

**BEDEUTUNG SPALTBARER
PEPTIDLINKER FÜR DIE FUNKTION
REKOMBINANTER SAPORIN-EGF-
IMMUNOTOXINE**

Dissertation
vorgelegt am
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Iring Heisler

Berlin 2003

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin unter Leitung von Prof. Dr. R. Tauber in der Arbeitsgruppe von Dr. H. Fuchs angefertigt.

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Hendrik Fuchs

2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Erdmann

Tag der Disputation: 14.07.2003

Abstract

Over the last few years there has been an increased interest in Immune-therapeutic procedures for the treatment of cancer due to the serious side effects of conventional cytostatic drugs. Immunotoxins, which consist of a tumor-specific antibody, antibody fragment or ligand and a highly active toxic domain of a protein toxin, represent a promising concept for such a therapy. Therapy success is determined mainly by (A) the selectivity of the cell-specific ligand, (B) the effectiveness of the cytosolic uptake, (C) the cytotoxic activity of the toxin, (D) the immunogenicity as well as (E) effective tumor penetration dependent on immunotoxin size and (F) the stability of the Immunotoxins.

In this work a universal molecular adapter was constructed for optimizing immunotoxins with respect to an efficient accumulation of the toxin in the cytosol of the cells to prevent undesirable side effects, due to the high stability of conventional immunotoxins. The adapter consists of a membrane-transfer-peptide flanked N-terminal by a cytosolic and C-terminal by an endosomal cleavable sequence and connects the toxin with the ligand. As tumor-specific ligand epidermal growth factor (EGF) and as toxin ribosome-inactivating protein saporin were used.

A multi-enzyme assay was developed to determine the enzymatic activity of the recombinant saporin. The N-glycosidase activity, the mechanism of action of saporin, can be quantified on the basis of the specifically set free adenine from a DNA substrate. The endosomal cleavable peptide contains the natural and a mutated sequence from Pseudomonas exotoxin and Diphtheria toxin, respectively. The cytosolically cleavable peptide consists of three recognition sequences for Caspase-1, Caspase-3, Procaspase-3 and a protease from yeast. In this work the functionality of the adapter *in vitro* could be proven and optimized by modification regarding its plasma stability. After the successful construction and purification several immunotoxins with and without adapter the IC₅₀ values were determined on different cell lines using an assay which converts fluorescein diacetate to fluorescein. The immunotoxins exhibited ligand specificity and are highly cytotoxic with IC₅₀ values of ± 2 nM.

To examine the effect of the adapter on reducing side effects for normal differentiated cells, a tumor-similar environment was simulated. The effect of cell-specific

inactivation and accumulation of the immunotoxins were examined. The data suggest that the adapter reduces the potential of the side effects for the immunotoxins.

Further researche in the laboratory showed that use of other toxins and ligands requires modifications within the adapter for optimal activity. Due to the modular structure of the adapter on a molecular level the functional domains can be easely exchanged thus the adapter offers an unique possibility of optimising Immunotoxine for a specific cancer therapy in simple manner.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGEN	X
1 EINLEITUNG	1
1.1 Tumorbehandlungen	1
1.2 Problembereiche für neue Verfahren in der Tumorthherapie	2
1.2.1 Tumorstruktur und Physiologie	2
1.2.2 Zelluläre und biochemische Barrieren	3
1.3 Strategien zur gezielten Freisetzung von Wirkstoffen in Tumorzellen	3
1.4 Immunokonjugate	5
1.4.1 Unkonjugierte Antikörper	6
1.4.2 Bispezifische Antikörper	7
1.4.3 Antikörperkonjugate kleiner cytotoxischer Wirkstoffe	8
1.5 Immunotoxine	9
1.5.1 Toxine	9
1.5.2 Liganden	11
1.6 Aktuelle Entwicklung von Immunotoxinen	13
1.7 Therapeutische Grenzen der Immunotoxine	14
1.8 Verknüpfung von Toxin und Ligand	15
1.8.1 Endosomal und lysosomal spaltbare Sequenzen	16
1.8.2 Cytosolisch spaltbare Sequenzen	16
1.8.3 Toxinunabhängiger Membrantransfer	17
1.9 Zielsetzung der Arbeit	19
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Geräte	21
2.1.1 Elektrophorese und Westernblot	21
2.1.2 Zell- und Bakterienkultur	21
2.1.3 Zentrifugen	21
2.1.4 Weitere Geräte	22
2.2 Verbrauchsmaterialien	22
2.2.1 Zell- und Bakterienkultur	22
2.2.2 Chemikalien	23

2.2.3	Primärantikörper	24
2.2.4	Sekundärantikörper	24
2.2.5	Enzyme	24
2.2.6	Kits	25
2.2.7	Sonstige Verbrauchsmaterialien	25
2.2.8	Oligonucleotide	26
2.2.9	Bakterienstämme	26
2.2.10	Bakterienmedien und Pufferlösungen	27
2.3	Molekularbiologische Methoden	27
2.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.3.2	Agarosegelelektrophorese	27
2.3.3	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	28
2.3.4	Restriktionsverdau	28
2.3.5	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	28
2.3.6	Phosphorylierung von DNA	29
2.3.7	Ligation von DNA-Fragmenten	29
2.3.8	Herstellung kompetenter Bakterienzellen nach Hanahan	29
2.3.9	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	30
2.3.10	Präparation von Plasmid-DNA	30
2.3.10.1	Maxipräparation	30
2.3.10.2	Minipräparation	30
2.3.11	DNA-Sequenzierung	31
2.3.12	Herstellung von EGF-cDNA	31
2.3.13	Reinigung der 60S-Ribosomen und deren 28S-rRNA aus Leber	31
2.3.14	Reinigung mitochondrialer DNA	32
2.3.15	Umsetzung der Toxine mit Nukleinsäure-Substraten	32
2.3.16	Adeninquantifizierung	33
2.4	Chromatographische Methoden	33
2.4.1	Affinitätschromatographie (Nickel-NTA)	33
2.4.1.1	Reinigung unter nativen Bedingungen	33
2.4.1.2	Reinigung unter denaturierenden Bedingungen (nach Qiagen)	34
2.4.2	Kationenaustauschchromatographie	34
2.4.3	Peptid-Affinitätschromatographie	34
2.4.3.1	Herstellung einer Saporinpeptidsäule mit Affi-10-Säulenmaterial.	34
2.4.3.2	Affinitätschromatographie mittels einer Saporinpeptid-Säule	35
2.4.4	Gelfiltration	35
2.5	Proteinbiochemische Methoden	36
2.5.1	Proteinexpression	36

2.5.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	36
2.5.3	Dialyse von Proteinen	36
2.5.4	Aufkonzentrierung von Proteinen	36
2.5.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.5.6	Gelfärbungen und Trocknen von Gelen	38
2.5.6.1	Färbung mit Coomassie-Blau	38
2.5.6.2	Silberfärbung	38
2.5.6.3	Trocknen von Gelen	38
2.5.7	Westernblot	39
2.5.7.1	Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen (<i>Semi-Dry-Verfahren</i>)	39
2.5.7.2	Immunoblot	39
2.5.8	Toxinspaltung <i>in vitro</i>	40
2.5.8.1	Spaltung im Cytosol und durch Caspasen	40
2.5.8.2	Spaltung durch Membranfraktionen und Furin	40
2.5.8.3	Spaltung in humanem Serum	40
2.6	Zellbiologische Methoden	41
2.6.1	Zellkultur	41
2.6.2	Kultivierung der Zelllinien	41
2.6.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	41
2.6.4	Cytotoxizitätsassay	42
2.6.5	Transferassay	42
2.6.6	Induktion einer Apoptose durch Staurosporin	43
2.6.7	Zellaufschlussverfahren	43
2.6.7.1	Zelllyse	43
2.6.7.2	Cytosolisolierung modifiziert nach Dignam <i>et al.</i> [153]	43
2.6.7.3	Zellaufschluss durch fraktionelle Zentrifugation	44
3	ERGEBNISSE	45
3.1	Entwicklung und Evaluierung eines Multienzymassays zur Quantifizierung von freiem Adenin	45
3.1.1	Entwicklung und Optimierung des Adeninquantifizierungsassays	45
3.1.1.1	Optimierung der Phosphatdetektion	46
3.1.1.2	Optimierung der Pyrophosphatase-Konzentration	47
3.1.1.3	Einstellung der APRT-Konzentration	48
3.1.1.4	Einfluss der PRPP-Konzentration	48
3.1.1.5	Bestimmung der 5'-Nucleotidase-Konzentration	49
3.1.1.6	Kinetische Untersuchung der Adeninumsetzung	50
3.1.2	Evaluierung des Assays für Toxine und Nukleinsäuresubstrate	51
3.2	Entwicklung eines Immunoadaptortoxins	53

3.2.1	Die Toxin-Komponente	54
3.2.1.1	Herstellung von Antikörpern	54
3.2.1.2	Rekombinante Darstellung der Toxine	55
3.2.1.3	Aufreinigung von Saporin über einen N-terminalen His-Tag	57
3.2.1.4	Deletionsmutanten	59
3.2.2	Die Adapterherstellung	60
3.2.2.1	Klonierung von SapAd _{CM}	62
3.2.2.2	Klonierung von ESP, TLM und CSP*	62
3.2.2.3	Expression und Reinigung	63
3.2.3	Immunoadaptortoxine mit Ligand	65
3.2.3.1	Klonierung	65
3.2.4	Funktionsanalyse der cytosolisch spaltbaren Peptidsequenz CSP	68
3.2.5	Funktionsanalyse der endosomal spaltbaren Peptidsequenz (ESP)	71
3.2.6	Untersuchung der Stabilität von Immunoadaptortoxinen in humanem Blutplasma	72
3.3	N-Glycosidaseaktivität der Toxinkonstrukte	73
3.4	Cytotoxizität der Immunoadaptortoxine	73
3.4.1	Auswahl der Zielzellen für den Cytotoxizitätsassay	74
3.4.2	Kalibrierung des FDA-Assays	74
3.4.3	Messung der immunotoxinabhängigen Cytotoxizität	75
3.4.4	Berechnung der IC ₅₀ -Werte der Immunotoxine	79
3.5	Transferassay	81
3.6	Bindung des Liganden an die Zielzelle	83
4	DISKUSSION	85
4.1	Toxindomäne	85
4.1.1	<i>In vitro</i> -Testsystem für RIPs: Der Adeninquantifizierungsassay	85
4.1.2	Rekombinante Darstellung	87
4.1.3	Erzeugung von Deletionsmutanten	87
4.1.4	Funktionelle Charakterisierung	88
4.2	Adapterdomäne	88
4.2.1	ESP	89
4.2.2	TLM	90
4.2.3	CSP	90
4.3	Ligand	91
4.4	Immunoadaptortoxine	93
4.4.1	Bestimmung der cytotoxischen Aktivität	93
4.4.2	Universalität des Adapters	97
4.5	Ausblick	98
5	ZUSAMMENFASSUNG	100

6	LITERATURVERZEICHNIS	102
7	ANHANG	112
7.1	<i>S.officinalis</i> mRNA für Saporin-3	112
7.2	<i>S.officinalis</i> Proteinsequenz für Saporin-3	112
7.3	Adaptersequenzen	113
8	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	114
9	LEBENS LAUF	116
10	DANKSAGUNG	117

Abkürzungen

% (v/v)	Prozentgehalt Volumen am Gesamtvolumen (ml/100 ml)
% (w/v)	Prozentgehalt Masse am Gesamtvolumen (g/100 ml)
λ	Wellenlänge
\varnothing	Durchmesser
AMMP	2-Amino-6-mercapto-7-methylpurin
Anorg. PPI-ase	Anorganische Pyrophosphatase
anti-Saporin	Antikörper gegen Saporin
APRT	Adeninphosphoribosyltransferase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	2,2'-Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	die der <i>Messenger</i> -RNA komplementäre DNA
CSP	cytosolisch spaltbare Peptidsequenz
Da	Dalton (g/mol)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium mit L-Alanyl-L-Glutamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DT	Diphtheriatoxin
DTA	enzymatisch aktive A-Kette von Diphtheriatoxin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , Sicherheitsstamm K 12
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF II	eukaryotischer Elongationsfaktor II
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
eGFP	in seinen Fluoreszenzeigenschaften verändertes GFP
EPR	erhöhte Permeabilität und Retention
ESP	endosomal spaltbare Peptidsequenz
FBP	folatbindendes Protein
FCS	fetales Kälberserum
FDA	Fluoresceindiacetat
HER	humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
HRP	Peroxidase aus Meerrettich

hsDNA	Hering-Sperma-DNA
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IL 2	Interleukin 2
IP	isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galaktopyranosid
LRP	<i>lung resistance protein</i>
M	(mol/l)
MAb	Monoklonaler Antikörper
MDR	<i>multi drug resistance</i>
MDRP	<i>multi drug resistance related protein</i>
MESG	2-Amino-7-mercapto-methylpurinribonucleosid
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MTS	Membrantransfersequenz nach Rojas <i>et al.</i> [1]
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
OD _x	optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge $\lambda = x$ nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin
PEN	Penetratin nach Derossi <i>et al.</i> [2]
Pi	Phosphat
PKC	Proteinkinase C
PNP	Purinnucleosidphosphorylase
PPi	Pyrophosphat
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
RIP	ribosomeninaktivierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTA	A-Kette von Ricin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPDP	N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propinoat
Tf	Transferrin
TfR	Transferrinrezeptor
TLM	Translokationsmotiv nach Oess und Hildt [3]
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
U	die für einzelne Substanzen und Enzyme in spezifischen Testsystemen ermittelte Aktivität in Einheiten (Unit)
VLS	<i>vascular leak syndrom</i>
wt	Wildtyp
$x \times g$	x -faches der Erdbeschleunigung ($g = 9.80665 \text{ m/s}^2$)