuch des A33rbCD Fusionsantikörpers in <i>Pichia pastoris</i>	67
3.10. Optimierungsversuch der Sensitivität des Protein L/Streptavidin Western Blots.....	68
3.11. Expressionsversuch im Such-Maßstab von einem Milliliter.....	69
3.12. Klonierung eines A33-Fusionskonstrukts mit einer aus der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> stammenden Cytosindeaminase (A33rbCDy)	70
3.13. Funktionsnachweis des A33rbGFP Fusionsantikörpern mittels Fluoreszenzmikroskopie	74
3.14. Funktionsnachweis des A33rbGFP Fusionsantikörpers mittels Durchflusszytometrie ..	75
3.15. Analyse des Fluoreszenzverhaltens verschiedener Tumorzelllinien.....	79
3.16. Biosensor-Analyse des Bindungsverhaltens des A33rbGFP Fusionsantikörpers	80
3.17. Funktionstest des A33rbGFP Fusionsantikörpers am klinischen Resektat.....	82
4. Diskussion	83
4.1. Etablierung eines Expressionssystems zur Herstellung eines funktionellen A33rbGFP Fusionsantikörpers in <i>Pichia pastoris</i>	84
4.1.1. Transformation und Selektion von <i>Pichia pastoris</i> Klonen	84
4.1.2. PCR-Analyse zur Überprüfung der genomischen Integration.....	85
4.1.3. Expression des Fusionsproteins A33rbGFP	86
4.1.4. Funktionsanalyse des Fusionsproteins A33rbGFP	86
4.1.4.1. Semiquantitative Funktionsanalyse des Fusionsproteins A33rbGFP	87

4.1.4.2. Quantitative Funktionsanalyse des Fusionsproteins A33rbGFP	88
4.2. Versuch der Etablierung eines Hefeexpressionssystems für den A33rbCD Fusionsantikörper.....	91
4.2.1. Nachweis des A33rbCD Fusionsantikörpers	91
4.2.2. Expressionsversuch des A33rbCD Fusionsantikörpers	92
4.3. Anwendungen und Perspektiven von A33-Fusionsantikörpern.....	96
4.3.1. Detektierung des A33-Oberflächenantigens durch den A33rbGFP Fusionsantikörper	97
4.3.2. Der A33rbGFP Fusionsantikörper als Werkzeug zur Etablierung einer antikörpergesteuerten Enzym-Prodrug-Therapie	100
5. Zusammenfassung.....	102
6. Literaturverzeichnis.....	104

Abkürzungen und Begriffe

SI-Einheiten und andere international festgelegte Abkürzungen sind hier nicht angegeben.

ADEPT	Antibody directed Enzym Prodrug Therapy
APS	Amoniumperoxidsulfat 10 % in Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
CD	Cytosindeaminase
CDR	Complementarity Determining Region
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Fluorescence Activated Cell Scanning
FCS	fötales Kälber Serum
GFP	Green-Fluorescent-Protein, eingetragener Markennahme der Firma, BD Biosciences / Clontech
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isoprooyl- β -D-Thiogalactosid
kbp	Kilobasenpaar
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline Solution)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
RNA	Ribonukleinsäure
scFv	single-chain-Fragment variable
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
YNB	Yaest Nitrogen Bases

