

# **Design modularer Immunotoxine unter Verwendung polyionischer Fusionspeptide**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Martin Kleinschmidt  
geb. am 25.07.1975 in Weißenfels

## **Gutachter**

1. PD Dr. Hauke Lilie
2. Prof. Dr. Johannes Buchner
3. Dr. Ulrich Brinkmann

Tag der öffentlichen Verteidigung: Mittwoch, dem 29.09.2004

**urn:nbn:de:gbv:3-000007358**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007358>]



# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungen .....IV

## 1 Einleitung..... 1

1.1. Entwicklung von Antikörpern für die Krebstherapie .....	3
1.2. Strategien zur Verstärkung der Anti-Tumor-Aktivität von Antikörpern.....	6
1.2.1 Verstärkung der Immunsystem-aktivierenden Wirkung .....	6
1.2.2. Strategie des <i>pre-targeting</i> .....	8
1.2.3 Strategie des <i>indirect arming</i> .....	9
1.2.4 Strategie des <i>direct arming</i> .....	9
1.3. Entwicklung von Immunotoxinen für die Krebstherapie .....	11
1.4 Problemstellung und Ziele.....	18

## 2 Material und Methoden..... 20

2.1 Materialien.....	20
2.1.1 Geräte .....	20
2.1.2 Chemikalien, Molekulargewichtstandards und Referenzproteine, Kits, Reagenzien und Enzyme, Peptide, sonstiges Material.....	23
2.1.3 Plasmide und Vektoren.....	27
2.1.3.1 Ausgangskonstrukte .....	27
2.1.3.2 Selbsterstellte Konstrukte .....	28
2.1.4 Oligonukleotide .....	28
2.1.5 Mikroorganismen .....	29
2.1.6 Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer und Lösungen .....	30
2.1.7 Materialien für Zellkultur .....	32
2.2 Methoden.....	35
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	35
2.2.1.1 Klonierung und Sequenzierung .....	35
2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion .....	38
2.2.2 Konstruktion der Expressionsvektoren.....	39
2.2.2.1 Vektoren zur Expression von E8CPE38.....	39
2.2.2.2 Vektor zur Expression des GST-E8CPE38 Genfusion.....	41
2.2.3 Stammhaltung und Kultivierung von Mikroorganismen.....	41
2.2.3.1 Stammhaltung und Anzucht von Mikroorganismen.....	41
2.2.3.2 Transformation von Mikroorganismen.....	42

2.2.3.3 Expressionstests .....	43
2.2.3.4 Expression von GST-E8CPE38 in BL21 .....	43
2.2.3.5 Bioreaktorkultivierung .....	44
2.2.4. Proteinchemische Methoden .....	44
2.2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	44
2.2.4.2 Western Blot .....	46
2.2.4.3 Herstellung des Rohextraktes zur Isolierung von löslichem Protein .....	47
2.2.4.4 Isolierung von <i>inclusion bodies</i> .....	48
2.2.4.5 Solubilisierung von <i>inclusion bodies</i> .....	48
2.2.4.6 Proteinbestimmung nach Bradford .....	49
2.2.4.7 Renaturierung des dsFv-B3-R <sub>8</sub> CP .....	49
2.2.4.8 Konzentrierung von Proteinlösungen .....	50
2.2.4.9 Chromatographische Reinigung von Proteinen .....	50
2.2.4.10 Bestimmung freier SH-Gruppen .....	54
2.2.4.11 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen.....	54
2.2.4.12 Assoziation von Proteinen .....	55
2.2.4.13 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von B3-GzmB und GzmB-GCD <sub>8</sub> .....	57
2.2.5. Spektroskopische Methoden .....	57
2.2.5.1 UV/VIS Spektroskopie .....	57
2.2.5.2 Fluoreszenz-Spektroskopie .....	59
2.2.5.3 CD-Spektroskopie .....	63
2.2.5.4 Massenspektrometrie .....	64
2.2.6 N-terminale Sequenzierung von Proteinen .....	64
2.2.7 Zellbiologische Methoden .....	64
2.2.7.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen als <i>Monolayer</i> .....	64
2.2.7.2 Passagierung eukaryontischer Zellen.....	65
2.2.7.3 Präparation einer Kryokultur .....	65
2.2.7.4 Reaktivierung einer Kryokultur .....	65
2.2.7.5 Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Antikörpern in eukaryontische Zellen .....	65
2.2.7.6 Fluoreszenzmikroskopie .....	67
2.2.7.7 Cytotoxizitätstest.....	67
2.2.7.8 Colorimetrische Auswertung des Cytotoxizitätstests .....	68
2.2.7.9 Durchfluscytometrie .....	68
2.2.7.10 Bestimmung des IC <sub>50</sub> -Wertes.....	71

<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>72</b>
3.1 Immunotoxin B3-PE38 .....	72
3.1.1 Optimierung der Expression von E <sub>8</sub> C-PE38 .....	73
3.1.2 Reinigung von E <sub>8</sub> C-PE38 und dsFv-B3R <sub>8</sub> CP .....	75
3.1.3 Herstellung des modularen Immunotoxins B3-PE38 .....	78
3.1.4 Biophysikalische Charakterisierung des B3-PE38 .....	81
3.1.5 Biologische Aktivität des Immunotoxins B3-PE38 in Zellkultur .....	86
3.2 Immunotoxin B3-GzmB .....	91
3.2.1 Herstellung des modularen Immunotoxins B3-GzmB .....	92
3.2.2 Untersuchung der <i>in vitro</i> Aktivität des B3-GzmB .....	95
3.2.3 Biologische Aktivität des Immunotoxins B3-GzmB in Zellkultur .....	99
3.3 Immunotoxin B3-toxGal .....	105
3.3.1 Herstellung und Reinigung von Gal-CE <sub>8</sub> P und toxGal-CE <sub>8</sub> P .....	106
3.3.2 Massenspektroskopische Untersuchung von toxGal-CE <sub>8</sub> P .....	108
3.3.3 Herstellung des modularen Immunotoxins B3-toxGal .....	108
3.3.4 Biologische Aktivität des Immunotoxins B3-toxGal in Zellkultur .....	112
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>114</b>
4.1. Immunotoxin B3-PE38 .....	115
4.1.1 Produktion von dsFv-B3-R <sub>8</sub> CP und E <sub>8</sub> C-PE38 .....	115
4.1.2 Kopplung von dsFv-B3-R <sub>8</sub> CP mit E <sub>8</sub> C-PE38 .....	116
4.1.3. Biophysikalische Charakterisierung des Immunotoxins B3-PE38 .....	117
4.1.4 Biologische Aktivität des Immunotoxins B3-PE38 in Zellkultur .....	118
4.2. Immunotoxin B3-GzmB .....	120
4.2.1 Produktion von GzmB-GCD <sub>8</sub> und Kopplung mit dsFv-B3-R <sub>8</sub> CP .....	120
4.2.2 Untersuchung der <i>in vitro</i> Aktivität des B3-GzmB .....	121
4.2.3 Biologische Aktivität des Immunotoxins B3-GzmB in Zellkultur .....	122
4.3. Immunotoxin B3-toxGal .....	126
4.3.1 Produktion von Gal-CE <sub>8</sub> P und toxGal-CE <sub>8</sub> P .....	126
4.3.2 Cytotoxizität von Gal-CE <sub>8</sub> P und toxGal-CE <sub>8</sub> P .....	127
4.3.3 Kopplung von dsFv-B3-R <sub>8</sub> CP und toxGal-CE <sub>8</sub> P .....	127
4.3.4 Biologische Aktivität des Immunotoxins B3-toxGal in Zellkultur .....	128
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>129</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>131</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ac-IEPD-pNA	Granzyme B Substrat VIII, Colorimetrisch
ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
ADEPT	<i>antibody directed enzyme prodrug therapy</i>
ADP	Adenosindiphosphat
Amp <sup>r</sup>	Marker, der Resistenz gegenüber Ampicillin vermittelt
B3	monoklonaler Antikörper, der gegen das Oligosaccharid Lewis Y gerichtet ist, das auf vielen humanen Tumorzellen präsentiert wird
B3(dsFv)	disulfidverbrücktes Fv-Fragment des B3-Antikörpers
B3(dsFv)-PE38	Immunotoxin, genetische Fusion von B3(dsFv) und PE38
B3(Fv)-PE38	Immunotoxin, genetische Fusion von B3(scFv) und PE38
B3(scFv)	<i>single chain</i> Fv-Fragment des B3-Antikörpers
B3-Gal	Kopplungsprodukt von dsFv-B3-R <sub>8</sub> CP und Gal-CE <sub>8</sub> P
B3-GzmB	polyionisches Immunotoxin, bestehend aus dsFv-B3-R <sub>8</sub> CP und GzmB-GCD <sub>8</sub>
B3-PE38	polyionischen Immunotoxin, bestehend aus dsFv-B3-R <sub>8</sub> CP und E <sub>8</sub> C-PE38
B3-toxGal	polyionisches Immunotoxin, bestehend aus dsFv-B3-R <sub>8</sub> CP und toxGal-CE <sub>8</sub> P
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C1	erste Komplementkomponente
C1q	Untereinheit der ersten Komplementkomponente, bindet an die Fc-Abschnitte zweier benachbarter Antikörper
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CD	Circulardichroismus
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i>
CDR	<i>complement determining region</i> ; Bereiche in den variablen Domänen eines Antikörpers, die für die Antigenerkennung verantwortlich sind
CDX	<i>clustered differentiation</i> ; antigene Determinante auf der Oberfläche von Zellen, z. B. CD20

CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
CI-MPR	Kalzium-unabhängiger Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CS	Kälberserum
C-Terminus	Carboxylende einer Peptidkette
CTLA4Ig	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4-IgG1</i>
Cu <sup>2+</sup>	Kupfer-II-ionen
CuCl <sub>2</sub>	Kupfer-II-chlorid
DAB <sub>389</sub> IL2	trunkiertes Diphtheria Toxin, C-Terminus wurde genetisch mit Interleukin 2 fusioniert
DABCO	1,4-Diazobicyclo[2,2,2]-octan
deg	<i>degree</i> , Grad
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Mix
dsFv-B3-R <sub>8</sub> CP	disulfidverbrücktes Fv-Fragment des B3-Antikörpers, am C-Terminus von V <sub>H</sub> durch das Peptid R8CP erweitert
DT	<i>Diphtheria</i> Toxin
DTE	Dithioerythritol
DTNB	5,5'-Dithio- <i>bis</i> (2-nitrobenzoesäure)
DTP	2,2'-Dithiodipyridin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E <sub>280 nm</sub>	Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm
E <sub>8</sub> C-PE38	trunkierte Variante des <i>Pseudomonas</i> Exotoxins, am N-Terminus durch das Peptide E <sub>8</sub> C erweitert
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eEF-2	eukaryontischer Elongationsfaktor 2
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ErbB	Rezeptor-Tyrosin-Kinase, überexprimiert auf Krebszellen
EtOH	Ethanol

---

Fab	antigenbindendes Fragment, bestehend aus der leichten Kette sowie der variablen und ersten konstanten Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
FabE10C	Antikörperfragment mit dem Fusionspeptid GluGluGluGluGluGluGluGluGluGluSerCysPro am C-Terminus der ersten konstanten Domäne der schweren Kette
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
Fc	zweite und dritte konstante Domäne eines Antikörpers
Fc $\gamma$ -Rezeptor	Rezeptor, der an den Fc-Abschnitt von Antikörpern bindet
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-iso-thiocyanat
Fv	antigenbindendes Fragment, bestehend aus den variablen Domänen der schweren und leichten Kette
g	Erdbeschleunigung
Gal-CE $_8$ P	$\beta$ -Galaktosidase, am C-Terminus durch das Peptid CE $_8$ P erweitert
GM-CSF	Granulocyten-Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GzmB	Granzym B
GzmB-GCD $_8$	Granzym B, am C-Terminus durch das Peptid GCD $_8$ erweitert
HCl	Salzsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HMW	high molecular weight, Proteinmarker
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IC $_{50}$ -Wert	Konzentration an Toxin, bei der 50 % der Zellen überleben
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
K $_D$	Dissoziationskonstante
kD	Kilodalton

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
Kn <sup>f</sup>	Marker, der Resistenz gegenüber Kanamycin vermittelt
LMW	low molecular weight, Proteinmarker
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization - time of flight</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mS	milli Siemens
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-bromid
MWCO	<i>molecular weight cutoff</i> , Trenngrenze
Na	Natrium
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
Nadoc	Natriumdesoxycholol
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NIH Units	Einheit der enzymatischen Aktivität, 1 NIH Unit lässt eine Standard-Fibrinogen-Lösung bei 37 ° in 15 sek gerinnen
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
N-Terminus	Aminoende einer Peptidkette
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphat gepuffte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PE	<i>Pseudomonas Exotoxin</i>
PE38	trunkierte Variante des <i>Pseudomonas Exotoxins</i>
PEG	Polyethylenglykol
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
Pro-CASP7 <sup>C285A</sup>	Pro-Caspase 7, Cystein 285 gegen Alanin ausgetauscht
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	quartäres Ammoniumion (Q-Sepharose)
RI	Ribonuklease-Inhibitor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

---

rpm	<i>rotation per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
scFv	<i>single chain</i> Fv; Antikörperfragment, bestehend aus der variablen Domäne der leichten und schweren Kette, die durch einen Peptidlinker miteinander verbunden sind
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH-	Thiol-
SLO	Streptolysin O
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- $\alpha$	<i>transforming growth factor <math>\alpha</math></i>
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
toxGal-CE <sub>8</sub> P	fluorierte Variante der $\beta$ -Galaktosidase, am C-Terminus durch das Peptid CE <sub>8</sub> P erweitert
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Triton-X 100	<i>t</i> -Octylphenoxypolyethoxyethanol
tRNA	<i>transfer</i> Ribonukleinsäure
U	<i>units</i> ; Einheit der enzymatischen Aktivität, entspricht dem Umsatz von 1 $\mu$ mol Substrat pro min unter Standardbedingungen
UV	Ultraviolett
UV/VIS	Ultraviolett/ <i>Visible</i>
v/v	Volumen/Volumen
V <sub>H</sub>	variable Domäne der schweren Kette
V <sub>L</sub>	variable Domäne der leichten Kette
w/v	Masse/Volumen
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
$\Omega$	Ohm
$\Theta_{\text{molar}}$	molare Elliptizität
$\alpha$ -Gluc	$\alpha$ -Glucosidase

# 1 Einleitung

Jährlich wird weltweit bei mehr als 10 Millionen Menschen Krebs diagnostiziert. Diese Zahl wird nach Schätzungen der WHO bis zum Jahr 2020 auf über 15 Millionen ansteigen. Derzeit sterben jährlich rund 6 Millionen Menschen an Krebs, dies entspricht 12 % der gesamten Todesfälle (Quelle: [www.who.int/cancer/en](http://www.who.int/cancer/en)). Die Möglichkeiten der Krebsbehandlung und damit die Heilungschancen haben sich in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert. Ein wichtiger Grund dafür ist die rechtzeitige Erkennung von Krebs. In frühen Stadien ist Krebs in vielen Fällen zu über 90 % heilbar. Derzeit werden im Wesentlichen drei Therapieformen für die Behandlung eingesetzt: Operation, die Strahlentherapie und die Chemotherapie. Bei der Operation werden einzelne örtlich begrenzte Tumore chirurgisch entfernt. Dies ist aber nur möglich, solange sich der Krebs noch nicht auf das gesamte Organ ausgebreitet hat. Ansonsten muss das betroffene Organ ganz oder teilweise entfernt werden, um möglichst alle Zellen zu entfernen. Bei der Strahlentherapie wird energiereiche Strahlung gezielt auf die Krebszellen gerichtet. Als Strahlenquelle verwendet man natürliche radioaktive Isotope. Die Strahlung zerstört die DNA der Krebszellen, wodurch diese dann nicht mehr lebensfähig sind und sterben. Die Strahlung wirkt sowohl auf die Krebszellen als auch auf gesunde Zellen. Aufgrund der oft extrem hohen Wachstumsgeschwindigkeit sind Krebszellen wesentlich empfindlicher gegenüber dieser Strahlung als langsam wachsendes gesundes Gewebe. Bei einer neoadjuvanten Behandlung wird der Tumor vor einer Operation mittels Strahlentherapie verkleinert, wenn er für die chirurgische Entfernung zu groß ist. Die Strahlentherapie wird aber auch häufig nach einer Operation eingesetzt, um nicht entfernte Tumorzellen zu töten. Dadurch wird die Gefahr vermindert, dass an der selben Stelle wieder ein Tumor auftritt. Bei der Chemotherapie werden sogenannte Zytostatika eingesetzt. Sie verhindern oder verzögern, dass sich Zellen teilen, oder sie töten diese sogar ab. Da sich Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen sehr rasch teilen, wirken diese Medikamente vornehmlich gegen Krebszellen. In einem gewissen Maß greifen diese Substanzen auch gesunde Zellen an, deswegen sind die Nebenwirkungen einer Chemotherapie sehr groß. Die Kombination verschiedener Zytostatika ist meist erfolgreicher, da die verschiedenen Substanzen auf unterschiedliche Phasen der Zellteilung wirken. Die Hormontherapie wird bei Tumorarten, deren Wachstum durch Hormone beeinflusst wird, wie z.B. Brust- und Prostatakrebs, angewendet. Der Angriffspunkt dieser Therapieform sind nicht die Krebszellen selbst, sondern Hormone, die diese zum Wachstum anregen. Dabei wird die Bildung der Hormone durch Inhibitoren gegen die entsprechenden Enzyme blockiert.

Es gibt auch neue Therapiekonzepte, die in Zukunft einen größeren Anteil an der Behandlung von Krebs haben werden. Ein Ansatzpunkt ist die Hemmung der Angiogenese. Tumore sind in ihrem Wachstum stark von der Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff abhängig. Deswegen regen die Tumorzellen Blutgefäße zum Wachstum an (Angiogenese). Durch die Behandlung mit solchen Angiogenese-Hemmern, z.B. Bevacizumab (Avastin®) (Moses *et al.*, 2004) und Angiostatin (Folkman, 2002), wird die Neubildung von Blutgefäßen verhindert.

Ein weiteres Konzept zur Behandlung von Krebs ist die Gentherapie. Ziel der Gentherapie ist es, genetische Informationen künstlich in die Körperzellen einzuschleusen. Es ist bekannt, dass an der Entstehung von Krebs mutierte Gene eine zentrale Rolle spielen. Krebs kann sowohl durch die Aktivierung von Onkogenen als auch durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen entstehen. Onkogene entstehen durch Mutationen normaler zellulärer Gene, sogenannter Protoonkogene, deren Genprodukte meist in der Regulation von Wachstum und Differenzierung der Zellen involviert sind. Die Genprodukte von Suppressorgenen sind an der Übermittlung von Wachstums-inhibierenden Signalen beteiligt und stellen somit ein Gegengewicht zu den proliferationsaktivierenden Protoonkogenen dar. Intakte Tumorsuppressorgene schützen die Zelle vor maligner Entartung. Durch die Gentherapie könnten solche mutierten Gene gegen die intakten ersetzt werden. Da aber bei der Entstehung von Krebs meist mehrere Gene beteiligt sind, ist dies noch sehr schwierig zu realisieren. Einfacher ist es, die Krebszelle nicht zu heilen sondern zu töten. Die neue genetische Information soll die Krebszellen so verändern, dass sie in Apoptose gehen oder durch Medikamente bzw. durch das Immunsystem gezielter angegriffen werden. Es gibt auch die Möglichkeit, dass die Gentherapie indirekt auf die Krebszellen wirkt, indem sie die Zellen des Immunsystems für die Krebsabwehr aktiviert. Anfänglich erfolgte die Gentherapie durch Injektion nackter DNA. Die Effizienz dieser Methode ist aber viel zu gering. Deswegen musste die DNA mit Hilfe eines *carrier* Systems in die Zellen transportiert werden. Ein sehr effizientes System stellen virale Transfektionssysteme dar. Bei der Herstellung solcher viralen Vektoren werden essentielle Teile des viralen Genoms durch therapeutische Sequenzen ersetzt. Die fehlenden viralen Proteine werden in *trans* von sogenannten Verpackungszelllinien hergestellt. In normalen Zellen können sich solche Viren nicht vermehren. Es zeigte sich jedoch in klinischen Studien, dass diese viralen Transfektionssysteme gravierende Nebenwirkungen aufweisen, die bis zum Tod des Patienten führen können (Wadman, 1999). Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Gentherapie für die Behandlung von Krebs noch nicht ausgereift.

## 1.1. Entwicklung von Antikörpern für die Krebstherapie

Ein weiteres neuartiges Therapiekonzept ist die Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die bestimmte Oberflächenstrukturen von Krebszellen erkennen und an diese binden. Die gebundenen Antikörper werden vom Immunsystem erkannt, welches dann die markierten Zellen tötet.

Der Grundstein für die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern wurde von Köhler & Milstein (1975) gelegt. Damals wurden große Hoffnungen in diese neue Technologie bei der Behandlung von Krebs gelegt. Aber erst in den letzten Jahren konnten die Erwartungen in diese Form der Krebstherapie in die Tat umgesetzt werden. Derzeit sind 6 verschiedene Antikörper als Krebstherapeutikum zugelassen (Walsh, 2003), viele weitere monoklonale Antikörper befinden sich derzeit noch in klinischen Tests (Tab. 1.1).

In den nächsten Jahren wird die Zahl der zugelassenen therapeutischen Antikörper für die Krebsbehandlung weiter steigen. Das Aufkommen von Antikörpern als Therapeutikum in der Krebsbehandlung wurde erst durch die Entwicklung neuer Methoden ermöglicht. Die ersten monoklonalen Antikörper wurden durch Immunisierung von Mäusen und Ratten gewonnen (Köhler & Milstein, 1975). Diese zeigten jedoch eine stark immunogene Wirkung, waren nur wenig effizient und hatten Halbwertszeiten im menschlichen Körper von unter 20 Stunden (Carter, 2001). Um die Immunogenität zu minimieren, wurden zunächst Antikörperchimeren erzeugt, bei denen die variablen Domänen von monoklonalen Antikörpern aus Maus mit konstanten Domänen humanen Ursprungs fusioniert waren (Boulianne *et al.*, 1984; Morrison *et al.*, 1984). Diese chimerisierten Antikörper zeigten eine deutlich schwächere Abstoßungsreaktion, die aber den therapeutischen Einsatz oft noch ausschloss. Später erkannte man, dass auch die variablen Domänen der Antikörper ein relativ konstantes Grundgerüst besitzen und sich im Wesentlichen in der Struktur kleiner, hypervariabler Regionen (CDR) unterscheiden, welche hauptverantwortlich für die Antigenbindung sind. Deswegen wurden auch die Gerüststrukturen der variablen Domänen gegen die humanen Sequenzen ausgetauscht. Die resultierenden humanisierten Antikörper weisen nur noch in den hypervariablen Regionen Anteile des ursprünglichen Maus-Antikörpers auf (Jones *et al.*, 1986). Mit Hilfe von *phage display* oder der Herstellung in transgenen Mäusen konnten hochaffine humane Antikörper gewonnen werden (Vaughan *et al.*, 1996; Fishwild *et al.*, 1996). Trotz der deutlichen Fortschritte in der Entwicklung von Antikörpern für die Behandlung von Krebs musste jedoch deren Anti-Tumor-Aktivität noch weiter verbessert werden. Es gibt dafür einige Ansatzpunkte, wie z.B. die Antigen-Bindungs-Affinität, die molekulare Größe sowie die Verbesserung der Bindung durch die Vermehrung der Valenzen.

Antibody trade name (generic name)	Antigen target	Antibody type	Strategy to enhance activity of naked antibody	Tumour target	Status	Corporate sponsors
Avastin (bevacizumab)	VEGF	hu IgG <sub>1</sub>	Combination with chemotherapy	Metastatic NSCLC, metastatic CRC	Phase III, Phase III	Genentech
BEC2 (mitumomab)	Anti-idiotypic mAb, GD3 ganglioside mimic	mu IgG	Vaccine	SCLC, malignant melanoma	Phase III, Phase II	ImClone Systems, Merck KGaA
Bexxar (tositumomab)	CD20	mu IgG <sub>2a</sub>	<sup>131</sup> Iodine	NHL	BLA filed with US FDA	Corixa, GlaxoSmith-Kline
Campath (alemtuzumab)	CD52	hu IgG <sub>1</sub>	None	B-cell CLL	Approved in US May 2001	Millennium and ILEX Partners
CeaVac	Anti-idiotypic mAb, CEA mimic	mu IgG	Vaccine in combination with chemotherapy for CRC or TriAb for NSCLC	CRC NSCLC	Phase III, Phase II	Titan Pharmaceuticals
Herceptin (trastuzumab)	ERBB2	hu IgG <sub>1</sub>	Combination with chemotherapy	Metastatic breast cancer overexpressing <i>ERBB2</i>	Approved in US September 1998	Genentech
IMC-C225 (cetuximab)	EGFR	ch IgG	Combination with chemotherapy or external beam radiation	CRC, locally advanced or metastatic head and neck	BLA filing in progress, Phase III	mClone Systems
LymphoCide (epratuzumab)	CD22	hu IgG	None	NHL	Phase III	Immunomedics
MDX-210	ERBB2 X CD64 (FcγRI)	mu F(ab') <sub>2</sub>	Bispecific	Ovarian cancer overexpressing <i>ERBB2</i>	Phase III	Medarex, Immuno Designed Molecules
Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin)	CD33	hu IgG <sub>4</sub>	Calicheamicin conjugate	AML	Approved in US May 2000	Wyeth Laboratories
Panorex (edrecolomab)	EpCam	mu IgG <sub>2a</sub>	Combination with chemotherapy	Dukes' C CRC	Approved in Germany January 1995	GlaxoSmith-Kline, Centocor
Rituxan (rituximab)	CD20	ch IgG <sub>1</sub>	Combination with chemotherapy	NHL	Approved in US November 1997	IDEC Pharmaceuticals, Genentech
Theragyn (pemtumomab)	PEM	mu IgG <sub>1</sub>	<sup>90</sup> Yttrium	Ovarian cancer, gastric cancer	Phase III, Phase II	Antisoma
Zamyl	CD33	hu IgG <sub>1</sub>	Combination with chemotherapy	AML	Phase III	Protein Design Labs
Zevalin (ibritumomab tiuxetan)	CD20	mu IgG <sub>1</sub>	<sup>90</sup> Yttrium	NHL	BLA filed with US FDA	IDEC Pharmaceuticals

**Tab. 1.1:** Antikörper zur Behandlung von Krebs (Quelle: Carter, 2001)

Die aufgelisteten Antikörper werden zur Zeit alle in der 3. klinischen Phase getestet oder sind bereits als Therapeutikum zugelassen. Nicht aufgeführt sind laufende Versuche mit auf dem Markt befindlichen Antikörper-Produkten. AML, akute myelogene Leukämie; BLA, Zulassung als biologisches Arzneimittel; CEA, karzinomembryonales Antigen; ch, chimär; CLL, chronische lymphocytische Leukämie; CRC kolonrektaler Krebs; EpCam, epithelisches Zelladhäsionsmolekül; FDA, Federal Drug Administration (USA); EGFR, epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor; hu, humanisiert; mAb, monoklonaler Antikörper; Ig, Immunglobulin; mu, murin; NHL, Non-Hodgkin-Lymphom; NSCLC, nichtkleinzelliger Lungenkrebs; PEM, polymorphisches Epithlien-Muzin; SCLC, kleinzelliger Lungenkrebs; VEGF, vasikulärer endothelischer Wachstumsfaktor

Die Verbesserung der Antigen-Bindungsaffinität erfolgte zunächst mittels *phage display* (Schier *et al.*, 1996). Diese Methode ist jedoch sehr aufwendig und wurde im späteren Verlauf der Forschung durch Ribosomen *display* in Verbindung mit *DNA shuffling* ergänzt (Hanes *et al.*, 2000; Jermutus *et al.*, 2001). Es zeigte sich dabei, dass eine Erhöhung der Antigen-Bindungs-Affinität nicht zwangsläufig zu einer Verbesserung der Anti-Tumor-Aktivität führt. Durch Studien mit einer Reihe von scFv-Fragmenten, die alle gegen das Epitop ErbB2 gerichtet waren, konnte gezeigt werden, dass die hohen Affinitäten die Tumorpenetration der

Antikörper limitieren (Adams *et al.*, 2001). Diese Daten unterstützten die Theorie der „*binding site* Barriere“, die eine Penetration in den Tumor von hoch affinen Antikörper beeinträchtigt (Fujimori *et al.*, 1990). Ein weiterer entscheidender Punkt in Zusammenhang mit der Antigen-Bindungsaffinität ist die Selektivität der verwendeten Antikörper. Viele Tumor-assoziierten Antigene werden auch auf normalen Zellen in geringeren Mengen auf der Oberfläche exprimiert. Somit würde man die beste Tumor-Selektivität durch niederaffine Antikörper erreichen, die darauf angewiesen sind, dass ihr entsprechendes Antigen in hoher Dichte auf der Oberfläche der Zielzelle exponiert ist. Ein weiterer Ansatzpunkt zur Verbesserung der Anti-Tumor-Aktivität ist die Herstellung von Antikörpern mit mehreren Valenzen. Es konnte durch die Herstellung eines Dimers des anti-ErbB2 scFv-Antikörperfragmentes eine verbesserte Aufnahme in die Zellen bei ähnlicher Tumorpenetration im Vergleich zum monomeren Fab-Fragment gezeigt werden (Adams *et al.*, 1993). Diese Methode ist eine sehr einfache Art, die Tumorbindung zu erhöhen, ohne dabei die Affinität der Antigen-Bindungsstelle verbessern zu müssen. Durch die Homodimerisierung von Antikörpern wird nicht nur die Bindung zum Tumor verbessert, sondern auch die Reaktion des Immunsystems durch cytotoxische Lymphozyten oder durch das Komplementsystem verstärkt (Caron *et al.*, 1992). Es konnte auch die Induktion von Apoptose bzw. Wachstumsinhibierung durch Homodimerisierung eines Tumor-spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden (Ghetie *et al.*, 1997). Wie schon erwähnt, ist die Tumorpenetration von Antikörpern ein wichtiger Faktor für ihren Einsatz in der Krebstherapie. Komplett Antikörper zeigen verglichen mit Antikörperfragmenten eine schlechtere Tumorpenetration, haben aber im Körper eine wesentlich höhere Halbwertszeit.

In klinischen Studien wurden die Antikörper auf ihre Wirksamkeit in der Krebstherapie untersucht. In einer Studie der 2. klinischen Phase sprachen lediglich die Hälfte der Patienten (6 % komplett, 42 % partiell) auf die Behandlung mit dem chimäre anti-CD20 Antikörper Rituxan an (McLaughlin *et al.*, 1998). Im Fall des humanisierten anti-ErbB2 Antikörpers Herceptin sprachen nur 15 % der Patienten bei einer Studie der 3. klinischen Phase auf die Behandlung an (Cobleigh *et al.*, 1999). Die Ansprechrate lag im Schnitt bei lediglich 9,1 Monaten. Die Patienten überlebten mit Hilfe dieser Therapie im Durchschnitt 13 Monate (Cobleigh *et al.*, 1999). Diese Daten zeigten, dass die Wirksamkeit der Antikörper für die Behandlung von Krebs noch weiter gesteigert werden musste.

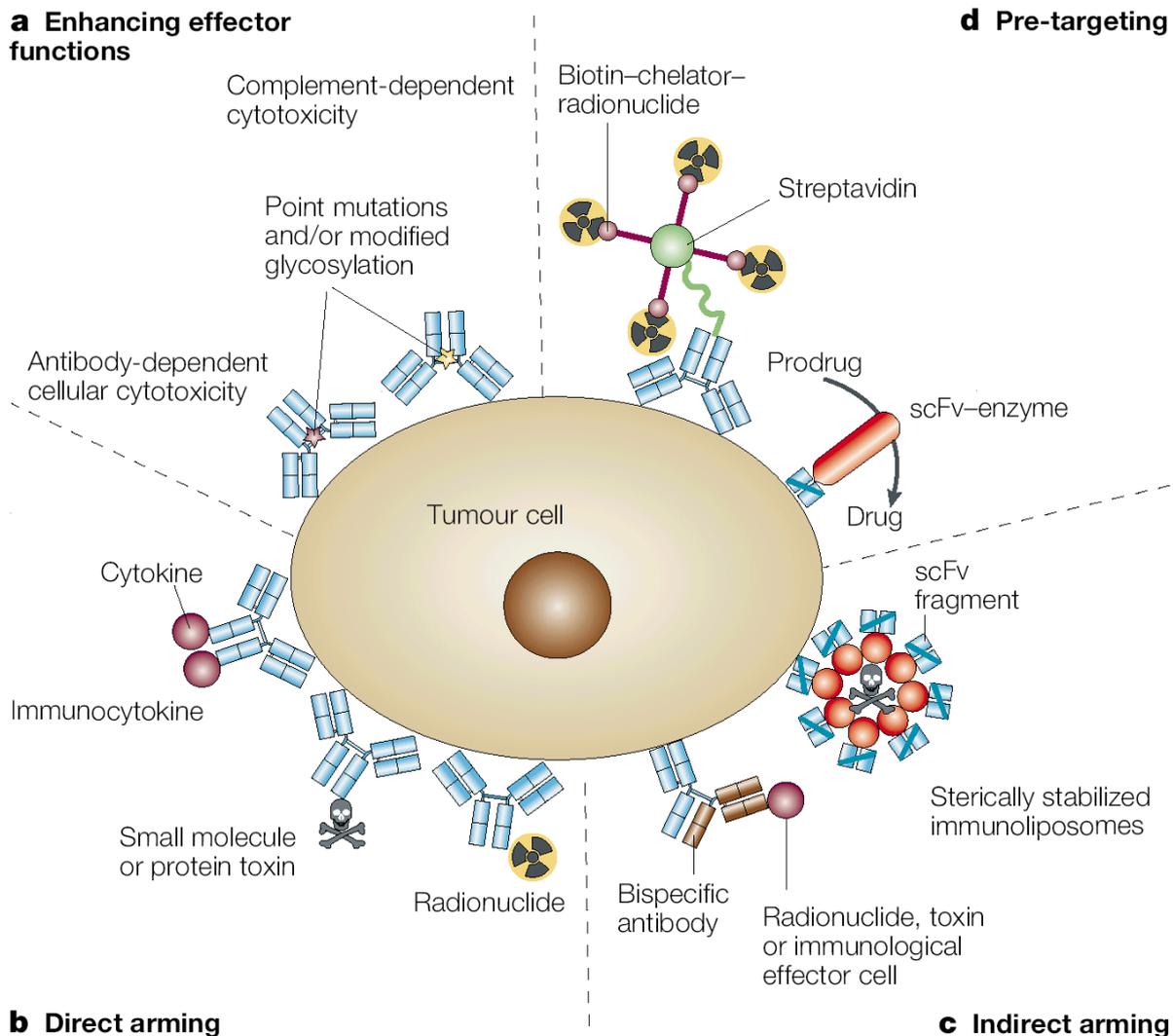
## 1.2. Strategien zur Verstärkung der Anti-Tumor-Aktivität von Antikörpern

In klinischen Studien konnte beobachtet werden, dass die kombinierte Applikation von cytotoxischen Chemotherapeutika und Tumor-spezifischen Antikörpern die Effizienz der Behandlung erhöht. So zeigte Herceptin einen synergistischen Effekt bei der Krebsbehandlung durch kombinierte Verabreichung mit Cisplatin- bzw. Carbonplatin-Verbindungen (Pietras *et al.*, 1994; Pietras *et al.*, 1998). Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei der Behandlung von ErbB2-überexprimierenden Brustkrebs in Studien der 3. klinischen Phase beobachtet werden. Neben den Chemotherapeutika wurde den Patienten auch Herceptin appliziert. Dadurch konnte die durchschnittliche Ansprechdauer von 6,1 auf 9,1 Monate sowie die Ansprechrates von 32 % auf 50 % erhöht werden. Die jährliche Sterberate sank aufgrund der kombinierten Behandlung innerhalb dieser Studie von 33 % auf 22 % (Slamon *et al.*, 2001). Jedoch erhöhte sich durch die kombinierte Behandlung mit Herceptin und Chemotherapeutika auch die systemische toxische Wirkung auf die Patienten (Slamon *et al.*, 2001). Auch für den chimären anti-CD20 Antikörper Rituxan konnte eine synergistische Wirkung für den Einsatz in der Chemotherapie beobachtet werden. Die kombinierte Applikation von Rituxan und dem Chemotherapeutikum bei der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphom führte jedoch nicht zu einer verstärkten systemischen Toxizität (Vose *et al.*, 2001).

### 1.2.1 Verstärkung der Immunsystem-aktivierenden Wirkung

Neben der kombinierten Applikation von therapeutischen mit cytotoxischen Substanzen gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten, die cytotoxische Wirkung der Antikörper selbst zu verbessern (Abb. 1.1). Humane Antikörper, speziell die Isotypen IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>3</sub>, unterstützen zum einen die Antikörper vermittelte zelluläre Cytotoxizität (ADCC) zum anderen auch die Komplement vermittelte Cytotoxizität (CDC). Die ADCC wird durch die Interaktion der Fc-Region des an die Tumorzelle gebundenen Antikörpers und der Fc $\gamma$ -Rezeptoren, die auf der Oberfläche von neutrophilen Zellen, Makrophagen und natürlichen Killerzellen exponiert sind, ausgelöst. Das Komplementsystem wird durch die Bindung der C1q-Untereinheit der ersten Komplementkomponente an die Fc-Abschnitte zweier an den Tumor gebundener Antikörper aktiviert. Die markierte Krebszelle wird somit durch eine cytotoxische Effektorzelle oder durch das aktivierte Komplementsystem getötet. Erstmals wurde von Clynes *et al.* (1998) gezeigt, dass die Interaktion zwischen dem Fc-Teil des IgG und des Fc $\gamma$ -Rezeptors für die Anti-Tumor-Aktivität von entscheidender Bedeutung ist. Für diese Untersuchung wurden Mäuse verwendet, die keinen Fc $\gamma$ -Rezeptor 1 und 3 exprimierten. Der verwendete Antikörper zeigte in diesen Mäusen keine Anti-Tumor-Aktivität, wobei derselbe Antikörper bei der

Behandlung von Mäusen ohne diese Defizienz eine sehr potente Wirkung aufwies. Aufgrund dieser Tatsache wurde versucht durch Modifikationen in der Fc-Region die Bindung an Fc $\gamma$ -Rezeptoren zu verbessern. Durch Punktmutation in der Fc-Region konnte die Bindung an den Fc $\gamma$ -Rezeptor 3 verbessert und die Antikörper vermittelte zelluläre Cytotoxizität um Faktor 2 verstärkt werden (Shields *et al.*, 2001).



**Abb. 1.1:** Strategien zur Verbesserung der Anti-Tumor-Aktivität von Antikörpern (Quelle: Carter, 2001)

(a) Die Effizienz von Antikörpern kann durch die Steigerung der Antikörper-vermittelten zellulären Cytotoxizität bzw. Komplement-vermittelten Cytotoxizität verbessert werden. Dies erreicht man durch Punktmutationen in der Fc-Region oder durch Glykosylierung von Antikörpern. (b) Kovalente Verknüpfung von Antikörpern mit cytotoxischen Komponenten, wie Radionukliden, Chemotherapeutika, Proteintoxinen oder Cytokinen. (c) Bispezifische Antikörper sind in der Lage, zwei verschiedene Antigene zu binden. Ein Paratop des Antikörpers bindet an die Zelloberfläche das andere toxische Substanzen, cytotoxische Effektorzellen oder an die Oberfläche von Liposomen, in denen sich therapeutische Substanzen befinden. (d) Ziel der Strategie des *pre-targeting* ist die Verminderung der systemischen Toxizität von cytotoxischen Substanzen. Für das *prodrug pre-targeting* wird ein Antikörper-Enzym Fusionskonstrukt an die Zelloberfläche gebunden. Die Aktivierung dieser *prodrugs* erfolgt ausschließlich innerhalb des Tumors. Für Radionuklid *pre-targeting* bindet ein Antikörper-Streptavidin-Konjugat an die Zelloberfläche. Dadurch werden applizierte Biotin-Radionuklid-Komplexe direkt an den Tumorzellen eingefangen.

Durch Manipulation der Antikörperglykosylierung konnte ebenso eine Steigerung der ADCC beobachtet werden (Umana *et al.*, 1999). Durch die verbesserte Bindung der C1q-Untereinheit der C1-Komponente an die Fc-Region des Antikörpers konnte eine Erhöhung der Komplement-vermittelten Cytotoxizität beobachtet werden (Idusogie *et al.*, 2000, 2001). Dieser Ansatz ist jedoch problematisch, da viele Tumorzellen, ebenso wie normale Zellen, Membranproteine wie CD46, CD55 und CD59 exprimieren, die den Angriff des Komplementsystems behindern (Gorter & Meri, 1999).

### **1.2.2. Strategie des *pre-targeting***

Eine weitere Möglichkeit, die Effizienz von Anti-Tumor-Antikörpern zu verbessern, ist die Strategie des *pre-targeting*. Es gibt zwei verschiedene Ansätze. Bei der ADEPT (*antibody directed enzyme prodrug therapy*) bindet zunächst ein Tumor-spezifischer Antikörper, der mit einem Enzym fusioniert ist, an der Oberfläche von Krebszellen (Niculescu-Duvaz *et al.*, 1999; Syrigos & Epenetos, 1999). Danach werden die verbleibenden nichtgebundenen Antikörper-Enzym-Fusionsproteine entfernt. Anschließend wird dem Patienten ein pro-toxisches Agens verabreicht, das sich im gesamten Körper verteilt, jedoch im Idealfall nur durch das Tumor-assoziierte Antikörper-Enzym-Konjugat direkt an der Krebszelle aktiviert wird. Im Vergleich zu normalen Antikörpern kommt es bei den hier verwendeten Konjugaten aufgrund der katalytischen Aktivierung durch das fusionierte Enzym zu einer Amplifikation der cytotoxischen Wirkung. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, auch benachbarte Tumorzellen zu töten. Somit können auch Krebszellen attackiert werden, die ihr Antigen bereits verloren haben. Ein anderer Ansatz des *pre-targeting* ist die Verwendung von mit Streptavidin fusionierten Antikörpern und Biotin-Radionuklid-Komplexen (Stoldt *et al.*, 1997; Wu, 2001). Die Antikörper-Fusionskonstrukte binden spezifisch an die Oberfläche von Krebszellen. Überschüssige nicht gebundene Antikörper werden durch ein Agens entfernt. Die applizierten Radionuklid-Biotin-Komplexe werden von der Streptavidin-Komponente des Konjugates eingefangen, binden somit an die Tumorzellen und zerstören diese. Der Vorteil dieser Methode verglichen mit der klassischen Strahlentherapie ist das wesentlich bessere Verhältnis an Radioaktivität im Tumor zur Radioaktivität im normalen Gewebe. Dadurch wird die Strahlenbelastung des Körpers verringert. Beide Methoden des *pre-targeting* zeichnen sich durch ihre geringe systemische Toxizität für den Patienten im Vergleich zu den klassischen Methoden der Strahlen- und Chemotherapie aus. Nachteile dieser Methoden sind ihre Komplexität (Die *pro-drugs* könnten durch körpereigene Enzyme aktiviert werden. Deswegen ist die Entwicklung von *pro-drugs*, die nur durch spezielle Enzyme, jedoch nicht durch

Wildtyp-Enzyme aktiviert werden können, unabdingbar (Smith *et al.*, 1997.) und die hohe Immunogenität der verwendeten nicht-humanen Komponenten, die durch biochemische Modifikation derer verringert werden kann (Chinol *et al.*, 1998).

### 1.2.3 Strategie des *indirect arming*

Eine weitere Strategie zur Verbesserung der Anti-Tumor-Aktivität von Antikörpern ist das sogenannte *indirect arming*. Hierbei wird die Bindung von Cytotoxinen durch Antikörper vermittelt, die zum einen spezifisch an die Oberfläche von Krebszellen binden, zum anderen in der Lage sind mit dem toxischen Agens zu assoziieren. Eine Möglichkeit besteht darin bispezifische Antikörper zu kreieren, die an zwei verschiedene Epitope binden können. Der Antikörper bindet mit einem Paratop spezifisch auf der Oberfläche der Krebszelle. An das andere Paratop können Radionuklide, Toxine oder auch cytotoxische Effektorzellen gebunden werden (Segal *et al.*, 1999; Koelemij *et al.*, 1999; van Spriël *et al.*, 2000). Diese bispezifischen Antikörper weisen in ihrer Anwendung in der Krebstherapie einige Nachteile auf. Durch die Applikation kommt es zur systemischen Aktivierung von Effektorzellen, was eine Freisetzung von Cytokinen zur Folge hat, und somit zu unerwünschten Nebenwirkungen führt. Ein weiteres Problem stellt die Herstellung dieser Antikörper dar, die derzeit für den Einsatz als Therapeutikum noch sehr schwierig und zu teuer ist. Es gibt bereits Ansätze, durch die Entwicklung von *diabodies*, scFv-scFv Tandemfragmenten oder neuartiger bispezifischer humaner IgG, dieses Problem zu lösen (Plückthun & Pack, 1997; Merchant *et al.*, 1998). Eine weitere Möglichkeit des *indirect arming* ist die Verwendung von Immunoliposomen. Diese bestehen aus selbst-assoziiierenden Lipid-Bilayer-Membranen, die dazu verwendet werden können, Therapeutika wie DNA oder Toxine zu verpacken. An die Oberfläche dieser Liposomen sind Antikörper angeheftet, die spezifisch an Krebszellen binden (Park *et al.*, 1995, 1997). Dadurch kann über ein Tumor-assoziiertes Antikörpermolekül eine Vielzahl der verpackten cytotoxischen Moleküle in die Zelle gelangen. Im Vergleich zu der klassischen Chemotherapie zeigt diese Methode eine höhere Tumor-spezifische Cytotoxizität bei gleichzeitiger geringerer systemischer Toxizität (Park *et al.*, 1997). Ein entscheidender Nachteil der Immunoliposomen ist jedoch ihre Größe von ca. 100 nm (Bendas, 2001). Sie eignen sich daher eher zur Behandlung von hämatologischen denn soliden Tumoren.

### 1.2.4 Strategie des *direct arming*

Die am weitesten verbreitete Strategie zur Verbesserung der Anti-Tumor-Aktivität von Antikörpern ist die direkte kovalente Verknüpfung mit cytotoxischen Substanzen. wie z.B.

Radionukliden, klassischen Chemotherapeutika, Proteintoxinen oder Cytokinen. Solch ein Konjugat zeigt eine wesentlich höhere Effizienz als der vergleichbare ungekoppelte Antikörper. Jedoch konnte bei vielen dieser Immunokonjugate in verschiedenen klinischen Untersuchungen ein hohes Level an unspezifischer Toxizität beobachtet werden (Farah *et al.*, 1998). Wichtig für den Erfolg einer solchen Therapie ist die Auswahl des Zielantigens und des entsprechenden Antikörpers. Das Zielantigen sollte möglichst von allen Zellen des zu behandelnden Tumors exprimiert werden. Des Weiteren sollte das Antigen nicht oder nur in sehr geringem Maße von normalen Zellen exprimiert werden, um die Nebenwirkungen der Therapie zu minimieren. Ein entscheidender Punkt ist der Wirkort der cytotoxischen Komponente. Liegt dieser im Inneren der Krebszelle ist es unbedingt erforderlich, dass das Antigen nach Bindung des Antikörpers oder kontinuierlich internalisiert wird.

Für die Anwendung von Radionuklid-gekoppelten Antikörpern ist dies nicht erforderlich. Die verwendeten Radionuklide sind meistens  $\beta$ -Strahler wie z.B.  $^{131}\text{I}$ od,  $^{90}\text{Y}$ ttrium,  $^{186}\text{R}$ henium und  $^{188}\text{R}$ henium. Iod eignet sich jedoch nur bedingt für den Einsatz in der Strahlentherapie, da es 80 % seiner Energie als  $\gamma$ -Strahlung abgibt und überdies eine Halbwertszeit von 193 Stunden hat und somit wesentlich länger als der verwendete Antikörper überlebt (Aussage von P. A. Schubiger; ETH Zürich, PSI). Der Vorteil von Radionukliden ist ihre Fähigkeit, auch benachbarte Tumorzellen zu töten. Dadurch werden auch Krebszellen attackiert, die ihr Antigen bereits verloren haben. Durch die große Reichweite von  $\beta$ -Strahlen, die im Gewebe wenige Millimeter beträgt, werden natürlich auch Nicht-Tumor-Zellen beschädigt. Dies führt vor allem in hämatologischen Geweben zu schweren unspezifischen cytotoxischen Effekten. Durch die Verwendung von  $\alpha$ -Strahlern wie z.B.  $^{211}\text{A}$ statin, das eine Wirkungsreichweite von weniger als 100  $\mu\text{M}$  hat, wird eine äußerst lokale cytotoxische Wirkung ermöglicht (Zalutsky *et al.*, 1996, 2000).

Eine weitere Anwendungsform von Immunokonjugaten ist die Verwendung von Antikörper-gekoppelten Cytokinen. Verschiedene Cytokine wie z.B. Interleukin-2, Interleukin-12 und der Granulocyten-Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) sind dafür geeignet (Penichet & Morrison, 2001). Diese werden genetisch mit dem N- bzw. C-Terminus der leichten bzw. schweren Kette des Antikörpers fusioniert. Durch die Behandlung mit diesen Immunocytokinen kommt es zu einer hohen lokalen Konzentration an Cytokinen im Tumor, dadurch wird die Immunantwort der T-Lymphocyten, B-Lymphocyten oder natürlichen Killerzellen stimuliert (Lode *et al.*, 1998, 2000).

Eine sehr verbreitete Methode zur Steigerung der Aktivität von Anti-Tumor-Antikörpern ist die Kopplung mit konventionellen Chemotherapeutika. Das Immunokonjugat Mylotarg, bei dem

ein anti-CD33-Antikörper mit dem Cytotoxin Calicheamicin konjugiert wurde, ist seit 2000 als Krebstherapeutikum zugelassen. Es wird bei der Behandlung von akuter myeloider Leukämie eingesetzt. In klinischen Studien sprachen 30 % der Patienten auf dieses Medikament an, wobei die systemische Toxizität in einem akzeptablen Bereich lag (Sievers *et al.*, 2001). Eine Ursache für die hohe Effizienz und Verträglichkeit war die Verteilung des Medikaments im Körper. Ungefähr 80 % des applizierten Konjugates war an den Zielzellen lokalisiert. Der Einsatz eines Anti-Muzin-Antikörper-Calicheamicin-Konjugates für die Behandlung von soliden Tumoren war weniger erfolgreich (Baker *et al.*, 1994; Pietersz *et al.*, 1997) und wurde deswegen später aufgegeben. Diese Konjugate wurden wahrscheinlich nur sehr ineffizient in den soliden Tumoren akkumuliert (Sedalacek *et al.*, 1992). Prinzipiell sind die Konjugate aus Antikörper und Chemotherapeutikum für die Tumorthherapie geeignet, jedoch nicht für jeden Krebstyp universell einsetzbar.

### **1.3. Entwicklung von Immunotoxinen für die Krebstherapie**

Zu den Immunokonjugaten zählen auch die Immunotoxine. Immunotoxine sind chimäre Proteine, die aus einem Antikörper oder Antikörperfragment und einem cytotoxischen Protein aufgebaut sind. Die Antikörper sind gegen Antigene auf der Oberfläche von Krebszellen gerichtet. Nach der Internalisierung des Immunotoxins wird im Cytosol durch die cytotoxische Komponente die Proteinbiosynthese inaktiviert bzw. die Apoptose induziert. Viele der verwendeten Proteintoxine haben ein so hohes cytotoxisches Potenzial, dass theoretisch ein Molekül im Cytosol ausreicht um die Zelle zu töten. Diese Toxine stammen aus Pflanzen, Bakterien oder Pilzen, und sind in der Lage, an verschiedene Gewebe im menschlichen Körper zu binden. Für die Verwendung als cytotoxische Komponente in Immunotoxinen müssen diese Proteine so modifiziert sein, dass sie ihren natürlichen Tropismus verlieren. Durch die Fusion mit Tumor-spezifischen Antikörpern, die als zellbindenden Komponente fungieren, können diese Konstrukte nun spezifisch an Krebszellen binden und diese töten. Derzeit befinden sich eine Vielzahl von Immunotoxinen in klinischen Tests (Tab. 1.2). Für den Einsatz von Immunotoxinen in der Krebstherapie gelten ähnliche Voraussetzungen wie für die in den vorigen Kapiteln beschriebenen Immunokonjugate. Zunächst sollte sich das Zielantigen in hoher Dichte auf der Oberfläche der Krebszellen befinden und, wenn möglich, von allen Zellen des Tumors exprimiert werden. Außerdem sollten die Tumorzellen das Zielantigen nicht verlieren. Des Weiteren sollte dieses Antigen exklusiv auf der Oberfläche dieser Krebszellen exponiert sein oder sich in nur sehr geringem Maß auf nicht-malignen Zellen befinden.

Ligand	Rezeptor/Antigen	Toxin	Art der Fusion	Bezeichnung	Referenz
B3 Mab	Lewis <sup>Y</sup>	PE	C	LMB-1	Pai <i>et al.</i> , 1996
B3 sFv	Lewis <sup>Y</sup>	PE	G	LMB-7 <sup>a</sup>	
B3 sFv	Lewis <sup>Y</sup>	PE	G	B96(sFv)PE40	Haggerty <i>et al.</i> , 1999
B3 dsFv	Lewis <sup>Y</sup>	PE	G	LMB-9	Benhar <i>et al.</i> , 1995
RFB4 Mab	CD22	Ricin	C	IgG-RFB4-dgA	Amolt <i>et al.</i> , 1993
RFB4 Fab'	CD22	Ricin	C	Fab9-RFB4-dgA	Vitetta <i>et al.</i> , 1991
RFB4 dsFv	CD22	PE	G	BL22	Kreitman <i>et al.</i> , 2001
HD37 Mab	CD19	Ricin	C	IgG-HD37-dgA	Stone <i>et al.</i> , 1996
B43 Mab	CD19	PAP	C	B43-PAP	Uckun <i>et al.</i> , 1993
Anti-B4 Mab	CD19	Ricin	C	Anti-B4-bR	Grossbard <i>et al.</i> , 1993
IL2	IL2R	DT	G	ONTAK	Olsen <i>et al.</i> , 2001
Anti-Tac Mab	CD25	PE	C	Anti-Tac-PE	Waldman <i>et al.</i> , 1992
RFT5 Mab	CD25	Ricin	C	RFT5-dgA	Schnell <i>et al.</i> , 1998
Anti-Tac sFv	CD25	PE	G	LMB-2	Kreitman <i>et al.</i> , 2000
Tf	TfR	DT	C	HN66000	Laske <i>et al.</i> , 1997
454A12 Mab	TfR	Ricin	C	454A12-rA	Laske <i>et al.</i> , 1997
IL4	IL4R	PE	G	IL4(38-37)PE38KDEL	Husain <i>et al.</i> , 1998
HuM195 Mab	CD33	Gel	C	HuM195-rGel	Pagliaro <i>et al.</i> , 1998
GM-CSF	GM-CSFR	DT	G	DTGM	Hall <i>et al.</i> , 2001
N901 Mab	CD56	Ricin	C	N901-bR	Lynch <i>et al.</i> , 1997
TGF $\alpha$	EGFR	PE	G	TP40	Goldberg <i>et al.</i> , 1995
EGF	EGFR	DT	G	DAB <sub>389</sub> EGF	Bacha <i>et al.</i> , 1995
791T/36 Mab	M <sub>r</sub> 72,000 antigen	Ricin	C	Xomazyme-791	Byers <i>et al.</i> , 1989
260F9 Mab	M <sub>r</sub> 55,000 antigen	Ricin	C	260F9-rA	Gould <i>et al.</i> , 1989
Ber-H2 Mab	CD30	SO6	C	Ber-H2-SO6	Falin <i>et al.</i> , 1992
T101 Mab	CD5	Ricin	C	T101-RTA	Hertler <i>et al.</i> , 1989
H65 Mab	CD5	Ricin	C	H65-RTA	LeMaistre <i>et al.</i> , 1991
XMMME-001 Mab	Proteoglycan	Ricin	C	XMMME-001-RTA	Spitler <i>et al.</i> , 1987
OVB3 Mab	Ovarian antigen	PE	C	OVB3-PE	Pai <i>et al.</i> , 1991
3A1 Mab	CD7	Ricin	C	3A1-dgRTA	Frankel <i>et al.</i> , 1997
TXU Mab	CD7	PAP	C	TXU-PAP	Waurzyniak <i>et al.</i> , 1997
e23 dsFv	erbB-2	PE	G	Erb-38	Pai-Scherf <i>et al.</i> , 1999

**Tab. 1.2:** Immunotoxine in klinischen Tests (Quelle: Frankel *et al.*, 2000)

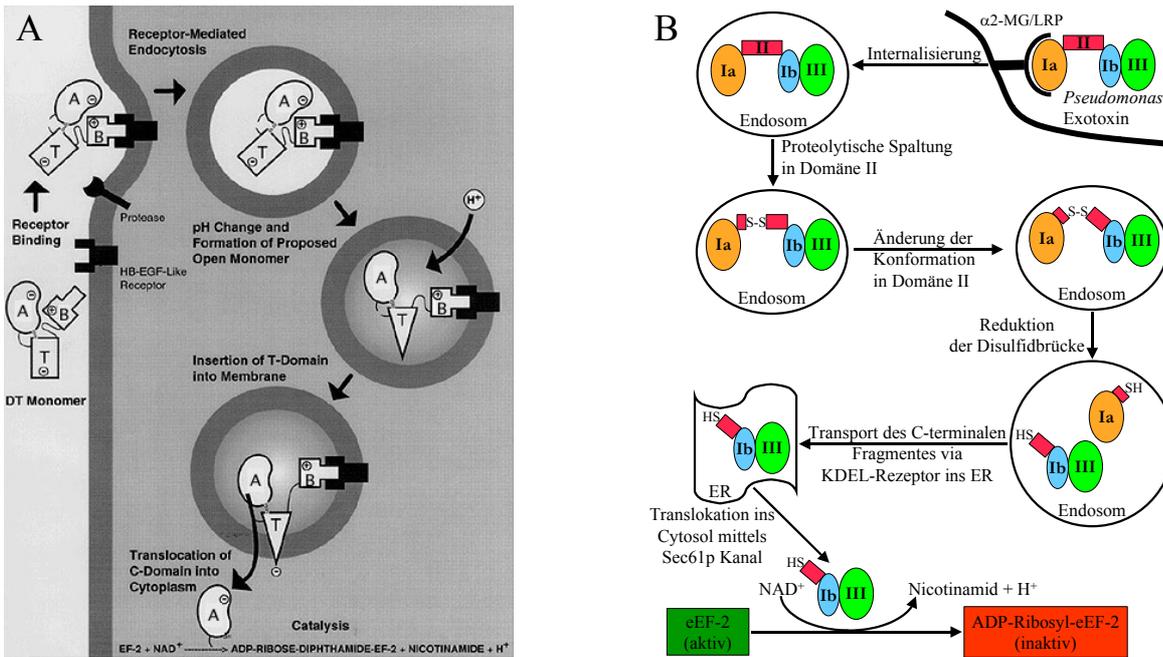
G, genetische Fusion beider Komponenten; C, chemische Fusion beider Komponenten; Mab, monoklonaler Antikörper; EGF, epidermaler Wachstumsfaktor; IL, Interleukin; TGF $\alpha$ , Tumor-Wachstumsfaktor  $\alpha$ ; sFv; single chain Fv-Antikörperfragment; dsFv, disulfidverbrücktes Fv-Antikörperfragment; TfR, Transferrin-Rezeptor; EGFR, epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; GM-CSFR, GM-CSF Rezeptor; Lewis<sup>Y</sup>, ein Kohlenhydrat-Antigen; CD5, CD7, CD19, CD22, CD25, CD30 und CD56, Cluster Bezeichnung von Zelloberflächen-Antigenen; erbB-2, ErbB2 Antigen; Fab', Fab Antikörperfragment; PE, *Pseudomonas* Exotoxin; PAP-antivirales Protein der Kermesbeere; DT, *Diphtheria* Toxin; Gel, Gelonin; SO6, Saporin; bR, blockiertes Ricin

<sup>a</sup>L. H. Pai-Scherf, D. Pearson, R. Wittes, M. C. Willingham, and I. Pastan. A Phase I study of LMB-7, [B3(Fv)PE38], a recombinant single-chain immunotoxin for advanced solid tumors, eingereicht zur Publikation

Für die cytotoxische Wirkung des Immunotoxins ist es entscheidend, dass das Zielantigen nach der Bindung der Antikörperkomponente oder kontinuierlich internalisiert wird. Die zellbindenden Komponenten der derzeit untersuchten Immunotoxine sind gegen verschiedene Antigene gerichtet (vgl. Tab. 1.2). Ein weiteres Zielantigen ist Mesothelin, das von Mesothelischen Tumoren exprimiert wird (Chang *et al.*, 1996). Dennoch gibt es einen großen Bedarf an noch spezifischeren Zielstrukturen für den Einsatz von Immunotoxinen in der Krebstherapie. Durch Programme, wie das Cancer Genome Anatomy Project (CGAP) des National Cancer Institute (NCI), könnten neue Tumor-spezifischen Antigene gefunden werden, die die oben beschriebenen Anforderungen erfüllen (Brinkmann *et al.*, 2001).

Für die Herstellung des Immunotoxins müssen die zellbindende Komponente und die cytotoxische Komponente miteinander verknüpft werden. Bei den ersten Immunotoxinen wurden beide Komponenten durch chemisches *cross-linking* gekoppelt (Ghetie *et al.*, 1990; Pai *et al.*, 1996). Jedoch entsteht mit dieser Methode eine inhomogene Population an Kopplungsprodukten. Das korrekt verknüpfte Immunotoxin muss anschließend von den anderen Kopplungsprodukten und den noch freien Komponenten gereinigt werden. In der nächsten Generation von Immunotoxinen wurde die zellbindende und cytotoxische Komponente mittels genetischer Fusion miteinander verknüpft und rekombinant hergestellt. Die bevorzugten Toxine für die Herstellung rekombinanter Immunotoxine sind Proteine, die ihre Aktivität durch die Produktion als eine Polypeptidkette nicht verlieren. Dies ist jedoch ein Problem für viele pflanzliche Toxine, die deswegen durch chemisches *cross linking* an die zellbindende Komponente gekoppelt werden. Hingegen eignen sich bakterielle Toxine wie das *Diphtheria* Toxin oder *Pseudomonas* Exotoxin, die von den pathogenen Bakterien *Corynebacterium diphtheria* bzw. *Pseudomonas aeruginosa* sezerniert werden, sehr gut für die genetische Fusion mit dem Antikörper. Beide Toxine sind aus mehreren Domänen aufgebaut, die unterschiedliche Funktionen innerhalb des toxischen Mechanismus erfüllen (Abb. 1.2). Beide Toxine inaktivieren die Proteinbiosynthese, indem sie den ADP-Rest vom  $\text{NAD}^+$  auf den eukaryontischen Elongationsfaktor 2 (eEF-2) übertragen. Die Inhibierung der Proteinbiosynthese kann direkt zum Zelltod führen oder auch Apoptose induzieren (Hafkemeyer *et al.*, 1999; Keppler-Hafkemeyer *et al.*, 2000). Viele Menschen sind gegen das *Diphtheria* Toxin immunisiert und besitzen daher Antikörper gegen das Protein. Deswegen ist das *Pseudomonas* Exotoxin besser für die Herstellung rekombinanter Immunotoxine geeignet. Durch Deletion der Domäne Ia des *Pseudomonas* Exotoxins ist das Toxin nicht mehr in der Lage, an die Oberfläche eukaryontischer Zellen zu binden und ist somit inaktiv. Erst durch die Kopplung eines Antikörpers kann das trunkierte *Pseudomonas* Exotoxin, jedoch jetzt spezifisch, wieder an die Zelloberfläche binden und diese Zelle töten.

Zumeist werden für die genetische Fusion mit der cytotoxischen Komponente nicht mehr komplette Antikörper, sondern nur noch Fab- oder Fv-Fragmente verwendet. Im Fab-Fragment sind die leichte und schwere Kette über eine Disulfidbrücke zwischen der  $\text{C}_{\text{H}1}$ - und  $\text{C}_{\text{L}}$ -Domäne miteinander verbunden. Im Fall des Fv-Fragment sind die beiden konstanten Domäne inklusive der stabilisierenden Disulfidbrücke entfernt worden. Das resultierende Fv-Fragment ist jedoch sehr instabil (Glockshuber *et al.*, 1990; Webber *et al.*, 1995).



**Abb. 1.2:** Wirkungsmechanismen bakterieller Toxine

(A) Diphtheria Toxin (Quelle: www.bact.wisc.edu)

Das *Diphtheria* Toxin besteht aus zwei Ketten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Die B-Kette bindet an den Heparin-bindenden epidermalen Wachstumsfaktor *precursor* (Naglich *et al.*, 1992) und wird über einen Clathrin-abhängigen Mechanismus aufgenommen (Simpson *et al.*, 1998). Durch den niedrigen pH-Wert in Endosomen kommt es zu Konformationsänderungen innerhalb des Moleküls, was zu einer Exposition hydrophober Bereiche führt. Es kommt zur Insertion dieser hydrophoben Regionen in die Membran des Endosoms (Falnes & Sandvig, 2000). Die katalytische Domäne wird vom Rest des Moleküls abgespalten und gelangt aus dem Endosom ins Cytoplasma. Dort katalysiert sie die Übertragung des ADP-Restes von  $\text{NAD}^+$  auf ein modifiziertes Histidin (Diphthamid) des eukaryontischen Elongationsfaktors 2. Die Inaktivierung des eEF-2 führt zur Inaktivierung der Proteinsynthese und schließlich zum Tod der Zelle.

(B) *Pseudomonas* Exotoxin

Das *Pseudomonas* Exotoxin bindet mit der Domäne Ia an den  $\alpha 2$ -Makroglobulin / *low density lipoprotein receptor related protein* ( $\alpha 2$ -MG/LRP) (Kounnas *et al.*, 1992). Die Aufnahme erfolgt über einen Clathrin-abhängigen Mechanismus (Sandvig & van Deurs, 2002). Im Endosom spaltet eine Furin-ähnliche Protease innerhalb der Domäne II. Die beiden resultierenden Fragmente sind über die Disulfidbrücke Cys265-Cys287 miteinander verknüpft. Der niedrige pH-Wert im Endosom induziert eine Änderung der Konformation des PE innerhalb der Domäne II (Idziorek *et al.*, 1990). Dadurch wird die Disulfidbrücke zugänglich und wahrscheinlich von einer Protein-Disulfid-Isomerase gespalten (McKee *et al.*, 1999). Das C-terminale Fragment gelangt über den retrograden Transport via KDEL-Rezeptor in das Endoplasmatische Retikulum (Jackson *et al.*, 1999). Es gibt jedoch auch die Theorie, dass erst im ER residente Chaperone und Enzyme die Disulfidbrücke reduzieren (Sandvig & van Deurs, 2002). Aus dem ER gelangt das 37 kD-Fragment über den Sec61p Kanal in das Cytoplasma (Koopmann *et al.*, 2000). Dort katalysiert die Domäne III die Übertragung des ADP-Restes vom  $\text{NAD}^+$  auf den eEF-2, was zur Inaktivierung der Biosynthese und letztlich zum Zelltod führt.

Es gibt verschiedene Strategien, das Fragment wieder zu stabilisieren, von denen zwei hauptsächlich bei der Herstellung von Immunotoxinen verwendet werden. Die am meisten verwendete Methode zur Stabilisierung von Fv-Fragmenten ist die Verknüpfung beider Ketten mittels eines Peptidlinkers vom C-Terminus der leichten Kette zum N-Terminus der schweren Kette (Bird *et al.*, 1988; Johnson & Bird, 1991). Es gibt auch *single chain* Fv-Fragmente, bei

dem der C-Terminus der schweren Kette mit dem N-Terminus der leichten Kette über einen Peptidlinker verknüpft sind, wie im Fall des scFv-Immunotoxin B3(Fv)-PE38, bei dem der C-Terminus des Antikörperfragmentes mit dem N-Terminus vom PE38, einer trunkierten Variante des *Pseudomonas* Exotoxins ohne die zellbindende Domäne Ia und Teile der Domäne Ib, genetisch fusioniert ist (Brinkmann *et al.*, 1991). Es gibt auch Beispiele, bei denen die zellbindende Komponente mit dem C-Terminus des Toxins fusioniert sind, z.B. DAB<sub>389</sub>IL2 (Duvic *et al.*, 1998). Eine weitere Methode zur Stabilisierung von Fv-Fragmenten ist die Einführung einer artifiziellen Disulfidbrücke zwischen V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub> (Brinkmann *et al.*, 1993). In diesem Fall wurden die beiden variablen Domänen des B3-Antikörpers, der gegen das Lewis Y-Antigen auf der Oberfläche verschiedener Krebszelltypen gerichtet ist, durch die Disulfidverbrückung stabilisiert. Dabei wurde das Arginin-44 von B3(V<sub>H</sub>) und das Serin-105 von B3(V<sub>L</sub>) jeweils gegen ein Cystein ausgetauscht. Der C-Terminus der leichten Kette des disulfidverbrückten Fv-Fragmentes war über einen Peptidlinker genetisch mit dem N-Terminus des PE38 verknüpft.

Im Anschluss an die Entwicklung eines solchen Immunotoxins wird dessen biologische Aktivität und Selektivität in Zellkultur untersucht. In diesen Experimenten wird die Cytotoxizität auf Zielzellen und auf Kontrollzellen bestimmt, um die Tumor-selektive Wirkung des Immunotoxins nachzuweisen. Des Weiteren wird die erforderliche Konzentration an Toxin für das Töten der Krebszellen ermittelt. Sind diese Tests erfolgreich, wird die biologische Wirksamkeit im lebenden Organismus am Tiermodell getestet. In diesen Experimenten werden neben der Aktivität und Spezifität auch noch andere Faktoren, wie Tumorpenetration und Stabilität des Immunotoxins, untersucht. Für eine gute Tumorpenetration ist die Größe des Immunotoxins von entscheidender Bedeutung. Kleinere Moleküle dringen besser in den Tumor ein als große. Deswegen wurden die kompletten Antikörper in den Immunotoxinen durch die Antigen-bindenden Fragmente ersetzt. Generell lassen sich hämatologische Tumore aufgrund der besseren Zugänglichkeit der Krebszellen wesentlich besser mit Immunotoxinen behandeln als solide Tumore. Da die Immunotoxine eine gewisse Zeit von der Applikation bis zum Binden an die Tumorzelle benötigen, ist deren Stabilität im Blutplasma sehr bedeutsam. Einige scFv-Immunotoxine zeigten in Plasma eine unzureichende Stabilität. Der limitierende Faktor war das gekoppelte Antikörperfragment, denn die cytotoxische Komponente zeigte sich sehr stabil. Somit hat die Stabilität der Antikörperkomponente einen großen Einfluss auf die Stabilität des gesamten Immunotoxins. Durch die Verwendung von disulfidstabilisierten Antikörperfragmenten in Immunotoxinen

konnte sowohl deren Stabilität als auch die Wirksamkeit gesteigert werden (Reiter *et al.*, 1994a; Reiter *et al.*, 1994b).

Bevor jedoch Immunotoxine für die Krebstherapie am Menschen eingesetzt werden, muss ihre systemische Toxizität an Primaten untersucht werden (Puri *et al.*, 1996). Trotz dieser Untersuchungen kann man nicht alle Nebenwirkungen, die beim Menschen auftreten, vorhersagen. In den klinischen Studien zeigten viele Immunotoxine starke Nebenwirkungen (Tab. 1.3).

Immunotoxin	Krankheit	Antwortrate	Nebenwirkungen	Referenz
ONTAK	CTCL	22/71	VLS	Olsen <i>et al.</i> , 2001
HN6600	Hirntumor	9/15	CNS	Laske <i>et al.</i> , 1997
LMB-2*	HCL,CTCL,CLL,HD	8/35	Leber, Fieber	Kreitman <i>et al.</i> , 1999, 2000
B43-PAP	ALL	9/19	VLS	Uckun, 1993
IgG-RFB4-dgA	NHL	6/25	VLS	Sausville <i>et al.</i> , 1995
Fab9-RFB4-dgA	NHL	5/14	VLS	Vitetta <i>et al.</i> , 1991
Ber-H2-SO6	HD	5/12	VLS	Falini <i>et al.</i> , 1992
TP40	Blasenkrebs	8/43	None	Goldberg <i>et al.</i> , 1995
Anti-B4-bR	NHL	8/59	Leber	Grossbard <i>et al.</i> , 1992, 1993
H65-RTA	CTCL	4/14	VLS	LeMaistre <i>et al.</i> , 1991
3A1-dgRTA	T-LGL, T-ALL	2/11	VLS	Frankel <i>et al.</i> , 1997
DAB486IL2	CTCL	4/19	Leber	Hesketh <i>et al.</i> , 1993
IgG-HD37-dgA	NHL	3/32	VLS, Akrozyanose	Stone <i>et al.</i> , 1996
LMB-1	Karzinoma	2/38	VLS	Pai <i>et al.</i> , 1996
Xomazyme-791	Darmkrebs	2/16	VLS	Byers <i>et al.</i> , 1989
T101-RTA	CLL	2/18	VLS	Hertler <i>et al.</i> , 1989
Anti-CD25-dgA	HD	2/15	VLS	Schnell <i>et al.</i> , 1998
N901-bR	SCLC	1/21	VLS	Lynch <i>et al.</i> , 1997
260F9-rA	Brustkrebs	1/9	Schwann-Zellen, VLS	Gould <i>et al.</i> , 1989
XMMME-001-RTA	Melanom	1/22	VLS	Spitler <i>et al.</i> , 1987
erb-38*	Brust-, Speiseröhrenkrebs	0/5	Leber	Pai-Scherf <i>et al.</i> , 1999
OVB3-PE	Eierstockkrebs	0/23	CNS	Pai <i>et al.</i> , 1991
BL22*	HCL, CLL, NHL	13/16	Hypoalbuminämie, Leber	Kreitman <i>et al.</i> , 2001
Anti-Tac-PE	ATL	0/4	Leber	Waldman <i>et al.</i> , 1992
454A12-rA	Adenokarzinom	0/20	CNS	Laske <i>et al.</i> , 1997
454A12-rA	Leptomeningeal Krebs	0/8	Arachnoidea	Bookman, 1998
DAB389EGF	Brustkrebs	0/43	Leber	Bacha <i>et al.</i> , 1995
BR96(sFv)PE40	Brustkrebs	IU		
LMB-9*	Karzinoma	IU	keine Angabe	
DTGM	AML	IU		
TXU-PAP	TALL	IU		
IL4(38-37)PE38KDEL	Hirnkrebs	IU		
HuM195-rGel	AML	IU		
SS1(dsFv)-PE38*	Eierstockkrebs, Mesotheliom	IU	keine Angabe	
LMB-7 <sup>a</sup>	Karzinoma	0/54	Leber, Niere	

**Tab. 1.3:** Ergebnisse aus klinischen Tests von Immunotoxinen

(Quelle: Frankel *et al.*, 2000; Brinkmann *et al.*, 2001 (mit \* gekennzeichnet))

AML, akute myeloide Leukämie, TALL, T-Zell akute lymphoblastische Leukämie; NHL, Non-Hodgkin-Lymphom; SCLC, kleinzelliger Lungenkrebs; T-LGL T-Zelltyp der großen granulo-lymphocytischen Leukämie; IU, laufende Untersuchung; CNS, Zentrales Nervensystem; RTA, Ricin toxin A; bR, blockiertes Ricin; IL, Interleukin; HCL, Haarzellenleukämie; CTCL, kutanes T-Zell Lymphom; CLL, chronische lymphocytische Leukämie; HD, Hodgekin'sche Krankheit; ATL, akute T-Zellen Leukämie; DTGM, Fusionsprotein aus *Diphtheria* Toxin und GM-CSF, Granulocyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor; VLS, vaskuläres Leak Syndrom.

<sup>a</sup>L. H. Pai-Scherf, D. Pearson, R. Wittes, M. C. Willingham, and I. Pastan. A Phase I study of LMB-7, [B3(Fv)PE38], a recombinant single-chain immunotoxin for advanced solid tumors, eingereicht zur Publikation

Deswegen muss in Zukunft die Selektivität der Antikörper weiter verbessert bzw. exklusiv auf der Oberfläche von Krebszellen lokalisierte Antigene charakterisiert werden, um neue Antikörper zu generieren. Die hohe Immunogenität der Konjugate ist ein weiteres Problem. Es gibt derzeit Strategien, durch die kombinierte Applikation mit CTLA4Ig die immunogene Wirkung der Toxine zu verringern (Siegall *et al.*, 1997). Durch die chemische Modifikation der Immunotoxine mit Polyethylenglykol konnte ebenso eine Verringerung der Immunogenität erreicht werden (Tsutsumi *et al.*, 2000).

Ein weiterer Ansatz zur Lösung des immunologischen Problems ist die Verwendung von humanen cytotoxischen Proteinen, wie z.B. RNasen (Newton *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1999; Huhn *et al.*, 2001). Neben der geringen Immunogenität ist auch die geringe Größe vieler RNasen, was für die Tumorpenetration entscheidend ist, ein Vorteil. Jedoch schützt sich die Zelle vor dem Abbau ihrer RNA durch RNasen mittels einer großen Menge an Ribonuklease-Inhibitoren (RI) im Cytosol. Diese Inhibitoren, die eine sogenannte *horseshoe* Struktur aufweisen, binden an die RNasen und blockieren dadurch das aktive Zentrum (Kajava *et al.*, 1995). Es gibt Ansätze diese Blockierung durch Modifikation der RNase zu verhindern. Durch die genetische Fusion der humanen RNase Angiogenin mit dem scFv-Fragment gegen den humanen Transferrinrezeptor wurde ein Immunotoxin erzeugt, dessen RNase-Komponente trotz des gekoppelten Antikörperfragmentes durch RI blockiert werden konnte (Newton *et al.*, 1996). Durch Co-Kristallisation von Rinder-RNase A mit einem RI aus Schwein konnte die Bindungsstelle zwischen RNase und Inhibitor lokalisiert werden (Suzuki *et al.*, 1999). Auf diesen Daten aufbauend wurde innerhalb der Bindungsregion der humanen pankreatischen RNase das Glycin-89 durch ein Cystein ausgetauscht (Suzuki *et al.*, 1999). Diese Mutation hatte keinen Einfluss auf die Ribonukleaseaktivität. Über das Cystein-89 konnten an die RNase verschiedene Proteine, wie z.B. die RNase selbst zum Tandemprotein, Transferrin und der monoklonale Antikörper 5E9, chemisch gekoppelt werden. Die resultierenden Konjugate zeigten sich resistent gegenüber der Blockierung durch RNase-Inhibitoren, ohne jedoch die Ribonukleaseaktivität zu beeinflussen, was in Zellkultur nachgewiesen werden konnte (Suzuki *et al.*, 1999). Die Antikörper-gekoppelten RNasen stellen somit eine neue Generation von Immunotoxinen mit extrem geringer Immunogenität dar, deren therapeutisches Potential in Zukunft in klinischen Studien noch getestet werden muss.

## 1.4 Problemstellung und Ziele

Bei den derzeit verwendeten rekombinanten Immunotoxinen sind beide Komponenten des Immunotoxins durch eine genetische Fusion miteinander verknüpft. In den vorigen Kapiteln wurde beschrieben, dass der Erfolg einer Krebstherapie durch Immunotoxine von einer geeigneten Kombination aus Antikörper und Toxin abhängt. Vor diesem Hintergrund wäre die Suche nach einer solchen Kombination unter Verwendung der genetisch fusionierten Immunotoxine sehr aufwendig. Aufbauend auf den Arbeiten von Richter *et al.* (2001) und Stubenrauch *et al.* (2001) sollte ein neuartiges polyionisches Dimersierungsmotiv, bestehend aus entgegengesetzt geladenen Peptiden, die durch Ausbildung einer Disulfidbrücke kovalent miteinander verknüpft werden, für die Kopplung der zellbindenden und cytotoxischen Komponenten von Immunotoxinen etabliert werden. Zunächst sollte ausgehend von einem bekannten Immunotoxin, dem B3(dsFv)-PE38 (Brinkmann *et al.*, 1993), die einzelnen Komponenten, das Antikörper Fv-Fragment und das trunkierte *Pseudomonas* Exotoxin PE38, mit den polyionischen Peptiden R<sub>8</sub>C und E<sub>8</sub>C fusioniert und anschließend gekoppelt werden. Das resultierende polyionische Immunotoxin B3-PE38 sollte hinsichtlich des Einflusses der fusionierten Peptide und der Heterodimerisierung beider Komponenten auf deren biophysikalische Eigenschaften untersucht werden. Ob das polyionische B3-PE38 eine Zelltyp-spezifische Aktivität aufweist, ist in verschiedenen Zellkulturexperimenten zu überprüfen und mit der Aktivität des genetisch fusionierten B3(dsFv)-PE38 zu vergleichen.

Um die Modularität des polyionischen Dimerisierungsmotivs für die Herstellung Tumorspezifischer Immunotoxine zu untermauern, sollte neben PE38 ein zweites cytotoxisches Protein für die Kopplung an das polyionische Fv-Fragment dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP verwendet werden, die Serinprotease Granzym B (GzmB). Granzym B wird aus den Granula cytotoxischer T-Lymphocyten ausgeschüttet (Barry *et al.*, 2002; Fröhlich *et al.*, 1998). Es bindet mit Hilfe seiner Zuckerreste an den Kalzium-unabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (CI-MPR) auf der Zelloberfläche. Die Aufnahme von Granzym B in das Cytosol der Zelle wird durch das porenbildenden Perforin vermittelt (Lieberman, 2003), wo es die Apoptose der Zelle über Caspase-abhängige und unabhängige Signalkaskaden induziert. Granzym B wirkt wie die humanen RNasen wesentlich weniger immunogen auf den menschlichen Körper als die in vielen Immunotoxinen verwendeten bakteriellen oder pflanzlichen Toxine. Das rekombinant in *E.coli* produzierte GzmB liegt nicht-glykosyliert vor und hat somit seinen natürlichen Tropismus verloren. Durch Fusion mit dem negativ geladenen Peptid GCD<sub>8</sub> kann es, vergleichbar mit der polyionischen, trunkierten Variante des *Pseudomonas Exotoxins* E<sub>8</sub>C-

PE38, an dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP gekoppelt werden. Das resultierende polyionische Immunotoxin B3-GzmB soll auf den Einfluss der Fusionspeptide und der Heterodimerisierung auf die enzymatische Aktivität des gekoppelten GzmB untersucht werden. Außerdem ist die Stabilität und die Aktivität in humanem Serum zu überprüfen. Die Zelltyp-spezifische Aktivität des B3-GzmB sollte in Zellkulturexperimenten nachgewiesen und mit der des B3-PE38 verglichen werden.

Die bisher verwendeten Immunotoxine werden meist intrazellulär proteolytisch abgebaut, was sich negativ auf die cytotoxische Effizienz auswirkt. In Anlehnung an Tumor-spezifische Antikörper, die mit Radionukliden bzw. Chemotherapeutika gekoppelt sind, wurde eine  $\beta$ -Galaktosidase mit fluorierten Tyrosinen hergestellt. Fluorierte Aminosäuren üben eine toxische Wirkung auf Zellen aus (Budisa *et al.*, 1999). Die mit fluorierten Tyrosinen modifizierte  $\beta$ -Galaktosidase (toxGal-CE<sub>8</sub>P) wurde C-terminal mit dem polyionischen Peptid CE<sub>8</sub>P fusioniert. Ziel war es, mit Hilfe der polyionischen Fusion die fluorierte  $\beta$ -Galaktosidase mit dem Antikörperfragment dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP zu koppeln. Das resultierende Immunotoxin B3-toxGal sollte in Zellkulturexperimenten auf seine Zelltyp-spezifische Toxizität hin untersucht werden.

Die polyionischen Fusionspeptide könnten für die Herstellung von Immunotoxinen eine Alternative zu den bisherigen Kopplungsmethoden wie chemisches *cross linking* und genetische Fusion darstellen. Durch diese Methode wäre ein wesentlich effizienteres *screening* geeigneter Kombinationen von Antikörper und Toxin für die Therapie bestimmter Krebstypen möglich.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

##### Absorptionsspektrophotometer

Ultrospec 4000 UV/VIS Spectrophotometer	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
UVIKON 942 Spectrophotometer mit Thermostat E10	<i>Bio-Tek Kontron Instruments, Neufahrn medingLab, Freital</i>
Küvetten: Hellma 104QS (d = 10 mm)	<i>VWR, Darmstadt</i>

##### Fluoreszenzspektrophotometer

F-4500 Fluorescence Spectrophotometer	<i>Hitachi High-Technologies, UK</i>
FluoroMax-2	<i>ISA Instrument, S.A., Inc., München</i>
Küvetten: Hellma 104F QS (10x4 mm)	<i>VWR, Darmstadt</i>
Hellma Makro 111	<i>VWR, Darmstadt</i>

##### Circulardichroismusspektrometer

Jasco J-710 Spektropolarimeter	<i>Jasco GmbH, Groß-Umstadt</i>
--------------------------------	---------------------------------

##### Chromatographie-Einheiten

Pharmacia HiLoad System	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
ÄKTApurifier 100 bzw. ÄKTAexplorer 100 mit Fraktionskollektor Frac-900 und Prozeßsteuerung mittels UNICORN Control Software (V. 3)	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Gynkotech HPLC:	<i>Dionex, Idstein</i>
Pumpe: P580	
Autosampler: Gina 50	
UV/VIS-Detektor: UVD 170S	
Kolonnenthermostat: STH 585	
Steuersoftware: Chromeleon v4.32	
Fluoreszenzdetektor: L-7480, Hitachi	<i>Hitachi High-Technologies, UK</i>

##### Verwendete Chromatographiematerialien und -säulen

###### *Ionenaustauschchromatographie:*

POROS <sup>®</sup> HS; Säulenvolumen: 1,7 ml	<i>PerSeptive Biosystems, Wiesbaden</i>
--	---

POROS <sup>®</sup> HQ; Säulenvolumen: 1,7 ml	<i>PerSeptive Biosystems, Wiesbaden</i>
Q-Sepharose <i>fast flow</i> ; Säulenvolumen: 35 ml	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
<i>Gelfiltration:</i>	
Superdex 75 HR 10/30	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
HiLoad 16/60 Superdex 75 pg	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
PD-10	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
<i>Affinitätschromatographie:</i>	
Glutathion-Sepharose 4B	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
HiTrap Benzamidin Fast Flow 1 ml	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Ni-NTA Sepharose; Säulenvolumen: 20 ml	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
<i>Reversed Phase:</i>	
Source 15RPC (3,6 ml)	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
<b>DNA-Sequenziergerät</b>	
Li-Cor <sup>®</sup> -Sequenziergerät Modell 4000	<i>MWG BIOTECH, Ebersberg</i>
<b>Elektroporationsgerät</b>	
Gene Pulser II mit Pulse Controller Plus	<i>BioRad, München</i>
Elektroporationsküvetten, 2 mm	<i>BioRad, München</i>
<b>Gelelektrophoreseeinheiten</b>	
Gelelektrophoreseapparatur GNA-100 <i>submarine unit</i> mit <i>electrophoresis power supply</i> EPS 200 bzw. EPS 600	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Gelelektrophoreseapparatur SE 250 <i>mighty small II mini-vertical unit</i> für zwei 10 cm × 8 cm Gele	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
<b>Blotapparatur</b>	
Semidry Blotapparatur Hoefer SemiPhor	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
<b>Thermocycler</b>	
TRIO-Thermoblock	<i>Biometra, Göttingen</i>
Omn-E Thermocycler	<i>Hybaid-AGS, Heidelberg</i>
<b>Zentrifugen</b>	
Zentrifuge Avanti J-20	

Avanti J-25	
Avanti J-30I	<i>Beckman, München</i>
Zentrifuge Sorvall RC 5C Plus	<i>DuPont, Newton, USA</i>
Biofuge Fresco, Pico	<i>Heraeus, Hanau</i>
Centrifuge 5415C	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Optima TLX Ultrazentrifuge	<i>Beckman, München</i>
<b>Rotoren</b>	
JA-25.50; JA-30.50; TLA-100.3;	
JLA-8.1000; JLA-10.500; JLA-16.250	<i>Beckman, München</i>
SLA-3000; SLA-1500	<i>Kendro, Langenselbold</i>
<b>Bioreaktorkultivierung</b>	
Biostat ED (Arbeitsvolumen: 10 l); mit digitalem Mess- und Regelsystem C-DCU und dem Prozessleitsystem MCF5win	<i>Braun, Melsungen</i>
<b>Sonstige Geräte</b>	
Certomat BS-T-Schüttelinkubator	<i>B. Braun Biotech, Melsungen</i>
Digital pH-Meter pH 525	<i>WTW, Weilheim</i>
Gaulin-Hochdruckhomogenisator Lab 60	<i>APV, Lübeck</i>
Gaulin-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40	<i>APV, Lübeck</i>
Membranvakuumpumpe CVC2	<i>Vacuubrand, Wertheim</i>
Heizblock	<i>Liebisch</i>
Horizontalschüttler Polymax 1040	<i>Heidolph, Schwabach</i>
HT Multitron Inkubationsschüttelmaschine	<i>Infors, Bottmingen, Schweiz</i>
Küvettenschleuder	<i>ITS, Hattersheim</i>
Peristaltik Pumpe P1	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Schwingmühle HM 2000	<i>Retsch, Haan</i>
Tangentialflussfiltrationssystem ProVario-3	<i>Pall-Gelman, Dreieich</i>
Thermomixer comfort	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Tischautoklav GTA50	<i>Medizin und Labortechnik Fritz Gössner, Hamburg</i>
Trockenschrank Function Line	<i>Heraeus, Hanau</i>
Ultrafree®-15 bzw. Ultrafree®-4	
Zentrifugalkonzentratoren ( <i>cut off</i> 5 kD)	<i>(Millipore, Schwalbach)</i>

Ultra-Turrax T25	<i>Janke &amp; Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen</i>
UV-Transluminator	<i>VWR, Darmstadt</i>
Vertikalschüttler Typ 3025	<i>GFL, Burgwedel</i>
VKS-75Control Schüttelinkubator	<i>Edmund Bühler</i>
Vortex-Genie 2	<i>Scientific Industries, Bohemia, USA</i>
Waagen Sartorius MC1, MC210S und BP4100	<i>Sartorius, Göttingen</i>

### 2.1.2 Chemikalien, Molekulargewichtstandards und Referenzproteine, Kits, Reagenzien und Enzyme, Peptide, sonstiges Material

#### Chemikalien

2,2'-Dithiodipyridin (DTP)	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
2-Mercaptoethanol	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
2-Propanol	<i>VWR, Darmstadt</i>
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid-Lösung	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Aceton	<i>Merck, Darmstadt</i>
Acetonitril (HPLC-grade)	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Ac-IEPD-pNA	<i>Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden</i>
Agar-Agar	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Agarose <i>electrophoresis grade</i>	<i>ICN, Meckenheim</i>
Ammoniak (25%ig)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ammoniumchlorid	<i>Riedel-de-Haën, Seelze</i>
Ammoniumperoxodisulfat	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Ammoniumsulfat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ampicillin	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Arginin	<i>Ajinomoto C., Inc., Tokyo, Japan</i>
Bactotrypton	<i>DIFCO, Detroit, USA</i>
Borsäure	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Bradford-Reagenz	<i>BioRad, München</i>
Bromphenolblau	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Calciumchlorid	<i>Riedel-de-Haën, Seelze</i>
Citronensäure	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Coomassie Brilliant Blau G250	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Coomassie Brilliant Blau R250	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>

Cystein	<i>ICN, Meckenheim</i>
Diammoniumhydrogencitrat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Diammoniumsulfat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Dikaliumhydrogenphosphat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Dinatriumhydrogenphosphat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Dinatriumsulfat	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Dithiothreitol (DTT)	<i>ICN, Meckenheim</i>
Essigsäure (96%ig)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ethanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ethidiumbromid (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenanthridiniumbromid)	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, freie Säure)	<i>ICN, Meckenheim</i>
Ethylenglykol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Formaldehyd	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Glucose	<i>Merck, Darmstadt</i>
Glutathion oxidiert	<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>
Glutathion reduziert	<i>Merck, Darmstadt</i>
Glycerin	<i>ICN, Meckenheim</i>
Glycin	<i>ICN, Meckenheim</i>
Guanidiniumhydrochlorid (C-grade)	<i>Nigu Chemie GmbH, Waldkraiburg</i>
Harnstoff	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Hefeextrakt	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Hefeextrakt Servabacter® powder	<i>Serva, Heidelberg</i>
Hefeextrakt	<i>CMV, Hefewerk Hamburg</i>
Iodacetamid	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	<i>Applichem, Darmstadt</i>
Kaliumdihydrogenphosphat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Kaliumhydroxid	<i>Merck, Darmstadt</i>
Kalziumchlorid-Dihydrat	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Kanamycin	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Kupfer-II-chlorid	<i>Riedel-de-Haën, Seelze</i>
Magermilchpulver	<i>Nestlé, Frankfurt/M.</i>
Magnesiumchlorid	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>

Magnesiumsulfat	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Methanol (HPLC-grade)	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Mineralöl für PCR	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Mowiol 4-88	<i>Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden</i>
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Natriumacetat	<i>ICN, Meckenheim</i>
Natriumazid	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Natriumcarbonat, wasserfrei	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumchlorid	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Natriumdesoxycholat (Nadoc)	<i>Berlin-Chemie, Berlin</i>
Natriumdihydrogenphosphat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumhydroxid	<i>Riedel-de-Haën, Seelze</i>
Natriumsulfat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumthiosulfatpentahydrat	<i>Amresco, Solon, USA</i>
Nicotinamidadenindinukleotid (NAD)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Phosphorsäure (85%ig)	<i>Merck, Darmstadt</i>
p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
Polyethylenglycol 8000	<i>Fluka Chemia AG, Schweiz</i>
Ponceau S	<i>Merck, Darmstadt</i>
Protease Inhibitor Mix	<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>
Salzsäure (37%ig)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Silbernitrat für Proteinfärbung	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
TexasRed® C2 Maleiimid	<i>Molecular Probes, Netherlands</i>
Thiaminhydrochlorid	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
<i>t</i> -Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100)	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
Trichloressigsäure	<i>Fluka-Chemica, Neu-Ulm</i>
Trifluoressigsäure	<i>Fluka-Chemica, Neu-Ulm</i>
Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	<i>ICN, Meckenheim</i>
Trypton-Pepton (pankreat. Verdau von Casein)	<i>Beckton-Dickinson, Heidelberg</i>
Tween 20	<i>Merck, Darmstadt</i>

**Molekulargewichtstandards und Referenzproteine**

1 kb-DNA-Leiter	<i>Gibco-BRL, Eggenstein</i>
Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS electrophoresis	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
High Molecular Weight Calibration Kit for SDS electrophoresis	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Rinderserumalbumin (Fraktion V)	<i>Boehringer Mannheim</i>
B3(dsFv)-PE38 (LMB-9)	<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>

**Kits**

ECL-Detektkit	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
GFX Gelband Purification Kit	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
QIAprep Spin Miniprep Kit	<i>Qiagen, Hilden</i>
PCR Nukleotid Mix, dNTP's (jeweils 10 mM)	<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>
SequiTherm EXCEL™ II	
DNA-Sequenzier Kit LC (für 25-41 cm Gele)	<i>Epicentre Technologies, Madison, USA</i>
BioPorter Transfektionssystem Kit	<i>Gene Therapy Systems, Inc., San Diego</i>

**Reagenzien und Enzyme**

Verwendete Polymerasen:

Deep Vent <sub>R</sub> ® DNA Polymerase	<i>New England BioLabs, Frankfurt/M.</i>
Expand™ High Fidelity PCR System	<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	<i>Promega, Mannheim</i>

Restriktionsendonukleasen:

NdeI (20 U/μl), EcoRI (20 U/μl), NotI (10 U/μl), XbaI (20 U/μl) inklusive entsprechender Puffer für Einzel- und Doppelrestriktionsspaltungen	<i>New England BioLabs, Frankfurt/M.</i>
---	--

Weitere Enzyme und Proteine:

Anti-B3-IgG aus Hase	<i>Zur Verfügung gestellt von Dr. Uli Brinkmann, NIH</i>
Anti-GST-IgG aus Hase	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
Anti-PE-IgG aus Hase	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>

Anti-Rabbit-Ig-Peroxidase	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
Benzonase <sup>R</sup> purity grade II (>90%) (250 U/μl)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Lysozym	<i>Merck, Darmstadt</i>
Shrimps Alkalische Phosphatase	<i>USB, Cleveland OH., USA</i>
T4-DNA-Ligase (1 U/μl)	<i>Gibco-BRL, Eggenstein</i>

### Sonstiges Material

Autoradiographiefilm Retina XBD	<i>INTAS, Göttingen</i>
BioTrace <sup>TM</sup> Nitrocellulosemembran (0,45 μm)	<i>Pall-Gelman, Dreieich</i>
BioTrace <sup>TM</sup> PVDF Transfermembran (0,45 μm)	<i>Pall-Gelman, Dreieich</i>
Dialyseschläuche Spectropor MWCO 6000-8000	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Glasperlen, 0,25-0,50 mm	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
pH-Indikatorstäbchen	<i>Merck, Darmstadt</i>
Zentrifugalkonzentratoren Macrosep <i>cut off: 10 kD und 30 kD</i>	<i>Pall-Gelman, Dreieich</i>
Minisette FSQ, <i>cut off: 10 kD</i>	<i>Pall-Gelman, Dreieich</i>
Parafilm	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Pipettensatz	<i>Gilson, Schweiz</i> <i>Eppendorf, Hamburg</i>

## 2.1.3 Plasmide und Vektoren

### 2.1.3.1 Ausgangskonstrukte

pULI 39-1	Plasmid zur Expression des Fusionskonstruktes B3(V <sub>L</sub> )-PE38REDLK; Teil des B3(dsFv)-PE38 Immunotoxins (Reiter <i>et al.</i> , 1994), bereitgestellt von Uli Brinkmann, NIH
pET21-a(+)	Expressionsplasmid; Amp <sup>r</sup> , T7lac Promotor; <i>Novagen USA</i>
pGEX-4T-1	Expressionsplasmid mit N-terminaler Glutathion-S-Transferase, Amp <sup>r</sup> , <i>tac</i> -Promotor; <i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
pUBS520	codiert den I <sup>q</sup> -Repressor und seltene <i>argU</i> tRNAs (Brinkmann <i>et al.</i> , 1989); Kn <sup>r</sup>
pB3(V <sub>H</sub> )R <sub>8</sub> CP	Derivat des pYR 38-2 (Reiter <i>et al.</i> , 1994) Expressionsplasmid der V <sub>H</sub> -Domäne vom monoklonalen Antikörper B3; C-terminal erweitert um Sequenz codierend für AR <sub>8</sub> CP (Stefan Gleiter, Institut für Biotechnologie Halle)

pB3(V <sub>L</sub> )	Derivat des pULI 39-1 (Reiter <i>et al.</i> , 1994) Expressionsplasmid der V <sub>L</sub> -Domäne vom monoklonalen Antikörper B3 (Stefan Gleiter, Institut für Biotechnologie Halle)
----------------------	---

### 2.1.3.2 Selbsterstellte Konstrukte

pET21-E8CPE38	pET21-a(+) Derivat zur Expression des PE38, das N-terminal um die Sequenz codierend für MGSSE <sub>8</sub> C erweitert wurde.
pET21-miniE8CPE38	pET21-a(+) Derivat zur Expression des PE38, das N-terminal um die Sequenz codierend für MGSSE <sub>8</sub> C erweitert wurde. Zur Steigerung der Expression wurde vor das Gen für E <sub>8</sub> C-PE38 ein Cistron mit einer zusätzlichen Ribosomenbindungsstelle eingefügt.
pGEX4T1-E8CPE38	pGEX-4T-1 Derivat zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus der N-terminalen GST und des N-terminal verlängerten PE38; zwischen beiden Proteinen befindet sich eine artifizielle Thrombin-Schnittstelle

### 2.1.4 Oligonukleotide

Sequenzierprimer:

T7-Promotor            5'-CGA AAT TAA TAC GAC TCA C-3'

T7-Terminator        5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G-3'

Beide T7-Sequenzierprimer wurden von der Firma *MWG Biotech, Ebersberg* in HPSF-gereinigter Form bezogen und waren am 5'-Ende mit dem Farbstoff *IRD41* markiert.

Die Sequenzierung der pGEX-4T-1 Konstrukte wurde von Angela Peterson, Biozentrum durchgeführt. Die Sequenzierprimer waren am 5'-Ende mit dem Farbstoff *CY5* markiert und hatten folgende Sequenz:

GEX-5'                    5'-GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG-3'

GEX-3'                    5'-CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG-3'

Sequenzen der verwendeten PCR-Primer:

*Primer zur Mutagenese des PE38*

5'-Primer für N-terminale polyionische Verlängerung; Umklonierung des E8CPE38 in pET21-a(+)

fwdE8CPE38      5'-GAT CAA GAC ATA TGG GCA GCA GCG AAG AGG AGG  
AAG AGG AGG AGG AAT GCG CTT CCG GAG GTC CCG AGG  
GC-3'

3'-Primer zum Umklonieren des E8CPE38 in pET21-a(+)

revPE38            5'-GGA GAA TTC TCA TTA CTT CAG GTC CTC GCG CGG  
CGG-3'

5'-Primer für N-terminale Erweiterung des E8CPE38 durch ein mini-Cistron mit Sequenz, die komplementär an 16S rRNA bindet (Schoner *et al.*, 1990)

miniE8CPE38      5'-GGA ATT CCA TAT GTA TCG ATT AAA TAA GGA GGA  
ATA AAC CAT GGG CAG CAG CGA AGA GGA GGA AGA G-3'

5'-Primer zum Umklonieren des E8CPE38 in pGEX-4T-1

4T1-E8CPE38fwd    5'-CCG GAA TTC GAA GAG GAG GAA GAG GAG GAG GAA  
TGC GCT TC-3'

3'-Primer zum Umklonieren des E8CPE38 in pGEX-4T-1

4T1-E8CPE38rev    5'-TTT TCC TTT TGC GGC CGC TCA TTA CTT CAG GTC CTC  
GCG CGG CGG-3'

Die verwendeten PCR-Primer wurden HPLC-gereinigt von der Firma *INTERACTIVA Virtual Laboratory, Ulm* bezogen.

### 2.1.5 Mikroorganismen

Stamm	Genotyp	Referenz	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> BL21	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i>	Studier und Moffatt, 1986	Promega, USA
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)</i>	Studier und Moffatt, 1986	Calbiochem- Novabiochem, Bad Soden

<i>E.coli</i> BL21(DE3) pLysS	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub>-r<sub>B</sub>-</i> ), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , (DE3), pLysS, Cm <sup>r</sup>	Studier und Moffatt, 1986	Promega, USA
<i>E.coli</i> JM109(DE3)	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>k</sub><sup>-</sup></i> ) <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ( <i>lac-proAB</i> ), [F <sup>+</sup> , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacIqZΔM15</i> ], λ(DE3)	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985 (Genotyp für JM109)	Promega, USA
<i>EcoB</i>	<i>lon</i>	Donch und Greenberg, 1968	Roche Diagnostics, Penzberg

## 2.1.6 Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer und Lösungen

### Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie:

10 x TAE-Puffer	400 mM Tris/Essigsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0 (wurde als 1-fach Puffer für die Herstellung und Elektrophorese der Agarosegele und für die Ethidiumbromid-Färbelösung verwendet)
5 x DNA-Probenauftragspuffer	50 % (v/v) Glycerin, in 1-fach TAE-Puffer 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
10 x TBE-Puffer für die Sequenzierung	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA
Ausfällen von DNA	3 M Natriumacetat, pH 4,8 100 % Ethanol

### Lösungen und Medien für die Kultivierung von Mikroorganismen:

Benötigte Medien für Bakterien (Sambrook *et al.*, 1989) sowie Lösungen und Wasser für die Arbeiten mit Mikroorganismen wurden direkt nach der Herstellung im Autoklaven sterilisiert. Hitzeempfindliche Stoffe wurden den erkalteten Lösungen sterilfiltriert zugegeben.

Luria-Bertani-Broth (LB-Medium)	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l Natriumchlorid
LB-Agar	LB-Medium + 15 g/l Agar-Agar

SOC-Medium	20 g/l Bacto-Trypton	} separat autoklaviert
	5 g/l Hefeextrakt	
	0,5 g/l NaCl	
	10 ml/l 1M MgCl <sub>2</sub> (separat autoklaviert)	
	10 ml/l 1M MgSO <sub>4</sub> (separat autoklaviert)	
	20 ml/l 20 % (w/v) Glucose (separat autoklaviert)	

### Antibiotika-Lösungen:

Stammlösung Ampicillin: 100 mg/ml	Konzentration im Medium: 100 µg/ml
Stammlösung Kanamycin: 35 mg/ml	Konzentration im Medium: 70 µg/ml
Stammlösung Chloramphenicol: 35 mg/ml	Konzentration im Medium: 35 µg/ml

Alle Stammlösungen der Antibiotika wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt, anschließend sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### Medien für die Bioreaktorkultivierungen:

Hefeextrakt-Vollmedium (Ansatzvolumen: 7 l)

350 g Hefeextrakt	} lösen in 6 l H <sub>2</sub> O bidest, im Bioreaktor für 60 min bei 121°C } autoklavieren
3,5 g Ammoniumchlorid	
77 g Glycerin	

Direkt vor Kultivierungsbeginn Zugabe von:

- 350 ml 1M di-Kaliumhydrogenphosphat (steril)
- 20 ml 1M Magnesiumsulfat (steril)
- 0,8 g Thiamin in 10 ml H<sub>2</sub>O bidest gelöst (sterilfiltriert)
- 10 ml 100 mg/ml Ampicillin (sterilfiltriert)

Fermenter wurde mit sterilem H<sub>2</sub>O bidest auf 7 l aufgefüllt, und der pH-Wert mit 10 N Natriumhydroxidlösung auf 7,0 eingestellt.

### Feeding-Lösung (Ansatzgröße: 3 l)

- 30 % (w/v) Hefeextrakt (CMV, Hefewerk Hamburg)
- 25 % (v/v) Glycerin
- in H<sub>2</sub>O bidest lösen, anschließend autoklavieren

**Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese:**

5x SDS-Probenauftragspuffer	250 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	5 % (w/v)	SDS
	50 %	Glycerin
	0,005 %	Bromphenolblau
	optional bei zu reduzierenden Proben erfolgte die Zugabe von 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol	
5x SDS-Gelelektrophoresepuffer	125 mM	Tris
	1,25 M	Glycin
	17,5 mM	SDS
	pH 8,3	
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, 0,8 % SDS, pH 6,8	
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, 0,8 % SDS, pH 8,8	

Zum Färben der Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen wurden Lösungen nach Fairbanks *et al.* (1971) verwendet.

Lösung A:	25 % (v/v) Isopropanol
	10 % (v/v) Essigsäure
	0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250
Lösung B:	10 % (v/v) Isopropanol
	10 % (v/v) Essigsäure
	0,005 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250
Lösung C:	10 % (v/v) Essigsäure
	0,002 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250
Entfärbelösung:	10 % (v/v) Essigsäure

**2.1.7 Materialien für Zellkultur****Geräte**

accu-jet® Pipettierhelfer	<i>Brand GmbH, Wertheim</i>
Behälter mit flüssigem Stickstoff Typ GT35	<i>AIR LIQUIDE, Frankreich</i>
Biofuge fresco	<i>Heraeus, Hanau</i>
CO <sub>2</sub> -Inkubator mit Desinfektionsstufe HERAcell	<i>Heraeus, Hanau</i>

Durchflusscytometer FACSCalibur mit Rechner und Steuerungssoftware: CellQuest Pro	<i>Becton-Dickinson, Heidelberg</i>
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100M	
Konfokales Laserscanning Mikroskop LSM 510	<i>Carl Zeiss, Jena</i>
Mirkoskop TELAVAL 3	<i>Carl Zeiss, Jena</i>
Pipettensatz Eppendorf <i>research</i>	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Sicherheitswerkbank HERAsafe Klasse 2 TypH	<i>Heraeus, Hanau</i>
VACUU Hand Controller mit Pumpe und Absaugflasche	<i>Vacuubrand Wertheim</i>
Varioklav Dampfsterilisator Typ 250T	<i>H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim</i>
Wasserbad Typ 1092	<i>GFLmbH, Burgwedel</i>

#### **Zellkulturflaschen, Testplatten, Kryoröhrchen und Pipettenspitzen**

Kryoröhrchen, verschraubbar	<i>Greiner, Frickenhausen</i>
Gestopfte Pipettenspitzen: 10 µl, 200 µl, 1000 µl	<i>Ilona Schubert Laborbedarf, Leipzig</i>
Serologische Pipetten: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	<i>TPP, Schweiz</i>
Zellkulturflaschen: 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	<i>TPP, Schweiz</i>
Zellkulturtestplatten: 6, 12, 24 Wells	<i>TPP, Schweiz</i>

#### **Seren, Medien, Lösungen und Chemikalien**

Fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert) FCS	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Kälberserum (hitzeinaktiviert) CS	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
D-MEM mit GlutaMAX I, 4,5 g/l Glucose, Natriumpyruvat, Pyridoxin	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
D-MEM mit 4,5 g/l Glucose, Pyridoxin ohne Phenolrot	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
RPMI 1640 Medium (Dutch Modification) ohne Glutamin	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
RPMI 1640 Medium ohne Glutamin, ohne Phenolrot	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Dulbecco's Phosphat gepufferte Kochsalzlösung	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Gentamicin 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O dest.	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Trypsin-EDTA (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA)	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>

GlutaMAX I-Supplement 200 mM gelöst in 0,85 % NaCl	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
FACSFlow	<i>Becton-Dickinson, Heidelberg</i>
FACSClean	<i>Becton-Dickinson, Heidelberg</i>
FACSRinse	<i>Becton-Dickinson, Heidelberg</i>
TNF- $\alpha$ aus Ratte, rekombinant in <i>E.coli</i> , lyophilisiert	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl- Tetrazolium-bromid)	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
Propidiumjodid	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
Paraformaldehyd	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
Chloroquin	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
Mowiol 4-88	<i>Calbiochem, USA</i>
DABCO (1,4-Diazobicyclo[2.2.2]-octan)	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>

### Verwendete Lösungen

TNF- $\alpha$                     10  $\mu$ g/ml gelöst in PBS mit 1 mg/ml BSA

MTT                            5 mg/ml gelöst in PBS

Propidiumjodid            50  $\mu$ g/ml gelöst in H<sub>2</sub>O bidest (Stammlösung)

Paraformaldehyd        3 % (w/v) gelöst in PBS

Chloroquin                10 mM gelöst in PBS

Inkubationspuffer:      140 mM NaCl  
                                  10 mM HEPES, pH 7,4  
                                  5 mM CaCl<sub>2</sub>

Puffer wurde entgast und sterilfiltriert.

Zell-Lysepuffer:        99,4 ml DMSO  
                                  0,6 ml Essigsäure  
                                  darin gelöst 10 g SDS

Mowiol-Lösung:        6 g Glycerol, 2,4 g Mowiol 4-88 in 6 ml Wasser lösen (ca. 2h)  
                                  Zugabe von 12 ml 0,2 M Tris-HCl pH 8,5, bei RT für 3h rühren  
                                  unlösliche Bestandteile 20 min mit 5000x g bei RT abzentrifugieren  
                                  Zugabe von 0,2 % (w/v) DABCO (Antifade), lagern bei -20°C

**Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Beschreibung	ATCC-Nr.	Kultiviert in:
A431	humane Hautkrebszellen	CRL-1555	RPMI 1640 (Dutch Modification) + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) GlutaMAX I + 0,5 % (v/v) Gentamicin
HT-29	humane Dickdarmkrebszellen	HTB-30	D-MEM mit GlutaMAX I, 4,5 g/l Glucose, Natriumpyruvat, Pyridoxin + 10 % (v/v) FCS + 0,5 % (v/v) Gentamicin
MCF7	humane Brustkrebszellen	HTB-22	RPMI 1640 (Dutch Modification) + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) GlutaMAX I + 0,5 % (v/v) Gentamicin
MCF7 <sup>casp3</sup>	humane Brustkrebszellen, intakte Caspase 3	HTB-22	RPMI 1640 (Dutch Modification) + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) GlutaMAX I + 0,5 % (v/v) Gentamicin
NIH3T3	Mäusefibroblasten	CRL-1658	RPMI 1640 (Dutch Modification) + 10 % (v/v) CS + 1 % (v/v) GlutaMAX I + 0,5 % (v/v) Gentamicin
SK-BR3	humane Brustkrebszellen	HTB-30	D-MEM mit GlutaMAX I, 4,5 g/l Glucose, Natriumpyruvat, Pyridoxin + 10 % (v/v) FCS + 0,5 % (v/v) Gentamicin

**2.2 Methoden****2.2.1 Molekularbiologische Methoden****2.2.1.1 Klonierung und Sequenzierung****Isolierung von Plasmid-DNA**

Plasmid-DNA wurde aus den verwendeten *E.coli* Stämmen mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kits* (*Qiagen, Hilden*) isoliert. Die Zellen wurden durch alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (1979) aufgeschlossen. Anschließend konnte die DNA mittels eines Anionenaustauschchromatographiesäulchens isoliert werden. Man erhält reine Plasmid-DNA in Konzentrationen von ca. 100 ng/μl. Die DNA-Isolierung erfolgte nach dem *Qiagen*-Standardprotokoll für Plasmidpräparation mit Hilfe einer Mikrozentrifuge.

### **Agarose-Gelelektrophorese**

Großporige Agarosegele eignen sich zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten. Die verwendeten 1 %igen Agarosegele, hergestellt in 1x TAE-Puffer, trennen DNA-Moleküle der Länge 0,5 bis 10 kb. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1x TAE verwendet. Die DNA-Proben wurden mit  $\frac{1}{4}$  Volumen 5x DNA-Probenauftragspuffer gemischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte horizontal in einer *GNA-100 submarine unit* Gelelektrophoreseapparatur bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 400 mA für 30-60 min. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5  $\mu\text{g/ml}$  in 1x TAE-Puffer) inkubiert. Die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden ließen sich im Transilluminator unter UV-Licht (302 nm) identifizieren.

### **Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden wurden unter langwelligem UV-Licht, um den mutagenen Einfluss der Strahlung durch *cross linking* der Nukleotidbasen zu minimieren, mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem *GFX PCR DNA-Kit* (*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*) nach Angaben des Herstellers.

### **Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen wurden zur Spaltung von Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten aus PCR verwendet. Diese schneiden an spezifischen, meist 4-8 bp langen Erkennungssequenzen. Der Verdau mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den Angaben des Herstellers in den mitgelieferten Restriktionspuffern. Die Spaltung von DNA diente sowohl analytischen, als auch präparativen Zwecken. Üblicherweise wurden folgende Ansätze für eine Doppelrestriktionsspaltung pipettiert:

Für analytische Zwecke:

6  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O

2  $\mu\text{l}$  DNA aus Plasmid-Isolierung bzw. PCR (ca. 100 ng/ $\mu\text{l}$ )

1  $\mu\text{l}$  10x Restriktions-Puffer

1  $\mu\text{l}$  Restriktionsendonukleasen (10 bzw. 20 U/ $\mu\text{l}$ )

Inkubation bei 37°C für 5h

Für präparative Zwecke:

50 µl DNA aus Plasmid-Isolierung bzw. PCR

6 µl 10x Restriktions-Puffer

3-6 µl Restriktionsendonukleasen (10 bzw. 20 U/µl)

Inkubation bei 37°C für 16h

Die Spaltprodukte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, analysiert und bei präparativen Ansätzen aus dem Gel extrahiert. Mit Hilfe der Intensität der 1,6 kb Bande der DNA-Leiter kann man die Konzentration der verdauten Fragmente abschätzen, dabei entspricht die 1,6 kb Bande 25 ng, wenn 4 µl der DNA-Leiter aufgetragen wurden.

Zu den verdauten Plasmiden wurden noch 1 µl Shrimps Alkalische Phosphatase wie auch 7 µl des mitgelieferten Puffers pipettiert, um die Phosphatgruppen am 5' und 3'-Ende der linearisierten Plasmid-DNA abzuspalten. Durch Inkubation des Ansatzes bei 65°C für 30 min wurden alle Enzyme inaktiviert. Die linearisierte, dephosphorylierte Plasmide konnten nun für die Ligation eingesetzt werden.

### **Ligation von DNA-Fragmenten und Ethanolpräzipitation**

Für die Ligation wurden linearisierte, dephosphorylierte Plasmid-DNA und DNA aus einer PCR verwendet. Beide DNA-Moleküle wurden mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut. Die Ligrationsreaktion erfolgte mit 30 fmol Plasmid-DNA, 90 fmol DNA aus einer PCR und 1 U T4-DNA-Ligase in dem vom Hersteller mitgelieferten Ligase-Puffer. Der Reaktionsansatz (20 µl Gesamtvolumen) wurde bei 16°C im Wasserbad für 16 h inkubiert. Anschließend wurde der Ligrationsansatz durch Zugabe 2 µl 3M Na-Acetat pH 4,8 und 50 µl 100 % EtOH und für 3 h bei -20°C gefällt und anschließend 30 min bei 4°C mit 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen und nochmals unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Das DNA-Pellet ist in einer Suspension elektrokompetenter *E.coli* XL1-Blue aufgenommen und diese mittels Elektroporation transformiert worden.

### **Sequenzierung von Plasmid-DNA**

Die Sequenzierung aller verwendeten Expressionsplasmide erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977). Nach dem Prinzip der *Cycle-Sequencing*-Methode wurden unter Verwendung des *SequiTherm EXCEL™ II* -Kits und Sequenzierprimern (*MWG Biotech, Ebersberg*) Kettenabbruchfragmente erzeugt. Die Analyse der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente erfolgte mittels eines halbautomatischen DNA-Sequenzierers (*Li-Cor®*-Sequenziergerät Modell 4000, *MWG BIOTECH, Ebersberg*).

### 2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich DNA-Fragmente in einer zyklisch wiederholenden Abfolge von Reaktionsschritten amplifizieren (Mullis *et al.*, 1986). Dabei werden Oligonukleotide, auch Primer genannt, in das Fragment eingebaut, wodurch man neue Restriktionsschnittstellen in das DNA-Fragment einfügen kann. Deswegen wurde die PCR für alle Klonierungen eingesetzt.

#### PCR zur Klonierung von E8CPE38 in pET21-a(+)

Reaktionsansatz: 24,5 µl steriles H<sub>2</sub>O bidest.  
 5 µl Deep Vent Polymerase Puffer 10x  
 4 µl *Template*: pULI 39-1 (ca. 100 ng/µl)  
 4µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM)  
 4 µl 5'-Oligonukleotid: fwdE8CPE38 (10 pmol/µl)  
 4 µl 3'-Oligonukleotid: revPE38 (10 pmol/µl)  
 1 µl DMSO  
 2,5 µl Formamid  
 1,5 µl Deep Vent Polymerase (Zugabe nach initialen Denaturierung)

Der Reaktionsansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

#### Temperatur-Programm:

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	180 s	1
Denaturierung	96°C	45 s	} 30
Annealing	73°C	30 s	
Extension	72°C	70 s (+ 5 s pro Zyklus)	
Finale Extension	72°C	600 s	1

#### PCR zur Klonierung von miniE8CPE38 in pET21-a(+)

Reaktionsansatz: 31 µl steriles H<sub>2</sub>O bidest.  
 5 µl Deep Vent Polymerase Puffer 10x  
 1 µl *Template*: pET21-E8CPE38  
 4µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM)  
 4 µl 5'-Oligonukleotid: miniE8CPE38 (10 pmol/µl)  
 4 µl 3'-Oligonukleotid: revPE38 (10 pmol/µl)

1,5 µl Deep Vent Polymerase (Zugabe bei initialen Denaturierung)

Der Reaktionsansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

Temperatur-Programm:

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	180 s	1
Denaturierung	96°C	45 s	} 30
Annealing	67°C	30 s	
Extension	72°C	70 s (+ 5 s pro Zyklus)	
Finale Extension	72°C	600 s	1

*PCR zur Klonierung von E8CPE38 in pGEX-4T-1*

Reaktionsansatz: 31 µl steriles H<sub>2</sub>O bidest.

5 µl Deep Vent Polymerase Puffer 10x

1 µl *Template*: pET21-E8CPE38

2 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM)

4 µl 5'-Oligonukleotid: 4T1-E8CPE38fwd (10 pmol/µl)

4 µl 3'-Oligonukleotid: 4T1-E8CPE38rev (10 pmol/µl)

2 µl Formamid

1,5 µl Deep Vent Polymerase (Zugabe bei initialen Denaturierung)

Der Reaktionsansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

Temperatur-Programm:

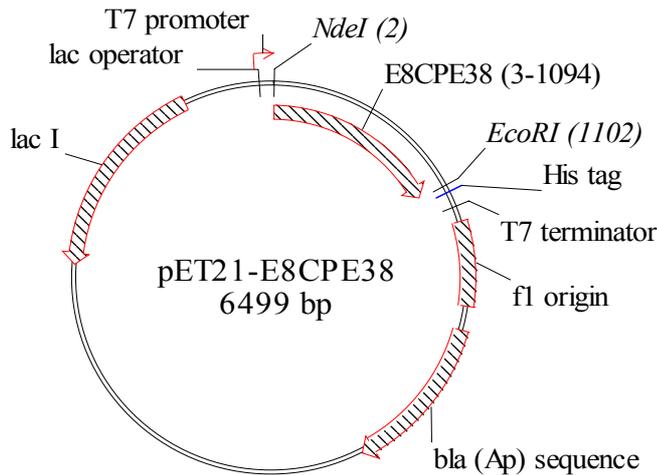
Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	180 s	1
Denaturierung	96°C	45 s	} 30
Annealing	67°C	30 s	
Extension	72°C	70 s (+ 5 s pro Zyklus)	
Finale Extension	72°C	600 s	1

## 2.2.2 Konstruktion der Expressionsvektoren

### 2.2.2.1 Vektoren zur Expression von E8CPE38

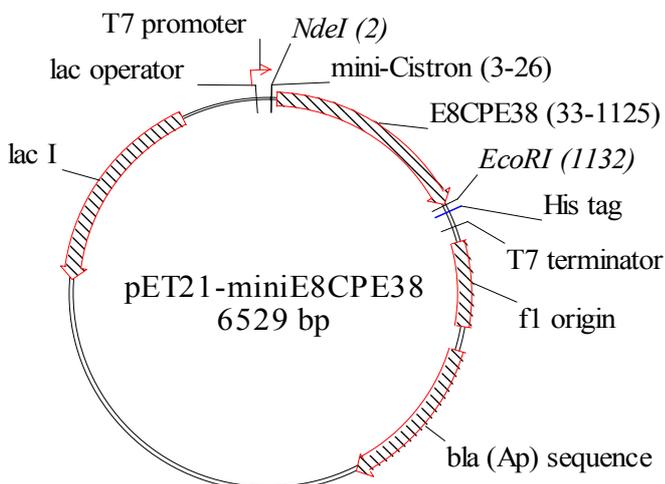
Ausgehend von dem Plasmid pULI 39-1, auf dem die V<sub>L</sub>-Domäne des B3 Antikörpers als Fusion mit dem PE38 codiert war, wurde die Gensequenz des PE38 mittels der Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986) amplifiziert. Mit Hilfe der für die Amplifikation

verwendeten Primer wurde das 5'-Ende des Gens für PE38 um eine Sequenz codierend für MGSSE8C erweitert. Außerdem wurde in diesem Schritt am 5'-Ende eine *NdeI*-Restriktionsschnittstelle und am 3'-Ende eine *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Die verwendeten Primer waren fwdE8CPE38 für das 5'-Ende und revPE38 für das 3'-Ende der für PE38 codierenden Sequenz. Nach dem Restriktionsverdau des amplifizierten Fragmentes mit *NdeI* und *EcoRI* erfolgte die Insertion in den ebenfalls mit *NdeI* und *EcoRI* geschnittenen Vektors pET-21a(+), der zur Expression der genetischen Fusion E8CPE38 verwendet wurde.



**Abb. 2.1:**  
Plasmidkarte des Expressionsvektors pET21-E8CPE38. Die Klonierung des PCR-Fragmentes erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *EcoRI*.

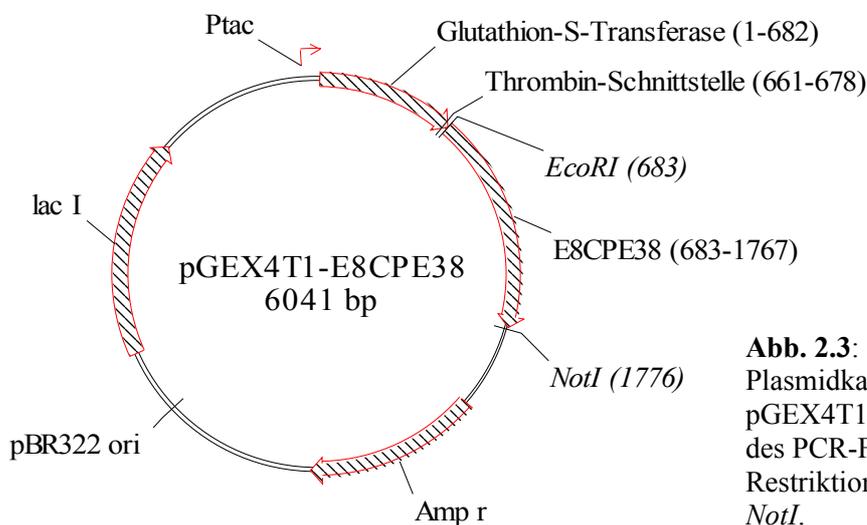
Um die Effizienz der Expression zu steigern wurde ein zweites Konstrukt zur Expression des E8CPE38 erstellt. Ausgehend vom Plasmid pET21-E8CPE38 wurde das 5'-Ende des E8CP38 durch die Verwendung des Primers miniE8CPE38 um die Sequenz 5'-GGA ATT CCA TAT GTA TCG ATT AAA TAA GGA GGA ATA AAC C-3' mittels Polymerase-Kettenreaktion verlängert. Der verwendete 3'-Primer war wiederum revPE38. Die ersten 34 Nukleotide des neuen Konstruktes codieren für eine *NdeI*-Restriktionsschnittstelle und für ein acht Triplet langes mini-Cistron mit einer Sequenz, die komplementär an die 16S rRNA bindet (Schoner *et al.*, 1990). Mit dem Stopp-Codon TAA endet das mini-Cistron. Das Triplet ACC dient als *Spacer* zwischen dem mini-Cistron und der Sequenz E8CPE38. Die Klonierung des miniE8CPE38 erfolgte wie im letzten Abschnitt beschrieben in den pET21-a(+) Vektor.



**Abb. 2.2:**  
Plasmidkarte des Expressionsvektors pET21-miniE8CPE38. Die Klonierung des PCR-Fragmentes erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *EcoRI*.

### 2.2.2.2 Vektor zur Expression des GST-E8CPE38 Genfusion

In einem dritten Konstrukt wurde eine genetische Fusion bestehend aus der Sequenz codierend für die Glutathion-S-Transferase (GST) und dem E8CPE38 erstellt. Neben der erhofften Steigerung der Expression sollte das produzierte Fusionsprotein GST-E<sub>8</sub>C-PE38 mittels Affinitätschromatographie gut zu reinigen sein. Ausgehend vom Plasmid pET21-E8CPE38 wurde mittels PCR das Gen E8CPE38 amplifiziert. Die verwendeten Primer 4T1-E8CPE38fwd (5'-Primer) und 4T1-E8CPE38rev (3'-Primer) codierten für die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* bzw. *NotI*. Nach dem Restriktionsverdau des amplifizierten Fragmentes mit *EcoRI* und *NotI* erfolgte die Insertion in den ebenfalls mit *EcoRI* und *NotI* geschnittenen Vektors pGEX-4T-1, der zur Expression des Fusionskonstruktes GST-E8CPE38 verwendet wurde.



**Abb. 2.3:** Plasmidkarte des Expressionsvektors pGEX4T1-E8CPE38. Die Klonierung des PCR-Fragmentes erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *NotI*.

### 2.2.3 Stammhaltung und Kultivierung von Mikroorganismen

#### 2.2.3.1 Stammhaltung und Anzucht von Mikroorganismen

Die Stammhaltung von Mikroorganismen erfolgte einmal auf LB-Agar-Platten bei 4°C bis zu ca. 8 Wochen. Für langfristige Lagerung wurden Mikroorganismen als Glycerinkulturen bei -80°C aufbewahrt. Hierzu wurden 500 µl einer Übernachtskultur mit 300 µl sterilem 50 % (v/v) Glycerin, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl pH 8,0 gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Anzucht von Mikroorganismen erfolgte entweder in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium oder in 100 ml Schüttelkolben mit 25 ml LB-Medium auf einem Horizontalschüttler bei 130 rpm und 37°C über Nacht. Je nach verwendetem *E.coli* Stamm und Plasmid wurden dem LB-Medium die entsprechenden Antibiotika zugesetzt. Die Flüssigkulturen wurden entweder mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte oder direkt aus einer Glycerinkultur angeimpft.

### 2.2.3.2 Transformation von Mikroorganismen

#### Herstellung von kompetenten *E.coli* für Elektroporation

200 ml LB-Medium wurden mit 2 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 angezogen. Anschließend wurde die Kultur 30 min auf Eis inkubiert. Jeder der folgenden Arbeitsschritte erfolgte auf Eis oder bei 4°C in der Zentrifuge. Danach wurden die Zellen für 15 min bei 5000 rpm in der Sorvall RC 5C Plus mit einem GS-3 Rotor zentrifugiert, das Zellpellet in 200 ml sterilem Wasser mit 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und erneut 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wurde zweimal wiederholt, wobei das Volumen auf 100 ml und letztlich 20 ml reduziert wurde. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 0,5 ml sterilem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert, in Aliquots á 40 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

#### Herstellung kompetenter *E.coli* nach der TSS-Methode (Chung *et al.*, 1989)

100 ml LB-Medium wurden mit einer Übernachtskultur 1 %ig angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4 angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C 15 min lang mit 5000 rpm zentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus mit GS3 Rotor). Das auf Eis stehende Zellpellet wurde in 10 ml eiskaltem, sterilfiltriertem Puffer (10 % (w/v) PEG8000, 5 % DMSO, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,5) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension zu 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

#### Transformation von *E.coli* durch Elektroporation

Ein Aliquot elektrokompenter *E.coli* wurde auf Eis aufgetaut mit 1 µl Plasmid-DNA (100 ng/µl) gemischt und in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Durch Natriumacetat und Ethanol präzipitierte Plasmid-DNA wurde in der Suspension von elektrokompenten *E.coli* gelöst und in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert.

Die Elektroporation erfolgte mit folgenden Einstellungen am Gene Pulser II (*BioRad, München*):

Spannung: 2,5 kV

Widerstand: 200 Ω

Kapazität: 25 µF

Sofort nach dem Spannungspuls wurden die *E.coli* in 500 µl 37°C warmen SOC-Medium aufgenommen und 1h bei 37°C geschüttelt. Danach erfolgte das Ausplattieren der Bakterien-suspension auf LB-Agar-Platten. Um auf transformierte *E.coli* zu selektieren, war den LB-

Agar-Platten die entsprechenden Antibiotika zugesetzt worden. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **Transformation von TSS-kompetenten *E.coli***

Ein Aliquot TSS-kompetenter *E.coli* wurde 10-15 min auf Eis aufgetaut, 5 µl Plasmid-DNA (100 ng/µl) zupipettiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µl LB-Medium zugegeben und der gesamte Ansatz bei 37°C 30 min lang geschüttelt. Das Ausplattieren der Bakteriensuspension erfolgte auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika.

### **2.2.3.3 Expressionstests**

Expressionstests wurden in 100 ml Schüttelkolben mit 25 ml LB-Medium, supplementiert mit den entsprechenden Antibiotika, durchgeführt. Das Medium wurde mit einer Übernachtskultur 2 %ig angeimpft. Die Flüssigkultur wurde bei 37°C mit 130 rpm geschüttelt. Jede Stunde wurde die optische Dichte (OD<sub>600nm</sub>) der Kultur bestimmt. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8 durch Zugabe von 25 µl 1M IPTG. Direkt vor der Induktion bzw. 2h, 4h, 20h nach der Induktion wurden 2 ml Proben aus der Kultur entnommen, zentrifugiert und das Zellpellet mit 400 µl 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,4 resuspendiert. Mit Hilfe von Glasperlen und der Schwingmühle HM 2000 (*Retsch, Haan*) wurden die *E.coli* aufgeschlossen (15 min bei 4°C). Durch anschließende Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C für 10 min wurden die unlöslichen Bestandteile des Zellextraktes von den löslichen getrennt. Die Analyse der Expressionsproben erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot. Dazu wurden jeweils 10 µg Protein pro Spur aus der löslichen bzw. unlöslichen Fraktion aufgetragen.

### **2.2.3.4 Expression von GST-E8CPE38 in BL21**

Die Produktion des Fusionsproteins GST-E<sub>8</sub>C-PE38 erfolgte in BL21 pGEX4T1-E8CPE38. Dazu wurde 25 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) in einem 100 ml Schüttelkolben direkt aus einer Glycerinkultur angeimpft. Diese erste Vorkultur wurde bei 37°C und 165 rpm für ca. 8 h geschüttelt. Anschließend wurde eine 2. Vorkultur, 200 ml LB-Medium (200 µg/ml Ampicillin) in einem 1 l Schüttelkolben, mit 1 ml aus der 1. Vorkultur überimpft. Die Inkubation der 2. Vorkultur erfolgte über Nacht im Horizontalschüttler bei 37°C und 165 rpm. Die Hauptkultur, 4 l LB-Medium (200 µg/ml Ampicillin) verteilt auf vier 5 l Schüttelkolben, wurde 2 %ig mit der 2. Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 165 rpm geschüttelt. Bei einer OD<sub>600nm</sub> von 1 wurde in jeden Kolben nochmals 3 ml Ampicillin-Stammlösung zugegeben.

Anschließend erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von je 1 ml 1M IPTG pro Kolben. Nach der Induktion wurden jede Stunde 2 ml Probe aus der Kultur entnommen und wiederum 2 ml Ampicillin-Stammlösung in jeden Kolben pipettiert. Die *E.coli* wurden 3h nach der Induktion durch Zentrifugation (8000 rpm, 20 min, 4°C, Rotor JLA 8.1000, *Beckman*) geerntet und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

### 2.2.3.5 Bioreaktorkultivierung

Die Bioreaktorkultivierungen wurden in einem Biostat ED (Arbeitsvolumen: 10 l; *Braun, Melsungen*) mit digitalem Mess- und Regelsystem DCU und dem Prozessleitsystem MCF5win durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte dabei nach dem *Fed-Batch*-Verfahren auf einem Hefeextrakt-Vollmedium (Zusammensetzung: siehe Kapitel 2.1.6). Das Medium wurde mit 400 ml einer Übernachtskultur, gewachsen in 50 g/l Hefeextrakt, 2 % (w/v) Glycerin, 2,76 mM MgSO<sub>4</sub>, angeimpft. Die Kultivierung wurde bei 35°C durchgeführt. Die Regulierung des pH-Wert erfolgte mit 10 N NaOH-Lösung und 10 % (v/v) Phosphorsäure. Als Antischaummittel wurde eine 50 % (v/v) Polypropylenglykollösung (PLURIOL<sup>®</sup> P2000, *BASF, Ludwigshafen*) verwendet. Der pO<sub>2</sub>-Wert wurde mittels der Rührergeschwindigkeit, der Luft- und der Sauerstoffzufuhr während der gesamten Fermentation über 30 % Sättigung gehalten. Dem Medium wurde beim Erreichen von OD<sub>600nm</sub> = 10, 20, 30 usw. jeweils 10 ml 1M MgSO<sub>4</sub> zugesetzt. Ab einer OD<sub>600nm</sub> von 20 erfolgte die kontinuierliche Zugabe von 1 l Feedinglösung pro Stunde. Bei Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von etwa 50 wurde durch Zugabe von 10 ml 1 M IPTG die Expression induziert. Direkt vor der Induktion wurden 20 ml Ampicillin-Stammlösung dem Medium zugesetzt. Die *E.coli* wurden 2h nach der Induktion durch Zentrifugation (8000 rpm, 20 min, 4°C, Rotor JLA 8.1000, *Beckman*) geerntet und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

Nach der hier beschriebenen Methode wurden BL21(DE3) pB3(V<sub>H</sub>)R<sub>8</sub>CP und BL21(DE3) pB3(V<sub>L</sub>) zur Produktion der V<sub>H</sub>- bzw. V<sub>L</sub>-Domäne des B3-Antikörpers kultiviert.

## 2.2.4. Proteinchemische Methoden

### 2.2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE werden Proteine in denaturierter Form in einem Acrylamidgel im elektrischen Feld aufgetrennt (Laemmli, 1970). Das anionische Detergenz SDS bindet an die durch Hitzebehandlung denaturierten Proteine. Die stark negative Ladung des SDS nivelliert alle Ladungen der Proteine, sodass in der Regel alle Proteine das gleiche Ladungs-Masse-Verhältnis aufweisen. Somit ist die elektrophoretische Beweglichkeit nur noch von der

molekularen Masse der Proteine abhängig (Reynolds und Tanford, 1970). Es wurden selbstgefertigte Gele mit unterschiedlichen Acrylamidgehalt verwendet. Das Trenngel wurde mit einem Sammelgel überschichtet.

#### Zusammensetzung für zwei SDS-Polyacrylamidgele

##### Trenngele:

	8 %	10 %	12 %	15 %
Acrylamid/Bisacrylamid (30 % / 0,8 %)	2,7 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml
4x Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
H <sub>2</sub> O bidest	4,8 ml	4,2 ml	3,5 ml	2,5 ml
APS-Lösung (10 % (w/v) in Wasser)	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl
TEMED	14 µl	14 µl	14 µl	14 µl

##### Sammelgele:

	5 %	6 %
Acrylamid/Bisacrylamid (30% / 0,8%)	1,0 ml	1,2 ml
4x Sammelgelpuffer	1,5 ml	1,5 ml
H <sub>2</sub> O bidest	3,5 ml	3,3 ml
APS-Lösung (10 % (w/v) in Wasser)	40 µl	40 µl
TEMED	8 µl	8 µl

Die Proben wurden mit ¼ Vol. 5x SDS-Probenauftragspuffer gemischt und 5 min bei 100°C inkubiert. Für Proben, die unter reduzierenden Bedingungen im Acrylamidgel getrennt werden sollten, enthielt der 5x Probenauftragspuffer zusätzlich noch 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol. Hingegen wurden Proben, die unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert werden sollten, zuvor mit 0,1 Vol 400 mM Jodacetamid in 100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA pH 7,5 für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch werden alle freien Cystein-Reste, wie sie beispielsweise durch ein *Redox-Shuffling-System* eingetragen werden, durch Carboxyamido-methylierung blockiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im elektrischen Feld bei 120V und 30 mA. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine nach der Methode von Fairbanks *et al.* (1971) mit Coomassie Brilliant R250 detektiert. Als Molekularmassenstandards dienten LMW und HMW *Calibration Kit for SDS electrophoresis* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Einige SDS-Gele wurden außerdem noch mit Hilfe des Programms Phoretix 1D Quantifier Version 4.01 (NonLinear Dynamics Ltd.) densitometrisch ausgewertet.

#### 2.2.4.2 Western Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss auf eine Membran übertragen (Towbin, 1979). Mittels einer Semidry-Blotting-Apparatur (Hoefer SemiPhor, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) erfolgte nach der Methode von Kyhse-Andersen (1984) der Transfer der Proteine aus dem Acrylamidgel auf die Membran. Der Blot erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von  $2 \text{ mA/cm}^2$  Membranfläche und 100 V für 1h. Für die immunologische Detektion wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Biotrace<sup>TM</sup> NC Transfermembran aus reiner Nitrocellulose, Porengröße:  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ , Pall Gelman, Dreieich) übertragen. Der Transfer auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (Biotrace<sup>TM</sup> PVDF Transfermembran, Porengröße:  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ , Pall Gelman, Dreieich) erfolgte für die N-terminale Sequenzierung von Proteinen.

##### *Blot für Immunodetektion*

Für den Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran wurde ein Puffer folgender Zusammensetzung verwendet: 20 mM Tris/HCl, pH 8,3, 150 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,02 % (w/v) SDS. Mit diesem Puffer wurden 6 Lagen Whatman 3 MM-Papier und die Nitrocellulose Membran getränkt. Anschließend erfolgte der Aufbau des *Blotsandwich*, beginnend mit 3 Lagen Whatman Papier, der Nitrocellulosemembran, darauf das SDS-Polyacrylamidgel, abschließend nochmals 3 Lagen Whatman-Papier. Nach der Übertragung der Proteine in der Blotapparatur wurden die Proteine auf der Membran mit einer 2 % (w/v) Ponceau S-Lösung (mit 3 % (w/v) TCA) gefärbt, sodass man die Molekularmassenstandards mit einem Kugelschreiber markieren konnte. Anschließend wurde die Membran in TBS-Milchpuffer (5 % Magermilchpulver in 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 154 mM NaCl) bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem 1. Antikörper, verdünnt (1:20000 für Anti-PE-IgG; 1:5000 für Anti-GST-IgG) in TBS-Milchpuffer, bei Raumtemperatur für 1 h. Danach wurde die Membran 3x kurz mit Wasser und 3 min in TBS gewaschen. Nun inkubierte man die Membran mit dem 2. Antikörper (Anti-Rabbit-Peroxidase Konjugat) 1:2000 verdünnt in TBS-Milchpuffer bei Raumtemperatur für 1 h, danach erfolgte die Wiederholung der ersten Waschprozedur. Mit Hilfe einer Luminol-Peroxidase-Reaktion mit dem ECL-Detektionssystem (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde das E<sub>8</sub>C-PE38 bzw. das GST auf der Membran nachgewiesen. Der Retina XBD Röntgenfilm (INTAS, Göttingen) wurde für 30 sec bis 5 min mit der Membran exponiert und anschließend entwickelt.

### *Blot für N-terminale Sequenzierung*

Diese Methode ist eine Vorarbeit für die N-terminale Sequenzierung. Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese wurde in einem ersten Schritt 5 min in 100 % Methanol inkubiert. Anschließend erfolgte für 5 min die Inkubation der Membran und der 6 Lagen Whatman-Papier im Transferpuffer (50 mM Borsäure-NaOH, pH 9,0, 20 % (v/v) Methanol). Der Aufbau des *Blotsandwich* erfolgte wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese zum Färben der Proteinbanden für ca. 1 min in 10 % (v/v) Methanol, 1 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Brillant Blau R250 inkubiert und anschließend mit 30 % (v/v) Methanol, 10 % Essigsäure entfärbt. Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad p. A..

### **2.2.4.3 Herstellung des Rohextraktes zur Isolierung von löslichem Protein**

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis bzw. im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

#### *Isolierung von E<sub>8</sub>C-PE38*

8 g Biofeuchtmasse (BL21 pGEX4T1-E8CPE38) wurden in 40 ml 20 mM Tris-HCl pH 7,3, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 1 mM EDTA mit Hilfe des Ultra-Turrax T25 (*Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen*) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Hochdruckdispersion mittels Gaulin MicronLab 40 (*APV, Lübeck*) bei einem Druck von 600 bar. Es wurden 4 Passagen durchgeführt. Anschließend wurden der Suspension 3 mM MgCl<sub>2</sub> zugegeben und der pH-Wert auf 8 eingestellt. Durch Zugabe von 10 µl Benzonase (250 U/µl) erfolgte der Verdau der DNA bei Raumtemperatur für 30 min. Danach wurde die Suspension mit 5 mM EDTA versetzt. Durch Zentrifugation im Rotor JA-30.50 (*Beckman, München*) bei 20000 rpm und 4°C für 1 h wurden die unlöslichen Zellbestandteile abgetrennt. Der Überstand, der sogenannte Rohextrakt, wurde nach Filtration durch einen Spritzenvorsatzfilter mit 0,45 µM Membran (*Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig*) auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen (vgl. Abschnitt 2.4.4.9).

#### *Isolierung von Gal-CE<sub>8</sub>P und toxGal-CE<sub>8</sub>P*

Die Zellen wurden in resuspendierter Form tiefgefroren auf Trockeneis von der Arbeitsgruppe Nediljko Budisa aus Martinsried erhalten. Nach dem Auftauen der Zellen wurden der Suspension (ca. 40 ml) 3 Tabletten Protease-Inhibitor-Mix (*Roche Diagnostics, Penzberg*) zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte durch Hochdruckdispersion mittels Gaulin MicronLab

40 (APV, Lübeck) bei einem Druck von 600 bar. Es wurden 3 Passagen durchgeführt. Anschließend wurden der Suspension 3 mM MgCl<sub>2</sub> zugegeben und der pH-Wert auf 8 eingestellt. Der DNA-Verdau erfolgte bei Raumtemperatur für 30 min durch Zugabe von 50 µl Benzonase. Anschließend wurden durch Zentrifugation im Rotor JA-30.50 (Beckman, München) bei 20000 rpm und 4°C für 1 h die unlöslichen Zellbestandteile abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine Ni-NTA-Sepharose-Säule (20 ml) aufgetragen (vgl. Abschnitt 2.4.4.9)

#### 2.2.4.4 Isolierung von *inclusion bodies*

Die Isolierung von *inclusion bodies* erfolgte nach Rudolph *et al.* (1997). 120 g Biofeuchtmasse (BL21(DE3) pB3(V<sub>H</sub>)R<sub>8</sub>CP bzw. pB3(V<sub>L</sub>)) wurden in 600 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA mit Hilfe des Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen) resuspendiert, 3 mg Lysozym pro Gramm Zellen hinzugegeben und bei 4°C für 1 h inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss durch Hochdruckdispersion mittels Gaulin Lab 60 (APV, Lübeck) bei einem Druck von 700 bar. Es wurden 7 Passagen durchgeführt. Danach erfolgte die Zugabe von 3 mM MgCl<sub>2</sub>, sowie das Einstellen des pH-Wertes auf 8. Nach Zugabe von 50 µl Benzonase wurde die Suspension 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im folgenden Schritt wurde die Suspension mit ½ Volumen 1,5 M NaCl, 60 mM EDTA pH 7,0, 6 % (v/v) Triton X-100 gemischt und für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte durch Zentrifugation für 30 min bei 38400x g und 4°C die Trennung der löslichen Fraktion der Suspension von den sedimentierten *inclusion bodies*. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit Puffer gewaschen. Dazu wurde die unlösliche Fraktion in 200 ml 0,67 M Tris-HCl pH 7,0, 33 mM EDTA, 0,5 M NaCl, 2 % (v/v) Triton X-100 mittels Ultra-Turrax T25 resuspendiert und anschließend zentrifugiert (30 min bei 38400x g und 4°C). Danach wurde das Pellet sechsmal mit 200 ml 0,1 M Tris pH 7,0, 20 mM EDTA gewaschen (resuspendieren und zentrifugieren wie in den vorherigen Arbeitsschritten). Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet (*inclusion bodies*) aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 2.2.4.5 Solubilisierung von *inclusion bodies*

Diese Methode erfolgte nach Rudolph *et al.* (1997). 6 g *inclusion bodies* wurden mittels Ultra-Turrax T25 in 60 ml 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM DTT, pH 8 gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte das Absenken des pH-Wertes auf 2,5 durch tropfenweise Zugabe von 1 N HCl-Lösung. Durch Zentrifugation für 1 h bei 75600x g und 20°C wurden alle unlöslichen Bestandteile von den

solubilisierten *inclusion bodies* abgetrennt. Im Anschluss wurden die gelösten *inclusion bodies* gegen 1 l 4M Guanidiniumhydrochlorid pH 2,0 bei Raumtemperatur für 3 h dialysiert. Es folgte ein zweiter Dialyseschritt über Nacht bei 4°C gegen 2 l 4M Guanidiniumhydrochlorid, pH 3,0. Nach der Dialyse wurden die solubilisierten *inclusion bodies* nochmals für 1 h bei 108800x g und 4°C zentrifugiert, um präzipitierte Proteine und DNA abzutrennen. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (vgl. Abschnitt 2.4.4.6). Die solubilisierten *inclusion bodies* wurden aliquotiert und bei –80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 2.2.4.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinkonzentrationen von solubilisierten *inclusion bodies* wurden nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Dafür wurde das colorimetrische Nachweisverfahren der Firma *BioRad* nach deren Angaben verwendet. Als Referenzproteine wurde Rinderserumalbumin (Fraktion V) in 4 M Guanidiniumhydrochlorid, pH 3,0 gelöst und in Konzentrationen von 100 bis 1000 µg/ml eingesetzt.

#### 2.2.4.7 Renaturierung des dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP

Für die Renaturierung des disulfidverbrückten Fv-Fragmentes des B3-Antikörpers wurden die solubilisierten *inclusion bodies* der leichten und der schweren Kette der variablen Domäne eingesetzt. Als Renaturierungspuffer wurden 5 l 500 mM L-Arginin, 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 1 mM EDTA, 1 mM GSH, 1 mM GSSG verwendet. Vor der Zugabe des Redoxsystems (GSH/GSSG) wurde dem Renaturierungspuffer durch Entgasen der Sauerstoff entzogen. Die solubilisierten *inclusion bodies* wurden in einem molaren Verhältnis  $V_H:V_L=5:1$  gemischt und unter schnellem Rühren dem auf 15°C vortemperierten Renaturierungspuffer langsam hinzu-gegeben. Die Proteinkonzentration von  $V_H+V_L$  betrug im Renaturierungsansatz maximal 30 µg/ml. Die Renaturierung erfolgte über 5 Tage bei 15°C. In einem abschließenden Oxidationsschritt wurde dem Ansatz 5 mM GSSG zugegeben. Nach der Renaturierung erfolgte durch Zentrifugation (1 h bei 18480x g und 4°C) das Abtrennen der präzipitierten Proteine. Der lösliche Teil des Renaturierungsansatzes wurde mittels Ultrafiltration aufkonzentriert (vgl. Abschnitt 2.4.4.8). Die präzipitierten Proteine wurden in 50 ml 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 50 mM DTT, pH 8 gelöst und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung unter schnellem Rühren dem entgasten Renaturierungspuffer (500 mM L-Arginin, 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 1 mM EDTA, 1,5 mM GSSG) zugegeben. Die zweite Renaturierung erfolgte wie oben beschrieben

über 5 Tage und endete mit der Zugabe von 5 mM GSSG, anschließendem Zentrifugieren und Aufkonzentrieren.

#### **2.2.4.8 Konzentrierung von Proteinlösungen**

Zur Aufkonzentrierung von Proteinlösungen (Volumen größer 500 ml) mittels Ultrafiltration wurde das Minisette<sup>TM</sup>-Tangentialflusssystem ProVario3 (*Pall-Gelman, Dreieich*) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Zum Einsatz kam eine Omega-Membrankassette (modifizierte Polyethersulfon-Membran für geringe Proteinbindung, *open channel*-Konfiguration). Der *cut off* dieser Membran lag bei 8 kD, die effektive Filterfläche bei 0,07 m<sup>2</sup>. Proteinlösungen mit Volumina von 2 ml bis 15 ml wurden mit Ultrafree®-15 bzw. Ultrafree®-4 Zentrifugalkonzentratoren (*cut off* 5 kD) (*Millipore, Schwalbach*) nach den Angaben des Herstellers aufkonzentriert.

#### **2.2.4.9 Chromatographische Reinigung von Proteinen**

##### **Chromatographische Methoden**

Sämtliche chromatographischen Reinigungen wurden bei 4°C durchgeführt. Chromatographische Analytik (*reversed Phase* Chromatographie, Analytische Gelfiltration) von Proteinen erfolgte auch bei Raumtemperatur.

##### **Ionenaustauschchromatographie**

Proteine werden bei dieser Form der Chromatographie aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrostatischen Wechselwirkungen mit einer entgegengesetzt geladenen Matrix voneinander getrennt. Wie stark ein Protein an einen Ionentauscher gebunden wird, hängt von mehreren Faktoren ab:

- pH-Wert und Ionenstärke des Puffers
- isoelektrischer Punkt des Proteins
- Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche
- Art des Ionentauscher-Materials

An der Matrix gebundene Proteine können entweder durch Änderung des pH-Wertes oder durch Erhöhung der Ionenstärke der mobilen Phase eluiert werden.

##### **Gelfiltrationschromatographie**

Die Gelfiltration dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe und Form. Dazu verwendet man eine Säule mit einer Gelmatrix, die mit hydrophilen Poren durchsetzt ist. Große Moleküle vermögen eine solche Säule schneller zu durchwandern, da sie schlechter in die Poren der Gelmatrix eindringen können als kleinere Moleküle, welche effektiv in einem

größeren Volumen verteilt sind und daher langsamer durch die Matrix gelangen. Je kleiner ein Molekül ist, desto größer ist sein Elutionsvolumen. Niedermolekulare Substanz, wie z.B. GSH wurden mit Hilfe kleiner Gelfiltrationssäulen (PD-10, *Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*) von Proteinen abgetrennt. Neben dem präparativen Auftrennen zur Reinigung von Proteinen wurde die Gelfiltration auch für analytische Zwecke genutzt. Durch Vergleich des Elutionsvolumens mit dem von Molekülen bekannter Größe lässt sich die Größe bzw. relative Molekülmasse abschätzen.

### **Affinitätschromatographie**

Die Affinitätschromatographie nutzt im Gegensatz zu anderen chromatographischen Verfahren der Proteintrennung die spezifische und hochaffine Wechselwirkung zwischen Biomolekülen. Grundlage der Selektivität affinitätschromatographischer Trennungen ist die natürliche Spezifität immobilisierter Liganden, komplementäre Molekülstrukturen reversibel zu binden. Diese Liganden, meist Inhibitoren, Cofaktoren oder Substratanaloga, sind kovalent an das chromatographische Trägermaterial gekoppelt. Der Ligand ist dabei in der Lage, das gesuchte Protein aus einem komplexen Gemisch heraus selektiv zu binden. Nach dem Herauswaschen von nichtbindenden Proteinen mit Pufferlösung kann das gebundene Protein kompetitiv durch Zugabe des Liganden in löslicher Form eluiert werden. Eine spezielle Form der Affinitätschromatographie ist die Verwendung eines Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) Säulenmaterials, bei dem das Nickel-Atom vierfach komplexiert ist. Dieses Material ist in der Lage, mit einem *His-tag* fusionierte Proteine unter Ausbildung eines Metall-Chelat-Komplexes an die Matrix zu binden. Die Elution des Proteins erfolgt durch Zugabe des Kompetitors Imidazol oder durch Absenken des pH-Wertes.

### **Reversed Phase Chromatographie**

Das Trennprinzip der *reversed phase* Chromatographie beruht auf den hydrophoben Wechselwirkungen des Proteins mit der stationären und mobilen Phase. Die stationäre Phase sind hydrophobe Liganden, meist aliphatische Kohlenwasserstoffketten, die an das Trägermaterial kovalent gekoppelt sind. Die mobile Phase ist ein Gemisch aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel, meist Acetonitril. Das Protein, anfangs in wässriger Lösung, wird von den Liganden der Matrix aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen gebunden. Zur Elution des Proteins von der Matrix wird kontinuierlich der Anteil des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase erhöht. Die *reversed phase* Chromatographie wurde benutzt, um Proteinproben für N-terminale Sequenzierung und Massenspektroskopie zu entsalzen.

### Reinigung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP

Das Fv-Fragment des B3 Antikörpers wurde nach Renaturierung und Konzentrierung von 5000 ml auf ca. 70 ml zweimal gegen 2 l 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA über Nacht dialysiert. Anschließend wurden präzipitierte Proteine mittels Zentrifugation für 1 h bei 108800x g und 4°C abgetrennt. Die Reinigung erfolgte an einem starkem Kationentauscher (Poros HS, *PerSeptive Biosystems, Wiesbaden*). Die Säule wurde in 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA äquilibriert und mit dem Überstand der Zentrifugation bei einer Flussrate von 4 ml/min beladen. Nachfolgend wurde mit 30 Säulenvolumen desselben Puffers bei gleicher Flussrate gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte in einem linearen Gradienten von 200 – 2000 mM NaCl über 60 Säulenvolumen. Das Antikörperfragment eluierte bei einer Leitfähigkeit von 40 mS/cm. Es wurden 3 ml Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Der Durchlauf wurde unter denselben Bedingungen rechromatographiert. Alle Fraktionen mit dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP wurden vereinigt, mit 3 Volumen 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA gemischt und erneut aufgetragen. Durch Elution in nur einem Säulenvolumen erfolgte eine Konzentrierung des Proteins. Im Anschluss wurden verbliebene Verunreinigungen durch Gelfiltration in 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA an einer HiLoad 16/60 Superdex 75 pg Säule (*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*) bei einer Flussrate von 1 ml/min abgetrennt.

Das gereinigte dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP wurde bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

### Reinigung von E<sub>8</sub>C-PE38

Eine Säule mit 20 ml Glutathion-Sepharose 4B (*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*) wurde in Puffer A (20 mM Tris-HCl pH 7,3, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM EDTA) äquilibriert und mit dem Rohextrakt (siehe Abschnitt 2.4.4.3) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min beladen. Nachfolgend wurde die Säule mit Puffer A bei einer Flussrate von 1 ml/min gewaschen. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 2 Säulenvolumen Puffer A, 80 mM MgCl<sub>2</sub>. Danach wurde Thrombin (300 *NIH Units*), gelöst in 30 ml Puffer A, 80 mM MgCl<sub>2</sub>, auf die Säule gepumpt. Der Thrombin-Verdau erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Elution des abgespaltenen E<sub>8</sub>C-PE38 erfolgte im selben Puffer. Zur Erhöhung der Ausbeute erfolgte ein weiterer Thrombin-Verdau über Nacht mit anschließender Elution. Das Thrombin wurde aus der eluierten E<sub>8</sub>C-PE38-Fraktion mittels HiTrap Benzamidin Fast Flow (*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*) entfernt. Diese wurde zuvor in Puffer A, 80 mM MgCl<sub>2</sub> äquilibriert. Durch Erhöhen der Salzkonzentration auf 1 M NaCl konnte unspezifisch gebundenes E<sub>8</sub>C-PE38 von der Benzamidin-Säule eluiert werden, wohingegen Thrombin

weiter auf der Säule verblieb. Abschließend erfolgte eine Reinigung über einen starken Anionentauscher (Poros HQ, PerSeptive Biosystems, Wiesbaden). Die Säule wurde in 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM EDTA äquibriert und anschließend mit den E<sub>8</sub>C-PE38 Fraktionen, die zuvor mit 5 Volumen des Äquibrierungspuffers verdünnt wurden, bei einer Flussrate von 4 ml/min beladen. Die Säule wurde mit 30 Säulenvolumen Äquibrierungspuffers gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte in einem linearen Gradienten von 0 bis 2 M NaCl über 100 Säulenvolumen. Das E<sub>8</sub>C-PE38 eluierte bei einer Leitfähigkeit von 30 mS/cm. Es wurden 3 ml Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Alle Fraktionen mit E<sub>8</sub>C-PE38 wurden vereinigt, mit 3 Volumen 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM EDTA gemischt, erneut aufgetragen und mit 30 Säulenvolumen gewaschen. Das Toxin wurde in einem linearen Gradienten von 0 bis 2 M NaCl über 3 Säulenvolumen konzentriert von der Säule eluiert, anschließend nochmals gegen 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM EDTA pH 7,4 dialysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **Reinigung von Gal-CE<sub>8</sub>P und toxGal-CE<sub>8</sub>P**

Sowohl Gal-CE<sub>8</sub>P als auch toxGal-CE<sub>8</sub>P besitzen an ihren N-Termini einen *His-tag* und wurden nach derselben Methode gereinigt. Die Ni-NTA-Sepharose Säule (20 ml) wurde in 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Imidazol pH 8,0 äquibriert und anschließend mit dem Rohextrakt (vgl. Abschnitt 2.4.4.3) bei einer Flussrate von 1 ml/min beladen. Nachfolgend wurde die Säule mit 3 Säulenvolumen 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM Imidazol pH 7,0 gewaschen. Die Elution der β-Gal erfolgte in einem linearen Gradienten von 20 –1000 mM Imidazol über 3 Säulenvolumen. Es wurden 4 ml Fraktionen gesammelt. Die Elutionsfraktionen wurden mit 5 mM EDTA versetzt und mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Alle β-Gal Fraktionen wurden vereinigt, mit 3 Volumen Puffer A (25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA pH 8,0) verdünnt und über einen starken Anionentauscher gereinigt. Dazu wurde die Poros HQ in Puffer A äquibriert, mit den verdünnten β-Gal Fraktionen bei einer Flussrate von 4 ml/min beladen und mit 30 Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte in einem linearen Gradienten von 0 bis 900 mM NaCl über 50 Säulenvolumen. Die β-Gal eluierte bei einer Leitfähigkeit von 42 mS/cm. Es wurden 4 ml Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Alle Fraktionen mit β-Gal wurden vereinigt, mit 3 Vol Puffer A gemischt, erneut aufgetragen und mit 30 Säulenvolumen gewaschen. Die gereinigte β-Gal wurde in einem linearen Gradienten von 0 bis 3 M NaCl über 1 Säulenvolumen konzentriert von der Säule eluiert, anschließend nochmals gegen 25 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7,4 dialysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 2.2.4.10 Bestimmung freier SH-Gruppen

Freie SH-Gruppen in Proteinen oder Peptiden können nach der Methode von Ellman (1959) bestimmt werden. Das Reagenz DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)) reagiert bei pH-Werten über 8 quantitativ mit zugänglichen Thiolgruppen. Dabei wird 3-Carboxy-4-nitrothiophenolat freigesetzt. Dieser Farbstoff kann bei einer Wellenlänge von 410 nm photometrisch bestimmt werden. Aus der ermittelten Absorption lässt sich mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei pH 8) die Konzentration des Farbstoffs und somit die der freien SH-Gruppen bestimmen. Unter nativen Bedingungen erfolgte die Bestimmung in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA pH 8,0, unter denaturierenden Bedingungen in 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0. Dazu wurden 1 ml Proteinlösung 30  $\mu\text{l}$  DTNB-Lösung (4 mg/ml, gelöst im gleichen Puffer wie Protein) zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Extinktion bei 410 nm, woraus die molare Konzentration an freien Thiolgruppen berechnet wurde.

#### 2.2.4.11 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Mit dieser Methode wurde der Farbstoff TexasRed® C2 Maleiimid (*Molecular Probes, Netherlands*) mit dem freien Cystein des dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP kovalent gekoppelt. Dazu wurde das freie terminale Cystein des Antikörperfragmentes in 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 2 mM GSH pH 8,0 reduziert. Anschließend erfolgte ein Absenken des pH-Wertes auf 5,5 durch tropfenweise Zugabe von 10 % (v/v) Phosphorsäure. Nachfolgend wurde der reduzierte dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP gegen zweimal 1 l 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA pH 5,0 über Nacht bei 4°C dialysiert. Nach der Dialyse wurde der pH-Wert der Protein-Lösung wieder auf 7,4 erhöht. Im nächsten Schritt wurden 20  $\mu\text{l}$  TexasRed® C2 Maleiimid, 1,03 mg gelöst in 40  $\mu\text{l}$  DMSO, dem Fv-Fragment unter Rühren langsam hinzugegeben. Die eingesetzte Menge an Farbstoff entsprach einem 20-fachen molaren Überschuss. Der Markierungsansatz wurde 4 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde der nichtgekoppelte Farbstoff durch dreimaliges Dialysieren über mehrere Tage bei 4°C im Dunkeln gegen 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl pH 7,4 aus dem Ansatz entfernt. Danach erfolgte durch Zentrifugation bei 70000 rpm und 4°C für 1 h das Abtrennen aller unlöslichen Bestandteile. Die Proteinkonzentration des fluoreszenzmarkierten dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP (B3-TexasRed) wurde durch ein UV/VIS-Spektrum

bestimmt (vgl. Abschnitt 2.2.5.1). B3-TexasRed wurde aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 2.2.4.12 Assoziation von Proteinen

Alle verwendeten Puffern wurden filtriert und durch Entgasen vom Sauerstoff befreit.

##### **Kopplung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und E<sub>8</sub>C-PE38**

Beide Proteine können aufgrund ihrer entgegengesetzt geladenen polyionischer Fusionen miteinander interagieren und durch Ausbildung einer Disulfidbrücke kovalent verknüpft werden. Dazu wurden dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP (10 ml mit 424  $\mu\text{g/ml}$ ) und E<sub>8</sub>C-PE38 (8 ml mit 787  $\mu\text{g/ml}$ ) über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  gegen 2 l 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA pH 8,0 dialysiert. Nach der Dialyse erfolgte die Reduktion der freien terminalen Cysteine beider Proteine durch Zugabe von 1 mM GSH bei Raumtemperatur für 2 h. Reduziertes Glutathion wurde aus einer Stammlösung mit 50 mM GSH in Dialysepuffer pH 8,0 hinzugegeben. Nach der zweistündigen Inkubation wurden beide Proteinlösungen gemischt, was einem äquimolaren Verhältnis entsprach. Die Kopplung beider Proteine erfolgte nach Zugabe von 4 mM GSSG, aus einer Stammlösung (100 mM GSSG in Dialysepuffer pH 8,0) über Nacht bei  $20^{\circ}\text{C}$ . Das Kopplungsprodukt B3-PE38 wurde mit Hilfe eines starken Anionentauschers von den nicht gekoppelten Komponenten gereinigt. Dazu wurde die Poros HQ mit 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA pH 8,0 äquilibriert, mit dem Kopplungsansatz bei einer Flussrate von 4 ml/min beladen und mit 30 Säulenvolumen Äquilibrierungspuffer gewaschen. Die Elution des B3-PE38 bzw. E<sub>8</sub>C-PE38 erfolgte durch zwei lineare Gradienten (1. Gradient: 0 bis 200 mM NaCl über 30 Säulenvolumen; 2 Gradient: 200 bis 1000 mM NaCl über 20 Säulenvolumen). Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt, und diese mittels SDS-PAGE unter oxidierenden Bedingungen analysiert. Die nicht gekoppelten Komponenten (dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP war im Durchlauf, E<sub>8</sub>C-PE38 eluierte bei 30 mS/cm) wurden wiederverwendet. Das Immunotoxin B3-PE38 eluierte bei einer Leitfähigkeit von 18 mS/cm. Alle Fraktionen mit B3-PE38 wurden vereinigt, mit 2 Volumen 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA pH 8,0 gemischt, erneut aufgetragen und mit 30 Säulenvolumen gewaschen. Das Immunotoxin wurde in einem linearen Gradienten von 0 bis 2 M NaCl über 1 Säulenvolumen konzentriert von der Säule eluiert, anschließend nochmals gegen 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl pH 7,4 dialysiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **Kopplung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und GzmB-GCD<sub>8</sub>**

Wie schon erwähnt können beide Proteine aufgrund ihrer polyionischen Fusionen miteinander gekoppelt werden. Dazu wurden dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP (2620 µg/ml) und GzmB-GCD<sub>8</sub> (880 µg/ml) über Nacht bei 4°C gegen 2 l 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA pH 8,0 dialysiert. Anschließend erfolgte die Reduktion der freien terminalen Cysteine beider Proteine durch Zugabe von 1 mM GSH aus einer Stammlösung (50 mM GSH in Dialysepuffer pH 8,0) bei Raumtemperatur für 2 h. Danach wurde der pH-Wert beiden Proteinlösungen durch tropfenweise Zugabe von 10 % (v/v) Phosphorsäure auf 4,5 abgesenkt. Es folgte eine weitere Dialyse gegen zweimal 2 l 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA pH 4,5 über Nacht bei 4°C. Dabei wurde das Reduktionsmittel GSH aus den Proteinlösungen entfernt. Nach der Dialyse wurde das freie reduzierte Cystein des dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP mittels DTP (2,2'-Dithiodipyridin) aktiviert. Dazu wurden 13,55 mg DTP in 300 µl EtOH gelöst, anschließend mit 700 µl 100 mM Borsäure-NaOH pH 8,5 versetzt und 30 min bei 37°C geschüttelt. Das gelöste DTP wurde im 10-fachen molaren Überschuss dem Antikörperfragment zugesetzt (1200 µl Proteinlösung + 15,6 µl DTP-Lösung). Der pH-Wert des Reaktionsansatzes wurde mit 1 N NaOH-Lösung auf 8,1 eingestellt. Die Aktivierung des freien Cysteins erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h. Anschließend wurde überschüssiges DTP mit Hilfe einer PD-10 Säule (*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*) abgetrennt. Das aktivierte dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP wurde mit dem reduzierten GzmB-GCD<sub>8</sub> in einem molaren Verhältnis von 3:1 gemischt. Der pH-Wert des Kopplungsansatzes wurde durch Zugabe von 1 N NaOH auf 8,1 eingestellt. Die Inkubation erfolgte für 5 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C. Das Kopplungsprodukt B3-GzmB wurde mit Hilfe eines starken Kationentauschers von den nicht gekoppelten Komponenten gereinigt. Dazu wurde die Poros HS mit 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA äquilibriert, mit dem Kopplungsansatz bei einer Flussrate von 2 ml/min beladen und mit 30 Säulenvolumen Äquilibrierungspuffer gewaschen. Die Elution des dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP (bei 40 mS/cm), GzmB-GCD<sub>8</sub> (bei 44 mS/cm) und des Immunotoxins B3-GzmB (bei 56 mS/cm) erfolgte in einem linearen Gradienten von 200 bis 3000 mM NaCl über 150 Säulenvolumen. Es wurden 3 ml Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE sowohl unter oxidierenden als auch reduzierenden Bedingungen analysiert. Das gereinigte Kopplungsprodukt B3-GzmB wurde mit Hilfe des Ultrafree®-4 Zentrifugalkonzentrators (*cut off 5 kD*) (*Millipore, Schwalbach*) konzentriert, anschließend gegen 2 l 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl pH 7,4 dialysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **Kopplung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP mit toxGal-CE<sub>8</sub>P**

Beide Proteine wurden über Nacht gegen 2 l 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA pH 8,0 dialysiert. Dem Dialysepuffer wurde 1 Tablette Protease-Inhibitor-Mix (*Roche Diagnostics, Penzberg*) zugegeben. Nach der Dialyse erfolgte die Reduktion der freien terminalen Cysteine beider Proteine durch Zugabe von 1 mM GSH aus einer Stammlösung (20 mM GSH in Dialysepuffer pH 8,0) bei Raumtemperatur für 1 h. Anschließend wurden reduziertes dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und reduzierte toxGal-CE<sub>8</sub>P im molaren Verhältnis 3:1 gemischt und mit 4 mM GSSG aus einer Stammlösung (80 mM GSSG in Dialysepuffer pH 8,0) versetzt. Der Kopplungsansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Das Kopplungsprodukt wurde mittels eines starken Anionentauschers von nicht gekoppeltem Antikörperfragment gereinigt. Dazu wurde die Poros HQ mit 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA pH 8,0 äquilibriert, mit dem Kopplungsansatz bei einer Flussrate von 1 ml/min beladen und mit 20 Säulenvolumen Äquilibrierungspuffer mit 200 mM NaCl gewaschen. Die Elution des B3-toxGal Immunotoxins erfolgte durch 1 M NaCl, welches im Anschluss gegen 2 l 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl pH 7,4 dialysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert wurde.

#### **2.2.4.13 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von B3-GzmB und GzmB-GCD<sub>8</sub>**

Die enzymatische Aktivität wurde nach einer Methode von Kurschus *et al.* (2004) bestimmt. Hierbei katalysiert das Granzym B die Hydrolyse des Substrates Ac-IEPD-pNA (*Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden*) unter Bildung von *p*-Nitroanilin. Die zeitliche Änderung der *p*-Nitroanilinkonzentration ist dabei proportional zur zeitlichen Änderung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm. Als Reaktionspuffer wurde 100 mM Tris-HCl pH 8,1, 100 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Triton X-100 verwendet. Das Substrat Ac-IEPD-pNA wurde in einer Konzentration von 250 µM direkt vor der Reaktion dem Puffer zugegeben. Durch Zugabe von 100 bzw. 200 nM B3-GzmB bzw. GzmB-GCD<sub>8</sub> wurde die Reaktion gestartet und am Dynatech MR4000 *plate reader* oder am UVIKON-Spectrophotometer 492 analysiert.

### **2.2.5. Spektroskopische Methoden**

#### **2.2.5.1 UV/VIS Spektroskopie**

Die UV/VIS-Spektroskopie beruht auf der Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Elektronen in bestimmten Molekülstrukturen. Diese Wechselwirkungen können durch die Absorption bei bestimmten Wellenlängen Informationen über den Molekülaufbau geben. Diese Form der Spektroskopie kam bei folgenden Methoden zum Einsatz:

1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (vgl. Abschnitt 2.2.4.6)
2. Bestimmung der enzymatischen Aktivität (vgl. Abschnitt 2.2.4.13)
3. Bestimmung der Proteinkonzentration durch Messen der Absorption bei 280 nm
4. Colorimetrischer Cytotoxizitäts-*Assay* (vgl. Abschnitt 2.2.7.8)

Das UVIKON-Spectrophotometer 492 (*Bio-Tek Kontron Instruments, Neufahrn*) wurde für die oben aufgeführten Untersuchungen 1, 2 und 4 verwendet. Das Ultrospec 4000 UV/VIS Spectrophotometer (*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*) kam hauptsächlich bei der 3. Methode zum Einsatz. Dabei wurde nicht nur die Absorption bei 280 nm bestimmt, sondern ein komplettes UV-Spektrum (240-340 nm), bei fluoreszenzmarkierten Proteinen ein komplettes UV/VIS-Spektrum (240-700 nm), von dem Protein gemessen.

Wird eine Farbstofflösung (Proteinlösung) mit Licht bestimmter Wellenlänge bestrahlt, nimmt die Intensität abhängig von der Menge der absorbierenden Moleküle und von der Schichtdicke ab. Aus dieser Abhängigkeit heraus ergibt sich das Lambert-Beersche-Gesetz wie folgt:

$$I_E = I_A \cdot e^{-\alpha \cdot c \cdot d}$$

- $I_E$     Intensität des Lichtstrahls, vor der Probe  
 $I_A$     Intensität des Lichtstrahls, nach der Probe  
 $\alpha$     Proportionalitätsfaktor  
 $c$     Konzentration des Farbstoffs (Protein)  
 $d$     Schichtdicke der Probe

Demnach nimmt die Intensität exponentiell mit der Schichtdicke der Probe und der Konzentration ab. Häufiger wird eine andere Form des Lambert-Beerschen-Gesetzes verwendet:

$$E = \log(I_A/I_E) = \varepsilon \cdot c \cdot d ; \text{ wobei } E \text{ die Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge ist}$$

$\varepsilon$ , das mit  $\alpha$  über die Formel  $\varepsilon = \alpha/\ln 10$  zusammenhängt, ist der sogenannte molare Absorptionskoeffizient des Farbstoffs (Protein) für eine bestimmte Wellenlänge. Mit Hilfe dieser Formel kann aus der Extinktion  $E_\lambda$  bei einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda$ , dem molaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_\lambda$  [ $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ] für die gleiche Wellenlänge und der Schichtdicke der Probe  $d$  [cm] die Konzentration des Farbstoffes (Protein) in der Lösung bestimmt werden. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration ermittelt man die Extinktion bei 280 nm ( $E_{280nm}$ ). Der

molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280\text{nm}}$  des Proteins ergibt sich dabei nach Wetlaufer (1962) aus folgender Summe:

$$\epsilon_{280\text{nm}} [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] = a \cdot \epsilon_{\text{Tyr}} + b \cdot \epsilon_{\text{Trp}} + c \cdot \epsilon_{\text{Cys-S-S-Cys}}$$

$$\epsilon_{\text{Tyr}} = 1280 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{Trp}} = 5690 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{Cys-S-S-Cys}} = 120 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

a, b, c Anzahl der im Protein vorhandenen Tyrosin-, Tryptophan-Reste und Disulfidbrücken.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden folgende molare Extinktionskoeffizienten in der Berechnung verwendet:

$$\text{E}_8\text{C-PE38} \quad \epsilon_{280\text{nm}} = 42650 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\text{dsFv-B3-R}_8\text{CP} \quad \epsilon_{280\text{nm}} = 52060 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\text{GzmB-GCD}_8 \quad \epsilon_{280\text{nm}} = 31960 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\text{Gal-CE}_8\text{P bzw. toxGal-CE}_8\text{P} \quad \epsilon_{280\text{nm}} = 261590 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

### 2.2.5.2 Fluoreszenz-Spektroskopie

Bei der Fluoreszenz handelt es sich um einen lichtemittierenden Prozess (im wesentlichen aus dem 1. elektronisch angeregtem Zustand, dem  $S_1$ -Zustand), der durch eine Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlänge ausgelöst wird. Die durch Lichteinwirkung in einen angeregten Zustand versetzten Moleküle (Fluorophor) kehren dabei durch spontane Lichtemission in den elektronischen Grundzustand zurück. Die Deaktivierung aus dem angeregten Zustand kann aber auf unterschiedlichen Wegen, auch ohne Fluoreszenz, erfolgen, wie das im folgenden Jablonski-Diagramm (Abb. 2.4) dargestellt ist. Durch Bestrahlung mit Licht erfolgt unter Einhaltung des Frank-Condon-Prinzips ein Übergang in höhere schwingungsangeregte Niveaus des ersten angeregten Zustandes ( $S_1$ ).

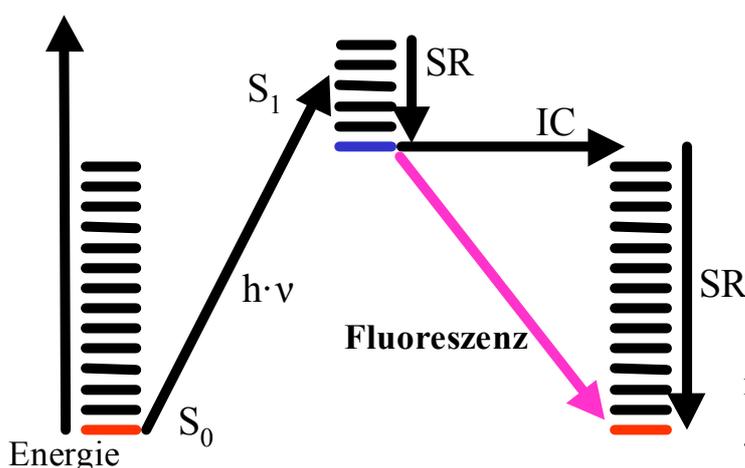


Abb. 2.4:  
Vereinfachte Darstellung eines  
Jablonski-Diagrammes

Zunächst findet eine sogenannte Schwingungsrelaxation (SR-Übergang) statt, bei dem der Übergang z.B. zum niedrigsten  $S_1$ -Niveau strahlungslos, d. h. unter Wärmeabgabe, erfolgt. Nun kann, was der häufigere Fall ist, eine sogenannte *Internal Conversion* (IC-Übergang) stattfinden, bei dem ein strahlungsloser Übergang z.B. vom niedrigsten Schwingungszustand des  $S_1$ -Zustandes in einen etwa energieglichen höheren Schwingungszustand des Elektronengrundzustands erfolgt. Von dort findet unter Wärmeabgabe eine Schwingungsrelaxation z.B. in den Schwingungsgrundzustand des  $S_0$ -Zustandes statt. Neben des IC-Prozesses existieren in großen Molekülen weitere strahlungslose Deaktivierungsprozesse des  $S_1$ -Zustandes, z.B. der sogenannte *intersystem crossing* – Prozess, bei welchem Übergänge in das Triplett-System des Moleküls stattfinden. Bei geeigneten Molekülen kann aber die Energie auch in Form von Licht abgegeben werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Fluoreszenz. Alle diese Deaktivierungsprozesse spontane Emission, *internal conversion* und *intersystem crossing* bestimmen die Lebensdauer des  $S_1$ -Zustandes. Dieser ist typischerweise  $10^{-9}$  ...  $<10^{-13}$  sek. Wegen der innerhalb des  $S_1$ -Zustandes stattfindenden schnellen Schwingungsrelaxationsprozesse zu tiefer liegenden Schwingungsniveaus und der Strahlungsemission (Fluoreszenz) in angeregten Schwingungszustände des  $S_0$ -Zustandes ist das emittierte Licht immer langwelliger als das eingestrahlte (Stokes-Regel). Lösungsmittelleffekte, Lösungsmittelrelaxation und *excited state* Reaktionen können neben den schon an sich immer vorhandenen fluoreszenzmindernden Prozessen (*internal conversion*, *intersystem crossing*) zum weiteren *Quenchen* der Fluoreszenz führen, indem sie dafür sorgen, dass die aufgenommene Energie zu keiner Lichtemission führt, sondern anderweitig abgegeben wird.

### **Fluoreszenz-Quenching von B3-PE38 bzw. E<sub>8</sub>C-PE38 durch NAD-Bindung**

Wie schon erwähnt, kann durch Wechselwirkung des Fluorophors mit dem *Quench*-Molekül die Fluoreszenz vermindert werden. *Pseudomonas* Exotoxin ist ein NAD-bindendes Enzym. An der NAD-Bindung sind unter anderem auch Tryptophane (W417, W466, W558) (Beattie *et al.*, 1996) beteiligt. Durch die Wechselwirkung der Tryptophane mit dem NAD-Molekül wird der strahlungslose Übergang beschleunigt und somit die Fluoreszenz messbar verringert. Das Fluoreszenz-Quenching ist abhängig von der NAD-Konzentration und der Dissoziationskonstante des Toxin/NAD-Komplexes. Das Messen der Fluoreszenz in Abhängigkeit der NAD-Konzentration wurde in Anlehnung an Beattie *et al.* (1996) durchgeführt.

Die Messung erfolgte in einer rührbaren Fluoreszenzküvette (*Hellma Makro 111*) am FluoroMax-2 (*ISA Instrument, S.A., Inc.*) bei 20°C mit folgender Geräteeinstellung:

Anregungswellenlänge:	295 nm
Messen der Emission bei	340 nm
Messdauer:	6500 Sekunden, alle 10 Sekunden erfolgte eine Messung
Spaltbreite:	1,175 mm, entspricht einem Bandpass von 5,0 nm
Signal:	S/R (Das Messsignal wird mit Hilfe des Referenzsignals einer Photodiode normiert)

B3-PE38 und E<sub>8</sub>C-PE38 waren in 50 mM Tris-HCl pH 8,2 zu jeweils 20 µg/ml gelöst. Die Zugabe von NAD zu der Proteinlösung erfolgte aus zwei Stammlösungen (2 mM bzw. 20 mM in 50 mM Tris-HCl pH 8,2) erstmalig 300 Sekunden nach Start des Experiments, im Anschluss alle 500 Sekunden direkt in die Messküvette. Die NAD-Konzentration wurde im Bereich von 0 bis 1000 µM variiert. Nach der Zugabe von NAD änderte sich das Messsignal sehr schnell und blieb bis zum nächsten Titrationsschritt nahezu konstant. Die letzten 10 Messwerte vor erneuter Zugabe von NAD wurden gemittelt und gegen die NAD-Konzentration aufgetragen. Die ermittelten Werte konnten durch Messen der NAD-abhängigen Fluoreszenzabnahme (*inner filter* Effekt) von Lysozym, welches nicht NAD binden kann, korrigiert werden. Aus der erhaltenen Abhängigkeit der Fluoreszenz des B3-PE38 bzw. E<sub>8</sub>C-PE38 von der NAD-Konzentration konnte die Dissoziationskonstante für folgendes Gleichgewicht:



bestimmt werden.

Es gilt:

$$K_D = \frac{[\text{PE38}] \cdot [\text{NAD}]}{[\text{Komplex}]}$$

R – [PE38]                      Konzentration des Rezeptors PE38 im Gleichgewicht

L – [NAD]                        Konzentration des Liganden NAD im Gleichgewicht

RL – [Komplex]                Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes PE38/NAD im Gleichgewicht

weiterhin gilt:

$$R = R_0 - RL \quad R_0 - \text{Ausgangskonzentration an Rezeptor PE38}$$

$$L = L_0 - RL \quad L_0 - \text{Ausgangskonzentration an Ligand NAD}$$

daraus folgt:

$$K_D = \frac{(R_0 - RL) \cdot (L_0 - RL)}{RL}$$

$$K_D = \frac{R_0 \cdot L_0 - R_0 \cdot RL - L_0 \cdot RL + (RL)^2}{RL}$$

es ergab sich folgende Quadratische Gleichung:

$$0 = R_0 \cdot L_0 - RL \cdot (R_0 + L_0 + K_D) + (RL)^2$$

Nach der bekannten Lösungsformel ergab sich:

$$RL = \frac{R_0 + L_0 + K_D}{2} - \sqrt{\left(\frac{R_0 + L_0 + K_D}{2}\right)^2 - R_0 \cdot L_0}$$

Das Fluoreszenzsignal ist über folgende Formel von der Konzentration des PE38/NAD-Komplexes (RL) abhängig:

$$S = S_0 - dS \times \frac{RL}{R_0}$$

S – Fluoreszenzsignal

S<sub>0</sub> – Fluoreszenzsignals des Proteins ohne NAD

dS – Amplitude (Differenz zwischen höchsten und niedrigsten Fluoreszenzsignal)

RL – Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes PE38/NAD im Gleichgewicht

R<sub>0</sub> – Ausgangskonzentration von B3-PE38 bzw. E<sub>8</sub>C-PE38

Mit Hilfe des Programms SigmaPlot 5.0 wurden durch Approximierung des Fluoreszenzsignals (S) an die gemessenen Fluoreszenzwerte die Konstanten S<sub>0</sub>, dS und die Dissoziationskonstante K<sub>D</sub> für den PE38/NAD-Komplex bestimmt.

### **Messung des Temperaturübergangs mittels Fluoreszenz**

Wie bereits erwähnt, wird die Fluoreszenz vom Lösungsmittel beeinflusst. Die Fluoreszenz von Tryptophan, maßgeblicher Fluorophor in Proteinen, wird bei 295 nm angeregt. In hydrophober Umgebung liegt das Emissionsmaximum bei 330 – 340 nm, im wässrigen Milieu hingegen bei 350 nm. Im nativen Zustand befinden sich Tryptophanreste normalerweise in hydrophober Umgebung im Inneren des Proteins. Durch temperaturinduzierte Entfaltung des Proteins gelangen sie in ein wässriges Milieu. Neben der Verschiebung des Emissionsmaximums erfolgt durch verstärkte Lösungsmittelrelaxation auch eine Abnahme der Fluoreszenz. Eine Ausnahme bildet hierbei das dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP. Beim Entfalten des Antikörperfragmentes verschwindet der Quencheffekt einer Disulfidbrücke, wodurch die Fluoreszenzintensität steigt. Die Entfaltung des Proteins wird durch Amplitudenänderung der Fluoreszenz bei 340 nm erfasst.

Dazu wurde eine Proteinlösung, 50 µg/ml in 50 mM Tris-HCl pH 8,2, in einer rührbaren Küvette (*Hellma Makro 111*) von 20°C auf 80°C mit 0,3 K/min erwärmt. Bei jeder Temperaturerhöhung um 1 K wurde die Proteinlösung für 120 sek. bei dieser Temperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenz am F-4500 Fluorescence Spectrophotometer (*Hitachi High-Technologies, UK*) (Anregung bei 295 nm; Messen der Emission von 300 bis 400 nm; Auswertungswellenlänge: 340 nm; Anzahl der Akkumulationen: 3). Aus der normierten Auftragung der Fluoreszenzintensität bei 340 nm gegen die jeweilige Temperatur konnte der Übergangsmittelpunkt  $T_m$  bestimmt werden.

### 2.2.5.3 CD-Spektroskopie

Linear polarisiertes Licht lässt sich in zwei zirkular polarisierte Komponenten zerlegen. Dem Umlaufsinn entsprechend werden diese als links- bzw. rechtszirkular polarisiert bezeichnet. Die CD-Spektroskopie beruht auf der Tatsache, dass chirale Moleküle links und recht zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren. Das Messverfahren beruht jetzt darauf, dass periodisch im Takt links- bzw. rechtszirkular polarisierte Strahlung erzeugt und durch die Probe geschickt wird. Im gleichen Takt misst ein Photodetektor die Intensität der Strahlung hinter der Probe. Das Verhältnis der beiden im gleichen Takt gemessenen Intensitäten ist dann ein Maß für die Absorption der Probe bei unterschiedlichem Drehsinn des einfallenden zirkular polarisierten Lichtes.

Die Messung von Fern-UV-CD-Spektren erfolgte an einem Jasco J-710 Spektropolarimeter (*Jasco GmbH, Groß-Umstadt*) in einer Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von 1 mm. Die Spektren wurden von 260 nm bis 190 nm mit einer Scan-Geschwindigkeit von 50 nm/min und einer Zeitkonstante von 2 s aufgenommen. Die Spektren wurden 10-fach akkumuliert und bei 20°C aufgenommen. Der verwendete Puffer war 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,4. Nach Abzug des Puffersignals wurde die gemessene Elliptizität  $\Theta$  in die molare Elliptizität  $\Theta_{\text{molar}}$  nach der folgenden Formel umgerechnet (Schmid, 1997).

$$\Theta_{\text{molar}} = \frac{(\Theta \cdot 100 \cdot M_r)}{c \cdot l}$$

$\Theta_{\text{molar}}$  molare Elliptizität [deg·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>]

$\Theta$  Elliptizität [deg]

$M_r$  Molekularmasse [Dalton]

$c$  Proteinkonzentration [mg/ml]

$l$  Schichtdicke der Küvette [cm]

#### 2.2.5.4 Massenspektrometrie

Bei einem Massenspektrometer (MS) wird die zu untersuchende Probe in das MS eingebracht, verdampft und ionisiert. Als bewegte geladene Teilchen lassen sich die Ionen in einem Analysator auf verschiedene Weise nach ihrem  $m/Z$  – Verhältnis auftrennen und anschließend detektieren. Das gereinigte E<sub>8</sub>C-PE38 wurde nach Entsalzen mittels *reversed phase* Chromatographie (vgl. Abschnitt 2.2.4.9) durch ESI-Iontrap-Massenspektrometrie an einem Esquire-LC Spektrometer (*Bruker-Daltonik GmbH, Bremen*) charakterisiert. Die gereinigte fluorierte  $\beta$ -Galaktosidase wurde durch Trypsinverdau in Peptidfragmente zerlegt und diese an einem MALDI-TOF Massenspektrometer REFLEX (*Bruker-Daltonik GmbH, Bremen*) analysiert. Die massenspektrometrische Untersuchung wurde freundlicherweise von Frau Dr. A. Schierhorn (Forschungsstelle "Enzymologie der Proteinfaltung" der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

#### 2.2.6 N-terminale Sequenzierung von Proteinen

Proteine können durch Bestimmung ihres N-Terminus identifiziert werden. Die N-terminale Sequenzierung von Proteinen erfolgte entweder nach Transfer auf PVDF-Membran (vgl. Abschnitt 2.2.4.2) oder nach Entsalzen mittels *reversed phase* Chromatographie (vgl. Abschnitt 2.2.4.9). Durch automatischen Edman-Abbau mit einem Applied Biosystems 476A Gasphasen-Sequencer (*Applied Biosystems, Forster City, USA*) wurden jeweils die ersten 6 bis 7 Aminosäuren identifiziert. Die Sequenzanalyse wurde freundlicherweise von Herrn Dr. K. P. Rücknagel (Forschungsstelle "Enzymologie der Proteinfaltung" der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

#### 2.2.7 Zellbiologische Methoden

##### 2.2.7.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen als *Monolayer*

Die Kultivierung eukaryontischer Zellen erfolgte je nach Verwendungszweck in Flaschen oder Zellkulturtestplatten. T75-Zellkulturflaschen wurden für kontinuierliche Kultivierung einer Zelllinie verwendet. In Zellkulturtestplatten wurden alle Experimente durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator HERAcell (*Heraeus, Hanau*) bei 37°C und 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> in einer gesättigten Wasserdampfatosphäre. Das für die jeweilige Zelllinie verwendete Medium ist in Abschnitt 2.1.7 aufgeführt.

### 2.2.7.2 Passagierung eukaryontischer Zellen

Das Passagieren der Zellen erfolgte zu einem Zeitpunkt, bei dem sie fast konfluent gewachsen waren. Dazu wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml 1x Trypsin-EDTA-Lösung (*Invitrogen, Karlsruhe*) bedeckt und 5 min bei 37°C inkubiert. Durch festes Klopfen auf den Schalenrand lösten sich die Zellen von ihrer Unterlage und konnten in 12 ml Medium resuspendiert werden. Mit jeweils 2 ml dieser Suspension erfolgte die Inokulation einer neuen Flasche, in die zuvor 15 ml frisches Medium pipettiert wurden. Die hier beschriebene Methode wurde je nach Zelllinie alle 3 – 7 Tage durchgeführt.

### 2.2.7.3 Präparation einer Kryokultur

Die dauerhafte Lagerung von eukaryontischen Zellen erfolgte bei –198 °C in flüssigem Stickstoff. Dazu wurde das Medium aus einer T75-Flasche, mit konfluent gewachsenen Zellen, entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und 3 ml 1x Trypsin-EDTA-Lösung zu-pipettiert. Bei Raumtemperatur wurde die Flasche so lange geschwenkt, bis sich die ersten Zellen ablösen. Jetzt erfolgte das Absaugen der Trypsinierungslösung und das Resuspendieren der Zellen in 5 ml *Freezing*-Medium (FCS mit 10 % (v/v) DMSO; bei NIH3T3: CS mit 10 % (v/v) DMSO). Die Zellsuspension wurde in Aliquots zu 1 ml in Kryoröhrchen überführt und diese in 50 ml Greiner-Röhrchen gesammelt. Durch Inkubation der Greiner-Röhrchen in Isopropanol bei –80°C über Nacht erfolgte eine langsame Temperaturniedrigung der Zellen. Im Anschluss wurden die Kryoröhrchen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt und darin gelagert.

### 2.2.7.4 Reaktivierung einer Kryokultur

Zur Reaktivierung einer Kryokultur wurde ein Röhrchen mit Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend erfolgte mit dem kompletten Inhalt des Röhrchens die Inokulation einer T75-Zellkulturflasche mit frischem Medium. Nach 12 – 24 h im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C wurde das Medium gewechselt, um restliches DMSO aus der Kultur zu entfernen.

### 2.2.7.5 Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Antikörpern in eukaryontische Zellen

Wie in Abschnitt 2.2.4.11 beschrieben wurde der Antikörper dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP mit dem Fluoreszenzfarbstoff TexasRed markiert. Mit dieser Methode sollte nachgewiesen werden, ob die untersuchte Zelllinie in der Lage ist, den Antikörper spezifisch zu binden und zu internalisieren. Dazu wurden 6-Well Zellkulturtestplatten mit trypsinisierten Zellen inokuliert. In die

*Wells* wurden zuvor sterile Deckgläschen gelegt, auf denen die Zellen wachsen sollten. Nachdem die Zellen auf dem Deckgläschen konfluent waren, erfolgte die Aufnahme des B3-TexasRed in die Zellen nach folgender Prozedur.

1. Zellen wurden nach Absaugen des Mediums zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen
2. Zugabe von 2 ml/*Well* eiskaltem farblosem Medium
3. Zugabe von 0,1 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg B3-TexasRed (bei SK-BR3: 1, 3, 5, 10 µg)
4. Inkubation der Zellen im Dunkeln für 1 h auf Eis
5. Inkubation der Zellen im Dunkeln für 2 h bei 37°C in CO<sub>2</sub>-Inkubator
6. Zellen wurden nach Absaugen des Mediums dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen
7. Zugabe von 1,5 ml/*Well* von Paraformaldehyd (3 %ig in PBS) bei RT
8. Inkubation der Zellen im Dunkeln für 2 h bei RT
9. Zellen wurden nach Absaugen des Paraformaldehyds zweimal mit PBS gewaschen
10. Auf einen Objektträger wurden 30 µl Mowiol-Lösung pipettiert und darauf das Deckgläschen mit den Zellen nach unten gelegt.
11. Das Präparat trocknete über Nacht im Dunkeln bei RT
12. Mit Nagellack wurde der Rand des Deckgläschens versiegelt und restliches Mowiol mit Wasser abgespült.
13. Die Lagerung der Präparate erfolgte im Dunkeln bei 4°C

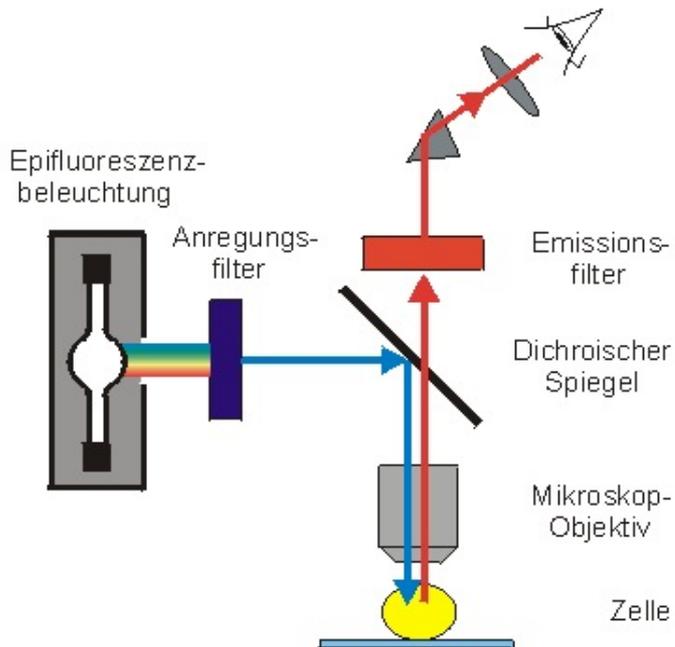
Die Präparate wurden mittels eines Fluoreszenzmikroskops betrachtet (vgl. Abschnitt 2.2.7.6)

Für die Analyse der Aufnahme mittels FACS (vgl. Abschnitt 2.2.7.9), durchgeführt von Florian Kurschus (Martinsried), wurde folgendes Protokoll zur Probenvorbereitung verwendet:

1. 100000 trypsinierte Zellen wurden mit PBS, 3 % (v/v) FCS, 0,01 % Natriumazid gewaschen
2. Zellen wurden in PBS, 3 % (v/v) FCS, 0,01 % Natriumazid mit 10 bzw. 20 µg/ml B3-TexasRed für 2 h bei 4°C inkubiert.
3. Waschen der Zellen mit PBS, 3 % (v/v) FCS, 0,01 % Natriumazid
4. Resuspendieren der Zellen in 200 µl FACS-Puffer (FACSFlow, *Becton-Dickinson, Heidelberg*)
5. Analysieren der Zellen mittels FACS (FACSCalibur, *Becton-Dickinson, Heidelberg*)

### 2.2.7.6 Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie erfolgte die Analyse der Aufnahme des B3-TexasRed in eukaryontische Zellen. Dafür wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100M Carl Zeiss, Jena) verwendet, das mit drei Filterblöcken und vier Objektiven (20×, 40×, 63×long distance, 100× Ölimmersion) ausgestattet war.



**Abb. 2.5:**  
Schematische Darstellung eines  
Fluoreszenzmikroskopes  
(Bildquelle: [http://www.zoologie-  
skript.de/methoden/fluo/fluomikh.htm](http://www.zoologie-skript.de/methoden/fluo/fluomikh.htm))

Wie in der Abbildung 2.5 dargestellt, besteht das optische System eines Fluoreszenzmikroskops aus einer Lichtquelle, dem Linsensystem, einem Anregungsfilter, dem dichroischen Spiegel und einem Emissionsfilter. Dabei lässt der Anregungsfilter selektiv nur Licht der Anregungswellenlänge des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes durch. Das Licht wird durch den dichroischen Spiegel zunächst auf die Probe (Zellen) reflektiert. Durch den Farbstoff in den Zellen wird Licht größerer Wellenlänge emittiert, für das der dichroische Spiegel durchlässig ist. Der nachgeschaltete Emissionsfilter lässt lediglich Licht der Emissionswellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffes durch. Für die Analyse des TexasRed-Fluoreszenz in den Zellen wurde der TRITC-Filterblock, bestehend aus Anregungsfilter ( $580 \pm 25$  nm), einem dichroischen Spiegel (600 nm) und einem Emissionsfilter ( $630 \pm 20$  nm), verwendet. Die Dokumentation erfolgte mit einer Kleinbildkamera bzw. am konfokalen Laserscanning Mikroskop LSM 510 (Zeiss, Jena).

### 2.2.7.7 Cytotoxizitätstest

Zum Nachweis der biologischen Aktivität der Immunotoxine (B3-PE38, B3-GzmB, B3-toxGal) und der ungekoppelten toxischen Komponenten (E<sub>8</sub>C-PE38, GzmB-GCD<sub>8</sub>, toxGal-

CE<sub>8</sub>P) wurden Zellen mit diesen Proteinen inkubiert. Dazu wurde eine 24-Well Zellkulturtestplatte (1 ml Medium pro Well) mit trypsinierten Zellen inokuliert. Nachdem die Zellen im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C zu 20 % Konfluenz gewachsen waren, erfolgte zunächst ein Mediumwechsel im Anschluss die Zugabe der Toxine in Konzentrationen von 0,01 bis 30000 bzw. 100000 ng/ml (Endkonzentration im Medium). Nach 48 h bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator wurde der Anteil an Lebendzellen zur Gesamtzellzahl mittels verschiedener Methoden bestimmt (vgl. Abschnitt 2.2.7.8 und 2.2.7.9)

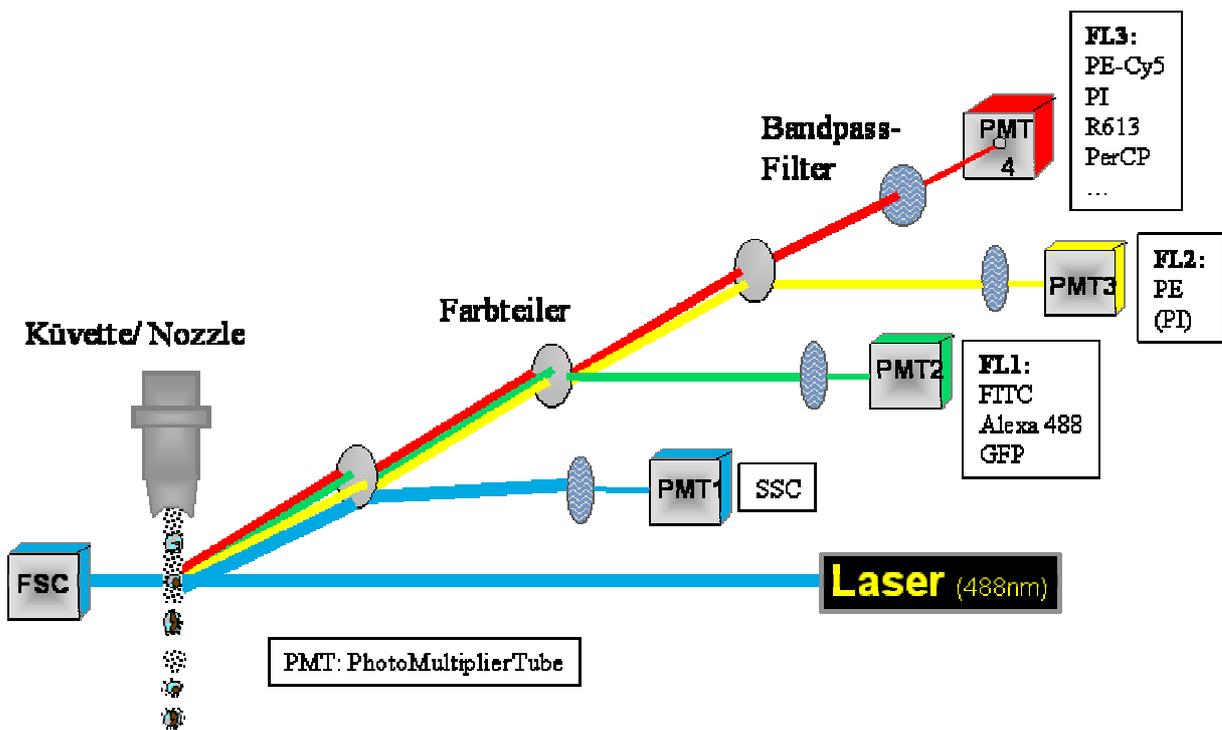
### 2.2.7.8 Colorimetrische Auswertung des Cytotoxizitätstests

Dieser Test beruht darauf, dass der gelbe Farbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-bromid) bei Spaltung wasserunlösliche, blaue Formazankristalle bildet. Diese Reaktion findet nur in lebenden, stoffwechselaktiven Zellen statt, indem MTT durch das mitochondriale Enzym Succinat-Dehydrogenase umgewandelt wird. Nach der Inkubation der Zellen mit Toxin wurden 50 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) pro ml Medium in jedes Well pipettiert. Die Farbreaktion erfolgte für 2 h bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Im Anschluss wurde das Medium abgesaugt und 500 µl Zell-Lysepuffer pro Well hinzugegeben. Die Lyse der Zellen erfolgte für 5 min bei 37°C. Der in 500 µl gelöste Farbstoff wurde mit 1 ml Zell-Lysepuffer ohne SDS verdünnt und bei 570 und 630 nm spektroskopisch vermessen (vgl. Abschnitt 2.2.5.1). Die Differenz der Extinktion bei 570 nm und 630 nm wurde für jede Toxinkonzentration bestimmt. Die Normierung der Werte erfolgte durch die gemessene Extinktion der Negativkontrolle (kein Toxin im Ansatz). Die normierten Werte sind ein Maß für den Anteil an lebenden Zellen und wurden gegen die jeweiligen Toxinkonzentrationen aufgetragen. Aus dem Kurvenverlauf konnte der IC<sub>50</sub>-Wert für das jeweilige Toxin mit einer bestimmten Zelllinie ermittelt werden (vgl. Abschnitt 2.2.7.10)

### 2.2.7.9 Durchflusscytometrie

Mit Hilfe der Durchflusscytometrie kann man einzelne Zellen hinsichtlich ihrer Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeigenschaften untersuchen (Carter und Meyer, 1994). Die Größe und Form der Zellen werden durch die Vorwärtsstreuung und Seitwärtsstreuung des Lichtes charakterisiert. Daneben kann auch die Fluoreszenz der Zellen, hervorgerufen durch markierte Antikörper (z.B. B3-TexasRed) oder angefärbte Zellbestandteile (z.B. DNA), gemessen werden. Jeder einzelnen Zelle werden diese Eigenschaften bei einer Messung zugeordnet, wodurch verschiedene Zellpopulationen exakt von einander unterschieden werden können. Die Zellen werden als Suspension angesaugt und mittels einer Trägerflüssigkeit transportiert. Zur Analyse werden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette

an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeführt, der die Fluorophore in der Probe anregt. Die Anzahl der emittierten Photonen, die durch einen Photodetektor registriert werden, sind ein Maß für zellgebundene Antikörper bzw. in Zellen aufgenommener Farbstoff. Man kann verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig messen, weil sich die eingesetzten Farbstoffe bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, jedoch über unterschiedliche Emissionsspektren verfügen.



**Abb. 2.6:**  
Schematische Darstellung des Strahlenganges eines FACScan-Gerätes  
(Bildquelle: <http://www.facsclab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>)

### Probenvorbereitung und Messung

#### Aufnahme B3-TexasRed in eukaryontische Zellen

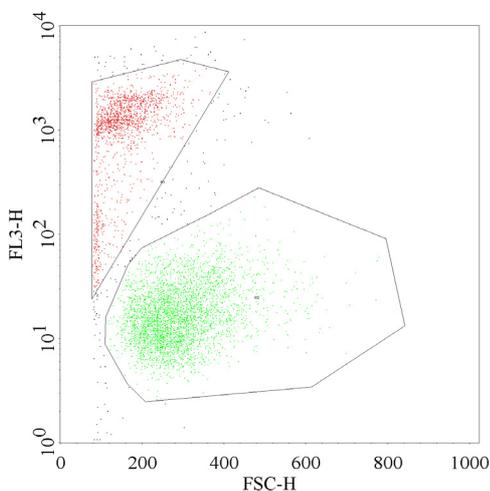
Zur Analyse der Zellen, die mit B3-TexasRed inkubiert wurden, erfolgte die Probenvorbereitung wie in Abschnitt 2.2.7.5 beschrieben. Die Zellen wurden mit einem Durchflusszycytometer FACSCalibur (*Becton-Dickinson, Heidelberg*) durch Florian Kurschus (Martinsried) vermessen. Die Auswertung der Fluoreszenzeigenschaften der Zellen erfolgte mittels eines Histogramms, bei dem die Anzahl der Zellen gegen deren Fluoreszenz (FL3: >670 nm) aufgetragen wurden.

### Auswertung des Cytotoxizitätstest

Nach der 48-stündigen Inkubation der Zellen mit Toxin wurden diese durch folgende Prozedur für die FACS-Messung vorbereitet.

1. Überführen des Mediums aus den *Wells* in 2 ml Reaktionsgefäße
2. Waschen der Zellen durch Zugabe von 550  $\mu$ l PBS pro *Well*, Überführen des PBS in jeweiliges Reaktionsgefäß
3. Zugabe von 100  $\mu$ l 1x Trypsin-EDTA-Lösung pro *Well*
4. Inkubation für 5 min bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator
5. Resuspendieren der Zellen mit 800  $\mu$ l Medium/PBS-Gemisch aus dem jeweiligen Reaktionsgefäß
6. Überführen der resuspendierten Zellen in jeweiliges Reaktionsgefäß
7. Zentrifugation der Zellen für 10 min bei 400x g und 4°C
8. Überstand wird verworfen und Zellen in 1 ml Inkubationspuffer resuspendiert
9. Zentrifugation der Zellen für 10 min bei 400x g und 4°C
10. Überstand wird verworfen und Zellen bis zur FACS-Analyse auf Eis gelagert

Die Unterscheidung zwischen lebenden und nekrotischen Zellen mittels FACS erfolgte durch den Farbstoff Propidiumjodid, der in die DNA nekrotischer Zellen interkaliert. Dazu wurden die auf Eis stehenden Zellen in 100  $\mu$ l Propidiumjodid-Lösung (1  $\mu$ g/ml in Inkubationspuffer) resuspendiert und 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 200  $\mu$ l Inkubationspuffer verdünnt und am Durchflusscytometer FACSCalibur (*Becton-Dickinson, Heidelberg*) vermessen. Die Auswertung erfolgte mittels eines *Dotplots*, bei dem die Fluoreszenz (FL3: >670 nm) gegen die Vorwärtsstreuung (FSC) aufgetragen wurde. In diesem Plot wurde eine Region für lebende Zellen definiert (Abb. 2.7).



**Abb. 2.7:** *Dotplot* einer FACS-Messung

Es wurde die Fluoreszenzintensität von Kanal FL3 (>670 nm) gegen die Vorwärtsstreuung (FSC) aufgetragen.

Die grünen Punkte repräsentieren die lebenden Zellen. Die roten Punkte repräsentieren tote Zellen bzw. Zellfragmente. Aufgrund der Aufnahme des Farbstoffes Propidiumjodid weisen diese Zellen eine um ca. Faktor 100 höhere Fluoreszenz (Kanal: FL3) auf. Die Zahl der grünen Punkte wurde für jede Toxinkonzentration bestimmt und auf einer Skala von 0 – 100 % normiert.

Für jede Toxinkonzentration wurde die Anzahl der sich in dieser Region befindlichen Zellen bestimmt und auf einer Skala (0 – 100 %) normiert. Die normierten Werte wurden gegen die jeweilige Toxinkonzentration aufgetragen und daraus der IC<sub>50</sub>-Wert ermittelt.

#### 2.2.7.10 Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes

Wie in den Abschnitten 2.2.7.8 und 2.2.7.9 beschrieben, erfolgte nach der Auswertung des Cytotoxizitätstests die Bestimmung des prozentualen Anteils an lebenden Zellen für die jeweilige Toxinkonzentration. Aus dem Kurvenverlauf der Auftragung, lebende Zellen in % gegen die Toxinkonzentration (logarithmische Skalierung), wurde der IC<sub>50</sub>-Wert des jeweiligen Toxins mit einer bestimmten Zelllinie ermittelt.

Es wurde folgende Formel dafür verwendet (nach Dissertation von Ulla Grauschopf, 2000):

$$y = y_{\min} + \frac{y_{\max}}{1 + 10^{(\log(\text{Toxin}) - \log(\text{IC}_{50}))}}$$

y – Anteil lebender Zellen in %

y<sub>min</sub> – Anteil lebender Zellen bei hohen Toxinkonzentrationen ( [Toxin] >> IC<sub>50</sub>)

y<sub>max</sub> – Anteil lebender Zellen bei niedrigen Toxinkonzentrationen ( [Toxin] << IC<sub>50</sub>)

Toxin – Toxinkonzentration

IC<sub>50</sub> – IC<sub>50</sub>-Wert, ist die Toxinkonzentration bei der 50 % der Zellen noch leben

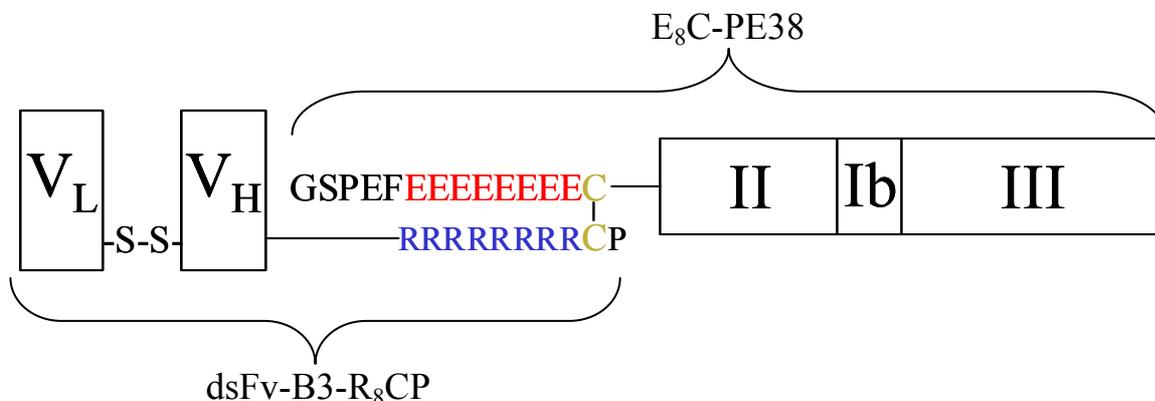
Mit Hilfe des Programms SigmaPlot 5.0 wurden durch Approximierung von y (Anteil lebender Zellen in %) an die gemessenen und normierten Lebendzellzahlen die Konstanten y<sub>min</sub>, y<sub>max</sub> und der IC<sub>50</sub>-Wert für das jeweilige Toxin mit bestimmter Zelllinie errechnet.

### 3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die beiden Komponenten von Immunotoxinen, ein Tumor-spezifisches Antikörperfragment und ein Proteintoxin, einzeln rekombinant hergestellt und gereinigt. Beide Komponenten sind entweder am N- oder am C-Terminus mit einem polyionischen Fusionspeptid gentechnisch verbunden. Aufgrund der entgegengesetzt geladenen Fusionen können das Antikörperfragment und das Toxin über elektrostatische Wechselwirkungen miteinander interagieren und durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den freien Cysteinen der Fusionspeptide kovalent miteinander verknüpft werden. Die verwendeten Fusionspeptide waren das (Arg)<sub>8</sub>CysPro, das (Glu)<sub>8</sub>Cys, das GlyCys(Asp)<sub>8</sub> und das Cys(Glu)<sub>8</sub>Pro Peptid. In früheren Arbeiten (Richter *et al.*, 2001) konnte mit den Peptiden ACE<sub>8</sub> und ACK<sub>8</sub> eine Heterodimerisierung selbst unter leicht reduzierenden Bedingungen nachgewiesen werden. Die Stabilität der Interaktion zwischen beiden Peptiden wurde mit  $\Delta G^0 = 6,6$  kcal/mol bestimmt. Bis zu einer Konzentration von 100 mM NaCl bildeten sich aus ACE<sub>8</sub> und ACK<sub>8</sub> zu 100 % Heterodimere. Diese biophysikalischen Untersuchungen zu polyionischen Peptiden dienten als Ausgangspunkt für die Assoziation zweier Proteine mittels dieser Peptidfusionen. Das Antikörperfragment dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP wurde jeweils mit unterschiedlichen cytotoxischen Proteinen (E<sub>8</sub>C-PE38, GzmB-GCD<sub>8</sub>, toxGal-CE<sub>8</sub>P) gekoppelt. Die dabei erzeugten modularen Immunotoxine wurden biophysikalisch untersucht und in Zellkulturexperimenten auf ihre biologische Wirksamkeit getestet.

#### 3.1 Immunotoxin B3-PE38

Für die Herstellung des Immunotoxins B3-PE38 wurde das zellbindende dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP Antikörperfragment mit dem cytotoxische Protein E<sub>8</sub>C-PE38 gekoppelt (vgl. Abb. 3.1).



**Abb. 3.1:**

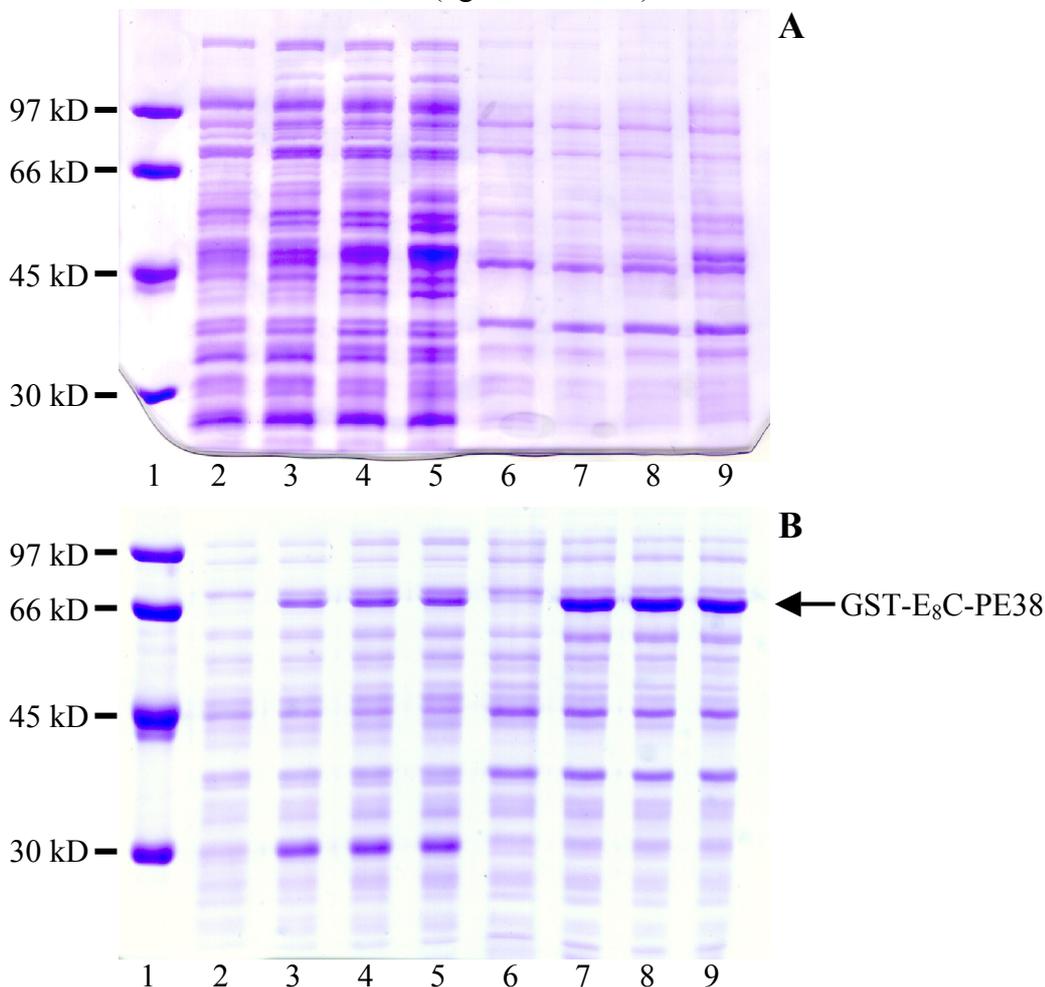
Schematische Darstellung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und E<sub>8</sub>C-PE38 in gekoppelter Form als Immunotoxin B3-PE38

In den folgenden Kapiteln wird die Herstellung, Reinigung und Kopplung der Proteine E<sub>8</sub>C-PE38 und dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP beschrieben. Die biophysikalischen Eigenschaften des gereinigten Immunotoxins B3-PE38 sowie seiner Komponenten wurde in verschiedenen Experimenten analysiert und miteinander verglichen. Die Untersuchung der biologischen Wirksamkeit des Immunotoxins und der cytotoxischen Komponente E<sub>8</sub>C-PE38 erfolgte in Testreihen mit verschiedenen eukaryontischen Zelllinien.

### 3.1.1 Optimierung der Expression von E<sub>8</sub>C-PE38

Die rekombinante Produktion des E<sub>8</sub>C-PE38 erfolgte zunächst mit Hilfe des Expressionsplasmides pET21-E8CPE38. Für die Expression des PE38 wurde in früheren Arbeiten ein auf einen pET-Vektor basierendes Expressionsplasmid verwendet (Reiter & Pastan, 1996). Deswegen erfolgte zunächst die Klonierung des E8CPE38 in den pET21-a(+) Vektor (vgl. Abb. 2.1). Dieses Plasmid enthält einen T7-Promotor und eine Resistenz für Ampicillin. Die Expression beginnt direkt mit der Gensequenz für MGSSE<sub>8</sub>C. Für die Expression wurden verschiedene *E.coli* Stämme mit einem T7-System, BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS und JM109(DE3), getestet. Zusätzlich wurde auch versucht, die Expressionsbedingungen (Medien, Zusätze und Temperatur) zu optimieren. Es konnte jedoch unter keinen Bedingungen eine Expression des rekombinanten Proteins mittels SDS-PAGE detektiert werden. Der Nachweis der Expression erfolgte mittels Western Blot. Unter Verwendung verschiedener Reinigungsmethoden (Ammoniumsulfatfällung, Ionenaustausch-, Affinitäts- und Hydrophobe Interaktionschromatographie) wurde versucht E<sub>8</sub>C-PE38 anzureichern. Alle Reinigungsschritte wurden mittels Western Blot analysiert. Es war jedoch nie möglich, dem positiven Signals des Western Blots eine Proteinbande auf dem SDS-Gel zuzuordnen. Deswegen wurde versucht, mit einem zweiten Konstrukt die Expression zu steigern. Verschiedene *E.coli* Stämme wurden mit pET21-miniE8CPE38 (vgl. Abb. 2.2) transformiert und die Expression bei unterschiedlichen Bedingungen getestet. Das Konstrukt ist so aufgebaut, dass vor dem Gen für E8CPE38 sich ein zusätzliches Cistron befindet. Dieses Cistron beinhaltet eine Sequenz, die komplementär zur 16S rRNA ist. Somit sollte die Bindung der mRNA an das Ribosom verbessert werden, wodurch es zu einer Steigerung der Expression kommen kann (Schoner *et al.*, 1990). Die Analyse der Expression erfolgte mittels SDS-PAGE. Es konnte jedoch wiederum keine Expressionsbande detektiert werden (vgl. Abb. 3.2 A). Es war bekannt, dass die Expressionsrate bei Proteinen mit N-terminaler polyionischer Fusion sehr gering ist, verglichen mit der des Wildtyp-Proteins. Jedoch hat eine C-terminale polyionischen Fusion keinen signifikanten Einfluss auf die Expressionsrate (Richter *et al.*, 2001). Deswegen wurde ein drittes Konstrukt für die Expression des E8CPE38 verwendet. In diesem Fall war der N-

Terminus des Zielproteins mit einem zweiten Protein, der Glutathion-S-Transferase (GST), fusioniert. Die polyionische Sequenz befand sich nun in der Mitte des Expressionskonstruktes, was zu einer Expressionssteigerung führen sollte. Neben der Expressionssteigerung diente die GST-Fusion auch der einfachen und spezifischen Reinigung mittels Affinitätschromatographie. Der *E.coli* Stamm BL21 wurde mit dem Expressionsplasmid pGEX4T1-E8CPE38 transformiert. Der Expressionstest erfolgte bei 37°C in LB-Medium (vgl. Abschnitt 2.2.3.3). Nach der Auswertung mittels SDS-PAGE konnte erstmals eine deutliche Expressionsbande auf den gefärbten Gelen detektiert werden. Die Expression des GST-E8CPE38 im präparativen Maßstab erfolgte wie in Abschnitt 2.2.3.4 beschrieben. Die Expression wurde durch ein SDS-Gel dokumentiert (vgl. Abb. 3.2 B).



**Abb. 3.2:** Rekombinante Expression von E<sub>8</sub>C-PE38

(Alle Proben wurden mit reduzierenden Probenpuffer behandelt und auf einem Coomassie-gefärbten 10 % igen SDS-Gel analysiert)

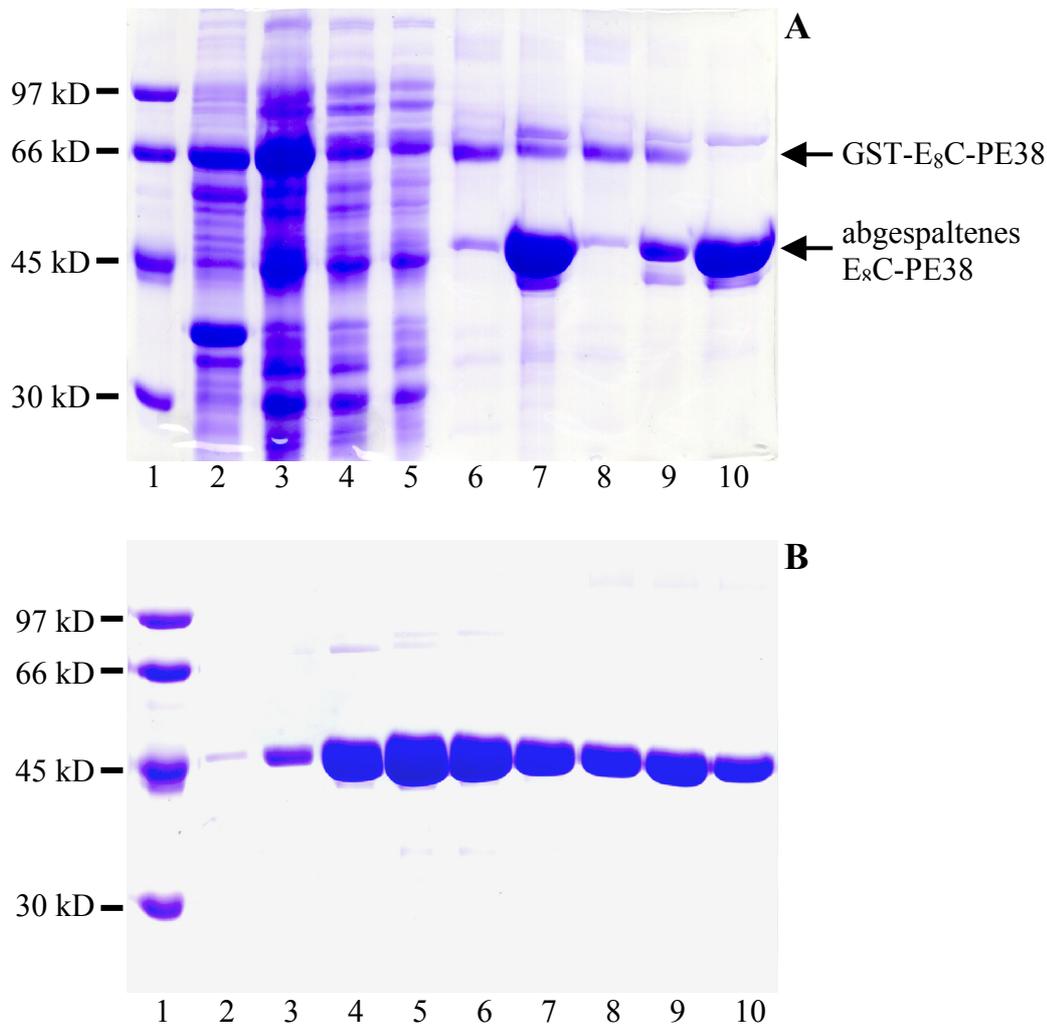
**A.** Expression von E8CPE38 mit BL21(DE3) pLysS pET21miniE8CPE38 auf LB-Medium bei 20°C; (1) LMW-Proteinmarker, (2)-(5) lösliche Fraktion: vor Induktion, 2h, 4h, 10h nach Induktion, (6)-(9) unlösliche Fraktion: vor Induktion, 2h, 4h, 10h nach Induktion

**B.** Expression von GST-E8CPE38 mit BL21 pGEX4T1-E8CPE38 auf LB-Medium bei 37°C, (1) LMW-Proteinmarker, (2)-(5) lösliche Fraktion: vor Induktion, 1h, 2h, 3h nach Induktion, (6)-(9) unlösliche Fraktion: vor Induktion, 1h, 2h, 3h nach Induktion

### 3.1.2 Reinigung von E<sub>8</sub>C-PE38 und dsFv-B3R<sub>8</sub>CP

#### E<sub>8</sub>C-PE38

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass sich E<sub>8</sub>C-PE38 als genetische Fusion mit der Glutathion-S-Transferase in *E.coli* mit guten Ausbeuten löslich produzieren lässt. Der hohe Anteil an GST-E<sub>8</sub>C-PE38 in den unlöslichen Fraktionen ist auf einen unvollständigen Zellaufschluss der Expressionstestproben mittels Schwingmühle zurückzuführen. Der Zellaufschluss erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4.3 beschrieben mit 8 g Biofeuchtmasse (BL21 pGEX4T1-E8CPE38). Der erhaltene lösliche Rohextrakt wurde auf die Glutathion-Sepharose aufgetragen, wobei das Fusionsprotein GST-E<sub>8</sub>C-PE38 über die GST spezifisch an das Chromatographiematerial bindet. Unspezifisch gebundene Proteine wurden von der Säule gewaschen. Das Abspalten des E<sub>8</sub>C-PE38 aus der Fusion erfolgte auf der Säule durch Inkubation mit 10 NIH Units Thrombin pro ml Säulenmaterial für 24 h bei 4°C. Anschließend wurde das Toxin von der Säule eluiert. Zur Erhöhung der Ausbeute erfolgte ein weiterer Thrombin-Verdau über Nacht. Im nächsten Schritt erfolgte die Abreinigung des Thrombins durch dessen Bindung an eine Benzamidin-Sepharose. Unspezifisch gebundenes E<sub>8</sub>C-PE38 wurde durch einen Waschschrift mit 1 M NaCl von der Säule eluiert (vgl. Abb. 3.3). Die abschließende Reinigung des Toxins nach der Elution von der Benzamidin-Sepharose erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie an einem Poros HQ Material. Dadurch wurden letzte Verunreinigungen bzw. Abbaufragmente des Toxins, entstanden durch den Thrombin-Verdau, vom intakten E<sub>8</sub>C-PE38 abgetrennt (vgl. Abb. 3.3 B). Die Fraktionen mit gereinigtem Toxin wurden vereinigt, die Salzkonzentration durch Verdünnen mit 50 mM Tris, 5 mM EDTA pH 7,4 verringert und nochmals auf die Poros HQ aufgetragen. Durch Elution in einem steilen Gradienten erfolgte eine Konzentrierung des Proteins. Das E<sub>8</sub>C-PE38 wurde gegen 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM EDTA pH 7,4 dialysiert, anschließend die Konzentration mittels UV-Spektrum (vgl. Abb. 3.3 C) bestimmt und bei -80°C gelagert. Aus 8 g Biofeuchtmasse konnten ca. 20 mg gereinigtes E<sub>8</sub>C-PE38 präpariert werden.



**Abb. 3.3:** Reinigung E<sub>8</sub>C-PE38

**A.** Affinitätschromatographie

Der verwendete Puffer war 20 mM Tris-HCl pH 7,3, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM EDTA, für die Thrombin-Spaltung wurden 80 mM MgCl<sub>2</sub> zugesetzt. Die Elution von der Benzamidin-Sepharose erfolgte durch 1 M NaCl im Puffer.

(Alle Proben wurden mit reduzierenden Probenpuffer behandelt und auf einem Coomassie-gefärbten 10 % igen SDS-Gel analysiert)

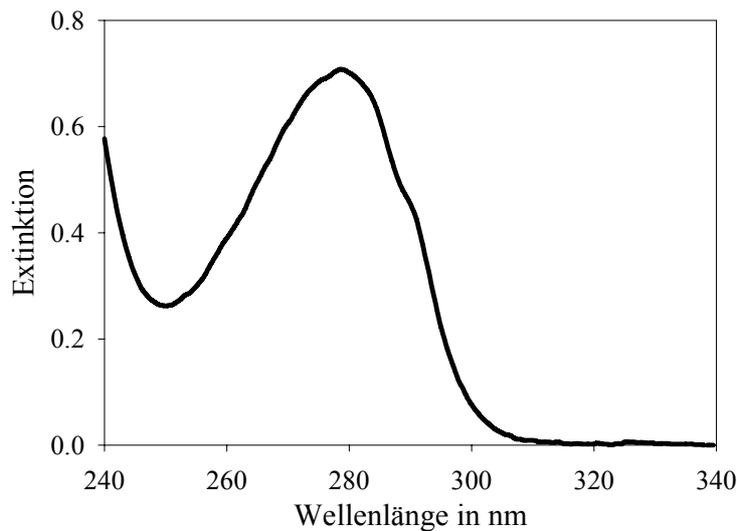
(1) LMW-Proteinmarker, (2) unlösliche Fraktion nach Zellaufschluss, (3) löslicher Rohextrakt, (4) und (5) 1. und 2. Durchlauf der Glutathion-Sepharose, (6) Durchlauf beim Beladen der Säule mit Thrombin-Lösung (1. Verdau), (7) Elution des abgespaltenen E<sub>8</sub>C-PE38 nach Thrombin-Verdau, (8) Durchlauf beim Beladen der Säule mit Thrombin-Lösung (2. Verdau), (9) Durchlauf der Benzamidin-Sepharose, (10) Elution des unspezifisch gebundenen E<sub>8</sub>C-PE38 von Benzamidin-Sepharose durch 1 M NaCl

**B.** Ionenaustauschchromatographie

Auftragung der E<sub>8</sub>C-PE38 enthaltenden Fraktionen der Benzamidin-Sepharose auf Poros HQ. Elution des Proteins in einem linearen Gradienten von 0 bis 2 M NaCl in 50 mM Tris, 5 mM EDTA pH 7,4 über 100 Säulenvolumen.

(Alle Proben wurden mit reduzierenden Probenpuffer behandelt und auf einem Coomassie-gefärbten 10 % igen SDS-Gel analysiert)

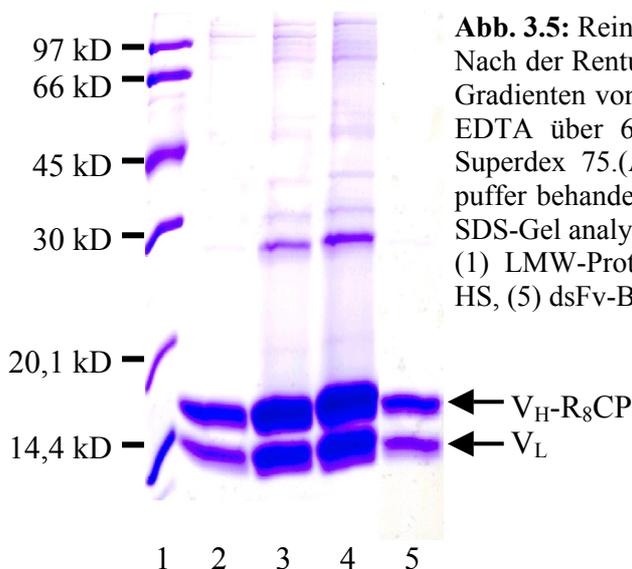
(1) LMW-Proteinmarker, (2)-(10) Elutionsfraktionen der Poros HQ: 16 – 24



**Abb. 3.4:** UV-Spektrum des gereinigten E<sub>8</sub>C-PE38

### dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP

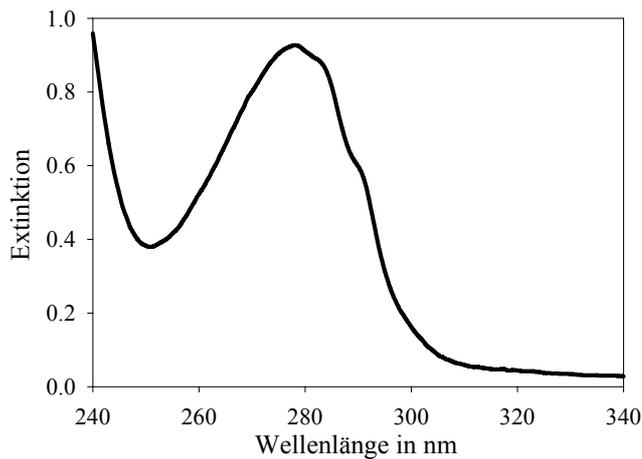
Die Herstellung und Reinigung des dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP erfolgte wie in den Methoden beschrieben nach Stubenrauch *et al.* (2001). Die beiden Ketten des Antikörperfragmentes wurden rekombinant in *E.coli* in Form von *inclusion bodies* hergestellt, deren Isolierung und Solubilisierung nach Rudolph *et al.* (1997), wie in den Abschnitten 2.2.4.4 und 2.2.4.5 beschrieben, erfolgte. Anschließend wurde das dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP renaturiert und gereinigt (vgl. Abschnitt 2.2.4.6 bis 2.2.4.9). Eine Zusammenfassung der Reinigungsschritte ist in Abb. 3.5 dokumentiert.



**Abb. 3.5:** Reinigung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP

Nach der Renaturierung erfolgte die Reinigung über Poros HS im Gradienten von 0,2 bis 2 M NaCl in 50 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA über 60 Säulenvolumen und über die HiLoad 16/60 Superdex 75. (Alle Proben wurden mit reduzierenden Probenpuffer behandelt und auf einem Coomassie-gefärbten 15 % igen SDS-Gel analysiert)

(1) LMW-Proteinmarker, (2)-(4) Elutionsfraktionen der Poros HS, (5) dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP nach Reinigung durch Superdex 75

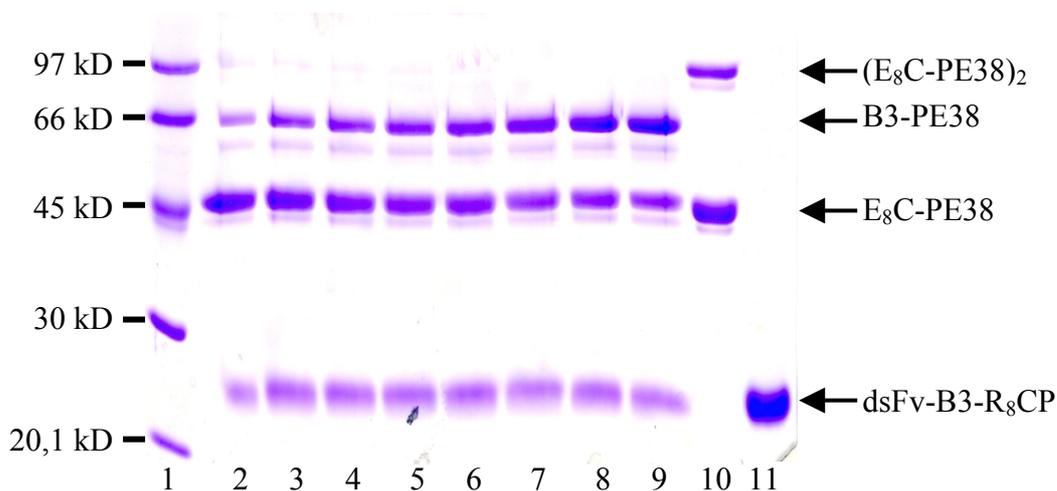


**Abb. 3.6:** UV-Spektrum des gereinigten dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP

### 3.1.3 Herstellung des modularen Immunotoxins B3-PE38

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die Herstellung eines modularen Immunotoxins, dessen Komponenten durch gerichtete Assoziation und kovalente Verknüpfung mittels polyionischer Fusionspeptide fusioniert werden. Die Assoziation beider Proteine ist an bestimmte Reaktionsbedingungen geknüpft. Wichtig für die gerichtete Assoziation zwischen den beiden entgegengesetzt geladenen Fusionspeptiden ist eine niedrige Ionenstärke ( $< 100$  mM NaCl) des Reaktionspuffers (Richter *et al.*, 2001). Da unter physiologischen Bedingungen Salzkonzentrationen von ca. 150 mM vorliegen, reicht eine Assoziation des E<sub>8</sub>C-PE38 mit dem dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP über elektrostatische Wechselwirkungen nicht aus, um ein auch bei solchen Bedingungen stabiles Immunotoxin herzustellen. Deswegen besitzen beide polyionische Fusionen (E<sub>8</sub>C und R<sub>8</sub>CP) ein freies Cystein. Diese bilden unter oxidierenden Bedingungen nach der gerichteten Assoziation eine Disulfidbrücke. Die polyionischen Fusionspeptide sorgen einerseits dafür, dass die Ausbildung von Homodimeren stark erschwert wird, zum anderen beschleunigen sie durch die elektrostatische Anziehung die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen E<sub>8</sub>C und R<sub>8</sub>CP. Die Kopplung des E<sub>8</sub>C-PE38 mit dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4.12 beschrieben nach den Bedingungen von Richter *et al.* (2001). Beide Proteine wurden zunächst getrennt voneinander bei pH 8 durch die Zugabe von 1 mM GSH reduziert. Dies ist notwendig, da nach längerem Lagern der Proteine sich disulfidverbrückte Homodimere ausbilden können, die aber unter leicht reduzierenden Bedingungen sofort in ihre Monomere zerfallen. Anschließend wurden E<sub>8</sub>C-PE38 und dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP im äquimolaren Verhältnis gemischt. Durch die Zugabe von 4 mM GSSG bildete sich ein *oxidoshuffling*-System im Puffer aus, welches die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen E<sub>8</sub>C und R<sub>8</sub>CP katalysiert. In den ersten Kopplungsversuchen wurden pH-Wert des Puffers sowie die Konzentration der Reaktionspartner variiert, um die optimalen Reaktions-

bedingungen zu ermitteln. Dazu wurde nach unterschiedlichen Inkubationszeiten 45  $\mu$ l Probe aus dem Kopplungsansatz entnommen und mit 5  $\mu$ l 400 mM Jodacetamid versetzt und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Jodacetamid reagiert mit freien Cysteinen und blockiert diese, sodass die weitere Ausbildung von Disulfidbrücken verhindert wird. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE analysiert (vgl. Abb. 3.7).



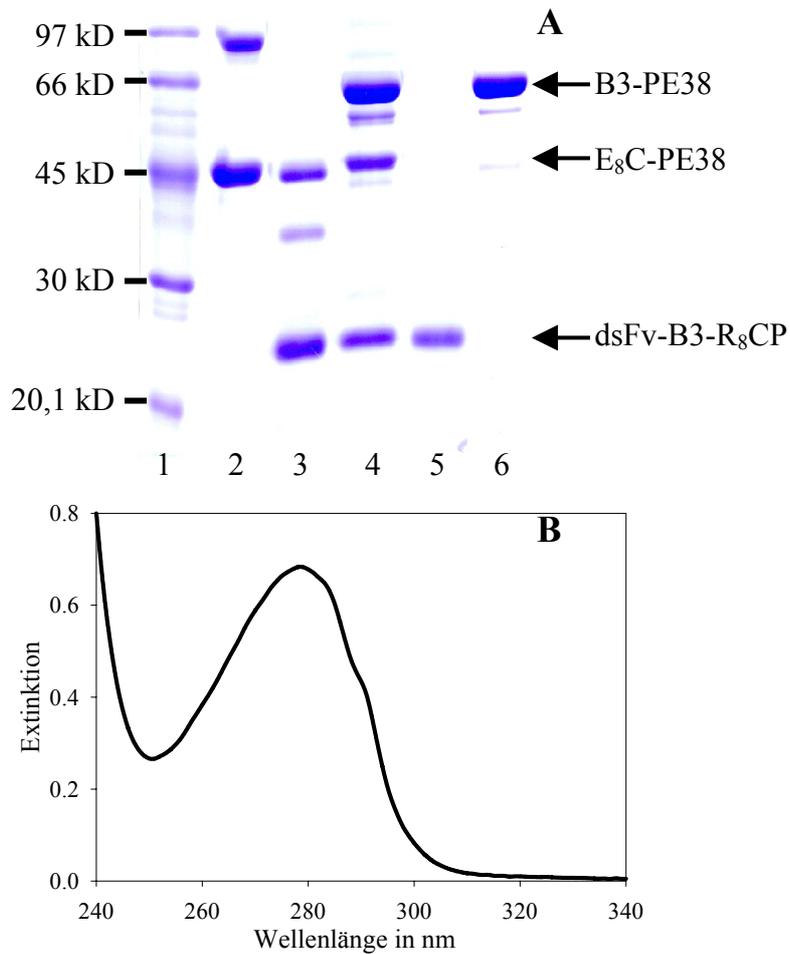
**Abb. 3.7:** Kinetik der Kopplung von E<sub>8</sub>C-PE38 und dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP

Die Reaktion erfolgte in 20 mM Tris, 2 mM EDTA pH 7,5 bei Raumtemperatur; die Proteinkonzentration lag bei jeweils 3  $\mu$ M. (Alle Proben wurden mit Jodacetamid inkubiert und mit oxidierendem Probenpuffer behandelt und auf einem Coomassie-gefärbten 12 % igen SDS-Gel analysiert)

(1) LMW-Proteinmarker, (2)-(9) Proben aus dem Kopplungsansatz, entnommen nach: 0 min (direkt nach Zugabe von GSSG), 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 5 h, 20 h, (10) Probe des E<sub>8</sub>C-PE38, (E<sub>8</sub>C-PE38)<sub>2</sub> ist das Homodimer des Toxins, (11) Probe des dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP

Wie in Abb. 3.7 zu sehen, entsteht das Kopplungsprodukt sofort nach der Zugabe des GSSG. Nach ca. 5 h ist die maximale Ausbeute an B3-PE38 erreicht. In weiteren Versuchen konnten die optimalen Bedingungen für die Kopplungsreaktion ermittelt werden. Die Herstellung des B3-PE38 Immunotoxins im präparativen Maßstab erfolgte unter den optimierten Bedingungen: Je 6,3 mg E<sub>8</sub>C-PE38 und 4,24 mg dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP, gelöst in 20 mM Tris, 2 mM EDTA pH 8,0, wurden mit 1 mM GSH für 2 h bei Raumtemperatur reduziert. Anschließend wurden beide Proteinlösungen gemischt, sodass E<sub>8</sub>C-PE38 und dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP in einem äquimolaren Verhältnis mit je 8,7  $\mu$ M im Ansatz konzentriert waren. Die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen den beiden Fusionspeptiden erfolgte durch die Zugabe von 4 mM GSSG unter nun oxidierenden Pufferbedingungen. Der Kopplungsansatz wurde für 20 h bei 20°C inkubiert. Die nicht gekoppelten Komponenten des B3-PE38 Immunotoxin wurden, wie in Abschnitt 2.2.4.12 beschrieben, über einen Anionentauscher (Poros HQ) abgetrennt. Das gereinigte Kopplungsprodukt wurde mit Hilfe der Poros HQ konzentriert und gegen 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl pH 7,4 dialysiert. Die Menge an gereinigtem B3-PE38 wurde mit Hilfe des UV-Spektrums (vgl. Abb. 3.8 B) auf 2 mg bestimmt und wurde bis

zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die einzelnen Schritte der Präparation des modularen Immunotoxins sind in Abb. 3.8 A dokumentiert.



**Abb. 3.8:** Herstellung und Reinigung des Immunotoxins B3-PE38

**A.**  $\text{E}_8\text{C-PE38}$  und  $\text{dsFv-B3-R}_8\text{CP}$ , gelöst in 20 mM Tris, 2 mM EDTA pH 8,0, wurden mit 1 mM GSH reduziert und im äquimolaren Verhältnis gemischt. Die Kopplungsreaktion erfolgte durch Zugabe von 4 mM GSSG bei  $20^{\circ}\text{C}$  für 20 h. Anschließend wurde der Ansatz auf die Poros HQ aufgetragen und die Proteine in zwei linearen Gradienten (0 – 0,2 M NaCl in 30 Säulenvolumen und 0,2 – 2 M NaCl in 20 Säulenvolumen) von der Säule eluiert.

(Alle Proben wurden mit Jodacetamid inkubiert und mit oxidierenden Probenpuffer behandelt und auf einem Coomassie-gefärbten 12 % igen SDS-Gel analysiert)

(1) LMW-Proteinmarker, (2) Probe des  $\text{E}_8\text{C-PE38}$ , (3) Probe des  $\text{dsFv-B3-R}_8\text{CP}$ , die oberste Bande ist das Homodimer des Antikörperfragmentes, (4) Probe des Kopplungsansatzes nach 20 h Inkubation bei  $20^{\circ}\text{C}$ , (5) Probe des Durchlaufs von Poros HQ: nicht gekoppeltes  $\text{dsFv-B3-R}_8\text{CP}$ , (6) Elution von Poros HQ: gereinigtes B3-PE38

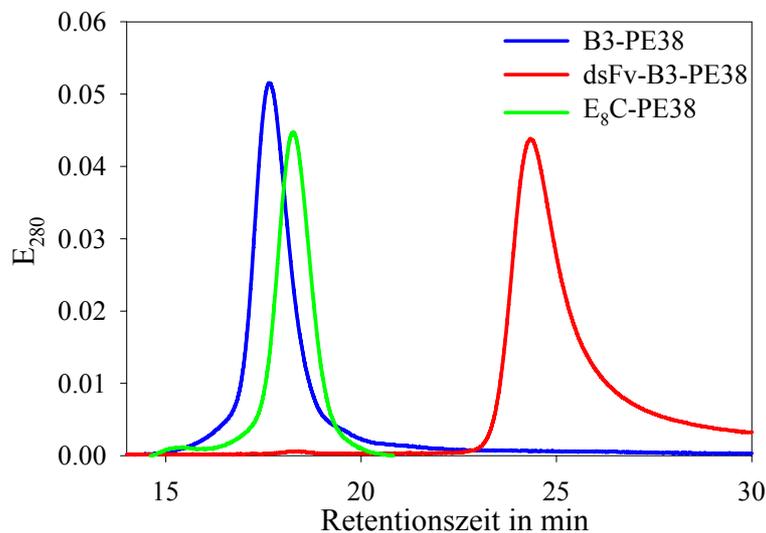
**B.** UV-Spektrum des gereinigten Immunotoxins B3-PE38

### 3.1.4 Biophysikalische Charakterisierung des B3-PE38

In diesem Abschnitt werden die biophysikalischen Eigenschaften des Immunotoxins B3-PE38 mit denen der Ausgangskomponenten (E<sub>8</sub>C-PE38 und dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP) verglichen. Es sollte bei den Untersuchungen herausgefunden werden, ob die Kopplung der beiden Proteine einen Einfluss auf deren Eigenschaften hat. Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass die C-terminale polyionische Erweiterung des Antikörperfragmentes bzw. dessen Kopplung an andere Proteine keinen Einfluss auf die biologische Funktion hat (Stubenrauch *et al.*, 2001).

#### Analytische Gelfiltration

Im ersten Experiment wurde das Elutionsverhalten von B3-PE38, E<sub>8</sub>C-PE38 und dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP auf einer analytischen Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) untersucht (vgl. Abb. 3.9).



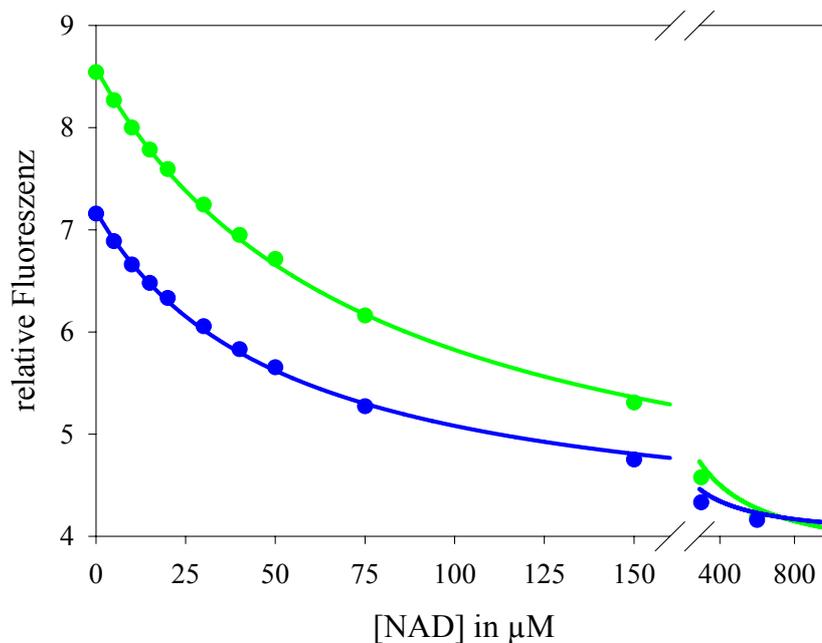
**Abb. 3.9:** Analyse des Molekulargewichts mittels Gelfiltration

Verwendete Säule: Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), 24 ml Säulenvolumen; Laufpuffer: 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl pH 7,4; Flussrate: 0,5 ml/min; Die Säule wurde an einer Gynkotec HPLC-Anlage (Dionex, Idstein) betrieben. Es wurden 100 µl Probenvolumen auf die Säule aufgetragen. Die Elution der Proteine als Absorption bei 280 nm analysiert.

Anhand der Kalibrierung der Säule konnte aus der Retentionszeit für das Immunotoxin B3-PE38 ein Molekulargewicht von 61 kD ermittelt werden. Da mit dieser Methode nur ein ungefähres Molekulargewicht bestimmt werden kann, stimmt der Wert mit dem tatsächlichen Gewicht von 66 kD gut überein. Die Komponenten des Immunotoxins eluieren entsprechend ihrer Größe verzögert nach dem B3-PE38 von der Superdex 75.

### NAD-Bindung von B3-PE38 und E<sub>8</sub>C-PE38

Die Toxizität des *Pseudomonas Exotoxins* beruht auf der Übertragung des ADP-Restes des NAD auf den eukaryontischen Elongationsfaktor 2. Somit ist die Fähigkeit der NAD-Bindung ein Maß für die biologische Aktivität des B3-PE38 bzw. E<sub>8</sub>C-PE38. Im aktiven Zentrum der katalytischen Domäne III befinden sich mehrere Tryptophane (W417, W466, W558), die an der Bindung vom NAD beteiligt sind (Beattie *et al.*, 1996). Es ist dadurch möglich, die NAD-Bindung durch die konzentrationsabhängige Abnahme der Tryptophan-Fluoreszenz von PE38 zu bestimmen. Dazu wurde jeweils die Fluoreszenz der Proteine B3-PE38 und E<sub>8</sub>C-PE38, wie in Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben, in Abhängigkeit der NAD-Konzentration gemessen. Da NAD bei der Anregungswellenlänge von 295 nm einen signifikanten Teil des eingestrahlteten Lichtes absorbiert, wurden die Daten um den daraus resultierenden *inner filter* Effekt korrigiert (vgl. Abb. 3.10).



**Abb. 3.10** Proteinfluoreszenz in Abhängigkeit von der NAD-Konzentration

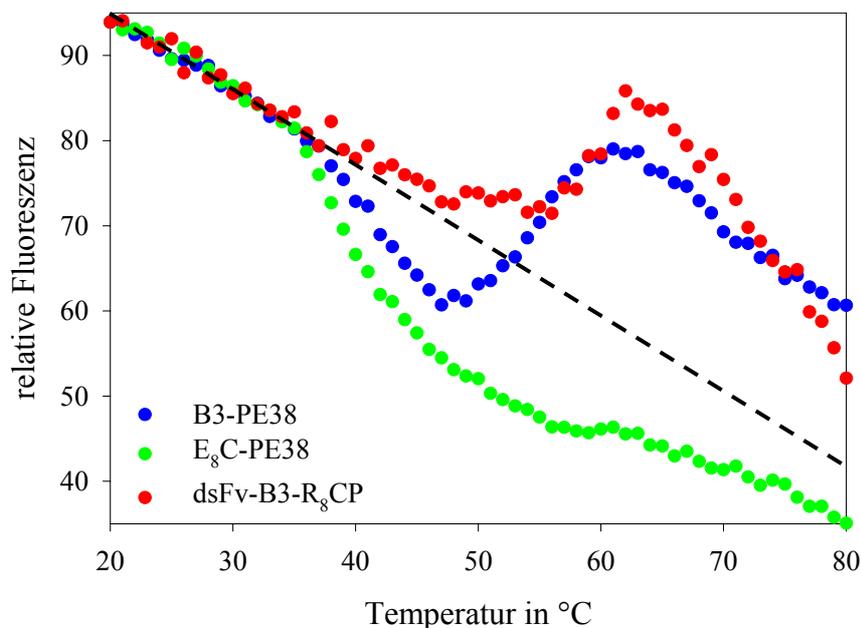
Die Proteine waren in 50 mM Tris pH 8,2 gelöst. Die Fluoreszenz wurde bei 295 nm angeregt und die Emission bei 340 nm gemessen. Die ermittelten Fluoreszenzwerte wurden durch den *inner filter* Effekt des NAD korrigiert. (●) B3-PE38 (0,3  $\mu\text{M}$ ) und (●) E<sub>8</sub>C-PE38 (0,51  $\mu\text{M}$ ).

Aus den erhaltenen Daten konnte mit Hilfe der in Abschnitt 2.2.5.2 erwähnten Gleichung die Dissoziationskonstanten für die Bindung von NAD ermittelt werden. Für das ungekoppelte E<sub>8</sub>C-PE38 betrug diese 76  $\mu\text{M}$  und für das B3-PE38 Immuntoxin 53  $\mu\text{M}$ . Die in der Literatur publizierte Dissoziationskonstante von 32  $\mu\text{M}$  für das PE40 (Beattie *et al.*, 1996) liegt mit den von mir ermittelten Werten in der selben Größenordnung. Damit wurde nachgewiesen, dass weder die polyionische Fusion noch die Kopplung mit einem anderen Protein einen Einfluss auf die Aktivität des PE38 hat. Vergleicht man die  $K_D$ -Werte für das B3-PE38 und das E<sub>8</sub>C-

PE38 zeigt sich, dass die Kopplung des Antikörperfragmentes keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungsfähigkeit für NAD ausübt. Die etwas geringere Affinität zum NAD für das isolierte E<sub>8</sub>C-PE38 ist möglicherweise auf die elektrostatische Abstoßung zwischen dem negativ geladenen Fusionspeptid und den zwei negativ geladenen *ortho*-Phosphat-Gruppen des NAD zurückzuführen.

### Stabilität von B3-PE38 gegenüber thermisch induzierter Denaturierung

Wichtig für einen potentiellen therapeutischen Einsatz des Immunotoxins B3-PE38 ist seine Stabilität gegenüber induzierter Denaturierung. Wie in Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben, wurde die Stabilität von B3-PE38 und seiner nichtgekoppelten Komponenten analysiert. Hierzu wurde für alle drei Proteine die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen (vgl. Abb. 3.11). Die lineare Abnahme der Fluoreszenz mit der Temperatur ergibt sich aus der Änderung der spezifischen Fluoreszenz der Proteine, ohne dass hier eine Konformationsänderung eintreten würde. Erst die Abweichung des Fluoreszenzsignals von dieser linearen Beziehung weist auf eine Strukturänderung und damit die beginnende Denaturierung der Proteine hin. Die Abb. 3.11 zeigt, dass die Fluoreszenz des E<sub>8</sub>C-PE38 bis zu einer Temperatur von 38°C linear abnimmt. Ab dieser Temperatur kommt es zu einer verstärkten Abnahme der Fluoreszenz, hervorgerufen von strukturellen Änderungen durch Entfaltung des Proteins.



**Abb. 3.11** Stabilität des B3-PE38 gegenüber thermischer Denaturierung

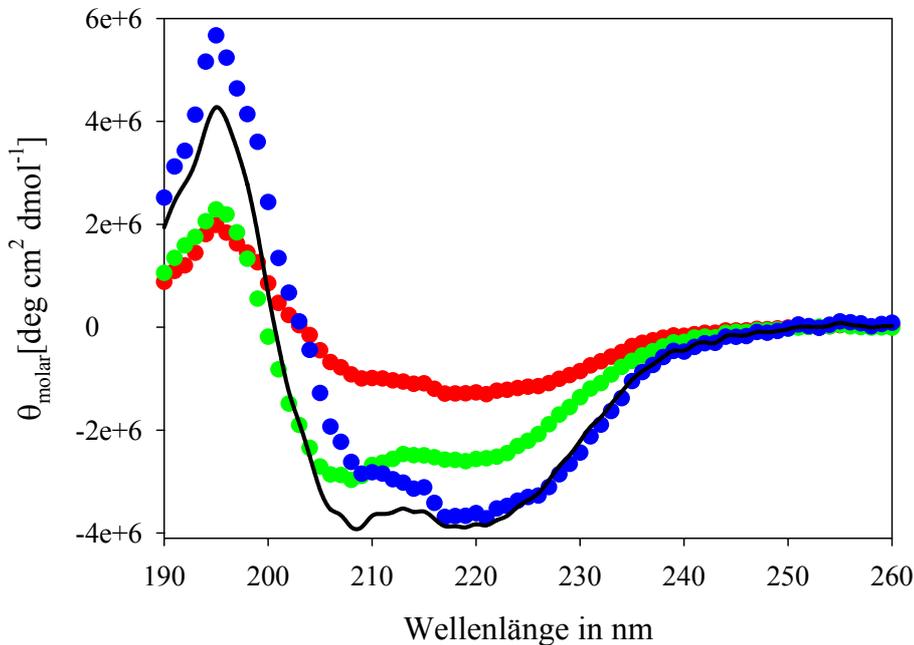
Alle drei Proteine waren jeweils mit einer Konzentration von 50 µg/ml in 50 mM Tris pH 8,2 gelöst. Die Proteinlösungen wurden von 20°C auf 80°C mit einer Heizrate von 0,3 K/min erwärmt. Die Fluoreszenz wurde alle 1 K bei 295 nm angeregt und die Emission bei 340 nm gemessen.

(●) B3-PE38, (●) E<sub>8</sub>C-PE38 und (●) dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP; die gestrichelte Linie repräsentiert die Abnahme der spezifischen Fluoreszenz der Tryptophane in Abhängigkeit von der Temperatur

Das Antikörperfragment dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP ist etwas stabiler. Bei ihm beginnt die Denaturierung bei 48°C, was in einem Anstieg der Fluoreszenz detektiert wurde. Ab 55°C kommt es zu starker Proteinaggregation, wodurch das Fluoreszenzsignal weiter steigt. Das B3-PE38 Immunotoxin zeigt eine vergleichbare thermische Stabilität wie seine isolierten Komponenten. Der Toxin-Anteil denaturiert wie das ungekoppelte E<sub>8</sub>C-PE38 ab einer Temperatur von 38°C. Der Teil des Antikörperfragmentes denaturiert wie das isolierte dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP ab 48°C. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass beide Komponenten unabhängig voneinander entfalten und dass sie sich nicht gegenseitig beeinflussen. Es ist somit möglich, durch die Kopplung von E<sub>8</sub>C-PE38 mit dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP ein strukturell intaktes Immunotoxin zu erzeugen.

### Charakterisierung des Immunotoxins B3-PE38 mittels CD-Spektroskopie

Mit dieser Methode sollte die Frage geklärt werden, ob durch die gerichtete Assoziation und kovalente Verknüpfung zwischen dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und E<sub>8</sub>C-PE38 zusätzliche Interaktionen zwischen den konjugierten Proteinen auftreten. Eine solche Interaktion könnte in veränderten strukturellen Eigenschaften resultieren und müsste mittels CD-Spektroskopie zu analysieren sein. In Abb. 3.12 sind die Fern-UV-CD-Spektren der nicht gekoppelten Einzelkomponenten und die des Konjugates B3-PE38 dargestellt.

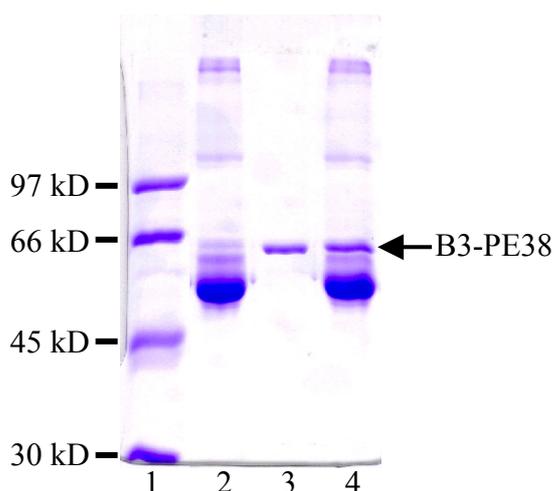


**Abb. 3.12:** Fern-UV-CD-Spektren von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP (●), E<sub>8</sub>C-PE38 (●) und dem Konjugat B3-PE38 (●). Alle Proteine waren gelöst in 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,4. Die Proteinkonzentration betrug für dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP 167 µg/ml, für E<sub>8</sub>C-PE38 219 µg/ml und für das Immunotoxin B3-PE38 144 µg/ml. Die Messung erfolgte in einer Quarzglas-Küvette mit einer Schichtdicke von 1 mm bei 20°C. Das nach der Addition der molaren Elliptizitäten von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und E<sub>8</sub>C-PE38 erhaltene Spektrum ist ebenfalls dargestellt (—).

Die molare Elliptizität wurde nach der in Abschnitt 2.2.5.3 angegebenen Formel aus dem Messsignal berechnet. Die Spektren der Einzelkomponenten zeigen deutliche Unterschiede auf. Das Antikörperfragment zeigt ein typisches Fern-UV-CD-Spektrum für ein  $\beta$ -Faltblatt Protein. Das Spektrum weist ein Minimum des CD-Signals bei einer Wellenlänge von 218 nm auf. Das Fern-UV-CD-Spektrum des E<sub>8</sub>C-PE38 hat ein Minimum der molaren Elliptizität bei 208 nm, was im Einklang mit der bekannten Struktur auf die Existenz von  $\alpha$ -Helices hindeutet. Das Fern-UV-CD-Spektrum des Konjugates B3-PE38 entspricht annähernd der Addition der Spektren der Einzelkomponenten. Die Verschiebung des additiven Signals von dem für das Konjugat gemessenen bei Wellenlängen unterhalb von 216 nm konnte auch für das polyionische Kopplungsprodukt von FabE10C und R10C- $\alpha$ -Gluc beobachtet werden (Richter *et al.*, 2001). Aus den erhaltenen Ergebnissen kann man folgern, dass die Sekundärstrukturelemente von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und E<sub>8</sub>C-PE38 durch die Assoziation und kovalente Verknüpfung mittels polyionischer Fusionspeptide vermutlich nicht beeinflusst werden.

### Untersuchung der Stabilität des B3-PE38 Immunotoxins im Serum

Das Immunotoxin stellt ein potentiell Therapeutikum dar. Um im lebenden Organismus (bzw. in Zellkultur) wirksam zu sein, muss es gegenüber den im Serum befindlichen Proteasen ausreichend stabil sein. Um dies zu untersuchen, wurde B3-PE38 für 1 h bei Raumtemperatur in 10 % fötalem Kälberserum inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Probe mittels SDS-PAGE (vgl. Abb. 3.13).



**Abb. 3.13:** Analyse der Stabilität von B3-PE38 in fötalem Kälberserum

(Alle Proben wurden mit oxidierendem Probenpuffer behandelt und auf einem Coomassie-gefärbten 10 % igen SDS-Gel analysiert)

(1) LMW-Proteinmarker, (2) 10 % (v/v) FCS + 90 % (v/v) PBS, (3) 90 % (v/v) B3-PE38 (470 µg/ml) + 10 % (v/v) PBS, (4) 90 % (v/v) B3-PE38 (470 µg/ml) + 10 % (v/v) FCS. Alle Proben wurden vor der Analyse 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

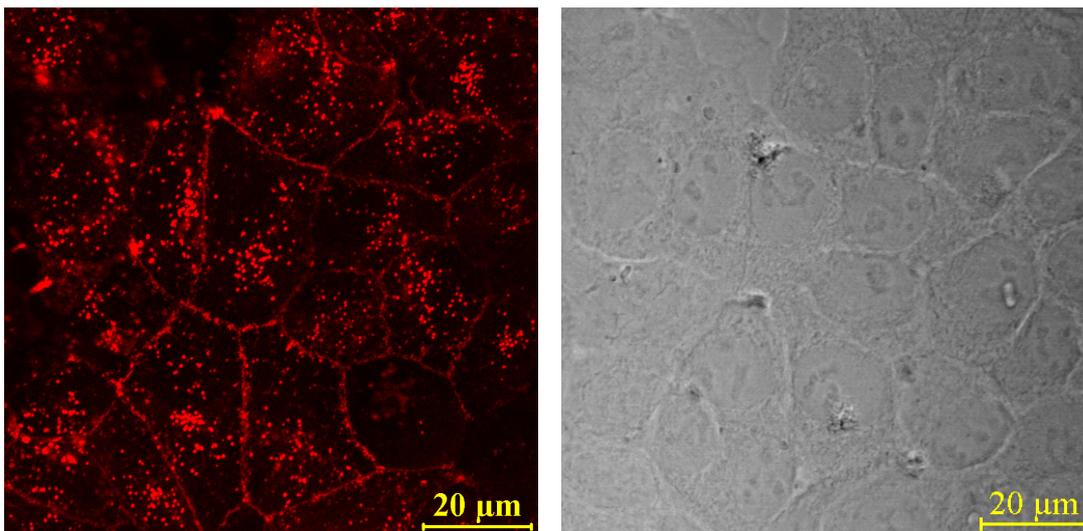
Aus dem SDS-Gel ist ersichtlich, dass es zu keinem proteolytischen Abbau des Immunotoxins bei der Inkubation in fötalen Kälberserum kommt. Somit ist die Stabilität des B3-PE38 für eine Untersuchung der biologischen Aktivität in Zellkulturexperimenten bzw. im lebenden Organismus gewährleistet.

### 3.1.5 Biologische Aktivität des Immunotoxins B3-PE38 in Zellkultur

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass einerseits das Immunotoxin unter physiologischen Bedingungen stabil ist und zum anderen die Kopplung der beiden Komponenten keinen Einfluss auf ihre biologische Aktivität hat. Im Folgenden wird die Wirksamkeit und Spezifität des Immunotoxins B3-PE38 mit der des isolierten E<sub>8</sub>C-PE38 und mit dem B3(dsFv)-PE38 (dieses Immunotoxin ist eine genetische Fusion aus dem disulfidverbrücktem Fv-Fragment des B3-Antikörpers und dem PE38 und befindet sich derzeit in der klinischen Untersuchung (Brinkmann *et al.*, 2001)) verglichen.

#### Nachweis Lewis Y-positiver Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Bevor die biologische Aktivität und Spezifität des B3-PE38 Immunotoxin in Zellkultur-experimenten nachgewiesen werden konnten, musste ermittelt werden, an welche Zellen das dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP bindet. Dazu wurde das mit TexasRed® markierte Antikörperfragment mit verschiedenen Zelllinien inkubiert, um eine spezifische Bindung des B3-TexasRed an die Zellen zu detektieren. Die Präparate der Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

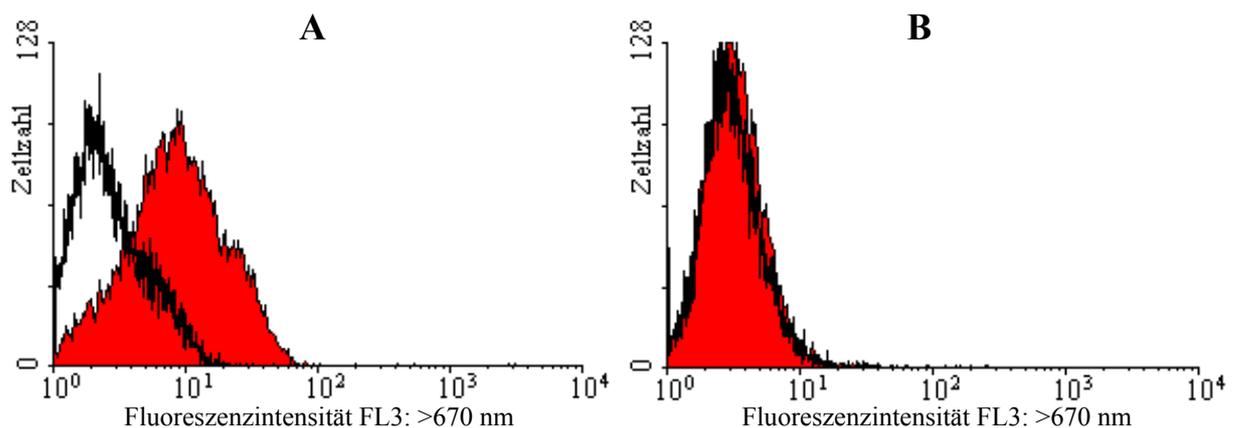


**Abb. 3.14** Aufnahme von MCF7 Zellen, die mit 1,5  $\mu\text{g/ml}$  B3-TexasRed inkubiert wurden.  
**A.** Fluoreszenzlichtaufnahme der MCF7 Zellen (Anregungsfilter: 580 nm, Emissionsfilter: 630 nm)  
**B.** Durchlichtaufnahme des selben Bildausschnittes  
Die Aufnahmen wurden an einem Konfokalem Laserscanning Mikroskop LSM 510 (Zeiss, Jena) gemacht.

Der B3-Antikörper bindet spezifisch an das Lewis Y Antigen auf der Oberfläche verschiedener Krebszelltypen (Pastan *et al.*, 1991). Als erstes wurde die Lewis Y-positive Zelllinie MCF7 auf ihre Bindungsfähigkeit hin zum fluoreszenzmarkierten dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP untersucht. Aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ist ersichtlich, dass die MCF7 Zellen in der Lage sind, B3-TexasRed zu binden. Somit ist diese Zelllinie für den Nachweis der biologischen Aktivität des B3-PE38 Immunotoxins geeignet. Um die Spezifität des Immunotoxins nachzuweisen, ist es notwendig, dessen Toxizität auch mit einer Lewis Y-negativen Zelllinie zu testen. Hierzu wurde die Zelllinie HT-29 auf ihre Fähigkeit hin, das Antikörperfragment zu binden, untersucht. Wie erwartet sind diese Zellen nicht in der Lage, B3-TexasRed und somit den das B3-PE38 spezifisch zu binden (Abb. nicht gezeigt).

### Nachweis Lewis Y-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie

Der Nachweis der Bindung des fluoreszenzmarkierten dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP an verschiedene Zelltypen erfolgte auch mittels Durchflusszytometrie. Die Messung wurde von Florian Kurschus (Martinsried) durchgeführt. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.2.7.5 beschrieben, mit dem B3-TexasRed inkubiert und für die Messung am Durchflusszytometer vorbereitet. Die verschiedenen Zelllinien wurden anschließend vermessen. Die Auswertung erfolgte in Form eines Histogramms. Dabei wurde die Anzahl an Zellen gegen die Fluoreszenzintensität (Emissionskanal FL3: 660 nm) aufgetragen. Als Vergleich wurde das gleiche Experiment mit nicht markierten Zellen durchgeführt (Abb. 3.15).



**Abb. 3.15** Bindung von B3-TexasRed an Zellen

Die trypsinierten Zellen wurden mit PBS, 3 % (v/v) FCS, 0,01 % Natriumazid gewaschen und anschließend für 2 h bei 4°C mit 20 µg/ml B3-TexasRed inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals gewaschen, in 200 µl FACS-Puffer (FACSFlow, Becton-Dickinson, Heidelberg) resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert. Die Fluoreszenz der Zellen wurde bei 488 nm angeregt und die Emission mit Kanal FL3: >670 nm gemessen.

**A.** MCF7 Zellen: (△) Zellen ohne B3-TexasRed, (▲) Zellen, inkubiert mit 20 µg/ml B3-TexasRed  
**B.** HT-29 Zellen: (△) Zellen ohne B3-TexasRed, (▲) Zellen, inkubiert mit 20 µg/ml B3-TexasRed

Wie in Abb. 3.15 A dargestellt, zeigen die MCF7 Zellen nach der Inkubation mit B3-TexasRed eine deutliche Verschiebung der Population zu höheren Fluoreszenzintensitäten. Somit müssen die Zellen in der Lage sein, das Antikörperfragment zu binden. Deswegen wurde MCF7 als Positivzelllinie für die Untersuchung der Toxizität des Immunotoxins B3-PE38 verwendet. Hingegen zeigen die HT-29 Zellen (Abb. 3.15 B) keine Verschiebung der Zellpopulation bei der Inkubation mit dem fluoreszenzmarkiertem Antikörperfragment. Diese Zelllinie bindet dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP nicht, deswegen wurde HT-29 als Negativkontrolle für das Immunotoxin eingesetzt.

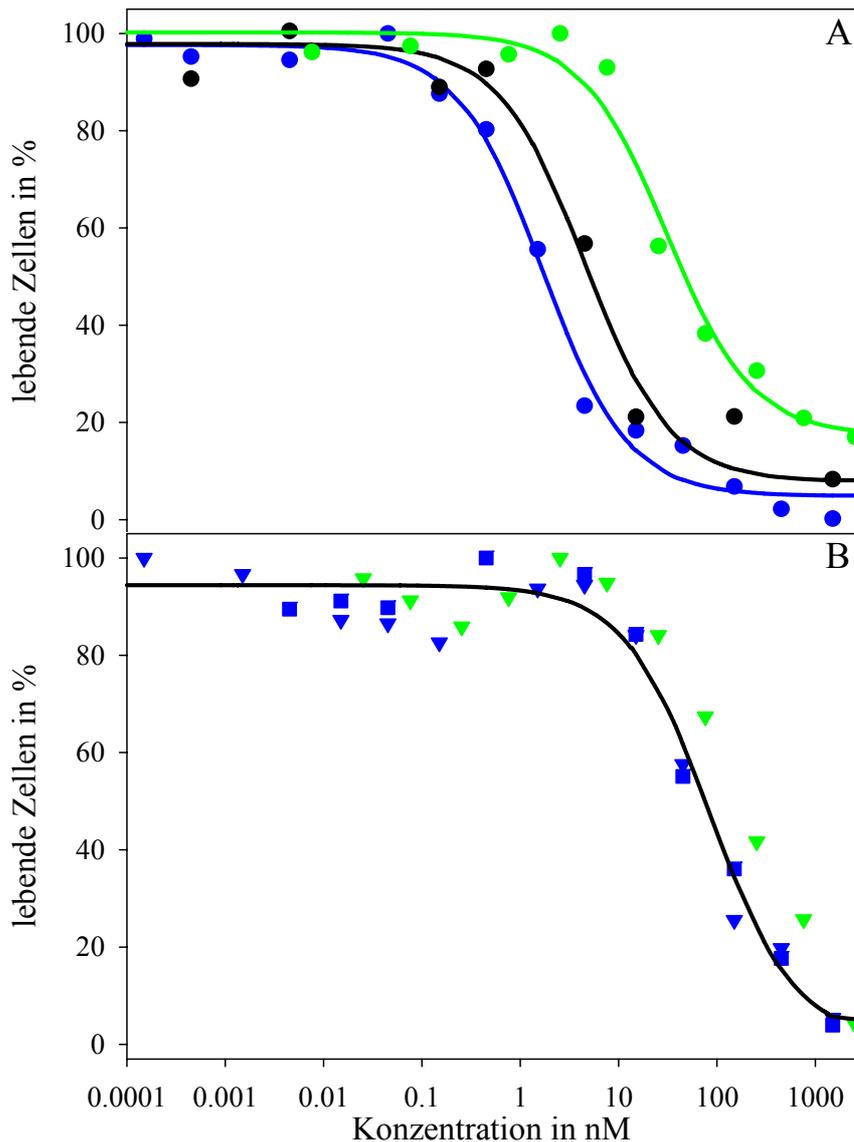
### Cytotoxizität des Immunotoxin B3-PE38

Die Fähigkeit des Immunotoxins B3-PE38, spezifisch Lewis Y-positive Krebszellen zu töten, sollte in mehreren Zellkulturexperimenten untersucht werden. Aus den Daten der Fluoreszenzmikroskopie und der FACS-Analyse war bekannt, welche Zelllinien in der Lage seien müssten, spezifisch das Immunotoxin binden zu können, und welche als Negativkontrollen verwendet werden. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.2.7.7 beschrieben, mit dem jeweiligen Toxin in Konzentrationen von 0,01 ng/ml bis 100000 ng/ml für 48 h bei 37°C inkubiert. Neben dem B3-PE38 wurde zum Vergleich der spezifischen Toxizität das B3(dsFv)-PE38 eingesetzt. Die unspezifische Toxizität wurde durch Experimente mit dem isoliertem E<sub>8</sub>C-PE38 untersucht. Die Auswertung einer Testreihe erfolgte entweder durch einen colorimetrischen Test auf die Lebensfähigkeit der Zellen (vgl. Abschnitt 2.2.7.8) oder durch FACS-Analyse, bei der tote Zellen durch Anfärben mit Propidiumjodid detektiert wurden (vgl. Abschnitt 2.2.7.9). Durch beide Methoden konnte ein prozentualer Anteil lebender Zellen für die jeweilige Toxinkonzentration ermittelt werden (Abb. 3.16 und Abb. 3.17). Aus den gewonnenen Daten wurde der IC<sub>50</sub>-Wert für das Toxin mit der jeweiligen Zelllinie bestimmt (Tab. 3.1).

	MCF7	HT-29	NIH3T3
B3-PE38	1,68 nM (FACS) 7,05 nM (MTT)	75,5 nM (FACS) 63,5 nM (MTT)	83,8 nM (FACS)
B3(dsFv)-PE38	4,52 nM (FACS)		
E <sub>8</sub> C-PE38	137 nM (FACS) 112 nM (MTT)	218 nM (FACS) 107 nM (MTT)	

**Tab. 3.1:** IC<sub>50</sub>-Werte für Immunotoxin B3-PE38, B3(dsFv)-PE38 und isoliertes E<sub>8</sub>C-PE38

Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden aus der Auftragung des prozentualen Anteils an lebenden Zellen gegen die jeweilige Toxinkonzentration, mit Hilfe der in Abschnitt 2.2.7.10 beschriebenen Formel, bestimmt. (FACS) Die Auswertung des Cytotoxizitätstestes erfolgte mittels Propidiumjodidfärbung der Zellen am Durchflusscytometer. (MTT) Die Auswertung des Cytotoxizitätstest erfolgte mittels MTT-Assay.



**Abb. 3.16:** Cytotoxizität von B3-PE38, ausgewertet mittels Durchflusszytometrie

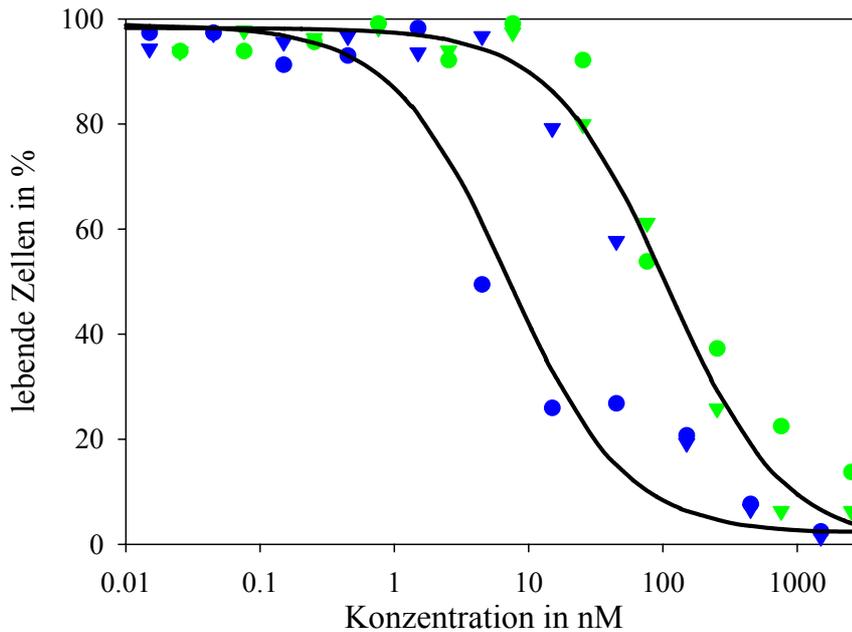
Verschiedene Zelllinien wurden mit dem Immunotoxin B3-PE38 inkubiert, um die Spezifität und biologische Aktivität des Konjugates zu charakterisieren. Es wurden MCF7 als Lewis Y-positive Zelllinie sowie HT-29 und NIH3T3 als Lewis Y-negative Zelllinien für die Untersuchung verwendet. Nachdem die Zellen zu 20 % Konfluenz gewachsen waren, erfolgte eine 48-stündige Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Immunotoxins B3-PE38 oder des isolierten Toxins E<sub>8</sub>C-PE38. Zum Vergleich der biologischen Aktivität wurde der gleiche Versuch mit dem Immunotoxin B3(dsFv)-PE38, bei dem das disulfidverbrückte Fv-Fragment genetisch mit PE38 fusioniert ist, durchgeführt. Anschließend wurde der Anteil an noch lebenden Zellen durch FACS-Analyse ermittelt. Aus den hier dargestellten Daten wurden die IC<sub>50</sub>-Werte für die jeweiligen Toxine und Zelllinien berechnet (vgl. Tab. 3.1)

**A.** Effekt des Immunotoxins B3-PE38 auf MCF7 Zellen

(●) B3-PE38, (●) B3(dsFv)-PE38, (●) E<sub>8</sub>C-PE38

**B.** Effekt des Immunotoxins B3-PE38 auf Lewis Y-negative Zellen

(▼) HT-29 inkubiert mit B3-PE38, (▼) HT-29 inkubiert mit E<sub>8</sub>C-PE38, (■) NIH3T3 inkubiert mit B3-PE38



**Abb. 3.17:** Cytotoxizität von B3-PE38, ausgewertet mittels MTT-Assay

Die Lewis Y-positive Zelllinie MCF7 und die Lewis Y-negative Zelllinie HT-29 wurden mit dem Immunotoxin B3-PE38 inkubiert, um dessen Spezifität und biologische Aktivität nachzuweisen. Dazu wurden die Zellen bei 20 % Konfluenz für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen des B3-PE38 oder des E<sub>8</sub>C-PE38 inkubiert. Anschließend wurden 50 µl 5 mg/ml MTT, gelöst in PBS, zu 1 ml Medium in jedes Well pipettiert. Die Farbreaktion erfolgte bei 37°C über 2 h. Danach wurde der Formazan-Farbstoff, der sich in den Zellen akkumuliert hatte, in 500 µl Zell-Lysepuffer gelöst, mit 1000 µl Zell-Lysepuffer ohne SDS verdünnt und die Absorption bei 570 und 630 nm vermessen. Die Absorptionsintensität ist ein Maß für die Anzahl an noch lebenden Zellen und wurde auf eine prozentuale Skala normiert und gegen die jeweilige Toxinkonzentration aufgetragen. Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte sind in Tab. 3.1 zusammengefasst.

(●) MCF7 inkubiert mit B3-PE38, (●) MCF7 inkubiert mit E<sub>8</sub>C-PE38, (▼) HT-29 inkubiert mit B3-PE38, (▼) HT-29 inkubiert mit E<sub>8</sub>C-PE38

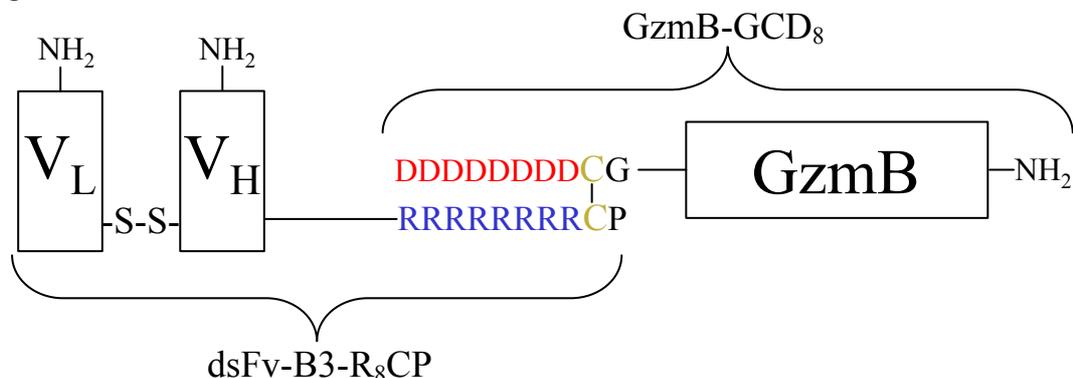
Das Immunotoxin B3-PE38 wurde auf seine Fähigkeit hin untersucht, spezifisch Tumorzellen zu töten. Die Inkubation des B3-PE38 mit der Lewis Y-positiven Zelllinie MCF7 zeigte ein effizientes Abtöten der Zellen. Aus der FACS-Analyse der Toxintitration konnte ein IC<sub>50</sub>-Wert von 1,68 nM berechnet werden. Eine ähnliche Toxizität zeigte das Immunotoxin B3(dsFv)-PE38, bei dem das disulfidverbrückte Fv-Fragment des B3 genetisch mit dem PE38 fusioniert wurde (Reiter *et. al.*, 1994), mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 4,52 nM. Im Gegensatz dazu zeigte das isolierte Toxin E<sub>8</sub>C-PE38 keine Zelltyp-spezifische Toxizität. Lediglich bei hohen Toxinkonzentrationen (IC<sub>50</sub>= 47,5 nM) konnte ein Abtöten der Zellen beobachtet werden (vgl. Abb. 3.15 A). Bei Lewis Y-negativen Zellen konnte kein spezifischer cytotoxischer Effekt beobachtet werden. Die IC<sub>50</sub>-Werte für das Immunotoxin B3-PE38 sowie das isolierte E<sub>8</sub>C-PE38 lagen bei diesen Zellen zwischen 75,5 und 218 nM, was auf eine lediglich unspezifische Toxizität zurückzuführen ist (vgl. Abb. 3.15 B). Mittels MTT-Assay konnten die durch FACS-Analyse erhaltenen Ergebnisse verifiziert werden (vgl. Abb. 3.16).

Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das polyionische Immunotoxin B3-PE38 in der Lage ist, aufgrund seines gekoppelten Antikörperfragmentes spezifisch Zellen mit dem entsprechenden Antigen zu töten. Des Weiteren konnte die gleiche Cytotoxizität wie für das genetisch gekoppelte Immunotoxin B3(dsFv)-PE38 nachgewiesen werden. Somit ist die Kopplung eines Tumor-spezifischen Antikörperfragmentes mit einem Toxin mittels der polyionischen Fusionspeptide eine sehr effiziente Methode, biologisch aktive und Zelltyp-spezifische Immunotoxine herzustellen.

### 3.2 Immunotoxin B3-GzmB

Um die Modularität der spezifischen Heterodimerisierung mittels polyionischer Fusionspeptide nachzuweisen, wurde ein weiteres Immunotoxin auf der Basis des disulfidverbrückten Fv-Fragmentes des B3 und des rekombinant hergestellten Granzym B entwickelt. Granzym B ist eine Apoptose induzierende Serinprotease aus cytotoxischen T-Lymphozyten (Barry *et al.*, 2002; Fröhlich *et al.*, 1998). Das natürliche glykosylierte Granzym B enthält Mannose-6-Phosphat. Die Aufnahme in Zellen erfolgt über den Kation-unabhängigen Mannose-6-Phosphat / *insulin like growth factor*-Rezeptor (CI-MPR) mit Hilfe des Membran-auflösenden Perforins (Lieberman, 2003). Im Cytosol aktiviert es die Apoptose über verschiedene Caspase-abhängige sowie Caspase-unabhängige Signalkaskaden. Hingegen bindet das rekombinant hergestellte, nicht-glykosylierte Granzym B (GzmB) nicht an den CI-MPR und induziert somit keine Apoptose.

Der C-Terminus des rekombinanten Granzym B wurde um das polyionische Fusionspeptid GlyCys(Asp)<sub>8</sub> verlängert (GzmB-GCD<sub>8</sub>). Wie schon bei B3-PE38 erfolgte die Herstellung des Immunotoxin B3-GzmB durch die spezifische Heterodimerisierung der beiden Fusionspeptide an den C-Termini vom B3-Antikörperfragment und Granzym B (vgl. Abb. 3.18). In den folgenden Kapiteln wird die Kopplung des dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP mit GzmB-GCD<sub>8</sub>, und die Reinigung des resultierenden Immunotoxins B3-GzmB beschrieben.



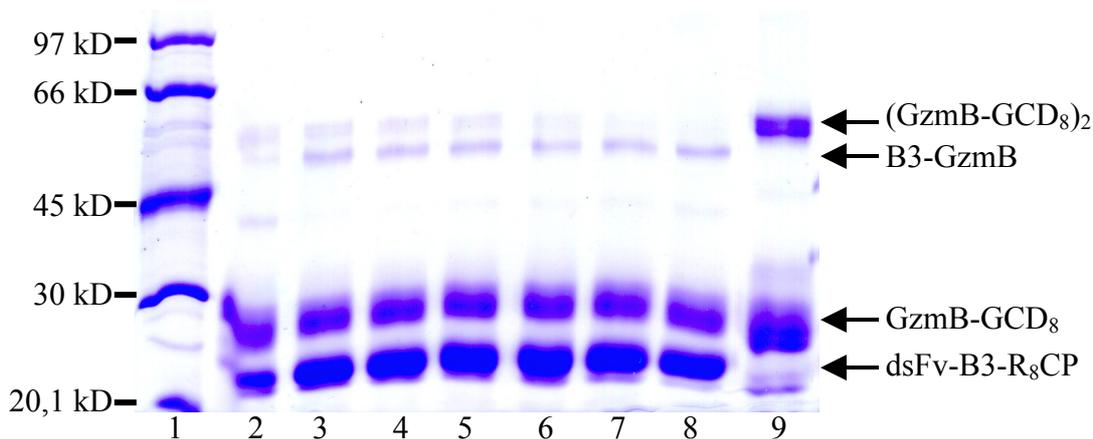
**Abb. 3.18:** Schematische Darstellung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und GzmB-GCD<sub>8</sub> in gekoppelter Form als Immunotoxin B3-GzmB

Der Nachweis der enzymatischen bzw. biologische Aktivität des B3-GzmB erfolgte *in vitro* und in Zellkulturexperimenten. Die Entwicklung und Charakterisierung des polyionischen Immunotoxins B3-GzmB erfolgte in Kooperation mit Florian Kurschus (Arbeitsgruppe Dieter Jenne, Martinsried).

### 3.2.1 Herstellung des modularen Immunotoxins B3-GzmB

Die Präparation aller rekombinanten Varianten des Granzym B erfolgte nach der Methode von Wilharm *et al.* (1999). Die Rückfaltung von pro-Granzym B erfolgte jedoch in Abwesenheit von  $\text{CaCl}_2$  bei pH 7,3, nach Initiation bei Raumtemperatur, über 24 h bei 4°C. Das rückgefaltete pro-Granzym B wurde mittels eines Kationentauschers (SOURCE 15, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gereinigt und durch DTE voraktiviertes Rinder-Cathepsin C (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) über Nacht bei 30°C in die aktive Form konvertiert. Das Cathepsin C wurde vom konvertierten Granzym B mittels der SOURCE 15 abgetrennt. Das gereinigte, konvertierte Granzym B wurde gegen PBS pH 7,4 dialysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

In Abschnitt 3.1.3 wurde die Kopplung des dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP mit E<sub>8</sub>C-PE38 beschrieben. Die in diesem Abschnitt erwähnten Reaktionsbedingungen sollten auch auf die Kopplung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP mit GzmB-GCD<sub>8</sub> übertragbar sein. Die Kopplung beider Proteine kann nur in einem Puffer mit niedriger Ionenstärke unter oxidierenden Bedingungen bei einem pH-Wert von über 7,0 erfolgen. Zunächst wurde versucht, dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und GzmB-GCD<sub>8</sub> unter den Bedingungen, wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, miteinander zu verknüpfen (vgl. Abb. 3.19).

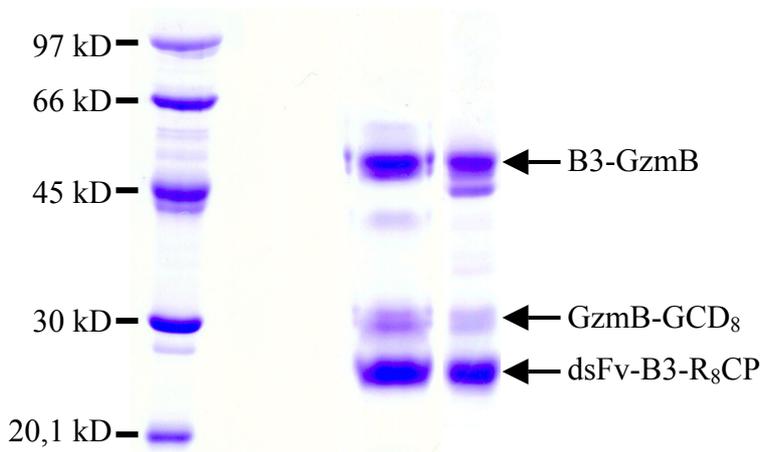


**Abb. 3.19:** Kinetik der Kopplung von GzmB-GCD<sub>8</sub> und dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP

Die Reaktion erfolgte in 20 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 8,0 bei Raumtemperatur; die Proteinkonzentration lag bei jeweils 9 µM. (Alle Proben wurden mit Jodacetamid inkubiert und mit oxidierendem Probenpuffer behandelt und auf einem Coomassie-gefärbten 12 % igen SDS-Gel analysiert)

(1) LMW-Proteinmarker, (2)-(8) Proben aus dem Kopplungsansatz, entnommen nach: 0 min (direkt vor Zugabe von GSSG), 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 24 h, (9) Probe des GzmB-GCD<sub>8</sub>, (GzmB-GCD<sub>8</sub>)<sub>2</sub> ist das Homodimer des Granzym B.

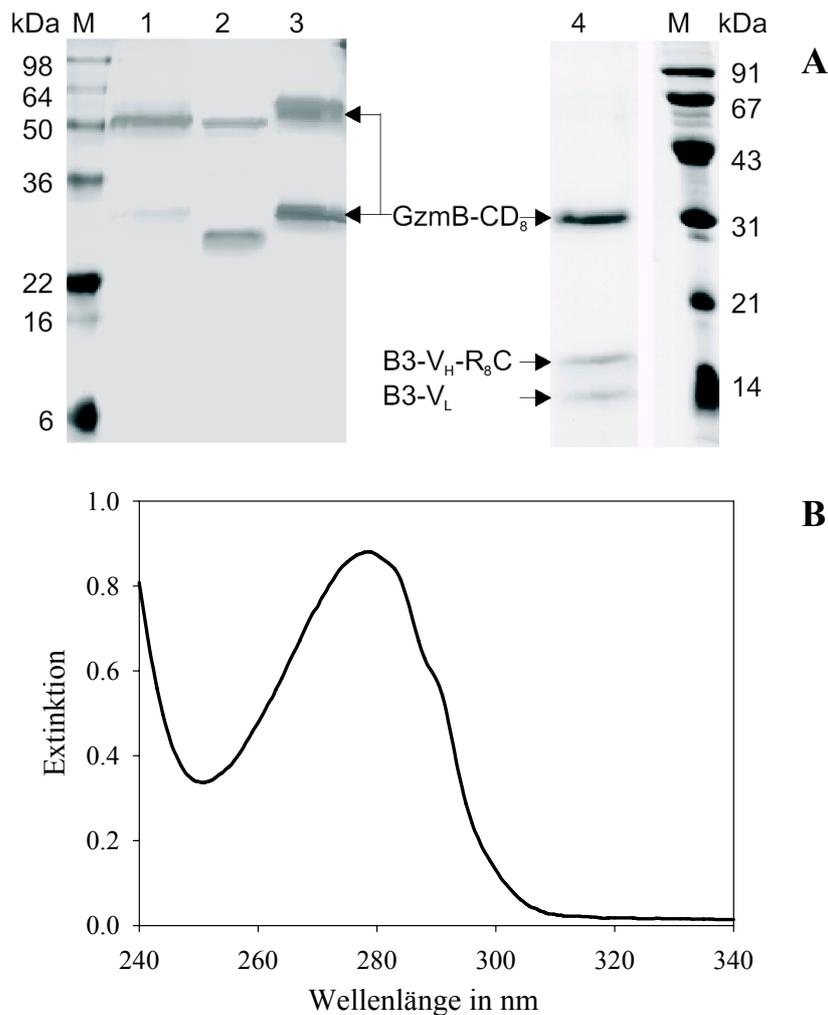
Wie in Abb. 3.19 zu erkennen, lag die Ausbeute an Kopplungsprodukt B3-GzmB unter 1 %. Dies war viel zu wenig, um unter diesen Bedingungen die beiden Proteine im präparativen Maßstab zu koppeln. Die niedrige Effizienz der Assoziation liegt daran, dass das negativ geladene Fusionspeptid des GzmB-GCD<sub>8</sub> mit dem sonst positiv geladenen Protein über elektrostatische Wechselwirkungen interagiert. Dadurch wird die polyionische Fusion und somit auch das freie Cystein für das polyionische Fusionspeptid des dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP nur schwer zugänglich. Die ganze Kopplungsreaktion verläuft deswegen sehr langsam. Es konnte auch nach zwei Wochen weiterer Inkubation des Ansatzes keine Steigerung der Kopplungsausbeute detektiert werden. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die freien Cysteine der Fusionspeptide durch das Glutathion des *oxidoshuffling*-System blockiert sind und somit keine Kopplung mehr stattfinden kann. Deswegen wurde versucht die Kopplung ohne Redoxsystem zu katalysieren. In einem Ansatz wurden die beiden Kopplungspartner durch 1 mM GSH bei pH 8,0 reduziert und das Glutathion durch Dialyse gegen 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA pH 4,5 entfernt. Anschließend wurden GzmB-GCD<sub>8</sub> und dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP im molaren Verhältnis von 1:2 gemischt und gegen 2 l 20 mM Tris, 10 µM CuCl<sub>2</sub> pH 8,0 über 5 Tage bei 4°C dialysiert. Danach wurde eine Probe des Ansatzes mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.20). Dieser experimentelle Ansatz führte zu einer nahezu quantitativen Kopplung. Da die Kopplung durch Luftoxidation, katalysiert durch Kupferionen, allerdings sehr lang dauerte, wurde versucht die Reaktion durch Aktivierung des freien Cysteins eines der Kopplungspartner zu beschleunigen. Dazu wurden GzmB-GCD<sub>8</sub> und dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP, wie in Abschnitt 2.2.4.12 beschrieben, zunächst getrennt durch 1 mM GSH bei pH 8,0 reduziert. Anschließend erfolgte die Abtrennung des Glutathions durch Dialyse gegen 2x 2 l 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA pH 4,5. Danach wurde das freie Cystein der polyionischen Fusion von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP durch DTP aktiviert. Die Kopplungsreaktion erfolgte nach Abtrennen des freien DTP durch Zugabe von reduziertem GzmB-GCD<sub>8</sub> bei pH 8,1 für 2 h bei Raumtemperatur, anschließend über Nacht bei 4°C. Danach wurde eine Probe des Ansatzes mittels SDS-PAGE analysiert (vgl. Abb. 3.20).

**Abb. 3.20:**

Kopplung von GzmB-GCD<sub>8</sub> mit dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP durch Luftoxidation bzw. chemische Aktivierung  
 Für beide Kopplungsmethoden wurden beide Proteine getrennt durch 1 mM GSH bei pH 8,0 reduziert und das Reduktionsmittel durch Dialyse gegen 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA pH 4,5 entfernt. Nachdem GzmB-GCD<sub>8</sub> und dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP in einem molaren Verhältnis von 1:3 gemischt wurden, erfolgte die Kopplung durch Luftoxidation durch Dialyse gegen 20 mM Tris, 10 µM CuCl<sub>2</sub>, pH 8,0 über 5 Tage bei 4°C. Für die andere Kopplungsmethode wurde das C-terminale freie Cystein des dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP durch einen 10-fachen molaren Überschuss an DTP bei pH 8,1 für 1 h aktiviert. Nachdem das freie DTP mittels Gelfiltration abgetrennt wurde, erfolgte die Kopplung durch Zugabe von reduziertem GzmB-GCD<sub>8</sub> zum aktivierten dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP in einem molaren Verhältnis von 1:3 zunächst 2 h bei RT, anschließend über Nacht bei 4°C. (Alle Proben wurden mit Jodacetamid inkubiert und mit oxidierendem Probenpuffer behandelt und auf einem Coomassie-gefärbten 12 %igen SDS-Gel analysiert)

(1) LMW-Proteinmarker, (2) Kopplung von GzmB-GCD<sub>8</sub> und dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP durch chemische Aktivierung und (3) mittels Luftoxidation, katalysiert durch Cu<sup>2+</sup> Ionen.

Wie in Abb. 3.20 zu erkennen, liegt die Kopplungsausbeute bei beiden Methoden über 80 %. Deswegen wurde die Kopplung im präparativen Maßstab unter den optimierten Bedingungen mittels chemischer Aktivierung des C-terminalen Cysteins des dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP durchgeführt. Die Reinigung des resultierenden Immunotoxins B3-GzmB erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4.12 beschrieben (Abb. 3.21 A). Im Anschluss wurde das gereinigte B3-GzmB mittels Ultrafree®-4 Zentrifugalkonzentrators aufkonzentriert und gegen 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl pH 7,4 dialysiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messen des UV-Spektrums (Abb. 3.21 B). Aus 2620 µg dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und 792 µg GzmB-GCD<sub>8</sub> konnten 572 µg gereinigtes B3-GzmB hergestellt werden.



**Abb. 3.21:** Herstellung und Reinigung des Immunotoxins B3-GzmB

**A.** Die Herstellung von B3-GzmB erfolgte mit Hilfe chemischer Aktivierung durch DTP wie in der Legende in Abb. 3.20 dargestellt. Die Poros HS Säule, äquilibriert mit 50 mM Tris pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, wurde mit dem Kopplungsansatz beladen und mit Äquilibrierungspuffer gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte in einem linearen Gradienten von 0,2 bis 3 M NaCl über 150 Säulenvolumen. Das Immunotoxin B3-GzmB eluierte bei einer Leitfähigkeit von 56 mS/cm. Die nicht gekoppelten Komponenten eluierten vorher bei niedrigeren Salzkonzentrationen. (Die Proben der Spuren 1-3 wurden mit oxidierendem Probenpuffer behandelt und auf einem Silber-gefärbten 15 %igen SDS-Gel analysiert. Die Probe der Spur 4 wurde mit reduzierendem Probenpuffer behandelt und auf einem Coomassie-gefärbten 15 %igen SDS-Gel analysiert).

(M) Proteinmarker, (1) gereinigtes B3-GzmB (unter oxidierenden Bedingungen aufgetragen), (2) dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP (obere Bande ist das entsprechende Homodimer), (3) GzmB-GCD<sub>8</sub> (obere Bande ist das entsprechende Homodimer), (4) gereinigtes B3-GzmB (unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen)

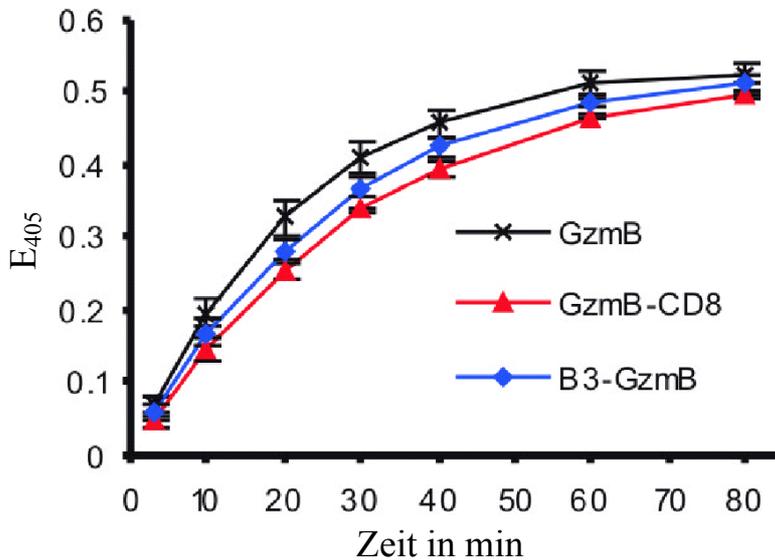
**B.** UV-Spektrum des gereinigten B3-GzmB

### 3.2.2 Untersuchung der *in vitro* Aktivität des B3-GzmB

Wie schon beim Immunotoxin B3-PE38 sollte herausgefunden werden, ob die Kopplung der Komponenten GzmB-GCD<sub>8</sub> und dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP einen Einfluss auf die biologische Wirksamkeit des Granzym B hat. Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die biologische Aktivität des GzmB-GCD<sub>8</sub> im Plasma und mit bestimmten Proteaseinhibitoren verhält.

### Enzymatische Aktivität von GzmB, GzmB-GCD<sub>8</sub> und B3-GzmB

Wie schon erwähnt, ist das Granzym B eine Serinprotease, die Sequenz-spezifisch hinter einem Aspartat das Substrat spaltet. Wie schon in Abschnitt 2.2.4.13 beschrieben, kann diese Reaktion durch Verwendung des Peptides Ac-IEPD-pNA als Substrat spektroskopisch verfolgt werden (vgl. Abb. 3.22).



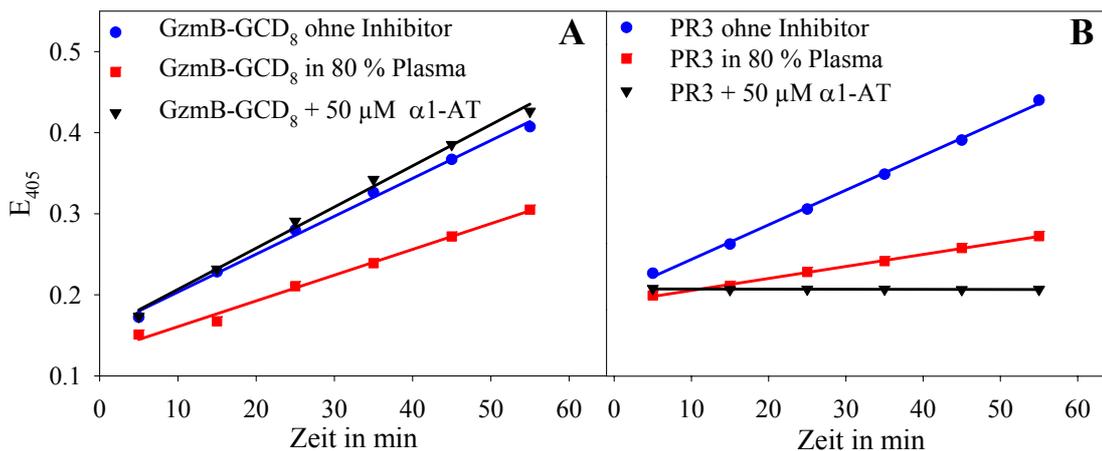
**Abb. 3.22:** Enzymatische Aktivität von B3-GzmB

Der enzymatische Test fand in 100 mM Tris pH 8,1, 100 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Triton X-100 mit 250  $\mu$ M Ac-IEPD-pNA (*Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden*) statt bei RT. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 nM GzmB, GzmB-GCD<sub>8</sub> oder B3-GzmB gestartet. Die Absorption des entstehenden Farbstoffs pNA wurde bei 405 nm mit einem Dynatech MR4000 *plate reader* über die Zeit analysiert.

Aus dem Verlauf der Produktbildungskurven in Abb. 3.22 ist zu erkennen, dass weder das polyionische Fusionspeptid GCD<sub>8</sub>, noch die Kopplung des dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP an das GzmB-GCD<sub>8</sub>, einen signifikanten Einfluss auf die enzymatische Aktivität des GzmB ausübt.

### Test der Aktivität von GzmB-GCD<sub>8</sub> im Plasma

Ein Problem für die Anwendung von GzmB als potentielles Therapeutikum ist dessen Inaktivierung durch extrazelluläre Protease-Inhibitoren, die sich im humanen Plasma befinden. Deshalb wurde die enzymatische Aktivität des rekombinanten GzmB-GCD<sub>8</sub> in humanem Plasma und in Anwesenheit von  $\alpha$ 1-Antitrypsin ( $\alpha$ 1-AT), einem Serin-Protease-Inhibitor des Plasmas, bestimmt (Abb. 3.23 A). Zum Vergleich wurde das gleiche Experiment mit Proteinase 3 (PR3), einer neutralen Serinprotease, welche u.a. in den azurophilen Granula von neutrophilen Granulozyten vorkommt, durchgeführt (Abb. 3.23 B).



**Abb. 3.23:** Aktivität von GzmB-GCD<sub>8</sub> in Plasma

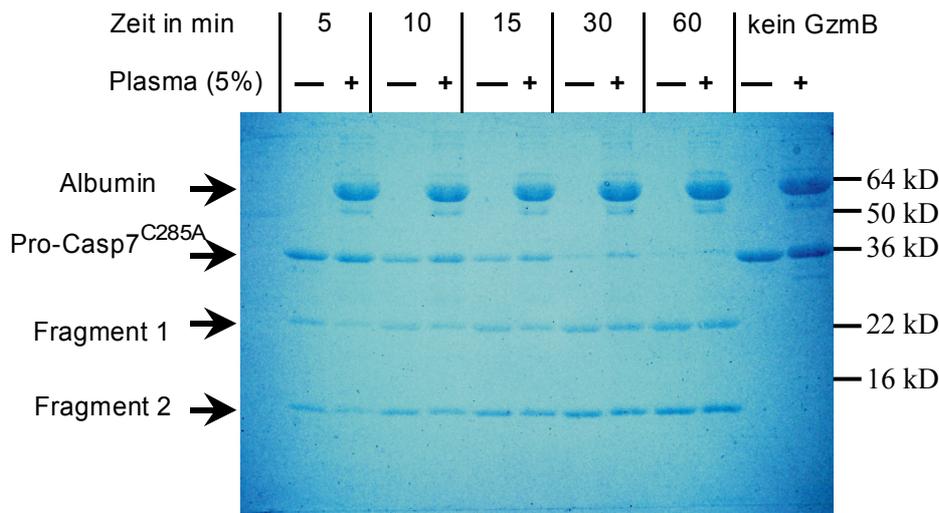
GzmB-GCD<sub>8</sub> bzw. PR3 wurden für 20 min bei 37°C ohne Inhibitor, in humanem EDTA-Plasma oder mit 50 μM α1-AT inkubiert.

**A.** Nach der Inkubation wurde die Aktivität von GzmB-GCD<sub>8</sub> (200 nM) in 100 mM Tris pH 8,1, 100 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Triton X-100 mit 250 μM Ac-IEPD-pNA (*Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden*) bestimmt. Die Absorption bei 405 nm wurde mit einem Dynatech MR4000 *plate reader* über die Zeit analysiert.

**B.** Nach der Inkubation wurde die Aktivität von PR3 (200 nM) in 100 mM Tris pH 8,1, 100 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Triton X-100 mit 1 mM MeOSuc-AAPV-pNA (*Bachem*) bestimmt. Die Absorption wurde mit einem Dynatech MR4000 *plate reader* über die Zeit analysiert.

Die Inkubation des GzmB-GCD<sub>8</sub> mit dem humanen EDTA-Plasma führte zu einer moderaten Verringerung der Aktivität um 30 %. Hingegen fand keine Inhibition durch das α1-AT statt. Die Aktivität der Serin-Protease PR3 nach der Inkubation mit dem humanen EDTA-Plasma verringerte sich um 70 %. Im Gegensatz zum GzmB-GCD<sub>8</sub> wurde die PR3 vollständig durch das α1-AT inhibiert.

Während der Inkubation mit dem Plasma können sich GzmB-α2-Makroglobulin-Komplexe ausbilden. In diesen Komplexen ist GzmB in der Lage, lediglich kleine Substratmoleküle, jedoch keine makromolekularen Substrate zu hydrolysieren. Um zu untersuchen, ob GzmB in humanen Plasma auch makromolekulare Substrate enzymatisch spalten kann, wurde die Fähigkeit zur Aktivierung von Pro-Caspase 7 durch GzmB durch Inkubation ohne bzw. mit 5 % humanen Plasmas analysiert (Abb. 3.25).



**Abb. 3.25:** Aktivierung von Pro-Caspase 7 durch GzmB

GzmB wurde für 30 min bei RT mit 5 % humanen Plasma vorinkubiert. Anschließend wurde Pro-CASP7<sup>C285A</sup> zugegeben. In dem Testansatz befanden sich 5 % humanes Plasma, 50 nM GzmB und 50  $\mu$ M Pro-CASP7<sup>C285A</sup>. Proben vom Ansatz wurden nach 5, 10, 15, 30 und 60 min entnommen. Als Kontrolle wurde Pro-CASP7<sup>C285A</sup> ohne GzmB, mit und ohne Plasma inkubiert. Die Proben wurden mit reduzierendem Probenpuffer behandelt und durch ein Coomassie-gefärbtes 15 %iges SDS-Gel analysiert. Als Substrat für GzmB wurde die katalytisch inaktive Mutante C285A der Pro-Caspase 7 verwendet, um eine autokatalytische Aktivierung auszuschließen (Riedl *et al.*, 2001).

Wie in Abb. 3.25 zu erkennen ist, führt die Inkubation von GzmB mit 5 % humanem Plasma zu einer verzögerten Aktivierung der Pro-CASP7<sup>C285A</sup> im Vergleich mit der Aktivierung durch das unbehandelte GzmB. Nach 60 min sind auch in Anwesenheit von humanem Plasma nur noch die beiden Fragmente als Produkte der Substrat-Hydrolyse auf dem SDS-Gel zu erkennen. Die Inkubation von Pro-CASP7<sup>C285A</sup> ohne GzmB, ob mit oder ohne Plasma, zeigt keine Spaltung des Proteins, die auf dem Gel detektierbar ist. Trotz der Anwesenheit von humanem Plasma ist GzmB immer noch in der Lage Pro-CASP7 zu hydrolysieren. Somit ist die Inaktivierung von GzmB durch Assoziation mit  $\alpha$ 2-Makroglobulin für dessen biologische Aktivität nicht relevant.

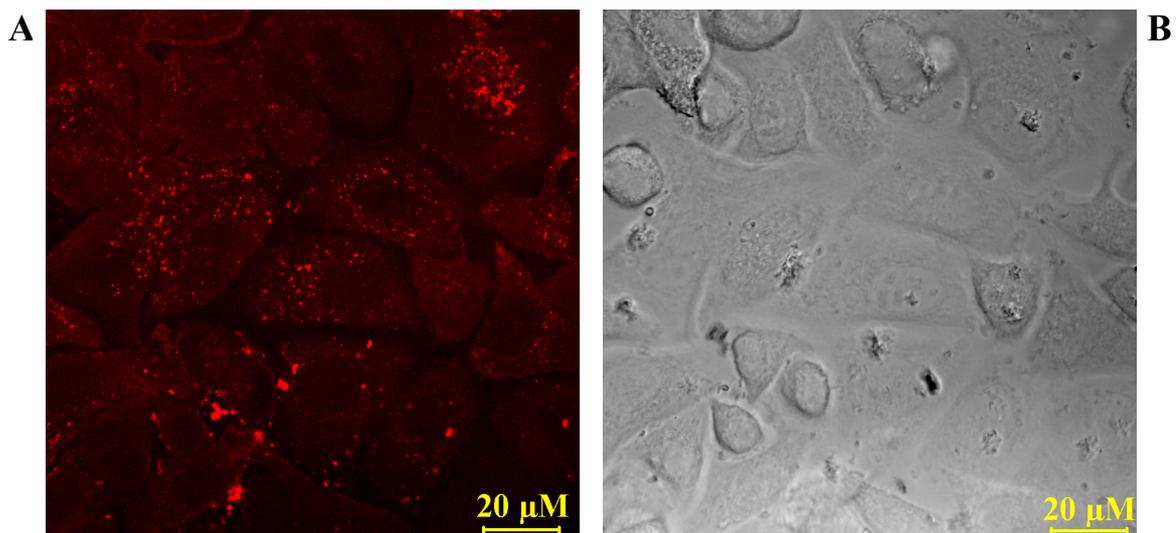
Die Daten zur *in vitro* Aktivität des B3-GzmB, GzmB-GCD<sub>8</sub> und GzmB zeigen, dass zum einen die Kopplung des Antikörperfragmentes keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität hat. Die Inkubation mit  $\alpha$ 1-AT zeigte keinen Einfluss auf die Aktivität von GzmB-GCD<sub>8</sub>. Die Anwesenheit von humanem Plasma führte lediglich zu einer moderaten Abnahme der Aktivität. Somit ist durch die verschiedenen *in vitro* Experimente gezeigt worden, dass B3-GzmB für eine Untersuchung der biologischen Aktivität in Zellkulturexperimenten bzw. im lebenden Organismus geeignet ist.

### 3.2.3 Biologische Aktivität des Immunotoxins B3-GzmB in Zellkultur

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass das GzmB im Kontext des Immunotoxins auch unter physiologischen Bedingungen noch seine enzymatische Aktivität aufweist. Um die Cytotoxizität und Spezifität des Immunotoxins B3-GzmB zu untersuchen, wurde B3-GzmB in verschiedenen Zellkulturexperimenten auf seine biologische Aktivität hin analysiert.

#### Nachweis Lewis Y-positiver Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Der Nachweis der biologischen Aktivität des Immunotoxins B3-PE38 wurde mit der Lewis Y-positiven Zelllinie MCF7 durchgeführt. Diese Zellen sind jedoch nicht sensibel gegen Granzym B, da sie eine Defizienz im Gen für Caspase 3 besitzen. Die Caspase 3 ist der wichtigste Mediator für die apoptotische Wirkung von GzmB (Darmon *et al.*, 1995). Deswegen wurde eine andere Lewis Y-positive Zelllinie gesucht, die eine intakte Caspase 3 besitzt. Dazu wurden wiederum verschiedene Zelllinien mit dem TexasRed® markierten Antikörperfragment (B3-TexasRed) inkubiert, um die spezifische Bindung an die Zellen zu detektieren. Die Präparate der Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 3.26). Wie schon in Abschnitt 3.1.5 erwähnt, bindet der B3-Antikörper an das Lewis Y-Antigen auf der Oberfläche von verschiedenen Krebszelltypen. Die Zelllinie SK-BR3 ist in der Literatur nicht als Lewis Y-positiv beschrieben. Jedoch konnte durch die Inkubation mit dem B3-TexasRed mittels Fluoreszenzmikroskopie eine Bindung nachgewiesen werden.

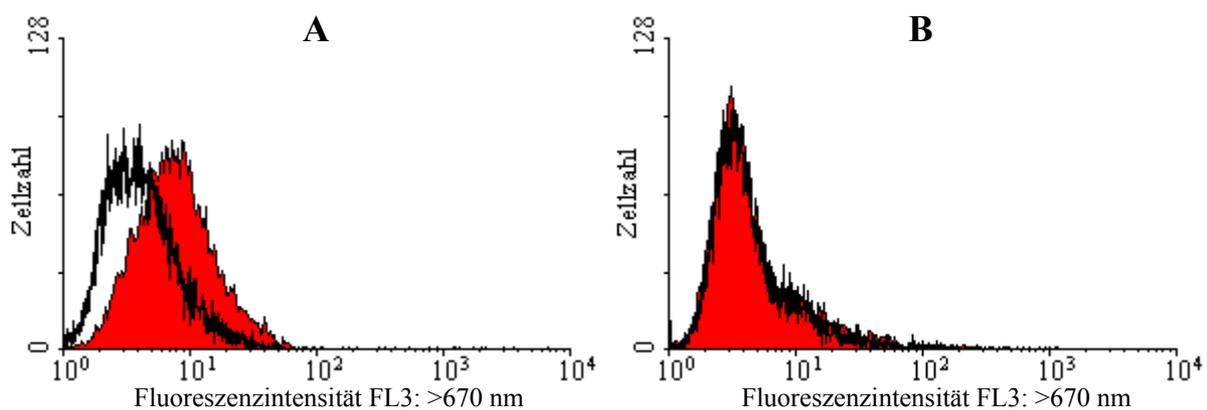


**Abb. 3.26:** Aufnahme von SK-BR3 Zellen, die mit 1,5  $\mu\text{g/ml}$  B3-TexasRed inkubiert wurden.  
**A.** Fluoreszenzaufnahme der SK-BR3 Zellen (Anregungsfilter: 580 nm, Emissionsfilter: 630 nm)  
**B.** Durchlichtaufnahme des selben Bildausschnittes  
Die Aufnahmen wurden an einem Konfokalem Laserscanning Mikroskop LSM 510 (Zeiss, Jena) gemacht.

Die Fluoreszenz ist sichtbar schwächer als die von unter gleichen Bedingungen markierten MCF7 Zellen, was auf weniger gebundene Antikörpermoleküle pro Zelle und damit geringere Anzahl auf der Zelloberfläche präsentierte Lewis Y-Moleküle schließen lässt. Es sollte trotzdem ein Unterschied in der Toxizität zwischen dem Immunotoxin B3-GzmB und dem isolierten GzmB-GCD8 detektierbar sein. Die Spezifität des B3-GzmB sollte mit einer Lewis Y-negativen Zelllinie überprüft werden. Hierzu wurden A431 Zellen auf ihre Fähigkeit hin, das Antikörperfragment zu binden, untersucht. In der Literatur ist A431 als Lewis Y-positive Zelllinie beschrieben (Pastan *et al.*, 1991). Es konnte jedoch keine Bindung des B3-TexasRed detektiert werden (Abb. nicht gezeigt). Somit sollten diese Zellen nicht in der Lage sein, B3-GzmB spezifisch zu binden.

### Nachweis Lewis Y-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie

Der Nachweis der Bindung des fluoreszenzmarkierten dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP an verschiedene Zelltypen erfolgte auch mittels FACS-Analyse. Wie in Abschnitt 2.2.7.5 beschrieben, wurden die Zellen mit B3-TexasRed inkubiert und für die Messung am Durchflusszytometer vorbereitet. Die Zellen wurden anschließend vermessen (vgl. Abschnitt 2.2.7.9). Die Auswertung erfolgte in Form eines Histogramms (Abb. 3.27). Dabei wurde die Anzahl an Zellen gegen die Fluoreszenzintensität (Emissionskanal FL3: >670 nm) aufgetragen. Als Vergleich wurde das gleiche Experiment mit nicht markierten Zellen durchgeführt. Wie aus Abb. 3.27 hervorgeht, zeigen die SK-BR3 Zellen nach der Inkubation mit B3-TexasRed eine Verschiebung der Population zu höheren Fluoreszenzintensitäten. Wie zu erwarten war, ist diese Verschiebung jedoch nicht so stark wie bei MCF7 Zellen.



**Abb. 3.27:** Bindung von B3-TexasRed an Zellen

Die trypsinisierte Zellen wurden mit PBS, 3 % (v/v) FCS, 0,01 % Natriumazid gewaschen und anschließend für 2 h bei 4°C mit 20 µg/ml B3-TexasRed inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals gewaschen, in 200 µl FACS-Puffer (FACSFlow, Becton-Dickinson, Heidelberg) resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert. Die Fluoreszenz der Zellen wurde bei 488 nm angeregt und die Emission mit Kanal FL3: >670 nm gemessen.

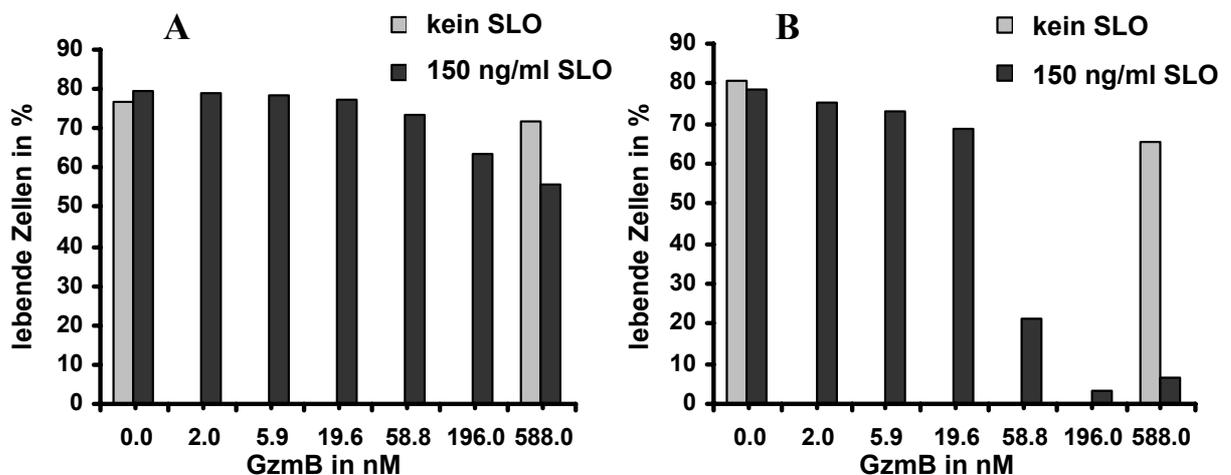
**A.** SK-BR3 Zellen: (Δ) Zellen ohne B3-TexasRed, (▲) Zellen, inkubiert mit 20 µg/ml B3-TexasRed

**B.** A431 Zellen: (Δ) Zellen ohne B3-TexasRed, (▲) Zellen, inkubiert mit 20 µg/ml B3-TexasRed

Die Zellen sind aber trotzdem in der Lage, das Antikörperfragment zu binden, und damit geeignet zur Untersuchung der Toxizität des Immunotoxins B3-GzmB. Die A431 Zellen zeigen nach der Inkubation mit B3-TexasRed keine Verschiebung der Zellpopulation zu höheren Fluoreszenzintensitäten. Diese Zelllinie bindet dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP nicht und kann somit als Negativkontrolle für das Immunotoxin eingesetzt werden. Die von mir verwendeten A431 Zellen werden auf Grund der vorliegenden Daten als Lewis Y-negativ eingestuft. Es wurde noch eine weitere Zelllinie mit B3-TexasRed auf ihre Bindungsfähigkeit untersucht. K562 Zellen sind nicht in der Lage, den fluoreszenzmarkierten Antikörper zu binden (Abb. nicht gezeigt). Diese Zelllinie wird als zweite Negativkontrolle für die Cytotoxizitätsexperimente verwendet.

### Cytotoxizität von GzmB

In diesem Experiment sollte die Wirkung von GzmB auf die Zelllinien SK-BR3 und A431 getestet werden. Da das rekombinante GzmB keine zellbindenden Eigenschaften mehr besitzt, muss die Aufnahme ins Cytosol durch den Zusatz von sublytischen Konzentrationen von Streptolysin O (SLO) durch *fluid phase uptake* vermittelt werden (Trapani *et al.*, 2003).



**Abb. 3.29:** Induktion der Apoptose durch GzmB

Die adhärenen Zellen wurden trypsiniert und in Medium (mit 10 % FCS) resuspendiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit serumfreiem Medium (0,5 % BSA) gewaschen. Das Experiment erfolgte in 100 µl serumfreiem Medium (0,5 %) mit 10<sup>5</sup> Zellen. Es wurde zunächst GzmB in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Zellen gegeben. Das SLO (25 µg/ml), gelöst in dem Medium, wurde durch Zugabe von 40 µM Cystein für 10 min bei RT aktiviert. Anschließend wurde das aktivierte SLO verdünnt und zu den Zellen in einer Endkonzentration von 150 ng/ml gegeben. Nach 4 bis 5 h wurden die adhärenen Zellen trypsiniert und mit FACS-Medium (PBS, 3 % FCS, 0,01 % NaN<sub>3</sub>) gewaschen. In 25 µl Bindungs-Puffer (BD-Bioscience) erfolgte die Färbung der Zellen mit FITC-Annexin (Caltech) und Propidiumjodid 1:20 verdünnt (BD-Bioscience) bei RT für 15 min. Danach wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die apoptotischen Zellen wurden, aufgrund der FITC-Färbung, im Emissionskanal FL1 detektiert, die nekrotischen Zellen (angefärbt durch Propidiumjodid) in Emissionskanal FL3. Der prozentuale Anteil an nicht gefärbten Zellen, somit noch lebenden Zellen, wurde gegen die jeweilige GzmB-Konzentration aufgetragen.

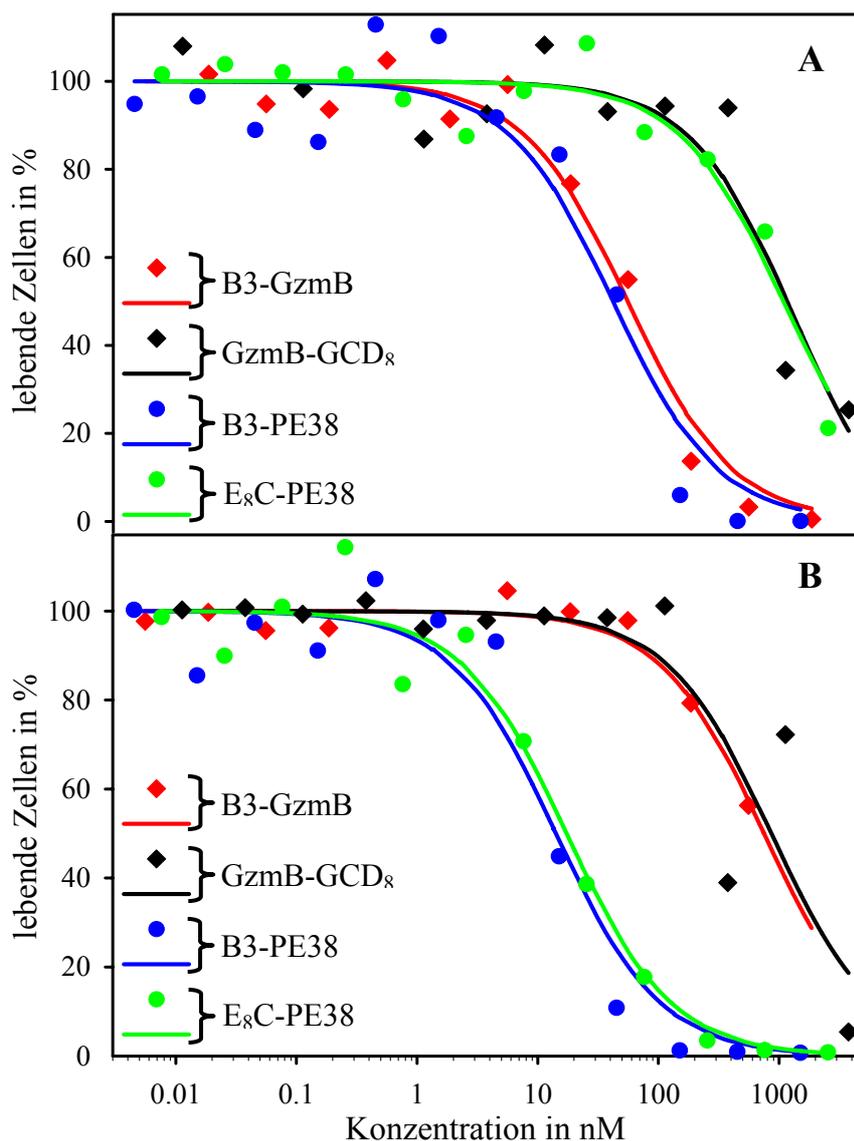
**A.** Inkubation von SK-BR3 Zellen mit GzmB und SLO

**B.** Inkubation von A431 Zellen mit GzmB und SLO

Aus der Abb. 3.29 ist zu erkennen, dass 4-5 h nach der Zugabe von 588 nM GzmB und 150 ng/ml SLO noch ca. 55 % der SK-BR3 Zellen lebend sind. Ohne die Zugabe von SLO hat das GzmB selbst bei der höchsten Konzentration kaum eine Wirkung auf die Zellen. Auf die A431 Zellen wirkt das GzmB wesentlich schneller und stärker. Nach der Inkubation mit 196 nM GzmB und 150 ng/ml SLO für 4-5 h sind nahezu alle Zellen apoptotisch. Der Prozentsatz an lebenden Zellen liegt unter 5 %. Auch bei den A431 Zellen ist zu beobachten, dass ohne die Zugabe von SLO selbst bei der höchsten GzmB-Konzentration noch 70 % der Zellen lebend sind.

### **Cytotoxizität des Immunotoxins B3-GzmB**

Das Immunotoxin B3-GzmB wurde wie das B3-PE38 in mehreren Zellkulturexperimenten auf seine Fähigkeit hin untersucht, spezifisch Lewis Y-positive Krebszellen zu töten. Aus den Bindungsstudien mit B3-TexasRed wurden die Zelllinien ausgewählt, die in der Lage sein müssten, spezifisch das Immunotoxin zu binden, und welche, die als Negativkontrolle eingesetzt werden. Als Lewis Y-positive Zelllinien wurden SK-BR3, MCF7 und MCF7<sup>Casp3</sup> untersucht. Letztere Zellen besitzen eine intakte Caspase 3, dessen Gen stabil in den Zellen durch Transfektion eingebracht wurde (Jänicke *et al.*, 1998). Als Lewis Y-negative Zelllinien wurden A431 und K562 verwendet. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.7.7 beschrieben mit dem jeweiligen Toxin in Konzentrationen von 0,3 ng/ml bis 100000 ng/ml für 48 h bei 37°C inkubiert. Neben dem B3-GzmB wurde zum Vergleich der spezifischen Toxizität das B3-PE38 eingesetzt. Die unspezifische Toxizität wurde durch Experimente mit GzmB-GCD<sub>8</sub> und E<sub>8</sub>C-PE38 untersucht. Die Auswertung einer Testreihe erfolgte durch FACS-Analyse, bei der tote Zellen durch Anfärben mit Propidiumjodid detektiert wurden (vgl. Abschnitt 2.2.7.9). Aus den Messdaten konnte ein prozentualer Anteil lebender Zellen für die jeweilige Toxinkonzentration ermittelt (Abb. 3.28) und daraus der IC<sub>50</sub>-Wert für das Toxin mit der jeweiligen Zelllinie bestimmt werden (Tab. 3.2). Die Daten für MCF7, inkubiert mit B3-PE38 bzw. E<sub>8</sub>C-PE38, wurden aus den früheren Messungen (vgl. Tab. 3.1) übernommen.



**Abb. 3.28:** Cytotoxizität von B3-GzmB

Die Zelllinien SK-BR3 (Lewis Y-positiv) und A431 (Lewis Y-negativ) wurden mit dem Immunotoxin B3-GzmB inkubiert, um die Spezifität und biologische Aktivität des Konjugates zu charakterisieren. Nachdem die Zellen zu 20 % Konfluenz gewachsen waren, erfolgte eine 48-stündige Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des B3-GzmB, GzmB-GCD<sub>8</sub>, B3-PE38 oder E<sub>8</sub>C-PE38. Anschließend wurde der Anteil an noch lebenden Zellen durch FACS-Analyse ermittelt. Die anhand der Daten berechneten IC<sub>50</sub>-Werte sind in Tab. 3.2 zusammengefasst.

**A.** Test der Cytotoxizität von B3-GzmB, GzmB-GCD<sub>8</sub>, B3-PE38 und E<sub>8</sub>C-PE38 mit SK-BR3 Zellen

**B.** Test der Cytotoxizität von B3-GzmB, GzmB-GCD<sub>8</sub>, B3-PE38 und E<sub>8</sub>C-PE38 mit A431 Zellen

Für die Lewis Y-positive Zelllinie SK-BR3 konnte die Cytotoxizität mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 98 nM berechnet werden. Die isolierte cytotoxische Komponente GzmB-GCD<sub>8</sub> zeigte keine Zelltyp-spezifische Toxizität. Lediglich bei sehr hohen Toxinkonzentrationen (IC<sub>50</sub>=1595 nM) konnte ein Abtöten der Zellen beobachtet werden. Zum Vergleich wurde die SK-BR3 Zellen auch mit dem B3-PE38 inkubiert. Dieses Immunotoxin besitzt mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 41,9 nM eine ähnliche Toxizität wie das B3-GzmB. Das isolierte E<sub>8</sub>C-PE38 zeigte wie die

cytotoxische Komponente GzmB-GCD<sub>8</sub> lediglich eine Zelltyp-unspezifische Toxizität in sehr hohen Konzentrationsbereichen (IC<sub>50</sub>=1080 nM).

Mit der Lewis Y-negativen Zelllinie A431 konnte sowohl für das Immunotoxin B3-GzmB (IC<sub>50</sub>=751 nM), als auch für das GzmB-GCD<sub>8</sub> (IC<sub>50</sub>=863 nM) lediglich eine unspezifische Toxizität bei sehr hohen Toxinkonzentrationen nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Lewis Y-negative Zelllinie K562 erhalten.

Zelllinien	IC <sub>50</sub> in nM				
	Lewis Y-negativ		Lewis Y-positiv		
	A431	K562	MCF7	MCF7 <sup>Casp3</sup>	SK-BR3
B3-GzmB	751	>557 <sup>a</sup>	140	35	98 <sup>d</sup>
GzmB-GCD <sub>8</sub>	863	>1128 <sup>a</sup>	198	394 <sup>c</sup>	1595 <sup>c</sup>
B3-PE38	14	14	1,7 <sup>b</sup>	1,8	41,9
E <sub>8</sub> C-PE38	17	37	137 <sup>b</sup>	58	1080

**Tab. 3.2:** IC<sub>50</sub>-Werte für B3-GzmB, GzmB-GCD<sub>8</sub>, B3-PE38 und E<sub>8</sub>C-PE38 mit verschiedenen Zellen. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden aus der Auftragung des prozentualen Anteils an lebenden Zellen gegen die jeweilige Toxinkonzentration, mit Hilfe der in Abschnitt 2.2.7.10 beschriebenen Formel, bestimmt.

<sup>a</sup> Der IC<sub>50</sub>-Wert konnte nicht bestimmt werden, da er außerhalb der vermessenen Konzentrationen lag.

<sup>b</sup> IC<sub>50</sub>-Werte wurden aus Tab. 3.1 übernommen

<sup>c</sup> Durchschnittswert, ermittelt aus zwei unabhängigen Experimenten.

<sup>d</sup> Durchschnittswert, ermittelt aus drei unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz dazu konnte eine hohe unspezifische Toxizität der *Pseudomonas* Exotoxin basierenden Konstrukte im Vergleich mit den GzmB Toxinen für die Lewis Y-negativen Zelllinie K562 und A431 nachgewiesen werden (vgl. Tab. 3.2). Die IC<sub>50</sub>-Werte lagen hier bei 14 - 37 nM. Als weitere Negativkontrolle wurde die Zelllinie MCF7 verwendet. An diese Zellen kann zwar das Immunotoxin B3-GzmB spezifisch binden, jedoch können die Zellen nicht über die Aktivierung der Caspase 3 in die Apoptose gehen. Deswegen liegt der IC<sub>50</sub>-Wert für das B3-GzmB mit 140 nM recht hoch. Der IC<sub>50</sub>-Wert, des durch unspezifische Bindung aufgenommenen GzmB-GCD<sub>8</sub>, liegt mit 198 nM nur unwesentlich höher als beim B3-GzmB. Als zweite Positivzelllinie wurde MCF7<sup>Casp3</sup> verwendet. Diese Zellen sollten in der Lage sein aufgrund ihres Lewis Y-Antigens auf der Oberfläche den B3-Antikörper zu binden und durch eine intakte Caspase 3 über diese in Apoptose zu gelangen. Die Fähigkeit, diese Zellen spezifisch mit einem Lewis Y-spezifischen Immunotoxin zu töten, wurde mit dem B3-PE38 zunächst untersucht. Dabei konnte mit diesem Immunotoxin ein nahezu identischer IC<sub>50</sub>-Wert (1,8 nM), wie für MCF7 (1,7 nM) ermittelt werden. Auch die unspezifische Wirkung des E<sub>8</sub>C-PE38 auf die beiden Zellvarianten war mit 47,5 nM für MCF7 und 58 nM für MCF7<sup>Casp3</sup>

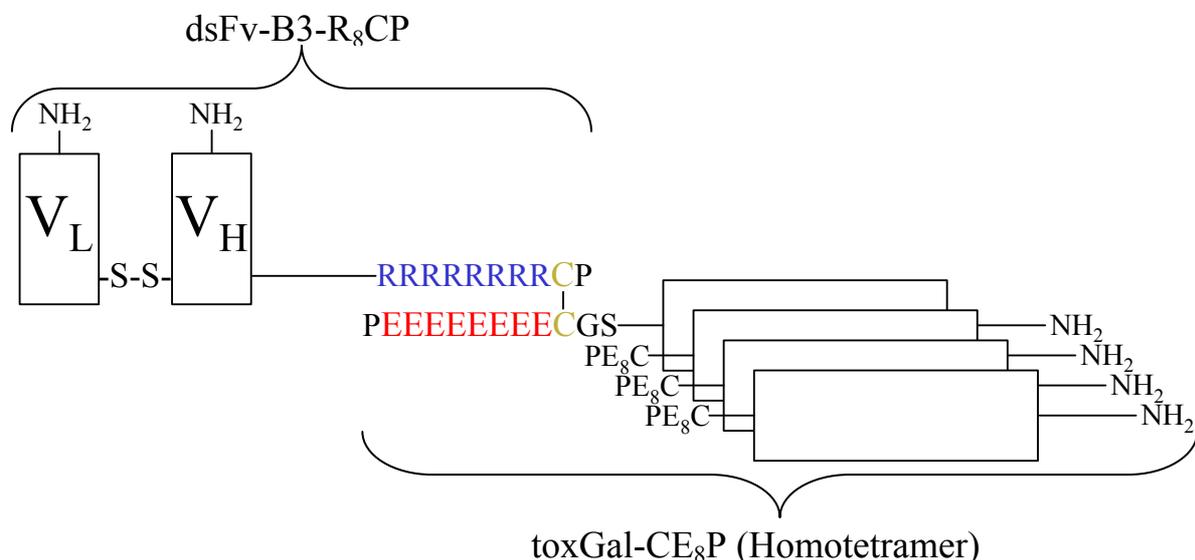
nahezu gleich. Aufgrund der positiven Ergebnisse mit dem B3-PE38 wurden die MCF7<sup>Casp3</sup> Zellen auch mit dem B3-GzmB untersucht. Mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 35 nM ist aber dessen Toxizität nicht so hoch wie beim B3-PE38, liegt jedoch in der selben Größenordnung wie für die Zelllinie SK-BR3. Trotzdem zeigt das Immunotoxin B3-GzmB auch mit den MCF<sup>Casp3</sup> eine Zelltyp-spezifische Wirkung, denn beim GzmB-GCD<sub>8</sub> ist lediglich bei hohen Konzentrationen eine unspezifische Toxizität (IC<sub>50</sub>= 394 nM) zu beobachten.

Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse zeigen, dass auch das polyionische Immunotoxin B3-GzmB in der Lage ist, aufgrund seines gekoppelten Antikörperfragmentes spezifisch Zellen mit dem entsprechenden Antigen zu töten. Die Cytotoxizität von B3-GzmB wurde mit der des polyionischen Immunotoxins B3-PE38 verglichen. Die toxische Wirkung des B3-GzmB auf MCF7<sup>Casp3</sup> Zellen ist nicht so hoch wie beim B3-PE38. Jedoch ist die unspezifische Toxizität des GzmB Konstruktes bei allen untersuchten Zelllinien sehr gering. Wohingegen das B3-PE38 auch bei einigen Lewis Y-negativen Zelllinien eine hohe toxische Wirkung aufweist. Mit dem B3-GzmB konnte ein weiteres modulares Immunotoxin, bei dem die zellbindende und die cytotoxische Komponente mittels polyionischer Fusionspeptide miteinander verknüpft wurden, entwickelt werden. Wie beim B3-PE38 konnte auch für das Immunotoxin B3-GzmB die biologische Aktivität und Zelltyp-spezifische Selektivität in Zellkulturexperimenten nachgewiesen werden.

### 3.3 Immunotoxin B3-toxGal

Das B3-toxGal ist ein weiteres modulares Immunotoxin auf der Basis des disulfidverbrückten Fv-Fragmentes des B3 Antikörpers und einer Variante der  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal). Im Gegensatz zum PE38 oder GzmB besitzt die  $\beta$ -Gal keine cytotoxischen Eigenschaften. Jedoch wurden bei der rekombinanten Produktion der  $\beta$ -Gal fluorierte Tyrosine in das Protein (toxGal) eingebaut. In früheren Arbeiten wurde beobachtet, dass nicht kanonische Aminosäuren, wie z.B. fluorierte Tyrosine, toxisch auf Zellen wirken (Budisa *et al.*, 1999). Die Cytotoxizität von fluorierten Tyrosinen konnte mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 10-25  $\mu$ M bestimmt werden (N. Budisa, persönliche Mitteilung). Dabei ist die Toxizität der fluorierten Tyrosine vermutlich durch ihre Aufnahme in die Zellen limitiert, da für Aminosäuretransporter durchschnittliche Affinitäten zu den von ihnen transportierten Aminosäuren von ca. 100-500  $\mu$ M haben (M. Brandsch, persönliche Mitteilung). Durch den Einbau von fluorierten Tyrosinen in die  $\beta$ -Gal und deren Kopplung an ein zellbindendes Protein sollte es möglich sein, die toxischen Aminosäuren spezifisch und wesentlich effizienter in die Zellen zu

transportieren. Im nativen Zustand liegt die  $\beta$ -Galaktosidase als Homotetramer vor. Jedes Monomer besitzt 31 Tyrosine und hat eine Größe von 116 kD. Um die  $\beta$ -Gal mit dem dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP verknüpfen zu können, wurde der C-Terminus um die Sequenz SerGlyCys(Glu)<sub>8</sub>Pro erweitert. Von  $\beta$ -Gal mit der C-terminalen polyionischen Fusion wurde eine nicht fluoridierte Variante (Gal-CE<sub>8</sub>P) und eine fluoridierte Variante (toxGal-CE<sub>8</sub>P) hergestellt. Wie schon bei den Immunotoxinen B3-PE38 und B3-GzmB erfolgte die Herstellung des B3-toxGal durch spezifische Heterodimerisierung der beiden Fusionspeptide an den C-Termini vom dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und toxGal-CE<sub>8</sub>P (vgl. Abb. 3.30). Durch das gekoppelte Antikörperfragment kann das Immunotoxin B3-toxGal spezifisch an der Oberfläche von Lewis Y-positiven Krebszellen binden. Die Zellen sollten nach der Aufnahme des fluoridierten Proteins getötet werden. Über den toxischen Wirkungsmechanismus von fluoridierten Proteinen ist derzeit nichts bekannt.



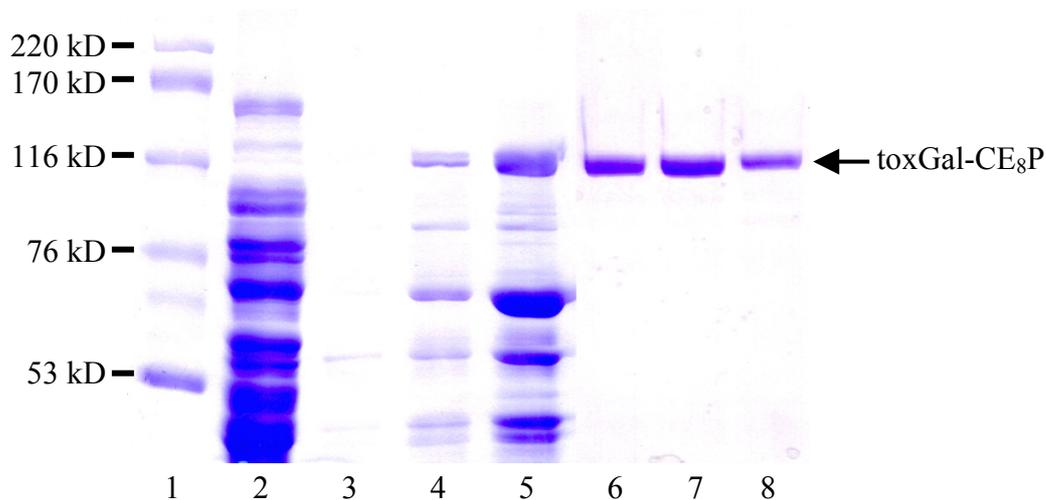
**Abb. 3.30:** Schematische Darstellung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und toxGal-CE<sub>8</sub>P in gekoppelter Form als Immunotoxin B3-toxGal. Das B3-Antikörperfragment ist mit dem C-Terminus eines Monomers verknüpft. Theoretisch können an ein toxGal-CE<sub>8</sub>P Molekül vier dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP Moleküle gekoppelt werden.

In den folgenden Kapiteln wird die Reinigung des Gal-CE<sub>8</sub>P bzw. toxGal-CE<sub>8</sub>P und deren Kopplung an dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP beschrieben. Der Nachweis der biologischen Aktivität des toxGal-CE<sub>8</sub>P bzw. B3-toxGal erfolgte in Zellkulturexperimenten.

### 3.3.1 Herstellung und Reinigung von Gal-CE<sub>8</sub>P und toxGal-CE<sub>8</sub>P

Die Expression in der beiden  $\beta$ -Gal Varianten erfolgte rekombinant in *E.coli* und wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Nediljko Budisa (Martinsried) durchgeführt. Die Zellen wurden mir resuspendiert in 20 mM Phosphat-Puffer pH 7,0 auf Trockeneis zugeschickt. Wie in Abschnitt 2.2.4.3 beschrieben, wurde aus den Zellen der lösliche Rohextrakt hergestellt. Die

Reinigung der fluorierten und nicht fluorierten  $\beta$ -Gal Variante erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4.9 beschrieben nach der gleichen Methode. Beide Proteine besitzen an ihrem N-Terminus einen *His-tag*. Der lösliche Rohextrakt wurde auf ein Ni-NTA-Sepharose-Material aufgetragen. Die unspezifisch gebundenen Proteine wurden mit 25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM Imidazol pH 7,0 von der Säule gewaschen. Die Elution der  $\beta$ -Gal erfolgte in einem linearen Gradienten von 20 bis 1000 mM Imidazol in 3 Säulenvolumen. Die  $\beta$ -Gal Fraktionen wurden vereinigt und mittels Poros HQ weiter aufgereinigt (vgl. Abb. 3.31).

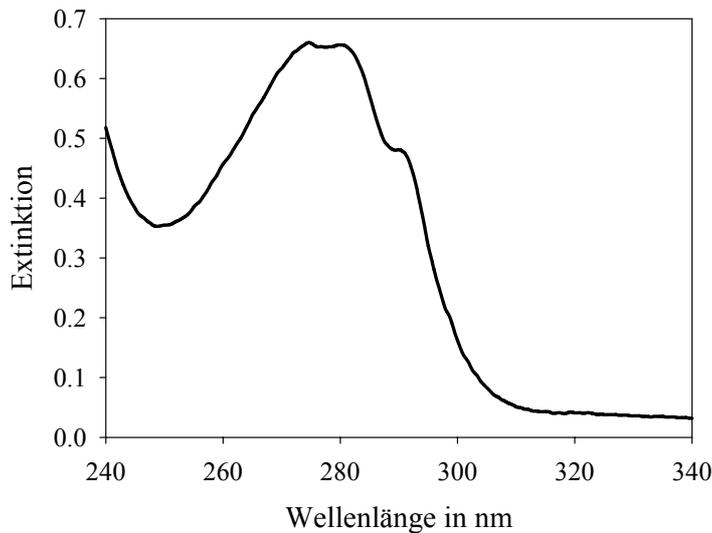


**Abb. 3.31:** Reinigung von toxGal-CE<sub>8</sub>P

Nach dem Zellaufschluss wurde der lösliche Rohextrakt auf die Ni-NTA-Säule (20 ml) aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM Imidazol pH 7,0 von der Säule gewaschen. Die Elution der toxGal-CE<sub>8</sub>P erfolgte in einem linearen Gradienten von 20 bis 1000 nM Imidazol über 3 Säulenvolumen. Die Fraktionen mit toxGal-CE<sub>8</sub>P wurden auf die Poros HQ aufgetragen und die Säule mit 25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM EDTA pH 8,0 gewaschen. Die Elution erfolgte in einem linearen Gradienten von 0 bis 900 mM NaCl über 50 Säulenvolumen. (Alle Proben wurden mit reduzierendem Probenpuffer behandelt und auf einem Coomassie-gefärbten 8 % igen SDS-Gel analysiert)

(1) HMW-Proteinmarker, (2) Durchlauf von Ni-NTA-Sepharose, (3) – (5) Elutionsfraktionen von Ni-NTA-Sepharose, (6) – (8) Elutionsfraktionen von Poros HQ

Die gereinigte toxGal-CE<sub>8</sub>P wurde mittels der Poros HQ konzentriert und gegen 25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7,4 dialysiert. Anschließend wurde die Konzentration mittels UV-Spektrum (vgl. Abb. 3.32) bestimmt. Das Protein wurde bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Es konnten 1700  $\mu\text{g}$  gereinigtes Gal-CE<sub>8</sub>P, aber nur 555  $\mu\text{g}$  gereinigtes toxGal-CE<sub>8</sub>P präpariert werden. Grund dafür war, dass die unfluorierte Variante in dem *E.coli* Stamm wesentlich besser exprimiert wurde als die fluorierte Variante. Außerdem war die fluorierte Variante stärker einem proteolytischen Abbau unterworfen als die unfluorierte Variante (Abb. nicht gezeigt).



**Abb. 3.32:** UV-Spektrum des gereinigten toxGal-CE<sub>8</sub>P  
Das UV-Spektrum des toxGal-CE<sub>8</sub>P, gelöst in 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 7,4, wurde am Ultraspec 4000 UV/VIS Spectrophotometer gemessen.

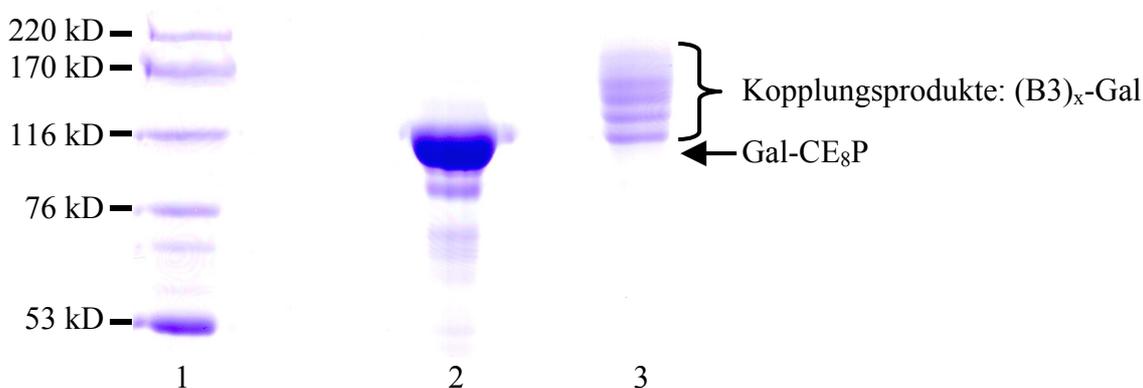
### 3.3.2 Massenspektroskopische Untersuchung von toxGal-CE<sub>8</sub>P

Mit Hilfe der Massenspektrometrie sollte der Einbau der fluorierten Tyrosine in die  $\beta$ -Gal nachgewiesen werden. Dazu wurde die gereinigte toxGal-CE<sub>8</sub>P, gelöst in 50 mM Ammoniumcarbonat pH 8,5, mit Trypsin verdaut. Die entstandenen Fragmente wurden über ein *reversed phase* Material entsalzt und deren Masse mit Hilfe eines MALDI-TOF Massenspektrometers analysiert. Mit Hilfe des Programms *Peptide Mass* (<http://au.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass.pl>) wurden die möglichen Peptidfragmente und deren Massen, die bei einem Trypsinverdau von toxGal-CE<sub>8</sub>P entstehen, aufgelistet. Die durch das MALDI-TOF-Massenspektrometer analysierten Massen für die untersuchten Peptidfragmente wurden mit der Liste aus dem Programm verglichen. Zum einen konnte durch die Übereinstimmung der Massen vieler Fragmente das Protein toxGal-CE<sub>8</sub>P nachgewiesen werden. Bei Fragmenten, die ein Tyrosin enthalten, sollte es jedoch einen Massenunterschied von 18 Da geben (das fluorierte Tyrosin besitzt am Phenolring statt eines Wasserstoffatoms ein Fluoratom). Bei dem Vergleich der Peptidmassen konnten in den Fragmenten 11 der 31 Tyrosine eindeutig identifiziert werden. Von diesen 11 Tyrosinen waren 8 fluoriert. Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnte nachgewiesen werden, dass ca. 72 % der Tyrosine in der toxGal-CE<sub>8</sub>P in fluorierter Form vorliegen.

### 3.3.3 Herstellung des modularen Immunotoxins B3-toxGal

Für die Herstellung der Immunotoxine B3-Gal bzw. B3-toxGal wurden die Erfahrungen aus der Herstellung der beiden modularen Immunotoxine B3-PE38 und B3-GzmB genutzt. Wie

schon in den vorherigen Abschnitten erwähnt, erfolgte die Kopplung unter oxidierenden Bedingungen bei einem pH-Wert über 7,0 in einem Puffer mit niedriger Ionenstärke. Für die Kopplung wurden die schon gezeigten Methoden (*oxidoshuffling*-System, chemische Aktivierung und Luftoxidation) getestet. Zunächst wurde versucht, die Kopplung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP mit Gal-CE<sub>8</sub>P mittels chemischer Aktivierung durch DTP zu katalysieren. Dies führte jedoch zu Aggregation des Produktes B3-Gal. Die Gal-CE<sub>8</sub>P besitzt neben dem Cystein des C-terminalen Fusionspeptides noch 4 zugängliche Cysteine auf der Oberfläche jedes Monomers. Theoretisch könnten somit 20 Moleküle dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP an das Homotetramer Gal-CE<sub>8</sub>P gekoppelt werden. Durch die Aktivierung des freien terminalen Cysteins des dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP kommt es auch zur unspezifischen Kopplung mit den Cysteinen auf der Oberfläche der Gal-CE<sub>8</sub>P, wodurch verschiedene Kopplungspezies entstehen (vgl. Abb. 3.33). Außerdem präzipitiert das Kopplungsprodukt, wenn zu viele Antikörper gekoppelt sind.



**Abb. 3.33:** Kopplung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und Gal-CE<sub>8</sub>P durch chemische Aktivierung

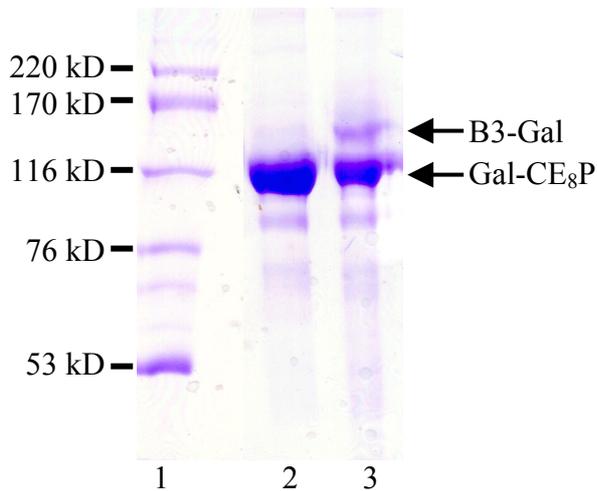
Das dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP wurde durch 1 mM GSH bei pH 8,0 reduziert und das Reduktionsmittel durch Dialyse gegen 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA pH 4,5 entfernt. Das C-terminale freie Cystein des dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP wurde durch einen 10-fachen molaren Überschuss an DTP bei pH 8,1 für 1 h aktiviert. Gleichzeitig wurde die Gal-CE<sub>8</sub>P mit 2 mM GSH bei pH 8,0 reduziert. Anschließend wurde das freie DTP vom dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und das GSH von der Gal-CE<sub>8</sub>P mittels Chromatographie über eine PD-10 Säule entfernt. Beide Proteine wurden in einem molaren Verhältnis von B3:Gal(Monomer) = 3:1 gemischt. Die Kopplung erfolgte bei RT für 4 h und anschließend über Nacht bei 4°C. (Alle Proben wurden mit Jodacetamid inkubiert und mit oxidierendem Probenpuffer behandelt und auf einem Coomassie-gefärbten 8 % igen SDS-Gel analysiert)

(1) HMW-Proteinmarker, (2) Probe der Gal-CE<sub>8</sub>P (identisch behandelt wie Kopplungsansatz), (3) Probe des Kopplungsansatzes

Es wurde auch versucht, dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP in einem äquimolaren Verhältnis für die Kopplung mit Gal-CE<sub>8</sub>P einzusetzen. Jedoch konnte bei diesen Ansätzen keine Produktbildung beobachtet werden (Abb. nicht gezeigt). Damit die Kopplungsreaktion spezifisch zwischen den beiden Fusionspeptiden abläuft, erfolgte in einem weiteren Versuch die Ausbildung der Disulfidbrücke durch Luftoxidation katalysiert von Cu<sup>2+</sup> Ionen. Um zu verhindern, dass zu viele Antikörperfragmente an ein Molekül Gal-CE<sub>8</sub>P koppeln, und das Produkt dadurch präzipitiert, wurde dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP in einem leichten molaren Überschuss für die Reaktion

eingesetzt. Im Gegensatz zu der Kopplung durch chemische Aktivierung kam es bei der Luftoxidation nicht zur Präzipitation des Kopplungsproduktes. Die Ausbeute an B3-Gal war jedoch mit dieser Methode zu gering (vgl. Abb. 3.34).

Es wurde nun versucht, die Kopplungsreaktion in Anwesenheit eines *oxidoshuffling*-System durchzuführen. Zunächst wurden beide Reaktionspartner in einem äquimolaren Verhältnis eingesetzt. Jedoch war die Ausbeute an Kopplungsprodukt zu gering.

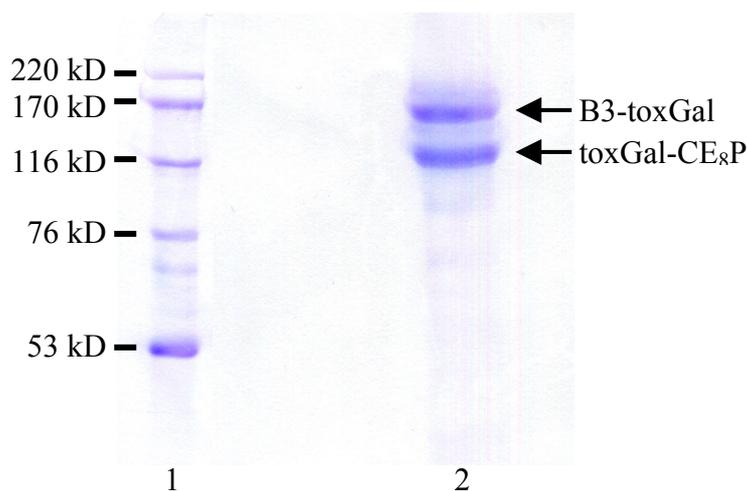


**Abb. 3.34:** Kopplung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und Gal-CE<sub>8</sub>P durch Luftoxidation

Das dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP wurde durch 1 mM GSH bei pH 8,0 reduziert und das Reduktionsmittel durch Dialyse gegen 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA pH 4,5 entfernt. Gal-CE<sub>8</sub>P wurde mit 2 mM GSH bei pH 8,0 reduziert. Anschließend wurde das GSH von der Gal-CE<sub>8</sub>P mittels Chromatographie über eine PD-10 Säule entfernt. Beide Proteine wurden in einem molaren Verhältnis von B3:Gal(Monomer) = 0,9:1 gemischt. Die Kopplung erfolgte durch Dialyse des Ansatzes gegen 20 mM Tris, 3 μM CuCl<sub>2</sub> pH 8,0 bei 4°C für 24 h. (Alle Proben wurden mit Jodacetamid inkubiert und mit oxidierendem Probenpuffer behandelt und auf einem Coomassie-gefärbten 8 % igen SDS-Gel analysiert)

(1) HMW-Proteinmarker, (2) Probe der Gal-CE<sub>8</sub>P (identisch behandelt wie Kopplungsansatz, (3) Probe des Kopplungsansatzes

In weiteren Versuchen wurde der molare Anteil an dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP gesteigert, wobei sich auch die Ausbeute an Kopplungsprodukt erhöhte. Unter optimalen Bedingungen, bei denen dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und Gal-CE<sub>8</sub>P in einem molaren Verhältnis von 3:1 (bezogen auf 1 Monomer Gal-CE<sub>8</sub>P) vorlagen, konnte eine Kopplungsausbeute von ca. 40 % ermittelt werden (Abb. nicht gezeigt). Im Gegensatz zu der Kopplung durch chemische Aktivierung konnte keine Präzipitation des Proteins beobachtet werden. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde die Kopplung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP mit toxGal-CE<sub>8</sub>P unter identischen Reaktionsbedingungen durchgeführt.

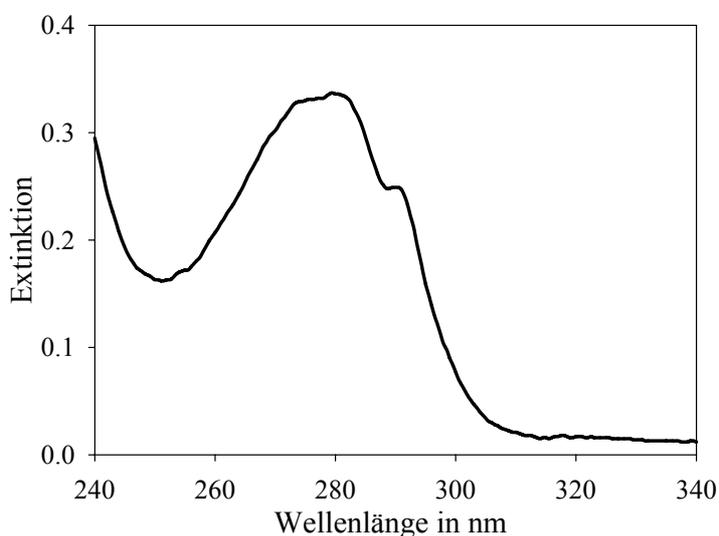


**Abb. 3.35:** Kopplung von dsFv-B3-R8CP und toxGal-CE8P mittels *oxidoshuffling*-System

Beide Proteine, gelöst in 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA pH 8,0, wurden getrennt durch 1 mM GSH für 1 h bei RT reduziert. Anschließend wurden reduziertes dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und reduzierte toxGal-CE<sub>8</sub>P im molaren Verhältnis 3:1 (bezogen auf 1 Monomer toxGal-CE<sub>8</sub>P) gemischt. Die Kopplungsreaktion erfolgte nach Zugabe von 4 mM GSSG über Nacht bei Raumtemperatur. (Alle Proben wurden mit Jodacetamid inkubiert und mit oxidierendem Probenpuffer behandelt und auf einem Coomassie-gefärbten 8 % igen SDS-Gel analysiert)

(1) HMW-Proteinmarker, (2) Probe des Kopplungsansatzes

Das Kopplungsprodukt wurde mittels Poros HQ gereinigt. Danach erfolgte die Dialyse des B3-toxGal gegen 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl pH 7,4 und anschließend die Konzentrationsbestimmung durch Messen des UV-Spektrums (Abb. 3.36).



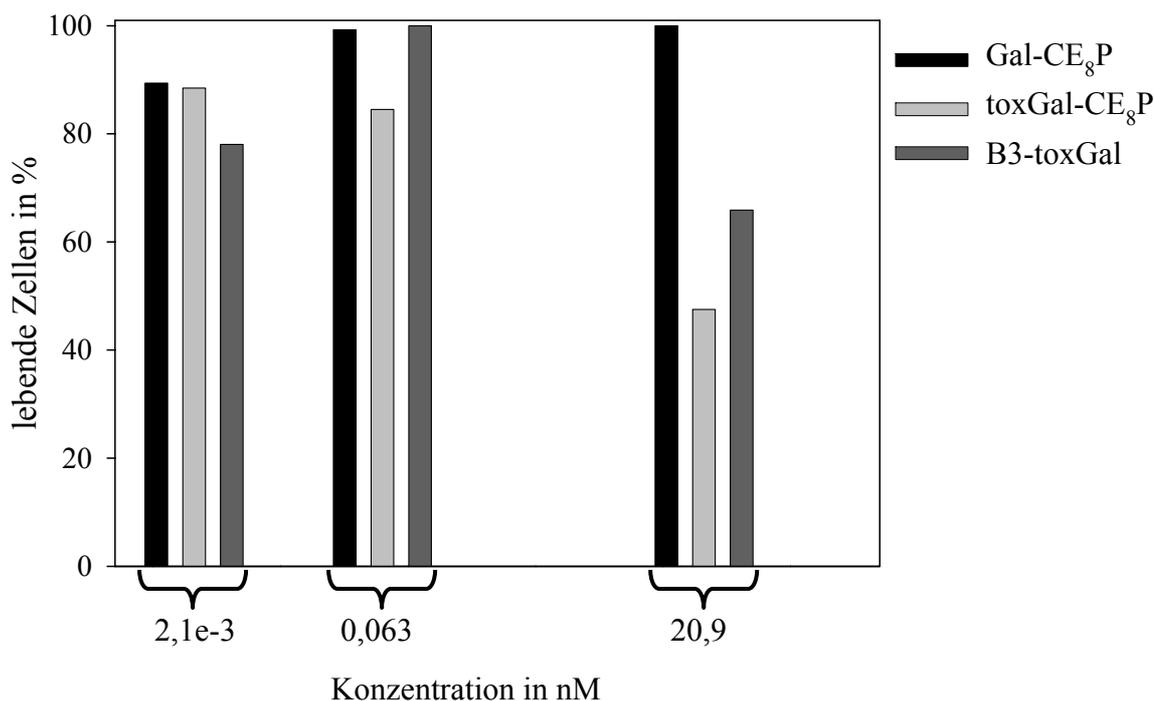
**Abb. 3.36:** UV-Spektrum des gereinigten B3-toxGal

Wie in Abb. 3.35 zu sehen, sind ca. 40 % der toxGal-CE<sub>8</sub>P Monomere an das B3 Antikörperfragment gekoppelt. Somit ist statistisch gesehen ein toxGal-CE<sub>8</sub>P Homotetramer mit 1-2 Moleküle dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP verknüpft. Die notwendige Kopplungsausbeute von 25 % (ein Molekül dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP gekoppelt mit einem toxGal-CE<sub>8</sub>P Homotetramer) wurde damit übertroffen. Aus 226 µg dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und 340 µg toxGal-CE<sub>8</sub>P, dies entspricht einem

molaren Verhältnis von 3:1 (bezogen auf 1 Monomer toxGal-CE<sub>8</sub>P), konnten 242 µg gereinigtes B3-toxGal hergestellt werden. Das Immunotoxin B3-toxGal wurde bis zur Verwendung in Zellkulturexperimenten bei -80°C gelagert.

### 3.3.4 Biologische Aktivität des Immunotoxins B3-toxGal in Zellkultur

Wie schon bei den vorangegangenen modularen Immunotoxinen sollte auch das B3-toxGal auf seine biologische Aktivität in Zellkulturexperimenten untersucht werden. Um die Cytotoxizität der toxGal-CE<sub>8</sub>P nachzuweisen, wurde dieses zunächst mit Hilfe des *BioPorter Protein Delivery System (Gene Therapy Systems, San Diego)* in das Cytoplasma von MCF7 Zellen transportiert. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurde der Protein/*BioPorter*-Komplex in verschiedenen Konzentrationen (0,3 ng/ml bis 50000 ng/ml toxGal-CE<sub>8</sub>P) zu den Zellen gegeben. Nach 5 h erfolgte die Zugabe von 1 Volumen Medium mit 20 % FCS und die Zellen wurden weiter bei 37°C inkubiert. Zum Vergleich wurde das gleiche Experiment mit der nicht fluorierten β-Gal durchgeführt. Die Analyse der spezifischen Cytotoxizität des Immunotoxins B3-toxGal erfolgte wie in Abschnitt 2.2.7.7 beschrieben. Nach 48-stündiger Inkubation erfolgte die Auswertung der Cytotoxizitätstests durch FACS-Analyse, bei der tote Zellen durch Anfärben mit Propidiumjodid detektiert wurden. Aus den Messdaten konnte ein prozentualer Anteil lebender Zellen für die jeweilige Toxinkonzentration ermittelt werden (Abb. 3.37). Wie zu erwarten, zeigte die nicht fluorierte β-Gal keine toxische Wirkung auf die Zellen. Bei der fluorierten Variante hingegen konnte ein cytotoxischer Effekt festgestellt werden. Die toxische Wirkung auf die Zellen war jedoch schwächer als erwartet. Erst bei höheren Konzentrationen konnte eine Abnahme der Lebendzellzahl detektiert werden. Das BioPorter Transfektionssystem hat selbst einen großen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der MCF7 Zellen. So lag die Lebendzellzahl bei unbehandelten Zellen um ca. 30 % höher als bei Zellen, die mit dem BioPorter und PBS behandelt wurden. Deswegen wurde auf die Ermittlung eines IC<sub>50</sub>-Wertes verzichtet. Man konnte lediglich einen leichten cytotoxischen Effekt durch die fluorierte β-Gal feststellen. Das Immunotoxin B3-toxGal, inkubiert mit den MCF7 Zellen, zeigte so gut wie keine cytotoxische Wirkung. Erst bei hohen Konzentrationen konnte eine Abnahme der Lebendzellzahl detektiert werden. Da aber selbst bei der höchsten Konzentration an B3-toxGal noch mehr als 65 % der Zellen lebend waren, konnte ein spezifischer cytotoxischer Effekt auf die Zellen nicht eindeutig nachgewiesen werden.



**Abb. 3.37:** Cytotoxizität von Gal-CE<sub>8</sub>P, toxGal-CE<sub>8</sub>P und B3-toxGal

Die Zelllinie MCF7 wurde mit dem Immunotoxin B3-toxGal inkubiert, um die Spezifität und biologische Aktivität des Konjugates zu charakterisieren. Nachdem die Zellen zu 20 % Konfluenz gewachsen waren, erfolgte eine 48-stündige Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des B3-toxGal, toxGal-CE<sub>8</sub>P bzw. Gal-CE<sub>8</sub>P. Die Proteine Gal-CE<sub>8</sub>P und toxGal-CE<sub>8</sub>P wurden zuvor mit dem BioPorter Transfektionssystem inkubiert, um eine Aufnahme in die Zellen zu vermitteln (Die Verwendung des BioPorter-Systems erfolgte nach den Angaben des Herstellers). Anschließend wurde der Anteil an noch lebenden Zellen durch FACS-Analyse ermittelt.

In diesem Abschnitt konnte die Reinigung der fluorierten und nicht fluorierten Variante der  $\beta$ -Galaktosidase, die am C-Terminus durch ein polyionisches Fusionspeptid erweitert wurde, gezeigt werden. Mit Hilfe der Massenspektrometrie wurde zum einen die gereinigte toxGal-CE<sub>8</sub>P identifiziert, außerdem konnte die Fluorierung der Tyrosine nachgewiesen werden. Durch Optimierung der Kopplungsbedingungen konnte das Immunotoxin B3-toxGal in ausreichenden Mengen hergestellt werden. Die cytotoxische Wirkung konnte jedoch nur für toxGal-CE<sub>8</sub>P nachgewiesen werden. Eine toxische Wirkung des Immunotoxin B3-toxGal konnte nicht eindeutig gezeigt werden. Wahrscheinlich gelangt nach der Bindung und Internalisierung des Immunotoxins nur ein kleiner Prozentsatz der Proteins ins Cytosol. Durch die Verwendung des BioPorter-Systems gelangt wesentlich mehr fluoriertes Protein ins Cytosol, was sich in einer stärkeren toxischen Wirkung zeigt.

## 4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden modulare Immunotoxine konstruiert und untersucht, deren zellbindende und cytotoxische Komponente über polyionische Fusionspeptide durch gerichtete Assoziation und kovalente Verknüpfung miteinander verbunden sind. Die erhaltenen Immunotoxine wurden biophysikalisch charakterisiert und in Zellkulturexperimenten auf ihre biologische Wirksamkeit hin untersucht.

In den letzten Jahren haben sich monoklonale Antikörper als Anti-Krebs-Therapeutika etabliert. Dabei wurden große Fortschritte bei der Humanisierung von Maus-Antikörpern gemacht. Mit Hilfe von *Phage Display* konnte die Affinität und Spezifität der Antikörper gesteigert werden. Durch die rekombinante Produktion ist es möglich, Antikörper in großen Mengen herzustellen. Mitte letzten Jahres waren 6 verschiedene Antikörper als Krebs-therapeutikum zugelassen (Walsh, 2003), viele weitere werden noch in klinischen Tests untersucht. Jedoch zeigte sich in klinischen Studien, dass nur bei einigen Patienten eine Reaktion auf diese Antikörper zu beobachten war. Bei der Behandlung von Brustkrebs mit dem humanisierten Anti-ErbB2-Antikörper Herceptin lag die Erfolgsquote bei lediglich 15 % (Cobleigh *et al.*, 1999). Deswegen ist es notwendig, die Effizienz der Anti-Krebs-Antikörper zu erhöhen. Es gibt dafür viele Ansatzpunkte. Eine Möglichkeit besteht darin, bispezifische Antikörper zu entwickeln, die zum einen an eine Krebszelle binden und zum anderen Radionuklide, Toxine oder auch cytotoxische Lymphocyten zu binden (Segal *et al.*, 1999; Koelemij *et al.*, 1999; van Spriël *et al.*, 2000). Aber zumeist werden die Antikörper direkt mit einer cytotoxischen Komponente kovalent verknüpft. Dies können Radionuklide (z.B.  $^{211}\text{Astatin}$ ), niedermolekulare Toxine (konventionelle Chemotherapeutika), Proteintoxine (A-Kette vom Ricin, bakterielle Toxine, humane RNasen) oder auch Cytokine (Interleukine, GM-CSF) sein (Zalutsky *et al.*, 2000; Farah *et al.*, 1998; Pastan, 1997; Lode *et al.*, 2000). Durch die Kopplung von Antikörpern mit solchen Komponenten wird deren cytotoxische Wirkung stark erhöht. Die erzeugten Konjugate weisen allerdings neben ihrer Zelltyp-spezifischen Toxizität auch eine erhöhte unspezifische Toxizität auf. Es treten dadurch Nebenwirkungen, wie z.B. das *vascular leak syndrom*, auf (Kuan *et al.*, 1995). Die Menge an appliziertem Immunotoxin ist in diesem Fall durch die Nebenwirkungen limitiert. Deswegen ist die Auswahl des Ziel-Antigens, des entsprechenden Antikörpers und natürlich der cytotoxischen Komponente entscheidend für den Erfolg dieser Therapieform.

Die Herstellung von Immunotoxinen erfolgte zunächst durch chemisches *cross linking* von einem Antikörper oder Antikörperfragment mit einem Proteintoxin. Dies führte aber zu heterogenen Kopplungsprodukten, wobei sich auch die Spezifität des Antikörpers verändern

konnte (Karpovsky *et al.*, 1984). Bei den derzeit verwendeten rekombinanten Immunotoxinen handelt es sich um Fusionsproteine, bei denen das Antikörperfragment und das Toxin genetisch miteinander fusioniert wurden. Wie schon beschrieben, hängt der Erfolg einer Therapie von der geeigneten Kombination von Antikörperfragment und Toxin ab. Unter Verwendung von genetisch fusionierten Immunotoxinen wäre die Suche nach einer solch geeigneten Kombination sehr aufwendig. Eine Methode zur spezifischen Heterodimerisierung von Antikörperfragment und Toxin würde dieses *screening* wesentlich vereinfachen und beschleunigen. In der Literatur sind einige Dimerisierungsmotive, wie z.B. Vier-Helix-Bündel (Pack & Plückthun, 1992) oder S-Protein und S-Peptid der RNase A (Dübel, 1999), beschrieben. Jedoch wird keines davon zur Herstellung von Immunotoxinen verwendet. Ein neuartiges polyionisches Dimerisierungsmotiv, bestehend aus entgegengesetzt geladenen Peptiden, die durch Ausbildung einer Disulfidbrücke kovalent miteinander verknüpft werden, wurde von Richter *et al.* (2001) beschrieben.

## 4.1. Immunotoxin B3-PE38

### 4.1.1 Produktion von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und E<sub>8</sub>C-PE38

Aufbauend auf der Charakterisierung polyionischer Peptide als spezifische Dimerisierungsmotive wurden das B3-Antikörperfragment C-terminal an der schweren Kette durch das Peptid R<sub>8</sub>CP und das trunkierte *Pseudomonas* Exotoxin PE38 am N-Terminus durch das Peptid GSPEFE<sub>8</sub>C erweitert. Bei der Herstellung der beiden Komponenten des Immunotoxins zeigte sich ein weiterer Vorteil gegenüber den durch genetische Fusion hergestellten Immunotoxinen. Diese werden rekombinant in *E.coli* in Form von *inclusion bodies* produziert und müssen anschließend renaturiert werden. Für die mit dem oben beschriebenen Konstrukt vergleichbaren Immunotoxine B3(Fv)-PE38 und B3(dsFv)-PE38 lagen die Ausbeuten nach Renaturierung und Reinigung bei lediglich 3 % bzw. 10 – 15 % (Reiter *et al.*, 1994). Im Fall der polyionisch gekoppelten Immunotoxine werden die einzelnen Komponenten separat produziert. Die Herstellung des Antikörperfragmentes dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP erfolgte nach Stubenrauch *et al.* (2001). Durch Optimierung der Fermentation konnte der Anteil sowohl der leichten, als auch der schweren Kette des B3-Antikörperfragmentes in den *inclusion bodies* erhöht werden. Auch die Qualität der *inclusion bodies* nach deren Präparation wurde dadurch verbessert. Deswegen konnten Ausbeuten nach Renaturierung und Reinigung des dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP von 30 % erzielt werden. Die rekombinante Produktion des E<sub>8</sub>C-PE38 erfolgte als lösliches Protein. Bis dahin konnten Proteine, die N-terminal mit einer polyionischen Sequenz

erweitert waren (z.B. R10C- $\alpha$ -Gluc, durch 10 Arginine und 1 Cystein N-terminal erweiterte  $\alpha$ -Glucosidase), nur in sehr geringen Mengen in *E.coli* produziert werden (Richter, 2001). Durch die Herstellung des Fusionsproteins, bestehend aus GST und E<sub>8</sub>C-PE38, wurde die Expressionsrate und somit die Ausbeute an gereinigtem E<sub>8</sub>C-PE38 extrem gesteigert. Durch die separate Produktion von Antikörperfragment und Toxin konnten beide Komponenten des Immunotoxins B3-PE38 sehr viel einfacher und in größeren Mengen produziert werden, als es für das vergleichbare genetisch fusionierte Immunotoxin beschrieben wurde.

#### 4.1.2 Kopplung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP mit E<sub>8</sub>C-PE38

Damit nun aus den Komponenten dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und E<sub>8</sub>C-PE38 das komplette Immunotoxin B3-PE38 in ausreichenden Mengen hergestellt werden konnte, mussten zunächst die Bedingungen für die gerichtete Assoziation und kovalente Verknüpfung getestet und optimiert werden. Aus den Arbeiten von Richter *et al.* (2001) war bekannt, dass die gerichtete Assoziation der beiden entgegengesetzt geladenen Fusionspeptide nur bei Salzkonzentrationen unter 100 mM NaCl noch zu über 90 % stattfindet. Die kovalente Verknüpfung durch Ausbildung einer Disulfidbrücke erfolgte mittels eines *oxido-shuffling* Systems unter leicht oxidierenden Bedingungen. Für die Ausbildung der Disulfidbrücke durch Thiol-Disulfid-Austausch sind pH-Werte ab 7,5 geeignet. Bei pH-Werten im Bereich von 8,5 bis 9,5 läuft die Reaktion allerdings schneller ab, da hier die Thiolgruppe des Nucleophils deprotoniert ist. Die Kopplungsreaktion von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und E<sub>8</sub>C-PE38 (je 1  $\mu$ M) wurde in einem pH-Bereich von 7,5 bis 9,5 untersucht. Die Ausbeute an Kopplungsprodukt lag nach 20 h Inkubation bei 41 % (pH 7,5), 51 % (pH 8,5) und 53 % (pH 9,5) (Daten nicht gezeigt). Die Kopplungsausbeute hängt auch von der Konzentration der beteiligten Partner ab (Richter, 2001). So lag die Ausbeute an Konjugat für die Kopplung von FabE10C und R10C- $\alpha$ -Glucosidase mit je 1  $\mu$ M bei 30 %. Durch Erhöhung der Konzentration an FabE10C auf 5  $\mu$ M konnte die Kopplungsausbeute auf 60 % gesteigert werden (Richter, 2001). Dies wurde auch bei der Kopplung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und E<sub>8</sub>C-PE38 beobachtet. Durch Erhöhung der Proteinkonzentration bei der Kopplungsreaktion konnte eine Ausbeute an Konjugat von bis zu 80 % erreicht werden. Die nicht gekoppelten Komponenten konnten leicht vom kompletten polyionischen Immunotoxin mittels Ionenaustauschchromatographie abgetrennt werden.

#### 4.1.3. Biophysikalische Charakterisierung des Immunotoxins B3-PE38

Das gereinigte Immunotoxin wurde in verschiedenen Experimenten biophysikalisch charakterisiert. Die daraus gewonnenen Daten wurden mit denen der isolierten Einzelkomponenten verglichen. Die Bindungsfähigkeit von NAD ist für die Toxizität des *Pseudomonas* Exotoxins von entscheidender Bedeutung. Die Domäne III des PE katalysiert die Übertragung des ADP-Restes von NAD auf den eukaryontischen Elongationsfaktor 2 (Hwang *et al.*, 1987). Die Deletion der Domäne Ia, wie im Fall des PE38, hat somit keinen Einfluss auf die Bindung von NAD. Es wurde zunächst untersucht, ob das polyionische Fusionspeptid des gereinigten E<sub>8</sub>C-PE38 durch die dichte Packung von negativen Ladungen einen Einfluss auf die NAD-Bindungsfähigkeit des PE38 hat. Für die trunkeerte Variante PE40 ist ein K<sub>D</sub>-Wert von 32 µM beschrieben worden (Beattie *et al.*, 1996). Für das E<sub>8</sub>C-PE38 und das Immunotoxin B3-PE38 konnten nach der gleichen Methode Dissoziationskonstanten von 76 µM bzw. 53 µM bestimmt werden. Die ermittelten Werte sind dem des unmodifizierten PE40 sehr ähnlich, dies deutet darauf hin, dass die NAD-Bindungsfähigkeit des PE38 weder durch die polyionische Fusion noch durch die Konjugation mit dem Antikörperfragment signifikant beeinflusst wird. Die etwas geringere Affinität des E<sub>8</sub>C-PE38 zum NAD im Vergleich mit B3-PE38 könnte auf die elektrostatische Abstoßung zwischen dem negativ geladenen Fusionspeptid und den zwei negativ geladenen *ortho*-Phosphat-Gruppen des NAD zurückzuführen sein.

Die C-terminale Fusion der V<sub>H</sub>-Domäne hat keinen Einfluss auf die Antigenbindung des B3-Antikörperfragmentes, was schon aus früheren Arbeiten bekannt war (Stubenrauch *et al.*, 2001; May *et al.*, 2002). Dies ist auch wenig überraschend, da innerhalb eines Antikörpers die V<sub>H</sub>-Domäne mit der C<sub>H</sub>1-Domäne verknüpft ist. Schlussfolgernd daraus hat somit weder die polyionische Fusion beider Kopplungspartner noch die Konjugation beider Proteine einen signifikanten Einfluss auf deren biologische Aktivität.

Durch die Untersuchung der thermischen Stabilität des Immunotoxins B3-PE38 und dessen Komponenten sollte herausgefunden werden, ob die Konjugation von Antikörperfragment und Toxin einen Einfluss auf deren Stabilität hat. Für E<sub>8</sub>C-PE38 konnte ein Übergangsmittelpunkt der thermischen Denaturierung von 41°C bestimmt werden. Die Entfaltung des Toxins beginnt bei 38°C. Die Entfaltung des Antikörperfragmentes dsFv-B3-R<sub>3</sub>CP beginnt bei 48 °C. Ab 55°C wird die Entfaltung von einer starken Aggregation des Proteins begleitet. Das Immunotoxin B3-PE38 zeigte eine vergleichbare Stabilität gegen thermische Denaturierung wie dessen isolierte Komponenten, es konnten beide Entfaltungsübergänge von E<sub>8</sub>C-PE38 und

dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP detektiert werden. Sowohl E<sub>8</sub>C-PE38 als auch dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP zeigen im isolierten und gekoppelten Zustand ein ähnliches Verhalten gegenüber thermischer Denaturierung. Dies deutet darauf hin, dass beide Komponenten des Immunotoxins unabhängig voneinander entfalten. Somit kommt es innerhalb des Immunotoxins zu keiner gegenseitigen Beeinflussung der beiden Kopplungspartner.

Durch Messen der Fern-UV-CD-Spektren vom Immunotoxin und dessen isolierter Komponenten wurde der Einfluss der Konjugation auf die Struktur von E<sub>8</sub>C-PE38 und dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP untersucht. Das Antikörperfragment zeigt ein typisches Spektrum für ein *all-β-sheet*-Protein mit einem Minimum bei 218 nm. Das Spektrum des E<sub>8</sub>C-PE38 mit einem Minimum bei 208 nm deutet darauf hin, dass das Toxin α-helikale Strukturelemente enthält. Die molare Elliptizität des Immunotoxins B3-PE38 kann annähernd durch die Summe der molaren Elliptizitäten der Einzelkomponenten beschrieben werden. Somit hat die Konjugation von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und E<sub>8</sub>C-PE38 keinen signifikanten Einfluss auf deren Sekundärstrukturelemente. Ein vergleichbares Ergebnis erhielt man für die Untersuchung von FabE<sub>10</sub>C, α-GlucR<sub>10</sub>C und dem Konjugat aus beiden Proteinen (Richter *et al.*, 2001). Wie bei der Messung der Fern-UV-CD-Spektren von B3-PE38 und dessen isolierter Komponenten konnte auch bei dieser Untersuchung eine Verschiebung des additiven Signals von dem des Konjugates bei Wellenlängen unterhalb 216 nm beobachtet werden. Es ist derzeit nicht bekannt, wodurch diese Verschiebung zustande kommt.

Durch die biophysikalische Charakterisierung des B3-PE38 konnte gezeigt werden, dass es mit Hilfe polyionischer Fusionspeptide möglich ist, biochemisch intakte Immunotoxine aus einem Antikörperfragment und einem Proteintoxin herzustellen. Das Immunotoxin B3-PE38 zeigte sich gegenüber Abbau durch im Serum befindliche Proteasen stabil. Somit stellt B3-PE38 ein potentiell Therapeutikum dar, dessen Wirksamkeit in verschiedenen Zellkultur-experimenten untersucht werden konnte.

#### 4.1.4 Biologische Aktivität des Immunotoxins B3-PE38 in Zellkultur

Entscheidend für den Einsatz von Immunotoxinen als Therapeutikum ist deren Zelltyp-spezifisches *targeting*. Die zellbindende Komponente des Immunotoxins B3-PE38 bindet spezifisch an die Oberfläche Lewis Y-positiver Krebszellen (Pastan *et al.*, 1991). Deswegen wurde zunächst in Zellkulturexperimenten die Bindung des Antikörperfragmentes an die Oberfläche verschiedener Zellen untersucht. Für die Zelllinie MCF7, die als Lewis Y-positiv in der Literatur beschrieben ist (Pastan *et al.*, 1991), konnte die Bindung vom TexasRed-

markiertem dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP nachgewiesen werden. Eine Bindung des Antikörperfragmentes an die in der Literatur als Lewis Y-negativ beschriebene Zelllinie HT-29 konnte nicht detektiert werden. Für die Untersuchung des Immunotoxins B3-PE38 wurden MCF7 als Zielzellen sowie HT-29 und NIH3T3 als Kontrollzellen verwendet. Das Immunotoxin B3(dsFv)-PE38, bei dem das B3-Antikörperfragment durch genetische Fusion mit dem PE38 verknüpft ist, kann spezifisch Lewis Y-positive Krebszellen töten (Reiter *et al.*, 1994). Für das modulare polyionische Immunotoxin B3-PE38, das aus den gleichen Komponenten aufgebaut ist, konnte ein IC<sub>50</sub>-Wert für die Lewis Y-positive Zelllinie MCF7 von 1,68 nM bestimmt werden. Es war damit genauso aktiv wie die genetisch fusionierte Variante (IC<sub>50</sub> = 4,52 nM). Aus der Untersuchung der toxischen Wirkung des isolierten E<sub>8</sub>C-PE38 auf MCF7 Zellen konnte ein IC<sub>50</sub>-Wert von 137 nM berechnet werden. Ohne ein zellbindendes *target*-Modul ist die cytotoxische Komponente nicht in der Lage, spezifisch an die Zelloberfläche zu binden. Deswegen wurde lediglich bei höheren Konzentrationen eine unspezifische toxische Wirkung des E<sub>8</sub>C-PE38 detektiert. Das gleiche Ergebnis ergab sich für die Lewis Y-negative Zelllinie HT-29 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 218 nM. Das nicht gekoppelte E<sub>8</sub>C-PE38 zeigte mit einer Lewis Y-positiven wie auch negativen Zelllinien eine nahezu gleiche unspezifische Toxizität, d.h. für die spezifische Wirkung des B3-PE38 ist allein die selektive Bindung der Antikörperkomponente des polyionischen Immunotoxins verantwortlich. Das Zelltyp-spezifische *targeting* des modularen Immunotoxins B3-PE38 wurde mit den Lewis Y-negativen Zelllinie HT-29 und NIH3T3 untersucht. Ohne Expression des Lewis Y-Antigens auf der Oberfläche dieser Zellen ist B3-PE38 nicht in der Lage, spezifisch an diese Zellen zu binden und diese zu töten. Deswegen wurde erst bei höheren Konzentrationen (HT-29: IC<sub>50</sub> = 75,5 nM; NIH3T3: IC<sub>50</sub> = 83,8 nM) ein toxischer Effekt beobachtet. Diese Werte liegen in dem gleichen Bereich wie für die unspezifische Aufnahme des E<sub>8</sub>C-PE38.

Die präsentierten Daten zeigen, dass das modulare polyionische Immunotoxin B3-PE38 in der Lage ist, spezifisch Krebszellen zu töten. Diese Zellen exprimieren ein Antigen auf ihrer Oberfläche, dessen entsprechendes Antikörperfragment als *target*-Modul für das Immunotoxin verwendet wurde. Weiterhin konnte die gleiche biologische Wirksamkeit des polyionischen Immunotoxins B3-PE38, verglichen mit der des in früheren Arbeiten (Reiter *et al.*, 1994) beschriebenen B3(dsFv)-PE38, nachgewiesen werden. Die gerichtete Assoziation und kovalente Verknüpfung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und E<sub>8</sub>C-PE38 führt somit nicht zu einem Verlust der biologischen Aktivität der beiden Komponenten des Immunotoxins. Deswegen ist die Kopplung eines Tumor-spezifischen Antikörperfragmentes mit einem potenten Toxin mittels polyionischer Fusionspeptide eine sehr effiziente Methode zur Herstellung biologisch aktiver

und Zelltyp-spezifischer Immunotoxine. Aufgrund der Verwendung polyionischer Fusionspeptide als Dimerisierungsmodul ist es im Gegensatz zu den genetisch fusionierten Immunotoxinen möglich, die zellbindende und cytotoxische Komponente separat und effizienter zu produzieren. Durch die verwendeten Methoden zur spezifischen Heterodimersierung ist ein einfaches *screening* verschiedener Antikörper gegen eine Vielzahl von Toxinen möglich. Vor dem Hintergrund, dass die derzeit in den klinischen Studien verwendeten Immunotoxine noch stark immunogen sind (Frankel *et al.*, 2000), wird es in Zukunft von entscheidender Bedeutung sein, neue cytotoxische Proteine zu finden, die eine wesentlich geringere Immunogenität aufweisen.

## 4.2. Immunotoxin B3-GzmB

Ein Ansatz für die Lösung des immunologischen Problems ist die Verwendung von cytotoxischen Proteinen, wie z.B. die humane RNase Angiogenin, die weniger immunogen auf den menschlichen Körper wirken. Angiogenin wurde genetisch mit dem humanen CD30-Liganden fusioniert, was zu einem Zelltyp-spezifischen *targeting* des so erzeugten Immunotoxins führte (Huhn *et al.*, 2001). Die cytotoxische Wirkung der RNasen wird jedoch durch Inhibitoren, die sich in großen Mengen im Cytosol befinden, stark geschwächt. Diese RNase-Inhibitoren, die eine sogenannten *horseshoe* Struktur aufweisen, binden an die RNasen und blockieren dadurch das aktive Zentrum (Kajava *et al.*, 1995). Deswegen wurde in dieser Arbeit als weiteres Modellsystem ein anderes humanes, nicht immunogenes Protein verwendet, welches toxisch ist, wenn es sich im Cytosol befindet, die Protease Granzym B. Granzym B wird aus Granula cytotoxischer T-Lymphocyten ausgeschüttet (Barry *et al.*, 2002; Fröhlich *et al.*, 1998). Es bindet mit Hilfe seiner Zuckerreste an den Kalzium-unabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (CI-MPR) auf der Zelloberfläche und wird mit Hilfe des porenbildenden Perforins in das Cytosol aufgenommen (Lieberman, 2003), wo es die Apoptose der Zelle über Caspase-abhängige und unabhängige Signalkaskaden induziert.

### 4.2.1 Produktion von GzmB-GCD<sub>8</sub> und Kopplung mit dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP

GzmB wurde C-terminal durch die negativ geladene Sequenz GCD<sub>8</sub> erweitert, wodurch es durch gerichtete Assoziation und kovalente Verknüpfung mit dem dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP gekoppelt werden kann. Durch die rekombinante Produktion von Granzym B in *E.coli* liegt das Protein nicht-glykosyliert vor und hat somit seinen natürlichen Tropismus verloren. Auf den

Ergebnissen zur Herstellung des polyionischen Immunotoxins B3-PE38 aufbauend, wurde versucht, auch GzmB-GCD<sub>8</sub> und dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP unter geeigneten Redoxbedingungen miteinander zu verknüpfen. Es kommt jedoch zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen Fusionspeptid von GzmB und dem sonst positiv geladenen Protein. Aufgrund dieser unspezifischen Assoziation war das freie Cystein des Fusionspeptides für die Ausbildung einer Disulfidbrücke nur schwer zugänglich und somit die Kopplungsreaktion sehr langsam. Bei Verwendung von reduziertem und oxidiertem Glutathion als *oxido-shuffling* System werden während der Kopplungsreaktion wahrscheinlich gemischte Disulfide ausgebildet, die eine spezifische Heterodimerisierung von GzmB-GCD<sub>8</sub> und dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP blockieren. Es konnte deswegen auch nur ein geringer Prozentsatz an Kopplungsprodukt detektiert werden. Um die Bildung solcher gemischter Disulfide zu verhindern, wurden weitere Kopplungsversuche in Abwesenheit von Glutathion durchgeführt. Die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen den beiden freien Cysteinen der Fusionspeptide erfolgte zum einen mittels Luftoxidation, die durch Kupferionen katalysiert wurde, zum anderen induziert durch die chemische Aktivierung des freien C-terminalen Cysteins des Antikörperfragmentes. Für beide Methoden konnte eine nahezu quantitative Kopplung der Proteine beobachtet werden. Die Konjugation, katalysiert durch chemische Aktivierung, war nach wenigen Stunden abgeschlossen, während die durch Luftsauerstoff katalysierte mehrere Tage dauerte. Deswegen erfolgte die Herstellung des polyionischen Immunotoxins B3-GzmB durch die chemische Aktivierung des freien C-terminalen Cysteins des dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP. Es konnte eine Ausbeute an Konjugat von über 80 % bestimmt werden.

#### 4.2.2 Untersuchung der *in vitro* Aktivität des B3-GzmB

Wie auch im Fall des Immunotoxins B3-PE38 hatte die Modifikation des GzmB durch die polyionischen Fusionspeptide und die Kopplung mit dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der cytotoxischen Komponente. Das polyionische Immunotoxin B3-GzmB stellt ein potentiell Therapeutikum dar. Für den Einsatz im lebenden Organismus ist es von entscheidender Bedeutung, dass GzmB auch unter physiologischen Bedingungen seine Aktivität nicht verliert. Deswegen wurde die enzymatische Aktivität von GzmB in Anwesenheit eines im Serum befindlichen Serinproteaseinhibitors und von humanem Plasma untersucht. Der Inhibitor  $\alpha$ 1-Antitrypsin zeigte keinen Einfluss auf die GzmB-katalysierte Spaltung des artifiziellen Substrates Ac-IEPD-pNA. GzmB zeigte sich in humanem Plasma stabil, die Inkubation führte lediglich zu einer moderaten Abnahme der proteolytischen

Aktivität sowohl gegenüber niedermolekularen als auch makromolekularen Substraten. Somit ist das polyionische Immunotoxin B3-GzmB prinzipiell für den Einsatz als Therapeutikum im menschlichen Organismus geeignet.

#### 4.2.3 Biologische Aktivität des Immunotoxins B3-GzmB in Zellkultur

Die biologische Wirksamkeit des rekombinanten GzmB, GzmB-GCD<sub>8</sub> und des B3-GzmB wurde in Zellkulturexperimenten untersucht. Wie schon bei dem polyionischen Immunotoxin B3-PE38 wurde auch beim B3-GzmB Zelllinien für die Untersuchung der Zelltyp-spezifischen Toxizität getestet. Die für B3-PE38 verwendete Lewis Y-positive Zelllinie MCF7 schied als Positivkontrolle aus, da diese Zellen eine Defizienz im Gen von Caspase 3 aufweisen. Die Caspase 3 ist der wichtigste Mediator für die apoptotische Wirkung von GzmB (Darmon *et al.*, 1995). Es mussten andere Lewis Y-positive Zelllinien gefunden werden, die eine intakte Caspase 3 besitzen. Der Nachweis der Antigenbindung durch das fluoreszenzmarkierte B3-Antikörperfragment erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse. Für die Zelllinie SK-BR3 konnte eine Bindung des Antikörperfragmentes nachgewiesen werden. Die Menge an exprimiertem Antigen auf der Oberfläche war geringer als bei den von mir verwendeten MCF7 Zellen. In der Literatur ist die Zelllinie A431 als Lewis Y-positiv beschrieben (Pastan *et al.*, 1991). Die von mir untersuchten A431 Zellen konnten jedoch nicht B3-TexasRed binden. Gleiches konnte auch für die Zelllinie K562 gezeigt werden. Beide Zelllinien wurden als Negativkontrolle für die Untersuchung der Zelltyp-spezifischen Toxizität des polyionischen Immunotoxins B3-GzmB eingesetzt.

Zunächst wurde die toxische Wirkung des rekombinanten GzmB auf die A431 und SK-BR3 Zellen untersucht. Die Aufnahme des GzmB erfolgte durch *fluid phase uptake*, vermittelt durch sublytische Konzentrationen von Streptolysin O (SLO), das als Perforin-Ersatz diente. Beide Zelllinien reagierten sehr unterschiedlich auf die Inkubation mit GzmB. A431 zeigte sich sehr sensitiv gegenüber GzmB-induzierter Apoptose. Schon bei einer Konzentration von 58,8 nM sank der Anteil an Lebendzellen auf 20 %. Hingegen zeigten sich die SK-BR3 Zellen relativ resistent gegenüber der Behandlung mit GzmB und SLO. Selbst bei der höchsten Konzentration von 588 nM GzmB überlebten immer noch 55 % der Zellen.

Die Untersuchung der Wirksamkeit und Spezifität des polyionischen Immunotoxins B3-GzmB erfolgte in Zellkulturexperimenten nach der gleichen Methode, die beim B3-PE38 verwendet wurde. Für das polyionische Immunotoxin B3-GzmB konnte ein cytotoxischer Effekt auf die Lewis Y-positive Zelllinie SK-BR3 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 98 nM beobachtet werden. Im

Vergleich dazu wirkte bei diesen Zellen das nicht gekoppelte GzmB-GCD<sub>8</sub> erst bei sehr hohen Konzentrationen toxisch (IC<sub>50</sub> = 1595 nM). Für die Lewis Y-negativen Zelllinien A431 und K562 konnten IC<sub>50</sub>-Werte von 863 nM bzw. >1128 nM ermittelt werden. Das nicht gekoppelte GzmB-GCD<sub>8</sub> zeigte sowohl mit Lewis Y-positiven wie auch Lewis Y-negativen Zellen eine nahezu gleiche unspezifische Toxizität, d.h. für die höhere Wirksamkeit des B3-GzmB ist allein die spezifische Bindung der Antikörperkomponente des polyionischen Immunotoxins verantwortlich. Das Zelltyp-spezifische *targeting* des B3-GzmB konnte mit den Lewis Y-negativen Zelllinie A431 und K562 nachgewiesen werden. Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte liegen im gleichen Bereich wie für die unspezifische Aufnahme des GzmB-GCD<sub>8</sub>. Auf die Lewis Y-positiv Zelllinie MCF7, die eine Defizienz für Caspase 3 aufweist, konnte ein cytotoxischer Effekt des polyionischen Immunotoxins B3-GzmB mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 140 nM nachgewiesen werden. B3-GzmB zeigte auf die Caspase 3-positiv Variante eine höhere cytotoxische Wirkung mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 35 nM. Dies untermauert die Bedeutung der Caspase 3-vermittelten Apoptose bei der cytotoxischen Wirkung des GzmB. Da die Höhe des Expressionslevel von Caspase 3 in den MCF7<sup>Casp3</sup> Zellen nicht bekannt ist, lässt sich keine Aussage darüber treffen, warum die Steigerung der cytotoxischen Wirkung des GzmB bei der Caspase 3-positiv Variante nur ca. Faktor 4 gegenüber den Wildtyp-Zellen beträgt. Die toxische Wirkung des nicht-gekoppelten GzmB-GCD<sub>8</sub> auf MCF7 und MCF7<sup>Casp3</sup> war für beide Zelllinien annähernd gleich und konnte im Vergleich zu der Wirkung von B3-GzmB auf MCF7<sup>Casp3</sup> erst bei höheren Konzentrationen beobachtet werden. Die präsentierten Daten zeigen, dass das rekombinante GzmB-GCD<sub>8</sub> durch Kopplung mit dem Antikörperfragment dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP in der Lage ist, spezifisch an Lewis Y-positiv Zielzellen zu binden und diese durch Induktion der Apoptose zu töten.

Die spezifische Toxizität des polyionischen Immunotoxins B3-GzmB wurde mit der des B3-PE38 unter identischen Bedingungen in Zellkulturexperimenten verglichen. Das Immunotoxin B3-PE38 zeigte auf die Lewis Y-positiv Zelllinien SK-BR3 und MCF7<sup>Casp3</sup> mit IC<sub>50</sub>-Werten von 41,9 nM und 1,8 nM eine um Faktor 2 bzw. 20 höhere spezifische cytotoxische Wirkung als das B3-GzmB. Jedoch konnte bei der Inkubation von Lewis Y-negativen Zellen (A431, K562) sowohl mit B3-PE38 als auch mit E<sub>8</sub>C-PE38 eine sehr hohe unspezifische Toxizität schon bei niedriger Konzentration (IC<sub>50</sub>=14-37 nM) beobachtet werden. Trotz der hohen Sensitivität der A431 Zellen gegenüber GzmB im Cytosol zeigte diese Lewis Y-negativ Zelllinie bei Inkubation mit B3-GzmB bzw. GzmB-GCD<sub>8</sub> eine wesentlich geringere unspezifische Toxizität, die auch bei der Zelllinie K562 beobachtet werden konnte (siehe Tabelle 3.2). Die Lewis Y-positiv SK-BR3 Zellen, die relativ resistent gegenüber GzmB

induzierter Apoptose sind, konnten trotzdem durch das Immunotoxin B3-GzmB mit einer dem B3-PE38 vergleichbaren Effizienz spezifisch getötet werden. Durch Bindung der gekoppelten Antikörperkomponente an die Oberfläche Lewis Y-positiver Zellen wird die cytosolische Aufnahme und somit die Effizienz von GzmB ähnlich wie beim PE38 verbessert.

Der Lewis Y-spezifische B3-Antikörper bindet an Kohlenhydrate von verschiedenen Proteinen auf der Oberfläche von Tumor- und Epithelzellen (Pastan *et al.*, 1991). Deswegen ist es schwierig eine Aussage darüber zu treffen, wie GzmB durch die Zellmembran aufgenommen wird. Nachdem das polyionische Immunotoxin B3-GzmB mittels des konjugierten Antikörperfragmentes an dem Lewis Y-Antigen gebunden und anschließend internalisiert wurde, kommt es zur Akkumulation in endosomalen Vesikeln. Einige der endocytierten Rezeptor-Immunkonjugat-Komplexe gelangen möglicherweise durch Translokation ins Cytosol (Olsnes *et al.*, 2003) und aktivieren dort proapoptotische Substrate.

Das PE38-Fragment ist im Gegensatz zum GzmB in der Lage, unter Verwendung zellulärer Transportmechanismen (retrograder Transport vom Endosom zum Endoplasmatischen Retikulum mittels des KDEL-Rezeptors, Translokation aus dem ER ins Cytosol durch den Sec61p Kanal), ins Cytosol zu gelangen (Jackson *et al.*, 1999; Koopmann *et al.*, 2000). Daher besitzen die auf dem *Pseudomonas* Exotoxin basierenden Konstrukte eine höhere cytotoxische Wirksamkeit als Konstrukte, die nicht über einen solch effizienten Mechanismus ins Cytosol gelangen.

Die Zelltyp-spezifische Toxizität von GzmB-basierenden Immunotoxinen konnte auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden. Dabei war GzmB genetisch mit dem VEGF (*vascular epithel growth factor*) bzw. mit dem Antikörperfragment scFvMEL (*single-chain anti-melanoma antibody*) fusioniert (Liu *et al.*, 2003). Darüber hinaus wurde kürzlich die Konstruktion eines neuartigen Immunotoxins (*immunoGrB*) beschrieben (Zhao *et al.*, 2004). Dieses Konstrukt besteht aus einem anti-ErbB2-scFv-Fragment, das C-terminal genetisch mit der Domäne II des *Pseudomonas* Exotoxins und Granzym B fusioniert wurde. Diese Domäne II ist für die Translokation des Proteins aus dem ER ins Cytosol verantwortlich. Das Immunotoxin wird von Jurkat Zellen produziert und sezerniert, welche in unterschiedlichen Mengen mit den Zielzellen inkubiert werden. Dadurch ist es möglich, selektiv ErbB2-überexprimierende Zellen zu töten. Das verwendete Konstrukt ist im Vergleich zu den auf dem *Pseudomonas* Exotoxin basierenden Immunotoxinen (Chen *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997) weniger immunogen und sollte sich daher für eine längerfristige Behandlung von Tumoren, die ErbB2 überexprimieren, eignen (Zhao *et al.*, 2004). In dieser Publikation wurde jedoch nicht die Toxizität des *immunoGrB* mit einem Konstrukt, bei dem die Domäne II des

*Pseudomonas* Exotoxins fehlt, verglichen. Dies hätte Aussagen darüber geben können, ob sich durch die Fusion der Translokationsdomäne mit GzmB dessen Cytotoxizität erhöht.

Schon in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass durch Fusion mit der Translokationsdomäne des *Pseudomonas* Exotoxins Proteine aus dem Endosom ins Cytosol gelangen können. Dies wurde am Beispiel des cytotoxischen Proteins Barnase, einer extrazellulären Ribonuklease des *Bacillus amyloliquefaciens*, die mit einem PE-Fragment, bestehend aus Domäne I und II, fusioniert wurde, untersucht (Prior *et al.*, 1992). Dieses Konstrukt (PE<sup>1-412</sup>-Bar-COOH) zeigte so gut wie keine cytotoxische Wirkung auf die Zellen (IC<sub>50</sub>>1000 ng/ml). Der C-Terminus des *Pseudomonas* Exotoxins speziell die letzten Aminosäuren REDLK sind essentiell für die cytotoxische Wirkung des PE (Chaudhary *et al.*, 1990), ohne dabei Einfluss auf die ADP-Ribosylierungsaktivität der Domäne III auszuüben (Prior *et al.*, 1992). Deswegen wurden die letzten 10 Aminosäuren des *Pseudomonas* Exotoxins genetisch mit dem C-Terminus des PE<sup>1-412</sup>-Bar-COOH Konstruktes fusioniert. Das so entwickelte Konstrukt (PE<sup>1-412</sup>-Bar) zeigte eine wesentlich größere Cytotoxizität (IC<sub>50</sub> = 10 ng/ml). In späteren Arbeiten wurde beschrieben, dass der C-Terminus des *Pseudomonas* Exotoxin den retrograden Transport via KDEL-Rezeptor vom Endosom zum Endoplasmatischen Retikulum vermittelt (Jackson *et al.*, 1999), und somit essentiell für die toxische Wirkung des PE ist. Erst im ER erfolgt die Translokation des 37 kD-Fragmentes des PE über den Sec61p Protein Komplex ins Cytosol (Koopmann *et al.*, 2000).

Im Fall des *immunoGrB* blieb jedoch der C-Terminus des fusionierten GzmB unverändert. Dieses Konstrukt ist somit nicht in der Lage über den retrograden Transport via KDEL-Rezeptor aus dem Endosom ins ER zu gelangen. Die Cytotoxizität des *immunoGrB*-Immunotoxin könnte durch eine Fusion des C-Terminus mit einer Proteinsequenz für den retrograden Transport wesentlich gesteigert werden. Durch solch ein Konstrukt könnte man die Effizienz von auf *Pseudomonas* Exotoxin basierenden Immunotoxinen mit der niedrigen Immunogenität vom GzmB-Immunotoxinen vereinen.

In dieser Arbeit konnte das Zelltyp-spezifische Töten von Krebszellen mittels des poly-ionischen Immunotoxins B3-GzmB gezeigt werden. Da der Mensch eine starke immunologische Toleranz gegenüber endogenem GzmB aufweist, sollte eine humorale oder zelluläre Immunantwort bei der Behandlung mit GzmB-basierenden Immunotoxinen nicht auftreten. In diesem Punkt ist das GzmB den bisher in Immunokonjugaten verwendeten Toxinen, wie dem *Diphtheria* Toxin, *Pseudomonas* Exotoxin oder verschiedener pflanzlichen Toxine, die eine hoch immunogene Wirkung zeigen (Kreitman, 1999), weit überlegen. Die Verwendung anderer antigenbindender Proteine als *target*-Modul könnte die Spezifität und Effizienz der

GzmB-basierenden Immunotoxine noch weiter erhöhen, die dadurch eine gute Alternative zu den zur Zeit in klinischen Studien befindlichen Konstrukten darstellen.

### 4.3. Immunotoxin B3-toxGal

Für beide polyionischen Immunotoxine B3-PE38 und B3-GzmB konnte aufgrund der Kopplung eines Antikörperfragmentes an ein cytotoxisches Protein eine Zelltyp-spezifische Toxizität nachgewiesen werden. Jedoch sind die bisher verwendeten Immunotoxine meist intrazellulärem proteolytischen Abbau unterworfen, wodurch sich die Effizienz ihrer toxischen Wirkung stark vermindert. In Anlehnung an Tumor-spezifische Antikörper, die mit Radionukliden bzw. Chemotherapeutika gekoppelt sind, wurde ein Protein hergestellt, dessen Aminosäuren cytotoxisch sind. Fluorierte Aminosäuren üben eine toxische Wirkung auf Zellen aus (Budisa *et al.*, 1999). Die Cytotoxizität von fluorierten Tyrosinen konnte mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 10-25 µM bestimmt werden (N. Budisa, persönliche Mitteilung). Dabei ist die Toxizität der fluorierten Tyrosine vermutlich durch ihre Aufnahme in die Zellen limitiert, da Aminosäuretransporter durchschnittliche Affinitäten zu den von ihnen transportierten Aminosäuren von ca. 100-500 µM haben (M. Brandsch, persönliche Mitteilung). Ein aus solchen Aminosäuren aufgebautes Protein kann zwar genauso wie die bisher verwendeten Immunotoxine proteolytisch abgebaut werden, der proteolytische Abbau ist hier allerdings für die Entfaltung der Wirkung sogar notwendig. Es wurde bis heute noch kein Immunotoxin beschrieben, dessen Wirkung auf der Cytotoxizität seiner Aminosäuren beruht. Wie bei den zuvor beschriebenen Konstrukten wurden die Antikörperkomponente und die cytotoxische Komponente mittels der entgegengesetzt geladenen Fusionspeptide miteinander verknüpft. Entscheidend für die toxische Wirkung ist die Menge an aufgenommenen fluorierten Aminosäuren. Deswegen wurde für die cytotoxische Komponente ein Protein ausgewählt, bei dessen endocytotischer Aufnahme möglichst viele fluorierte Aminosäuren in die Zelle gelangen. Durch die Verwendung von β-Galaktosidase als Trägerprotein könnten theoretisch durch die Aufnahme eines Moleküls 124 fluorierte Tyrosine in die Zelle transportiert werden.

#### 4.3.1 Produktion von Gal-CE<sub>8</sub>P und toxGal-CE<sub>8</sub>P

Damit die fluorierte β-Galaktosidase spezifisch Zellen tötet, wurde diese C-terminal um das Fusionspeptid CE<sub>8</sub>P verlängert, mit dem das Tumor-spezifische Antikörperfragment dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP gekoppelt werden kann. Die fluorierte (toxGal-CE<sub>8</sub>P) als auch unfluorierte β-Galaktosidase (Gal-CE<sub>8</sub>P) mit der C-terminalen Fusion wurde von Nediljko Budisa

(Martinsried) rekombinant in *E.coli* hergestellt. Mittels tryptischen Verdaus der toxGal-CE<sub>8</sub>P und massenspektroskopischer Analyse der Fragmente konnte die Fluorierung für 72 % der Tyrosine nachgewiesen werden. Somit stellte die gereinigte fluorierte  $\beta$ -Galaktosidase ein potentiell cytotoxisches Protein dar. Wie schon erwähnt, sollte durch die Kopplung des B3-Antikörperfragmentes das erhaltene polyionische Immunotoxin B3-toxGal in der Lage sein, spezifisch an Lewis Y-positive Zellen zu binden und diese nach Internalisierung und proteolytischen Abbau zu töten.

#### 4.3.2 Cytotoxizität von Gal-CE<sub>8</sub>P und toxGal-CE<sub>8</sub>P

Die cytotoxische Wirkung der fluorierten Tyrosine der  $\beta$ -Galaktosidase wurde in Zellkulturexperimenten mit der Zelllinie MCF7 untersucht. Als Kontrolle erfolgte das gleiche Experiment mit der unfluorierten Variante. Die MCF7 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Gal-CE<sub>8</sub>P bzw. toxGal-CE<sub>8</sub>P inkubiert. Die cytosolische Aufnahme beider Proteine erfolgte mit Hilfe des BioPorter Transfektionssystems. Für die fluorierte  $\beta$ -Galaktosidase konnte ein cytotoxischer Effekt auf die Zellen beobachtet werden. Die unfluorierte Variante hatte keine cytotoxische Wirkung auf die Zellen. Somit konnte die Cytotoxizität der fluorierten Tyrosine der toxGal-CE<sub>8</sub>P nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch, dass die cytotoxische Wirksamkeit der fluorierten  $\beta$ -Galaktosidase nicht so hoch ist wie die von PE38 und GzmB. Wie schon erwähnt, ist die Toxizität stark abhängig von der Menge an fluorierten Tyrosinen in der Zelle. Durch das Transfektionssystem gelangen die toxischen Moleküle direkt ins Cytosol. Die  $\beta$ -Galaktosidase ist gegenüber proteolytischem Abbau relativ stabil und wird deswegen in Zellkulturexperimenten sehr häufig als Reportersystem verwendet. Für die Entfaltung der toxischen Wirkung muss jedoch das Protein proteolytisch abgebaut werden, damit die fluorierten Tyrosine freigesetzt werden. Dies ist eine mögliche Ursache für die relativ geringe Cytotoxizität der toxGal-CE<sub>8</sub>P.

#### 4.3.3 Kopplung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und toxGal-CE<sub>8</sub>P

Die spezifische Assoziation und kovalente Verknüpfung von dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und toxGal-CE<sub>8</sub>P erfolgte in einem molaren Verhältnis von 3:1 (bezogen auf 1 Monomer toxGal-CE<sub>8</sub>P) unter Verwendung eines *oxido-shuffling* Systems. Die Effizienz der spezifischen Heterodimerisierung lag unter diesen Bedingungen bei 40 %. Dies bedeutet statistisch gesehen, dass ein Homotetramer der  $\beta$ -Galaktosidase mit 1-2 Molekülen dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP verknüpft ist.

#### 4.3.4 Biologische Aktivität des Immunotoxins B3-toxGal in Zellkultur

Die spezifische toxische Wirkung des polyionischen Immunotoxins B3-toxGal auf MCF7 Zellen wurde ohne die BioPorter vermittelte cytosolische Aufnahme untersucht, um ein Zelltyp-spezifisches *targeting* des Konjugates zu ermöglichen. Es konnte jedoch für B3-toxGal keine signifikante toxische Wirkung auf Zellen beobachtet werden. Selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration waren immer noch 65 % der Zellen lebend. Die Stärke der Cytotoxizität hängt von der Menge an fluorierten Tyrosinen im Cytosol der Zelle ab.

Ein zentraler Punkt zum besseren Verständnis der toxischen Wirkung von fluorierten Proteinen ist die Aufklärung der intrazellulären Lokalisation und möglicher Abbauewege. Durch eine Fusion der  $\beta$ -Galaktosidase mit dem humanen Ubiquitin könnte der intrazelluläre proteolytische Abbau verbessert und somit die Toxizität gesteigert werden. Dies wird bereits von Nediljko Budisa (Martinsried) untersucht. Zum besseren Verständnis der intrazellulären Lokalisation wurde sowohl eine fluorierte als auch unfluorierte Variante des Grün fluoreszierenden Proteins (GFP) hergestellt, das am C-Terminus um das polyionische Fusionspeptid CE<sub>8</sub>P erweitert wurde. Durch Kopplung mit dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP wird ein Zelltyp-spezifisches *targeting* des Konjugates ermöglicht. Aufgrund der Fluoreszenz des GFP ist es möglich, die Bindung an die Zelloberfläche, die Internalisierung des Proteins, den intrazellulären Transport und letztlich den Abbau des Proteins zu verfolgen. Diese Untersuchung könnte darüber Aufschluss geben, wie man die cytotoxische Wirkung fluorierter Proteine steigern kann.

Bisher gibt es noch zu wenig Daten zu dieser Art von Immunotoxinen, um eine Aussage darüber zu treffen, ob sie jemals für die Therapie am Menschen eingesetzt werden können. Zunächst muss die Cytotoxizität solcher fluorierter Proteine auf ähnliches Level wie die derzeit verwendeten Immunotoxine gesteigert werden. Die Verbesserungen lassen sich in Zellkulturexperimenten schnell und einfach nachweisen. Des Weiteren muss der Verbleib der fluorierten Aminosäuren nach dem Zelltod untersucht werden und ob diese einen negativen Effekt auf die umgebenden, möglicherweise noch gesunden Zellen haben. Die Forschung zu diesen fluorierten Immunotoxinen steht noch ganz am Anfang. Es wird sich in der nächsten Zeit herausstellen, ob der gewählte Ansatz, spezifisch Krebszellen zu töten, erfolgsversprechend ist.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden drei modulare Immunotoxine konstruiert und charakterisiert, bei denen die zellbindende Komponente und die cytotoxische Komponente mittels polyionischer Fusionspeptide verknüpft sind. Mit diesem Prinzip konnte ein Kopplungssystem etabliert werden, das in Zukunft ein schnelles und effizientes *screening* der für eine bestimmte Therapie geeigneten Kombination aus Antikörperfragment und Toxin gestattet. Bei allen untersuchten Komponenten der drei Immunotoxine hatte die polyionische Fusion sowie die Kopplung an das Partnerprotein keinen Einfluss auf ihre Stabilität und biologische Aktivität. Für das polyionische disulfidverbrückte B3-Antikörperfragment (dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP), welches spezifisch an das Lewis Y-Antigen auf der Oberfläche verschiedener Krebszelltypen bindet, konnte dies schon von Stubenrauch *et al.* (2001) gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte für das polyionische Immunotoxin B3-PE38, bestehend aus dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und dem trunkierten *Pseudomonas* Exotoxin mit der polyionischen Fusion (E<sub>8</sub>C-PE38), mit Hilfe verschiedener Methoden (Fluoreszenztitration, thermisch induzierte Denaturierung und CD-Spektroskopie) nachgewiesen werden, dass die Kopplung die strukturellen Eigenschaften weder des dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP noch des E<sub>8</sub>C-PE38 signifikant beeinflusst. Darüber hinaus ist das Immunotoxin B3-PE38 resistent gegenüber Proteolyse im Serum. Vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Stabilität und Aktivität erhielt man auch für B3-GzmB. In diesem Fall wurde dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP mit einem rekombinant in *E.coli* hergestellten Granzym B (GzmB-GCD<sub>8</sub>) mit Hilfe der polyionischen Fusionspeptide miteinander verknüpft. Entscheidend jedoch für den Einsatz von Immunotoxinen in der Therapie ist ihre biologische Wirksamkeit und Spezifität. Für B3-PE38 und B3-GzmB konnte dies in Zellkulturexperimenten nachgewiesen werden. Die beiden Immunotoxine unterschieden sich aber hinsichtlich ihrer Toxizität. So ist das B3-PE38 je nach Zelllinie um Faktor 2-20 effizienter beim Töten der Zielzellen als das B3-GzmB. Jedoch konnte auch eine hohe unspezifische Wirkung des auf dem *Pseudomonas* Exotoxin basierenden Konstruktes mit einigen Lewis Y-negativen Zelllinien beobachtet werden. Hingegen ist die unspezifische Toxizität des B3-GzmB auch mit sehr GzmB-sensitiven Zelllinien sehr gering. Im Gegensatz zu den beiden ersten Immunotoxinen konnte für B3-toxGal, das aus dem dsFv-B3-R<sub>8</sub>CP und einer mit fluorierten Tyrosinen modifizierten Variante der  $\beta$ -Galaktosidase, die C-terminal mit dem polyionischen Peptid CE<sub>8</sub>P fusioniert wurde, aufgebaut ist, keine signifikante toxische Wirkung auf Zellen beobachtet werden. Es gilt in naher Zukunft aufzuklären, warum dies so ist, und wie man die Effizienz fluorierter Immunotoxine verbessern kann. Für die polyionischen Immunotoxine B3-PE38 und B3-GzmB muss in weiterführenden Experimenten

überprüft werden, ob die in Zellkultur beobachtete Zelltyp-spezifische Cytotoxizität in geeigneten Tiermodellen zu einer Tumorregression oder Inhibierung des Tumorwachstums führt.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adams GP, McCartney JE, Tai MS, Oppermann H, Huston JS, Stafford WF 3rd, Bookman MA, Fand I, Houston LL, Weiner LM: Highly specific in vivo tumor targeting by monovalent and divalent forms of 741F8 anti-c-erbB-2 single-chain Fv. *Cancer Res.* 1993 Sep 1;53(17):4026-34.
- Adams GP, Schier R, McCall AM, Simmons HH, Horak EM, Alpaugh RK, Marks JD, Weiner LM: High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. *Cancer Res.* 2001 Jun 15;61(12):4750-5.
- Amlot PL, Stone MJ, Cunningham D, Fay J, Newman J, Collins R, May R, McCarthy M, Richardson J, Ghetie V, et al.: A phase I study of an anti-CD22-deglycosylated ricin A chain immunotoxin in the treatment of B-cell lymphomas resistant to conventional therapy. *Blood.* 1993 Nov 1;82(9):2624-33.
- Bacha P, Shaw J, Baselga J, Marshal M, Osborne C, Eder J, von Hoff D, Estis L, Nichols J: Phase I dose-escalation studies of the safety and tolerability of DAB389EGF in patients with epidermal growth factor receptor (EGF-R) expressing solid tumors. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Immunotoxins*, p. 138, Myrtle Beach, 1995.
- Baker TS *et al.*: Engineering in Breast Cancer Diagnosis and Treatment. in *Antigen and Antibody Molecular* (ed. Ceriani RL) (Plenum, New York, 1994).
- Barry M, Bleackley RC: Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol.* 2002 Jun;2(6):401-9.
- Beattie BK, Prentice GA, Merrill AR: Investigation into the catalytic role for the tryptophan residues within domain III of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Biochemistry.* 1996 Dec 3;35(48):15134-42.
- Bendas G: Immunoliposomes: a promising approach to targeting cancer therapy. *BioDrugs.* 2001;15(4):215-24.
- Benhar I, Reiter Y, Pai LH, Pastan I: Administration of disulfide-stabilized Fv-immunotoxins B1(dsFv)-PE38 and B3(dsFv)-PE38 by continuous infusion increases their efficacy in curing large tumor xenografts in nude mice. *Int J Cancer.* 1995 Jul 28;62(3):351-5.
- Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M: Single-chain antigen-binding proteins. *Science.* 1988 Oct 21;242(4877):423-6.
- Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24;7(6):1513-23.
- Bookman MA: Biological therapy of ovarian cancer: current directions. *Semin Oncol.* 1998 Jun;25(3):381-96.
- Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ: Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature.* 1984 Dec 13-19;312(5995):643-6.

- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
- Brinkmann U, Keppler-Hafkemeyer A, Hafkemeyer P: Recombinant immunotoxins for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2001 Jul;1(4):693-702.
- Brinkmann U, Mattes RE, Buckel P: High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene.* 1989 Dec 21;85(1):109-14.
- Brinkmann U, Pai LH, FitzGerald DJ, Willingham M, Pastan I: B3(Fv)-PE38KDEL, a single-chain immunotoxin that causes complete regression of a human carcinoma in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Oct 1;88(19):8616-20.
- Brinkmann U, Reiter Y, Jung SH, Lee B, Pastan I: A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Aug 15;90(16):7538-42.
- Budisa N, Minks C, Alefelder S, Wenger W, Dong F, Moroder L, Huber R: Toward the experimental codon reassignment in vivo: protein building with an expanded amino acid repertoire. *FASEB J.* 1999 Jan;13(1):41-51.
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM: XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques.* 1987 5, 376-379.
- Byers VS, Rodvien R, Grant K, Durrant LG, Hudson KH, Baldwin RW, Scannon PJ: Phase I study of monoclonal antibody-ricin A chain immunotoxin XomaZyme-791 in patients with metastatic colon cancer. *Cancer Res.* 1989 Nov 1;49(21):6153-60.
- Caron PC, Laird W, Co MS, Avdalovic NM, Queen C, Scheinberg DA: Engineered humanized dimeric forms of IgG are more effective antibodies. *J Exp Med.* 1992 Oct 1;176(4):1191-5.
- Carter NP, Meyer EW: Introduction to the principles of flow cytometry. Ormerod, M.G. ed., *Flow Cytometry*, 2<sup>nd</sup> ed. IRL Press, Oxford (1994).
- Carter P: Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer.* 2001 Nov;1(2):118-29
- Chang K, Pastan I: Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jan 9;93(1):136-40.
- Chaudhary VK, Jinno Y, FitzGerald D, Pastan I: *Pseudomonas* exotoxin contains a specific sequence at the carboxyl terminus that is required for cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jan;87(1):308-12.

- Chen SY, Yang AG, Chen JD, Kute T, King CR, Collier J, Cong Y, Yao C, Huang XF: Potent antitumour activity of a new class of tumour-specific killer cells. *Nature*. 1997 Jan 2;385(6611):78-80.
- Chinol M, Casalini P, Maggiolo M, Canevari S, Omodeo ES, Caliceti P, Veronese FM, Cremonesi M, Chiolerio F, Nardone E, Siccardi AG, Paganelli G: Biochemical modifications of avidin improve pharmacokinetics and biodistribution, and reduce immunogenicity. *Br J Cancer*. 1998 Jul;78(2):189-97.
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH: One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr;86(7):2172-5.
- Clynes R, Takechi Y, Moroi Y, Houghton A, Ravetch JV: Fc receptors are required in passive and active immunity to melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jan 20;95(2):652-6.
- Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ: Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol*. 1999 Sep;17(9):2639-48.
- Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC: Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature*. 1995 Oct 5;377(6548):446-8.
- Donch J, Greenberg J: Genetic analysis of lon mutants of strain K-12 of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*. 1968;103(2):105-15.
- Dübel S: Reconstitution of human pancreatic Rnase from two separate fragments fused to different single chain antibody fragments: On the way to binary immunotoxins. *Tumor Targeting*. 1999 4, 37-46.
- Duvic M, Cather J, Maize J, Frankel AE: DAB<sub>389</sub>IL2 diphtheria fusion toxin produces clinical responses in tumor stage cutaneous T cell lymphoma. *Am J Hematol*. 1998 May;58(1):87-90.
- Ellman GL: Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959 May;82(1):70-7.
- Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*. 1971 Jun 22;10(13):2606-17.
- Falini B, Bolognesi A, Flenghi L, Tazzari PL, Broe MK, Stein H, Durkop H, Aversa F, Corneli P, Pizzolo G, et al.: Response of refractory Hodgkin's disease to monoclonal anti-CD30 immunotoxin. *Lancet*. 1992 May 16;339(8803):1195-6.
- Falnes PO, Sandvig K: Penetration of protein toxins into cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2000 Aug;12(4):407-13.
- Farah RA, Clinchy B, Herrera L, Vitetta ES: The development of monoclonal antibodies for the therapy of cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1998;8(3-4):321-56.

- Fishwild DM, O'Donnell SL, Bengoechea T, Hudson DV, Harding F, Bernhard SL, Jones D, Kay RM, Higgins KM, Schramm SR, Lonberg N: High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat Biotechnol.* 1996 Jul;14(7):845-51.
- Folkman J: Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 2002 Dec;29(6 Suppl 16):15-8.
- Frankel AE, Kreitman RJ, Sausville EA: Targeted toxins. *Clin Cancer Res.* 2000 Feb;6(2):326-34.
- Frankel AE, Laver JH, Willingham MC, Burns LJ, Kersey JH, Vallera DA: Therapy of patients with T-cell lymphomas and leukemias using an anti-CD7 monoclonal antibody-ricin A chain immunotoxin. *Leuk Lymphoma.* 1997 Jul;26(3-4):287-98.
- Froelich CJ, Dixit VM, Yang X: Lymphocyte granule-mediated apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases. *Immunol Today.* 1998 Jan;19(1):30-6.
- Fujimori K, Covell DG, Fletcher JE, Weinstein JN: A modeling analysis of monoclonal antibody percolation through tumors: a binding-site barrier. *J Nucl Med.* 1990 Jul;31(7):1191-8.
- Ghetie MA, Podar EM, Ilgen A, Gordon BE, Uhr JW, Vitetta ES: Homodimerization of tumor-reactive monoclonal antibodies markedly increases their ability to induce growth arrest or apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jul 8;94(14):7509-14.
- Ghetie V, Till MA, Ghetie MA, Uhr JW, Vitetta ES: Large scale preparation of an immunoconjugate constructed with human recombinant CD4 and deglycosylated ricin A chain. *J Immunol Methods.* 1990 Jan 24;126(1):135-41.
- Glockshuber R, Malia M, Pfitzinger I, Pluckthun A: A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry.* 1990 Feb 13;29(6):1362-7.
- Goldberg MR, Heimbrook DC, Russo P, Sarosdy MF, Greenberg RE, Giantonio BJ, Linehan WM, Walther M, Fisher HA, Messing E, et al.: Phase I clinical study of the recombinant oncotxin TP40 in superficial bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 1995 Jan;1(1):57-61.
- Gorter A, Meri S: Immune evasion of tumor cells using membrane-bound complement regulatory proteins. *Immunol Today.* 1999 Dec;20(12):576-82.
- Gould BJ, Borowitz MJ, Groves ES, Carter PW, Anthony D, Weiner LM, Frankel AE: Phase I study of an anti-breast cancer immunotoxin by continuous infusion: report of a targeted toxic effect not predicted by animal studies. *J Natl Cancer Inst.* 1989 May 10;81(10):775-81.
- Grauschopf U, 2000: Strukturelle und funktionelle Untersuchungen am humanen Parathormon-Rezeptor. Dissertation, Universität Halle-Wittenberg

- Grossbard ML, Freedman AS, Ritz J, Coral F, Goldmacher VS, Eliseo L, Spector N, Dear K, Lambert JM, Blattler WA, et al.: Serotherapy of B-cell neoplasms with anti-B4-blocked ricin: a phase I trial of daily bolus infusion. *Blood*. 1992 Feb 1;79(3):576-85.
- Grossbard ML, Lambert JM, Goldmacher VS, Spector NL, Kinsella J, Eliseo L, Coral F, Taylor JA, Blattler WA, Epstein CL, et al.: Anti-B4-blocked ricin: a phase I trial of 7-day continuous infusion in patients with B-cell neoplasms. *J Clin Oncol*. 1993 Apr;11(4):726-37.
- Hafkemeyer P, Brinkmann U, Gottesman MM, Pastan I: Apoptosis induced by *Pseudomonas* exotoxin: a sensitive and rapid marker for gene delivery in vivo. *Hum Gene Ther*. 1999 Apr 10;10(6):923-34.
- Haggerty HG, Warner WA, Comerkeski CR, Peden WM, Mezza LE, Damle BD, Siegall CB, Davidson TJ: BR96 sFv-PE40 immunotoxin: nonclinical safety assessment. *Toxicol Pathol*. 1999 Jan-Feb;27(1):87-94.
- Hall PD, Virella G, Willoughby T, Atchley DH, Kreitman RJ, Frankel AE: Antibody response to DT-GM, a novel fusion toxin consisting of a truncated diphtheria toxin (DT) linked to human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM), during a phase I trial of patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Clin Immunol*. 2001 Aug;100(2):191-7.
- Hanes J, Schaffitzel C, Knappik A, Pluckthun A: Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nat Biotechnol*. 2000 Dec;18(12):1287-92.
- Hertler AA, Schlossman DM, Borowitz MJ, Blythman HE, Casellas P, Frankel AE: An anti-CD5 immunotoxin for chronic lymphocytic leukemia: enhancement of cytotoxicity with human serum albumin-monensin. *Int J Cancer*. 1989 Feb 15;43(2):215-9.
- Hesketh P, Caguioa P, Koh H, Dewey H, Facada A, McCaffrey R, Parker K, Nylén P, Woodworth T: Clinical activity of a cytotoxic fusion protein in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 1993 Sep;11(9):1682-90.
- Huhn M, Sasse S, Tur MK, Matthey B, Schinkothe T, Rybak SM, Barth S, Engert A: Human angiogenin fused to human CD30 ligand (Ang-CD30L) exhibits specific cytotoxicity against CD30-positive lymphoma. *Cancer Res*. 2001 Dec 15;61(24):8737-42.
- Husain SR, Behari N, Kreitman RJ, Pastan I, Puri RK: Complete regression of established human glioblastoma tumor xenograft by interleukin-4 toxin therapy. *Cancer Res*. 1998 Aug 15;58(16):3649-53.
- Hwang J, Fitzgerald DJ, Adhya S, Pastan I: Functional domains of *Pseudomonas* exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in *E. coli*. *Cell*. 1987 Jan 16;48(1):129-36.
- Idusogie EE, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Wong PY, Ultsch M, Meng YG, Mulkerrin MG: Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J Immunol*. 2000 Apr 15;164(8):4178-84.

- Idusogie EE, Wong PY, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Ultsch M, Mulkerrin MG: Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J Immunol.* 2001 Feb 15;166(4):2571-5.
- Idziorek T, FitzGerald D, Pastan I: Low pH-induced changes in *Pseudomonas* exotoxin and its domains: increased binding of Triton X-114. *Infect Immun.* 1990 May;58(5):1415-20.
- Jackson ME, Simpson JC, Girod A, Pepperkok R, Roberts LM, Lord JM: The KDEL retrieval system is exploited by *Pseudomonas* exotoxin A, but not by Shiga-like toxin-1, during retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* 1999 Feb;112 ( Pt 4):467-75.
- Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG: Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem.* 1998 Apr 17;273(16):9357-60.
- Jermutus L, Honegger A, Schwesinger F, Hanes J, Pluckthun A: Tailoring in vitro evolution for protein affinity or stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 2;98(1):75-80.
- Johnson S, Bird RE: Construction of single-chain Fv derivatives monoclonal antibodies and their production in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 1991;203:88-98.
- Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G: Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature.* 1986 May 29-Jun 4;321(6069):522-5.
- Kajava AV, Vassart G, Wodak SJ: Modeling of the three-dimensional structure of proteins with the typical leucine-rich repeats. *Structure.* 1995 Sep 15;3(9):867-77.
- Karpovsky B, Titus JA, Stephany DA, Segal DM: Production of target-specific effector cells using hetero-cross-linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc gamma receptor antibodies. *J Exp Med.* 1984 Dec 1;160(6):1686-701.
- Keppler-Hafkemeyer A, Kreitman RJ, Pastan I: Apoptosis induced by immunotoxins used in the treatment of hematologic malignancies. *Int J Cancer.* 2000 Jul 1;87(1):86-94.
- Koelemij R, Kuppen PJ, van de Velde CJ, Fleuren GJ, Hagens M, Eggermont AM: Bispecific antibodies in cancer therapy, from the laboratory to the clinic. *J Immunother.* 1999 Nov;22(6):514-24.
- Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975 Aug 7;256(5517):495-7.
- Koopmann JO, Albring J, Huter E, Bulbuc N, Spee P, Neefjes J, Hammerling GJ, Momburg F: Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity.* 2000 Jul;13(1):117-27.

- Kounnas MZ, Morris RE, Thompson MR, FitzGerald DJ, Strickland DK, Saelinger CB: The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A. *J Biol Chem.* 1992 Jun 25;267(18):12420-3.
- Kreitman RJ, Wilson WH, Bergeron K, Raggio M, Stetler-Stevenson M, FitzGerald DJ, Pastan I: Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia. *N Engl J Med.* 2001 Jul 26;345(4):241-7.
- Kreitman RJ, Wilson WH, Robbins D, Margulies I, Stetler-Stevenson M, Waldmann TA, Pastan I: Responses in refractory hairy cell leukemia to a recombinant immunotoxin. *Blood.* 1999 Nov 15;94(10):3340-8.
- Kreitman RJ, Wilson WH, White JD, Stetler-Stevenson M, Jaffe ES, Giardina S, Waldmann TA, Pastan I: Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol.* 2000 Apr;18(8):1622-36.
- Kreitman RJ: Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Immunol.* 1999 Oct;11(5):570-8.
- Kuan CT, Pai LH, Pastan I: Immunotoxins containing Pseudomonas exotoxin that target LeY damage human endothelial cells in an antibody-specific mode: relevance to vascular leak syndrome. *Clin Cancer Res.* 1995 Dec;1(12):1589-94.
- Kurschus FC, Kleinschmidt M, Fellows E, Dornmair K, Rudolph R, Lilie H, Jenne DE: Killing of target cells by redirected granzyme B in the absence of perforin. *FEBS Lett.* 2004 Mar 26;562(1-3):87-92.
- Kyhse-Andersen J: Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods.* 1984 Dec;10(3-4):203-9.
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(259):680-5.
- Laske DW, Muraszko KM, Oldfield EH, DeVroom HL, Sung C, Dedrick RL, Simon TR, Colandrea J, Copeland C, Katz D, Greenfield L, Groves ES, Houston LL, Youle RJ: Intraventricular immunotoxin therapy for leptomeningeal neoplasia. *Neurosurgery.* 1997 Nov;41(5):1039-49; discussion 1049-51.
- Laske DW, Youle RJ, Oldfield EH: Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors. *Nat Med.* 1997 Dec;3(12):1362-8.
- LeMaistre CF, Rosen S, Frankel A, Kornfeld S, Saria E, Meneghetti C, Drajesk J, Fishwild D, Scannon P, Byers V: Phase I trial of H65-RTA immunoconjugate in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.* 1991 Sep 1;78(5):1173-82.
- Lieberman J: The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2003 May;3(5):361-70.

- Liu Y, Cheung LH, Hittelman WN, Rosenblum MG: Targeted delivery of human pro-apoptotic enzymes to tumor cells: In vitro studies describing a novel class of recombinant highly cytotoxic agents. *Mol Cancer Ther.* 2003 Dec;2(12):1341-50.
- Liu Y, Cheung LH, Thorpe P, Rosenblum MG: Mechanistic studies of a novel human fusion toxin composed of vascular endothelial growth factor (VEGF)121 and the serine protease granzyme B: directed apoptotic events in vascular endothelial cells. *Mol Cancer Ther.* 2003 Oct;2(10):949-59.
- Lode HN, Reisfeld RA: Targeted cytokines for cancer immunotherapy. *Immunol Res.* 2000;21(2-3):279-88.
- Lode HN, Xiang R, Becker JC, Gillies SD, Reisfeld RA: Immunocytokines: a promising approach to cancer immunotherapy. *Pharmacol Ther.* 1998 Dec;80(3):277-92.
- Lynch TJ Jr, Lambert JM, Coral F, Shefner J, Wen P, Blattler WA, Collinson AR, Ariniello PD, Braman G, Cook S, Esseltine D, Elias A, Skarin A, Ritz J: Immunotoxin therapy of small-cell lung cancer: a phase I study of N901-blocked ricin. *J Clin Oncol.* 1997 Feb;15(2):723-34.
- May T, Gleiter S, Lilie H: Assessment of cell type specific gene transfer of polyoma virus like particles presenting a tumor specific antibody Fv fragment. *J Virol Methods.* 2002 Aug;105(1):147-57.
- McKee ML, FitzGerald DJ: Reduction of furin-nicked Pseudomonas exotoxin A: an unfolding story. *Biochemistry.* 1999 Dec 14;38(50):16507-13.
- McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK: Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol.* 1998 Aug;16(8):2825-33.
- Merchant AM, Zhu Z, Yuan JQ, Goddard A, Adams CW, Presta LG, Carter P: An efficient route to human bispecific IgG. *Nat Biotechnol.* 1998 Jul;16(7):677-81.
- Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT: Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Nov;81(21):6851-5.
- Moses MA, Harper J, Fernandez CA: A role for antiangiogenic therapy in breast cancer. *Curr Oncol Rep.* 2004 Jan;6(1):42-8.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.
- Naglich JG, Metherall JE, Russell DW, Eidels L: Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell.* 1992 Jun 12;69(6):1051-61.

- Newton DL, Xue Y, Olson KA, Fett JW, Rybak SM: Angiogenin single-chain immunofusions: influence of peptide linkers and spacers between fusion protein domains. *Biochemistry*. 1996 Jan 16;35(2):545-53.
- Niculescu-Duvaz I, Friedlos F, Niculescu-Duvaz D, Davies L, Springer CJ: Prodrugs for antibody- and gene-directed enzyme prodrug therapies (ADEPT and GDEPT). *Anticancer Drug Des*. 1999 Dec;14(6):517-38.
- Olsen E, Duvic M, Frankel A, Kim Y, Martin A, Vonderheid E, Jegasothy B, Wood G, Gordon M, Heald P, Oseroff A, Pinter-Brown L, Bowen G, Kuzel T, Fivenson D, Foss F, Glode M, Molina A, Knobler E, Stewart S, Cooper K, Stevens S, Craig F, Reuben J, Bacha P, Nichols J: Pivotal phase III trial of two dose levels of denileukin diftitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2001 Jan 15;19(2):376-88.
- Olsnes S, Klingenberg O, Wiedlocha A: Transport of exogenous growth factors and cytokines to the cytosol and to the nucleus. *Physiol Rev*. 2003 Jan;83(1):163-82.
- Pack P, Pluckthun A: Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric FV fragments with high avidity in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 1992 Feb 18;31(6):1579-84.
- Pagliari LC, Liu B, Munker R, Andreeff M, Freireich EJ, Scheinberg DA, Rosenblum MG: Humanized M195 monoclonal antibody conjugated to recombinant gelonin: an anti-CD33 immunotoxin with antileukemic activity. *Clin Cancer Res*. 1998 Aug;4(8):1971-6.
- Pai LH, Bookman MA, Ozols RF, Young RC, Smith JW 2nd, Longo DL, Gould B, Frankel A, McClay EF, Howell S, et al.: Clinical evaluation of intraperitoneal *Pseudomonas* exotoxin immunoconjugate OVB3-PE in patients with ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 1991 Dec;9(12):2095-103.
- Pai LH, Wittes R, Setser A, Willingham MC, Pastan I: Treatment of advanced solid tumors with immunotoxin LMB-1: an antibody linked to *Pseudomonas* exotoxin. *Nat Med*. 1996 Mar;2(3):350-3.
- Pai-Scherf LH, Villa J, Pearson D, Watson T, Liu E, Willingham MC, Pastan I: Hepatotoxicity in cancer patients receiving erb-38, a recombinant immunotoxin that targets the erbB2 receptor. *Clin Cancer Res*. 1999 Sep;5(9):2311-5.
- Park JW, Hong K, Carter P, Asgari H, Guo LY, Keller GA, Wirth C, Shalaby R, Kotts C, Wood WI, et al.: Development of anti-p185HER2 immunoliposomes for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Feb 28;92(5):1327-31.
- Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Meyer O, Papahadjopoulos D, Benz CC: Anti-HER2 immunoliposomes for targeted therapy of human tumors. *Cancer Lett*. 1997 Oct 14;118(2):153-60.
- Pastan I, Lovelace ET, Gallo MG, Rutherford AV, Magnani JL, Willingham MC: Characterization of monoclonal antibodies B1 and B3 that react with mucinous adenocarcinomas. *Cancer Res*. 1991 Jul 15;51(14):3781-7.

- Pastan I: Targeted therapy of cancer with recombinant immunotoxins. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Oct 24;1333(2):C1-6.
- Penichet ML, Morrison SL: Antibody-cytokine fusion proteins for the therapy of cancer. *J Immunol Methods*. 2001 Feb 1;248(1-2):91-101.
- Pietersz GA, Wenjun L, Krauer K, Baker T, Wreschner D, McKenzie IF: Comparison of the biological properties of two anti-mucin-1 antibodies prepared for imaging and therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 1997 Aug;44(6):323-8.
- Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, Pegram MD, Howell SB, Slamon DJ: Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene*. 1994 Jul;9(7):1829-38.
- Pietras RJ, Pegram MD, Finn RS, Maneval DA, Slamon DJ: Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene*. 1998 Oct 29;17(17):2235-49.
- Plückthun A, Pack P: New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology*. 1997 Jun;3(2):83-105.
- Prior TI, FitzGerald DJ, Pastan I: Translocation mediated by domain II of *Pseudomonas* exotoxin A: transport of barnase into the cytosol. *Biochemistry*. 1992 Apr 14;31(14):3555-9.
- Puri RK, Hoon DS, Leland P, Snoy P, Rand RW, Pastan I, Kreitman RJ: Preclinical development of a recombinant toxin containing circularly permuted interleukin 4 and truncated *Pseudomonas* exotoxin for therapy of malignant astrocytoma. *Cancer Res*. 1996 Dec 15;56(24):5631-7.
- Reiter Y, Brinkmann U, Jung SH, Lee B, Kasprzyk PG, King CR, Pastan I: Improved binding and antitumor activity of a recombinant anti-erbB2 immunotoxin by disulfide stabilization of the Fv fragment. *J Biol Chem*. 1994 Jul 15;269(28):18327-31.
- Reiter Y, Pai LH, Brinkmann U, Wang QC, Pastan I: Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of a recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Cancer Res*. 1994 May 15;54(10):2714-8.
- Reiter Y, Pastan I: Antibody engineering of recombinant Fv immunotoxins for improved targeting of cancer: disulfide-stabilized Fv immunotoxins. *Clin Cancer Res*. 1996 Feb;2(2):245-52.
- Reynolds JA, Tanford C: Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1970 Jul;66(3):1002-7.
- Richter S, 2001: Biotechnologische Anwendungen polyionischer Fusionspeptide. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Richter SA, Stubenrauch K, Lilie H, Rudolph R: Polyionic fusion peptides function as specific dimerization motifs. *Protein Eng*. 2001 Oct;14(10):775-83.

- Riedl SJ, Fuentes-Prior P, Renatus M, Kairies N, Krapp S, Huber R, Salvesen GS, Bode W: Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 18;98(26):14790-5.
- Rudolph R, Boehm G, Lilie H, Jaenicke R: Folding Proteins. In: Creighton, T. E.(Hrsg.): (1997) *Protein function - a practical approach*, 57-99.
- Sambrook J, Fritsch ER, Maniatis T: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, 1989
- Sandvig K, van Deurs B: Membrane traffic exploited by protein toxins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2002;18:1-24. Epub 2002 Apr 02.
- Sandvig K, van Deurs B: Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett*. 2002 Oct 2;529(1):49-53.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.
- Sausville EA, Headlee D, Stetler-Stevenson M, Jaffe ES, Solomon D, Figg WD, Herdt J, Kopp WC, Rager H, Steinberg SM, et al.: Continuous infusion of the anti-CD22 immunotoxin IgG-RFB4-SMPT-dgA in patients with B-cell lymphoma: a phase I study. *Blood*. 1995 Jun 15;85(12):3457-65.
- Schier R, McCall A, Adams GP, Marshall KW, Merritt H, Yim M, Crawford RS, Weiner LM, Marks C, Marks JD: Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J Mol Biol*. 1996 Nov 8;263(4):551-67.
- Schmid FX: Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In Creighton TE, 2<sup>nd</sup> ed. *Protein structure, a practical approach*. Oxford University Press, 1997
- Schnell R, Vitetta E, Schindler J, Barth S, Winkler U, Borchmann P, Hansmann ML, Diehl V, Ghetie V, Engert A: Clinical trials with an anti-CD25 ricin A-chain experimental and immunotoxin (RFT5-SMPT-dgA) in Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 1998 Aug;30(5-6):525-37.
- Schoner BE, Belagaje RM, Schoner RG: Enhanced translational efficiency with two-cistron expression system. *Methods Enzymol*. 1990;185:94-103.
- Sedalacek HH *et al.*: *Antibodies as Carriers of Cytotoxicity* Vol. 43 (Karger, Munich, Germany, 1992).
- Segal DM, Weiner GJ, Weiner LM: Bispecific antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol*. 1999 Oct;11(5):558-62.

- Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG: High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem*. 2001 Mar 2;276(9):6591-604. Epub 2000 Nov 28
- Siegall CB, Haggerty HG, Warner GL, Chace D, Mixan B, Linsley PS, Davidson T: Prevention of immunotoxin-induced immunogenicity by coadministration with CTLA4Ig enhances antitumor efficacy. *J Immunol*. 1997 Nov 15;159(10):5168-73.
- Sievers EL, Larson RA, Stadtmauer EA, Estey E, Lowenberg B, Dombret H, Karanes C, Theobald M, Bennett JM, Sherman ML, Berger MS, Eten CB, Loken MR, van Dongen JJ, Bernstein ID, Appelbaum FR; Mylotarg Study Group: Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol*. 2001 Jul 1;19(13):3244-54.
- Simpson JC, Smith DC, Roberts LM, Lord JM: Expression of mutant dynamin protects cells against diphtheria toxin but not against ricin. *Exp Cell Res*. 1998 Mar 15;239(2):293-300.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001 Mar 15;344(11):783-92.
- Smith GK, Banks S, Blumenkopf TA, Cory M, Humphreys J, Laethem RM, Miller J, Moxham CP, Mullin R, Ray PH, Walton LM, Wolfe LA 3<sup>rd</sup>: Toward antibody-directed enzyme prodrug therapy with the T268G mutant of human carboxypeptidase A1 and novel in vivo stable prodrugs of methotrexate. *J Biol Chem*. 1997 Jun 20;272(25):15804-16.
- Spitler LE, del Rio M, Khentigan A, Wedel NI, Brophy NA, Miller LL, Harkonen WS, Rosendorf LL, Lee HM, Mischak RP, et al.: Therapy of patients with malignant melanoma using a monoclonal antimelanoma antibody-ricin A chain immunotoxin. *Cancer Res*. 1987 Mar 15;47(6):1717-23.
- Stoldt HS, Aftab F, Chinol M, Paganelli G, Luca F, Testori A, Geraghty JG: Pretargeting strategies for radio-immunoguided tumour localisation and therapy. *Eur J Cancer*. 1997 Feb;33(2):186-92.
- Stone MJ, Sausville EA, Fay JW, Headlee D, Collins RH, Figg WD, Stetler-Stevenson M, Jain V, Jaffe ES, Solomon D, Lush RM, Senderowicz A, Ghetie V, Schindler J, Uhr JW, Vitetta ES: A phase I study of bolus versus continuous infusion of the anti-CD19 immunotoxin, IgG-HD37-dgA, in patients with B-cell lymphoma. *Blood*. 1996 Aug 15;88(4):1188-97.
- Stubenrauch K, Gleiter S, Brinkmann U, Rudolph R, Lilie H: Conjugation of an antibody Fv fragment to a virus coat protein: cell-specific targeting of recombinant polyoma-virus-like particles. *Biochem J*. 2001 Jun 15;356(Pt 3):867-73.

- Studier FW, Moffatt BA: Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 1986 May 5;189(1):113-30.
- Suzuki M, Saxena SK, Boix E, Prill RJ, Vasandani VM, Ladner JE, Sung C, Youle RJ: Engineering receptor-mediated cytotoxicity into human ribonucleases by steric blockade of inhibitor interaction. *Nat Biotechnol.* 1999 Mar;17(3):265-70.
- Syrigos KN, Epenetos AA: Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review of the experimental and clinical considerations. *Anticancer Res.* 1999 Jan-Feb;19(1A):605-13.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology.* 1992;24:145-9.
- Trapani JA, Sutton VR, Thia KY, Li YQ, Froelich CJ, Jans DA, Sandrin MS, Browne KA: A clathrin/dynamin- and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death. *J Cell Biol.* 2003 Jan 20;160(2):223-33. Epub 2003 Jan 21.
- Tsutsumi Y, Onda M, Nagata S, Lee B, Kreitman RJ, Pastan I: Site-specific chemical modification with polyethylene glycol of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) improves antitumor activity and reduces animal toxicity and immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jul 18;97(15):8548-53.
- Uckun FM: Immunotoxins for the treatment of leukaemia. *Br J Haematol.* 1993 Nov;85(3):435-8.
- Umana P, Jean-Mairet J, Moudry R, Amstutz H, Bailey JE: Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat Biotechnol.* 1999 Feb;17(2):176-80.
- van Spriël AB, van Ojik HH, van De Winkel JG: Immunotherapeutic perspective for bispecific antibodies. *Immunol Today.* 2000 Aug;21(8):391-7.
- Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, McCafferty J, Hodits RA, Wilton J, Johnson KS: Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol.* 1996 Mar;14(3):309-14.
- Vitetta ES, Stone M, Amlot P, Fay J, May R, Till M, Newman J, Clark P, Collins R, Cunningham D, et al.: Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma. *Cancer Res.* 1991 Aug 1;51(15):4052-8.
- Vose JM, Link BK, Grossbard ML, Czuczman M, Grillo-Lopez A, Gilman P, Lowe A, Kunkel LA, Fisher RI: Phase II study of rituximab in combination with chop chemotherapy in patients with previously untreated, aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2001 Jan 15;19(2):389-97.
- Wadman M: NIH panel to limit secrecy on gene therapy. *Nature.* 1999 Nov 4;402(6757):6.

- Waldmann TA, Pastan IH, Gansow OA, Junghans RP: The multichain interleukin-2 receptor: a target for immunotherapy. *Ann Intern Med.* 1992 Jan 15;116(2):148-60.
- Walsh G: Biopharmaceutical benchmarks--2003. *Nat Biotechnol.* 2003 Aug;21(8):865-70.
- Waurzyniak B, Schneider EA, Tumer N, Yanishevski Y, Gunther R, Chelstrom LM, Wendorf H, Myers DE, Irvin JD, Messinger Y, Ek O, Zeren T, Langlie MC, Evans WE, Uckun FM: In vivo toxicity, pharmacokinetics, and antileukemic activity of TXU (anti-CD7)-pokeweed antiviral protein immunotoxin. *Clin Cancer Res.* 1997 Jun;3(6):881-90.
- Webber KO, Reiter Y, Brinkmann U, Kreitman R, Pastan I: Preparation and characterization of a disulfide-stabilized Fv fragment of the anti-Tac antibody: comparison with its single-chain analog. *Mol Immunol.* 1995 Mar;32(4):249-58.
- Wetlaufer DB: *Advances in Protein chemistry* (Anfinsen CB, Anson MC, Bailey K, Edsam J, eds.). 375-378. Acad. Press London, 1962
- Wilharm E, Parry MA, Friebel R, Tschesche H, Matschiner G, Sommerhoff CP, Jenne DE: Generation of catalytically active granzyme K from *Escherichia coli* inclusion bodies and identification of efficient granzyme K inhibitors in human plasma. *J Biol Chem.* 1999 Sep 17;274(38):27331-7.
- Wu AM: Tools for pretargeted radioimmunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm.* 2001 Apr;16(2):103-8.
- Yang AG, Chen SY: A new class of antigen-specific killer cells. *Nat Biotechnol.* 1997 Jan;15(1):46-51.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 1985;33(1):103-19.
- Zalutsky MR, Bigner DD: Radioimmunotherapy with alpha-particle emitting radioimmunoconjugates. *Acta Oncol.* 1996;35(3):373-9.
- Zalutsky MR, Vaidyanathan G: Astatine-211-labeled radiotherapeutics: an emerging approach to targeted alpha-particle radiotherapy. *Curr Pharm Des.* 2000 Sep;6(14):1433-55.
- Zhao J, Zhang LH, Jia LT, Zhang L, Xu YM, Wang Z, Yu CJ, Peng WD, Wen WH, Wang CJ, Chen SY, Yang AG: Secreted antibody/granzyme B fusion protein stimulates selective killing of HER2-overexpressing tumor cells. *J Biol Chem.* 2004 Mar 5 [Epub ahead of print]

## Danksagung

*Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2000 bis Mai 2004 am Institut für Biotechnologie unter Anleitung von Herrn PD Dr. Hauke Lilie angefertigt.*

*Ich danke Herrn Prof. Rainer Rudolph für die Vergabe des interessanten Themas, für sein Interesse und seiner Diskussionsbereitschaft.*

*Ich möchte mich besonders bei PD Dr. Hauke Lilie für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, für seine stetige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bedanken.*

*Der Arbeitsgruppe Dieter Jenne (Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried), speziell Florian Kurschus, möchte ich für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung und Charakterisierung des polyionischen Immunotoxins B3-GzmB danken. Einige Experimente, deren Ergebnisse von mir in dieser Dissertation gezeigt und diskutiert wurden, sind von Florian Kurschus durchgeführt worden.*

*Ich danke der Arbeitsgruppe Nediljko Budisa (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) für die Herstellung polyionischer Varianten der  $\beta$ -Galaktosidase mit bzw. ohne fluorierte Tyrosine.*

*Stefan Gleiter danke ich für die Tipps bei der Anwendung molekularbiologischer, proteinchemischer und zellbiologischer Methoden.*

*Danken möchte ich nachfolgenden Studenten für ihr Interesse am Thema und die Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung von Experimenten: Anja Lehweß-Litzmann, Julia Hennig und Franziska Seifert.*

*Ich danke der Fa. Roche Diagnostics für die Bereitstellung des genetisch fusionierten Immunotoxins B3(dsFv)-PE38. Herrn Dr. Ulrich Brinkmann danke ich für das Ausgangsplasmid pULI 39-1 zur Herstellung der polyionischen Variante des PE38.*

*Frau Dr. A. Schierhorn und Herrn Dr. Peter Rücknagel von der Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft in Halle danke ich für die Durchführung der massenspektroskopischen Untersuchungen bzw. der N-terminalen Sequenzierung.*

*Ich danke Alexander Navarrete Santos für die Einweisung in die Methode der Durchflusszytometrie, sowie der Fa. ACGT Progenomics AG für Messzeiten an ihren FACS-Geräten.*

*Meinen Kollegen aus dem Labor „168“ Philine Dobberthien, Annegret Flier, Constanze Günther, Julia Hennig, Claudia Humbeck, Renate Nitsch, Susanne Richter, Sukhéna Sarun, Olaf Birkenmeier, Stefan Frost, Stefan Gleiter, Thomas Jahn, Thomas Klose, Christian Lange, Tobias May, Heiko Pultke, Björn Schott und Michael Volkmar sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.*

## Lebenslauf

Name: Martin Kleinschmidt  
Geburtsdatum: 25.07.1975  
Geburtsort: Weißenfels

### Bildungsweg

Sept. 1982 – Juli 1990 Besuch der Bergoberschule in Weißenfels  
Sept. 1990 – Juli 1994 Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen  
Gymnasiums Georg-Cantor in Halle/Saale;  
Abschluss: Abitur, Note 1,1  
Juli 1994 – Juni 1995 Dienst bei der Bundeswehr in Regensburg  
Okt. 1995 – Juli 2000 Biochemiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg  
Nov. 1999 – Juli 2000 Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie am Fachbereich  
Biochemie  
Thema: „Modifikation des *Pseudomonas* Exotoxins für die  
Kopplung an zellbindende Proteine“  
Abschluss: Diplom-Biochemiker, Note: „Sehr gut“  
Okt. 2000 – Mai 2004 Promotion am Institut für Biotechnologie am Fachbereich  
Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Thema: „Design modularer Immunotoxine unter Verwendung  
polyionischer Fusionspeptide“  
unter Anleitung von PD Dr. Hauke Lilie

Halle/Saale, den 19.5.2004

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Die aus den anderen Werken wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe. Die Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Halle/Saale, den 19.5.2004