



Aus der Naturwissenschaftlichen Fakultät I,
Institut für Biochemie und Biotechnologie,
Abteilung Technische Enzymologie

Design zytotoxischer RNase A-Tandemenzyme als potentielle Antitumortheraeutika

Dissertation

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Franziska Leich

geboren am 12.10.1979 in Karl-Marx-Stadt

Gutachter:

1. PD Dr. U. Arnold
2. Prof. Dr. U. Hahn
3. Prof. Dr. W. Höhne

Halle/Saale, August 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Aufgabenstellung	1
2	Theoretischer Teil	3
2.1	Therapiekonzepte zur Krebsbekämpfung	3
2.1.1	Klassische Therapieansätze.....	3
2.1.2	Ausgewählte neuere Therapiekonzepte	5
2.1.2.1	Therapeutische Antikörper	5
2.1.2.2	Antikörperkonjugate.....	7
2.1.2.3	Immunotoxine	8
2.2	RNasen als potentielle Antitumortherapeutika	9
2.2.1	Vorkommen und biologische Aktivität verschiedener RNasen	10
2.2.2	Untersuchungen zur Antitumoraktivität von RNasen	11
2.2.3	Mechanistische Grundlagen der Zytotoxizität von RNasen.....	13
2.3	RI und seine Rolle in der RNase-vermittelten Zytotoxizität	14
2.3.1	Struktur und Funktion des RI.....	14
2.3.2	Natürliche RNasen mit Antitumorwirkung.....	16
2.3.2.1	BS-RNase	16
2.3.2.2	RNase A-Multimere.....	17
2.3.2.3	Onconase	18
2.3.2.4	Mikrobielle RNasen.....	21
2.3.3	Gentechnisch veränderte und chemisch modifizierte RNasen mit Antitumorwirkung	22
2.3.3.1	Varianten	22
2.3.3.2	Chemisch modifizierte RNasen.....	23
2.3.3.3	RNase-Chimären und RNase-Fusionsproteine	25
2.4	Zusammenfassung	25
2.5	RNase A.....	26
3	Materialien und Methoden	29
3.1	Materialien.....	29
3.1.1	Chemikalien.....	29
3.1.2	Proteine	30
3.1.3	Oligonukleotide.....	30
3.1.4	Plasmide	31
3.1.5	<i>E. coli</i> -Stämme	31
3.1.6	Medien für die Kultivierung von Mikroorganismen	31
3.1.7	Materialien für die Zellkultur	32
3.2	Molekularbiologische Methoden	33
3.2.1	Klonierung und Sequenzierung	33
3.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA	33
3.2.1.2	Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA.....	33

3.2.1.3	Agarosegelelektrophorese.....	33
3.2.1.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
3.2.1.5	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	33
3.2.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten in das pET26b(+)-Plasmid	34
3.2.1.7	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	34
3.2.2	PCR-Reaktionen zur Genverdopplung	35
3.2.3	Ortsgerichtete Mutagenese.....	37
3.2.4	Stammhaltung und Kultivierung von Mikroorganismen	38
3.2.4.1	Stammhaltung und Anzucht von Mikroorganismen	38
3.2.4.2	Transformation von Mikroorganismen	38
3.2.4.2.1	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die Transformation mittels Hitzeschock	38
3.2.4.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen durch Hitzeschock	38
3.3	Proteinchemische Methoden	39
3.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
3.3.1.1	Natriumdesoxycholat (NaDoc)-Fällung.....	39
3.3.2	Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese (Nativ-PAGE)	39
3.3.3	Densitometrische Evaluierung	40
3.3.4	Herstellung der RNase A-Varianten.....	40
3.3.4.1	Expression	40
3.3.4.2	Isolierung der <i>inclusion bodies</i>	40
3.3.4.3	Solubilisierung der <i>inclusion bodies</i>	41
3.3.4.4	Renaturierung	41
3.3.4.5	Konzentrierung.....	41
3.3.4.6	Reinigung.....	41
3.3.5	Herstellung des RI.....	42
3.3.5.1	Expression	42
3.3.5.2	Zellaufschluss nach der löslichen Expression	42
3.3.5.3	Reinigung.....	42
3.3.6	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	43
3.3.6.1	Spektroskopische Konzentrationsbestimmung.....	43
3.3.6.2	Bradford-Test	43
3.3.6.3	Konzentrationsbestimmung mittels Nativ-PAGE	44
3.3.7	Bestimmung der RNase-Aktivität	44
3.3.8	Bestimmung der RNase-Aktivität in Anwesenheit des RI	45
3.3.9	Analyse der RI-Bindungsstöchiometrie mittels Nativ-PAGE	46
3.3.10	Limitierte Proteolyse.....	46
3.3.10.1	Bestimmung der Proteolysekonstanten	47
3.3.11	Kristallisation	47
3.3.11.1	Datensammlung.....	48
3.3.11.2	Modellierung und kristallographische Verfeinerung	48
3.4	Biophysikalische Methoden	50
3.4.1	Analytische Ultrazentrifugation.....	50

3.4.2	CD-Spektroskopie	50
3.4.2.1	CD-Spektren	50
3.4.2.2	Thermische Entfaltung	51
3.4.3	Fluoreszenzspektroskopie zur Bestimmung der GdnHCl-induzierten Übergangskurven.....	51
3.5	Zellbiologische Methoden	53
3.5.1	Kultivierung eukaryotischer K562-Zellen	53
3.5.1.1	Präparation von Kryokulturen	53
3.5.1.2	Reaktivierung von Kryokulturen	53
3.5.2	Zytotoxizitätstest.....	53
3.5.3	Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Ultrazentrifugation.....	54
3.5.3.1	Zentrifugation.....	54
3.5.3.2	Trennung von endosomaler und lysosomaler Fraktion.....	55
3.5.3.3	Charakterisierung der subzellulären Fraktionen.....	55
3.5.3.3.1	Bestimmung der N-Acetyl- β -D-Glucosaminidaseaktivität	55
3.5.3.3.2	Bestimmung der Kathepsinaktivität.....	56
3.5.3.3.3	Bestimmung der Laktatdehydrogenaseaktivität	56
3.5.4	Proteolyse in Gegenwart subzellulärer Fraktionen.....	56
3.5.5	Immunoblotting	57
3.5.5.1	Immunoblotting zur Quantifizierung der Internalisierung	57
3.5.5.2	Immunoblotting zur Analyse der intrazellulären Stabilität	58
4	Ergebnisse und Diskussion	59
4.1	Design der RNase A-Tandemenzyme	59
4.1.1	Rationales Design	59
4.1.2	Linkersequenzen.....	59
4.1.3	Klonierungsstrategie	60
4.2	Herstellung und Charakterisierung der RNase A-Tandemenzyme	62
4.2.1	Expression, Renaturierung und Reinigung.....	62
4.2.1.1	Expression	62
4.2.1.2	Isolierung der <i>inclusion bodies</i> und Renaturierung	62
4.2.1.3	Reinigung.....	63
4.2.2	Struktur- und Stabilitätsuntersuchungen.....	65
4.2.2.1	CD-Spektroskopie.....	65
4.2.2.2	Aktivität	66
4.2.2.3	Thermodynamische Stabilität	66
4.2.2.3.1	Temperaturinduzierte Entfaltung.....	66
4.2.2.3.2	Denaturansinduzierte Entfaltung	67
4.2.2.4	Zytotoxizität	68
4.2.2.5	Zusammenfassung	70
4.3	Herstellung des RI und Charakterisierung der RI-Bindung	72
4.3.1	Expression und Reinigung	72
4.3.2	Studien zur RI-Bindung	73

4.3.2.1	Ribonukleolytische Aktivität in Anwesenheit des RI	73
4.3.2.2	Bestimmung der RI-Bindungsstöchiometrie durch Nativ-PAGE	74
4.3.2.3	Analytische Ultrazentrifugation	77
4.3.2.4	Identifizierung der bevorzugten RI-Bindungsstelle am RNase A-Tandemenzym mittels Proteolyse	78
4.3.2.5	Design teilevasiver SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyme	80
4.4	Kristallisation der RNase A-Tandemenzyme.....	84
4.5	Quantifizierung der Internalisierung der RNase A- Tandemenzym-Varianten	89
4.5.1	Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Ultrazentrifugation.....	89
4.5.2	Detektion der RNase A-Varianten in den subzellulären Fraktionen	91
4.6	Proteolytische Stabilität der RNase A-Tandemenzym-Varianten	93
4.6.1	Proteolyse der RNase A-Tandemenzym-Varianten in Gegenwart verschiedener subzellulärer Fraktionen	94
4.6.2	Intrazelluläre proteolytische Stabilität der RNase A-Tandemenzym-Varianten	96
5	Zusammenfassung und Ausblick	97
6	Literaturverzeichnis	100
7	Abbildungsverzeichnis	115
8	Tabellenverzeichnis	117

Symbole und Abkürzungen

ADCC	antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
ADEPT	<i>antibody-directed enzyme prodrug therapy</i>
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
Amp	Ampicillin
AUAA	6-Carboxyfluoreszein-dArUdAdA-6-Carboxytetramethylrhodamin
β -AGA	N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase
BSA	Rinderserumalbumin
BS-RNase	<i>bovine seminal</i> RNase
CD	Circulardichroismus
CDC	antikörpervermittelte Komplementaktivierung (<i>complement-dependent cytotoxicity</i>)
[D] _{50%}	Denaturationskonzentration am Übergangsmittelpunkt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-Mix
DTT	Dithiothreitol
E ₂₇₈	Extinktion bei einer Wellenlänge von 278 nm
E-64	Epoxysuccinyl-Leucin-4-guanidinobutylamid
ECP	<i>eosinophil cationic protein</i>
EDN	<i>eosinophil derived neurotoxin</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ErbB2 (Her2)	Tyrosinkinaserzeptor, überexprimiert auf Krebszellen (<i>human epidermal growth factor receptor type 2</i>)
FCS	Fötale Kälberserum
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
f_N	Anteil an nativem Protein im Gleichgewicht
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
Fraktion E	endosomale Fraktion
Fraktion L	lysosomale Fraktion
Fraktion M	mikrosomale Fraktion
Fraktion T	zentrifugiertes Zellhomogenat (aufgeschlossene Zellen ohne Plasmamembran und Zellkerne)
Fraktion Z	zytosolische Fraktion
g	Erdbeschleunigung
G88R-SGR	G88R-Variante des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms
G220R-SGR	G220R-Variante des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms

GdnHCl	Guanidin-Hydrochlorid
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
Her2 (ErbB2)	<i>human epidermal growth factor receptor type 2</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish Peroxidase</i>)
HPR	humane pankreatische RNase
hRI	humaner RNase-Inhibitor
IC ₅₀	Konzentration an Toxin, bei der 50 % der Zellen überleben
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kat BLS	Kathepsin B, L und S
kb	Kilobase
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K _i	Inhibitor konstante
k _p	Geschwindigkeitskonstante der Proteolyse
LDH	Laktatdehydrogenase
LL2	humanisierter monoklonaler Anti-CD22-Antikörper
LRRs	<i>leucine-rich repeats</i>
MDR	<i>multiple drug resistance</i>
MDR1	<i>multi drug resistance gp 170 permeability glycoprotein</i>
MU	4-Methylumbelliferon
MU-NAG	4-Methylumbelliferon-N-Acetyl-β-D-Glucosaminid
NADH	reduziertes Nikotinamidadenindinukleotid
NaDoc	Natriumdesoxycholat
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ONC	Onconase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pI	isoelektrischer Punkt
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPI	Polyprolinhelix Typ I
PPII	Polyprolinhelix Typ II
pRI	RNase-Inhibitor aus Schweinepankreas
RC-RNase	RNase aus <i>Rana catesbeiana</i>
R	universelle Gaskonstante (8,314472 J mol ⁻¹ K ⁻¹)
RI	Ribonuklease-Inhibitor
RISBASEN	R ibonuclease with S pecial B iological A ction

RJ-RNase	RNase aus <i>Rana japonica</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro min
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>t</i>	Zeit
<i>T</i>	Temperatur
T7prom	T7-Promotor-Primer
T7prom	T7-Terminator-Primer
T_m	Temperatur im Übergangsmittelpunkt (°C)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
tRNA	Transfer-RNA
U	<i>units</i> ; Einheit der enzymatischen Aktivität (μmol Substrat pro min)
UV	ultraviolett
UV/VIS	ultraviolett/ <i>visible</i>
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
Z-Phe-Arg-AMC	Benzyloxycarbonyl-Phenylalanyl-Arginin-AMC
Θ	Elliptizität
$[\Theta]_{\text{MRW}}$	Molare Elliptizität

Aminosäuren mit Positionsbezeichnung werden im Drei- bzw. Einbuchstabencode angegeben. Im Text verwendete Anglizismen und lateinische Begriffe sind kursiv kenntlich gemacht.