

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

AbkürzungenIV

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 ₈ 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 ₈	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 ₅₀ -Wertes.....	71

3 Ergebnisse	72
3.1 Immunotoxin B3-PE38	72
3.1.1 Optimierung der Expression von E ₈ C-PE38	73
3.1.2 Reinigung von E ₈ C-PE38 und dsFv-B3R ₈ 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 ₈ P und toxGal-CE ₈ P	106
3.3.2 Massenspektroskopische Untersuchung von toxGal-CE ₈ P	108
3.3.3 Herstellung des modularen Immunotoxins B3-toxGal	108
3.3.4 Biologische Aktivität des Immunotoxins B3-toxGal in Zellkultur	112
4 Diskussion	114
4.1. Immunotoxin B3-PE38	115
4.1.1 Produktion von dsFv-B3-R ₈ CP und E ₈ C-PE38	115
4.1.2 Kopplung von dsFv-B3-R ₈ CP mit E ₈ 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 ₈ und Kopplung mit dsFv-B3-R ₈ 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 ₈ P und toxGal-CE ₈ P	126
4.3.2 Cytotoxizität von Gal-CE ₈ P und toxGal-CE ₈ P	127
4.3.3 Kopplung von dsFv-B3-R ₈ CP und toxGal-CE ₈ P	127
4.3.4 Biologische Aktivität des Immunotoxins B3-toxGal in Zellkultur	128
5 Zusammenfassung	129
6 Literaturverzeichnis	131

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 ^r	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 ₈ CP und Gal-CE ₈ P
B3-GzmB	polyionisches Immunotoxin, bestehend aus dsFv-B3-R ₈ CP und GzmB-GCD ₈
B3-PE38	polyionischen Immunotoxin, bestehend aus dsFv-B3-R ₈ CP und E ₈ C-PE38
B3-toxGal	polyionisches Immunotoxin, bestehend aus dsFv-B3-R ₈ CP und toxGal-CE ₈ P
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C1	erste Komplementkomponente
C1q	Untereinheit der ersten Komplementkomponente, bindet an die Fc-Abschnitte zweier benachbarter Antikörper
CaCl ₂	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 ₂	Kohlenstoffdioxid
CS	Kälberserum
C-Terminus	Carboxylende einer Peptidkette
CTLA4Ig	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4-IgG1</i>
Cu ²⁺	Kupfer-II-ionen
CuCl ₂	Kupfer-II-chlorid
DAB ₃₈₉ 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 ₈ CP	disulfidverbrücktes Fv-Fragment des B3-Antikörpers, am C-Terminus von V _H 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 _{280 nm}	Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm
E ₈ C-PE38	trunkierte Variante des <i>Pseudomonas</i> Exotoxins, am N-Terminus durch das Peptide E ₈ 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 γ -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	β -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- β -D-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
K _D	Dissoziationskonstante
kD	Kilodalton

KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Kn ^f	Marker, der Resistenz gegenüber Kanamycin vermittelt
LMW	low molecular weight, Proteinmarker
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization - time of flight</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	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 ₂ HPO ₄	di-Natriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
Nadoc	Natriumdesoxycholat
NaN ₃	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 ₂	Sauerstoffpartialdruck
Pro-CASP7 ^{C285A}	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- α	<i>transforming growth factor α</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
toxGal-CE ₈ P	fluorierte Variante der β -Galaktosidase, am C-Terminus durch das Peptid CE ₈ 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 μ mol Substrat pro min unter Standardbedingungen
UV	Ultraviolett
UV/VIS	Ultraviolett/ <i>Visible</i>
v/v	Volumen/Volumen
V _H	variable Domäne der schweren Kette
V _L	variable Domäne der leichten Kette
w/v	Masse/Volumen
β -Gal	β -Galaktosidase
Ω	Ohm
Θ_{molar}	molare Elliptizität
α -Gluc	α -Glucosidase