

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung und Evaluierung eines Multienzymassays zur Quantifizierung von freiem Adenin

Einen wesentlichen Teil dieser Arbeit stellt die rekombinante Darstellung verschiedener Fusionsvarianten ribosomeninaktivierender Proteine (RIPs) dar. Dies erfordert einen geeigneten *in vitro*-Assay zur Bestimmung der Enzymaktivität von RIPs. Da die bisher beschriebenen Verfahren gravierende Mängel aufweisen, wurde in dieser Arbeit zunächst eine neuartige Methode in Form eines Multienzymassays (Abbildung 3) entwickelt. Dieser stützt sich auf die N-Glycosidaseaktivität der RIPs, die die Quantifizierung von Adenin durch Freisetzung aus Nukleinsäuresubstraten erlaubt.

Die Schlüsselreaktion des Assays ist die enzymatische Umwandlung von Adenin mit Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) zu AMP und Pyrophosphat (PPi) mittels der Adeninphosphoribosyltransferase (APRT, siehe Abbildung 3). Im selben Reaktionsansatz werden (i) das entstandene AMP durch eine 5'-Nucleotidase zu Adenosin und einem Phosphat (Pi) und (ii) das Pyrophosphat durch die Anorganische Pyrophosphatase zu zwei Phosphatresten umgesetzt. Die in diesen Reaktionen aus einem Adenin entstandenen drei Phosphatreste werden nun mit Hilfe eines Phosphat-Detektions-Kit (Molecular Probes) in demselben Ansatz quantifiziert. Durch das Enzym Purinnucleosidphosphorylase (PNP) wird dabei durch Phosphorylyse das künstliche Substrat 2-Amino-7-mercapto-methylpurinribonucleosid (MESG) zu Phosphorylribose (PR) und 2-Amino-6-mercapto-7-methylpurin (AMMP) gespalten und dadurch ein messbarer Absorptionsshift von 330 nm zu 355 nm erreicht.

3.1.1 Entwicklung und Optimierung des Adeninquantifizierungsassays

Um einen hohen Probendurchsatz zu ermöglichen, wurde zunächst das Reaktionsvolumen von 1 ml (Herstellerangaben zum Phosphat-Detektions-Kit) auf 200 μ l reduziert. Dieser Schritt ermöglichte die spätere photometrische Messung in 96-Well-Platten. Da die Reduzierung des Probenvolumens nicht die Linearität und Dynamik des Assays beeinflussen sollte, mussten die optimalen Konzentrationen von MESG und dem

Enzym PNP für die Phosphatdetektion neu eingestellt werden. Durch Variation der Konzentration wurden anschließend schrittweise die optimalen Mengen der anderen an der Nachweisreaktion beteiligten Enzyme (APRT, 5'-Nucleotidase, Anorganische Pyrophosphatase) bestimmt.

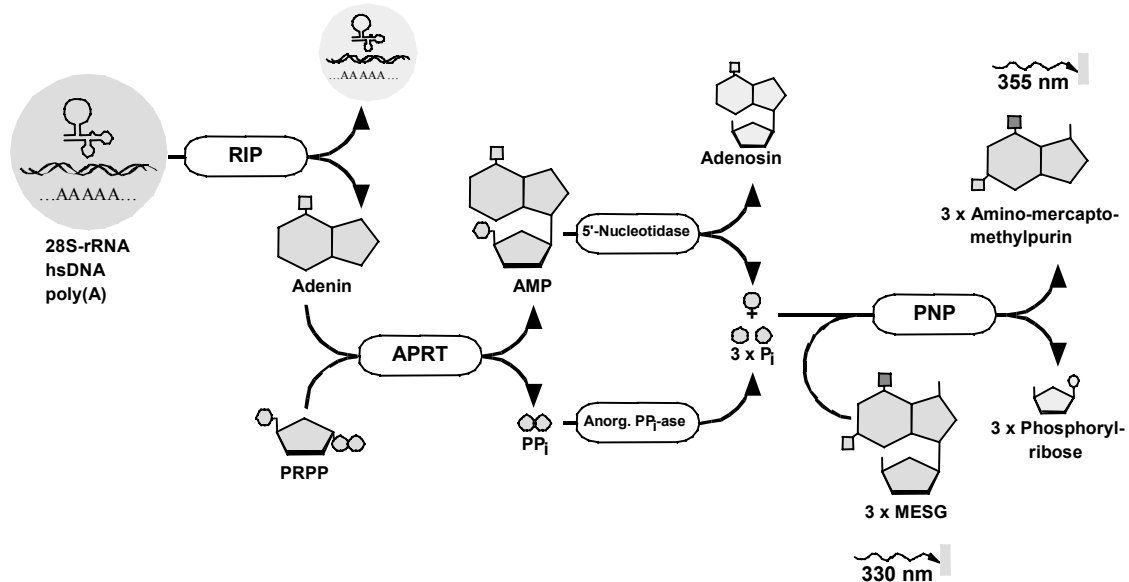


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Adeninquantifizierungsassays. Die Substrate und Produkte des Assays sind grau unterlegt, die Enzyme sind eingekreist dargestellt. Die Schlüsselreaktion ist die Umwandlung des durch die RIPs aus den DNA- oder RNA-Substraten freigesetzten Adenins zu AMP und Pyrophosphat (PPi) durch die Adeninphosphoribosyltransferase (APRT). In der weiteren Umsetzung wird das PPi durch die Anorganische Pyrophosphatase (Anorg. PPi-ase) zu Phosphat (Pi) und das AMP durch die 5'-Nucleotidase zu Pi und Adenosin gespalten. Das photometrisch messbare Signal entsteht durch die Phosphorylyse von 2-Amino-6-mercapto-7-methylpurinribonucleosid (MESG) zu Aminomercapto-methylpurin katalysiert durch die Purinnucleosidphosphorylase (PNP).

3.1.1.1 Optimierung der Phosphatdetektion

Für die letzte Teilreaktion der Adeninquantifizierung, die Umsetzung von MESG, wurde mit Phosphat als Standard zunächst die PNP-Konzentration und die MESG-Menge den neuen Bedingungen angepasst. Der Ablauf der Reaktion konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=360$ nm verfolgt werden. Um die Reaktion geräteunabhängig durchführen zu können, wurde die Wellenlänge der gängigen Filter gewählt.

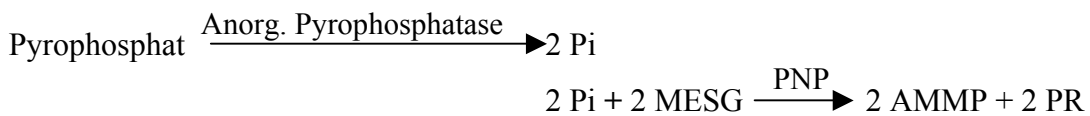


Bei konstant gehaltener Menge an Phosphat (10 mM) und MESG (0.25 mM) wurde zunächst die Menge an PNP variiert. Für PNP ergab sich hierbei eine optimale

Konzentration von 0.25 mM, die leicht unter der vom Hersteller angegebenen Menge (0.3 mM) liegt. Anschließend wurde bei konstantem Phosphat (10 nM) und PNP (0.25 mM) die MESG-Konzentration optimiert. Für MESG stellte sich eine im Vergleich zu den Angaben des Herstellers leicht erhöhte Menge als optimal heraus (0.2 mM statt 0.16 mM).

3.1.1.2 Optimierung der Pyrophosphatase-Konzentration

In einem weiteren Schritt wurde die nächste Teilreaktion optimiert.



Hierzu wurde diesmal die Pyrophosphatmenge konstant gehalten. Für die Reaktion wurden 10 nM Pyrophosphat als Substrat der Anorganischen Pyrophosphatase, 0.2 mM MESG und 0.25 mM PNP eingesetzt. In Abbildung 4 ist die zeitabhängige Umsetzung bei vier unterschiedlichen Konzentrationen an Anorganischer Pyrophosphatase dargestellt. Ohne Enzym war fast kein Hintergrundsignal zu detektieren. Bei 5, 10 und 20 mU der Pyrophosphatase wurde für die Umsetzung von 10 nmol Pyrophosphat ein fast identisches Endpunktsignal nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (11, 6, und 3.5 min) gemessen. Für die Adeninquantifizierung wurden im weiteren 10 mU Pyrophosphatase als Standard verwendet, da sich diese Menge bezüglich der Abwägung zwischen dem Materialverbrauch und der Umsetzungsgeschwindigkeit (1.67 nmol Substrat / min) als optimal herausstellte.

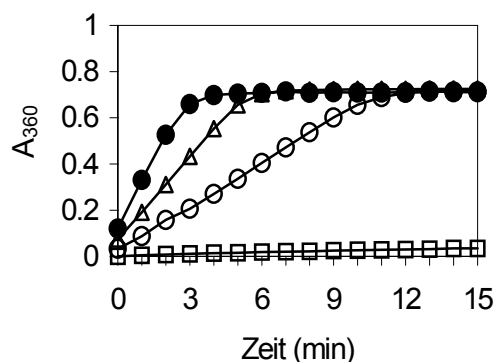
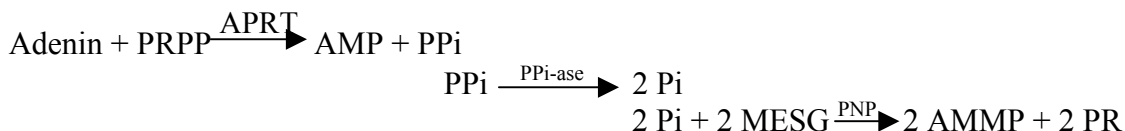


Abbildung 4: Kinetik der pyrophosphataseabhängigen Umsetzung von MESG. Pyrophosphat (10 nmol) wurde in Abwesenheit von Adenin und APRT mit unterschiedlichen Mengen Anorganischer Pyrophosphatase und Pyrophosphat inkubiert und die resultierende Spaltung von MESG detektiert. Die Steigung entspricht der Hydrolyserate, das Plateau dem kompletten Umsatz von Pyrophosphat. (□) ohne Pyrophosphatase, mit (○) 5 mU, (△) 10 mU, (●) 20 mU Pyrophosphatase.

3.1.1.3 Einstellung der APRT-Konzentration

Essentiell für den Assay ist die Umwandlung von freiem Adenin mit PRPP durch die APRT.



Zur Bestimmung der optimalen Konzentration von APRT wurden konstante Mengen von 5 nmol Adenin und 50 nM PRPP eingesetzt. Für die Pyrophosphatase wurden 10 mU gewählt, die Konzentrationen von MESG und PNP lagen bei 0.2 mM bzw. 0.25 mM. Variiert wurde die Konzentration an APRT, die zwischen 0 und 24 mg/ml lag. In Abbildung 5 ist die APRT-abhängige Umsetzung von MESG gezeigt.

Ohne APRT konnte keine Veränderung der Absorption gemessen werden. Bei den unterschiedlichen Konzentrationen von APRT (3, 6, 12 und 24 mg/ml) wurde eine Umsetzung des Adenins (5 nmol) nach 600, 240, 180 und 120 sec erreicht. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde eine Konzentration von 12 mg/ml verwendet. Bei dieser Konzentration wird das Substrat Adenin mit derselben Rate (1.67 pmol/min) durch APRT umgesetzt wie das entstehende Produkt PPi durch 10 mU Pyrophosphatase.

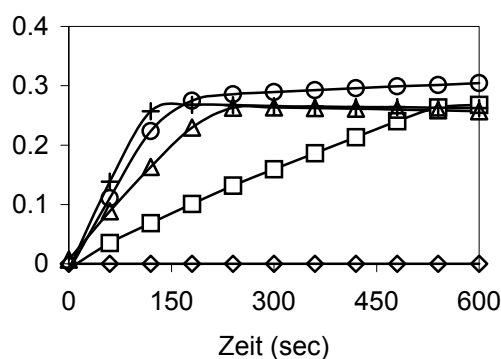


Abbildung 5: Kinetik der APRT-abhängigen Umsetzung von MESG. Adenin (5 nmol) wurde mit unterschiedlichen Mengen an APRT umgesetzt und die resultierende Phosphorylyse von MESG detektiert. Die Steigung entspricht der Bildung von AMP und PPi bei Konzentrationen von (◇) 0 mg/ml APRT, (□) 3 mg/ml, (△) 6 mg/ml, (○) 12 mg/ml und (+) 24mg/ml. Das Absorptionsmaximum entspricht dem vollständigen Umsatz von 5 nmol Adenin.

3.1.1.4 Einfluss der PRPP-Konzentration

Untersuchungen bezüglich des Einflusses unterschiedlicher Mengen an PRPP für die Reaktion zeigten, dass in Abwesenheit von Adenin die Pyrophosphatase bei hohen

Konzentrationen von PRPP in der Lage ist, hieraus kleine Mengen an Phosphat freizusetzen. Für geringe Mengen an PRPP von 10 bis 20 nmol wurde ein Hintergrundsignal gemessen, welches der Freisetzung von Pi aus 0.1 nmol Adenin entspricht. Bei 50 und 100 nmol stieg dieses Hintergrundsignal an und entspricht einer Menge von 0.3 bzw. 1.2 nmol Adenin. Um eine optimale Sensitivität mit einem möglichst geringen Hintergrund zu erzielen, wurde für die Reaktion eine Menge von 30 nmol PRPP gewählt. Das entspricht einem dreifachen molaren Überschuss gegenüber dem Substrat Adenin bei Verwendung der höchsten Adeninkonzentration im linearen Bereich des Assays.

3.1.1.5 Bestimmung der 5'-Nucleotidase-Konzentration

Eine weitere wichtige Reaktion stellt die Umsetzung von AMP zu Adenosin und einem weiteren Phosphat durch die 5'-Nucleotidase dar. Durch dieses zusätzliche Enzym entstehen aus einem Adenin insgesamt drei Phosphate, wie aus der folgenden Reaktionsgleichung hervorgeht.

APRT	$1 \text{ Adenin} + 1 \text{ PRPP} \rightarrow 1 \text{ AMP} + 1 \text{ PPi}$
Pyrophosphatase	$1 \text{ PPi} \rightarrow 2 \text{ Pi}$
5'-Nucleotidase	$1 \text{ AMP} \rightarrow \text{Adenosin} + 1 \text{ Pi}$
Gesamt	$1 \text{ Adenin} + 1 \text{ PRPP} \rightarrow 1 \text{ Adenosin} + 3 \text{ Pi}$

Die optimale Konzentration der 5'-Nucleotidase wurde in einem Versuchsansatz mit konstanten Mengen an Adenin (5 nmol) und den bereits optimierten Mengen an APRT, PRPP, MESG, PNP und Pyrophosphatase bestimmt. Dabei ergab sich für die 5'-Nucleotidase eine optimale Konzentration von 125 mU/ml.

Die Kalibrierungskurven für Adenin (0–5 nmol) zeigen unter gleichen Versuchsbedingungen Steigungsverhältnisse von 2.8 : 2 in Gegenwart gegenüber Abwesenheit von 5'-Nucleotidase und bestätigen damit klar das theoretisch zu erwartende Verhältnis der Menge an freigesetztem Phosphat von 3:2 (Abbildung 6).

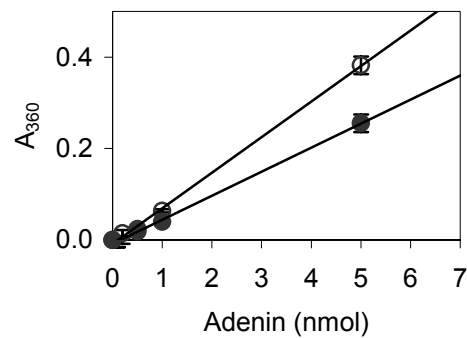


Abbildung 6: Verstärkender Effekt der 5'-Nucleotidase. Vollständiger Adeninquantifizierungsassay mit Standardkonzentrationen an APRT in An- (○) und Abwesenheit (●) von 125 mU/ml 5'-Nucleotidase. Die Steigungen der Ausgleichsgeraden (0.047 und 0.065 pro nmol Adenin) stehen in einem Verhältnis von 2 zu 2.8, was einer Umsetzung von 80 % des AMP zu Adenosin und Phosphat entspricht.

3.1.1.6 Kinetische Untersuchung der Adeninumsetzung

Zur Optimierung der Reaktionszeiten bei der Messung unterschiedlicher Mengen an Adenin wurde die Absorption im Zeitverlauf beobachtet. Hierfür wurden 0–20 nmol Adenin eingesetzt und zusammen mit den optimierten Mengen der notwendigen Enzyme und Substrate umgesetzt. Wie eindeutig in Abbildung 7 zu sehen ist, waren nach 15 min Inkubationszeit nahezu keine Veränderungen in der Farbreaktion mehr zu detektieren. Die Werte, die nach 15 min bei diesen Adeninkonzentrationen erhalten wurden (Abbildung 8), wiesen eine strikte Proportionalität der Absorption in einem Bereich von 0.2 nmol bis 10 nmol auf, was eine Quantifizierung der Adeninkonzentration in einem sehr großen Messbereich ermöglicht.

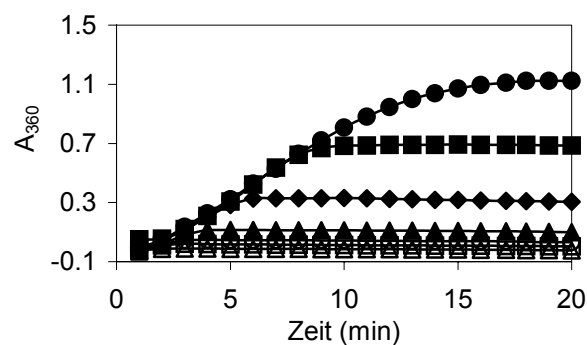


Abbildung 7: Kinetik der colorimetrischen Messung der adeninabhängigen Phosphatbildung. Adeninquantifizierungsassay mit Standardkonzentrationen von Adenin: (Δ) 0.2 nmol Adenin, (□) 0.5 nmol, (○) 1 nmol, (▲) 2 nmol, (◆) 5 nmol, (■) 10 nmol, (●) 20 nmol. Die Messung erfolgte unter optimierten Standardbedingungen. Die Absorption ohne Adenin wurde als Hintergrund abgezogen.

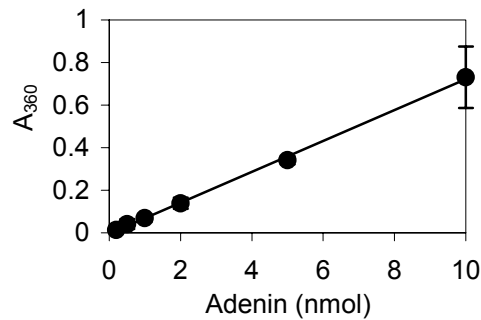


Abbildung 8: Bestimmung der Absorption nach 15 min Inkubation mit unterschiedlichen Adeninkonzentrationen. Die Abbildung zeigt die strikt lineare Relation zwischen der Menge an Adenin und der gemessenen Absorption im Bereich von 0.2 nmol bis 10 nmol im Adeninquantifizierungsassay.

3.1.2 Evaluierung des Assays für Toxine und Nukleinsäuresubstrate

Die RIPs haben als Klasse der N-Glycosidasen nicht nur die Eigenschaft, aus der 28S-rRNA der 60S-Ribosomen, sondern auch aus unterschiedlichen nukleinsäurehaltigen Substraten Adenin abzuspalten. Daher wurde zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der RIPs die zeit- und konzentrationsabhängige Freisetzung von Adenin aus unterschiedlichen Substraten gemessen. Zur Kalibrierung dienten hier Saporin-3, Dianthin und käuflich erworbenes Ricin A (RTA), später zusätzlich Ricin und reduziertes Ricin (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Colombatti, Universität von Verona, Italien). Die ersten Untersuchungen zeigten, dass die zunächst eingesetzten Substrate, die Heringssperma-DNA (hsDNA) und die poly(A)-RNA, mit MESG, dem Substrat der PNP, konkurrierten. Dies hatte eine starke Reduzierung des Umsatzes von MESG zur Folge, so dass kein messbares Signal für Adenin mehr zu detektieren war. Durch die Einführung einer zusätzlichen Ethanolpräzipitation nach Inkubation der RIPs mit den Substraten wurde dieses Problem erfolgreich gelöst. Die zeitabhängige Adeninfreisetzung durch Saporin-3 (3 pmol) zeigte unter diesen Bedingungen einen deutlich ausgeprägten linearen Zusammenhang (Abbildung 9, oben) mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0.9971$. Bereits nach 5 min Inkubation lag das messbare Adeninsignal vier bis fünffach über dem Hintergrundsignal, was die hohe Sensitivität des Assays bestätigt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Adeninfreisetzung proportional der eingesetzten Konzentration an RIPs ist (Abbildung 9, unten). Untersuchungen an käuflichem Ricin A (RTA) ergaben eine Adeninfreisetzung von 43 pmol Adenin pro pmol Ricin A pro Stunde. Kontrollen mit hitzeinaktivierten Toxinen zeigten dagegen kein messbares Signal. Für Saporin konnte die N-Glycosidase-

aktivität bis zu einer eingesetzten Menge von weniger als 100 pmol Toxin detektiert werden.

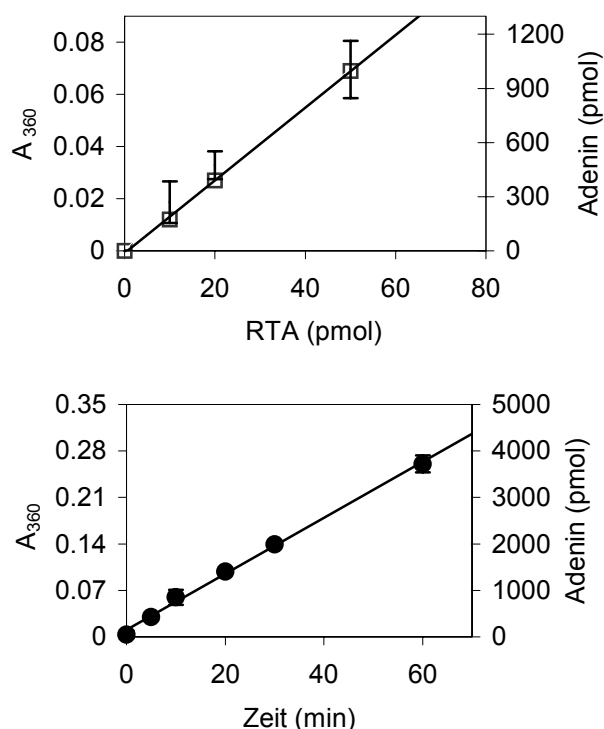


Abbildung 9: Messung der durch N-Glycosidasen freigesetzten Mengen an Adenin im Adeninquantifizierungsassay unter Standardbedingungen. Oben: Dosisabhängige Adeninfreisetzung durch RTA nach 30 min Inkubation mit hsDNA. Unten: Zeitabhängige Adeninfreisetzung aus hsDNA durch 3 pmol Saporin-3 als N-Glycosidase. Die gemessene Absorption wurde mittels interner Standardkurven in die Adeninfreisetzung umgerechnet. Alle Proben wurden nach der Inkubation des Toxins mit der hsDNA ethanolpräzipitiert, alle Werte repräsentieren die Mittelwerte aus zwei unterschiedlichen Messungen mit jeweils Doppelbestimmungen.

Die Adeninfreisetzung der eingesetzten Toxine mit allen verwendeten Substraten ist in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Substrat und RIP-abhängige Adeninfreisetzung

Substrat	Adeninfreisetzung (pmol/pmol RIP pro h) ^a				
	RTA	Ricin	reduziertes Ricin	Dianthin	Saporin-3
60S-Ribosomen	< 10	< 10	n.g.	< 10	< 10
28S-rRNA	185 ± 1	12 ± 5	n.g.	140 ± 15	140 ± 20
hsDNA	43 ± 2	70 ± 2	28 ± 4	755 ± 55	670 ± 35
mtDNA	< 10	n.g.	n.g.	330 ± 35	50 ± 25
poly(A)-RNA	< 10	n.g.	n.g.	< 10	< 10

^a Ergebnisse repräsentieren den Durchschnitt aus zwei bis vier Messungen ± Standardabweichung

n.g. = nicht gemessen

Obwohl die 60S-ribosomalen Untereinheiten die größte Ähnlichkeit gegenüber dem natürlichen Substrat, den Ribosomen, aufweisen, konnte keine RIP-Aktivität detektiert werden. Legt man aber der Tatsache zugrunde, dass aus 1 mg der 60S-Untereinheiten (5 mg/ml) bei optimaler Umsetzung nur 0.3 nmol Adenin freigesetzt werden können, liegt dieser Wert am Rande der Detektionsgrenze.

Bei Verwendung von gereinigter 28S-rRNA wiesen sowohl gereinigtes RTA aus Rizinussamen als auch rekombinantes Dianthin und Saporin-3 einen vergleichbaren Freisetzungswert (140–185 pmol Adenin/pmol Toxin/h) auf. Untersuchungen der anderen Substrate zeigten, dass poly(A)-RNA für keine der verwendeten RIPs geeignet ist. Vergleicht man die Adeninfreisetzung aus der 28S-rRNA mit der aus hsDNA und mtDNA, so wiesen diese keine einheitlichen Mengen an freigesetztem Adenin bei Verwendung verschiedener RIPs auf. Es zeigte sich, dass RTA nicht in der Lage ist, mtDNA als Substrat zu verwenden. Von allen untersuchten Substraten stellte sich hsDNA als am besten geeignet für den Adeninassay heraus. Mit Ausnahme von RTA konnten bei Verwendung dieses Substrates für alle RIPs die höchsten Signale gemessen werden. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Arbeiten hsDNA als Substrat verwendet. Dies betrifft insbesondere die Untersuchung von Saporinmutanten und RIP-Fusionsproteinen im Rahmen der Herstellung von Immunotoxinen.

3.2 Entwicklung eines Immunoadaptertoxins

Die Immunoadaptertoxine, deren Entwicklung zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist, lassen sich in drei Komponenten einteilen. Sie bestehen aus einem Toxin, einem molekularen Adapter und einem Liganden. Der Adapter dient der Verknüpfung von Toxin und Ligand. Für die Entwicklung wurde zunächst das Toxin alleine, später mit Adapter und am Schluss das komplette Immunoadaptertoxin funktionell charakterisiert.

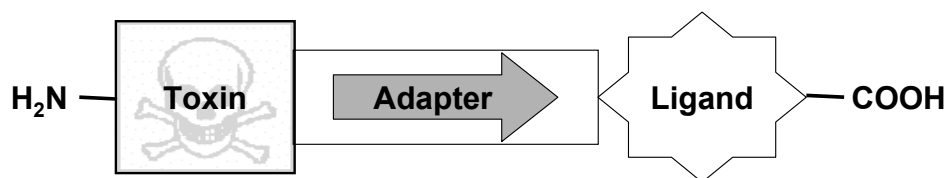


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Immunoadaptertoxine mit ihren drei funktionellen Bereichen. Vom N-Terminus (links) zum C-Terminus (rechts) sind der Toxinteil, der molekulare Adapter und der tumorspezifische Ligand dargestellt.

3.2.1 Die Toxin-Komponente

Toxine, die im Zuge einer hoch selektiv wirkenden, antitumoralen Therapie Anwendung finden sollen, müssen streng intrazellulär wirken. Neben einer sehr hohen Aktivität sollten die verwendeten Toxine eine geringe Größe haben, um einen Membrantransfer mittels Trojanischem Peptid zu gewährleisten. Die Klasse der proteinbiosynthese-inhibierenden Toxine stellt hierfür die besten Voraussetzungen. Von diesen Toxinen fanden in der vorliegenden Arbeit die pflanzlichen N-Glycosidasen der ribosomeninaktivierenden Proteine (RIPs) Saporin und Dianthin Anwendung.

Die cDNA des Saporin-3 wurde freundlicherweise von S. Fabbrini (San Raffaele Scientific Institute, Mailand, Italien) und die des Dianthin von M. Colombatti (Universität von Verona, Italien) zur Verfügung gestellt.

3.2.1.1 Herstellung von Antikörpern

Für die verwendeten Toxine war es unbedingt notwendig, diese im Verlauf der Arbeit mittels Immunoblot detektieren zu können. Da aber kommerziell keine Saporin- oder Dianthin-Antikörper verfügbar sind, mussten diese zunächst erzeugt werden.

Aufgrund der sehr hohen Homologie zwischen Saporin und Dianthin gelang es, einen exponiert vorliegenden Oberflächenbereich zu identifizieren, der in beiden Toxinen vorhanden ist. Es handelt sich hierbei um die Aminosäuren 181–197 aus Saporin-3. Diese Sequenz (RYIQNLVTKNFPNKFDS) wurde von der Firma Biosyntan (Berlin) mit Hilfe der simultanen, multiplen Peptidsynthese hergestellt. Aus diesem Peptid wurde anschließend von der Firma BioGenes (Berlin) ein Antiserum aus Kaninchen hergestellt. Das Antiserum wurde in der vorliegenden Arbeit zur Gewinnung spezifischer polyklonaler Antikörper über eine Affinitätschromatographie mit dem an eine Affi-10-Säulenmatrix immobilisierten, antigenen Peptid aufgereinigt. Zur Elution wurde ein pH-Gradient (7.5–2.5) verwendet. Die einzelnen Fraktionen wurden hinsichtlich ihrer Spezifität im Immunoblot untersucht. Erst die Elution bei pH 2.5 ermöglichte eine spezifische Detektion des Saporins in einem E. coli-Lysat (Abbildung 11 A). In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden (Abbildung 11 B), dass auch Saporin-Fusionsproteine und Dianthin durch diesen Antikörper spezifisch erkannt werden.

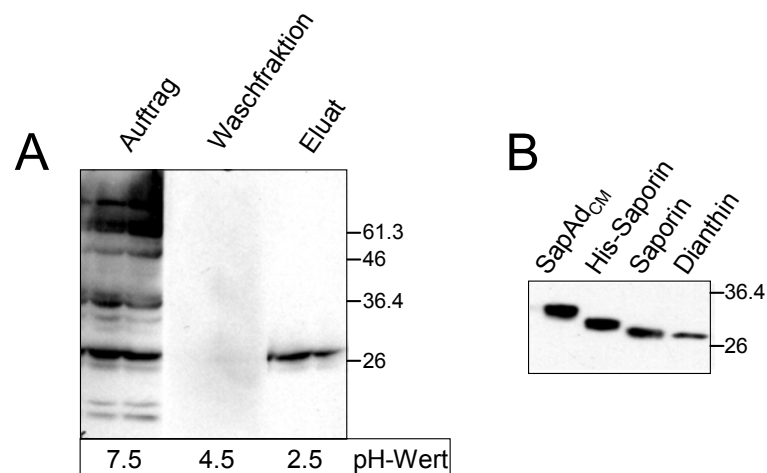


Abbildung 11: Reinigung und Charakterisierung des Saporin-Peptid-Antikörpers. In (A) ist ein Immunoblot gezeigt. Mit gereinigtem Saporin versetzte *E. coli*-Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die so immobilisierten Lysate wurden mit verschiedenen Reinigungsfractionen des primären Antikörpers (anti-Saporin) inkubiert und anschließend mit peroxidasegekoppelten sekundären anti-Kaninchen-Antikörpern (SAR*) detektiert. Die angegebenen Fractionen bestehen aus den neutralisierten Fractionen der Peptidaffinitätschromatographie. In (B) ist die Affinität des Eluates aus (A) im Immunoblot gegen jeweils 1 µg Dianthin, Saporin, His-Saporin und des Fusionstoxins His-SaporinAd_{CM} (siehe 3.2.2.1) dargestellt. Der gereinigte Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

3.2.1.2 Rekombinante Darstellung der Toxine

Für die rekombinante Darstellung der Toxine wurde das pET11d-Vektor-Expressionssystem (Invitrogen) gewählt. Bei diesem steht die zu exprimierende Ziel-DNA unter der Kontrolle eines T7-Promotors. Für die Expression wurden spezielle *E. coli*-Stämme [z. B. BL21(DE3) oder Rosetta(DE3)] verwendet, die ein zusätzliches T7-RNA-Polymerasegen (Zusatzbezeichnung DE3) unter Kontrolle eines lac-UV5-Promotors in das Bakteriengenom integriert haben. Die Auswahl dieser Expressionsstämme hatte zudem den Vorteil, dass die über die T7-RNA-Polymerase exprimierten Proteine aufgrund einer Proteasedefizienz dieser Bakterienstämme stabiler sind. Um eine vorzeitige Expression (*leaky expression*) der Ziel-DNA zu verhindern, wurde zusätzlich das Plasmid pLysS cotransformiert. Dies codiert für T7-Lysozym, das vor Zugabe von IPTG kleine Mengen an gebildeter T7-Polymerase inaktiviert. Auf diese Weise wird eine vorzeitige IPTG-unabhängige Expression der Toxine verhindert, die ein Absterben der *E. coli*-Zellen zur Folge hätte, da sich die toxische Wirkung nicht nur gegen die 60S-ribosomale Untereinheit der Eukaryoten, sondern auch gegen die 50S-ribosomalen Untereinheiten der Prokaryoten richtet.

Die Expression von Saporin und Dianthin erfolgte in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3). Bei der Anzucht sämtlicher Vorkulturen wurde das Medium mit 1 % Glucose versetzt, da die Menge an gebildetem T7-Lysozym nicht ausreichte, um die durch Laktoseverunreinigung bedingte Hintergrundexpression komplett zu unterdrücken. Die Expression von Saporin und Dianthin fand bei 30 °C über 3 h nach IPTG-Induktion statt.

Da in Saporin-3 die basischen Aminosäuren dominieren (IP 9.5), wurde die Aufreinigung über eine Kationenaustauschchromatographie angestrebt. Nach der Expression wurde das Bakterienpellet in Niedrigsalzpuffer aufgeschlossen, das Lysat auf eine MonoS-Kationenaustauschersäule geladen und mittels Hochsalzpuffer im Gradienten eluiert. Ein Elutionsprofil dieser Reinigung ist exemplarisch in Abbildung 12 dargestellt. Bei einer Ionenstärke von 18 mS (Fraktion bei 22 ml) ist eindeutig ein Proteinpeak zu erkennen, der in der Silberfärbung der nachfolgenden SDS-PAGE (Abbildung 13) eine der Saporingröße entsprechende Bande von 30 kDa zeigte.

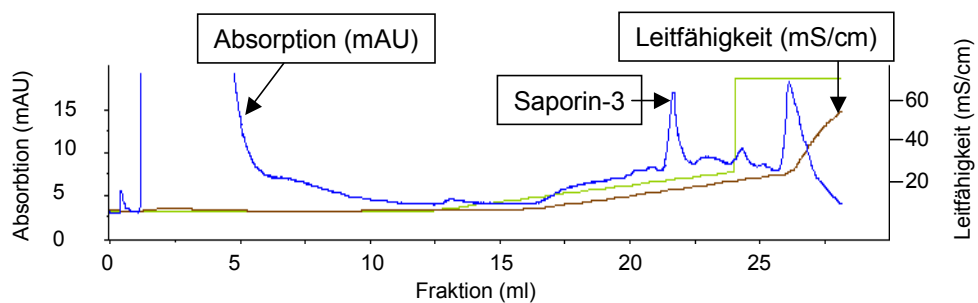


Abbildung 12: Elutionsprofil einer Kationenaustauschchromatographie. Saporin-3 wurde zunächst in 5 mM MES-Puffer (pH 6.5) mit 10 mM NaCl geladen und über einen Salzgradienten 0–100 % Puffer B (1 M NaCl) eluiert. Links ist die Absorption, rechts die Leitfähigkeit aufgetragen. Die Peakhöhe entspricht der Menge an eluiertem Protein. Die Fraktionen 0–5 ml entsprechen dem Durchfluss der ungebundenen Proteine der Probe. Das Elutionsprofil 20–26 ml wurde mittels SDS-PAGE analysiert.

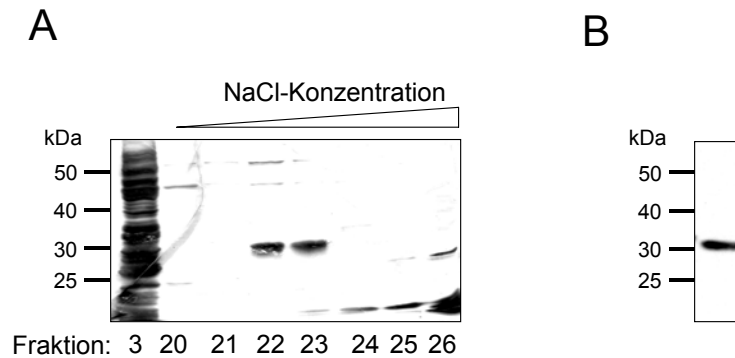


Abbildung 13: Silberfärbung einer SDS-PAGE unterschiedlicher Fraktionen der Kationenaustauschchromatographie. (A) Aufgetragen sind links der Durchfluss an ungebundener Probe (Fraktion 3 ml) und von links nach rechts die Fraktionen 20–26 ml aus dem in Abbildung 12 gezeigten Saporin-Elutionsprofil. Saporin konnte hier in den Fraktionen 22–23 ml nachgewiesen werden. In (B) sind die vereinigten Elutionsfraktionen 22 ml und 23 ml im Immunoblot gezeigt (anti-Saporin / SAR*).

3.2.1.3 Aufreinigung von Saporin über einen N-terminalen His-Tag

Da die Reinigung von Saporin über die Kationenaustauschchromatographie mit größerem apparativen Aufwand verbunden ist, wurde zur Vereinfachung der Aufreinigung ein N-terminaler $6 \times$ His-Tag an die Toxine fusioniert. Dieser ermöglicht die Reinigung der Proteine über eine Affinitätschromatographie mit einer Ni-NTA-Matrix.

Zur Herstellung von pET-HisSap (Abbildung 14) wurde zunächst die Saporin-3-cDNA mittels PCR aus pETSap-3 (siehe Anhang) amplifiziert. Als 5'-Primer wurden IH1-vor, der einen 5'-Überhang codierend für $6 \times$ Histidin trägt und als 3'-Primer IH2-rück verwendet. Das entstandene Produkt besaß für die weitere Klonierung eine *NcoI*-Schnittstelle 5'-seitig des Startcodons und eine *HindIII*-Schnittstelle innerhalb der für Saporin codierenden Sequenz. Dieses Fragment wurde über *HindIII* / *NcoI* in pET-Sap-3 kloniert und damit die His-Tag-Sequenz in den 5'-Bereich eingefügt. Wegen großer Mengen an DNA-Verunreinigungen während der Präparation von Plasmiden mit pET-11d-Ursprung erwies sich eine Sequenzierung bereits bei pET-HisSap als problematisch. Das Problem wurde gelöst, indem das vollständige Insert über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* / *EcoRI* in den Klonierungsvektor pLitmus 28 ligiert und die Plasmid-DNA-Präparation mit geringer Verunreinigung und höherer Ausbeute zur Sequenzierung eingesetzt wurde.

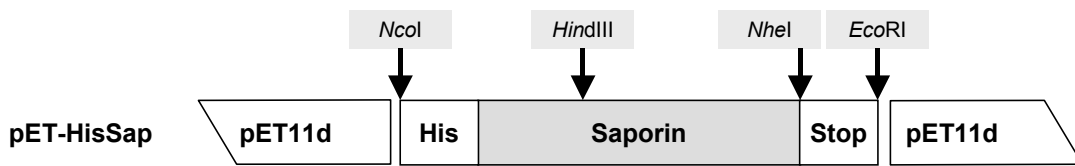


Abbildung 14: Schematische Übersicht des His-Saporin-Konstruktes (pET-HisSap). Mittels PCR (Primer: IH1-vor / IH2-rück; Template: pET-Sap-3) wurde an das 5'-Ende von Saporin die Sequenz für einen $6 \times$ His-Tag angefügt. Das entstandene etwa 700 bp große PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *HindIII* in pET11d-Sap-3 ligiert. Mit den Pfeilen ist die Lage der relevanten Restriktionsschnittstellen angegeben.

Das Konstrukt pET-HisSap wurde zunächst in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) mit pLysS cotransformiert und anschließend exprimiert (30 °C, 3 h). Die Reinigung über Ni-NTA-Agarose erfolgte anfänglich unter nativen und später unter denaturierenden Bedingungen. In Abbildung 15 ist exemplarisch das Reinigungsprofil von His-Saporin unter denaturierenden Bedingungen gezeigt. Deutlich ist die Saporin-Bande in den Elutionsfraktionen E3 und E4 zu sehen (Pfeil), die auch im Immunoblot nachzuweisen war. Im Vergleich war die Reinigung von Saporin mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgrund des geringeren apparativen Aufwandes der Kationenaustauscherchromatographie vorzuziehen. Die Reinigungseffizienz der beiden Methoden war vergleichbar.

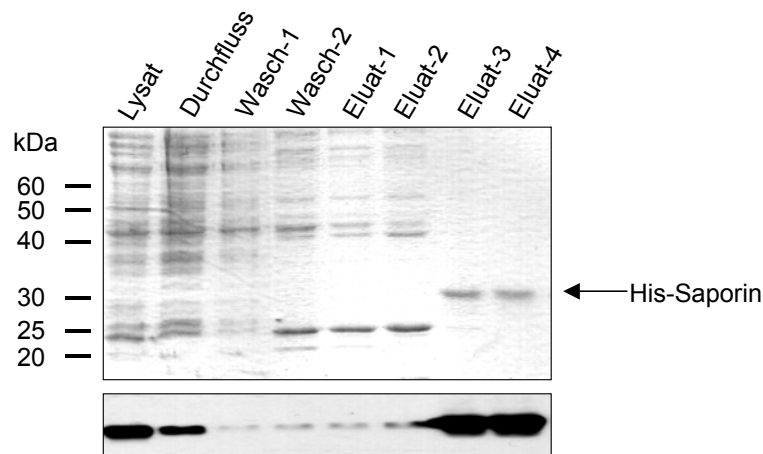


Abbildung 15: Coomassiefärbung und Blot verschiedener Reinigungsfraktionen von His-Saporin aufgetrennt in einem SDS-Gel. Von links nach rechts sind die Lysatfraktion (Lysat), der Durchfluss und die erste Waschfraktion (Wasch-1) in 8 M Harnstoffpuffer, pH 8.0, die zweite Waschfraktion (Wasch-2) mit pH 6.5, sowie die Elutionsfraktionen 1 und 2 (Eluat-1 und Eluat-2, pH 5.8) und die Elutionsfraktionen 3 und 4 (Eluat-3 und Eluat-4, pH 4.5) aufgetragen. Man erkennt deutlich die Elution des His-Saporins, das als dominante Bande bei 30 kDa in den Elutionsfraktionen 3 und 4 zu erkennen ist (Pfeil). Mittels Immunoblot (unten, anti-Saporin, SAR*) konnte die Identität des Saporins bestätigt werden.

Trotz der optimierten Expressions- und Reinigungsbedingungen konnten keine großen Mengen an Saporin rekombinant exprimiert werden. Dies lässt sich auf die Codon-zusammensetzung von Saporin zurückführen. Die Anzahl einiger für die Expression von His-Saporin notwendiger tRNAs ist in *E. coli* so gering, dass es zu stark verminderten Expressionsraten kommt. Dieses Problem konnte durch die Verwendung des Bakterienstamms Rosetta (DE3) gelöst werden, der chromosomal integrierte Gene für die in *E. coli* seltenen tRNAs besitzt. Für die weiteren Expressionen von Saporin-Konstrukten wurde dieser Stamm mit Erfolg verwendet.

3.2.1.4 Deletionsmutanten

Die Größe eines Immunotoxins ist von entscheidender Bedeutung für eine mögliche Tumorenpenetration. Auch ist der Membrantransfer, der durch die Trojanischen Peptide vermittelt wird, um so effizienter je kleiner die Proteine sind. Aus diesem Grund wurden mit Hilfe molekularbiologischer Methoden Saporin-Deletionsmutanten hergestellt. Grundlage für die Auswahl dieser Mutationen stellten umfangreiche Deletions- und Aktivitätsstudien der Ricin A-Kette dar [1].

Zur Untersuchung des Einflusses von Deletionen auf die Aktivität wurden C- und N-terminale sowie eine interne Deletion eingeführt. Die N-terminale Deletion, Saporin Δ 1–14, bei der die ersten 14 Aminosäuren deletiert wurden, und Saporin Δ 241–253 (Deletion der letzten 12 Aminosäuren) wurden erfolgreich mittels PCR hergestellt und in den Vector pET-11d ligiert. Für die interne Deletion der Aminosäuren 212–225 (Sap Δ 212–225) wurden zunächst die *up-* und *downstream* Sequenzen amplifiziert und anschließend über eine im Primerüberhang befindliche *Bst*B1-Restriktionsschnittstelle ligiert (dargestellt in Tabelle 10).

Tabelle 10: Klonierung der Saporin-Deletionsmutanten

Name	PCR-Primer	Template	T _{annealing}	Restriktionsenzym/Ziel
Sap Δ 1–14	IH3-vor IH4-rück	Sap-3	60 °C	<i>Nco</i> I / <i>Eco</i> RI in pET-Sap-3
Sap Δ 241–253	IH3-vor IH5-rück	Sap-3	60 °C	<i>Hind</i> III / <i>Eco</i> RI in pET-Sap-3
Sap Δ 212–225	IH3-vor IH2-rück und IH6-vor IH4-rück	Sap-3	60 °C	<i>Nco</i> I / <i>Bst</i> B1 / <i>Eco</i> RI in pET-Sap-3

Die Expression der Mutanten erfolgte in BL 21(DE3) / pLysS und die Reinigung zunächst über die Kationentauscherchromatographie. Da hier nur sehr geringe Mengen

der Toxine aufgereinigt werden konnten, wurden die Deletionsmutanten Sap Δ 241–253 und Sap Δ 212–225 zusätzlich mit einem His-Tag versehen, indem sie in pET-His-Saporin (via *Hind*III / *Nco*I) ligiert wurden. Die Aufreinigung über eine Nickel-NTA-Matrix unter denaturierenden Bedingungen ermöglichte eine problemlose Reinigung der Mutanten. Abbildung 16 zeigt exemplarisch die Reinigung von Sap Δ 212–225. Alle gereinigten Saporin-Mutanten zeigten nach Renaturierung (Dialyse gegen Tris-Puffer) keine nachweisbare N-Glycosidaseaktivität im Gegensatz zum unmutierten His-Saporin. Aus diesem Grund wurde das Vorhaben, die Toxingröße mittels Mutagenese weiter zu optimieren, aufgegeben und in der Folge mit dem gesamten, aktiven Saporin als Toxinvariante im Immunoadaptertoxin gearbeitet.

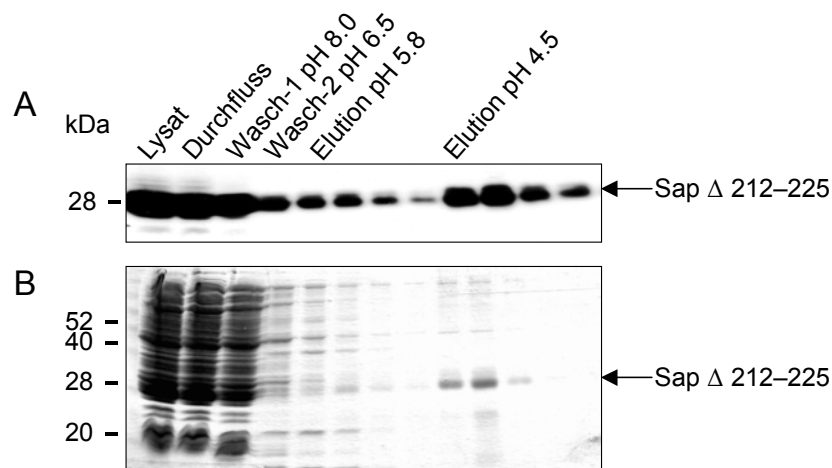


Abbildung 16: Reinigung der Mutante Sap Δ 212–225 über eine Ni-NTA-Säulenchromatographie. Blot (A) und Coomassiefärbung (B) zeigen die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Fraktionen der Reinigung unter denaturierenden Bedingungen. Von links nach rechts sind die Lysatfraktion, der Durchfluss und die Waschfraktionen 1 und 2 sowie die Elutionsfraktionen bei pH 5.8 und die Elutionsfraktionen bei pH 4.5 aufgetragen. Man erkennt deutlich die dominante 28 kDa große Bande der Saporinmutante in den Elutionsfraktionen (pH 4.5, Pfeil), deren Identität im Immunoblot mit anti-Saporin (detektiert mit SAR*) zweifelsfrei nachgewiesen wurde.

3.2.2 Die Adapterherstellung

Das Kernstück der in dieser Arbeit zu entwickelnden Immunotoxine stellt einen Adapter dar, der zwischen dem Toxin und dem Liganden liegt (Abbildung 10, S. 53). Um einen gerichteten Transport des Toxins in das Cytosol zu gewährleisten, sollte der Adapter neben einer Transmembrandomäne (MTS oder TLM) zwei weitere funktionelle Gruppen besitzen, eine cytosolisch spaltbare Peptidsequenz (CSP) und eine endosomal

spaltbare Peptidsequenz (ESP) (siehe Anhang). Da eine molekularbiologische Lösung zur Herstellung des Adapters angestrebt wurde, wurden als spaltbare Sequenzen jeweils peptidische Erkennungsmotive für die in den entsprechenden Kompartimenten (Endosom und Cytosol) vorliegenden aktiven Proteasen gewählt. Abbildung 17 gibt eine Übersicht über Aufbau und Funktion des Adapters.

Für die ESP (RHRQPRGNRVRRS) setzt sich diese Sequenz aus den natürlichen Spaltsequenzen der proteasesensitiven Bereiche von *Pseudomonas* Exotoxin und Diphtheriatoxin zusammen. Die CSP enthält unter anderem die Erkennungsmotive für die Caspasen 1 und 3, in einer weiteren CSP (CSP*) wurde die bestehende Sequenz der CSP N-terminal verlängert (Abbildung 17). Generell wurde darauf geachtet, dass die einzelnen Komponenten des Adaptertoxins stets getrennt voneinander auswechselbar blieben. Hierfür wurden die einzelnen Bestandteile des Adapters (CSP, MTS und ESP) durch in der Sequenz einmalige Restriktionsschnittstellen miteinander verbunden.

Cytosolisch spaltbare Peptidsequenz	Membrantransfersequenz	Endosomal spaltbare Peptidsequenz
<p>CSP (C)</p> <p>YVHDEVD<u>R</u>G<u>P</u>-<u>HM</u></p> <p>↑ ↑ ↑</p> <p>a b c</p>	<p>MTS (M)</p> <p>AAVLLPVLLA<u>A</u>P-<u>AG</u>P</p>	<p>ESP (E)</p> <p>RHRQPRGNRVRRS</p> <p>↑ ↑</p> <p>1 2</p>
<p>CSP* (C*)</p> <p>KEHDVPDEVD<u>R</u>G<u>P</u>-<u>HM</u></p> <p>↑ ↑ ↑ ↑</p> <p>d e b c</p>	<p>TLM (T)</p> <p>PLSSIFSRIG<u>D</u>P-<u>AG</u>P</p>	<p>ESP* (E*)</p> <p>RHRQPRGNRV<u>G</u>RS</p> <p>↑</p> <p>1</p>

Abbildung 17: Übersicht über den molekularen Aufbau der Adapterregion und deren Varianten. Der Adapter besteht aus drei funktionellen Regionen. Die endosomal spaltbare Peptidsequenz wird im Endosom gespalten und legt damit die Membrantransfersequenz frei. Diese ermöglicht den Durchtritt durch die Membran in das Cytosol. Dort wird dann die cytosolisch spaltbare Peptidsequenz gespalten und die Toxindomäne, die sich am N-Terminus des Adapters befindet, freigegeben. Unter der jeweiligen Namensgebung sind die Peptidsequenzen angegeben, darunter in der Mitte die beiden verwendeten Membrantransfersequenzen MTS (M) und TLM (T). Mit Pfeilen sind die potentiellen Spaltstellen in der CSP (C) und CSP* (C*) dargestellt, nämlich die der Caspase-1 (a und d), Caspase-3 (b), einer potentiellen Spaltsequenz aus Hefe (c), sowie aus der Pro-Caspase-3 (e). Die Spaltstellen der ESP (E) stammen aus *Pseudomonas* Exotoxin (1) und Diphtheriatoxin (2). Bei der ESP* handelt es sich um eine Arginin-Glycin-Mutation (fett) der ESP, die zum Verlust der Schnittstelle im Diphtheriatoxin führt. Zwischen den funktionellen Sequenzen liegen jeweils zwei oder drei Aminosäuren die aus den Restriktionsschnittstellen resultieren (unterstrichen).

3.2.2.1 Klonierung von SapAd_{CM}¹

Zunächst wurde die MTS, die je zwei Restriktionsschnittstellen am 5'- und am 3'-Ende (*KpnI* / *NdeI* bzw. *ApaI* / *EcoRI*) enthält, in den Vektor pBluescript II KS inseriert. Dazu wurden zwei komplementäre Oligonukleotide mit überhängenden Enden für die terminalen Schnittstellen kommerziell synthetisiert (IH7-vor und IH8-rück), einzeln mit T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert und abschließend bei Raumtemperatur hybridisiert. Der Vektor pBluescript II KS wurde für die Klonierung mit *KpnI* und *EcoRI* linearisiert und mit dem Fragment ligiert (freundlicherweise von J. Keller, Institut für Klinische Chemie, UKBF der FU Berlin, durchgeführt). In einem weiteren Schritt wurde die CSP ebenfalls in Form von zwei komplementären Oligonukleotiden (IH9-vor und IH10-rück) phosphoryliert, hybridisiert und in 5'-Position der MTS via *NdeI* ligiert (Abbildung 18). In das entstandene Produkt, bestehend aus CSP und MTS in pBluescript II KS wurden durch PCR (IH11-vor und IH12-rück) am 5'-Terminus die Restriktionsschnittstelle *NheI* und am 3'-Terminus die von *EcoRI* eingefügt und das resultierende PCR-Fragment CSP-MTS über *NheI* / *EcoRI* in pET-His-Sap zum pET-SapAd_{CM} ligiert.

3.2.2.2 Klonierung von ESP, TLM und CSP*

Die ESP wurde in Form von zwei komplementären Oligonukleotiden passend zu pET-SapAd_{CM} mit Überhängen für eine *ApaI*- und eine *EcoRI*-Schnittstelle kommerziell synthetisiert (IH13-vor und IH14-rück), anschließend phosphoryliert und schließlich hybridisiert. Dieses Fragment wurde anschließend in den *ApaI* / *EcoRI* geschnittenen Vektor pET-SapAd_{CM} ligiert (Abbildung 19), die resultierenden Klone mittels Restriktionsverdau auf ihre Richtigkeit überprüft und durch Sequenzierung bestätigt. Mit dem Ziel, die MTS gegen die TLM auszutauschen, wurde anschließend eine PCR (IH15-vor und IH16-rück) durchgeführt, bei der die Sequenz der TLM als Primerüberhang in das PCR-Produkt eingeführt wurde und pET-SapAd_{CME} als Template diente. Durch das entstandene PCR-Produkt, bestehend aus der Sequenz für die TLM und der ESP, wurde schließlich die MTS aus pET-SapAd_{CME} via *NdeI* / *EcoRI* gegen die TLM zu pET-SapAd_{CTE} ausgetauscht. Dasselbe Verfahren wurde für den Austausch der CSP gegen die CSP* angewendet. Mittels PCR (IH17-vor und IH16-rück, pET-SapAd_{CTE} als Template) wurde die Sequenz der CSP* als Primerüberhang eingeführt, anschließend das PCR-Fragment über *NheI* / *EcoRI* in den pET-SapAd_{CM} ligiert und pET-SapAd_{C*TE} generiert. Alle Schritte sind schematisch nochmals in Abbildung

¹ Die Komponenten des in den einzelnen Konstrukten verwendeten Adapters (Ad) sind als Index im Einbuchstabencode gemäß Abbildung 17 angegeben.

19 zusammengefasst. Alle Saporin-Adapterkonstrukte wurden wie in 3.2.1.2 beschrieben sequenziert (Primer: IH4-rück und T7) und die theoretischen Sequenzen bestätigt.

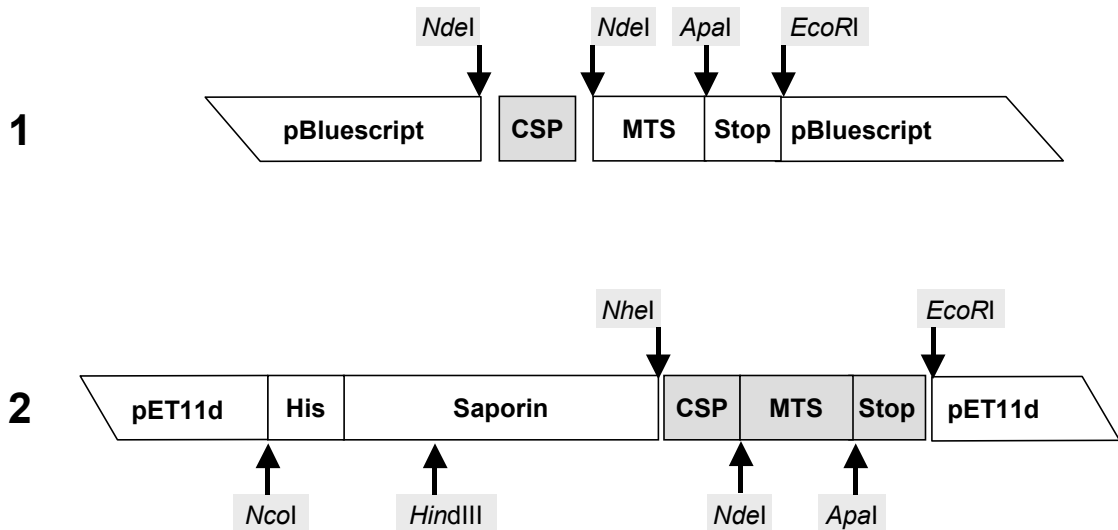


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Klonierung von SaporinAd_{CM} in pET11d. Zunächst wurde die CSP aus zwei komplementären Oligonukleotiden phosphoryliert, hybridisiert und über *NdeI* in den entsprechend vorbereiteten Vektor pBluescript-MTS ligiert (1). Anschließend wurde mittels PCR mit IH11-vor und IH12-rück die 5' der CSP gelegene *NdeI*-Restriktionsschnittstelle zu einer *NheI*-Schnittstelle mutiert und das entstandene Fragment in den *NheI*/*EcoRI* geschnittenen pET-HisSap-Vektor ligiert (2). Das Produkt pET-SapAd_{CM} wurde wie in 3.2.1.2 beschrieben sequenziert und die Richtigkeit der Sequenz bestätigt.

3.2.2.3 Expression und Reinigung

Für die Expression der Saporin-Adaptertoxine wurde auf das zuvor für His-Saporin optimierte Expressionsverfahren zurückgegriffen. Die in das pET11d-Plasmid ligierten Sequenzen wurden in den *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) / pLysS transformiert und in Anwesenheit von 1 % Glucose angezogen. Die Expression wurde erfolgreich bei 30 °C durchgeführt.

Die Reinigung wurde mittels Ni-NTA-Säulenchromatographie unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Auf diese Art ließen sich alle drei Konstrukte mit guter Ausbeute und hoher Reinheit herstellen. Exemplarisch ist in Abbildung 20 A die Reinigung von SapAd_{CTE} unter denaturierenden Bedingungen gezeigt, in Abbildung 20 B sind die jeweils reinsten Fraktionen der Aufreinigung der verwendeten Saporin-Adaptertoxine im Immunoblot dargestellt.

Alle Konstrukte wurden im Anschluss an ihre Reinigung mehrfach gegen 50 mM Tris, 150 mM NaCl dialysiert, aufkonzentriert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert

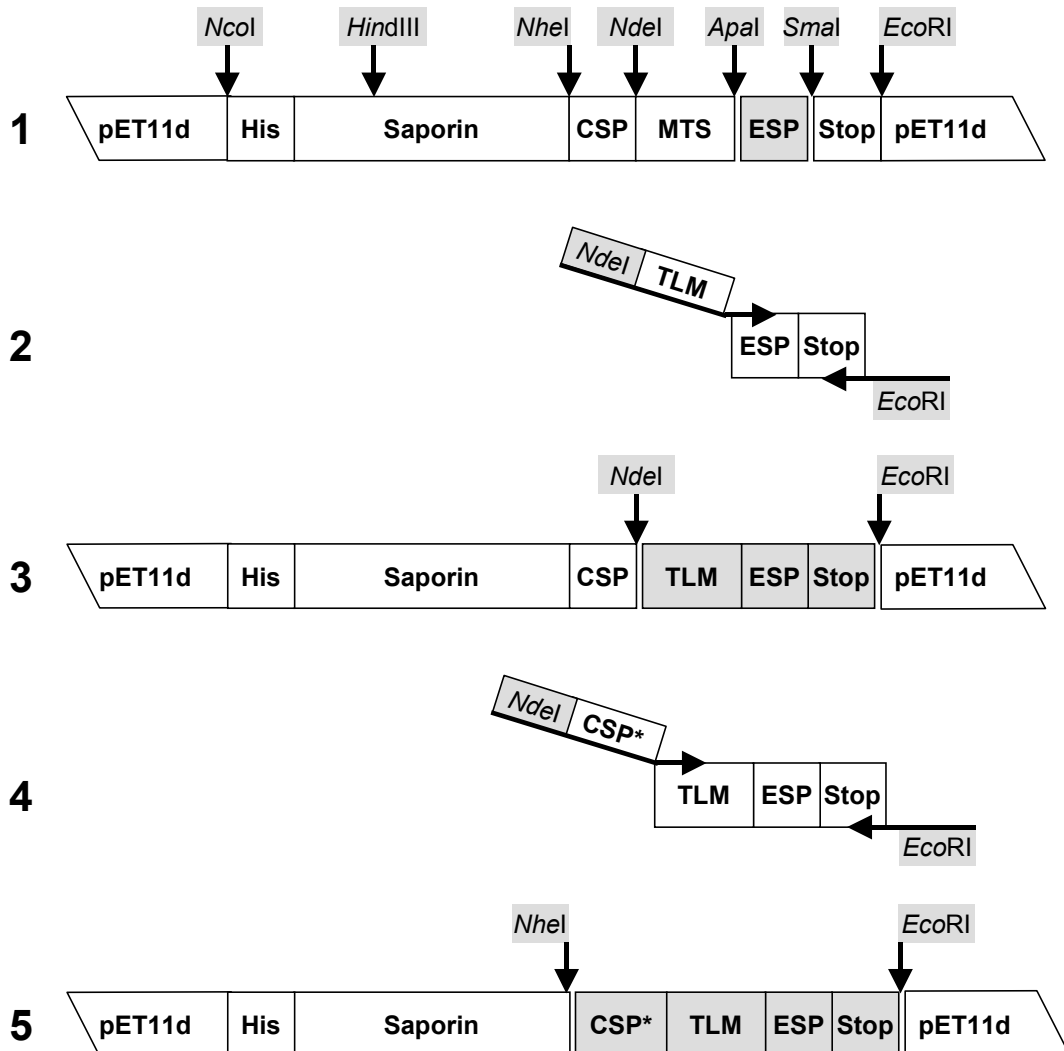


Abbildung 19: Klonierte Saporin-Adaptivvarianten. Für die Klonierung von pET-SapAd_{CME} (1) wurden zunächst die synthetisch hergestellten, komplementären Oligonukleotide IH13-vor und IH14-rück mittels T4-Polynucleotidkinase phosphoryliert und im Anschluss hybridisiert. Das so gewonnene doppelsträngige DNA-Fragment wurde über *ApaI* / *EcoRI* in pET-SapAd_{CM} ligiert. Zur Herstellung von pET-SapAd_{CTE} (2 und 3) wurde im Anschluss mit den Primern (IH15-vor und IH16-rück) pET-SapAd_{CME} amplifiziert und dessen Produkt via *NdeI* / *EcoRI* in pET-SapAd_{CM} ligiert. Das Konstrukt pET-SapAd_{C*TE} (5) wurde mit PCR (4, IH17-vor und IH16-rück, pET-SapAd_{CTE} als Template) und nachfolgender Ligation in pET-SapAd_{CM} über *NheI* / *EcoRI* generiert.

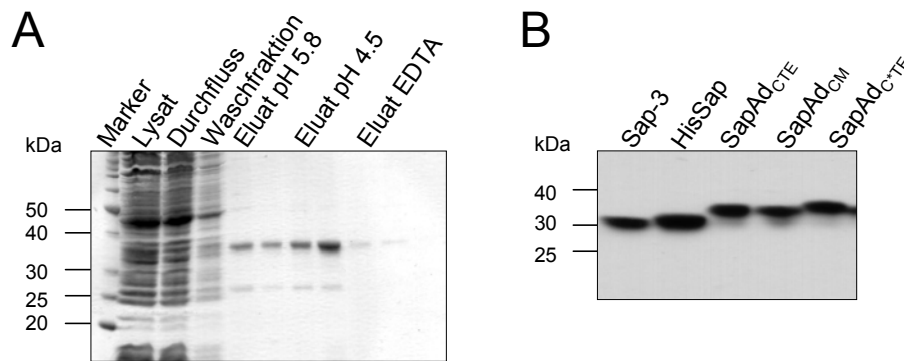


Abbildung 20: Reinigung der Saporin-Adaptotoxine. (A) Reinigung von SapAd_{CTE} über eine Ni-NTA-Säule. Die Elution unter denaturierenden Bedingungen fand durch pH-Änderung statt. Die Fraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Die Elution von reinem SapAd_{CTE} erfolgte ab einem pH von 5.8. (B) Weitere aufgereinigte Saporin-Adaptotoxine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot (anti-Sap/SAR*) detektiert. Bis auf Sap-3, das über Kationenaustauscherchromatographie gereinigt wurde, wurden alle anderen Toxine unter denaturierenden Bedingungen über die Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt.

3.2.3 Immunoadaptotoxine mit Ligand

Neben der Wahl des Toxins spielt die Wahl des tumorzellenspezifischen Liganden eine entscheidende Rolle für die Qualität des Immunotoxins. Eine Klasse an Rezeptoren, die in verstärktem Maße an der Oberfläche von Tumorzellen vorkommt, sind die Rezeptoren der HER-Familie (aus dem Engl.: *human epidermal growth factor receptor*). Einer seiner Liganden, das EGF (*epidermal growth factor*) erfüllt in besonderem Maße die an den Liganden des Immunotoxins geknüpften Anforderungen. Zum einen lässt er sich problemlos in *E. coli* exprimieren und zum anderen stellt seine Größe mit etwa 6 kDa kein Problem für den Membrantransfer dar. Aus diesem Grund wurde das EGF als Ligand der Immunotoxine gewählt.

3.2.3.1 Klonierung

Zunächst war es notwendig, die cDNA von EGF zu isolieren. Diese Arbeit wurde von M. Sutherland (Institut für Klinische Chemie, UKBF der FU Berlin) durchgeführt. Die cDNA von humanem EGF wurde durch RT-PCR (IH18-vor und IH19-rück) aus mit DMSO differenzierten HL60-Zellen amplifiziert, die DNA in den Vektor pCR2.1 ligiert, in den *E. coli*-Stamm Top10 kloniert und die Basenfolge durch Sequenzierung bestätigt. Zur Generierung des Immunotoxins SapAd_{CTE}EGF wurde die EGF-Sequenz über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *SmaI* in das pET-SapAd_{CTE}-Konstrukt ligiert. Ein adapterfreies Immunotoxin konnte erfolgreich durch das Einführen einer *NheI*-Schnittstelle an die 5'-Position des EGF (PCR, IH20-vor und IH16-rück; pET-

SapAd_{CTE}EGF als Template) und eine anschließende Klonierung über *NheI* / *EcoRI* in pET-SapAd_{CTE}EGF hergestellt werden.

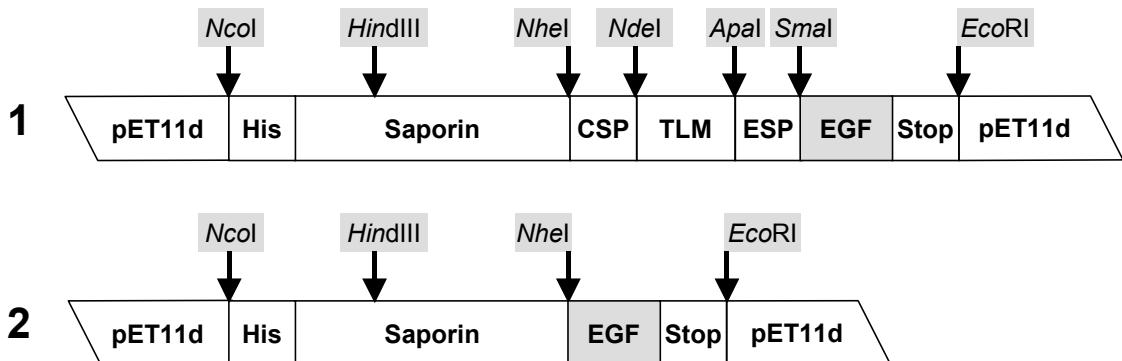


Abbildung 21: Aufbau der EGF-tragenden Immunotoxine. (1) Für das Konstrukt pET-SapAd_{CTE}EGF wurde EGF über *SmaI* (3'-seitig der ESP) und *EcoRI* (3'-seitig des Stoppcodons) in das bislang ligandenfreie Konstrukt pET-SapAd_{CTE} eingefügt. Das Konstrukt enthält wie SapAd_{CTE} einen 6 × His-Tag. Das gesamte Konstrukt befindet sich in dem zur Expression geeigneten Vektor pET11d. (2) Für das Toxinkonstrukt pET-SapEGF wurde die EGF-Sequenz direkt 5'-seitig der Saporinsequenz über *NheI* und *EcoRI* in das ligandenfreie Konstrukt pET-SapAd_{CTE}EGF ligiert, so dass ein Konstrukt ohne Adapterregion entstand.

Die Expression der Immunotoxine wurde im *E. coli*-Stamm Rosetta DE3 / pLysS unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Dabei kam es bei der Aufreinigung, außer bei der adapterfreien Variante, dem SapEGF, zu einer deutlichen Spaltung der Adaptertoxine innerhalb der Adapterregion. Die Spaltung in der Adapterregion fand nach dem Zellaufschluss und während der Reinigung auch unter denaturierenden Bedingungen statt. Durch den Zusatz von Proteaseinhibitoren (Complete, Roche) vor dem Zellaufschluss wurde der Grad der Spaltung deutlich verringert. Durch die Verwendung eines weiteren Elutionspuffers mit einem pH-Wert von 5.2 gelang es schließlich, die Immunotoxine fast ungespalten zu reinigen. Die so zugunsten der Reinheit und Stabilität entstandenen Verluste in der Ausbeute waren tolerierbar. Um einen Abbau nach der Aufreinigung zu verhindern, wurden die Proteine als Aliquots bei -20 °C gelagert.

Die vorzeitige Spaltung innerhalb des Adapters, die während der Aufreinigung beobachtet wurde, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich in der Sequenz der ESP gewollt mehrere Schnittstellen für Furin und furinähnliche Proteasen befinden. Um das Konstrukt stabiler zu gestalten, die Spaltbarkeit jedoch weiterhin zu gewährleisten, wurde eine Punktmutation in die ESP eingeführt. Dabei wurde eine optimale Erkennungssequenz (R-X-R-R) zu einer minimalen (R-X-X-R) in der ESP* mutiert (Abbildung 17, S. 61). Auf diese Weise sollte die Kinetik der vorzeitigen

Spaltung verlangsamt werden. Diese Punktmutation wurde mit Hilfe einer PCR (IH11-vor und IH21-rück; pET-SapAd_{CTE}EGF als Template) eingeführt, die in einer Änderung von Arginin zu Glycin auf Proteinebene resultierte. Dieser mutierte Adapter mit der ESP* wird im weiteren Arbeitsverlauf als Ad_{CTE}* bezeichnet.

Die Expression wurde analog der anderen Immunoadaptortoxine in dem Bakterienstamm Rosetta (DE3) / pLysS bei 30 °C durchgeführt. Bei der Reinigung über Ni-NTA-Agarose unter denaturierenden Bedingungen zeigte sich für SapAd_{CTE}*EGF eine klare Stabilisierung des Immunoadaptortoxins im Vergleich zu SapAd_{CTE}EGF mit der unmutierten ESP, wie aus Abbildung 22 aus der Abnahme der Spaltprodukte (Pfeil-s) hervorgeht. Die Größe der Spaltprodukte stimmt mit der eines innerhalb der ESP oder CSP gespaltenen Immunoadaptortoxins überein.

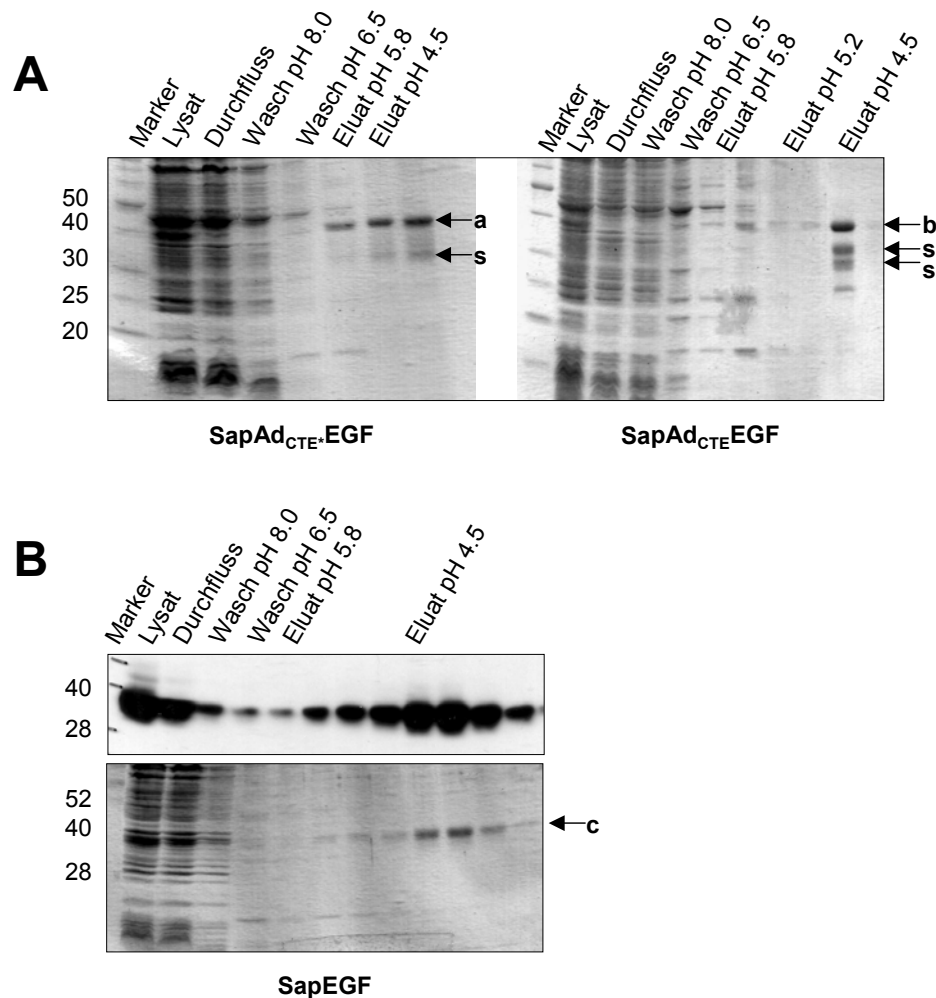


Abbildung 22: Ni-NTA-Säulenreinigung von Saporin-EGF-Varianten unter denaturierenden Bedingungen. **(A)** SaporinAd_{CTE}*EGF, SaporinAd_{CTE}EGF und **(B)** SapEGF. Die erhaltenen Fraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Für SapEGF ist zusätzlich ein Immunoblot mit anti-Saporin exemplarisch gezeigt **(B, oben)**. Mit den Pfeilen sind die jeweils aufgereinigten Immunotoxine **(a, b und c)** und mögliche vorzeitig gespaltene Konstrukte **(s)** markiert.

Der Adapter besteht neben einer Membrantransfersequenz im Zentrum aus zwei funktionellen Gruppen, der CSP und der ESP, die in unterschiedlichen Zellkompartimenten gespalten werden sollen. Die Aufnahme des kompletten Immunoadaptertoxins in die Zielzelle erfolgt zunächst über Endocytose des Ligand-Rezeptor-Komplexes, die über den tumorspezifischen Liganden vermittelt wird. In den Endosomen erfolgt dann eine Spaltung der ESP. Durch die C-terminale Abtrennung des Liganden und wesentlicher Teile der ESP wird die Transfersequenz aktiviert und ermöglicht den Membrandurchtritt ins Cytosol. Dort wird die N-terminale, enzymatisch aktive Toxindomäne durch Spaltung der CSP freigesetzt.

Zur Überprüfung der Funktionalität der einzelnen Komponenten der Immunoadaptertoxine wurde zunächst einerseits die Spaltbarkeit der Konstrukte an der CSP und an der ESP untersucht, andererseits die *in vitro*-N-Glycosidaseaktivität. In der folgenden Abbildung 23 ist eine Übersicht über die Konstrukte gegeben, die im weiteren Verlauf der funktionellen Charakterisierung des Adapters eine Rolle spielten.

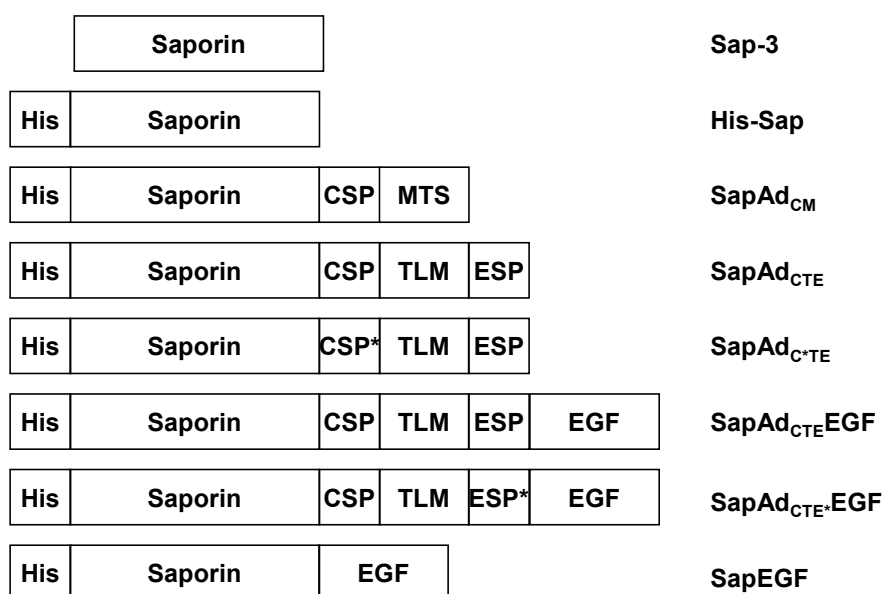


Abbildung 23: Schematischer Aufbau der *in vitro* getesteten Saporin-Konstrukte mit ihren im Text verwendeten Abkürzungen.

3.2.4 Funktionsanalyse der cytosolisch spaltbaren Peptidsequenz CSP

Mit SapAd_{CM}, SapAd_{CTE} und SapAd_{C*TE} stand eine Serie von Konstrukten zur Verfügung, mit denen die Spaltung der cytosolisch spaltbaren Sequenz (CSP) sehr

genau untersucht werden konnte. Mit SapAd_{CTE}EGF war der Nachweis der Spaltbarkeit im Gesamtkonstrukt und die Untersuchung des Einflusses eines Liganden möglich.

Für die funktionelle Charakterisierung der CSP wurde zunächst das Konstrukt SapAd_{CM} mit rekombinanter Caspase-3 inkubiert. Dabei sollte bestätigt werden, dass die caspasesensitive Schnittstelle in der CSP durch Caspasen gespalten wird.

Zum Nachweis der CSP-Spaltung durch Komponenten, die aus intakten Zellen gewonnen wurden, mussten die Caspasen zunächst aktiviert werden. Dazu diente eine Vorinkubation der Zellen mit dem PKC-Inhibitor Staurosporin, der Apoptose auslöst. Die Spezifität der auf diese Weise aktivierten Caspasen wurde durch Zugabe eines kompetitiven Caspase-3-Inhibitors (Ac-DEVD-CHO) untersucht. SapAd_{CM} zeigte bei Inkubation mit rekombinanter Caspase-3 (Abbildung 24), dass die CSP Caspase-3-sensitiv ist. Bereits nach 60 min ist eine deutliche Verschiebung zum etwa 2 kDa kleineren, gespaltenen Saporinkonstrukt, nach 120 min eine fast vollständige Spaltung zu erkennen. Zur einfacheren Unterscheidung des gespaltenen vom ungespaltenen Konstrukt wurde für die Inkubationsversuche mit Lysaten der staurosporinvorbehandelten HepG2-Zellen statt SapAd_{CM} das SapAd_{CTE}-Konstrukt verwendet, so dass bei erfolgter Spaltung eine Größenabnahme von 4 kDa nachzuweisen ist.

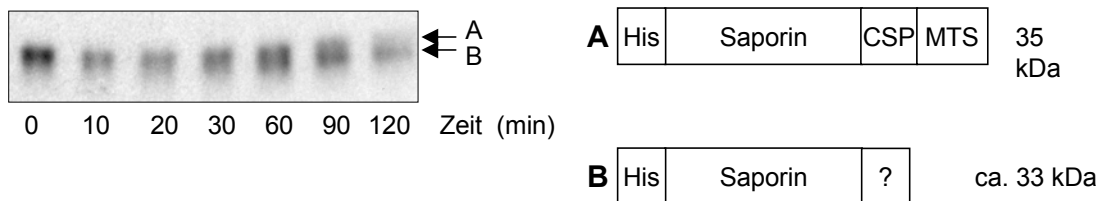


Abbildung 24: Zeitabhängige Spaltung von SapAd_{CM} durch rekombinante Caspase-3. Das Toxinkonstrukt (5 µg) wurde mit rekombinanter Caspase-3 (0.1 µg) in 80 µl Caspase-Puffer für 10 bis 120 min inkubiert und je 1/8 des Ansatzes entnommen. Die Aliquots wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Immunoblot mit anti-Sap / SAR* sichtbar gemacht. Rechts sind schematisch die zu erwartenden Saporinkonstrukte A und B dargestellt.

Hierbei zeigten die Inkubationen mit Lysaten staurosporinvorbehandelter Zellen genauso wie Lysate unbehandelter Zellen eine Spaltung von SapAd_{CTE} (Abbildung 25). Bereits nach 12 h Inkubation mit den Lysaten apoptotischer Zellen war fast das gesamte SapAd_{CTE}-Konstrukt gespalten. Auch das Lysat unbehandelter Zellen zeigte eine Spaltaktivität, jedoch in weit geringerem Ausmaß. Die Zugabe von Caspase-3-Inhibitor (AC-DEVD-CHO) zur Inkubation mit Lysaten staurosporinbehandelter Zellen ergab ebenfalls eine deutliche Verminderung der Spaltung.

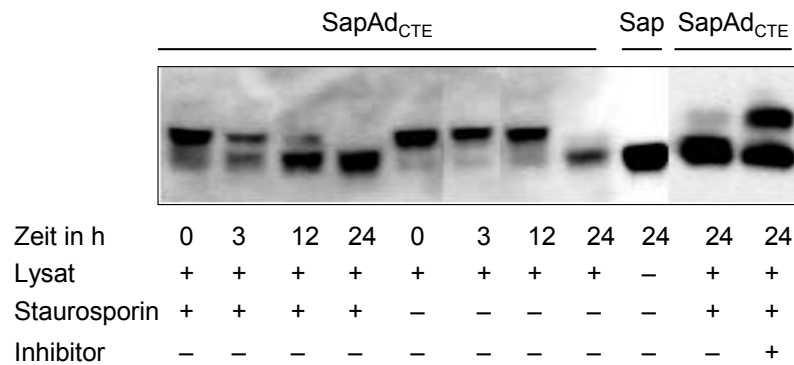


Abbildung 25: Spaltungsanalyse des SapAd_{CTE}-Konstruktes. 5 µg SapAd_{CTE} wurden in Anwesenheit von Lysaten staurosporinbehandelter (Staurosporin +) und nichtbehandelter (Staurosporin -) HepG2-Zellen für 3–24 h bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurde in einem 24-h-Ansatz der caspasespezifische Inhibitor AC-DEVD-CHO den Inkubationen mit Lysaten staurosporinbehandelter Zellen zugesetzt. Als Größenkontrolle diente gereinigtes Saporin-3 (Sap). Nach den angegebenen Zeiten wurden die Proben entnommen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Westernblot durch eine Immundetektion mit anti-Sap/SAR* sichtbar gemacht.

In weiteren Versuchen wurden einerseits am Beispiel von SapAd_{C*TE} die Auswirkungen der Modifikation der CSP und andererseits an SapAd_{CTE}EGF der Einfluss eines Liganden auf die Spaltung untersucht. Zum Vergleich diente jeweils das SapAd_{CTE}-Konstrukt. Es zeigte sich (Abbildung 26), dass alle drei Konstrukte durch Lysate apoptotischer Zellen gespalten werden. SapAd_{C*TE} war jedoch nach 3 h bereits größtenteils, SapAd_{CTE} erst zur Hälfte gespalten. Dies zeigt, dass die Verlängerung der CSP zur CSP* eine Spaltung begünstigt. Die Wirkung des Liganden auf die Spaltbarkeit wird durch den Vergleich des gesamten Immunoadaptortoxins (SapAd_{CTE}EGF) mit SapAd_{CTE} deutlich. Hier zeigte das Konstrukt mit Ligand eine verlangsamte Kinetik der Spaltung. Nach 6 h lag dieses Konstrukt noch etwa zur Hälfte ungespalten vor, während das Konstrukt ohne Ligand größtenteils gespalten war.

Betrachtet man die Kinetik von SapAd_{CTE}EGF, so fällt zudem bei dem 0-h-Wert eine weitere Bande auf (Pfeil b, Abbildung 26), die nach drei Stunden vollständig verschwunden ist. Die Bande entspricht der Größe nach dem SapAd_{CTE}-Konstrukt und ist ein Beleg dafür, dass die während der Reinigung auftretende Spaltung der Immunoadaptortoxine nicht innerhalb der CSP, sondern wahrscheinlich innerhalb der ESP abläuft.

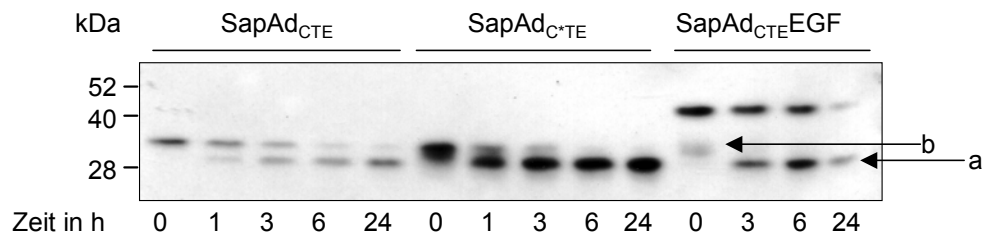


Abbildung 26: Einfluss des Liganden und der Modifikation innerhalb der CSP auf deren Spaltung. SapAd_{CTE}, SapAd_{C*TE} und SapAd_{CTE}EGF wurden jeweils mit denselben Mengen an Lysaten staurosporinbehandelter HaCat-Zellen für die angegebenen Zeiten inkubiert, anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Immunoblot mittels anti-Saporin detektiert. Bereits nach 6 h zeigen SapAd_{CTE} und SapAd_{C*TE} eine fast komplette Spaltung innerhalb der CSP, während SapAd_{CTE}EGF erst etwa zur Hälfte gespalten vorliegt (Pfeil a). Eine weitere Bande (Pfeil b) des SapAd_{CTE}EGF verschwindet innerhalb der ersten 3 h vollständig.

3.2.5 Funktionsanalyse der endosomal spaltbaren Peptidsequenz (ESP)

Mit SapAd_{CTE}EGF stand ein Konstrukt zur Verfügung, mit dem die Spaltung der endosomal spaltbaren Peptidsequenz, der ESP, funktionell charakterisiert werden konnte. Hierzu wurde SapAd_{CTE}EGF entweder mit rekombinantem Furin oder mit Membranfraktionen aus HepG2-Zellen inkubiert. Rekombinantes humanes Furin diente als Positivkontrolle. Die Spezifität der Spaltung durch Furin wurde durch die Zugabe eines kompetitiven Furinconvertaseinhibitors (Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chlormethylketon) analysiert. Es zeigte sich (Abbildung 27), dass die ESP sowohl durch rekombinantes Furin als auch bei Inkubation mit Membranfraktionen gespalten wird. Diese Spaltung lässt sich durch die Zugabe des kompetitiven Furinconvertaseinhibitors in beiden Fällen reduzieren, jedoch nicht vollständig unterdrücken.

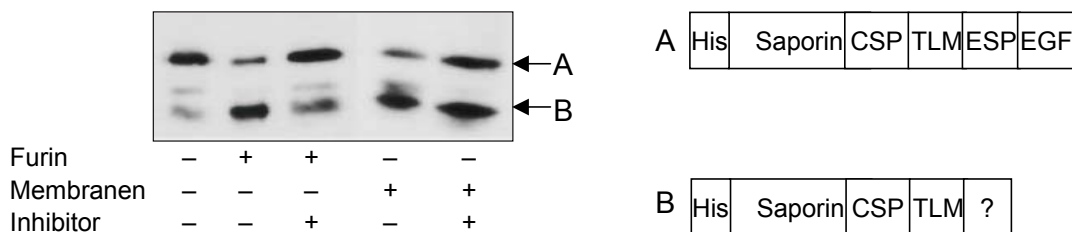


Abbildung 27: Spaltbarkeit der ESP. SapAd_{CTE}EGF wurde entweder mit rekombinantem Furin oder mit Membranfraktionen versetzt und bei 37 °C in An- und Abwesenheit eines Furinconvertaseinhibitors für 4 h inkubiert. Bei den Inhibierungsstudien wurde zunächst 10 min mit Furinconvertaseinhibitor (Endkonzentration 100 µM) vorinkubiert. Anschließend wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Immunoblot (anti-Saporin/SAR*) detektiert. Die mit Pfeil A markierte Bande stellt das ungespaltene Konstrukt, die mit Pfeil B das in der ESP gespaltene Konstrukt dar.

3.2.6 Untersuchung der Stabilität von Immunoadaptertoxinen in humanem Blutplasma

Für die spätere Anwendung des Adapters innerhalb von Immunitoxinen stellt die Stabilität im Blutplasma ein sehr wichtiges Kriterium dar. Die Stabilität wurde an SapAd_{CTE}EGF und SapAd_{CTE*}EGF untersucht, SapEGF diente dabei als adapterfreie Kontrolle. Die Konstrukte wurden jeweils bis zu 24 h mit 66 % humanem Plasma in PBS bei 37 °C inkubiert. Aufgrund der hohen, bei der SDS-PAGE störenden Proteinmenge im humanen Plasma wurden die zu untersuchenden Saporin-Konstrukte durch Bindung an Ni-NTA-Agarose unter denaturierenden Bedingungen nach der Inkubation zurückgewonnen und anschließend im Immunoblot analysiert. Die Stabilität der eingesetzten Konstrukte wurde nach densitometrischer Quantifizierung des Immunoblots anhand der relativen Spaltung erfasst.

Es konnte gezeigt werden (Abbildung 28, rechts), dass die Stabilität des adapterfreien Konstruktes SapEGF in humanem Plasma sehr hoch ist. Selbst nach 24 h konnte weder ein Abbau noch eine Spaltung detektiert werden. Im Gegensatz hierzu wurde das SapAd_{CTE}EGF-Konstrukt bereits nach 3 h zu mehr als 90 % gespalten (Abbildung 28, links). Die in die ESP eingebrachte Mutation in SapAd_{CTE*}EGF, durch die die optimale Schnittstelle für Furin eliminiert wurde, führte zu einer beachtlichen Stabilisierung des Konstruktes im humanen Plasma, so dass hier nach 24 h noch 30 % der Proteinmoleküle ungespalten waren (Abbildung 28, Mitte).

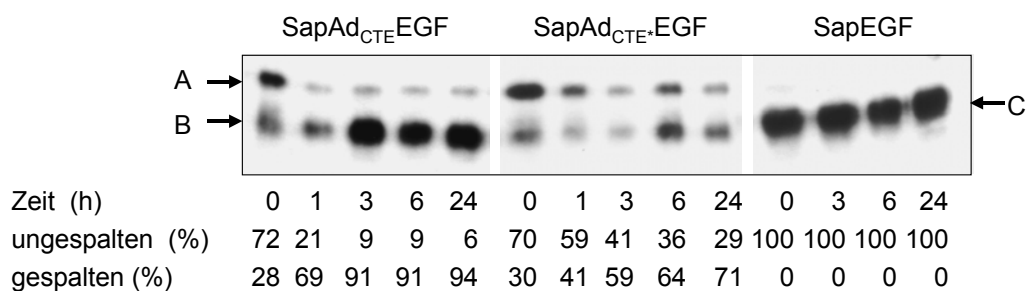


Abbildung 28: Untersuchung der Stabilität verschiedener Immunitoxine in humanem Plasma. Jeweils 1 µg der zu untersuchenden Toxine wurde in humanem Plasma für die angegebenen Zeiten bei 37 °C inkubiert und anschließend im *Batch*verfahren über Ni-NTA-Säulenmaterial von den Plasmaproteinen abgetrennt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Immunoblot (anti-Saporin / SAR*) detektiert. Die Banden A und C stellen die jeweils ungespaltenen Immunitoxin-Konstrukte und B das gespaltenen Immunitoxin dar. Die Banden aus drei Versuchsansätzen wurden durch Chemolumineszenzdetektion mit Hilfe eines FujiFilm LAS-1000-Systems quantifiziert und die Mittelwerte als relatives Verhältnis zueinander angegeben.

3.3 N-Glycosidaseaktivität der Toxinkonstrukte

Bevor die ligandenfreien oder ligandentragenden Adaptortoxine in Zellversuchen auf ihre Cytotoxizität hin untersucht wurden, wurde im Rahmen einer Funktionsanalyse der Einfluss der Adapterkomponenten auf die enzymatische Aktivität im zellfreien Milieu untersucht.

Dazu wurde der in dieser Arbeit entwickelte Adeninquantifizierungsassay eingesetzt. Die verwendeten Konstrukte sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Nativ aufgereinigtes Saporin-3 diente als Positivkontrolle. Die Menge an Adenin, die pro Stunde durch ein pmol Toxin aus 100 μ g hsDNA freigesetzt wurde, wurde unter Optimalbedingungen (siehe 2.3.15 und 2.3.16) gemessen.

Tabelle 11: N-Glycosidaseaktivität von Saporin-Fusionsproteinen

Toxinkonstrukt	Adeninfreisetzung
	pmol Adenin / pmol Toxin / h
Sap-3	670 \pm 55
HisSap	733 \pm 55
SapAd _{CM}	812 \pm 130
SapAd _{CTE}	660 \pm 15
SapAd _{CTE} EGF	514 \pm 113
SapAd _{CTE} EGF	641 \pm 247
SapEGF	480 \pm 204

Alle getesteten Saporin-Konstrukte zeigten in diesem Adeninquantifizierungsassay N-Glycosidaseaktivität. Sap_{CTE} zeigte dabei nahezu dieselbe Aktivität (660 pmol Adenin / pmol Toxin / h) wie das unmodifizierte Sap-3 (670 pmol Adenin / pmol Toxin / h). Die unter denaturierenden Bedingungen gereinigten Konstrukte HisSap und SapAd_{CM} zeigten eine leicht höhere Aktivität (733 bzw. 812 pmol Adenin / pmol Toxin / h) als Sap-3. Da sich alle gemessenen Aktivitäten in ihren Fehlerbereichen mit denen von Sap-3 überschneiden, könnte dies jedoch auf eine bloße Messwertschwankung zurückzuführen sein. Dies zeigt, dass sowohl die Verknüpfung des Toxins mit einem Adapter oder Liganden als auch die unterschiedlichen Reinigungsmethoden, die mit Denaturierung und Renaturierung der Proteine verbunden sind, keine wesentlichen Auswirkungen auf die N-Glycosidaseaktivität der Saporin-Adapterkonstrukte haben.

3.4 Cytotoxizität der Immunoadaptortoxine

Nach dem Nachweis der *in vitro*-Enzymaktivität im Adeninquantifizierungsassay, der Charakterisierung der CSP und ESP sowie der Plasmastabilität waren die Grundlagen

geschaffen, anhand des Cytotoxizitätsassays den Effekt der Toxine innerhalb eines Zellverbandes auf die Zellproliferation und somit die Cytotoxizität zu analysieren.

3.4.1 Auswahl der Zielzellen für den Cytotoxizitätsassay

Die Cytotoxizität wurde an Zellen untersucht, die in hohem Maße den HER1-Rezeptor exprimieren. Dafür wurden die Zelllinien A431, eine epidermale Krebszelllinie, und HER14, eine mit humanem HER1 transfizierte NHJ-3T3-Zelllinie eingesetzt. Als Kontrollzelllinie wurden MCF7-Zellen verwendet, denen der HER1-Rezeptor fehlt.

Die HER1-Expression wurde für alle Zelllinien überprüft (Abbildung 29). Sowohl A431- als auch HER14-Zellen exprimieren erwartungsgemäß den HER1-Rezeptor (176.5 kDa), während dieser in MCF7-Zellen nicht zu detektieren war.

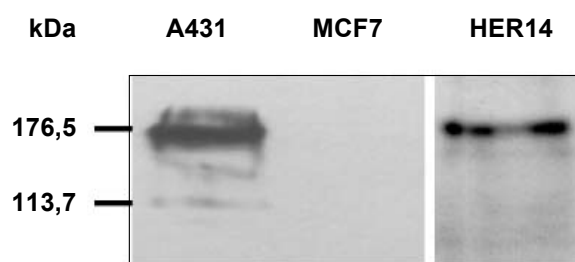


Abbildung 29: Detektion von HER1-Protein in A431-, MCF7- und HER14-Zellen. Total-Zelllysat (100 µg) wurde mittels SDS-PAGE (6 %) aufgetrennt und im Immunoblot mit monoklonalen Antikörpern gegen HER1 (sekundärer Antikörper: GAR*) detektiert.

3.4.2 Kalibrierung des FDA-Assays

Der FDA-Assay wurde als nichtradioaktive Methode zur Bestimmung der Cytotoxizität ausgewählt. Er beruht darauf, dass lebende Zellen in der Lage sind, durch Esterasen das farblose Fluoresceindiacetat in fluoreszierendes Fluorescein umzuwandeln. Dieses wird in das umgebene Medium abgegeben und kann im Fluoreszenzspektrometer quantifiziert werden.

Für den FDA-Assay konnten lineare Beziehungen für die resultierenden Fluoreszenzsignale im Bereich von 0–40 000 Zellen bei einer Inkubationszeit von 45 min nachgewiesen werden (siehe Abbildung 30). Eine Verlängerung der Inkubationszeit führte zu einer Sättigung und somit zum Abflachen der Geraden, so dass für weitere Messungen eine Inkubationszeit von 45 min gewählt wurde.

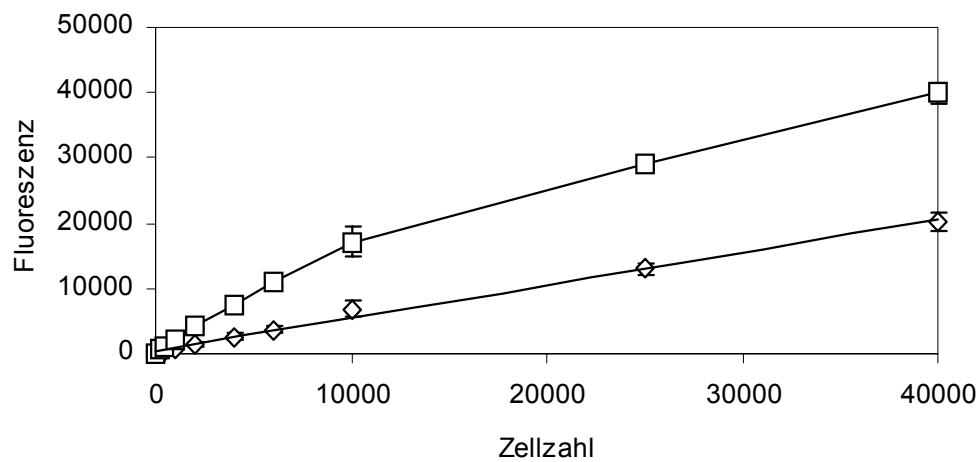


Abbildung 30: Quantifizierung verschiedener Zellzahlen mit Hilfe des FDA-Assays. HER14-Zellen wurden in Dichten von 0–40 000 Zellen / Vertiefung ausgesät. Nach der Adhäsion wurden die Zellen $2 \times$ mit Dulbecco-PBS⁺⁺ gewaschen und mit 200 μ l FDA-Lösung versetzt. Nach Inkubation im Brutschrank (\diamond 45min, \square 90min) wurden die Fluoreszenzsignale gemessen (Exzitation 485 nm, Emission 538 nm). Dargestellt sind die aus 8 Messungen erhaltenen, gemittelten Werte und deren Standardabweichungen.

Da sich das Zellwachstum auch in Abhängigkeit der anfänglich ausgesäten Zelldichte stark unterscheiden kann, wurde in einem weiteren Experiment untersucht, inwieweit die Linearität des Messbereiches bezüglich der Zellzahl nach einer Zeit von 64 h gewahrt bleibt. Aus Abbildung 31 geht hervor, dass nur im Bereich von 0–2000 Zellen eine Linearität zwischen ausgesäter Zellzahl und gemessenem Fluoreszenzsignal besteht. Oberhalb dieses Wertes kommt es zu einem extremen Abflachen des Signals, woraus sich schließen lässt, dass eine hohe Zelldichte erwartungsgemäß einen negativen Einfluss auf das Wachstum aufweist. Um im linearen Bereich messen zu können, wurde für die weiteren Untersuchungen eine Zellzahl von 2000 Zellen gewählt.

3.4.3 Messung der immunotoxinabhängigen Cytotoxizität

Die Cytotoxizität der Immunotoxine wurde im FDA-Assay über die Anzahl der überlebenden Zellen bestimmt. Hierzu wurden die A431-, HER14- und MCF7-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von SapAd_{CTE}, SapEGF, SapAd_{CTE}EGF und SapAd_{CTE}*EGF inkubiert. Saporin und rekombinantes EGF dienten hier als Kontrollen.

Saporin zeigte unabhängig von der Zelllinie einen leichten cytotoxischen Effekt (Überlebensindex 50 %) in Konzentrationen oberhalb von 300 nM (Abbildung 32, A). Ähnlich verhält sich das ebenfalls ligandenfreie SapAd_{CTE} (Abbildung 32, B), das bei gleichen Konzentrationen einen Überlebensindex von ca. 50 % auf allen Zellen aufweist.

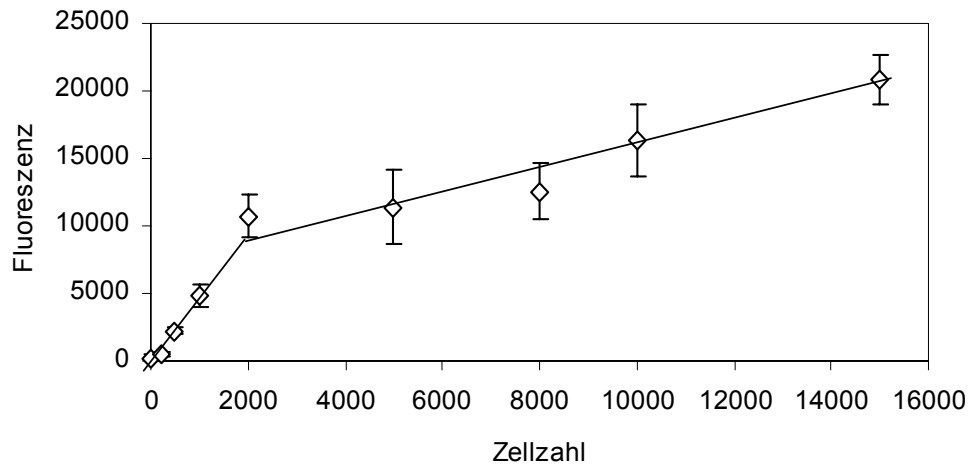


Abbildung 31: Messung der Zelldichte im FDA-Assay nach einer 64-stündigen Kultivierung der Zellen. Die ausgesäten Zellen (0 bis 15000) wurden ohne Zusatz von weiteren Stoffen inkubiert (die 64 h entsprechen der unter Abschnitt 2.6.4, S. 42 angegebenen Gesamtkultivierungszeit der Cytotoxizitätsmessung). Anschließend wurden die Zellen gewaschen ($2 \times$ PBS), mit $200 \mu\text{l}$ FDA-Lösung versetzt und nach 45 min Inkubation im Brutschrank gemessen (Exzitation 485 nm, Emission 538 nm). Dargestellt sind die aus 8 Messungen erhaltenen, gemittelten Werte und deren Standardabweichungen.

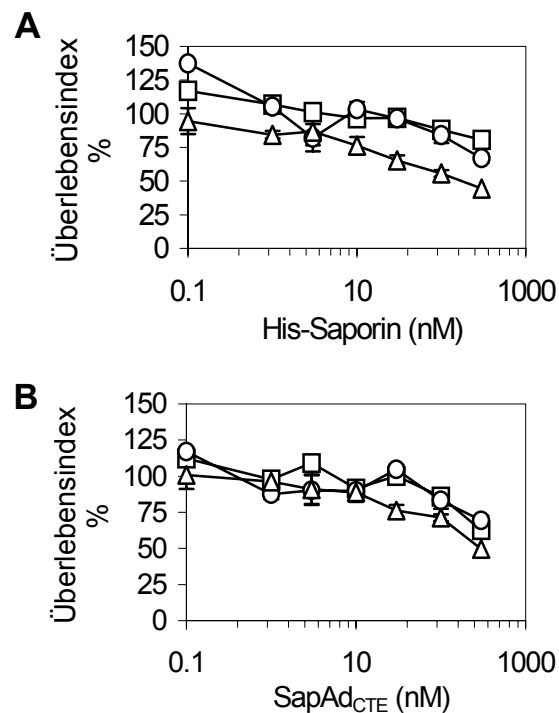


Abbildung 32: Cytotoxizität von Saporin und SapAd_{CTE}. Verwendet wurden jeweils 2000 Zellen der Linien (□) A431, (○) MCF7 und (△) HER14. Diese wurden mit 0.1 bis 300 nM Saporin (A) und SapAd_{CTE} (B) versetzt, für 48 h im Brutschrank inkubiert, anschließend im FDA-Assay photospektrometrisch vermessen und der prozentuale Überlebensindex sowie dessen Standardabweichung berechnet (aus drei unabhängigen Messungen mit Doppelbestimmungen).

Unterschiedliche Konzentrationen von rekombinantem EGF sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit sich EGF alleine in hohen Dosen auf das Zellwachstum auswirkt. Dabei konnte eine Cytotoxizität gegenüber A431-Zellen (Abbildung 33) detektiert werden. Ab einer Konzentration von 10 nM zeigte sich bereits ein Absinken der Überlebensrate auf 60 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Eine Erhöhung der Konzentration auf bis zu 1 μ M brachte allerdings keinen weiteren Anstieg der Cytotoxizität auf A431-Zellen. Keinen Effekt hatte hingegen EGF auf die anderen beiden Zelllinien MCF7 und HER14.

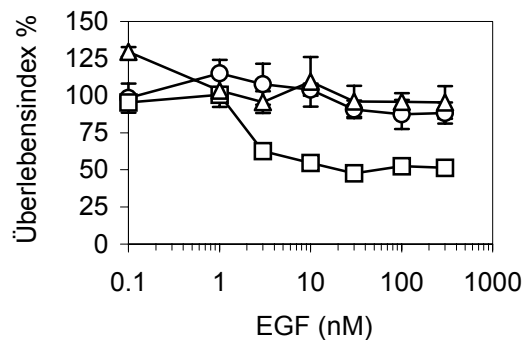


Abbildung 33: FDA-Assay zur Bestimmung der Cytotoxizität von EGF an verschiedenen Zelllinien. Es wurden die Zelllinien (□) A-431, (○) MCF7 und (△) HER14 verwendet und 0.1 bis 300 nM EGF zugesetzt. Aus den im FDA-Assay gemessenen Fluoreszenzsignalen (Exzitation 485 nm, Emission 538 nm) wurden die prozentualen Überlebensindizes sowie deren Standardabweichungen aus drei Versuchen berechnet.

Die Untersuchung der cytotoxischen Wirkung der Immunotoxine SapEGF, SapAd_{CTE}-EGF und SapAd_{CTE}*EGF auf die A431-Zellen zeigte, dass diese Immunotoxine eine klar konzentrationsabhängige Cytotoxizität vermitteln (Abbildung 34). Diese fällt im Vergleich zu dem durch EGF-induzierten Effekt deutlich stärker aus und zeigt auch noch bei höheren Dosen von über 10 nM eine zunehmende Wirkung.

Zur Untersuchung der Wirkung der EGF-tragenden Toxine unabhängig von dem durch EGF alleine hervorgerufenen cytotoxischen Effekt wurden die Zelllinien HER14 und MCF7 herangezogen (Abbildung 35). Hierbei zeigten die Immunotoxine SapEGF, SapAd_{CTE}EGF und SapAd_{CTE}*EGF auf HER14-Zellen eine eindeutige konzentrationsabhängige Cytotoxizität. Die IC₅₀-Werte der Toxine liegen hier zwischen 1 und 5 nM. Auf die HER1-rezeptordefizienten MCF7-Zellen zeigten diese Toxine wie erwartet keinen cytotoxischen Effekt im Konzentrationsbereich der IC₅₀-Werte für HER14-Zellen (1–5 nM). Erst bei der 100fachen eingesetzten Konzentration an Immunotoxinen (300 nM) wurde ein sehr geringer Effekt auf die Zellproliferation gemessen.

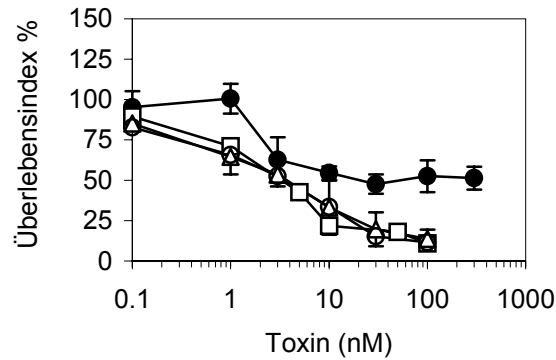


Abbildung 34: Messung der konzentrationsabhängigen Cytotoxizität von Immunotoxinen und EGF auf A431-Zellen. A431-Zellen wurden mit jeweils 0.1 bis 100 nM (□) SapAd_{CTE}EGF, (○) SapAd_{CTE}*EGF, (△) SapEGF oder 0.1 bis 300 nM (●) EGF für 48 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden im FDA-Assay die Fluoreszenzsignale gemessen und der prozentuale Überlebensindex und deren Standardabweichungen aus drei Versuchen berechnet.

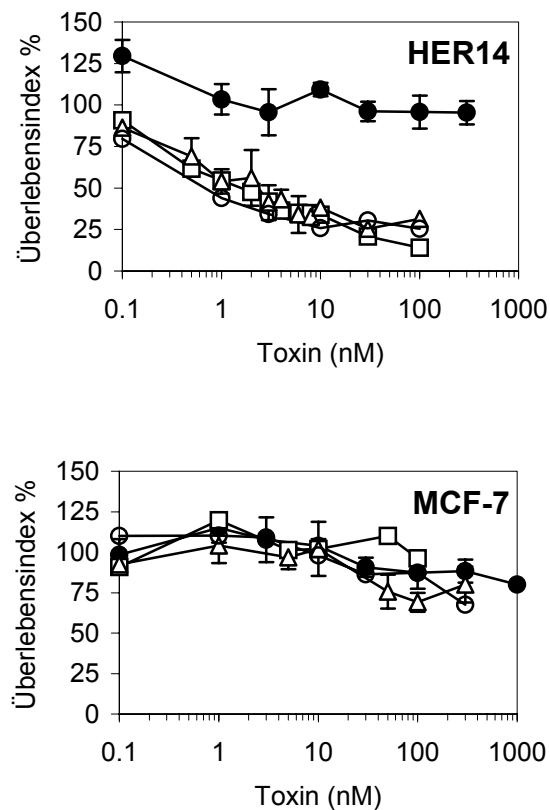


Abbildung 35: Cytotoxizität von Saporin-Immunotoxinen und EGF auf HER14- und MCF7-Zellen. Es wurden jeweils 0.1 bis 100 nM (□) SapAd_{CTE}EGF, (○) SapAd_{CTE}*EGF, (△) SapEGF oder 0.1 bis 300 nM (●) EGF bei HER14-Zellen bzw 0.1 bis maximal 1000 nM bei MCF7-Zellen für 48 h mit den Zellen inkubiert, anschließend der prozentuale Überlebensindex im FDA-Assay bestimmt. Die Fehler stellen die Standardabweichungen aus drei Versuchen berechnet.

3.4.4 Berechnung der IC₅₀-Werte der Immunotoxine

Aus den Dosiswirkungskurven in der Abbildung 34 und Abbildung 35 lassen sich mittels linearer Regression die IC₅₀-Werte der eingesetzten Immunotoxine gegenüber den verwendeten Zelllinien berechnen. Hierzu wurde der lineare Bereich der semilogarithmischen Darstellung durch eine Ausgleichsgerade erfasst, die durch eine Formel für eine logarithmische Kurve beschrieben werden konnte. Diese Vorgehensweise ist exemplarisch in Abbildung 36 dargestellt. Die Formel wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft) berechnet und beschreibt eine Ausgleichsgerade für den zugrundeliegenden semilogarithmisch aufgetragenen Konzentrationsbereich. Sie ist nur in diesem Konzentrationsbereich gültig.

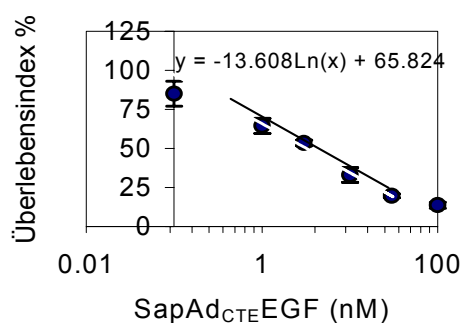


Abbildung 36: Darstellung der Ausgleichsgeraden für die Dosiswirkungskurve von SapAd_{CTE}EGF auf HER14-Zellen im Bereich von 0.1 bis 100 nM. Angegeben ist der im FDA-Assay bestimmte Überlebensindex. Eingezeichnet ist die mittels Excel berechnete Ausgleichsgerade des linearen Bereiches (1 bis 30 nM) der semilogarithmisch aufgetragenen Dosiswirkungskurve.

Zur Berechnung der IC₅₀-Werte muss die Formel der Ausgleichsgeraden nach x aufgelöst werden. Die aus Abbildung 36 berechnete Formel der konzentrationsabhängigen Cytotoxizität von SapAd_{CTE}EGF gegen HER14-Zellen ergibt somit einen IC₅₀-Wert von:

$$y = -13.608 \ln(x) + 65.824 = \text{Überlebensindex} \quad \text{für } 1 \leq x \leq 30$$

Bei einem Überlebensindex von 50 % ergibt sich folgende Gleichung:

$$x_{(y=50)} = e^{(50 - 65.824) / -13.608} = 3.2$$

Die logarithmischen Formeln zur Berechnung aller Ausgleichsgeraden sind in Tabelle 12 und die daraus berechneten IC₅₀-Werte für die verschiedenen Toxine und Zelllinien in Tabelle 13 wiedergegeben.

Tabelle 12: Ausgleichsgeraden der Dosiswirkungskurven verwendeter Immunotoxine

Zelllinie	SapAd _{CTE} EGF	SapAd _{CTE} EGF	SapEGF
A431 ^a	$y = -13.716\ln(x) + 65.90$	$y = -14.917\ln(x) + 67.14$	$y = -20.675\ln(x) + 72.16$
HER14 ^b	$y = -10.384\ln(x) + 57.65$	$y = -9.085\ln(x) + 50.974$	$y = -9.776\ln(x) + 53.83$
MCF7	keine Cytotoxizität messbar		

^a für den Konzentrationsbereich 1–30 nM

^b für den Konzentrationsbereich 0.5–30 nM

Tabelle 13: Aus den Ausgleichsgeraden berechnete IC₅₀-Werte der Immunotoxine

Zelllinie	SapAd _{CTE} EGF (nM)	SapAd _{CTE} EGF (nM)	SapEGF (nM)
A431	3.2	3.2	2.9
HER14	1.1	2.1	1.5
MCF7	> 300	> 300	> 300

Der IC₅₀-Wert ist die Konzentration an Immunotoxin, die zu einer 50 %igen Inhibierung des Zellwachstums führt (gemessen im FDA-Assay).

Betrachtet man die bisherigen Ergebnisse der gemessenen Cytotoxizität im FDA-Assay, so lässt sich folgendes zusammenfassen:

- Immunotoxine mit EGF als Liganden zeigen auf alle HER1-positiven Zelllinien eine konzentrationsabhängige Cytotoxizität. Die IC₅₀-Werte variieren leicht zwischen 1 und 3 nM.
- Saporin alleine zeigt nur eine leichte Cytotoxizität unabhängig von der Zelllinie und den exprimierten Rezeptoren. Der IC₅₀-Wert liegt, verglichen mit den Werten der ligandentragenden Toxine, etwa um den Faktor 300 höher.
- Saporin-Adaptertoxine ohne Liganden zeigen keine höhere Cytotoxizität als Saporin alleine.
- EGF alleine zeigt nur bei A431-Zellen einen wachstumshemmenden Effekt. Bei HER14- und MCF7-Zellen konnte kein Effekt beobachtet werden.
- Vergleicht man die Cytotoxizität der ligandentragenden Toxine untereinander, so ist eine fast identische Cytotoxizität zu erkennen. Deutlich wird dies bei der Inkubation der Immunotoxine mit A431-Zellen (Abbildung 34) und HER14-Zellen (Abbildung 35). Bei allen gemessenen Konzentrationen überschneiden sich hier die Werte des Überlebensindex innerhalb ihrer Standardabweichungen.
- Betrachtet man die Stabilität der Konstrukte in humanem Plasma, so zeigt sich, dass der Adapter sehr starken Einfluss auf die Abspaltung des Liganden hat.

3.5 Transferassay

Eine Aufgabe des Adapters ist die Reduzierung von Nebenwirkungen durch einen zielgerichteten Transport und die Akkumulation des Toxins im Cytosol.

Um untersuchen zu können, inwieweit umgebendes normal differenziertes Gewebe durch die Immunotoxine beschädigt wird, wurde ein Versuchsansatz gewählt, bei dem das Toxin nach der Inkubation auf den Zielzellen auf frische Zellen überführt wird. Um zu verhindern, dass das aus dem Immunotoxin freigesetzte toxin- und adapterfreie EGF nach dem Transfer eine Wirkung auf die frischen Zellen zeigt, wurde für diesen Versuch mit der Zelllinie HER14 gearbeitet.

Für diesen als Transferassay bezeichneten Versuchsansatz wurden Zellen in Medium kultiviert, dem zusätzlich Immunotoxine in einer Konzentration von 10 nM zugesetzt waren. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde dieses Medium auf frische Zellen überführt. Parallel dazu wurden zellfreie Mediumkontrollen angesetzt, bei denen unter denselben Bedingungen mit 10 mM Immunotoxin inkubiert und anschließend das Medium ebenfalls auf frische Zellen transferiert wurde. Nach diesem Transfer wurden die Ansätze für weitere 48 h wie im normalen Cytotoxizitätsassay inkubiert. Im nachfolgenden FDA-Assay wurde der prozentuale Überlebensindex der frischen Zellen nach der Inkubation mit dem vorinkubierten Medium bestimmt und mit Hilfe der Ausgleichsgeraden, die in Tabelle 12 dargestellt sind, die Konzentration des aktiven Toxins berechnet. Diese Messungen (dargestellt in Abbildung 37) zeigten, dass zellfreies Medium nur leichte Effekte auf die cytotoxische Wirkung des SapEGF hatte, während die Cytotoxizität von SapAd_{CTE}EGF nach Inkubation in zellfreiem Medium erheblich reduziert wurde. Der Cytotoxizitätsverlust lässt sich auf eine Spaltung innerhalb des Adapters zurückführen, wie die Immunoblotanalysen dieser Proben (Abbildung 37, rechts) zeigten. Im Gegensatz zu SapAd_{CTE}EGF zeigte das Konstrukt mit der mutierten ESP*, SapAd_{CTE*}EGF, eine wesentlich höhere Stabilität im zellfreien Medium, die mit der von SapEGF zu vergleichen war. Der Transferassay nach Inkubation auf HER14-Zellen zeigte, dass SapEGF nach 6 h immer noch zu 60 % in der aktiven Form vorlag, während dies bei SapAd_{CTE*}EGF nur noch zu 20 % der Fall war. Der bei SapEGF beobachtete Verlust der aktiven Form ist identisch mit dem, der während der zellfreien Inkubation auftrat, was auf einen nichtzellspezifischen Effekt hindeutet. Im Gegensatz hierzu zeigte SapAd_{CTE*}EGF eine klare Reduzierung seiner Cytotoxizität im Vergleich zur zellfreien Kontrolle. Die Cytotoxizität von SapAd_{CTE}EGF wurde in ähnlich starker Weise auf den HER14-Zellen reduziert, unterschied sich aber kaum von der zellfreien Kontrolle.

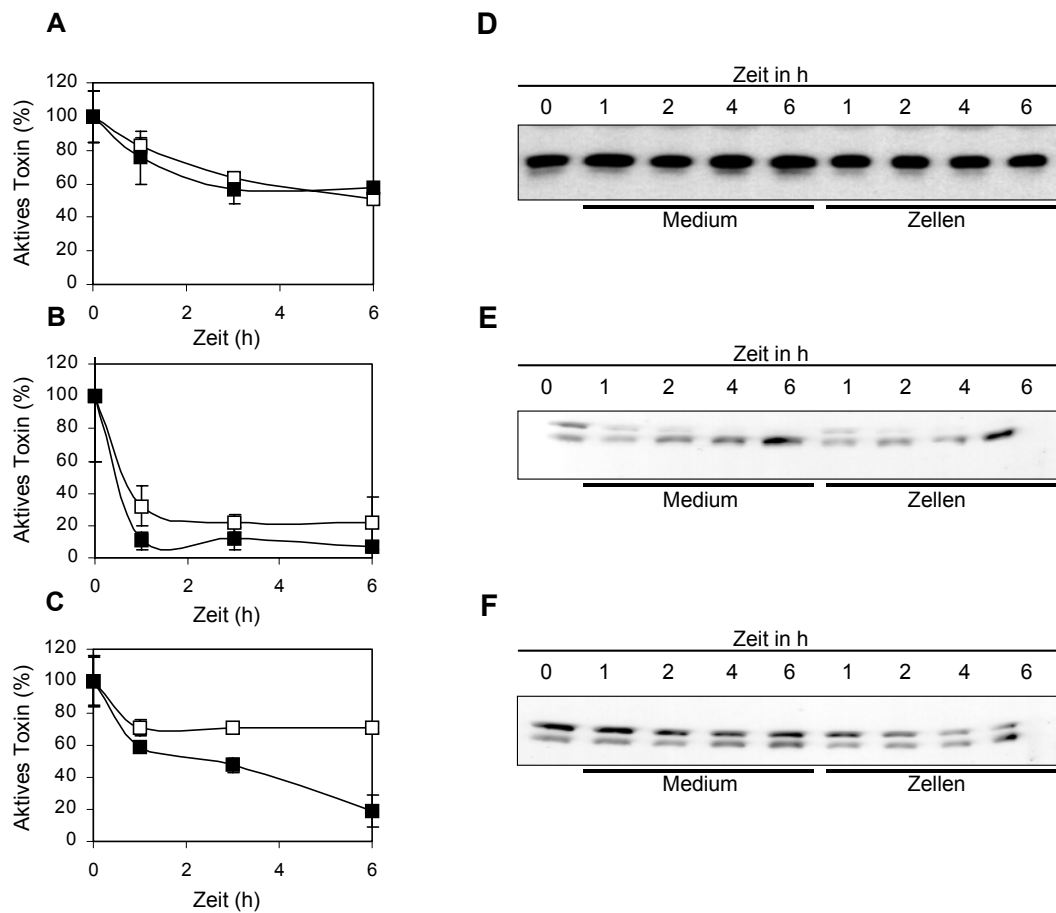


Abbildung 37: Quantifizierung der zellvermittelten Adapterspaltung. Jeweils 10 nM (A) SapEGF, (B) SapAd_{CTE}EGF und (C) SapAd_{CTE*}EGF wurden in (■) Anwesenheit oder (□) Abwesenheit von HER14-Zellen für 1, 3 und 6 h inkubiert. Der Überstand wurde auf frische HER14-Zellen (2000 Zellen / Well) transferiert und für weitere 48 h inkubiert. Anschließend wurde ein FDA-Assay durchgeführt und die Menge an aktivem Toxin mittels Standardkurven aus dem Überlebensindex bestimmt. Die relative Menge an aktivem Toxin ist der Mittelwert aus drei Versuchen mit Standardfehler. (D)–(F) Parallel wurden die transferierten Überstände exemplarisch im Immunoblot (12 % SDS-PAGE, Detektion: anti-Saporin / SAR*) auf ihre Spaltung analysiert.

Im weiteren wurde die Abhängigkeit der Inaktivierung der Immunoadaptortoxine von verschiedenen Zelllinien untersucht. Hierfür wurde erneut ein Transferassay durchgeführt, bei dem 10 nM Immuntoxine auf den Zelllinien HER14, A431 und der Kontrollzelllinie MCF7 vorinkubiert und nach 6 h auf frische HER14 Zellen transferiert wurden. Nach weiteren 48 h Inkubation wurde ein FDA-Assay durchgeführt und die Menge an aktivem Toxin mittels Standardkurven (Tabelle 12) aus dem Überlebensindex bestimmt. Die ermittelten Mengen an aktivem Toxin sind in Abbildung 38 dargestellt. Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass die Abnahme der aktiven Form nach 6-stündiger Inkubation auf den Zelllinien HER14 und A431 bei den eingesetzten Immuntoxinen

SapEGF, SapAd_{CTE}EGF und SapAd_{CTE}*EGF vergleichbar war, während nach Inkubation auf MCF7-Zellen die adaptertragenden Toxine SapAd_{CTE}EGF und SapAd_{CTE}*EGF einen deutlich geringeren Verlust ihrer aktiven Form aufwiesen

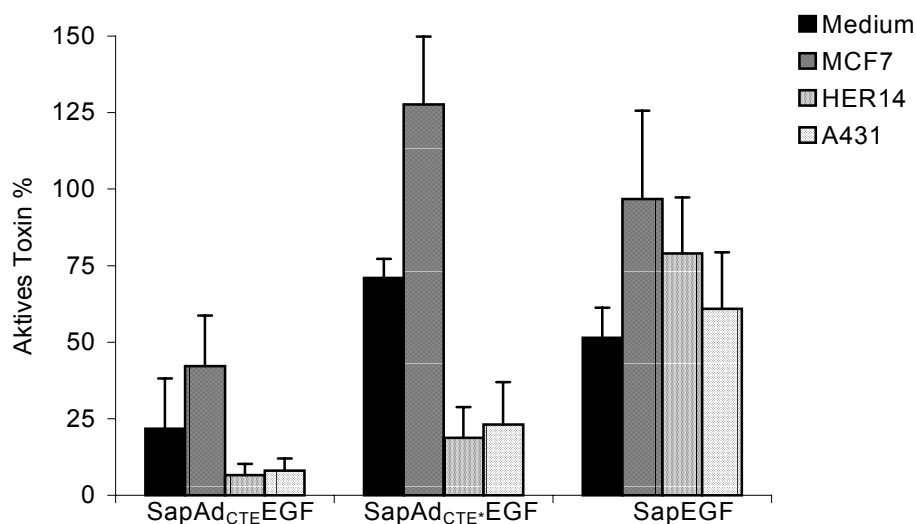


Abbildung 38: Menge an funktionell aktivem Immunotoxin nach 6-stündiger Vorinkubation auf unterschiedlichen Zelllinien. Die Immunotoxine SapAd_{CTE}EGF, SapAd_{CTE}*EGF und SapEGF wurden jeweils für 6 h in einer Konzentration von 10 nM mit 500 000 Zellen der Linien HER14, A431 oder MCF7 bei 37 °C vorinkubiert. Als Kontrolle (schwarzer Balken) diente Medium ohne Zellen. Die vorinkubierten Proben wurden im Anschluss auf HER14-Zellen transferiert und nach 48 h im FDA-Assay die Überlebensrate bestimmt, die mittels Ausgleichsgeraden (Tabelle 12) in die Konzentration des aktiven Toxins umgerechnet wurde. Dargestellt sind die relativen Mengen an aktivem Toxin in Bezug zu den eingesetzten Mengen (= 100%) als Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens drei Versuchen.

3.6 Bindung des Liganden an die Zielzelle

Um zu untersuchen, weshalb die Konstrukte mit Adapter trotz der Spaltung und damit verbundenen Reduzierung ihrer Cytotoxizität im Vergleich zu den adapterfreien Konstrukten keinen Unterschied in ihrer Cytotoxizität zeigen, wurde bestimmt, nach welchem Zeitpunkt die Toxine auf den Zellen ihre vollständige Wirkung ausprägen. Hierfür wurden die ausgesäten Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte mit Toxin versetzt und anschließend in toxinfreiem Medium für 48 h inkubiert. Die Ergebnisse zeigen (Abbildung 39), dass sowohl SapAd_{CTE}EGF als auch SapEGF innerhalb der ersten Minuten bereits fest an die Zielzelle binden und im Laufe der 48 h langen Inkubation ihre Cytotoxizität vermitteln. Zellen, die in gleicher Weise jedoch ohne Toxin behandelt wurden, wiesen keinen Unterschied in ihrem Wachstum auf.

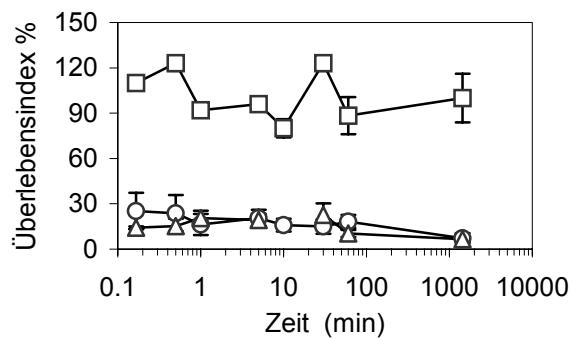


Abbildung 39: Untersuchung der Kinetik für die Bindung des Immunotoxins an die Zielzelle. HER14-Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät (2000 / Vertiefung) und nach 16 h mit (Δ) 10 nM SapEGF, (\circ) 10 nM SapAd_{CTE}EGF oder (\square) ohne Toxin inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Toxine von den Zellen entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in frischem Medium weiterkultiviert. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Zellen in dem FDA-Assay eingesetzt. Die Werte stellen den prozentualen Überlebensindex mit Standardabweichung aus drei Versuchen dar.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Gesamtkonzeption der in dieser Arbeit mit Hilfe molekularbiologischer Methoden hergestellten Immunoadaptertoxine es ermöglicht, die Eigenschaften bisher verwendeter Immunotoxine durch einfache Variation des Adapters in Bezug auf zielzellspezifische Cytotoxizität und unspezifische Nebenwirkungen grundlegend zu verbessern und den Anforderungen für individuelle Krebstherapien anzupassen.