

Konstruktion und Charakterisierung von rekombinanten Immuntoxinen zur Therapie von metastasierendem Pankreaskarzinom

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-
Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin
Daniela Brüll

aus Aachen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. R. Fischer
 Universitätsprofessor Dr. rer. nat. F. Kreuzaler

Tag der mündlichen Prüfung: 26. November 2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Meinen Eltern

I	EINLEITUNG	1
I.1	Das Pankreaskarzinom.....	1
I.1.1	Orthotopes Mausmodell.....	2
I.2	Der EGF-Rezeptor.....	4
I.3	Immuntherapie zur Behandlung von Krebs	8
I.3.1	Immuntoxine	8
I.3.1.1	Die Bindungsdomäne	10
I.3.1.2	Die toxische Domäne	12
I.3.1.3	EGFR-spezifische Antikörper und Immuntoxine.....	15
I.4	Produktion von rekombinanten Immuntoxinen.....	16
I.4.1	Prokaryotische Expression	16
I.4.2	Eukaryotische Expression	17
I.5	Zielsetzung	18
II	MATERIAL UND METHODEN	21
II.1	Material	21
II.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	21
II.1.2	Enzyme und Reaktionskits	21
II.1.3	Antikörper und enzymkonjugierte anti-Antikörper.....	21
II.1.4	Eukaryotische Zelllinien	23
II.1.5	Bakterienstämme	23
II.1.6	Versuchstiere.....	24
II.1.7	Plasmid-Vektoren	24
II.1.8	Synthetische Oligonukleotide	27
II.1.9	Verwendete Puffer und Lösungen.....	28
II.1.10	Nährmedien	29
II.1.11	Geräte, Apparaturen und Zubehör	30
II.1.12	Genehmigung der durchgeführten Arbeit	31
II.2	Molekularbiologische Methoden.....	31
II.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	31
II.2.2	DNA-Klonierungstechniken.....	33
II.2.2.1	Restriktion von DNA	33
II.2.2.2	Präzipitation von DNA	33
II.2.2.3	Dephosphorylierung restringierter Vektoren.....	33
II.2.2.4	Ligation restringierter DNA.....	34

II.2.3	Agarosegelelektrophorese von DNA.....	34
II.2.3.1	Analytische Agarosegelelektrophorese von DNA.....	34
II.2.3.2	Präparative Agarosegelelektrophorese und Isolierung von DNA.....	34
II.2.3.3	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA.....	34
II.2.4	Anzucht von <i>E. coli</i> und Herstellung von Stammkulturen.....	35
II.2.5	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien.....	35
II.2.5.1	Herstellung hitzeschockkompetenter <i>E. coli</i>	35
II.2.5.2	Hitzeschocktransformation von <i>E. coli</i>	36
II.2.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	36
II.2.6.1	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	36
II.2.6.2	Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	36
II.2.7	Sequenzierung von DNA.....	37
II.3	Proteinchemische und immunologische Methoden.....	37
II.3.1	Expression rekombinanter Proteine in eukaryotischen HEK293T Zellen.....	37
II.3.1.1	Transfektion von HEK293T Zellen.....	37
II.3.1.2	Anreicherung transfizierter Zellen und Proteinexpression.....	38
II.3.1.3	Proteinreinigung eukaryotisch exprimierter Proteine durch immobilisierte-Metall-Affinitäts-Chromatographie.....	39
II.3.1.3.1	Proteinreinigung (50 ml-500 ml Überstand).....	39
II.3.2	Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	40
II.3.2.1	Periplasmatische Proteinexpression unter Standardbedingungen (Schüttelkultur).....	40
II.3.2.2	Periplasmatische Proteinexpression unter osmotischem Stress (Schüttelkultur).....	40
II.3.2.3	Fermentation von 425(scFv)-ETA' in <i>E. coli</i>	42
II.3.2.4	Fermentation von 425(scFv) in <i>E. coli</i>	43
II.3.3	Reinigung von prokaryotisch exprimierten Proteinen.....	43
II.3.3.1	Immobilisierte-Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC).....	43
II.3.3.2	Ionenaustauschchromatographie.....	44
II.3.3.3	Gelfiltration.....	45
II.3.4	SDS-PAA-Gelelektrophorese.....	46
II.3.5	Bestimmung der Proteinkonzentrationen.....	46
II.3.6	Massenspektroskopie.....	46
II.3.7	Western-Blot-Analysen.....	47

II.3.8	Dialyse proteinhaltiger Lösungen.....	48
II.3.9	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay	49
II.3.9.1	Zellmembran-ELISA zum Nachweis von funktionellen rekombinanten Immuntoxinen.....	49
II.3.9.1.1	Präparation von Membranfraktionen.....	49
II.3.9.1.2	Durchführung des Zellmembran-ELISAs.....	50
II.3.10	Durchflusszytometrie zum Nachweis der Bindungsaktivität von 425(scFv)- Fusionsproteinen.....	50
II.3.11	Zytotoxizitätsassay mittels XTT-Substratumsetzung	52
II.3.12	Immunofluoreszenz-Mikroskopie mittels des OPERA-Systems	52
II.3.13	Stabilität von 425(scFv)-ETA' in Mausserum.....	53
II.4	Evaluierung der Wirksamkeit von 425(scFv)-ETA' <i>in vivo</i>	53
II.4.1	Bestimmung der maximal tolerablen Dosis in Mäusen	53
II.4.2	Injektion von L3.6pl Tumorzellen in Mäuse.....	54
II.4.3	Anti-Tumorexperimente in Mäusen	54
II.4.3.1	Statistische Auswertungen.....	54
II.4.4	Formalin-Fixierung von Gewebe	55
II.4.5	Paraffin-Einbettung.....	55
II.4.6	Hämatoxilin-Eosin-Färbung.....	55
II.5	Dokumentation und Bildbearbeitung.....	56
III	ERGEBNISSE	57
III.1	Konstruktion, Expression und Charakterisierung von 425(scFv)-ETA'	57
III.1.1	Konstruktion von pBM1.1-425(scFv)-ETA'	57
III.1.1.1	Konstruktion von pBM1.1-425(scFv).....	59
III.1.2	Periplasmatische Expression von 425(scFv)-ETA' unter osmotischem Stress und Reinigung des Fusionsproteins.....	60
III.1.2.1	Expression von 425(scFv)-ETA' im kleinen Maßstab (50 ml) und Reinigung mittels IMAC	60
III.1.2.2	Expression und Reinigung von 425(scFv)-ETA' im großen Maßstab.....	62
III.1.2.2.1	Immobilisierte-Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)	62
III.1.2.2.2	Ionenaustauschchromatographie	64
III.1.2.2.3	Gelfiltration	65
III.1.2.2.4	Massenspektroskopische Analysen	67
III.1.2.2.5	Konzentrationsbestimmung des gereinigten 425(scFv)-ETA'	67

III.1.2.3	Fermentation von 425(scFv)-ETA'	67
III.1.2.4	Periplasmatische Expression von 425(scFv)	70
III.1.2.4.1	Expression im Schüttelmaßstab.....	70
III.1.2.4.2	Fermentation und Reinigung von 425(scFv).....	70
III.1.3	Funktionelle Charakterisierung von 425(scFv)-ETA' <i>in vitro</i>	71
III.1.3.1	Bindungsanalysen mittels Zellmembran-ELISA.....	71
III.1.3.2	Bindungsanalysen mittels Durchflusszytometrie	73
III.1.3.3	Immunofluoreszenz-Mikroskopie.....	76
III.1.3.4	Charakterisierung der zytotoxischen Aktivität mittels XTT-basierender Zytotoxizitätssassays.....	77
III.1.3.5	Stabilität von 425(scFv)-ETA' in Mauserum.....	80
III.1.4	<i>In vivo</i> Experimente mit 425(scFv)-ETA'	82
III.1.4.1	Bestimmung der maximal tolerablen Dosis in Mäusen	82
III.1.4.2	Anti-Tumorexperimente in einem disseminierten Mausmodell	83
III.1.4.2.1	Hämatoxilin-Eosin-Färbung.....	84
III.2	Konstruktion, Expression und Charakterisierung von Gb-, Ang- und ECP- basierten Immuntoxinen.....	85
III.2.1	Generierung und Charakterisierung von 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-Gb und 425(scFv)-ECP	86
III.2.1.1	Konstruktion und Expression der Immuntoxine 425(scFv)-hE in Prokaryoten	86
III.2.1.1.1	Konstruktion von pBM1.1-425(scFv)-Ang, pBM1.1-425(scFv)-Gb und pBM1.1-425(scFv)-ECP	86
III.2.1.1.2	Periplasmatische Expression, Ni ²⁺ -NTA-Reinigung und Charakterisierung der Immuntoxine 425(scFv)-hE	87
III.2.1.2	Konstruktion und Expression der Immuntoxine 425(scFv)-hE in Eukaryoten	89
III.2.1.2.1	Konstruktion von pMSII-425(scFv)-Ang, pMSII-425(scFv)-Gb und pMSII- 425(scFv)-ECP	90
III.2.1.2.2	Expression der Immuntoxine 425(scFv)-hE in Eukaryoten und Reinigung mittels Affinitätschromatographie.....	90
III.2.1.2.3	Überprüfung der Bindungsaktivität mittels Durchflusszytometrie und Zellmembran-ELISA	92
III.2.1.2.4	Charakterisierung der zytotoxischen Aktivität gegenüber L3.6pl Zellen.....	93

III.2.2	Generierung und Charakterisierung von Ang-425(scFv), Gb-425(scFv) und ECP-425(scFv)	95
III.2.2.1	Konstruktion, eukaryotische Expression und Reinigung der Immuntoxine hE-425(scFv)	95
III.2.2.2	Charakterisierung der Bindungsaktivität mittels Durchflusszytometrie und Zellmembran-ELISA	96
III.2.2.3	Überprüfung der zytotoxischen Wirksamkeit	98
III.2.3	Generierung und Charakterisierung von 425(scFv)-dII-Ang, 425(scFv)-dII-ECP und 425(scFv)-dII-Gb	99
IV	DISKUSSION UND AUSBLICK	104
IV.1	Konstruktion, Expression und Charakterisierung von 425(scFv)-ETA'	105
IV.1.1	Expression und Reinigung von 425(scFv)-ETA'	105
IV.1.2	Funktionelle <i>in vitro</i> Charakterisierung von 425(scFv)-ETA'	109
IV.1.2.1	Überprüfung der Bindungsaktivität von 425(scFv)-ETA'	110
IV.1.2.2	Charakterisierung der zytotoxischen Aktivität	111
IV.1.3	<i>In vivo</i> Experimente mit 425(scFv)-ETA'	113
IV.2	Konstruktion, Expression und Charakterisierung von Gb-, Ang- und ECP-basierten Immuntoxinen	116
IV.2.1	Expression und funktionelle Charakterisierung von 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb	117
IV.2.1.1	Prokaryotische Expression	118
IV.2.1.2	Eukaryotische Expression	119
IV.2.2	Expression und Charakterisierung von Ang-425(scFv), ECP-425(scFv) und Gb-425(scFv)	121
IV.2.3	Expression und Charakterisierung von 425(scFv)-dII-Ang, 425(scFv)-dII-ECP und 425(scFv)-dII-Gb	122
IV.3	Ausblick	125
V	ZUSAMMENFASSUNG	127
VI	LITERATUR	129
VI.1	Eigene Veröffentlichungen	142
VII	ANHANG	144
VII.1	Abkürzungen	144
VII.2	Sequenzen	146
VII.2.1	425(scFv)-ETA'	146

VII.2.2	Angiogenin.....	147
VII.2.3	Eosinophil-kationisches Protein	147
VII.2.4	Granzym B	148
VII.3	Buchstabencode für Aminosäuren.....	148

I EINLEITUNG

Unter Krebs versteht man die durch Fehlregulation des Zellwachstums bedingte bösartige (maligne) Neubildung von Körpergewebe. Dabei ist die Fähigkeit von Zellen in das Nachbar- gewebe zu infiltrieren und Absiedlungen in anderen Organen auszubilden (Metastasen) ein eindeutiges Malignitätskriterium. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen an Krebs in Deutschland wird auf ca. 350.000 geschätzt. Mit 45.000 Neuerkrankungen ist der Brustkrebs die häufigste Krebserkrankung bei Frauen (Robert Koch-Institut, 2002). Männer erkranken am häufigsten an Prostatakrebs [31.500 Neuerkrankungen pro Jahr (Robert Koch-Institut, 2002)], gefolgt von Lungen- und Bronchialkrebs. Krebs ist mittlerweile nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den Industrienationen. Weiterhin erwartet die „world health organization“ (WHO) für den Zeitraum zwischen 2000 und 2020 einen weltweiten Anstieg der Krebsfälle um 29%. All diese vorangehenden Fakten verdeutlichen den dringenden Bedarf an neuen, effektiveren Therapiestrategien.

I.1 Das Pankreaskarzinom

In Deutschland beläuft sich die Inzidenz des Pankreaskarzinoms auf etwa 11.000 Neuerkrankungen pro Jahr, wobei vorwiegend Menschen zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr von der Erkrankung betroffen sind. In Deutschland wie auch in ganz Europa, wird jeder sechste Krebstod inzwischen durch ein duktales Pankreaskarzinom verursacht (KULKE 2002). Die Erkrankung ist charakterisiert durch ein ausgeprägtes lokal invasives Wachstum sowie eine frühzeitige lymphogene und hämatogene Metastasierungsfähigkeit (WARSHAW und FERNANDEZ-DEL CASTILLO 1992; ROTHENBERG *et al.* 1996; WANEBO und VEZERIDIS 1996). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist die Erkrankung nur bei 20% der Patienten auf die Bauchspeicheldrüse lokalisiert, bei 40% der Patienten ist die Tumorerkrankung bereits lokal fortgeschritten und weitere 40% weisen Metastasen auf (BRAND und TEMPERO 1998; BRAND 2001). Dabei befinden sich Fernmetastasen bei primärer Metastasierung hauptsächlich in der Leber (66%) und in den Lymphknoten (22%). Erst später werden Metastasen in der Lunge diagnostiziert. Derzeit fehlen sowohl Tumormarker, die eine Diagnose in einem frühen und somit heilbaren Stadium ermöglichen, als auch effektive Therapieansätze, die die Prognose der Patienten deutlich verbessern. Bedingt durch die Ineffektivität der Therapie- und Diagnoseansätze sowie der Aggressivität der Erkrankung weist das Pankreaskarzinom eine der höchsten Mortalitätsraten im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen auf. So liegt die durchschnittliche Fünf-Jahres-Überlebensrate bei 1 bis 5% (ROTHENBERG *et al.* 1996; LANDIS *et al.* 1999) und die mediane Überlebensrate im metastasierten Stadium nur bei fünf Monaten (HEDBERG *et al.* 1998). Die

kurative Behandlung des Pankreaskarzinoms besteht in der vollständigen Resektion (Whipple'sche Operation), wobei eine Operation nur in 10 bis 20% der Fälle durchführbar ist und eine R₀-Situation davon wiederum nur in 50% erreicht wird. Die besten klinischen Ergebnisse innerhalb der adjuvanten Therapieansätze in Form von Radio- und Chemotherapie werden derzeit durch Kombinationstherapien mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabine erzielt (GLIGOROV *et al.* 2002; PROST *et al.* 2002). Jedoch führen diese Therapieansätze auch zu keiner signifikanten Verbesserung der Prognose für die Patienten und stellen wie die anderen angewendeten Radio- und Chemotherapien nur einen palliativen Therapieansatz dar. Zu den zentralen Problemen der Chemo- und Radiotherapie zählen eine hochgradige Resistenz des Pankreaskarzinoms gegenüber vielen verwendeten Therapeutika (GUSTIN *et al.* 2002) sowie die zahlreichen mit einer Hochdosis-Chemotherapie verbundenen Nebeneffekte (LINSKENS *et al.* 2000; HAAG und EHNINGER 2002). Aufgrund unzureichender Spezifität der Radio- und Chemotherapeutika werden neben den erkrankten Zellen oftmals nicht maligne Zellen angegriffen. Zusätzlich werden häufig nicht alle Tumorzellen eliminiert. Diese sogenannten residuellen Tumorzellen führen dann zur Bildung von Metastasen oder Rezidiven und stellen den Hauptgrund für einen Krankheitsrückfall nach Standardtherapie dar. Dies verdeutlicht, dass bei der Entwicklung von neuen Therapiestrategien der Fokus auf die spezifische Elimination jeder malignen Zelle gerichtet sein sollte.

1.1.1 Orthotopes Mausmodell

Ein etabliertes Modell zur Analyse von Metastasen-assoziierten Genexpressionsänderungen und zur Untersuchung der Wirksamkeit von neu entwickelten Therapeutika stellt die orthotope Implantation der humanen Pankreaskarzinomzellen L3.6pl in den Pankreas von Nacktmäusen dar (BRUNS *et al.* 1999). Die hoch metastatische humane Zelllinie L3.6pl wurde nach multiplen *in vivo* Pankreas-Leber-Selektionszyklen in der Nacktmaus aus der Zelllinie COLO357 generiert (Abb. I-1). COLO357 ist eine humane, duktales Pankreasadenokarzinomzelllinie, die aus einer Lymphknotenmetastase eines lokal fortgeschrittenen Pankreaskopfkarcinoms isoliert wurde (MORGAN *et al.* 1980). Von der Arbeitsgruppe Vezeridis wurde im Anschluss *in vitro* eine schnell wachsende („fast growing“ FG) und eine langsam wachsende („slow growing“ SG) Pankreastumorzelllinie basierend auf COLO357 generiert (VEZERIDIS *et al.* 1992). Nach Injektion der FG Zellen in die Milz von Nacktmäusen wurde aus den gebildeten Lebermetastasen die Zelllinie L3.3 isoliert, aus der dann die Arbeitsgruppe Bruns nach mehrfacher Injektion in den Pankreas und Isolation der Zellen aus den Lebermetastasen die hoch metastasierende Zelllinie L3.6pl generierte (BRUNS *et al.* 1999). Die L3.6pl Zellen zeigen nach wiederum orthotoper Implantation in die Nacktmaus ein extrem aggressives Primärtumorwachstum und weisen im Gegensatz zu der Ausgangszelllinie

COLO357 eine weitaus höhere Metastasenbildung auf. So kommt es bei 50% der Tiere reproduzierbar zu spontaner Lebermetastasierung und in 100% der Tiere zu spontaner Lymphknotenmetastasierung. Weiterhin führt die orthotope Injektion von L3.6pl Zellen im Vergleich zur Injektion der Parentalzellen FG zu einer Reduktion der Überlebenszeit der Tiere um mehr als 55% (BRUNS *et al.* 1999). Im Vergleich zur Parentalzelllinie FG ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Expression der pro-angiogenetischen Faktoren VEGF („vascular epidermal growth factor“) und IL (Interleukin)-8 erhöht.

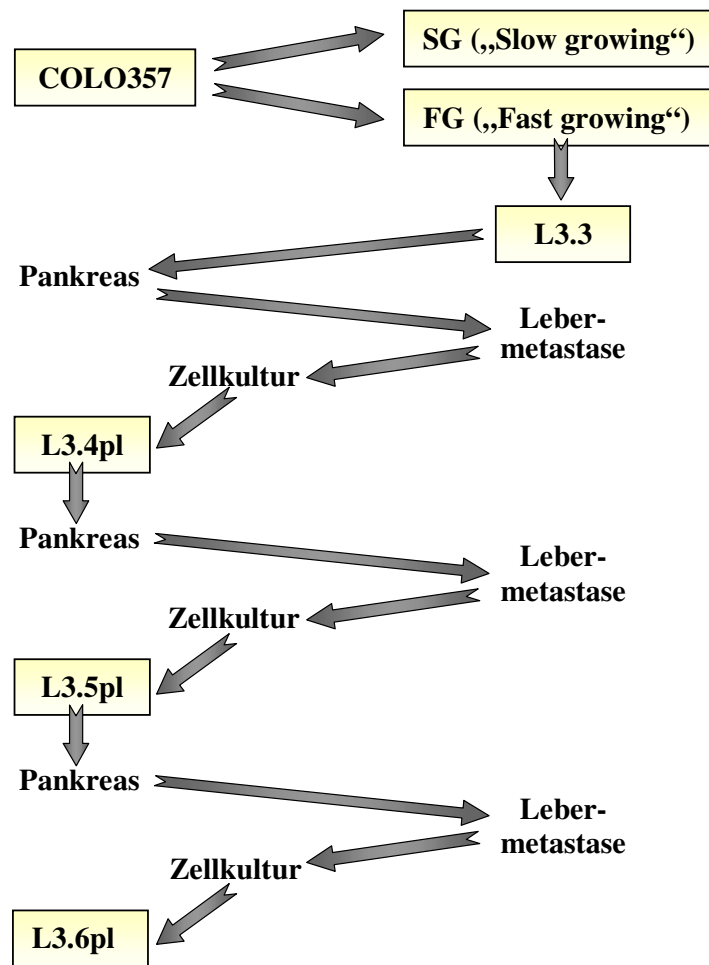


Abb. I-1: *In vivo* Selektion der humanen Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl.
pl : „pancreas-liver“.

Weiterhin weisen die L3.6pl Zellen bzw. Tumore gegenüber den parentalen Tumorzellen eine höhere Mikrogefäßdichte, einen erhöhten Proliferationsindex und einen verringerten Apoptoseindex auf. Die L3.6pl Zellen exprimieren wie viele andere Pankreaskarzinomzelllinien vermehrt den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (siehe I.2). Da die Überexpression der oben genannten Faktoren auch bei anderen metastasierenden Pankreaskarzinomzellen nachge-

wiesen wurde (LE *et al.* 2000; SHI *et al.* 2000), ist davon auszugehen, dass die *in vivo* Selektion in der Nacktmaus nicht zu einem artifiziell veränderten Expressionsmuster der Tumorzellen geführt hat.

1.2 Der EGF-Rezeptor

Der EGF-Rezeptor („epidermal growth factor receptor“, EGFR) ist ein membranständiges 170 kDa Glykoprotein mit Tyrosinkinase-Aktivität, das zu einer Gruppe von vier Wachstumsfaktor-Rezeptoren gehört, die als EGFR- oder ErbB-Familie bezeichnet wird (GULLICK 1991). Die Bezeichnung „ErbB“ bezieht sich auf die Homologie der kodierenden Gene zum v-ErbB-Onkogen des „Avian Erythroblastosis Virus“, welches zusammen mit dem trunkierten Schilddrüsenhormon-Rezeptor-Protein v-ErbA in Vögeln Erythroblastosen verursacht (DOWNWARD *et al.* 1984). Der EGFR präsentiert sich mit einer charakteristischen drei-segmentären Struktur, die den Typ-I-Rezeptor-Tyrosinkinasen zu Eigen ist (CARPENTER 1987; ULLRICH und SCHLESSINGER 1990). Die aus vier Subdomänen bestehende extrazelluläre Domäne ermöglicht die Bindung von lokal freigesetzten Wachstumsfaktoren mit EGF-ähnlicher Domäne, wie beispielsweise EGF selbst, TGF α („transforming growth factor alpha“), Amphiregulin, HB-EGF („heparin binding“-EGF) und Epiregulin. Diesem Rezeptorabschnitt folgt eine hydrophobe Transmembranregion, die der strukturellen Verankerung sowie der intramolekularen Signalvermittlung dient. C-terminal wird der EGFR durch ein zytoplasmatisches Segment komplementiert, in dem eine Tyrosinkinase-Domäne als primäre Effektoreinheit des Rezeptors integriert ist (USHIRO und COHEN 1980). Diese Kinase-Domäne dient als Bindungsstelle für weitere Kinasen und Substrate, die verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren (JORISSEN *et al.* 2003).

Die anderen Mitglieder der Rezeptorfamilie besitzen einen strukturell ähnlichen Aufbau, weisen jedoch einige spezifische Unterschiede auf (Abb. I-2). Bei ErbB3 (HER3) konnte beispielsweise eine katalytisch inaktive intrazelluläre Domäne nachgewiesen werden (CITRI *et al.* 2003). Weiterhin unterscheiden sich die Rezeptoren bezüglich der jeweiligen Liganden. So wurde z.B. eine große Anzahl von EGFR- und ErbB4-spezifischen Liganden identifiziert, wobei für ErbB2 (HER2/neu) bis jetzt noch keine Moleküle nachgewiesen werden konnten, die an die extrazelluläre Domäne binden und eine rezeptorvermittelte Signaltransduktion einleiten (CITRI *et al.* 2003). Die große Anzahl der Liganden, die mit der extrazellulären Domäne der Rezeptoren interagieren, deutet auf die zahlreichen zellulären Prozesse hin, in die die Rezeptorfamilie involviert ist.

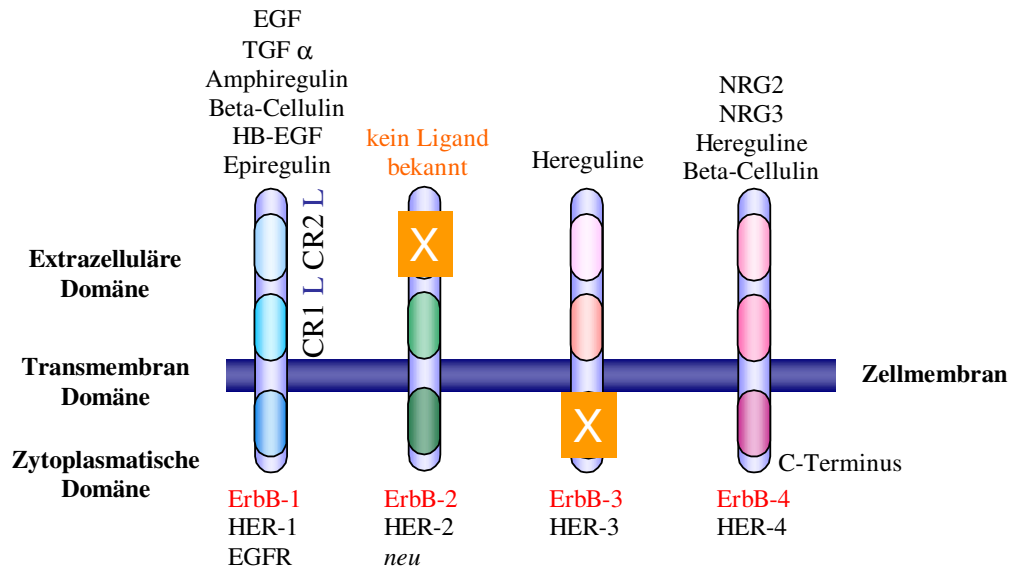


Abb. I-2: Die EGFR (ErbB)-Familie und ihre Liganden.

Alle vier Familienmitglieder weisen jeweils drei Domänen unterschiedlicher Funktion auf. Dabei besitzt die extrazelluläre Domäne vier Subdomänen, zwei cysteinreiche Domänen (CR) und zwei Liganden-Bindungsdomänen (L). ErbB-2 und ErbB-3 zeigen eine 50% bzw. 64% strukturelle Homologie zum EGFR (ErbB-1). Strukturelles Charakteristikum der EGF-Liganden-Familie, zu der die hier aufgeführten Liganden gehören, sind sechs Cysteine, die über ein konserviertes Sequenzmuster (CX7CX5CX10CX1CX8C) zur intramolekularen Formation dreier Disulfidbrücken führen, welche für die biologische Aktivität von besonderer Bedeutung sind (CAMPION *et al.* 1993).

In normalen Zellen führen die EGFR-vermittelten Signale unter anderem zu erhöhter Zellteilung, Proliferation, Differenzierung, Migration oder Angiogenese (HERBST 2004). Weiterhin ist eine inhibierende Wirkung auf die Apoptose festgestellt worden (JORISSEN *et al.* 2003). Abb. I-3 zeigt eine kurze Übersicht der für die Aktivierung der Signaltransduktionswege des EGFR wichtigen Prozesse. Im ersten Schritt erfolgt die Bindung eines Wachstumsfaktors mit EGF-ähnlicher Domäne an den EGFR. Die dadurch ausgelöste Konformationsänderung führt zu einer Dimerisierung von zwei gleichen Rezeptormolekülen (Homodimere) bzw. zur Dimerisierung von unterschiedlichen Rezeptoren der EGFR-Familie (Heterodimere). Die Rezeptordimerisierung induziert anschließend eine Autophosphorylierung von Tyrosinresten der intrazellulären Tyrosinkinase des EGFR. Diese Autophosphorylierung verstärkt zum einen die Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivität, zum anderen ermöglicht sie die Anbindung des Rezeptors an verschiedene mitogene Signalwege, indem die phosphotyrosinhaltigen Motive an cytoplasmatische Signalmoleküle binden, diese ebenfalls z.T. phosphoryliert und dadurch aktiviert werden. Nach erfolgter Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade wird der EGFR-Ligand-Komplex mittels Endozytose und den „clathrin coated pits“ internalisiert (STANG *et al.* 2004) und anschließend degradiert oder wiederverwertet (ALWAN *et al.* 2003; JORISSEN *et al.* 2003).

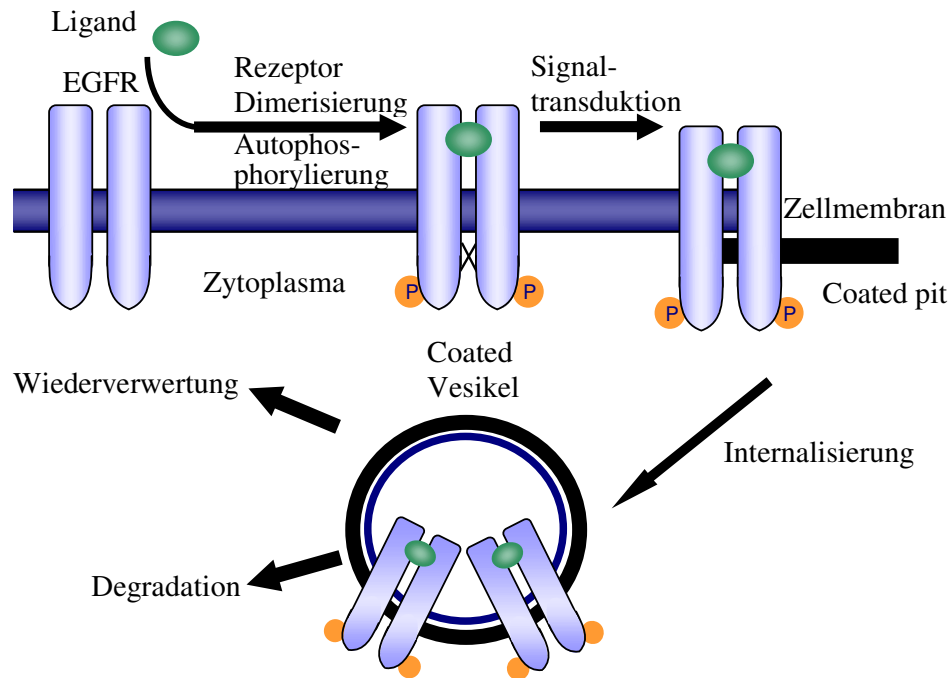


Abb. I-3: Schematische Übersicht der Aktivierung des EGFR und Induktion der Signaltransduktion.

Nach Bindung von EGF-ähnlichen Liganden an die extrazelluläre Domäne des EGFR erfolgt eine Rezeptordimerisierung, die eine Aktivierung der zytosomatischen Tyrosinkinase-Domäne induziert. Die Rezeptorphosphorylierung löst intrazelluläre Signalkaskaden aus, die z.B. zur Proliferation der Zellen führen. Anschließend wird der Rezeptor-Ligand-Komplex über „coated pits“ internalisiert, wodurch die Signaltransduktion herunterreguliert wird.

Durch die Internalisierung des Rezeptor-Komplexes wird die EGFR-vermittelte Signaltransduktion herunterreguliert. Ein weiterer negativ regulierender Mechanismus stellt eine im Rahmen der intrazellulären Signalkaskade erfolgende Aktivierung der Proteinkinase C dar, welche die Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivität durch eine Threonin-Phosphorylierung an Position 654 des EGFR negativ reguliert (DAVIES 1988).

Bei dem EGFR handelt es sich, wie bei anderen Rezeptortyrosinkinasen, um ein Proto-Onkogen. Mutationen in dem EGFR-codierenden Gen können die Aktivität der EGFR-Tyrosinkinase erhöhen und damit die EGFR-vermittelte Signaltransduktion verstärken. Durch verstärkte Wachstumssignale und reduzierte Apoptose kann es zu einem vermehrten unkontrollierten Zellwachstum bis hin zur onkogenen Veränderung von normalen Zellen kommen (SALOMON *et al.* 1995) (Abb. I-4). Die Überexpression des Rezeptors, die häufig von der Produktion mindestens einer seiner Liganden begleitet wird, ist eine charakteristische Eigenschaft vieler humaner epithelialer Tumore, wie z.B. dem Gehirn-, Blasen-, Lungen- und Brustkarzinom (HENDLER und OZANNE 1984; LIBERMANN *et al.* 1984; TSAO *et al.* 1996).

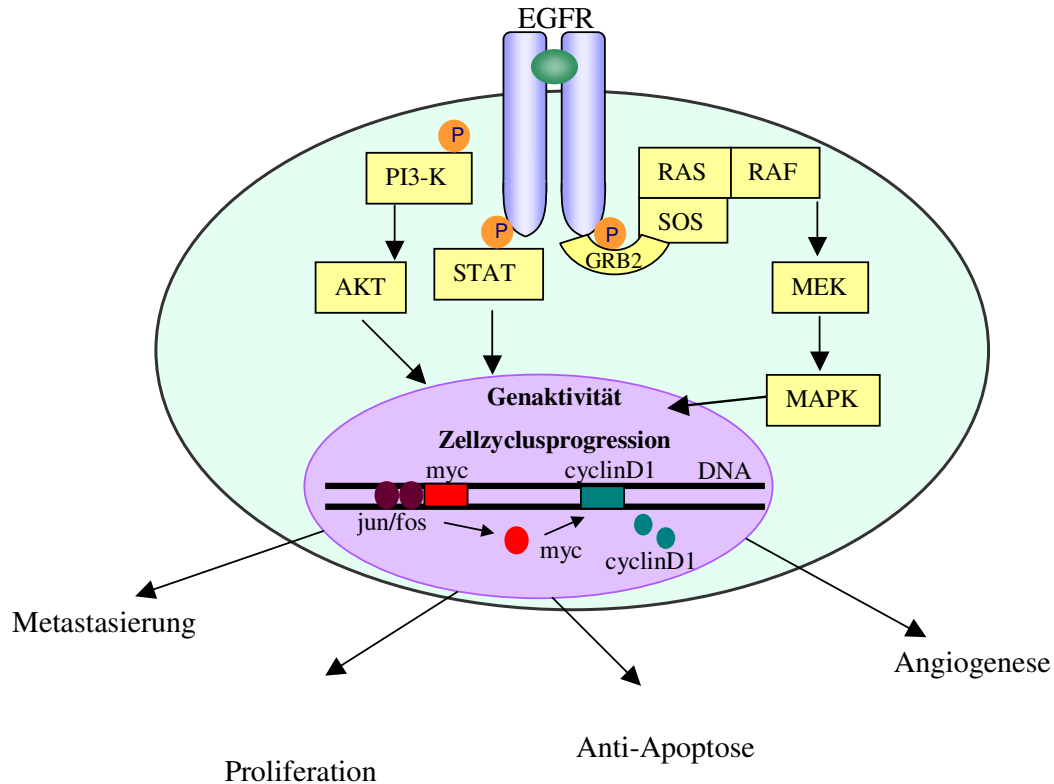


Abb. I-4: Schematische Darstellung der EGFR-Signalkette in Tumorzellen (modifiziert nach HERBST *et al.* (2004)).

Nach Aktivierung des EGFR können verschiedene Signaltransduktionswege eingeleitet werden. Der RAS-RAF Signalweg (LOWENSTEIN *et al.* 1992) sowie der Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3-K)/Akt Signalweg (CANTLEY *et al.* 1991) zählen zu den zwei wichtigsten Signalrouten der EGFR-Familie. Die durch die beiden Signalwege vermittelte Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren (z.B. jun/fos) resultiert in der Expression von wachstumsfördernden Proteinen. Die Tyrosin-spezifische Phosphorylierung der STAT („signal transducer and activator of transcription“-)Proteine leitet eine Dimerisierung und nachfolgende Translokation in den Nukleus ein, wo die STAT-Dimere an bestimmte DNA-Erkennungssequenzen binden (WAGENER 1996). Liegt eine Überaktivität des EGFR in Tumorzellen vor, führt die verstärkte Generierung von Wachstumssignalen zur Zellproliferation, Gefäßneubildung (Angiogenese) und Metastasierung, während die Apoptose reduziert wird.

Bei diesen Tumoren geht oftmals eine Überaktivierung des EGFR mit verstärkter Invasion, Metastasierung und erhöhter Resistenz gegenüber konventionellen Chemotherapeutika einher. Ein wichtiger EGFR-stimulierter, zellulärer Signalweg, der in epithelialen Tumoren zu erhöhter Zellteilung führt, ist die RAS/RAF/MAPK Kaskade (SAITO *et al.* 2004) (Abb. I-4).

Auch beim Pankreaskarzinom spielt eine gesteigerte Expression des EGFR und der Liganden EGF, Amphiregulin und TGF α eine maßgebliche Rolle (SMITH *et al.* 1987; EBERT *et al.* 1994; KOBRIN *et al.* 1994) und korreliert zusätzlich mit einer Diagnose fortgeschrittener Stadien, der Tumorgroße und einer reduzierten Überlebensrate der Patienten (YAMANAKA *et al.* 1993; DONG *et al.* 1998). Aufgrund der Tatsache, dass der EGFR als tumorassoziiertes Antigen auf normalen Zellen nur schwach exprimiert ist, stellt er ein interessantes Zielantigen für die Entwicklung spezifischer Therapiestrategien zur Behandlung von Tumorerkrankungen dar. Dies betrifft insbesondere immuntherapeutische Strategien, zu denen z.B. die Applikation von mono-

klonalen Antikörpern (mAk), Immuntoxinen und bispezifischen Antikörpern (Ak) zählen (PRESTA 2002).

1.3 Immuntherapie zur Behandlung von Krebs

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden verschiedene immuntherapeutische Strategien zur Behandlung von malignen Erkrankungen entwickelt. Diese Therapiestrategien, die man in passive und aktive Immuntherapien einteilt, sollen im Gegensatz zur konventionellen Chemotherapie die Tumorzellen spezifischer eliminieren und dementsprechend zu geringeren Nebenwirkungen führen. Ein aktiver immuntherapeutischer Ansatz besteht beispielsweise darin, die Immunogenität der Tumorzellen zu steigern, indem die Zellen mit Genen, die für costimulierende Moleküle kodieren, transfiziert werden (RAGNHAMMAR 1996). Des Weiteren können Oberflächenantigene der Tumorzellen mit immunogenen Molekülen gekoppelt werden. Die Entwicklung von tumorspezifischen Vakzinen und die Verabreichung von Immunmodulatoren, zu denen die Zytokine gehören (PARDOLL 1995), zählen ebenfalls zur aktiven Immuntherapie (HELLSTROM *et al.* 1997). Die Hemmung des Tumorwachstums kann dabei auf direkter Wirkung der Zytokine beruhen oder es spielen indirekte Effekte wie eine antiangiogenetische Wirkung oder Steigerung der Immunabwehr eine Rolle.

Vielversprechende Ansätze bei der passiven zellvermittelten Immuntherapie von Malignomen basieren auf tumorreaktiven T-Lymphozyten. Bei der adoptiven Immuntherapie werden *ex vivo* tumorantigenspezifische T-Lymphozyten vermehrt und wieder in den Patienten injiziert (WINTER und FOX 1999). Vor allem bei der Therapie von Melanomen konnte mittels Injektion von TIL („tumor infiltrating lymphocytes“-)Zellen ein Tumorrückgang beobachtet werden (BARTELS *et al.* 1996; WINTER und FOX 1999; CHAN *et al.* 2003). Eine weitere Möglichkeit besteht in dem Einsatz von mAk, die gegen spezifische Tumorantigene gerichtet sind. Rituximab (MCLAUGHLIN *et al.* 1998; MCLAUGHLIN 2001) und Trastuzumab (PEGRAM *et al.* 1998) zählen z.B. zu den derzeit für klinische Routineanwendungen zugelassenen Ak. Eine Schwierigkeit beim Einsatz von tumorspezifischen Ak besteht darin, dass die Tumorzellen nach Bindung des Ak oft nicht eliminiert werden. Zur Steigerung der antitumoralen Wirkung und des therapeutischen Effekts werden Ak daher mit zellschädigenden Substanzen fusioniert, wobei man von sogenannten Immuntoxinen spricht (siehe I.3.1).

1.3.1 Immuntoxine

Immuntoxine sind passive humorale Immuntherapeutika, bei denen eine spezifische Bindungseinheit mit einer toxischen Komponente gekoppelt ist (PAYNE 2003). Sie ermöglichen eine systemische Therapie und werden vor allem in der Krebstherapie eingesetzt. Bereits Ende des vorletzten Jahrhunderts formulierte Paul Ehrlich die Idee, Zellgifte mittels sogenannter

„Zauberkugeln“ selektiv zu den malignen Zielzellen im menschlichen Körper zu transportieren, indem man sich spezifischer Bindungsstrukturen auf den Tumorzellen bedient (HIMMELWEIT 1960). Doch erst nach der Entwicklung der Hybridomatechnologie durch Köhler und Milstein konnte diese Idee entsprechend realisiert werden, da mit der Verfügbarkeit von mAk nun spezifische Strukturen auf Zellen erkannt und attackiert werden konnten (KÖHLER und MILSTEIN 1975). Neben Ak, die gegen mutierte oder überexprimierte Antigene auf der Tumorzelloberfläche gerichtet sind, können auch Liganden von tumorspezifisch veränderten Rezeptoren als Bindungseinheiten in Immuntoxinen verwendet werden.

Die erste Generation von Immuntoxinen, welche aus vollständigen murinen Ak und daran chemisch gekoppelten Toxinen bestand, demonstrierte erstmals die Durchführbarkeit des neuartigen Therapiekonzepts zur Abtötung von Tumorzellen (KROLICK *et al.* 1982; VITETTA und UHR 1985). Jedoch zeigten sich bald auch mehrere Probleme. So belegten z.B. klinische Studien, dass chemische Konjugate eine unzureichende Stabilität *in vivo* aufwiesen (BYERS und BALDWIN 1988) und dass sie bedingt durch ihre Größe eine schlechte Tumorpenetration bei der Behandlung von soliden Tumoren zeigten (LOBUGLIO und SALEH 1992). Weiterhin sind Schwierigkeiten bei der Produktion zu erwähnen, da beide Komponenten separat produziert und gereinigt werden müssen und die chemische Konjugation keine definierte und reproduzierbare Ak-Toxin Bindung ermöglicht, was eine Produktion unter heutigen FDA („Food and Drug Administration“)-Richtlinien ausschließt. Bedingt durch die Verwendung von kompletten Toxinen, die beispielsweise ihre natürliche Bindungsdomäne enthielten, kam es zu Kreuzreaktivitäten mit normalen nicht malignen Zellen.

Immuntoxine der zweiten Generation konnten einige dieser Probleme überwinden. Grundlage hierfür war die Entwicklung der rekombinanten DNA-Technologie und des „Antikörper Engineering“. Mit Hilfe dieser Techniken kann die Größe von Immuntoxinen entscheidend verringert werden, indem z.B. sogenannte „single chain Fv“-Fragmente (siehe I.3.1.1) als Bindungsdomänen eingesetzt werden (WELS *et al.* 1992; BRINKMANN *et al.* 1993). Des Weiteren erlauben die molekularbiologischen Techniken die Generierung von vollständig rekombinanten Immuntoxinen, welche in großen Mengen und reproduzierbarer Qualität in Bakterien hergestellt werden können. Da das gesamte Fragment von einem einzigen Gen kodiert wird, führt dies zu einer Vereinfachung von genetischen Veränderungen, welche zur Verbesserung der Bindungsaffinität, der Stabilität und der Produzierbarkeit der Immuntoxine durchgeführt werden (KREITMAN und PASTAN 1995; KREITMAN *et al.* 1995). Eine Steigerung der Zytotoxizität der Konstrukte gegenüber malignen Zellen und Reduktion gegenüber normalen Zellen wurde durch die Verwendung von verkürzten und mutierten Toxinen erreicht, wozu z.B. die deletierte Form des *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A zählt (KONDO *et al.* 1988).

Neben ersten erfolgreichen Daten bei der Therapie von hämatologischen Erkrankungen mit rekombinanten Immuntoxinen (KREITMAN und PASTAN 1995; BARTH *et al.* 2000; KREITMAN *et al.* 2001) wurden die Fusionsproteine auch zur Therapie von soliden Tumoren generiert und zeigten vielversprechende Ergebnisse (PAI *et al.* 1996; REITER und PASTAN 1996; AZEMAR *et al.* 2000). Aufgrund der Tatsache, dass murine Ak potentiell immunogen sind und die Bildung von humanen anti-Maus Ak (HAMA) im Menschen induzieren können (TJANDRA *et al.* 1990), wurden in den letzten Jahren vermehrt humanisierte Ak und Ak-Fragmente konstruiert. Dazu wurden z.B. mittels „CDR-Grafting“ (KETTLEBOROUGH *et al.* 1991) die konstanten Domänen der murinen Ak gegen die entsprechenden humanen konstanten Domänen ausgetauscht.

1.3.1.1 Die Bindungsdomäne

Wie bereits in Abschnitt I.3.1 aufgeführt können vollständige Ak, Ak-Fragmente und Liganden als Bindungsdomäne in Immuntoxinen verwendet werden. Die mittels der Hybridomatechnologie produzierten murinen Ak waren vor allem Bestandteil der ersten Generation von Immuntoxinen (BLATTLER *et al.* 1989). Murine Ak gehören wie menschliche Ak zur Gruppe der Immunglobuline (Ig) und bestehen aus vier Polypeptidketten, zwei identischen leichten Ketten (L-Ketten) und zwei identischen schweren Ketten (H-Ketten), welche kovalent durch inter- und intramolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (BURTON 1987). Jede dieser Ketten kann in eine konstante Region (C-Region) und eine variable Region (V-Region) unterteilt werden (Abb. I-5). Dabei besitzt die C-Region der schweren Kette in der Regel drei Domänen (CH1, CH2, CH3), die der leichten Kette nur eine Domäne. Die V-Region der schweren und leichten Kette (V_H und V_L) lässt sich in drei hypervariable Regionen („complementarity determining regions“ CDRs) unterteilen, die von vier konservierten Bereichen („frameworks“) mit ausgeprägter β -Faltblattstruktur stabilisiert werden (KABAT *et al.* 1990). Die Antigen-Bindungsstelle, das Paratop, wird durch nicht-kovalente Assoziation der drei CDRs der H-Kette mit den drei CDRs der L-Kette geformt, so dass ein Ak über zwei identische Bindungsstellen verfügt (Bivalenz). Die Antigen-Spezifität eines Ak wird dabei überwiegend durch die Aminosäuren (AS)-Sequenz der CDRs determiniert. Die Domänen der C-Region spielen eine Rolle bei der Vermittlung der Effektorfunktionen des Ak, indem sie z.B. das Komplementsystem aktivieren oder an Oberflächenrezeptoren von Phagozyten binden.

Um die Größe von Immuntoxinen zu reduzieren sowie ihre Beweglichkeit und ihr Diffusionsverhalten durch das Tumorgewebe zu verbessern, können verschiedenste Ak-Fragmente verwendet werden (YOKODA *et al.* 1992). Zunächst wurden Ak-Fragmente durch enzymatische Modifikationen von mAk gewonnen. Dazu zählen die durch Protease-Behandlung hergestellten monovalenten Fab-Fragmente (PORTER 1959), die ebenfalls monovalenten Fv-Fragmente (INBAR *et al.* 1972) und die bivalenten $F(ab')_2$ -Fragmente (PARHAM 1986). Fv-Fragmente,

welche die kleinsten Ak-Fragmente darstellen, sind Proteinheterodimere aus den assoziierten V-Domänen der leichten und schweren Ak-Kette. Bedingt durch die nicht-kovalente Verbindung beider Ak-Ketten ist dieses Fragment aber sehr instabil und dissoziiert leicht in beide Untereinheiten.

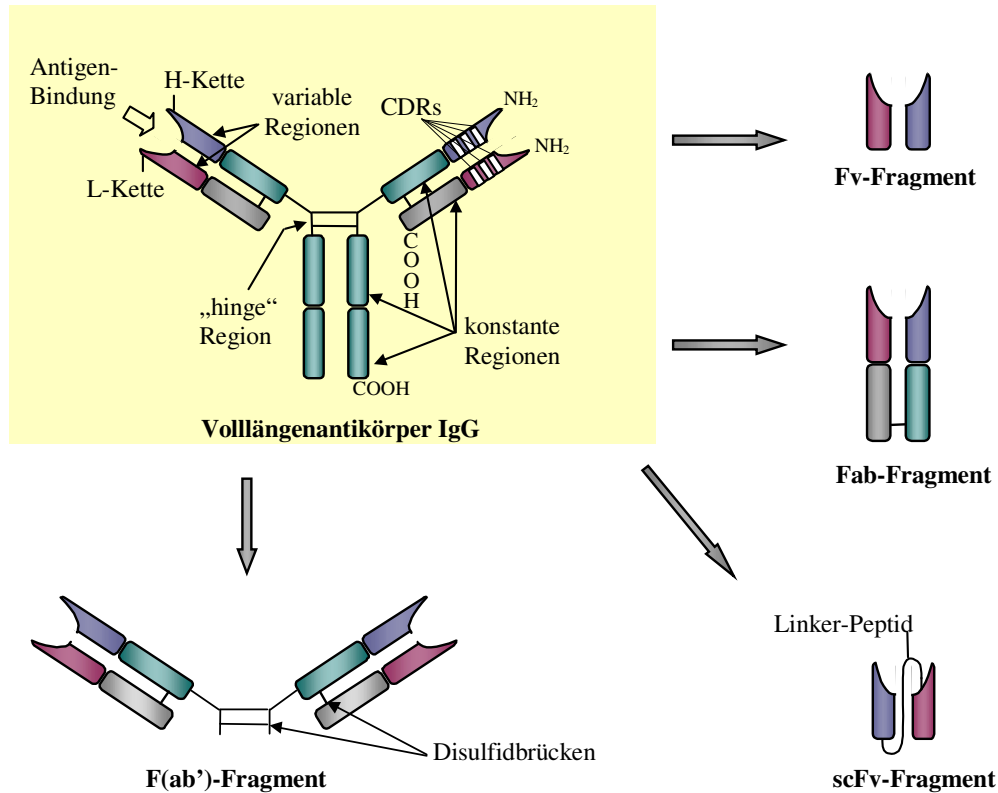


Abb. I-5: Schematische Darstellung eines Immunglobulins (IgG) und davon abgeleiteten Ak-Fragmenten. IgG = Immunglobulin G; Fab = „Fragment of antigen binding“; F(ab')₂ = Fab-Dimer; Fv = „Fragment of variable region“; scFv = „single chain Fragment of the variable region“; CDR = hypervariable Bereiche („complementary determining region“); L-Kette = leichte Kette; H-Kette = schwere Kette.

Neben der proteolytischen Herstellung lassen sich die oben erwähnten Ak-Fragmente auch molekularbiologisch gewinnen (WINTER und MILSTEIN 1991), wobei mittels dieser Technik eine Stabilisierung der Fv-Fragmente ermöglicht wird. Zum einen können die V-Domänen der H-Kette mit den V-Domänen der L-Kette durch ein kurzes Peptid („Linker“) zu einem einzigen Proteinstrang verknüpft werden, wobei ein scFv-Fragment („single chain Fragment of the variable region“) entsteht (BIRD *et al.* 1988). Bisher wurde eine große Anzahl von auf scFv-Fragmenten basierenden rekombinanten Immuntoxinen konstruiert und erfolgreich *in vitro* und *in vivo* analysiert (REITER *et al.* 1996; SCHMIDT *et al.* 1997; AZEMAR *et al.* 2003). Eine weitere Möglichkeit der Stabilisierung besteht darin, Cysteinreste in die carboxyterminalen konservierten Bereiche der V-Domänen einzufügen, wobei diese Disulfidbrücken ausbilden und so eine Verstärkung der Kettenassoziation bewirken (BRINKMANN *et al.* 1993). Die disulfid-stabilisierten

Fvs (dsFvs) weisen z.T. neben einer höheren Stabilität und einem verminderten Aggregationsverhalten auch eine verbesserte Bindungsaffinität gegenüber scFv-Fragmenten auf (REITER *et al.* 1994; REITER *et al.* 1994).

Da die scFv-Fragmente, wie auch die dsFv-Ak, keine Fc-Region mehr besitzen, können bei der Applikation von entsprechenden Immuntoxinen durch Effektorfunktionen bedingte Nebenwirkungen vermieden werden. Weiterhin ist eine kurze Verweildauer dieser Ak-Fragmente im Gewebe und eine schnelle Auswaschung aus der Blutzirkulation zu nennen (HUSTON *et al.* 1993).

Ak oder Ak-Fragmente, die als Bindungsdomänen in Immuntoxinen verwendet werden, sind beispielsweise gegen Wachstumsfaktorrezeptoren, wie den ErbB2- und EGF-Rezeptor oder gegen Zytokinrezeptoren wie IL-2- und IL-4- Rezeptor gerichtet, da diese oftmals im Vergleich zu normalen Zellen auf malignen Zellen überexprimiert oder mutiert sind (REITER und PASTAN 1998). Als Alternative zu rezeptorspezifischen Ak können auch die entsprechenden natürlichen Liganden und Zytokine als Bindungsdomäne eingesetzt werden, wozu z.B. die Zytokine IL-4 (PURI *et al.* 1991), IL-2 (GAO *et al.* 1996) und die EGFR-spezifischen Liganden EGF (YOON *et al.* 1999) und TGF α (SCHMIDT und WELS 1996) zählen.

1.3.1.2 Die toxische Domäne

Als zelltoxische Komponenten in Immuntoxinen können Radioisotope, Zytostatika oder Proteintoxine verwendet werden. Innerhalb der Gruppe der Proteintoxine unterscheidet man zwischen pflanzlichen Toxinen wie z.B. RicinA und Saporin, bakteriellen Toxinen und humanen Toxinen. Eines der gebräuchlichsten bakteriellen Toxine ist neben dem Diphtherietoxin (DT) das Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa* (ETA), welches vor allem durch die Arbeiten von Pastan bekannt wurde (PASTAN 2003). Es ist ein 613 AS großes Einzelkettenprotein, das drei funktionelle Domänen aufweist, die Bindungs-, die Translokations- und die toxische/katalytische Domäne (HWANG *et al.* 1987). Des Weiteren besitzt ETA noch eine Domäne unbekannter Funktion. Die Bindungsdomäne ermöglicht die Anlagerung des Toxins an den α 2-Makroglobulinrezeptor auf der Zelloberfläche von tierischen Zellen (KOUNNAS *et al.* 1992), worauf die Internalisierung von ETA mittels rezeptorvermittelter Endozytose erfolgt. Die Translokationsdomäne wird anschließend von der zelleigenen Protease Furin pH-abhängig in den Endosomen geschnitten (OGATA *et al.* 1990; CHIRON *et al.* 1994). Die mit dem Schneiden verbundene Konformationsänderung führt dann zur Translokation der toxischen Domäne des ETA über das trans-Golgi-Netzwerk und das Endoplasmatische Retikulum (ER) bis hin zum Zytoplasma der Zelle. Dort führt die katalytische Domäne durch NAD⁺-vermittelte ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 (EF-2) oder der Ribosomen selbst zur Inhibierung der Proteinsynthese und somit zum Tod der Zelle (IGLEWSKI und KABAT 1975; CARROLL und COLLIER 1987).

Durch Austausch der ursprünglichen Bindungsdomäne gegen einen spezifischen Bindeliganen (Abb. I-6) können ETA-Fusionsproteine selektiv an Zielzellen binden und diese nach Internalisierung und Freisetzung der katalytischen Domäne ins Zytosol sehr wirksam abtöten.

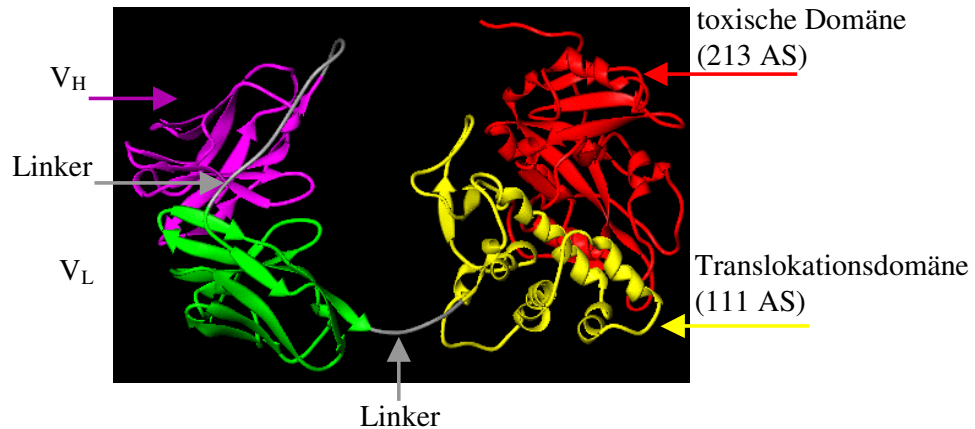


Abb. I-6: Strukturmodell eines Immuntoxins, bestehend aus einem scFv-Fragment und ETA.

Die 252 AS große Bindungsdomäne von ETA wurde durch ein scFv-Fragment als spezifischen gegen die Zielzellen gerichteten Bindeliganen rekombinant ersetzt. Die Translokations- und toxische Domäne von ETA sind durch einen Linker getrennt. V_H = variable Region der schweren Kette, V_L = variable Region der leichten Kette.

ETA ist im Vergleich zu anderen Toxinen sehr effizient, da theoretisch die Aufnahme von ein bis zehn Molekülen ins Zytosol ausreicht, um die Zelle zu zerstören (EIKLID *et al.* 1980). Allerdings muss beachtet werden, dass ETA als ein nicht-humanes Protein eine Immunantwort im Menschen provozieren kann und somit einer wiederholten Applikation von ETA-basierten Immuntoxinen Grenzen gesetzt sind. Weiterhin kann die systemische Gabe von ETA-Fusionsproteinen dosisabhängig zu verschiedenen Nebenwirkungen führen, wie dem sogenannten „Vaskular-Leak“-Syndrom und Leberschädigungen (PAI-SCHERF *et al.* 1999; POSEY *et al.* 2002).

Als Konsequenz der Problematik, dass bakterielle und pflanzliche Toxine eine hohe Immunogenität mit sich bringen und eine humorale Abwehr induzieren, kam es zum Einsatz von humanen Enzymen als Effektordomänen. Dabei unterscheidet man humane Effektordomänen, die zu den Mitgliedern der Ribonuklease-Superfamilie zählen und Enzyme die eine Proteaseaktivität aufweisen. Als erstes wurde das zytotoxische Potential der humanen RNaseA *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (NEWTON *et al.* 1992). Angiogenin, ein 14 kDa Protein mit 65%iger Sequenzhomologie zur RNaseA erwies sich nach Injektion in *Xenopus* Oocyten ebenfalls als effizienter Inhibitor der Proteinsynthese (SAXENA *et al.* 1992). Die Zytotoxizität des humanen Proteins ist dabei auf die tRNA-spezifische RNase-Aktivität zurückzuführen. Angiogenin ist wie die anderen Mitglieder der RNase-Superfamilie, in extrazellulären Flüssigkeiten, Plasma und Gewebe vorhanden und sollte dementsprechend als Bestandteil von Immuntoxinen keine Immunogenität aufweisen. Eine wichtige natürliche Funktion des Angiogenins besteht in der Induktion des

Gefäßwachstums (Angiogenese) (FETT *et al.* 1985). In verschiedenen Arbeitsgruppen konnte bereits mehrfach die *in vitro* Toxizität von Angiogenin-basierten Immuntoxinen gezeigt werden (YOON *et al.* 1999; NEWTON und RYBAK 2001; STÖCKER 2001). HUHN *et al.* entwickelten ein vollständig humanes Immuntoxin mit Angiogenin als toxische Domäne und wiesen weiterhin die spezifische Zytotoxizität gegenüber CD30-positiven Hodgkinzellen nach (HUHN *et al.* 2001). Ein weiteres Mitglied der RNase Superfamilie ist das eosinophil-kationische Protein (ECP) (GLEICH *et al.* 1986). Das 21 kDa Protein ist Bestandteil der Granula der eosinophilen Granulozyten, die zu den Effektorzellen des Immunsystems zählen und über membrangebundene Ak aktiviert werden. ECP weist zwei Glykosylierungen auf und spielt bei der Koagulations- und Komplementkaskade eine Rolle. Weiterhin zeigt es einen zytotoxischen Effekt gegenüber Trypanosomen, Bakterien, Parasiten und mammalischen Zellen (ROSENBERG 1998). Im Gegensatz zu Angiogenin ist die RNase-Aktivität für die toxische Eigenschaft von ECP nicht zwingend notwendig (ROSENBERG 1995).

Neben der Familie der RNasen spielen auch Komponenten der zellulären Immunabwehr, insbesondere Proteine mit Proteaseaktivität, eine bedeutende Rolle für den Einsatz in Immuntoxinen. Dazu zählt die Aspartat-spezifische Serinprotease Granzym B. Das 32 kDa Protein wird nach Aktivierung zytotoxischer T-Zellen oder natürlicher Killerzellen aus den zytotoxischen Granula der Zellen ausgeschüttet (SHRESTA *et al.* 1998). Erst kürzlich wurde Granzym B auch in den polymorphonukleären neutrophilen Zellen (PMNs) nachgewiesen, welche eine Rolle bei der Abwehr von bakteriellen Infektionen und der Ak-abhängigen zellulären Zytotoxizität spielen (WAGNER *et al.* 2004). Nach Perforin-abhängiger Internalisierung in das Zytoplasma der attackierten Zelle initiiert Granzym B eine proteolytische Kaskade, indem es verschiedene am Zelltod beteiligte Proteine spaltet und die Apoptose der Zelle einleitet (GREENBERG 1996).

In den letzten Jahren konnten verschiedene Proteine identifiziert werden, die nach Spaltung durch Granzym B aktiviert werden und in direktem Zusammenhang mit der Apoptose stehen. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Procaspasen 3 und 8, welche eine zentrale Rolle in der Apoptose spielen (NICHOLSON und THORNBERRY 1997), mittels Proteolyse von Granzym B in den aktiven Zustand übergehen (FERNANDES-ALNEMRI *et al.* 1996). Weiterhin unterstützt Granzym B den Zelltod durch DNA-Fragmentierung (KAM *et al.* 2000) und Spaltung des nukleären Matrixantigens und der poly-(ADP-Ribose)-Polymerase nach Caspase-abhängiger Translokation in den Zellkern (ANDRADE *et al.* 2004). Die Akkumulation von Granzym B im Zellkern ist dabei mit einer schnellen Apoptose verbunden (TRAPANI *et al.* 1998).

SUTTON *et al.* beschrieben, dass Granzym B den Zelltod Caspase-unabhängig nach direkter proteolytischer Spaltung von Bid, einem Mitglied der Bcl-2 Familie, initiiert (SUTTON *et al.* 2000). Die aus der Spaltung resultierende verkürzte Form tBid lagert sich dann in die mitochondriale Membran ein, was deren Depolarisierung nach sich zieht. Dadurch wird die Freisetzung von Cytochrom C und eines weiteren Apoptose-induzierenden Faktors aus den

Mitochondrien in das Zytoplasma induziert, was die Apoptose signifikant beschleunigt. Die mitochondrialen apoptotischen Vorgänge können weiterhin durch Granzym B vermittelte Degradation von MCL-1 und anschließender Aktivierung von Bim ausgelöst werden (HAN *et al.* 2004).

Die genaue Funktion des mit dem Granzym B ausgeschütteten Perforin ist bis dato noch nicht geklärt. Untersuchungen haben ergeben, dass Granzym B auch in Abwesenheit von Perforin den Zelltod einleiten kann, indem die Protease direkt in das Zytoplasma der Zellen injiziert wird. Dies deutet darauf hin, dass Perforin eine Rolle bei der Internalisierung von Granzym B spielt (PINKOSKI *et al.* 1998).

1.3.1.3 EGFR-spezifische Antikörper und Immuntoxine

Wie bereits in Abschnitt I.2 erwähnt, stellt der EGFR ein interessantes Zielantigen zur Entwicklung immuntherapeutischer Strategien dar, da der Rezeptor auf vielen Tumoren in veränderter oder überexprimierter Form vorliegt und auf normalen Zellen nur schwach exprimiert ist. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass anti-EGFR mAk das *in vitro* Wachstum verschiedener EGFR-positiver Zelllinien inhibieren und z.T. EGFR-überexprimierende Tumortransplantate in immundefizienten Mäusen eliminieren können (MODJTAHEDI *et al.* 1993; MODJTAHEDI und DEAN 1996; MENDELSON 1997). Weiterhin konnte die Selektivität der anti-EGFR mAk zur Behandlung von Tumoren bestätigt werden, da normales Gewebe durch die Therapeutika kaum geschädigt wurde. Anfang 2004 erhielt der von der Firma ImClone (New York, USA) hergestellte chimäre (Maus/human) anti-EGFR mAk IMC225 (ERBITUX[®]) die Marktzulassung in den USA zur Behandlung von metastasierendem Kolonkarzinom. IMC225 zeigte ebenfalls erste Erfolge bei der Therapie des Pankreaskarzinoms. So konnte z.B. das Wachstum pankreatischer Tumore in immundefizienten Mäusen mittels IMC225 sehr effizient unterdrückt werden (OVERHOLSER *et al.* 2000). BRUNS *et al.* verwendeten den humanisierten anti-EGFR Ak in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabine und wiesen eine deutliche Regression von pankreatischen Primärtumoren sowie eine Reduktion der Metastasenbildung in einem orthotopen Mausmodell nach (BRUNS *et al.* 2000). Zur Bestätigung des EGFR als passendes Zielantigen für die Therapie des Pankreaskarzinoms wurden weitere Studien mit IMC225 durchgeführt (XIONG und ABBRUZZESE 2002; HUANG *et al.* 2003).

Neben anti-EGFR Ak wurden bereits eine Vielzahl von EGFR-spezifischen Immuntoxinen *in vitro* und *in vivo* analysiert. Der mAk 425.3 wurde z.B. zur Steigerung der anti-Tumoraktivität chemisch mit dem bakteriellen Toxin ETA gekoppelt und das entstandene Fusionsprotein führte zu einer signifikanten Inhibierung sowohl des lokalen Tumorwachstums als auch der Metastasenbildung von Brustkrebszellen in Ratten (ENGEBRAATEN *et al.* 2000). Die auf scFv-Fragmenten basierenden Immuntoxine scFv(14E1)-ETA (SCHMIDT *et al.* 1999) und scFv(225)-ETA (AZEMAR *et al.* 2000) bestätigen ebenfalls, dass anti-EGFR Immuntoxine als mögliche effektive

Therapeutika zur Behandlung von unterschiedlichen Tumorerkrankungen Verwendung finden können, wobei vor allem die Erfolge bei der Eliminierung von residualen Tumorzellen und die damit verbundene Reduktion der Metastasierung hervorzuheben sind. Zur Behandlung von metastasierendem Pankreaskarzinom wurden bis dato noch keine rekombinanten Immuntoxine analysiert.

1.4 Produktion von rekombinanten Immuntoxinen

1.4.1 Prokaryotische Expression

Die Expression von rekombinanten Immuntoxinen wird derzeit üblicherweise in Prokaryoten durchgeführt. Dabei eignet sich *E. coli* gut als Produktionssystem aufgrund umfangreicher Kenntnisse bezüglich der einfachen genetischen Manipulierbarkeit sowie der unkomplizierten und kostengünstigen Handhabung und Kultivierung. Von Vorteil ist weiterhin, dass die im Allgemeinen für Eukaryoten toxischen Produkte keinen Einfluss auf die Vitalität der produzierenden Bakterien haben. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit rekombinante Proteine im Zytoplasma von *E. coli* zu exprimieren oder in den periplasmatischen Raum zu sekretieren (BANEYX 1999). Zur Produktion von Immuntoxinen wird hauptsächlich die zytoplasmatische Expression genutzt, da sie gegenüber der periplasmatischen Expression oftmals beträchtlich höhere Expressionsausbeuten erreicht (GAO *et al.* 1996; SANCHEZ *et al.* 1999). Jedoch werden die exprimierten Fremdproteine meist in Form von unlöslichen Aggregaten („inclusion bodies“) in der Zelle abgelagert (MITRAKI *et al.* 1991). Die Immuntoxine liegen in diesen „inclusion bodies“ denaturiert und vernetzt vor und sind dementsprechend zu 90% nicht aktiv (BUCHNER *et al.* 1992; FITZGERALD *et al.* 1998). Um funktionsfähige Proteine aus den „inclusion bodies“ zu gewinnen, muss eine z.T. aufwendige Rückfaltung der denaturierten Proteine durchgeführt werden (BUCHNER *et al.* 1992; SHI *et al.* 1997). Neben der geringen Ausbeute an funktionalem Protein führt diese Methode oftmals zu einer Verschlechterung der Proteineigenschaften bezüglich Stabilität und Aggregationsverhalten (BENHAR und PASTAN 1994). Als Vorteil der Bildung von „inclusion bodies“ ist zu erwähnen, dass das exprimierte Fremdprotein in den unlöslichen Aggregaten bereits in konzentrierter Form vorliegt und vor dem Abbau durch in großen Mengen vorhandenen zytoplasmatischen Proteasen geschützt ist (SWAMY und GOLDBERG 1982).

Bei der periplasmatischen Expression werden die rekombinanten Immuntoxine mittels eines Signalpeptides, wie z.B. dem *peIB*-oder *ompA*-Signalpeptid, durch die innere Membran in den periplasmatischen Raum sekretiert. Im Unterschied zum Zytoplasma wird im Periplasma von *E. coli* die Herstellung korrekt gefalteter Proteine unter Ausbildung von Disulfidbrücken durch ein oxidierendes Milieu, durch das Vorhandensein von einer Disulfid-Oxidoreduktase

(BRADWELL *et al.* 1991) und Chaperonen (LANGER *et al.* 1992) ermöglicht. Ein weiterer Vorteil der periplasmatischen Expression im Vergleich zur zytoplasmatischen Expression ist der niedrigere Gehalt an bakteriellen Proteinen, was die spätere Reinigung der Fremdproteine erleichtert. Außerdem weist das Periplasma eine geringere Menge an Proteasen auf, womit proteolytische Degradationen der exprimierten Proteine eingeschränkt werden (TALMADGE und GILBERT 1982). Die Effizienz des periplasmatischen Expressionssystems konnte durch die Verwendung von kompatiblen Soluten und osmotischem Stress weiter verbessert werden. Dieses neuartige Verfahren (II.3.2.2) ermöglicht eine Akkumulation von bis zu 95% an funktionalem rekombinantem Immuntoxin im Periplasma und führt zu Produktionsraten von >1 mg/l Bakterienkultur (BARTH *et al.* 2000).

Sollen humane Proteine in *E. coli* produziert werden, muss die z.T. unterschiedliche Codon-Zusammensetzung („Codon Usage“) in Prokaryoten und Eukaryoten berücksichtigt werden (WALL und PLÜCKTHUN 1999). Diese Unterschiede können drastische Auswirkungen auf die Effizienz der Translation und der Faltung haben und es bedarf somit einer Optimierung der Sequenz, um ausreichende Produktionsraten zu erzielen. Ein zusätzlicher limitierender Faktor ist, dass die Bakterienzelle keine posttranslatorischen Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen und AS-Acetylierungen durchführt und es somit zu Fehlfaltungen und Funktionalitätsstörungen der exprimierten Proteine kommen kann (PLÜCKTHUN 1991).

1.4.2 Eukaryotische Expression

Die eukaryotische Expression von rekombinanten Proteinen bietet eine interessante Alternative zur Produktion in Prokaryoten. Im Gegensatz zu dem bakteriellen Expressionssystem ermöglicht die Produktion in z.B. Säugetierzellen Glykosylierungen sowie weitere posttranslatorische Modifikationen der synthetisierten Proteine. Dies spielt vor allem bei der Expression von Proteinen zur klinischen Anwendung im Menschen eine Rolle. Weiterhin können im Vergleich zu *E. coli* Zellen in eukaryotischen Zellen wesentlich größere und komplexere Proteine, wie z.B. 150 kDa große mAk exprimiert werden. Wichtig für die korrekte Faltung und Funktionalität von in Eukaryoten exprimierten Proteinen sind die im ER lokalisierten Chaperone und die Disulfidisomerasen, die die Bildung von intra- und interspezifischen Disulfidbrücken sowie die Zusammenlagerung von Proteindomänen gewährleisten. Als Vorteil gilt auch die Möglichkeit, rekombinante Proteine mittels einer Signalsequenz gezielt in den Kulturüberstand von eukaryotischen Zellen zu sezernieren. Bei der periplasmatischen Expression in *E. coli* kann zwar auch eine Sekretion in das Kulturmedium stattfinden, diese ist aber abhängig von der Größe der Proteine und von bestimmten Kulturbedingungen, die eine gesteigerte Porösität der Membran bewirken (PLÜCKTHUN 1991). Die gezielte Sekretion ins Kulturmedium der eukaryotischen Zellen ermöglicht eine kontinuierliche Produktion der Proteine, da die produzierenden Zellen nicht abgeerntet und zerstört werden müssen. Ebenso wird aufgrund des niedrigen Gehalts an unerwünschten Proteinen

die Reinigung erleichtert. Das pSecTag-basierte pMS-Expressionssystem bedient sich einer N-terminalen Ig-Kappa (Igκ)-Signalsequenz zur Sekretion der rekombinanten Proteine ins Medium transfizierter Zellen (STÖCKER *et al.* 2003). Mit den derzeitigen Methoden der *in vitro* Transfektion von geeigneten Produktionszelllinien lassen sich in relativ kurzer Zeit rekombinante Proteine im Zellkulturüberstand nachweisen und funktionell charakterisieren (STÖCKER *et al.* 2003).

Verwendet man eukaryotische Zellen zur Produktion von Immuntoxinen, so muss bedacht werden, dass die gebildeten Toxine für die produzierenden Zellen potentiell toxisch sind, sobald die katalytischen Domänen ins Zytoplasma kommen. Aus diesem Grund missglückten die ersten Versuche rekombinante Immuntoxine in Säugetierzellen zu exprimieren (SPOONER *et al.* 1994). Durch die Verwendung von Zelllinien, die hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem Toxin mutiert waren, konnte dieses Problem z.T. umgangen werden (LIU *et al.* 2000). So ist es mehreren Arbeitsgruppen gelungen rekombinante Immuntoxine in Säugetierzellen zu produzieren und deren Funktionalität hinsichtlich Bindungsaktivität und Zytotoxizität zu verifizieren (CHEN *et al.* 1997; STÖCKER 2001).

Zu den gängigen Produktionszelllinien zählen bei den Säugetierzellen die Affennierenzelllinie COS, die „Chinese hamster ovary“ (CHO) Zellen, und die humane Nierenzelllinie HEK293T. Sowohl Vektoren für COS Zellen als auch für HEK293T Zellen besitzen oftmals den SV40 „origin of replication“ (ori). In den Zellen wird das „large T-Antigen“ des SV40-Virus exprimiert, welches zu einer hohen Kopienzahl des transfizierten episomal vorliegenden Plasmids führt und somit besonders geeignet für eine transiente nicht stabile Transfektion ist.

1.5 Zielsetzung

Im Vergleich zu allen anderen malignen Erkrankungen ist das Pankreaskarzinom durch eine sehr hohe Mortalitätsrate gekennzeichnet. Die Hauptgründe dafür liegen in der unzureichenden Möglichkeit einer frühen Diagnose, dem hochaggressiven Tumorwachstum und der frühen Ausprägung von Metastasen. Die bisherigen Therapieansätze der Radio- und Chemotherapie zeigen eine unzureichende Spezifität und gewährleisten meist keine vollständige Eliminierung der Tumorzellen. Diese residualen malignen Zellen können zur Bildung von Metastasen führen und stellen demnach die Hauptursache für einen Krankheitsrückfall dar. Aus diesem Grund müssen dringend effiziente Therapiestrategien entwickelt werden, die auf die spezifische Elimination jeder malignen Zelle ausgerichtet sind und so die durchschnittliche Überlebenszeit für die Patienten signifikant erhöhen. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die Immuntherapie mittels Immuntoxinen einen vielversprechenden Ansatz für eine spezifische Therapie darstellt. Dementsprechend sollten im Rahmen dieser Dissertation verschiedene Immuntoxine zur Therapie von metastasierendem Pankreaskarzinom entwickelt werden und ihre Wirkung *in vitro* und *in*

in vivo evaluiert werden. Dabei steht weniger die Behandlung des Primärtumors im Fokus, sondern die Eliminierung residueller pankreatischer Zellen durch Immuntherapeutika. Als tumorspezifisches Zielantigen der Immuntoxine sollte der EGFR verwendet werden, da er auf pankreatischen Tumorzellen überexprimiert wird und dies mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Freundlicherweise wurde von Prof. Haisma (University Centre for Pharmacy, Groningen, Niederlande) ein murines EGFR-spezifisches scFv-Fragment (425) zur Konstruktion der Immuntoxine zur Verfügung gestellt. Als toxische Domäne sollte zum einen eine Deletionsmutante des bakterielle *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA) verwendet werden, da dieses Toxin gut charakterisiert und durch eine hohe zytotoxische Wirksamkeit gekennzeichnet ist. Das generierte und durch Sequenzierung verifizierte Immuntoxin 425(scFv)-ETA' sollte in dem prokaryotischen pBM1.1-Expressionssystem evaluiert werden, welches die Sezernierung der rekombinanten Proteine in das Periplasma ermöglicht. Dieses System wurde gewählt, da es bereits mehrfach erfolgreich für die Expression von ETA-basierten Immuntoxinen verwendet wurde. Nach erfolgter Expression von 425(scFv)-ETA' in *E. coli* sollte das Immuntoxin gereinigt und anschließend funktionell *in vitro* charakterisiert werden (Abb. I-7).

Da das Toxin ETA bakteriellen Ursprungs ist und somit potentiell immunogen ist, sollten weiterhin Immuntoxine mit humanen Effektordomänen konstruiert werden. Dabei sollte die Wirkung von drei verschiedenen humanen Enzymen analysiert werden, wobei es sich um die aspartatspezifische Serinprotease Granzym B (Gb) und den RNasen Angiogenin (Ang) und dem eosinophil-kationischem Protein (ECP) handelte. Diese auf humanen Enzymen basierenden EGFR-spezifischen Immuntoxine sollten sowohl in den eukaryotischen Vektor pMS als auch in den prokaryotischen Expressionsvektor pBM1.1 kloniert werden, um das geeignetere Expressionssystem auszuwählen. Die eukaryotische Expression ermöglicht im Gegensatz zur Expression in Bakterien posttranslatorische Modifikationen, die für die korrekte Faltung und Funktionalität der Proteine wichtig sein können. Nach erfolgreicher Klonierung sollten die pMS-Konstrukte in HEK293T Zellen transfiziert werden und die gereinigten rekombinanten Immuntoxine hinsichtlich ihrer Bindungsaktivität und Zytotoxizität analysiert werden. Die verifizierten pBM1.1-Immuntoxinkonstrukte sollten nach der periplasmatischen Expression in *E. coli* ebenfalls gereinigt und *in vitro* charakterisiert werden.

Im Anschluss an erfolgreiche *in vitro* Charakterisierungen sollten schließlich erste Versuche zur Evaluierung der anti-Tumoraktivität der rekombinanten Immuntoxine in einem Mausmodell durchgeführt werden.

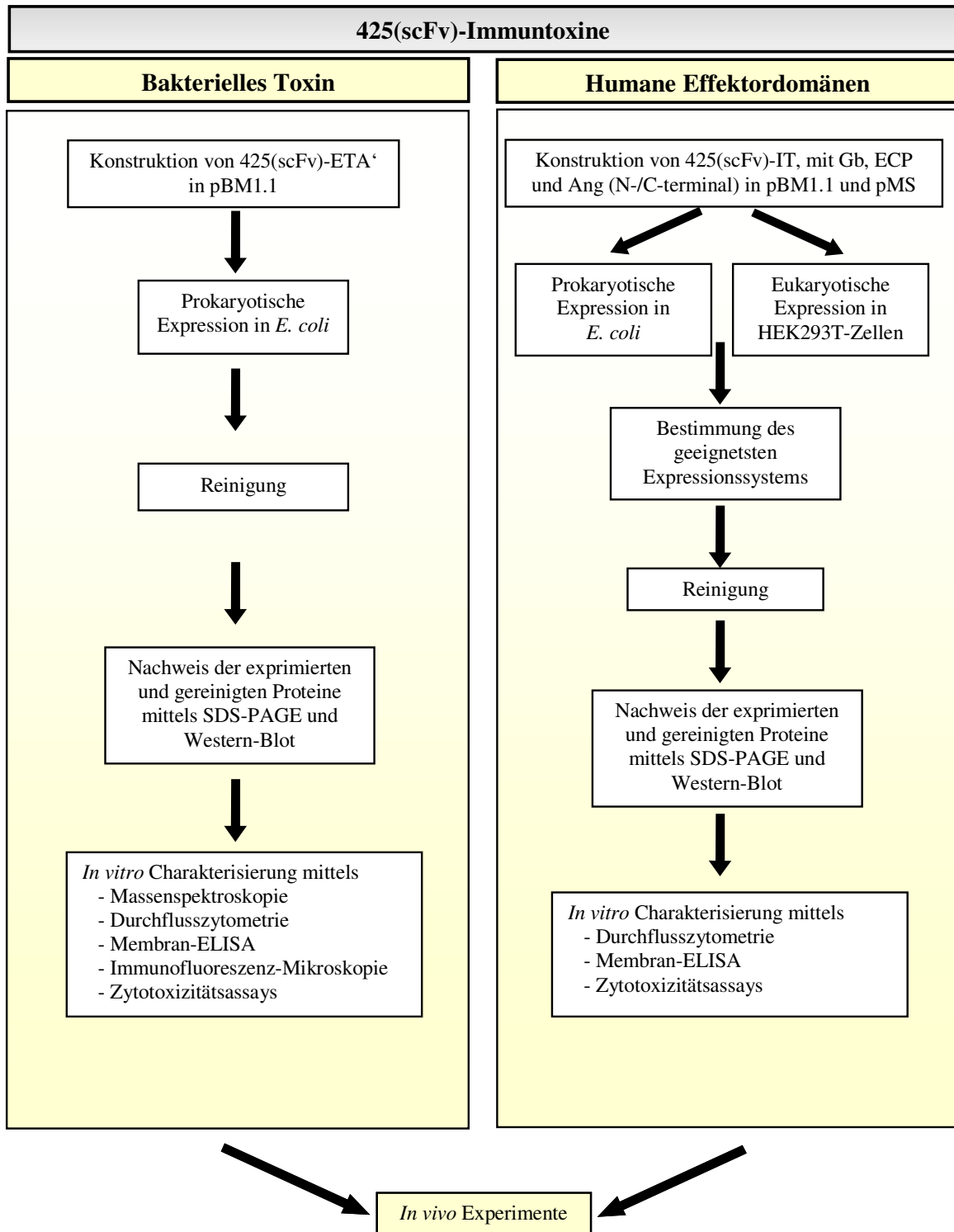


Abb. I-7: Übersichtsschema zur Verdeutlichung des Aufbaus der vorliegenden Arbeit.
IT = Immuntoxin.

II MATERIAL UND METHODEN

II.1 Material

II.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien und Fertiglösungen wiesen wenigstens den Reinheitsgrad *p.a.* auf und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Becton Dickinson Bioscience Clontech (Heidelberg), Biochrom (Berlin), BioRad (München), Cytogen (Obermörlen), ICN (Eschwege), Gibco BRL (Eggstein), Invitrogen (Leek, Niederlande), KMF Laborchemie (St. Augustin), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (NEB) (Schwalbach), Promega (Mannheim), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), VWR (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen).

Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen: Amersham Biosciences (Freiburg), Biozym (Oldendorf), Corning Inc. (Schiphol-Rijk, Niederlande), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Solingen), Hewlett-Packard (München), Kodak (Stuttgart), Millipore (Eschborn), Nunc (Biebrich), Pall Filtron (Northborough, MA, USA), Roth (Karlsruhe), Schott-Glaswerke GmbH (Neufahrn/San Diego), Starlab (Ahrensburg) und Whatman (Maidstone, England).

II.1.2 Enzyme und Reaktionskits

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen NEB, Roche Molecular Biochemicals, MWG-Biotech (Ebersberg) und Invitrogen bezogen und - sofern nicht anders angegeben - nach Herstellerangaben eingesetzt.

Folgende Reaktionskits der Firma Qiagen (Hilden) wurden verwendet:

- QIAquick Gelextraction Kit
- QIAGEN Plasmid Maxi Kit
- QIAprep Spin Miniprep Kit
- QIAquick „PCR-Purification“ Kit

II.1.3 Antikörper und enzymkonjugierte anti-Antikörper

Zum Nachweis der rekombinanten Immuntoxine im Western-Blot (II.3.6), ELISA (II.3.9) und in der Durchflusszytometrie (II.3.10) kamen folgende, z.T. enzymkonjugierte, Antikörper (Ak) zum Einsatz:

Tab. II-1: Übersicht über die verwendeten Antikörper.

Antikörper	Zielepitop	Eigenschaft
Maus-anti-c-myc Ak, [mAk9E10] (EVAN <i>et al.</i> 1985)	C-terminaler c-myc-Tag	Monoklonal
Maus-anti-penta-His Ak, (Qiagen)	N-, bzw. C-terminaler His- Tag	Monoklonal
[Ziege-anti-Maus (ZAM) ^{AP} Ak (α -IgG Fc)] (Sigma)	Fc-Teil der IgG	Polyklonal, AP (alkalische Phosphatase) gekoppelt
[Ziege-anti-Maus (ZAM) ^{HRPO} Ak (α -IgG Fc)] (Sigma)	Fc-Teil der IgG	Polyklonal, HRPO („horse radisch peroxidase“) gekoppelt
Maus-anti-polyHis ^{PO} Ak (Sigma)	N-, bzw. C-terminaler His- Tag	Monoklonal, PO (Peroxidase) gekoppelt
[Ziege-anti-Maus (ZAM) ^{FITC} Ak (α -IgG H+L)] (Caltag, Hamburg)	Leichte und schwere Kette der IgG	Polyklonal, FITC (Fluorescein-Iso-Thiocyanat) gekoppelt
TC-1 (GALLOWAY <i>et al.</i> 1984)	Katalytische Domäne des ETA'	Monoklonal
Maus-anti-penta-His ^{ALEXA} Ak (Qiagen)	N-, bzw. C-terminaler His- Tag	Monoklonal, Alexa Fluor [®] 488 gekoppelt
[Ziege-anti-Maus (ZAM) ^{ALEXA} (α -IgG H+L)] (Molecular Probes, Göttingen)	Leichte und schwere Kette der IgG	Alexa Fluor [®] 488 gekoppelt F(ab) ₂ -Fragment

Zur Konstruktion der rekombinanten Immuntoxine wurde das gegen die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors (EGFR) gerichtete Ak-Fragment 425(scFv) verwendet. Das 425(scFv)-Fragment wurde mit Hilfe molekularbiologischer Methoden aus der mRNA des in Hybridomazellen produzierten monoklonalen Antikörpers (mAk) 425 generiert (HAISMA *et al.* 2000). Die cDNA des 425(scFv)-Fragmentes und der mAk425 wurden freundlicherweise von Prof. Haisma (University Centre for Pharmacy, Groningen, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Neben dem mAk425 diente der ebenfalls gegen den EGFR gerichtete mAk528 (Calbiochem, Bad Nauheim) als Positivkontrolle. Beide Ak binden an die extrazelluläre Domäne des EGFR und kompetieren mit der Bindung der EGFR-Liganden.

II.1.4 Eukaryotische Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien (Tab. II-2) wurden in komplexem RPMI-Medium (II.1.10) bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ kultiviert.

Tab. II-2: Übersicht über die verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Ursprung/Eigenschaft	Referenz
HEK293T ATCC-Nr.:CRL-11268	Humane, embryonale Nierenzellen, adhärent wachsend	(SENA-ESTEVEZ <i>et al.</i> 1999)
L540Cy DSMZ-Nr.:ACC 72	Humanes Hodgkin Lymphom, in Suspension wachsend, EGFR -	(KAPP <i>et al.</i> 1992)
HL60 DSMZ-Nr.:ACC 3	Humane akute myelomische Leukämie, in Suspension wachsend, EGFR -	(COLLINS 1987)
II A1.6	Murine B-Lymphoblasten, adhärent wachsend, EGFR -	(JONES <i>et al.</i> 1986)
L3.6pl	Humane, metastasierende Pankreaskarzinomzellen, adhärent wachsend, EGFR +	(BRUNS <i>et al.</i> 1999)
FG	Humane Pankreaskarzinomzellen, adhärent wachsend, EGFR +	(BRUNS <i>et al.</i> 1999)
LS174T ATCC-Nr.: CRL-188	Humane Kolonkarzinomzellen, adhärent wachsend, EGFR +	(TOM <i>et al.</i> 1976)
TM3 ATCC-Nr.: CRL-1714	Murine, epitheliale Hodenzellen, adhärent wachsend, EGFR +	(MATHER 1980)

Zur Expression von rekombinanten Immuntoxinen wurde die Zelllinie HEK293T verwendet. Die Bindungsaktivität der 425(scFv)-Immuntoxine an den EGFR wurde mit Hilfe der Pankreaskarzinomzelllinien L3.6pl und FG sowie der EGFR-positiven Zelllinie LS174T verifiziert. Als Negativzelllinien dienten L540, II.A.1 und HL60 Zellen. Weiterhin wurde die Zelllinie TM3 verwendet, um die Bindung des 425(scFv) an den murinen EGFR zu analysieren.

II.1.5 Bakterienstämme

Als Rezipienten für rekombinante DNA, zur Vermehrung und Isolierung von Plasmiden sowie zur Proteinexpression wurden folgende *E. coli* Bakterienstämme verwendet (Tab. II-3):

Tab. II-3: Übersicht über die verwendeten *E. coli* Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp
DH5 α	<i>supE44 lacU169</i> (Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> (HANAHAN 1983)
BL21 (λ DE3)	F' <i>ompT hsdS_R</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>dcm⁻ gal lon⁻</i> (Novagen, Madison, USA)
XL1-blue	<i>RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r)] (Stratagene, La Jolla, USA)

II.1.6 Versuchstiere

Für die Evaluierung der *in vivo* anti-Tumoraktivität des rekombinanten Immuntoxins 425(scFv)-ETA' wurden männliche BALB/c Nacktmäuse (Charles River Laboratories, Les Oncins, Frankreich) in einem Alter von sechs bis acht Wochen verwendet. Die Tiere wurden unter pathogenfreien Bedingungen in einer Lamina gehalten. Alle Tierversuche wurden von dem Regierungspräsidenten von Bayern unter dem Akt.Z 621-2531.1-24/01 genehmigt.

II.1.7 Plasmid-Vektoren

- **pBM1.1-Ki-4(scFv)-ETA'**

Das Plasmid pBM1.1 (MATTHEY *et al.* 1999) diente der Klonierung und bakteriellen periplasmatischen Expression der rekombinanten Immuntoxine. Es leitet sich von dem bakteriellen Expressionsvektor pET27b (Novagen) ab und wurde freundlicherweise von Dr. Mehmet Tur (Fraunhofer IME, Aachen) zur Verfügung gestellt. Der Vektor enthält eine Deletionsmutante des von *Pseudomonas aeruginosa* stammenden Exotoxin A (ETA) und ermöglicht eine Klonierung von spezifischen Liganden oder Ak-Fragmenten an das 5' Ende der Translokationsdomäne von ETA'. Vor dem N-terminalen His10-Tag befindet sich die Erkennungssequenz einer Protease (Enterokinase), womit die Entfernung dieses His10-Tags ermöglicht wird. Das pelB-Signalpeptid gewährleistet die Sekretion des mit ihm fusionierten Immuntoxins in den periplasmatischen Raum (Abb. II-1).

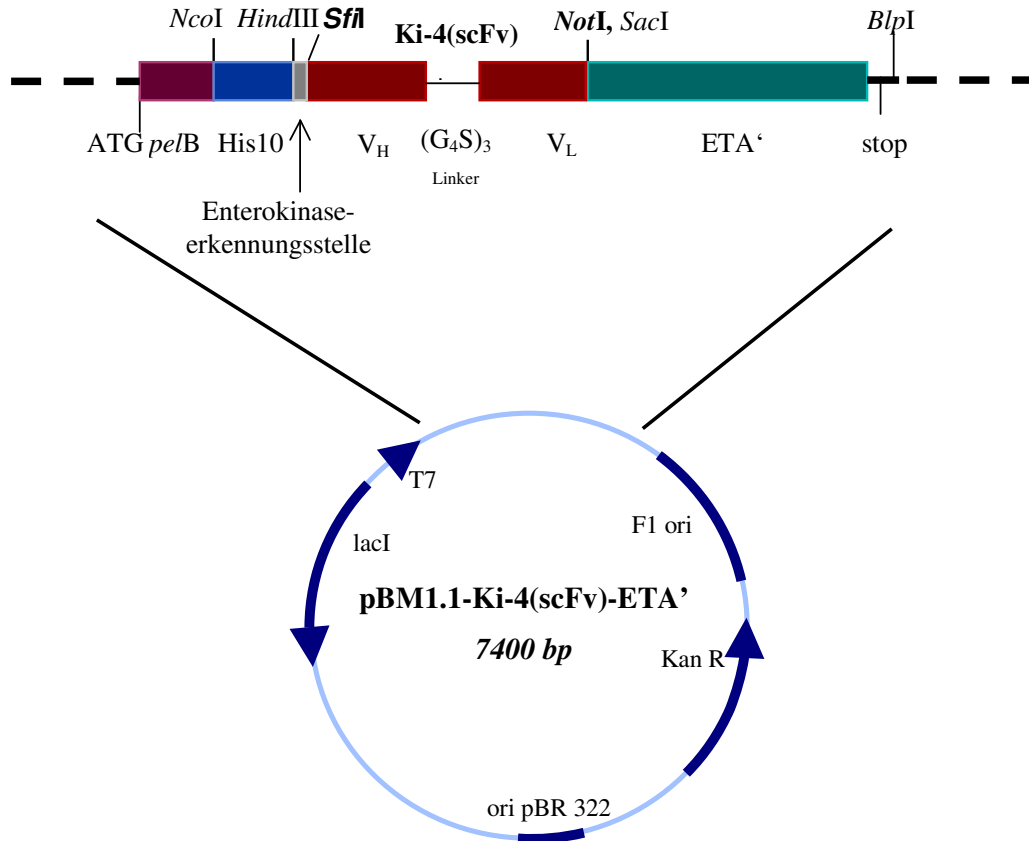


Abb. II-1: Karte des bakteriellen Plasmids pBM1.1-Ki-4(scFv)-ETA'.

ETA' = Deletionsmutante des *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxins; F1 ori = „origin of replication“ für die Produktion einzelsträngiger DNA durch den Phagen M13; His10 = Polyhistidinsequenz zur Detektion und Reinigung des rekombinanten Proteins; Kan R = Kanamycinresistenzgen; Ki-4 = anti-CD30 scFv; lacI = Lac-Repressor; ori pBR 322 = „origin of replication“; *pelB* = Signalsequenz für den Transport ins Periplasma; T7-Promotor = IPTG induzierbar; V_H, V_L = schwere und leichte Kette des Ak-Fragmentes Ki-4(scFv).

- **pBM1.1-M12(scFv)**

Dieses Plasmid wurde zur Klonierung und periplasmatischen Expression des 425(scFv) verwendet. Die „multiple cloning site“ (MCS) enthält das humane Ak-Fragment M12(scFv), welches gegen den Tumormarker MUC-1 gerichtet ist und durch das 425(scFv)-Fragment ersetzt wurde.

- **pMSII-Ki-4(scFv)-hE**

Das Plasmid pMSII (Abb. II-2) basiert auf dem pSecTag2 Vektor (Invitrogen) und wurde von Dr. Michael Stöcker (RWTH-Aachen, Lehrstuhl für Biologie VII) konstruiert (STÖCKER *et al.* 2003). Gegenüber dem pSecTag2 Plasmid enthält es zusätzlich eine interne ribosomale Eintrittsequenz (IRES) in Kombination mit dem Reportergen für das verstärkt fluoreszierende Protein („green fluorescent protein“ (EGFP)). Dieser Vektor wurde zur Klonierung des 425(scFv) an den N-Terminus von verschiedenen humanen Effektordomänen (hE) sowie zur transienten Expression dieser Konstrukte in eukaryotischen Zellen benutzt. Der Cytomegalovirus (CMV)-

Promotor sichert eine konstitutive Expression der rekombinanten Immuntoxine, welche mittels der Igκ-Signalsequenz muriner IgG-Immunglobuline in den Zellkulturüberstand sezerniert werden.

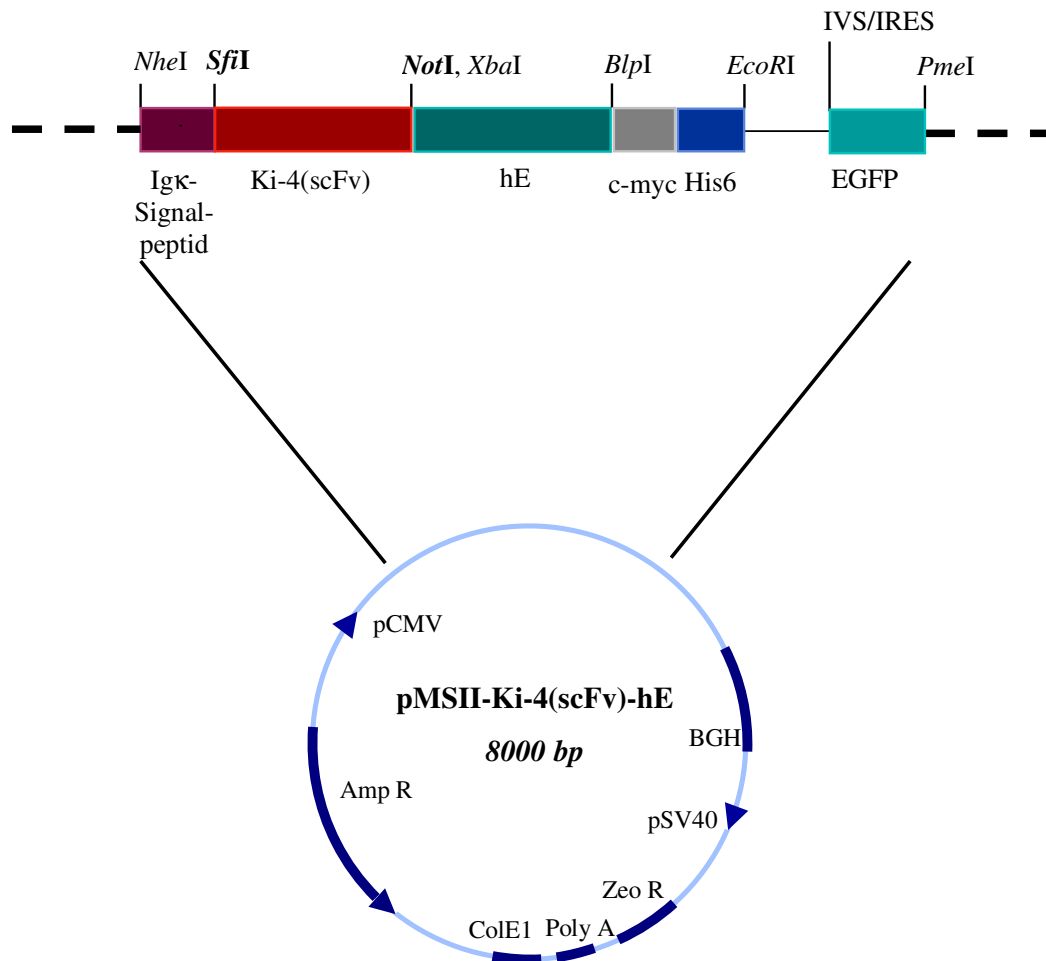


Abb. II-2: Karte des eukaryotischen Plasmids pMSII-Ki-4(scFv)-hE.

Amp R = Ampizillinresistenzgen zur Selektion in *E. coli*; BGH = bovines Wachstumshormon-Polyadenylierungssignal; c-myc = Sequenz zur Detektion des rekombinanten Proteins; ColE1 = „origin of replication“ (ori) für die Replikation in Prokaryoten; EGFP = verstärktes grün-fluoreszierendes-Protein; hE (humane Effektor-domänen) = Granzym B, Angiogenin oder eosinophil-kationisches Protein; His6 = Sequenz zur Detektion und Reinigung des Proteins; Igκ-Signalpeptid = murine Signalsequenz für die Sezernierung der Proteine in den Zellkulturüberstand; IRES = interne ribosomale Eintrittssequenz; IVS = synthetisches Intron zur Stabilisierung der mRNA; pCMV = Cytomegalovirus (CMV)-Promotor (konstitutiv); pSV40 = früher SV40-Promotor, SV40-Replikationsursprung; ZeoR = Zeozin[®]-Resistenzgen zur Selektion transfizierter Zellen.

- **pMSIII-hE -Ki-4(scFv)**

Dieser Vektor (STÖCKER *et al.* 2003) unterscheidet sich gegenüber dem Plasmid pMSII-Ki-4(scFv)-hE nur hinsichtlich der Klonierungskassette (Abb. II-3) und wurde zur Klonierung des 425(scFv) an den C-Terminus von verschiedenen hE sowie zur eukaryotischen Expression benutzt.

- **pMSIII-Ki-4(scFv)**

In dieses Plasmid (STÖCKER *et al.* 2003) wurde über die Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *NotI* das Ak-Fragment Ki-4(scFv) herausgeschnitten und gegen das 425(scFv)-Fragment ersetzt.

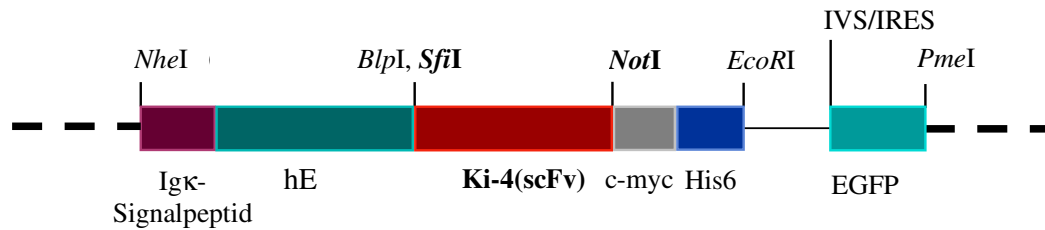


Abb. II-3: Klonierungskassette des eukaryotischen Plasmids pMSIII-hE-Ki-4(scFv).

c-myc = Sequenz zur Detektion des rekombinanten Proteins; EGFP = verstärktes grün-fluoreszierendes-Protein; hE (humane Effektor-domänen) = Granzym B, Angiogenin, oder eosinophil-kationisches Protein; His6 = Sequenz zur Detektion und Reinigung des Proteins; Igκ-Signalpeptid = murine Signalsequenz für die Sezernierung der Proteine in den Zellkulturüberstand; IRES = interne ribosomale Eintrittssequenz; IVS = synthetisches Intron zur Stabilisierung der mRNA.

- **pSecTagCantabFriendly-425**

Dieser Vektor enthielt die cDNA des 425(scFv) und wurde freundlicherweise von Prof. Haisma (University Centre for Pharmacy, Groningen, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Mittels der Restriktionsenzyme *SfiI* und *NotI* wurde das Ak-Fragment in den bakteriellen Expressionsvektor pBM1.1 sowie in die eukaryotischen Expressionsvektoren pMSII und pMSIII kloniert.

II.1.8 Synthetische Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von MWG-Biotech synthetisiert und einer HPSF-Reinigung unterzogen. Zur Lagerung wurde eine 100 pM wässrige Lösung bei -20°C aufbewahrt, aus der die jeweilige Arbeitskonzentration von 10 pM hergestellt wurde. Die Primer kamen in PCR-Reaktionen bzw. zur DNA-Sequenzierung zum Einsatz.

Tab. II-4: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz
pMS-5'	5' – AGC AGA GCT CTC TGG CTA ACT – 3'
pMS-3'	5' – CAT GCC CGC TTT TGA GAG GGA – 3'
pBM-5'	5' – GTC TGC TGC TCC TCG CTG – 3'
pBM-3'	5' – GGA TAT AGT TCC TCC TTT CAG – 3'
dII5'- <i>NotI</i>	5' – GAG ATC AAA GCG GCC GCT GGC GGC AGC CTG GCC
dII3'- <i>XbaI</i>	5' – GAC TAG TCT AGA CTC GTC GTT GCC GGT GCC CTG – 3'
425(scFv)-mitte 5'	5' – GTC GGG ACT ATG ATT ACG ACG – 3'
425(scFv)-mitte 3'	5' – TGG GTG AGC TCG ATG TCA GAT – 3'

II.1.9 Verwendete Puffer und Lösungen

Alle Standard-Lösungen, -Puffer und -Medien wurden nach SAMBROOK *et al.* (SAMBROOK *et al.* 1996), AUSUBEL *et al.* (AUSUBEL *et al.* 1995) oder COLIGAN *et al.* (COLIGAN *et al.* 1995) hergestellt. Spezielle Lösungen oder Puffer sind am Ende der jeweiligen Methode aufgeführt und wurden in doppelt destilliertem Wasser angesetzt. Um den pH-Wert einzustellen, wurden in der Regel 1 M HCl oder 1 M NaOH verwendet. Falls nicht anders vermerkt, wurden alle Lösungen durch Autoklavieren (25 min/121°C/1 bar) sterilisiert. Thermolabile Lösungskomponenten wurden sterilfiltriert (0,2 µm) und nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf 50°C zugesetzt.

10x PBS (pH 7,4)

NaCl	1,37 M
KCl	27 mM
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	81 mM
KH ₂ PO ₄	15 mM

PBST

1x PBS (pH 7,4)	
Tween 20	0,05% (w/v)

10x TBE-Elektrophoresepuffer (pH 8,3)

Tris Base	900 mM
Borsäure	900 mM
EDTA Dinatriumsalz	25 mM

5x SDS-PAA-Laufpuffer

Tris-HCl	125 mM
Glycin	960 mM
SDS	0,5% (w/v)

Blotting-Puffer

Tris-HCl, pH 8,3	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20% (v/v)

II.1.10 Nährmedien

Folgende Medien wurden für die Kultivierung von Bakterien benutzt:

LB (pH 7,0)

NaCl	1,0% (w/v)
Bakto-Trypton	1,0% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)

2xTY (pH 7,4)

NaCl	0,5% (w/v)
Bakto-Trypton	1,6% (w/v)
Hefeextrakt	1,0% (w/v)

TB (pH 7,4)

Bakto-Trypton	1,3% (w/v)
Hefeextrakt	2,7% (w/v)
Glyzerin	0,8% (v/v)

Medienzusätze:

Ampizillin	100 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml
Agar	1,6% (w/v)

Medien für die Zellkultur:

RPMI-Medium 1640 (Life Technologies, Eggenstein), serumfreies Medium

Komplexes RPMI-Medium (RPMI (K))

RPMI-Medium 1640	
Fötales Kälberserum (FCS)	10% (v/v)
Penicillin	50 µg/ml
Streptomycin	50 µg/ml
L-Glutamin	2 mM

Medienzusatz

Zeocin [®] (Invitrogen)	100 µg/ml
----------------------------------	-----------

II.1.11 Geräte, Apparaturen und Zubehör

- PCR-Thermocycler
Primus 96 Plus (MWG-Biotech), „Programmable Thermal Controller“ PTC-200™
(MJ Research Inc, Watertown, USA)
- Elektrotransformationsapparatur
„Gene Pulser“ und „Pulse Controller Unit“ (BioRad)
- Gelelektrophorese-Apparaturen, Kämmen und Stromversorgung (BioRad)
- UV-Transilluminator und Fotodokumentationssystem 299 (Herolab, Wiesloch)
- Automatische Sequenziermaschine: „ABI Prism 3700“ Kapillar-Sequenzierer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, USA)
- ESI QToF2 Massenspektrometer (Waters Micromass, Eschborn)
- Photometer
Zweistrahl-Spektrophotometer Uvikon 930 (Kontron, Neufahrn)
Biophotometer (Eppendorf)
- ElektrobloTTing-Kammer und Zubehör
Mini Protean II Gelkammer (BioRad)
XCell II Blot Module (Invitrogen)
- Proteingel-Apparaturen und Zubehör
Mini Protean III Gelkammer (BioRad)
- ELISA-Reader SpectraMax 340 (Molecular Devices, München)
- Schüttler und Inkubatoren
Innova™ 4430 (New Brunswick Scientific, Nürtingen)
37°C Inkubator (Heraeus Instruments, Hanau)
Brutschrank (Heraeus Instruments)
- Sterilbank
Hera Safe HS12 (Kendro, Hanau)
- FACSCalibur (Becton Dickinson)
- Probe Sonicator für Ultrazellaufschluß
UW2070 (Bandelin electronic, Berlin)
Mikrospitze aus Titan MS72
Mikrospitze aus Titan MS73
- Chromatographiesäulen und Chromatographiemedien
Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences)
Sephacryl 2-100 HR 16/60 (Amersham Biosciences)

Source 15Q, 1,7 ml (Amersham Biosciences)

Ni²⁺-NTA Agarose (Qiagen)

- Zentrifugen

Avanti J-30, Allegra 6KR, MikrofugeR, Optima L-40 Ultrazentrifuge (Beckman, Fullerton, USA)

Biofuge Pico (Heraeus Instruments)

Eppendorf-Tischzentrifuge (Eppendorf)

Picofuge (Stratagene)

Rotilabo-Zentrifuge mit Butterfly-Rotor (Roth)

Zentrifugenbecher aus Polypropylen oder Polyacetat mit Schraubverschlüssen

- Rotoren

#3324 (Heraeus Instruments)

F241.5, 16.250, JA-30.50, GH 3.8 (Beckmann)

A-4-62 (Eppendorf)

- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., Bohemia, USA)

- DM R Fluoreszenz-Mikroskop (Leica)

- „Opera Confocal Fluorescence Microplate Reader“ (Evotec Technologies, Düsseldorf)

- 7 l Fermenter (Applikon), Bio Controller ADI 1030, Bio Bench ADI 1065

II.1.12 Genehmigung der durchgeführten Arbeit

Die durchgeführten Arbeiten der Sicherheitsstufe S2 wurden durch das Landesumweltamt NRW unter der Nummer 64-K-1.20/01 genehmigt.

II.2 Molekularbiologische Methoden

II.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die als PCR („polymerase chain reaction“) bezeichnete enzymatische *in vitro*-Amplifikation (SAIKI *et al.* 1988) stellt eine der wichtigsten Standardmethoden in der Molekularbiologie dar. Neben der Amplifikation von DNA-Fragmenten dient die Methode z.B. der Einführung von Restriktionsenzymstimmstellen oder anderen Modifikationen, z.B. Mutationen in die DNA. Zur Vervielfältigung gewünschter DNA-Fragmente benötigt man neben spezifischen Oligonukleotiden (Primer), welche homolog zu Sequenzen der Matrizen-DNA sind und diese am 5'- und 3'-Ende flankieren, die hitzestabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-DNA-Polymerase). Diese Polymerase ermöglicht die mehrfache Wiederholung der drei Teilschritte der PCR-Reaktion: Denaturierung, Primeranlagerung und Primerverlängerung. In dieser Arbeit wurde

neben der *Taq*-Polymerase die ExpandTMHigh Fidelity DNA Polymerase (Roche Molecular Biochemicals) verwendet, welche eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität aufweist, die eine Korrekturaktivität („proofreading“) erlaubt. Die PCR-Reaktionen wurden im 50 µl Maßstab in 200 µl „PCR-strip“-Reaktionsgefäßen wie folgt angesetzt:

Tab. II-5: Konzentrationen und Volumina der verwendeten PCR-Komponenten.

Komponente	Endkonzentration/Volumen
Matrizen-DNA	10-100 ng
5'-Primer	10 pmol
3'-Primer	10 pmol
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP-Mix	0,4 mM
Betain	250 mM
Expand TM 10x Polymerase Puffer (Roche Molecular Biochemicals) oder 10x PCR-Puffer (Taq-Puffer)	1 x
Expand TM High Fidelity DNA Polymerase (Roche Molecular Biochemicals) oder <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	2 U
bidestilliertes und sterilfiltriertes Wasser	<i>ad</i> 50 µl

Für die Amplifikation der DNA wurde ein Thermocycler verwendet und folgendes Programm durchgeführt:

Tab. II-6: PCR-Reaktionsschema.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1x
Denaturierung	95°C	1 min	} 25-30x
Primeranlagerung	T _p	1 min	
Primerverlängerung	72°C	1 min	
Finale Verlängerung	72°C	7 min	1x

Die Anlagerungstemperatur (T_p) richtet sich hauptsächlich nach den verwendeten Primern und wird bei Primern mit Überhangbereichen folgendermaßen empirisch bestimmt (WU *et al.* 1991):

$$T_p = 22 + 1,46 \times [2 \times (G + C) + A + T]$$

In dieser Formel werden nur die Basenpaare berücksichtigt, die mit der Matrizen-DNA hybridisieren. Werden Primer verwendet, die vollständig komplementär zur Matrizen-DNA waren, so ergab sich die Anlagerungstemperatur durch Subtraktion von 5°C von der vom

Hersteller angegebenen Schmelztemperatur T_m . Nach Abschluss der PCR-Reaktion wurden die amplifizierten Produkte mittels einer präparativen Agarosegelelektrophorese (II.2.3.2) aufgetrennt, wodurch Größe, Reinheit und Ausbeute bestimmt werden konnte. Dann wurde das gewünschte amplifizierte Fragment aus der Gelmatrix isoliert und für nachfolgende Klonierungsschritte eingesetzt.

II.2.2 DNA-Klonierungstechniken

II.2.2.1 Restriktion von DNA

DNA-Restriktionen wurden nach den Vorgaben des Enzymherstellers in den mitgelieferten Puffern unter Berücksichtigung der jeweiligen optimalen Inkubationszeiten und Temperaturen durchgeführt. Um 1 μg DNA zu schneiden wurde in der Regel eine Enzymmenge von 2-4 U eingesetzt. Restriktionen, bei denen zwei verschiedene Enzyme kompatible Reaktionsbedingungen hatten, wurden in einem Ansatz durchgeführt. Im Falle unterschiedlicher Reaktions Temperaturen oder Puffersysteme der beiden Enzyme wurden die Reaktionen nacheinander bei der jeweiligen optimalen Bedingung durchgeführt. Um das Puffersystem zu wechseln, musste die DNA präzipitiert (II.2.2.2) werden.

II.2.2.2 Präzipitation von DNA

DNA-Präzipitationen aus wässrigen Lösungen wurden zur Konzentrierung, Reinigung und Umpufferung von DNA angewendet. Bei Durchführung einer Ethanol fällung wurde die Probe mit 2,5 Volumen 96% Ethanol (v/v) sowie 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt. Die Isopropanol fällung erfolgte dagegen mit 0,7 Volumen Isopropanol. Die Ansätze wurden 30 min bei -20°C (Ethanol fällung) bzw. bei RT (Isopropanol fällung) gelagert. Anschließend wurde die gefällte DNA durch Zentrifugation pelletiert (13.000 g/25 min/ 4°C), mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 g/5 min/ 4°C). Die DNA wurde 10 min bei RT getrocknet und dann in sterilem, entionisiertem Wasser aufgenommen.

II.2.2.3 Dephosphorylierung restringierter Vektoren

Zur Vermeidung von Autoligation der restringierten Vektor-DNA (II.2.2.1) wurden die 5'-terminalen Phosphatgruppen mit dem Enzym „shrimps alkalische phosphatase“ (SAP) der Firma Roche Molecular Biochemicals nach Herstellerangaben entfernt. Durch eine 15-minütige Inkubation bei 65°C lässt sich die SAP vollständig inaktivieren und die dephosphorylierte Vektor-DNA kann direkt in die Ligation (II.2.2.4) eingesetzt werden.

II.2.2.4 Ligation restringierter DNA

Die Verknüpfung zweier restringierter DNA-Fragmente erfolgte mit 80 U T4-DNA-Ligase (NEB) in dem vom Hersteller angegebenen Puffersystem und einem Gesamtvolumen von 10-20 µl. Ligationsansätze, bei denen DNA-Fragmente mit überhängenden komplementären Enden („sticky ends“) verbunden wurden, enthielten das Insert in dreifach molarem Überschuss zur Vektormenge und wurden in der Regel 2-4 h bei 22°C oder ∞ N bei 16°C inkubiert (SAMBROOK *et al.* 1996).

II.2.3 Agarosegelelektrophorese von DNA

II.2.3.1 Analytische Agarosegelelektrophorese von DNA

Analytische Agarosegelelektrophoresen wurden zur Separierung von DNA-Fragmenten nach Restriktionen (II.2.2.1) und PCR-Reaktionen (II.2.1) durchgeführt, wobei sowohl Fragment- und Vektorgrößen als auch Konzentrationen von DNA-Lösungen ermittelt wurden. Die Auftrennung der DNA erfolgte in 0,8-2%igen (w/v) Agarosegelen bei einer Feldstärke von ca. 5 V/cm². Die Elektrophorese wurde nach SAMBROOK *et al.* in 1x TBE-Puffer unter Zusatz von 0,1 µg/ml Ethidiumbromid durchgeführt (SAMBROOK *et al.* 1996). Nach Beendigung der Pherographie wurden die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 302 nm visualisiert. Die Dokumentation der Banden erfolgte mit einem Videodokumentationssystem der Firma Herolab unter Verwendung der Software „Easy Quant“. Als Größen- und Konzentrationsstandard diente PstI-geschnittene Lambda-DNA sowie eine „2 Log“ Leiter (NEB).

II.2.3.2 Präparative Agarosegelelektrophorese und Isolierung von DNA

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Fragmentgemisch, das nach Restriktionen (II.2.2.1) oder PCR-Amplifikationen (II.2.1) entsteht, wurde eine präparative Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte dabei unter den in II.2.3.1 beschriebenen Bedingungen. Nach der Separation der DNA-Fragmente wurden die gewünschten Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, wobei zur Visualisierung der DNA-Banden ein UV-Transilluminator verwendet wurde. Die Isolierung der DNA aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gelextraktionskits (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben. Zur Konzentrationsbestimmung wurden die gereinigten DNA-Fragmente einer analytischen Agarosegelelektrophorese (II.2.3.1) unterzogen.

II.2.3.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Um die Konzentration von DNA-Lösungen zu bestimmen wurden entweder analytische Agarosegelelektrophoresen (II.2.3.1) oder photometrische Messungen durchgeführt.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration in Ethidiumbromid-haltigen Agarosegelen erfolgte nach Gelelektrophorese durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität der Probenbande mit den Banden der Marker-DNA (PstI-geschnittene λ -DNA) bekannter Konzentration. Die Fluoreszenzintensität wurde bei einer Wellenlänge von 302 nm gemessen.

Zur DNA-Konzentrationsbestimmung durch photometrische Messung wurde das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt, wodurch zusätzlich der Reinheitsgrad der DNA ermittelt werden konnte.

II.2.4 Anzucht von E. coli und Herstellung von Stammkulturen

E. coli Kulturen wurden in LB-Flüssigmedium üN bei 37°C auf dem Schüttelinkubator (225 UpM) angezogen. Die Selektion rekombinanter mit pBM1.1-Vektor-DNA transformierter Bakterienklone erfolgte durch Supplementation der Medien und Agarplatten mit Kanamycin (25 µg/ml). Zur Kultivierung von pMS-DNA enthaltenden *E. coli* Kulturen wurde Ampizillin (100 µg/ml) zugesetzt.

Für eine kurzzeitige Lagerung ampizillinresistenter (Amp R), bzw. kanamycinresistenter (Kan R) Bakterienklone wurden LB-Amp-, bzw. LB-Kan-Agarplatten verwendet und bei 4°C gelagert. Ebenso dienten LB-Amp- und LB-Kan-Agarplatten der Selektion antibiotikaresistenter Bakterien nach einer erfolgten Transformation (II.2.5), wobei die Platten üN bei 37°C inkubiert wurden. *E. coli* Stammkulturen wurden hergestellt, indem 700 µl einer üN-Kultur mit 700 µl sterilem 40% (w/v) Glycerin versetzt wurden. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

II.2.5 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

II.2.5.1 Herstellung hitzeschockkompetenter E. coli

Zur Herstellung RbCl-kompetenter *E. coli* wurden 200 ml LB-Medium mit einer üN-Vorkultur angeimpft und bei 37°C auf einem Flachbettschüttler inkubiert (225 UpM). Nachdem die Kultur eine $OD_{600nm} = 0,6$ erreicht hatte, wurde diese 10 min auf Eis gelagert und durch Zentrifugation pelletiert (2.000 g/15 min/4°C). Das Pellet wurde sofort in 60 ml eiskaltem TFB-I-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis gestellt und erneut zentrifugiert (2.000 g/ 15 min/4°C). Die sedimentierten Bakterienzellen wurden vorsichtig in 8 ml eiskaltem TFB-II-Puffer aufgenommen. Zuletzt wurden die kompetenten Zellen zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

- TFB-I-Puffer (pH 5,8)

RbCl	100 mM
MnCl ₂	50 mM
Kaliumacetat	30 mM

CaCl ₂	10 mM
Glyzerin	15% (v/v)
• TFB-II-Puffer (pH 6,8)	
RbCl	110 mM
MOPS	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glyzerin	15% (v/v)

II.2.5.2 Hitzeschocktransformation von *E. coli*

Zur Hitzeschocktransformation wurden die RbCl-kompetenten *E. coli* (II.2.5.1) auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA gemischt und 30 min auf Eis gestellt. Es wurden ca. 10 ng Plasmid-DNA (II.2.6.1) oder 10-20 µl eines Ligationsansatzes (II.2.2.4) eingesetzt. Danach erfolgte der Hitzeschock für 90 sec in einem 42°C warmen Wasserbad. Nach Lagerung der Zellen für weitere 2 min auf Eis wurden dem Reaktionsansatz 800 µl 2xTY-Flüssigmedium zugegeben. Zur Regeneration der Bakterienzellen und Ausbildung der Ampizillin- bzw. Kanamycinresistenz wurden diese 40 min bei 37°C unter Schütteln (225 UpM) inkubiert. Anschließend wurden zur Selektion rekombinanter Klone verschiedene Volumina auf LB-Amp- bzw. LB-Kan-Agarplatten ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert. Die Identifizierung rekombinanter Bakterienklone erfolgte durch Plasmid-Minipräparation (II.2.6.1), Kontrollrestriktion der Plasmid-DNA (II.2.2.1) sowie anschließender Agarosegelelektrophorese (II.2.3.1).

II.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

II.2.6.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die „TELT“-Minipräparation (HE *et al.* 1995) von Plasmid-DNA wurde zur schnellen Analyse einer größeren Anzahl von rekombinanten Bakterienklone durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde einer Kontrollrestriktion (II.2.2.1) unterzogen und die restringierten Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese (II.2.3) separiert. Wurde sehr reine DNA für Klonierungsschritte oder Sequenzierungen benötigt, erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben.

II.2.6.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNA wurde eine Maxipräparation mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit entsprechend den Anleitungen des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde nach Restriktion (II.2.2.1) mittels analytischer Agarosegelelektrophorese bestimmt (II.2.3.1).

II.2.7 Sequenzierung von DNA

Nach der Klonierung von PCR-Fragmenten und DNA-Fragmenten wurden die amplifizierten und neu integrierten Bereiche durch Sequenzierung überprüft. Ebenso wurden finale Plasmidkonstrukte vor der Transformation in den Bakterienexpressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) (II.1.5) oder vor Transfektion in die eukaryotischen HEK293T Zellen (II.1.4) verifiziert.

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (SANGER *et al.* 1977) durchgeführt. Sie beruht auf der zufälligen Inkorporation von 2',3'-didesoxy-Nukleosidtriphosphaten anstelle von 2'-desoxy-Nukleosidtriphosphaten und dem durch die fehlende 3'-OH Gruppe verursachten statistischen Kettenabbruch.

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe eines Plasmidisolationskits der Firma Qiagen isoliert (II.2.6). Nach der Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der DNA (II.2.3.3, II.2.3.1) wurden 150 ng/kB Plasmid-DNA für die Sequenzierung eingesetzt. Sequenzierreaktionen wurden mit dem Thermosequenase-Kit der Firma USB/Amersham durchgeführt, das für die Kettenverlängerung eine modifizierte Taq-DNA-Polymerase zur unidirektionalen Amplifikation unter gleichzeitiger Didesoxyterminierung benutzt. Alle Sequenzierungen wurden mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden („Big Dye™cycle sequencing Kit“) durchgeführt und anschließend in einem „ABI Prism 3700“ Sequenzierer analysiert. Die Auftrennung der Sequenzierungsprodukte erfolgte durch Kapillarelektrophorese und deren laservermittelte Detektion nach Messung der Fluoreszenz mittels einer CCD-Kamera („charge-couple-device“). Zur Auswertung der Nukleotidsequenzen wurde das Sequenzanalyseprogramm DNASTar benutzt.

II.3 Proteinchemische und immunologische Methoden

II.3.1 Expression rekombinanter Proteine in eukaryotischen HEK293T Zellen

II.3.1.1 Transfektion von HEK293T Zellen

Die Transfektion von eukaryotischen Zellen wurde mit dem Transfektionsreagenz TransFast® (Promega), einem synthetischen kationischen Lipid, nach den Herstellerangaben durchgeführt. Als Produktionszelllinie wurde die humane Nierenzelllinie HEK293T verwendet (II.1.4), welche mit dem Large-T-Antigen des SV40 Virus transfiziert ist. Sie verfügt somit über die Fähigkeit, die eingebrachten pMS-Plasmide über den frühen SV40-ori episomal zu replizieren, wobei die daraus resultierende hohe Plasmidkopienzahl in den transfizierten Zellen zu einer verstärkten transienten Expression des rekombinanten Proteins führt. Am ersten Tag wurden 1×10^5 Zellen in 1 ml RPMI (K)-Medium in einer 12-Napf-Zellkulturplatte ausgesät und bei 37°C im Brutschrank

ün kultiviert. Am nächsten Morgen wurde 1 µg gereinigte Plasmid-DNA (II.2.6.1) mit 300 µl RPMI-Medium und 3 µl TransFast[®] Reagenz gemischt. Nach 15 min Inkubationszeit bei RT wurde das Kulturmedium von den zu transfizierenden Zellen abgenommen und die 300 µl Transfektionsansatz hinzugegeben. Die Zellen wurden bei 37°C für 1 h im Brutschrank inkubiert und anschließend 1 ml RPMI (K)-Medium zugegeben. Nach 2 bis 3 Tagen erfolgte die Kontrolle der Transfektionseffizienz am Fluoreszenzmikroskop. Der Kulturüberstand der transfizierten HEK293T Zellen wurde zur weiteren Proteinreinigung (II.3.1.3) verwendet und die Proteine mittels SDS-PAGE (II.3.4), Western-Blot (II.3.6), Durchflusszytometrie (II.3.10) und Zytotoxizitätsassay (II.3.11) analysiert. Die transfizierten Zellen wurden zur Expansion in Zellkulturflaschen (75 cm²) umgesetzt und unter Selektionsdruck (100 µg/ml Zeocin[®] (Invitrogen)) kultiviert (II.3.1.2).

II.3.1.2 Anreicherung transfizierter Zellen und Proteinexpression

Der zur Transfektion eingesetzte Vektor verleiht den Zellen zwei Eigenschaften, die zur Selektion und Anreicherung der transfizierten Zellen genutzt wurden. Einerseits enthält das verwendete pMS-Plasmid ein Resistenzgen gegenüber Zeocin[®], weiterhin verfügt der Vektor über eine bicistronische mRNA, welche die parallele Expression des zu sezernierenden rekombinanten Proteins mit dem Reportergen EGFP ermöglicht. Somit können die transfizierten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich der Transfektionseffizienz kontrolliert werden. Da in dieser Arbeit ausschließlich adhärente Zellen transfiziert wurden, konnten sehr einfach grün-fluoreszierende Zellen selektioniert werden. Zur Anreicherung von proteinproduzierenden Zellen wurden die frisch transfizierten HEK293T Zellen unter Selektionsdruck (Zeocin[®]-haltiges Medium) 1 bis 2 Wochen in Zellkulturflaschen kultiviert. Dabei starben die nicht-transfizierten Zellen aufgrund der nicht vorhandenen Zeocin[®]-Resistenz ab und konnten durch einen Mediumwechsel eliminiert werden. Unter den zurückbleibenden lebenden Zellen wurden dann die grün-fluoreszierenden Zellen in eine Zellkulturflasche umgesetzt und weiter kultiviert, wobei die Fluoreszenz regelmäßig kontrolliert wurde. Sobald der Zellkulturflaschenboden zu 90% konfluent war, wurde der Überstand abgenommen, für die Reinigung (II.3.1.3) verwendet und das gereinigte Protein mittels Western-Blot, SDS-PAGE, Durchflusszytometrie und Zytotoxizitätsassays analysiert (II.3.4, II.3.7, II.3.10, II.3.11). Anhand der Ergebnisse der Proteinanalysen zeigte sich, dass diese Methode für die Produktion rekombinanter Proteine im Bereich von 0,5 bis 1 mg ausreichte und eine Vereinzelnung transfizierter Zellen bzw. die Etablierung stabiler Klone umgangen werden konnte.

II.3.1.3 Proteinreinigung eukaryotisch exprimierter Proteine durch immobilisierte-Metall-Affinitäts-Chromatographie

Durch die terminale Integration von Oligo-Histidin-Resten an ein Protein kann dieses durch Affinitätschromatographie auf entsprechenden Säulen bzw. im ansatzweisen („batch“-)Verfahren gereinigt werden. Das Prinzip beruht auf der Chelatbildung von Histidin-Resten (His-Tags) im Protein mit divalenten Kationen wie z.B. Ni^{2+} -, Cu^{2+} -, und Zn^{2+} -Ionen (SULKOWSKI 1985; CROWE *et al.* 1994). Diese können z.B. immobilisiert als Ni^{2+} -NTA (N-Nitrilo-tri-Essigsäure)-Agarose-Säulen oder Ni^{2+} -IDA (Imino-di-Essigsäure)-Agarose-Säulen für die Chromatographie verwendet werden. Die Hauptvorteile der immobilisierten-Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) liegen in erster Linie in den milden Elutionsbedingungen. Meistens wird für die Elution der an die Matrix gebundenen Proteine das Histidinanalog Imidazol verwendet, welches die rekombinanten Proteine durch Konkurrenz verdrängt. Die IMAC-Reinigung der eukaryotisch exprimierten Proteine wurde mit Ni^{2+} -NTA-Agarose (Qiagen) durchgeführt und erfolgte im Gegensatz zur Reinigung von prokaryotisch exprimierten Proteinen (II.3.3.1) im „batch“-Verfahren und nicht im Säulen-Verfahren. Die Protokolle zur Proteinpräparation basierten auf den Qiagenprotokollen (The Expressionist 07/97) zur nativen Reinigung von Proteinen mit einem His-Tag.

II.3.1.3.1 Proteinreinigung (50 ml-500 ml Überstand)

Zunächst wurden 50 ml Zellkulturüberstand in einem 50 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert (3.000 g/5 min/RT) und 37,5 ml des Überstandes in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 12,5 ml 4fach-Inkubationspuffer und 100 μl mit 1fach-Inkubationspuffer gewaschener Ni^{2+} -NTA-Agarose erfolgte eine Inkubation für 1 h bei RT in einem Über-Kopf-Schüttler. Dann wurde die Matrix abzentrifugiert (3.000 g/5 min/RT), mit 1 ml 1fach-Inkubationspuffer versetzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 2x waschen mit jeweils 1 ml 1fach-Inkubationspuffer (3.000 g/2 min/RT) erfolgte die Elution mit 400 μl Elutionspuffer für 30 min. Zuletzt wurde die Matrix sedimentiert (3.000 g/2 min/RT) und der proteinhaltige Überstand abgenommen.

- 4fach-Inkubationspuffer (pH 8,0)

NaH_2PO_4	200 mM
NaCl	1,2 M
Imidazol	40 mM

- Elutionspuffer (pH 8,0)

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM

II.3.2 Expression von rekombinanten Proteinen in E. coli

II.3.2.1 Periplasmatische Proteinexpression unter Standardbedingungen (Schüttelkultur)

Zur periplasmatischen Expression des murinen 425(scFv)-Fragmentes wurde der Vektor pBM1.1 (II.1.7) verwendet, der das zur Sekretion des Proteins ins Periplasma benötigte *pelB*-Signalpeptid enthält. Es wurde eine Expression im 100 ml Maßstab in Anlehnung an ein bereits für scFv-Expressionen optimiertes Protokoll durchgeführt (BRUELL 2001). Dazu wurden 5 ml Glukosehaltiges (2% (w/v)) LB-Kan-Medium (LBG-Kan) mit einer frisch transformierten Bakterienkolonie inokuliert und üN bei 37°C unter Schütteln (225 UpM) inkubiert. Eine Hauptkultur (100 ml LBG-Kan-Flüssigmedium) wurde 1:100 mit der Vorkultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (225 UpM) bis zu einer OD_{600nm} = 0,6 kultiviert. Nach der Sedimentation der Bakterien (5.000 g/15 min/4°C) wurde das Bakterienpellet im gleichen Volumen LB-Kan-Flüssigmedium resuspendiert und bei 37°C für 30 min unter Schütteln (225 UpM) inkubiert. Durch Zugabe von 1 mM IPTG erfolgte die Induktion der Immuntoxinexpression für 6 h bei 30°C. Nach der Sedimentation der Bakterienzellen (5.000 g/10 min/4°C) wurden die Bakterienzellen durch Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurde das Bakterienpellet in eisgekühltem 1x PBS, dem Complete™ (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) zugesetzt wurde, resuspendiert und anschließend auf Eis 3x 1 min mit Ultraschallimpulsen (120 W/duty cycle: 9 sec) behandelt. Das Bakterienlysats wurde dann mit 1% (v/v) Triton-X-100 versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Proteine, „inclusion bodies“ und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (12.000 g/30 min/4°C) entfernt. Der Zentrifugationsüberstand des Bakterienlysats (periplasmatische Fraktion) sowie der sterilfiltrierte Kulturüberstand wurden für weitere Analysen verwendet.

II.3.2.2 Periplasmatische Proteinexpression unter osmotischem Stress (Schüttelkultur)

Bei der Proteinexpression unter Stress handelt es sich um ein Expressionssystem, bei dem die Bakterien unter osmotischem Stress (4% (w/v) NaCl, 0,5 M Sorbitol) in Anwesenheit von kompatiblen Soluten wie Glycinbetain oder Hydroxyektoin angezogen werden. Durch den osmotischen Stress wird unter anderem die Bildung von Hitzeschockproteinen und Chaperonen in den Bakterien induziert, welche eine große Rolle bei der korrekten Faltung von *E. coli* Proteinen

spielen, sowie deren Löslichkeit und Stabilität erhöhen. Diese Effekte können sich ebenfalls positiv auf das rekombinante Protein im periplasmatischen Raum auswirken und deren Eigenschaften bezüglich Faltung, Stabilität und Funktionalität verbessern (BARTH *et al.* 2000). Neben Chaperonen wird durch den Stress die Expression zahlreicher weiterer Proteine induziert, die das Wachstum unter den gegebenen Bedingungen sichern sollen. Die indirekten Effekte dieser Proteine können ebenfalls positiv auf die periplasmatisch sekretierten Proteine wirken, sind aber im einzelnen noch nicht vollständig geklärt. Eine wichtige Bedeutung haben weiterhin die zugesetzten kompatiblen Solute. Es handelt sich dabei um niedermolekulare organische Verbindungen, die einen positiven Effekt auf die Struktur und Funktionalität von Proteinen haben (GALINSKI 1995). Sie werden von den Bakterien über in der Zellmembran befindliche Transportsysteme in die Zelle aufgenommen, um den osmotischen Gradienten auszugleichen und somit das Überleben der Bakterienzellen zu gewährleisten. In der Zelle interagieren die kompatiblen Solute vermutlich unter anderem auch mit dem exprimierten Protein und verbessern dessen Stabilität und Faltung. Diese Interaktionen sind jedoch bis dato noch unerforscht.

Rekombinante Bakterien des Stammes *E. coli* BL21 (DE3) wurden in einer üN-Kultur bei 26°C in TB-Kan-Medium, das mit 0,5 mM ZnCl₂, 2% (w/v) Glukose und 10:1 Kaliumphosphatpuffer supplementiert war, unter Schütteln (225 UpM) angezogen. Hierbei diente der Kaliumphosphatpuffer dem Einstellen des pH-Wertes im Medium. Das ZnCl₂ wurde zur Reduktion der periplasmatischen Proteolyse eingesetzt und die Glukose diente als Repressor für den T7-Promotor. Am nächsten Tag wurde für die Hauptkultur das oben beschriebene Medium verwendet, diese 1:100 mit der Vorkultur inokuliert und ca. 20 h bei 26°C bis zu einer OD_{600nm} = 12-18 unter Schütteln (225 UpM) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5.000 g/15 min/4°C) sedimentiert und das Bakterienpellet in TB-Kan-Medium, versetzt mit 10:1 Kaliumphosphatpuffer und 0,5 mM ZnCl₂, resuspendiert. Dabei wurde die Kultur 1:2 verdünnt, so dass eine OD_{600nm} = 5-10 erreicht wurde. Nach einer Regeneration von 45 min bei 26°C wurden der Kultur 0,5 M Sorbitol, 4% (w/v) NaCl und 10 mM Glycinbetain zugegeben. Nach weiteren 30 min wurde die Expression mit 2 mM IPTG induziert und für 6 h bei gleichbleibenden Inkubationsbedingungen fortgesetzt. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation separiert (30.000 g/10 min/4°C) und das Bakterienpellet bei -20°C gelagert. Für den Zellaufschluss wurde das Pellet mit Aufschlusspuffer (2 ml/g Zellpellet) resuspendiert und anschließend 4x 1 min mit Ultraschallimpulsen (200 W/duty-cycle: 9 sec) behandelt. Die periplasmatische Fraktion wurde durch Zentrifugation (30.000 g/30 min/4°C) geklärt und vor der Ni²⁺-NTA-Reinigung mittels PD10-Entsalzungssäulen (Amersham Biosciences) in EP-Puffer umgepuffert (II.3.8). Dies ist nötig, da das im Aufschlusspuffer befindliche EDTA die Ni²⁺-Ionen der Ni²⁺-NTA-Matrix komplexiert und somit die Matrix entladen würde.

- Kaliumphosphatpuffer

KH_2PO_4	170 mM
K_2HPO_4	720 mM
- Aufschlusspuffer (pH 8,0)

NaCl	300 mM
EDTA	10 mM
Glyzerin	10% (v/v)
Complete™(Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche)	1 mM
DTT	5 mM
- EP-Puffer (pH 8,0)

NaCl	1 M
Imidazol	10 mM
in 1 x PBS	

II.3.2.3 Fermentation von 425(scFv)-ETA' in E. coli

Die Fermentationen von 425(scFv)-ETA' wurden in einem Rührreaktor mit drei sechsblättrigen Rushton Turbinenrührern und einem Arbeitsvolumen von 5 l durchgeführt. Der Fermenter verfügte über Einrichtungen zur Echtzeiterfassung von pH-Wert, Gelöstsauerstoffkonzentration, Temperatur und Füllhöhe. Diese Parameter konnten über automatische Kontrollkreise durch Heizen/Kühlen, Säure/Base-Zugabe, Zugabe von reinem Sauerstoff in die Begasungsanlage und Antischaumzugabe konstant gehalten werden. Der aus Edelstahl gefertigte Rührreaktor wurde zusammen mit 4 l Medium für 30 min bei 121°C *in situ* sterilisiert.

425(scFv)-ETA' wurde in einem ansatzweisen Verfahren produziert, wobei zwei simultane Fermentationen zur Evaluierung von zwei verschiedenen Kulturmedien durchgeführt wurden. Zum einen wurde ein synthetisches Minimalmedium verwendet und zum anderen ein auf Pepton/Hefeextrakt basierendes komplexes Medium (TB-Medium). Die gesamte Fermentation wurde bei 26°C, einer Rührergeschwindigkeit von 500 UpM und einer konstanten Belüftungsrate von $1 \text{ l l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ durchgeführt. Zur Regulation des pH-Wertes auf 6,8 wurde 25% (w/v) Ammoniumhydroxidlösung verwendet. Der Fermenter wurde mit einer *E. coli* BL21 (DE3) Vorkultur, transformiert mit pBM1.1-425(scFv)-ETA', inokuliert und die Bakterien wurden unter Verwendung von Glukose als Kohlenstoffquelle kultiviert. Nachdem die Glukose verbraucht war und die $\text{OD}_{600\text{nm}}$ zwischen 5 und 10 lag wurden die Bakterien osmotischem Stress ausgesetzt, indem 4% (w/v) NaCl und 0,5 M Sorbitol langsam zugegeben wurden. Weiterhin erfolgte die Zugabe von 40 mM Betain als kompatibles Solut und 0,5 mM ZnCl_2 . Nach 30 min wurde die Expression von 425(scFv)-ETA' durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert und nach weiteren

30 min erfolgte die Zufütterung von Glycerin. Die Induktionsphase wurde für 24 h aufrechterhalten, bevor die Zellen geerntet wurden.

- Minimalmedium

KH ₂ PO ₄	8,3 g/l
NH ₄ (H ₂ PO ₄)	2 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,035 g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,07 g/l
Glukose	10 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75 g/l
Zitronensäure	1,05 g/l
L-Arginin-HCl	0,1 g/l
PTM ₁ -Basalsalze	0,5 ml/l
Kanamycin	25 mg/l
Methionin	0,1 g/l

II.3.2.4 Fermentation von 425(scFv) in E. coli

425(scFv) wurde wie 425(scFv)-ETA' in einem ansatzweisen Verfahren produziert, wobei der in II.3.2.3 beschriebene Rührreaktor benutzt wurde. Als Kulturmedium wurde das in II.3.2.3 aufgeführte synthetische Minimalmedium (2x konzentriert) verwendet. Die gesamte Hochzelllichtfermentation wurde bei 37°C, einer Rührergeschwindigkeit von 1000 UpM und einer konstanten Belüftungsrate von 2 l l⁻¹ min⁻¹ durchgeführt. Nach der Inokulation des Fermenters mit einer *E. coli* (DE3) Vorkultur, transformiert mit pBM1.1-425(scFv), wurden die Bakterien bis zu einer OD_{600nm} = 60-70 kultiviert. Glukose diente dabei als Kohlenstoffquelle. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von 75 µM IPTG induziert und für 24 h aufrechterhalten.

II.3.3 Reinigung von prokaryotisch exprimierten Proteinen

II.3.3.1 Immobilisierte-Metall-Affinitäts-Chromatographie

Zur Reinigung von prokaryotisch exprimierten Proteinen wurde als erster Reinigungsschritt eine IMAC im Säulenverfahren durchgeführt. Wie bereits in II.3.1.3 beschrieben, nutzt diese Methode die Affinität von Histidin-Clustern (His-Tags) in Proteinen zu Ni²⁺-Ionen, welche beispielsweise an NTA-Agarose immobilisiert vorliegen.

Für die IMAC-Reinigung von 425(scFv)-ETA' aus der periplasmatischen Bakterienfraktion wurden stets in EP-Puffer umgepufferte Fraktionen verwendet (II.3.2.2). Je nach Volumen der

Expressionskultur bzw. Menge des aufzureinigenden Proteins wurde eine Säule mit 800 µl-3 ml Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen) befüllt und mit 10 Säulenvolumina EP-Puffer äquilibriert. Dann wurde die periplasmatische Fraktion auf die Säule aufgegeben und anschließend mit jeweils 10 Säulenvolumen EP-Puffer und Waschpuffer I gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Ni²⁺-NTA gebundene His-10 markierte Proteinmoleküle wurden durch Waschen der Säule mit ca. 3 Säulenvolumina Elutionspuffer eluiert und fraktioniert gesammelt. Abschließend wurde die Säule mit 10 Säulenvolumina 50 mM EDTA/1 M NaCl gewaschen, um noch an der Säule gebundene Proteine sowie Ni²⁺-Ionen zu entfernen. Die gesammelten Fraktionen wurden nachfolgend mittels SDS-PAGE (II.3.4) und Western-Blot (II.3.6) analysiert.

- Waschpuffer I (pH 8,0)

NaCl	1 M
Imidazol	40 mM
in 1 x PBS	

- Elutionspuffer (pH 8,0)

NaCl	1 M
Imidazol	500 mM
in 1 x PBS	

425(scFv)-Fragmente aus dem Kulturüberstand einer 4 l Fermentation (II.3.2.4) wurden im ersten Schritt ebenfalls mittels IMAC gereinigt. Dazu wurde eine Streamline25 Säule (Amersham Biosciences) verwendet, die mit 110 ml IDA Chelating Matrix (Amersham Biosciences) gepackt und anschließend mit 3 Säulenvolumina 100 mM NiSO₄ beladen wurde. Die Äquilibrierung und Expansion des Chromatographiemediums erfolgte mit 13 Säulenvolumina Bindepuffer (1x PBS, 1 M NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) bei einer Flussrate von 300 cm/h. Der zellfreie Kulturüberstand wurde mit 1/10 Volumen 10x PBS und festes NaCl in einer Endkonzentration von 1 M versetzt und anschließend auf die Säule mit einer Flussrate von 300 cm/h aufgetragen. Danach erfolgte ein Waschschriff mit 5 Säulenvolumina Bindepuffer, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Ni²⁺-IDA gebundene His-10 markierte Proteinmoleküle wurden durch Waschen der Säule mit ca. 1,5 Säulenvolumina Elutionspuffer (1x PBS, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,2) und einer Flussrate von 50 cm/h eluiert, wobei verschiedene Fraktionen gesammelt wurden.

II.3.3.2 Ionenaustauschchromatographie

Zur weiteren Reinigung des rekombinanten Immuntoxins 425(scFv)-ETA' sowie des Ak-Fragmentes 425(scFv) wurde nach der IMAC (II.3.3.1) eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt. Der theoretische isoelektrische Punkt (IEP) von 425(scFv)-ETA' liegt bei 5,5 und

ermöglicht eine Reinigung durch Anionenaustauschchromatographie (AEX). Die Chromatographie wurde bei konstantem pH von 8,0 durchgeführt, wobei die Elution der durch elektrostatische Wechselwirkungen an die Matrix gebundenen Proteine durch Änderung der Ionenstärke erfolgte. Dazu wurden die aus der IMAC stammenden Elutionsfraktionen (II.3.3.1) mittels PD-10 Säulen (II.3.8) auf 50 mM Na₂HPO₄ (pH 8,0) eingestellt und mit einer Flussrate von 900 cm/h auf die mit 50 mM Na₂HPO₄ (pH 8,0) äquilibrierte AEX-Säule (Medium: Source 15Q, 1,7 ml Säulenvolumen (Amersham Biosciences)) aufgetragen. Zur Elution der Proteine wurde ein linearer NaCl-Gradient von 0-1 M (in 50 mM Na₂HPO₄, pH 8,0) eingesetzt. Die eluierten Proteine wurden fraktioniert und mittels SDS-PAGE (II.3.4) und Western-Blot (II.3.6) analysiert.

Da der IEP von 425(scFv) bei 6,4 liegt, wurde zur weiteren Reinigung des Proteins eine Kationenaustauschchromatographie (KEX) durchgeführt. Die aus der IMAC stammenden vereinigten Elutionsfraktionen wurden dazu in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,0) umgepuffert (II.3.8) und auf die KEX-Säule, äquilibriert mit 50 mM Natriumacetatpuffer, 0,35 M NaCl (pH 5,0), aufgetragen (Medium: Source15S, 1,7 ml Säulenvolumina (Amersham Biosciences)). Anschließend wurden die 425(scFv)-Fragmente mittels eines 6,5 Säulenvolumina umfassenden linearen NaCl-Gradient von 0,35-1 M NaCl (in 50 mM Acetatpuffer, pH 5,0) eluiert und die verschiedenen gesammelten Fraktionen mittels SDS-PAGE (II.3.4) und Western-Blot (II.3.6) analysiert.

II.3.3.3 Gelfiltration

Falls IMAC und AEX noch nicht den erwünschten Reinigungsgrad des rekombinanten Proteins erbracht hatten, wurde eine Gelfiltration als letzter Reinigungsschritt durchgeführt. Hierbei werden Proteinlösungen nach ihrer Größe aufgetrennt („size exclusion chromatographie“, SEC). Das System beruht darauf, dass die Moleküle eine Säule durchwandern, die mit kleinen porösen Trägern gefüllt ist. Sind die Moleküle klein genug, um in die Poren dieser Träger einzudringen, verweilen sie dort und wandern demzufolge langsamer durch die gepackte Säule. Große Moleküle verbleiben dagegen in den Zwischenräumen der Trägerpartikel, durchwandern somit die Säule schneller und werden eher eluiert.

Die Gelfiltration wurde mit der Superdex 200 HR 10/30 Säule (Amersham Biosciences) und HighPrep Sephacryl 2-100 HR 16/60 Säule (Amersham Biosciences) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die mit 1x PBS äquilibrierte Säule aufgegeben und entsprechend aufgetrennt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot (II.3.4, II.3.6) untersucht.

II.3.4 SDS-PAA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Detektion von Proteinen wurde eine denaturierende, diskontinuierliche SDS-PAA-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI *et al.* (LAEMMLI 1970) durchgeführt. Die proteinhaltigen Proben wurden mit 1/10 Volumen 10x SDS-PAA-Gelelektrophorese-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 100°C denaturiert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (13.000 g/5 min/RT) entfernt. Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine in „Mini-Protean III“-Apparaturen (BioRad). Neben selbst gegossenen Gelen wurden fertige Gelsysteme (Invitrogen) verwendet. Die Probenvorbereitung und Gelelektrophorese erfolgte nach Herstellerangaben. Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde entweder ein unspezifischer Nachweis der Proteine durchgeführt, wobei die Visualisierung mit Coomassie Brilliant blue G-250 (WILSON 1983) erfolgte, oder die Proteine wurden in einem Western-Blot (II.3.6) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und spezifisch in einer immunologischen Reaktion nachgewiesen. Zur Dokumentation wurde das Gel mit einem Scanner (ArcusII, AGFA) eingelesen und anschließend in Cellophan gewickelt und getrocknet.

Sammelgel: T=4%, C=2,7%, pH 6,8

Trenngel: T=12%, C=2,7%, pH 8,8

II.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde anhand verschiedener Verfahren bestimmt. Zum einen wurde eine SDS-PAGE (II.3.4) durchgeführt, in der die Proteinproben nach Coomassie-Färbung mit einem RSA-Standard oder einer anderen Probe bekannter Konzentration visuell verglichen wurden. Um das Ergebnis des Gels zu verifizieren, wurde ein Bradford Assay (BioRad) (BRADFORD 1976) durchgeführt. Hierzu wurden die Proben mit einer Eichreihe bekannter RSA-Konzentrationen im Probenpuffer korreliert, wodurch die Konzentration der zu untersuchenden Proteine graphisch ermittelt werden konnte. Alternativ wurde die Proteinkonzentration durch direkte UV-Photometrie bestimmt. Dazu wird die Extinktion (E) bei 280 nm und 260 nm bestimmt und der Quotient aus 280/260 ermittelt. Bei einer reinen nicht von Nukleinsäuren kontaminierten Proteinprobe ist dieser Quotient > 1,75. Der Proteingehalt kann wie folgt berechnet werden:

$$\text{mg Protein/ml} = 1,45 \times E_{280\text{nm}} - 0,74 \times E_{260\text{nm}}$$

II.3.6 Massenspektroskopie

Die Massenspektroskopie ist ein Analyseverfahren zur Bestimmung von chemischen Elementen, Molekülmassen und Massenfragmenten. Weiterhin wird diese Methode zur Sequenzanalyse

eingesetzt. Ein Massenspektrometer (MS) besteht aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. In der Ionenquelle wird die zu testende Substanz ionisiert, wobei verschiedene Methoden zum Einsatz kommen. Beispielsweise kann das zu analysierende Molekül durch Elektronen-Stoß-Ionisation (ESI) ionisiert werden. Durch den Zusammenstoß von Elektronen mit den Molekülen wird Energie auf die Moleküle übertragen, wodurch primäre positive Ionen erzeugt werden. Diese primären Ionen sind meistens sehr instabil und zerfallen ganz oder teilweise zu kleineren geladenen Massenfragmenten. Bei der Ionisation einer Substanz fragmentiert diese in ein vorhersehbares Ionen-Muster. Bei der „Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization“ (MALDI) wird der Analyt mit einem großen Überschuss an Matrix gemischt und nach Kokristallisation mittels gepulstem Laserlichtes ionisiert.

Die massenspektroskopischen Analysen wurden freundlicherweise von Herrn Michael Küpper (RWTH Aachen) durchgeführt. Dazu wurden die Proteinlösungen nach Isolierung aus dem SDS-PAA-Gel mittels ZipTipC18 (Millipore, Schwalbach) in 75% (v/v) Acetonitril, 1% (v/v) Ameisensäure entsalzt. Die so entsalzte Proteinlösung wurde direkt in die Elektrospray-Quelle bei 3 µl/min injiziert. Die ESI-Spektren wurden an einem ESI QTof2 (Quadrupole Time of Fly) Massenspektrometer (Waters Micromass, Eschborn) aufgenommen. Als Lösungsmittel diente ein Acetonitril-Wasser-Gemisch im Verhältnis 1:1 in 1% (v/v) Ameisensäure.

II.3.7 Western-Blot-Analysen

Western-Blot-Analysen erfolgten zum spezifischen Nachweis von Proteinen, die in SDS-PAGE (II.3.4) größenabhängig aufgetrennt wurden. Dazu wurden die Proteine aus den Gelen mittels „Electro-Tank-Blotting“ (TOWBIN *et al.* 1979) oder des XCell II-Blot-Moduls (Invitrogen) nach Herstellerangaben auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Die Visualisierung der immobilisierten Proteine erfolgte entweder durch Bindung eines Protein-spezifischen Ak, an den nachfolgend ein Enzym-konjugierter sekundärer anti-Ak gekoppelt wurde oder direkt mittels eines Enzym-gekoppelten Protein-spezifischen Ak. Wurden AP-gekoppelte Ak eingesetzt, führte der anschließende Substratumsatz mit NBT/BCIP (Life Technologies) zur Sichtbarmachung der Proteinbanden (BURNETTE 1981). Bei Verwendung eines PO-konjugierten Ak diente ECL (Amersham Biosciences) als Substrat und die Proteinbanden wurden mittels einer Chemilumineszenzreaktion detektiert. Dabei wurde die Lichtemission mit einer Kamera (LAS-1000, Fujifilm) detektiert. Durch den Vergleich mit einem Größenstandard („Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB), „SeeBluePlus2 Prestained Standard“ (Invitrogen), „Prestained Marker“ (Bio-Rad) konnte eine Größenabschätzung der Proteine durchgeführt werden. Die einzelnen Schritte zur Detektion der Proteinbanden sind in Tab. II-7 dargestellt.

Tab. II-7: Parameter zur Detektion von (425)scFv und (425)scFv-Fusionsproteinen im Western-Blot nach Transfer elektrophoretisch separierter Proteine auf eine Nitrozellulosemembran.

Schritt	Nachweis von 425(scFv) und 425(scFv)-Fusionsproteinen
Blockieren	2% (w/v) RSA in 1x PBS, pH 7,4 1 h bei RT oder üN bei 4°C
Hybridisierung Ak I	Maus-anti-penta-His Ak (1:5000), Maus-anti-c-myc Ak (1:5000), TC1 (1:20), Maus-anti-polyHis ^{PO} Ak (1:400), 1 h bei RT
Hybridisierung Ak II	ZAM ^{AP} Ak (1:5000), ZAM ^{HRPO} Ak (1:5000) 1 h bei RT
Substratreaktion	NBT/BCIP (10-20 min bei RT) ECL (5 min bei RT)

Die Ak wurden, falls nicht anders angegeben, in 1x PBS, 0,5% (w/v) RSA verdünnt. Die Membranen wurden zwischen den einzelnen Inkubationsschritten jeweils 3x mit PBS-T gewaschen, wobei im Falle von AP-konjugierten Ak vor der Substratreaktion zusätzlich noch 3x mit AP-Puffer gewaschen wurde. Die Farbreaktion wurde durch gründliches Waschen der Membran mit Wasser gestoppt.

- AP-Puffer (pH 9,6)

Tris-HCl	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

II.3.8 Dialyse proteinhaltiger Lösungen

Zur Entsalzung und Umpufferung von Proteinproben > 1 ml wurden PD10-Entsalzungssäulen (Amersham Biosciences) verwendet. Dazu wurden die Säulen mit 5-10 ml Puffer äquilibriert und anschließend 2,5 ml Probe aufgegeben. Der Durchfluss wurde verworfen und die Proteine mit 3 ml Puffer eluiert. Zur Umpufferung kleinerer Volumina von Proteinlösungen wurden Nanosep 10 K Omega Säulen (Pall Filtron, Dreieich) nach Herstellerangaben verwendet.

II.3.9 Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay

Bei dem **Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay** (ELISA) handelt es sich um Mikrotiterplattentests, in denen Polyvinylchlorid- oder Polystyrolplatten in einer bestimmten Abfolge mit Ak, Antigen (Ag) und enzymkonjugierten Ak beschichtet werden. Diese Festphasenmethode, die durch ihre hohe Variationsmöglichkeit und schnelle Durchführung gekennzeichnet ist, dient zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Ag bzw. Ak (ENGVALL und PERLMAN 1971). Weiterhin zeichnet sich diese Methode durch eine hohe Selektivität und Sensitivität aus. Durch die Kombination der verschiedenen Parameter lässt sich der ELISA für eine Reihe von speziellen Anwendungen optimieren.

II.3.9.1 Zellmembran-ELISA zum Nachweis von funktionellen rekombinanten Immuntoxinen

Für einen Bindungsnachweis der gereinigten rekombinanten 425(scFv)-Fusionsproteine an die EGFR-positiven Zielzellen wurden unter anderem Zellmembran-ELISAs (TUR *et al.* 2001) durchgeführt. Dazu wurden die Membranen der Zellen durch eine Kombination von Ultraschall und fraktionierte Ultrazentrifugation präpariert.

II.3.9.1.1 Präparation von Membranfraktionen

Als Erstes wurden 1×10^7 Zellen abzentrifugiert (200 g/10 min/RT), das Pellet 3x mit 1x PBS gewaschen (200 g/10 min/RT) und anschließend in 5 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer resuspendiert. Die Suspension wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 1x 3 min und 2x 1,5 min sonifiziert (50 W/duty cycle: 9 sec). Nach Zentrifugation der Suspension (1.000 g/12 min/4°C) wurde der Überstand abgenommen und die Membranfraktionen durch Ultrazentrifugation pelletiert (100.000 g/20 min/4°C). Das Membranpellet wurde nachfolgend in 10 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 aufgenommen und nochmals ultrazentrifugiert (100.000 g/20 min/4°C). Abschließend erfolgte die Resuspendierung des Pellets in 1,2 ml Beschichtungspuffer (0,02 M Bicarbonatpuffer, pH 9,6). Die aliquotierten Membranfraktionen wurden bei -80°C bis zur Benutzung gelagert.

- Homogenisierungspuffer

Saccharose	320 mM
Tris-HCl, pH 7,4	25 mM
1 Tablette Complete™ (Protease Inhibitor Cocktail, Roche)/50 ml	

II.3.9.1.2 Durchführung des Zellmembran-ELISAs

Zunächst wurden auf einer Maxisorp-ELISA-Platte (Nunc) 100 µl frisch präparierte Membranfraktionen (~ 900 ng Protein/ml) in Beschichtungspuffer üN bei 4°C immobilisiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Platte mit 2% (w/v) RSA in 1x PBS für 2 h bei 37°C oder üN bei 4°C behandelt. Anschließend wurden die verdünnten Proteinproben dazugegeben. Der Nachweis von gebundenen Immuntoxinen und 425(scFv)-Fragmenten wurde mit Hilfe eines Maus-anti-penta-His Ak und eines HRPO-konjugierten ZAM Ak durchgeführt. Die Substratreaktion erfolgte mit ABTS (2,2'-Azino-Di-(3-Ethylbenzthiazolin Sulfonat) Diammoniumsalz) und wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert. Alle intermediären Waschschrte wurden 3x mit PBS-T für je 5 min durchgeführt. Die zu analysierenden Proteinproben sowie die verwendeten Ak wurden in 1x PBS, 0,5% (w/v) RSA, pH 7,4 verdünnt. Die Durchführung des ELISAs ist in Tab. II-8 schematisch dargestellt.

- Beschichtungspuffer (pH 9,6)

Lösung A: 0,2 M Na₂CO₃

Lösung B: 0,2 M NaHCO₃

Gebrauchslösung: 1,7 ml Lösung A + 0,8 ml Lösung B auf 10 ml mit H₂O auffüllen

Tab. II-8: Parameter des Zellmembran-ELISAs zur Bestimmung der Bindungsaktivität von 425(scFv) und 425(scFv)-Fusionsproteinen.

Schritt	Konz/Verd.	Vol./Napf	Ink.[h]	Temp. [°C]
Beschichtung (Membranfraktionen)	900 ng/ml	100 µl	üN	4°C
Blockieren (RSA)	2% (w/v)	200 µl	üN oder 2 h	4°C 37°C
Protein-Proben	Verschiedene Verdünnungen	100 µl	1,5 h	RT
Maus-anti-penta-His Ak	1:5000	100 µl	1 h	RT
ZAM ^{HRPO} Ak	1:5000	100 µl	1 h	RT
Substrat (ABTS)	1 mg/ml in Substratpuffer	100 µl	1 h-üN	RT

II.3.10 Durchflusszytometrie zum Nachweis der Bindungsaktivität von 425(scFv)-Fusionsproteinen

Die Durchflusszytometrie wird im Allgemeinen dazu genutzt, die Bindung sowie die Bindungsspezifität fluoreszenzmarkierter Proben, wie z.B. Ak oder Liganden, an zellassozierte

Moleküle, wie beispielsweise Oberflächenantigenen oder Rezeptoren, zu untersuchen. Die mit Fluorochromen markierten Zellen werden in einem kontinuierlichen Strom einzeln durch eine Kapillare geleitet und passieren hierbei einen Laser bestimmter Anregungslänge, der die Fluorochrome zur Fluoreszenz anregt. Durch einen Detektor werden diese Signale gesammelt und in ein elektronisches Signal umgesetzt, das computerunterstützt visualisiert wird. Da Eigenschaften der Zellen, wie Größe und Granularität, die Qualität des Signals beeinflussen, werden diese Informationen ebenfalls, jedoch unabhängig von den Fluoreszenzsignalen, ermittelt. Die Durchflusszytometrie kann sowohl rein analytisch als auch zur Zellsortierung genutzt werden (FACS = „fluorescent activated cell sorter“). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich analytisch gearbeitet.

Um die spezifische Bindungsaktivität der 425(scFv)-Fusionsproteine nachzuweisen, wurden die EGFR-positiven Pankreaskarzinomzelllinien L3.6pl und FG sowie die Kolonkarzinomzelllinie LS174 verwendet. Weiterhin wurden TM3 Zellen benutzt, um die Bindungsaktivität des 425(scFv) an murinem EGFR zu untersuchen. Als Negativkontrolle dienten die EGFR-negativen Zelllinien HL60 und L540. Die Zellzahl/ml wurde mittels des Zellzählgerätes „Casey Counter“ (Schärfesystem, Reutlingen) bestimmt. Pro Probe wurden 5×10^5 Zellen eingesetzt, die zuvor in einem Zellwaschgerät (Dade Serocent, Baxter) 1x mit 1,8 ml 1x PBS gewaschen und durch Zentrifugation sedimentiert wurden. Anschließend erfolgte die Inkubation (45 min/4°C) der Zellen mit den gereinigten Proteinproben bzw. mit den Zellkulturüberständen von transfizierten HEK293T Zellen. Die Proteinproben wurden dabei in 1x PBS, 0,5 % (w/v) BSA verdünnt, so dass das Endvolumen 100 µl betrug. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut wie oben beschrieben gewaschen und mit dem ersten Ak inkubiert (20 min/4°C). Für die Bindungsanalysen von prokaryotisch exprimierten Immuntoxinen wurde ein Maus-anti-penta-His Ak (1 µg/Probe) verwendet, bei eukaryotisch exprimierten Proteinen konnte sowohl der Maus-anti-c-myc Ak (3 µg/Probe) oder Maus-anti-penta-His Ak (1 µg/Probe) eingesetzt werden. Die Zellen wurden 2x gewaschen und anschließend mit dem Detektions-Ak für 25 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Hierzu wurde ein FITC-konjugierter ZAM Ak (5 µg/Probe) verwendet. Nach der Inkubation mit dem zweiten Ak wurden die Zellen 3x gewaschen, sedimentiert und in 500 µl 1x PBS, 0,5 % (w/v) RSA resuspendiert. Die anschließende Durchflusszytometrie erfolgte am FACSCalibur (Becton Dickinson) nach Herstellerangaben mit einer Zählrate von mindestens 5000 Ereignissen pro Probe. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der CellQuest Software (Becton Dickinson) sowie dem Programm WinMDA (Version 2.8). Als Referenzwerte dienten Zellen, die lediglich mit den Nachweis-Ak inkubiert wurden. Der mAk425 und mAk528 (Calbiochem) wurde zur Überprüfung der EGFR-Expression auf den L3.6pl, FG und LS174 Zellen eingesetzt. Alle Ak wurden in 1x PBS, 0,5 % (w/v) RSA entsprechend verdünnt.

II.3.11 Zytotoxizitätsassay mittels XTT-Substratumsetzung

Um die zytotoxische Aktivität der rekombinanten Immuntoxine auf spezifischen Zielzellen zu evaluieren wurde die Umsetzung von XTT (Sigma) zu einem wasserlöslichen orangefarbenen Farbstoff gemessen. Als Negativkontrolle wurde RPMI (K)-Medium ohne Immuntoxin verwendet, als Positivkontrolle RPMI (K)-Medium mit Zeocin[®] (1000 µg/ml).

Zunächst wurden die Zielzellen mit RPMI (K)-Medium auf eine Zellzahl von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der zu testenden Immuntoxine bzw. Zeocin[®] als Positivkontrolle in einer 96 Napf Mikrotiterplatte angesetzt, wobei das Endvolumen pro Napf 100 µl betrug und ein Dreifachansatz pro Verdünnung durchgeführt wurde. Die gereinigten Immuntoxine wurden zuvor in 1x PBS umgepuffert (II.3.8) und sterilfiltriert (0,2 µm). Zur Analyse von 425(scFv)-ETA' wurden vorwiegend 1:10 bzw. 1:5 Verdünnungen durchgeführt, bei Immuntoxinen, die humane Effektordomänen enthielten wurden 1:2 und 1:5 Verdünnungen gewählt. Anschließend wurden in jedem Napf 100 µl der Zellsuspension zupipettiert und die Platte bei 37°C im Brutschrank für 48 h inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden pro Napf 50 µl der XTT/Phenazin-Lösung pipettiert und die Platte erneut bei 37°C inkubiert. Nach 24 h wurde die Substratumsetzung als Subtraktion von $E_{450nm} - E_{650nm}$ im ELISA-Reader gemessen. Die so ermittelten Daten wurden mit Hilfe von MS-Excel ausgewertet und graphisch dargestellt. Als wichtiger Wert gilt die IC_{50} , bei der es sich um die Konzentration eines Toxins handelt, die eine 50%ige Inhibition der Zellproliferation bewirkt.

- XTT/Phenazin-Lösung

RPMI (K)-Medium (Life Technologies)	10 ml
XTT (Sigma)	10 mg
Phenazin (Sigma)	12 µg

II.3.12 Immunofluoreszenz-Mikroskopie mittels des OPERA-Systems

Zur Verifizierung der Bindungsaktivität von 425(scFv)-ETA' wurden 1×10^5 Zellen pro Probe in eine 96 Napf Platte (Greiner) ausgesät und üN bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte die Blockierung der Plattenoberfläche mit 300 µl Blockierungslösung (DMEM Medium, 2% (w/v) RSA) pro Napf für 1,5 h (37°C, 5% CO₂). Anschließend wurde die Platte 1x mit DMEM-Puffer (DMEM-Medium, 0,5% (w/v) RSA) gewaschen und 100 µl der zu testenden gereinigten Proteinproben (1 µg/Napf) zupipettiert. Nach einer Inkubation für 1 h im Brutschrank wurde die Platte erneut wie oben beschrieben gewaschen, der in DMEM-Puffer verdünnte Maus-anti-penta-His Ak (1 µg/Napf) hinzugegeben und die Platte für 1 h im Brutschrank inkubiert. Der Detektions-Ak ZAM^{ALEXA} (2,5 µg/Napf) wurde nach einmaligem Waschen zupipettiert und für

1 h inkubiert. Die Anregungs- und Emissionswellenlänge des konjugierten Fluorochroms liegen bei 488 nm bzw. 603 nm. Zuletzt wurde das Reagenz Draq5 (Biostatus Ltd, USA) zur Kernanfärbung auf die Zellen gegeben und für 20 min inkubiert. Draq5 wird bei einer Wellenlänge von 633 nm angeregt und emittiert bei 670 nm. Nach einem letzten Waschschrift erfolgte die vollautomatische Messung der roten und grünen Fluoreszenz mittels des OPERA-Systems. Dazu wurde ein konfokales 20x Wasserimmersionsobjektiv verwendet. Die Messwerte wurden mit Hilfe der Software Acapella 1.01 ausgewertet, wobei die entsprechenden grünen und roten Fluoreszenzen übereinandergelegt wurden. Als Negativzelllinie wurden die IIA1.6 Mauszellen verwendet.

II.3.13 Stabilität von 425(scFv)-ETA' in Mausserum

Jeweils 2 µg des gereinigten rekombinanten Immuntoxins wurden mit 200 µl Mausserum (1:10 verdünnt in 1x PBS) in „Non-binding“ ELISA-Platten (Corning) gemischt und bei 37°C im Brutschrank für verschiedene Zeiträume inkubiert (1 h, 2 h, 5 h, 24 h). Die Menge von 425(scFv)-ETA' nach der Inkubation in Serum wurde mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot (II.3.4, II.3.6) bestimmt. Dabei wurde das Immuntoxin mit einem PO gekoppelten Maus-anti-polyHis Ak detektiert (II.1.3). Als Kontrolle wurde 425(scFv)-ETA' ohne Serum unter identischen Bedingungen inkubiert und analysiert.

Die Funktionalität der in Serum inkubierten Immuntoxine wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie (II.3.10) analysiert. Für die Detektion der an die L3.6pl Zellen gebundenen 425(scFv)-ETA' Fusionsproteine wurde ein Maus-anti-penta-His^{ALEXA} Ak verwendet.

II.4 Evaluierung der Wirksamkeit von 425(scFv)-ETA' in vivo

Alle Tierexperimente wurden in Kooperation mit Frau Dr. Christiane J. Bruns an der LMU München, Chirurgische Klinik und Poliklinik Großhadern durchgeführt.

II.4.1 Bestimmung der maximal tolerablen Dosis in Mäusen

Um zu bestimmen, bei welcher Dosis 425(scFv)-ETA' irreversible Toxizitäten in gesunden BALB/c Mäusen hervorruft, wurden Gruppen von je zwei Mäusen mit 10, 20, 30, 40, und 50 µg gereinigtem rekombinantem Immuntoxin behandelt. Das in 300 µl 1x PBS verdünnte Immuntoxin wurde intravenös (i.v.) in die Schwanzvene appliziert. Sobald die Tiere klinisch eindeutige Krankheitszeichen zeigten (Inaktivität, Gewichtsabnahme) wurden die Tiere geopfert.

II.4.2 Injektion von L3.6pl Tumorzellen in Mäuse

Für die anti-Tumorexperimente mit 425(scFv)-ETA' (II.4.3) wurden L3.6pl Zellen durch Behandlung mit 0,25% (v/v) Trypsin und 0,02% (w/v) EDTA von dem Kulturflaschenboden abgelöst. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von RPMI-Medium, 10% (v/v) FCS gestoppt. Die Zellen wurden 1x in serumfreiem RPMI-Medium gewaschen und in 1x PBS resuspendiert. Nur Einzelzellsuspensionen mit einer Viabilität > 90% wurden zur Tumorzellinjektion benutzt. 1×10^6 L3.6pl Zellen wurden anschließend in einem Volumen von 100 μ l in die Schwanzvene von Nacktmäusen injiziert.

II.4.3 Anti-Tumorexperimente in Mäusen

Die *in vivo* Aktivität von 425(scFv)-ETA' gegenüber Pankreaskarzinomzellen wurde in einem disseminierten Tumormodell in Nacktmäusen beurteilt. Dazu wurden vier bis sechs Wochen alten Mäusen 1×10^6 L3.6pl Zellen i.v. in die Schwanzvene injiziert (II.4.2). Einen Tag nach der Tumorzellinokulation erfolgte die einmalige i.v. Behandlung mit 20 μ g 425(scFv)-ETA' oder 1x PBS. Die Dosis von 20 μ g repräsentiert die maximal tolerable Dosis (MTD) (III.1.4.1). Eine weitere Gruppe von sieben Tieren erhielt 4×10^6 μ g rekombinantes Immuntoxin an den Tagen 1, 2, 3, 4 nach Tumorzellinjektion. Die Vitalfunktionen wurden regelmäßig überprüft und das Gewicht einmal pro Woche aufgezeichnet. 49 Tage nach Tumorzellinjektion wurden alle Tiere geopfert und das Lungengewicht, die Anzahl an makroskopisch sichtbaren Lungenmetastasen sowie die Inzidenz von Tumoren an der Einstichstelle am Schwanz bestimmt. Lungengewebe von allen drei Behandlungsgruppen wurde in Formalin fixiert und nach Einbettung in Paraffin (II.4.5) einer H&E-Färbung (II.4.6) zur histomorphologischen Untersuchung unterzogen.

II.4.3.1 Statistische Auswertungen

Die mittlere Anzahl der Lungenmetastasen wurde unter Verwendung von ANOVA mit Hilfe eines „Student-Newman-Keuls“ Tests (InStat 3,0 Statistische Software, Graphpad Software, San Diego, CA, USA) verglichen. Bei diesem Test handelt es sich um einen multiplen Mittelwertvergleichstest, der zur Überprüfung der Signifikanz unterschiedlicher Gruppen benutzt wird, wobei die Messgruppen paarweise miteinander verglichen werden (SACHS 1992). Die angegebenen Werte sind gemittelt +/- der Standardabweichung.

Die relative Anzahl der Schwanztumore innerhalb der Behandlungsgruppen wurde mit einem „Fisher's Exact Test“ verglichen. Für alle Analysen wurde $p < 0,05$ als signifikant gewertet.

Die gesamten statistischen Auswertungen wurden von Frau Dr. Christiane Bruns (LMU München, Chirurgische Klinik und Poliklinik Großhadern) durchgeführt.

II.4.4 Formalin-Fixierung von Gewebe

Die Formalinfixierung des Gewebes erfolgte bei RT für 12 h in einer frisch angesetzten gepufferten Formalinlösung. Anschließend wurde das Fixierungsmittel aus dem Gewebe für mindestens 2 h mit Leitungswasser ausgespült. Danach erfolgte die eigentliche Entwässerung mit einer in der Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe:

- 45-60 min Isopropanol, 20% (v/v), in aqua dest.
- 45-60 min Isopropanol, 40% (v/v), in aqua dest.
- 45-60 min Isopropanol, 60% (v/v), in aqua dest.
- 45-60 min Isopropanol, 80% (v/v), in aqua dest.
- 45-60 min Isopropanol, 90% (v/v), in aqua dest.
- 2x 45-60 min Isopropanol, 100% (v/v)
- 8 bis 16 h Isopropanol, 100%(v/v)
- 3x 1 h Xylol

- gepufferte Formalinlösung (pH 7,4)

KH_2PO_4 70 mM

Na_2HPO_4 30 mM

in 860 ml aqua dest. lösen und 140 ml Formalin (37%ige (v/v) Stammlösung) hinzugeben

II.4.5 Paraffin-Einbettung

Die fixierten Gewebe müssen, bevor man von ihnen Schnitte anfertigen kann, eingebettet werden. Dies erfolgt in der Regel in Paraffin. Die Einbett-Temperaturen können je nach verwendetem Paraffin zwischen 50°C und 70°C schwanken. Die entwässerten, mit Formalin fixierten (II.4.4) Gewebe, wurden 10 h mit 55° bis 65°C heißem Paraffin inkubiert und dann mit 70°C heißem Paraffin eingeblockt. Nach dem Erkalten wurden die Paraffinblöcke weiter auf -20°C gekühlt und mindestens 2 h bei dieser Temperatur gelagert. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt. Die erhaltenen Schnitte wurden zuerst auf einem Kaltwasserbad (ca. 20°C) aufgefangen und dann auf einem Heißwasserbad (ca. 45°C) gestreckt, um glatt auf einen Objektträger aufgezogen werden zu können. Die aufgezogenen Schnitte mussten abschließend noch in bei 37°C getrocknet werden, um sie dann für die H&E-Färbung zu verwenden.

II.4.6 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Die histologische Beurteilung des Lungengewebes der behandelten und unbehandelten Nacktmäuse erfolgte an Paraffin eingebettetem Material, das in 3 µm dicke Scheiben geschnitten, auf Glasobjektträger aufgezogen und gefärbt wurde. Die Routinefärbung in der Pathologie ist die

Hämatoxilin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung). In dieser Färbung werden saure Moleküle im Schnitt durch das Hämatoxilin dargestellt, so dass die Kerne, aber auch saure Schleimsubstanzen, Bakterien und Kalk blau erscheinen. Eosin ist im Gegensatz zu Hämatoxilin bei niedrigem pH-Wert ein negativ geladener Farbstoff, der zur Gegenfärbung dient. Er färbt alle übrigen Strukturen, wie z.B. das Zytoplasma der Zellen, Kollagen und proteinhaltige Lösungen in verschiedenen Rot-Tönen („Azidophilie“).

Die Gewebepreparate wurden mit Ehrlich'schem Hämatoxilin für 30 min gefärbt und unter fließendem Leitungswasser abgespült bis eine Blautönung sichtbar wurde. Zur Differenzierung wurde das Präparat in 1%iger Salzsäure (v/v) in 70%igem (v/v) Ethanol 3x eingetaucht. Nach erneutem Waschen mit Leitungswasser wurde die Färbung unter dem Mikroskop überprüft. Sollte es zu einer Überdifferenzierung gekommen sein, müssen die zuvor beschriebenen Schritte wiederholt werden. Bei einer Unterdifferenzierung wurden die nachfolgenden Schritte wiederholt. Die Präparate wurden 10 bis 15 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und 2 bis 5 min mit 1%igem (v/v) Eosin gegengefärbt. Nach erneutem Waschen unter fließendem Leitungswasser, wurden die Präparate abschließend in 95%igem (v/v) Ethanol entwässert und eingedeckt.

II.5 Dokumentation und Bildbearbeitung

Alle SDS-PAA-Gele und Western-Blots wurden auf einem Flachbettscanner der Firma AGFA, Modell: Arcus II, eingelesen und digital gespeichert. Die Bearbeitung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm *Photoshop 5.0* von Adobe. Photoshop stellt die elektronische Realisation von Optimierungsmethoden zur Verfügung. Zur Optimierung der Bilder wurden nur einige wenige der insgesamt vom Programm zur Verfügung gestellten Bearbeitungsmodule angewendet. Hierzu gehört die Farbwertkorrektur, bei der alle nicht besetzten Graustufen aus den Rohdaten herausgefiltert werden, so dass ein stärker kontrastiertes Bild entsteht. Außerdem wurden bei einigen Bildern Helligkeit und Kontrast verändert, um sie dem Erscheinungsbild der übrigen Bilder anzupassen. Zuletzt wurden die Abbildungen so vergrößert, dass sie in das vorgegebene elektronische Dokumentenformat eingefügt werden konnten.

III ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten rekombinante Immuntoxine zur Therapie von metastasierendem Pankreaskarzinom generiert und charakterisiert werden. Die Behandlung von Tumorzellen mit Immuntoxinen zählt zu den immuntherapeutischen Ansätzen und stellt eine vielversprechende Alternative zur Chemo- und Radiotherapie dar. In der Literatur wurden bereits mehrere rekombinante Immuntoxine erfolgreich im Hinblick auf eine Therapie von verschiedensten Tumorarten getestet (ENGBRAATEN *et al.* 2000; ENGBRAATEN *et al.* 2002; AZEMAR *et al.* 2003; TUR *et al.* 2003). Da bis dato noch keine rekombinanten Immuntoxine zur Behandlung des Pankreaskarzinoms beschrieben wurden, sollte in dieser Arbeit das therapeutische Potential von EGF-Rezeptor (EGFR)-spezifischen rekombinanten Immuntoxinen gegenüber Pankreaskarzinomzellen evaluiert werden. Dabei wurde der Fokus auf die Eliminierung von residualen Tumorzellen und der damit verbundenen Unterdrückung der Metastasenbildung gesetzt. Der EGFR bietet sich als Zielantigen an, da er auf pankreatischen Tumorzellen überexprimiert ist und dies mit einer ungünstigen Prognose verbunden ist. Das gegen den EGFR gerichtete Antikörper (Ak)-Fragment 425(scFv) sollte als Bindungsdomäne mit verschiedenen toxischen Komponenten fusioniert werden, wozu das bakterielle Toxin *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA) und die humanen Enzyme Granzym B (Gb), Angiogenin (Ang) sowie das eosinophil-kationische Protein (ECP) zählten. Der erste Teil der Arbeit (III.1) befasst sich mit der Konstruktion, der prokaryotischen Expression und Charakterisierung des rekombinanten Immuntoxins 425(scFv)-ETA'. Zur Reduzierung der Immunogenität sollten im zweiten Teil der Arbeit (III.2) 425(scFv)-Immuntoxine konstruiert werden, die humane Effektor-domänen (hE) als toxische Komponenten enthalten. Diese Konstrukte sollten ebenfalls nach erfolgreicher Expression in *E. coli* und HEK293T Zellen hinsichtlich ihrer Bindungsaktivität und toxischen Aktivität charakterisiert werden.

III.1 Konstruktion, Expression und Charakterisierung von 425(scFv)-ETA'

III.1.1 Konstruktion von pBM1.1-425(scFv)-ETA'

Das murine anti-EGFR 425(scFv)-Fragment sollte an den N-Terminus einer Deletionsmutante des *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA') fusioniert werden. ETA' enthält im Gegensatz zu dem ursprünglichen Toxin keine Bindungsdomäne mehr. Dementsprechend kann an die Translokationsdomäne ein spezifischer Bindeligand fusioniert werden, der die selektive Bindung des

ETA-Fusionsproteins an die Zielzellen gewährleistet und diese nach Internalisierung und Freisetzung der katalytischen Domäne ins Zytosol abtötet (KREITMAN 2001).

Das Plasmid pBM1.1 (II.1.7), welches sich von dem pET27b-Vektor ableitet, diente der Klonierung und bakteriellen periplasmatischen Expression von 425(scFv)-ETA'. Ausgangspunkt für die Klonierung von 425(scFv)-ETA' war der Vektor pSecTagCantabFriendly-425 (II.1.7), welcher die durch Sequenzierung bestätigte korrekte 425(scFv)-cDNA enthielt sowie der Vektor pBM1.1-Ki-4(scFv)-ETA' (II.1.7). Mittels der in beiden Plasmiden enthaltenen Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *NotI* wurde das 425(scFv)-Fragment in den pBM1.1-Vektor kloniert und dadurch mit der modifizierten Deletionsmutante von ETA fusioniert. Dazu wurde die Plasmid-DNA pSecTagCantabFriendly-425 mit *SfiI* und *NotI* restringiert (II.2.2.1) und das geschnittene 756 bp große 425(scFv)-Fragment mittels einer präparativen Agarosegelelektrophorese (II.2.3.2) aus dem Reaktionsansatz isoliert. Das Plasmid pBM1.1-Ki-4(scFv)-ETA' wurde ebenfalls mit *SfiI/NotI* restringiert, wodurch das 756 bp große Ki-4(scFv)-Fragment herausgeschnitten und in einer anschließenden „sticky-end“ Ligation (II.2.2.4) durch 425(scFv) ersetzt wurde. Zuvor wurde die Vektor-DNA mit SAP dephosphoryliert (II.2.2.3), um einer möglichen Autoligation entgegen zu wirken. Die Ligationsansätze wurden nachfolgend in hitzekompetente *E. coli* XL-1 blue transformiert (II.2.5.2). Acht rekombinante Klone wurden aus dem Transformationsansatz ausgewählt und in 5 ml Flüssigkultur angezogen. Die Plasmid-DNA wurde mittels einer „Telt“-Minipräparation (II.2.6.1) isoliert und durch Restriktion mit *SfiI/NotI* und *SacI* sowie analytischer Gelelektrophorese auf das Vorhandensein der 425(scFv)-cDNA als Insert überprüft. Von diesen als positiv identifizierten Klonen wurde die Plasmid-DNA mittels des QIAprep Spin Miniprep Kits von Qiagen (II.2.6.1) isoliert, um möglichst reine DNA für die anschließende Sequenzierung zu erhalten. Die Sequenzierung von vier Klonen erfolgte mittels der vektorständigen Sequenzierprimer pBM-5' und pBM-3' sowie der 425(scFv)-spezifischen Primer 425(scFv)-mitte-5' und 425(scFv)-mitte-3' (II.1.8) und führte zur Identifizierung von vier Konstrukten, deren Sequenz der Ausgangssequenz entsprach. Abb. III-1 zeigt einen schematischen Überblick der Klonierungsschritte sowie den Aufbau des daraus resultierenden Konstruktes pBM1.1-425(scFv)-ETA'.

Die vollständige DNA- bzw. Aminosäuren (AS)-Sequenz des rekombinanten Immuntoxins 425(scFv)-ETA' ist im Anhang (VII.2.1) abgebildet. Für die periplasmatische Expression wurde die DNA von drei Klonen (pBM1.1-425(scFv)-ETA#1, #2, #3) mittels einer Hitzeschocktransformation in Zellen des Expressionsstammes *E. coli* BL21 (DE3) übertragen.

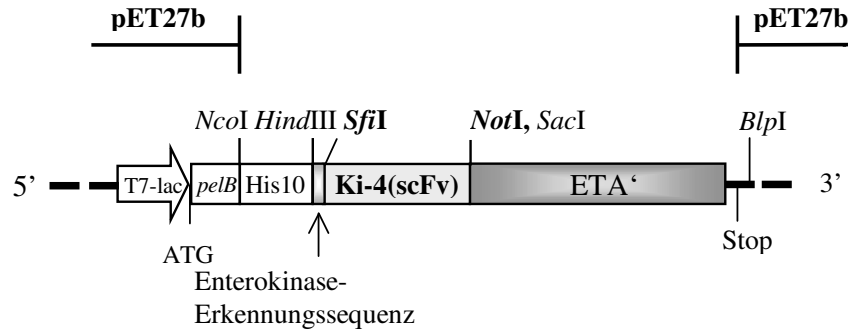
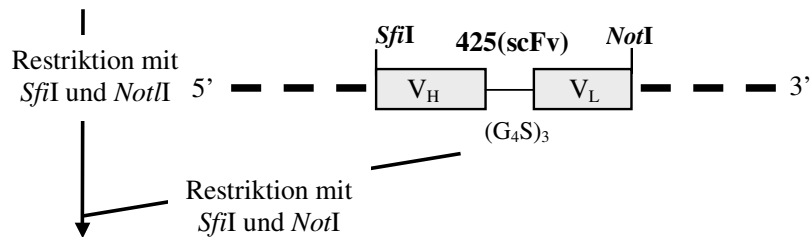
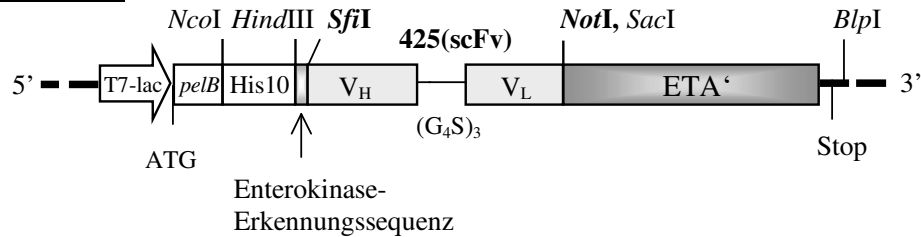
pBM1.1-Ki-4(scFv)-ETA'**pSecTagCantabFriendly-425****pBM1.1-425(scFv)-ETA'**

Abb. III-1: Schematischer Überblick zur Herstellung des bakteriellen Expressionskonstruktes pBM1.1-425(scFv)-ETA' zur periplasmatischen Expression.

ATG = Startcodon; ETA' = Deletionsmutante des *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxins; His10 = Polyhistidinsequenz zur Detektion und Reinigung des rekombinanten Proteins; Ki-4 = anti-CD30 scFv; *pelB* = Signalsequenz für den Transport ins Periplasma; T7-Promotor = IPTG induzierbar; V_H, V_L = schwere und leichte Kette des Ak-Fragmentes Ki-4(scFv) und 425(scFv).

III.1.1.1 Konstruktion von pBM1.1-425(scFv)

Als Kontrolle wurde das Konstrukt pBM1.1-425(scFv) generiert, das nur das scFv-Fragment 425 alleine, d.h. ohne Fusion mit der toxischen Domäne ETA' enthielt. Dazu wurden die Plasmide pSecTagCantabFriendly-425 und pBM1.1-M12(scFv) (II.1.7) mit den Restriktionsenzymen *SfiI* und *NotI* geschnitten (II.2.2.1), in einer präparativen Agarosegelelektrophorese (II.2.3.2) aufgetrennt und die entsprechenden Vektor- und Insertfragmente aus dem Gel isoliert. Nach erfolgter Reinigung der Fragmente aus der Agarosematrix wurden die restringierten 425(scFv)- und Vektor-Fragmente in einer „Sticky-End“-Ligation (II.2.2.4) verknüpft. Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* XL1-blue Zellen transformiert (II.2.5.2) und die Plasmid-DNA von sechs rekombinanten Klonen mittels Plasmid-DNA Minipräparation (II.2.6.1), Test-Restriktion mit *SfiI/NotI* bzw. *SacI* (II.2.2.1) und analytischer Agarosegelelektrophorese (II.2.3.1) überprüft. Anschließend wurden die Klone mit korrektem Insert (756 bp) einer Sequenzierung unterzogen

und ein verifizierter Klon (pBM1.1-425(scFv)) für nachfolgende Expressionsversuche ausgewählt (III.1.2.4).

III.1.2 Periplasmatische Expression von 425(scFv)-ETA' unter osmotischem Stress und Reinigung des Fusionsproteins

Zur Charakterisierung des rekombinanten Immuntoxins 425(scFv)-ETA' sollte dieses Protein periplasmatisch in *E. coli* exprimiert werden. Die prokaryotische Expression des Immuntoxins bietet sich an, da sowohl das scFv-Fragment als auch ETA' keine für die Funktionalität wichtigen Glykosylierungen erfordern. Die periplasmatische Expression von 425(scFv)-ETA' erfolgte unter osmotischem Stress in Anwesenheit von kompatiblen Soluten nach einem modifizierten und optimierten Protokoll von BARTH *et al.* (BARTH *et al.* 2000) (II.3.2.2). Eine wichtige Bedeutung besitzen die kompatiblen Solute. Neben der Funktion als Stressschutzfaktoren schreibt man ihnen einen positiven Einfluss auf die Funktionalität und Stabilität der zu exprimierenden Proteine zu. Vorteile dieses Systems liegen in den hohen Ausbeuten an löslichem und funktionalem Protein. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* BL21 (DE3) verwendet. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens aus, welches unter der Kontrolle des lac-Promotors steht und dessen Expression somit mittels IPTG reguliert werden kann. Weiterhin ist der Stamm defizient für die bakteriellen Proteasen *lon* und *ompT* (SUGIMURA und HIGASHI 1988).

III.1.2.1 Expression von 425(scFv)-ETA' im kleinen Maßstab (50 ml) und Reinigung mittels IMAC

Zum schnellen Nachweis des Proteinexpressionsvermögens von verschiedenen rekombinanten Bakterienklonen wurde die Kultivierung im kleinen Maßstab von 50 ml durchgeführt. Dazu wurde die Plasmid-DNA der Klone pBM1.1-425(scFv)-ETA'#1, #2 und #3 (III.1.1) in einer Hitzeschocktransformation in *E. coli* BL21 (DE3) übertragen (II.2.5.2) und je eine Flüssigkultur mit einer rekombinanten Bakterienkolonie inokuliert. Neben den 50 ml Immuntoxin-Expressionskulturen wurde als Negativkontrolle eine *E. coli* BL21 (DE3) Wildtypkultur angesetzt und wie unter II.3.2.2 beschrieben kultiviert. Nach der Zugabe der Salze zur Erzeugung des osmotischen Stresses und der Zugabe des kompatiblen Soluten folgte eine sechsstündige Induktionsphase. Anschließend wurde das Kulturmedium von den Bakterienzellen abgetrennt, das Bakterienpellet bei -20°C schockgefroren und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen (II.3.2.2). Nach Entfernung der Zelltrümmer durch Zentrifugation wurde die periplasmatische Fraktion mittels PD10-Säulen entsalzt (II.3.8) und über eine Ni²⁺-NTA-Säule (II.3.3.1) gereinigt. Eluiert wurde das Protein mittels 500 mM Imidazol in 300 µl Fraktionen. Aus jedem Reinigungsschritt wurde je

eine Probe in einer denaturierenden, diskontinuierlichen SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt (II.3.4), auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anschließend analysiert (II.3.6).

Anhand des in Abb. III-2 dargestellten Western-Blots, der exemplarisch die Reinigung des Klon pBM1.1-425(scFv)-ETA' #1 zeigt, ist deutlich zu erkennen, dass die periplasmatische Expression des Immuntoxins 425(scFv)-ETA' in *E. coli* mit anschließender Ni²⁺-NTA-Reinigung erfolgreich war. Ein Vergleich der in den Elutionsfraktionen detektierten Proteinbanden mit dem Größenstandard ergab ein Molekulargewicht von ca. 69 kDa, welches im Bereich der erwarteten Größe des His10-markierten 425(scFv)-ETA' von 69,5 kDa (646 AS) lag. Da in entsprechenden Proben der gereinigten periplasmatischen Fraktion des *E. coli* BL21 (DE3) Wildtyps keine Bande dieser Größe detektiert wurde (Daten nicht gezeigt), ist davon auszugehen, dass es sich um einen spezifischen Nachweis des Immuntoxins 425(scFv)-ETA' durch den Maus anti-penta-His Ak handelt. Der Western-Blot zeigt weiterhin, dass die Konzentration des 425(scFv)-ETA' in der periplasmatischen Fraktion für eine Detektion noch zu gering war und dass das rekombinante Immuntoxin erst nach Konzentrierung in den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden konnte. Sowohl in dem Durchfluss als auch in den Waschfraktionen konnte keine dem 425(scFv)-ETA' Fusionsprotein entsprechende ~69 kDa Proteinbande detektiert werden.

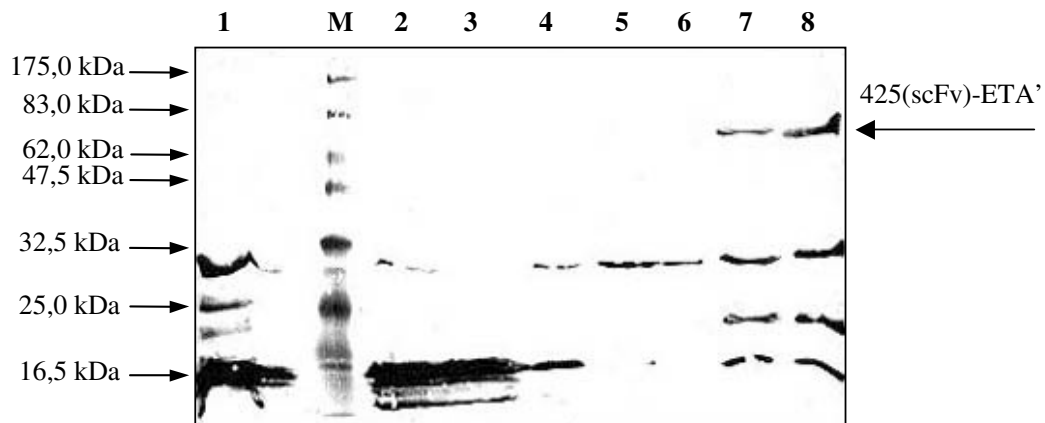


Abb. III-2: Western-Blot-Analyse des periplasmatisch exprimierten Immuntoxins 425(scFv)-ETA', Klon#1 (50 ml Maßstab).

Die Expression von 425(scFv)-ETA' wurde nach Zugabe der Salze zur Erzeugung des osmotischen Stresses mit 2 mM IPTG induziert und für 6 h bei 26°C aufrechterhalten (II.3.2.2). Die entsalzte periplasmatische Fraktion wurde mittels einer Ni²⁺-NTA-Säule gereinigt. 15 µl der verschiedenen Fraktionen wurden in einer 12%igen SDS-PAGE (II.3.4) aufgetrennt und im Western-Blot (II.3.6) auf eine Membran transferiert. Die 425(scFv)-ETA' Proteine wurden über den N-terminalen His10-Tag durch einen Maus-anti-penta-His Ak und mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierten Ziege-anti-Maus (ZAM^{AP}) Ak nachgewiesen. Die Visualisierung der Banden erfolgte mit NBT/BCIP über eine AP-Reaktion. [1: periplasmatische Fraktion, M: „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB), 2: entsalzte periplasmatische Fraktion, 3: Durchfluss der Ni²⁺-NTA-Säule, 4: Waschfraktion (10 mM Imidazol), 5: Waschfraktion (40 mM Imidazol), 6-8: Elutionsfraktionen 1-3 (500 mM Imidazol)].

Bei Betrachtung der Elutionsfraktionen fällt des Weiteren auf, dass neben der ~69 kDa Bande noch weitere Proteinbanden zu erkennen sind. Diese kontaminierenden Proteinbanden können sowohl auf Degradationsprodukte von 425(scFv)-ETA' als auch auf unspezifisch erkannte *E. coli*

Proteine zurückzuführen sein. Außerdem ist zu beachten, dass es sich bei den im Western-Blot nachgewiesenen Proteinen < 69 kDa um unvollständige Translationsprodukte handeln könnte. Aufgrund der Lokalisation des His10-Tags am N-Terminus der rekombinanten Proteine können auch die nach einem Translationsabbruch entstehenden Proteine detektiert werden. Eine definitive Aussage zur Identifikation der Proteine kann aber nur durch massenspektroskopische Untersuchungen gemacht werden (siehe III.1.2.2.4).

Eine Western-Blot-Analyse des ebenfalls über Ni²⁺-NTA gereinigten Kulturüberstandes ergab, dass 425(scFv)-ETA' nicht in das Kulturmedium sekretiert wurde (Daten nicht dargestellt). Im Vergleich zu den anderen beiden Klonen pBM1.1-425(scFv)-ETA#2 und #3 zeigte der Klon pBM1.1-425(scFv)-ETA#1 die höchste Expressionsrate (Daten nicht dargestellt) und wurde somit für weitere Expressionsstudien verwendet. Nachfolgend wurden Expressionen im größeren Maßstab durchgeführt (III.1.2.2), um eine umfassende *in vitro* Charakterisierung (III.1.3) zu ermöglichen.

III.1.2.2 Expression und Reinigung von 425(scFv)-ETA' im großen Maßstab

Analog zu dem Expressionsprotokoll für 50 ml Kulturvolumen wurde eine Expression des Klons pBM1.1-425(scFv)-ETA#1 im 1 l Maßstab durchgeführt (III.1.2.1, II.3.2.2). Nach erfolgter Reinigung der periplasmatischen Fraktion sollte die Konzentration des exprimierten 425(scFv)-ETA' bestimmt werden. Mittels Massenspektroskopie (III.1.2.2.4) sollte die ~69 kDa Bande als spezifische Immuntoxin-Proteinbande verifiziert bzw. das exakte Molekulargewicht von 425(scFv)-ETA' bestimmt werden. Weiterhin sollte die Bindungsaktivität und zytotoxische Aktivität des unter osmotischem Stress produzierten Immuntoxins evaluiert werden (III.1.3.1, III.1.3.2, III.1.3.3, III.1.3.4).

III.1.2.2.1 Immobilisierte-Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)

Die periplasmatische Fraktion einer 1 l Expressionskultur (II.3.2.2) wurde nach Entsalzung bzw. Umpufferung in EP-Puffer (II.3.8) über eine Ni²⁺-NTA-Säule gereinigt (II.3.3.1). Der EP-Puffer enthielt 1 M NaCl und 10 mM Imidazol, um die Bindung unspezifischer Komponenten an die Säule zu reduzieren. Die verschiedenen Fraktionen bestehend aus Durchfluss, Waschfraktionen und Eluate wurden mittels SDS-PAGE (II.3.4) und Western-Blot (II.3.7) analysiert.

Der in Abb. III-3 dargestellte Western-Blot zeigt, dass die Expression im 1 l Maßstab und die Reinigung mittels Affinitätschromatographie erfolgreich war und das ~69 kDa Vollängentranslationsprodukt von 425(scFv)-ETA' in den Elutionsfraktionen 1-5 detektiert werden konnte. Sowohl im Durchfluss als auch in den beiden Waschfraktionen konnte keine 425(scFv)-ETA' Bande visualisiert werden, was dafür spricht, dass die gesamte 425(scFv)-ETA' Proteinmenge an die Matrix gebunden hat und mittels der Waschschrte nur unspezifische Proteine heruntergewaschen worden sind.

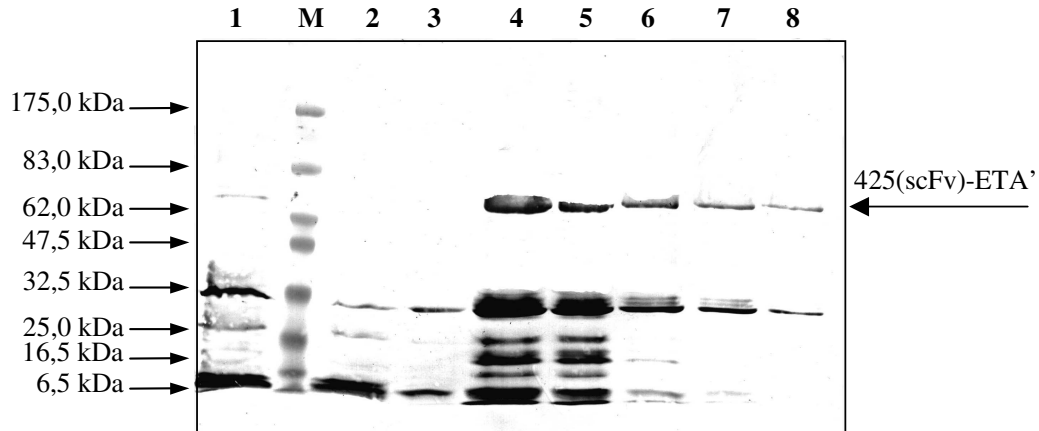


Abb. III-3: Western-Blot-Analyse des periplasmatisch exprimierten Immuntoxins 425(scFv)-ETA' (1 l Maßstab).

Die Expression erfolgte unter osmotischem Stress, wobei die 1 l Kultur für 6 h bei 26°C mit 2 mM IPTG induziert wurde (II.3.2.2). Die entsalzete periplasmatische Fraktion wurde mittels einer Ni²⁺-NTA-Säule gereinigt (II.3.3.1). 15 µl der verschiedenen Fraktionen wurden in einer 12%igen SDS-PAGE (II.3.4) aufgetrennt und im Western-Blot (II.3.6) auf eine Membran transferiert. Die 425(scFv)-ETA' Proteine wurden über den N-terminalen His10-Tag durch einen Maus-anti-penta-His und ZAM^{AP} Ak nachgewiesen. Die Visualisierung der Banden erfolgte mit NBT/BCIP über eine AP-Reaktion. [1: Durchfluss der Ni²⁺-NTA-Säule, M: „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB), 2: Waschfraktion (10 mM Imidazol), 3: Waschfraktion (40 mM Imidazol), 4-8: Elutionsfraktionen 1-5 (500 mM Imidazol)].

Des Weiteren verdeutlicht der Western-Blot (Abb. III-3) und das korrespondierende SDS-PAA-Gel (Abb. III-4), dass neben der ~69 kDa Bande noch zusätzliche Proteinbanden in den Elutionsfraktionen vorhanden sind (siehe auch III.1.2.1).

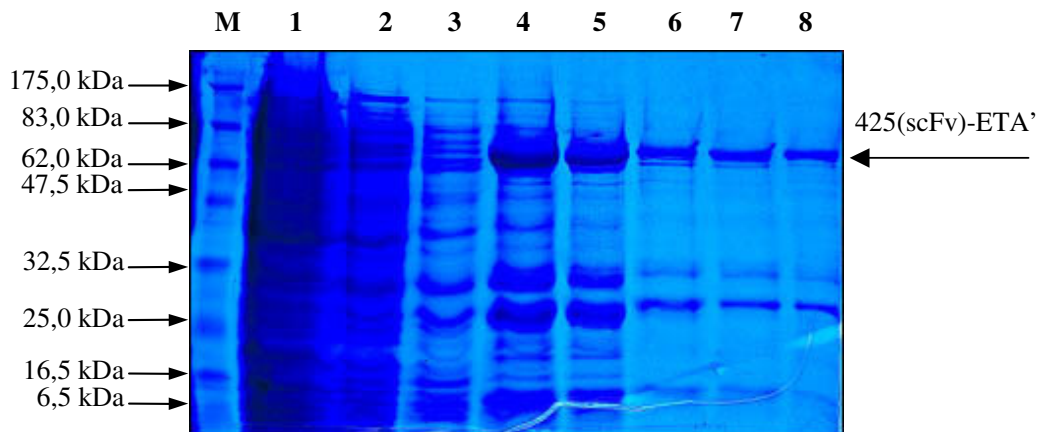


Abb. III-4: Korrespondierendes SDS-PAA-Gel (siehe Abb. III-3) des periplasmatisch exprimierten Immuntoxins 425(scFv)-ETA' (1 l Maßstab).

15 µl der verschiedenen Fraktionen wurden in einer 12%igen SDS-PAGE (II.3.4) aufgetrennt und das Gel mit Coomassie Brilliant blue (Serva) angefärbt. [M: „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB), 1: Durchfluss der Ni²⁺-NTA-Säule, 2: Waschfraktion (10 mM Imidazol), 3: Waschfraktion (40 mM Imidazol), 4-8: Elutionsfraktionen 1-5 (500 mM Imidazol)].

Um diese kontaminierenden Proteine von 425(scFv)-ETA' zu entfernen, wurden weitere Reinigungsschritte durchgeführt.

III.1.2.2.2 Ionenaustauschchromatographie

Die löslich exprimierte 425(scFv)-ETA' Fusionsproteine wurden aus der periplasmatischen Fraktion mittels Affinitätschromatographie isoliert und gereinigt (III.1.2.2.1). Aufgrund des unzureichenden Reinheitsgrades der Elutionsfraktionen (Abb. III-3, Abb. III-4) wurde ein weiterer Reinigungsschritt in Form einer Ionenaustauschchromatographie (II.3.3.2) durchgeführt. Da der isoelektrische Punkt von 425(scFv)-ETA' 5,5 beträgt, wurde ein Anionenaustauscher verwendet, an dessen positive Gruppen 425(scFv)-ETA' durch elektrostatische Wechselwirkungen binden konnte. 15 µl des Durchflusses und der Eluate wurden anschließend mittels SDS-PAGE (II.3.4) untersucht, wobei die Proteine durch eine Coomassie Brilliant blue Färbung visualisiert wurden. Das in Abb. III-5 dargestellte Ergebnis zeigt, dass die AEX erfolgreich verlaufen ist. Im Durchfluss (Fraktion A2) wurde kein Immuntoxin nachgewiesen, so dass davon auszugehen ist, dass die gesamte 425(scFv)-ETA' Proteinmenge an die Matrix gebunden hat. Der größte Teil des gebundenen Immuntoxins wurde ab einer Leitfähigkeit von 15 mS/cm von der Säule eluiert und fraktioniert gesammelt. Das Peakmaximum lag bei einer Leitfähigkeit von 19 mS/cm.

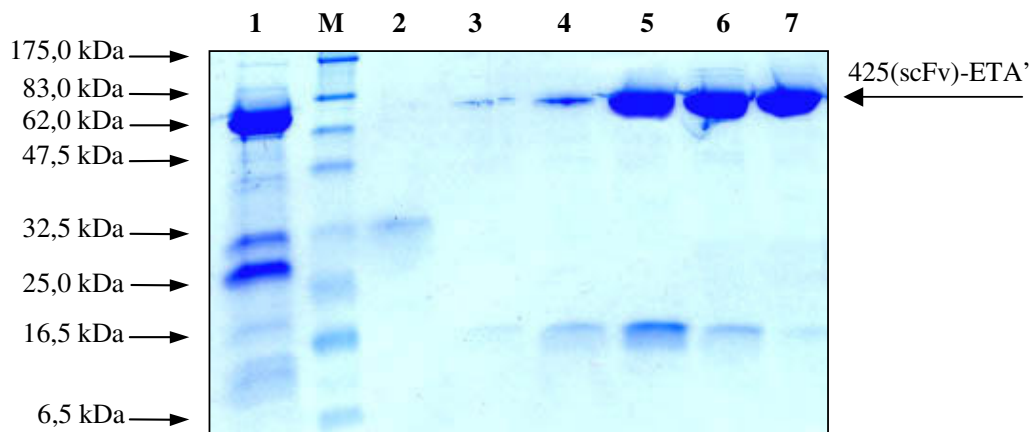


Abb. III-5: SDS-PAGE verschiedener Fraktionen aus der AEX des Immuntoxins 425(scFv)-ETA'.

Die vereinigten Elutionsfraktionen 1-5 aus der Ni²⁺-NTA-Reinigung wurden nach Umpufferung in 50 mM Na₂HPO₄ einer AEX bei pH 8,0 unterzogen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch eine stufenweise Änderung der Ionenstärke. 15 µl der verschiedenen Fraktionen wurden in einer 12%igen SDS-PAGE (II.3.4) pherographiert und das Gel mit Coomassie Brilliant blue (Serva) angefärbt. [1: vereinigte Elutionsfraktionen 1-5 (umgepuffert in 50 mM Na₂HPO₄), M: „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB), 2: Fraktion A2 (Durchfluss), 3: Fraktion A6, 4: Fraktion A7, 5: Fraktion A8, 6: Fraktion A9, 7: Fraktion A10].

Weiterhin ist ersichtlich, dass die meisten Proteinkontaminationen von 425(scFv)-ETA' durch die Ionenaustauschchromatographie erfolgreich eliminiert werden konnten. In den Fraktionen A7-A9 konnte zusätzlich noch eine ~16 kDa Proteinbande detektiert werden. Zur Eliminierung dieses kontaminierenden Proteins wurde ein weiterer Reinigungsschritt durchgeführt, wobei aufgrund des deutlichen Größenunterschiedes zwischen dem Zielprotein von 69 kDa und dem zu entfernenden Protein von ~16 kDa eine Gelfiltration (III.1.2.2.3) gewählt wurde.

III.1.2.2.3 Gelfiltration

Das periplasmatisch exprimierte Immuntoxin 425(scFv)-ETA' wurde mittels Affinitätschromatographie und AEX (III.1.2.2.1, III.1.2.2.2) gereinigt. Bis auf ein ~16 kDa großes Protein konnten alle kontaminierenden Proteine von 425(scFv)-ETA' eliminiert werden. Aufgrund dessen wurde als dritter Reinigungsschritt eine Gelfiltration mit der HighPrep Sephacryl 2-100 HR 16/60 Säule (Amersham Biosciences) durchgeführt (II.3.3.3). Das Chromatogramm ist in Abb. III-6 dargestellt.

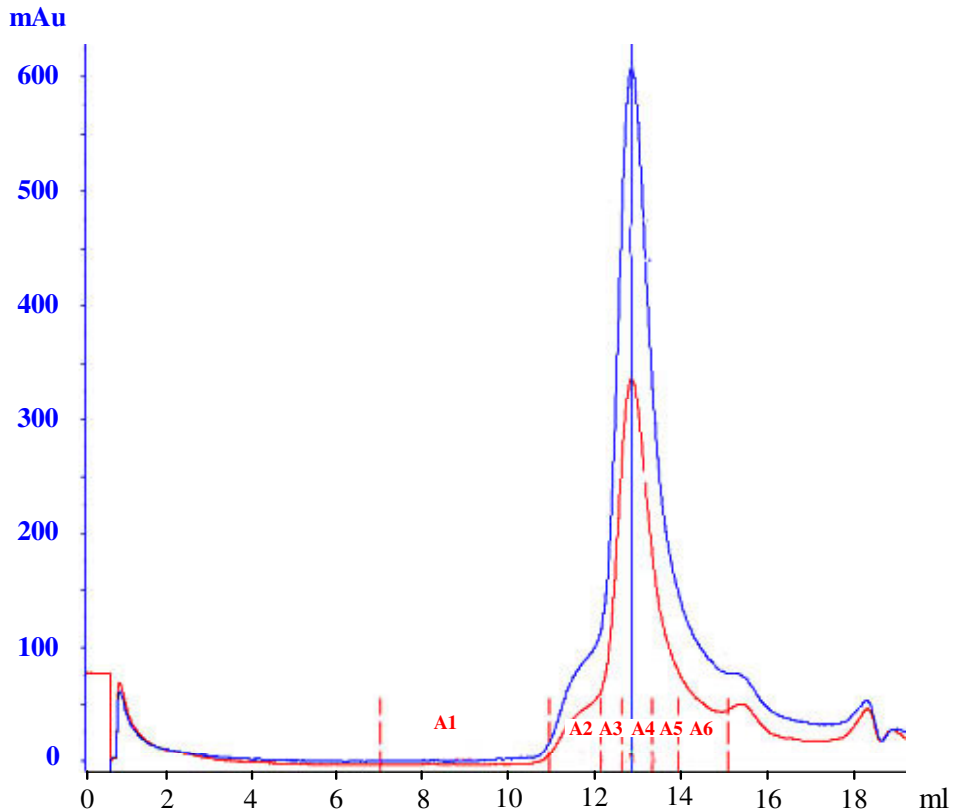


Abb. III-6: Chromatogram der Gelfiltration von den AEX-Fractionen A7-A10.

Nach der Durchführung einer Kalibrierung (Korrelationsfaktor: 0,999) wurden die aus der AEX (II.3.3.2) stammenden Fraktionen A8-A10 (III.1.2.2.2) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die mit 1x PBS äquilibrierte HighPrep Sephacryl 2-100 HR 16/60 Säule (Amersham Biosciences) aufgegeben und entsprechend aufgetrennt (II.3.3.3). Das Peakmaximum lag bei einem Elutionsvolumen von 12,8 ml. Dies entspricht einem Molekulargewicht von ~ 72 kDa.

Abb. III-7 zeigt das SDS-PAA-Gel der verschiedenen Gelfiltrationsfraktionen. Es ist ersichtlich, dass mittels dieser Reinigungsmethode das ~16 kDa Protein erfolgreich von dem Immuntoxin abgetrennt werden konnte. In allen fünf Fraktionen (A2-A6) wurde nur eine ~69 kDa Bande detektiert, welche dem Immuntoxin 425(scFv)-ETA' entspricht.

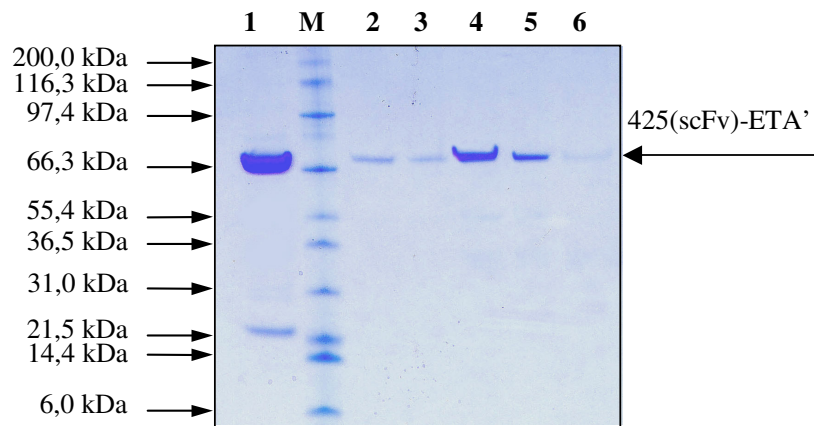


Abb. III-7: SDS-PAGE-Analyse der Gelfiltration des 425(scFv)-ETA' Immuntoxins.

Fraktion A8-A10 der AEX (II.3.3.2) wurden für die Gelfiltration eingesetzt. 15 µl der gesammelten Fraktionen wurden aufgeköcht und über eine SDS-PAGE (II.3.4) aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant blue (Serva) angefärbt (II.3.4). [1: Fraktion A8-A10 der AEX, M: „Mark12 Unstained Standard“ (Invitrogen), 2: Fraktion A2, 3: Fraktion A3, 4: Fraktion A4, 5: Fraktion A5, 6: Fraktion A6].

Die Fraktionen A2-A6 wurden anschließend vereinigt, mit Hilfe einer SpeedVac konzentriert und eine Probe dieser konzentrierten Proteinlösung im Western-Blot (II.3.7) und SDS-PAGE (II.3.4) analysiert. Zur Detektion der Proteine im Blot wurde diesmal ein anti-ETA spezifischer Ak (TC-1) verwendet.

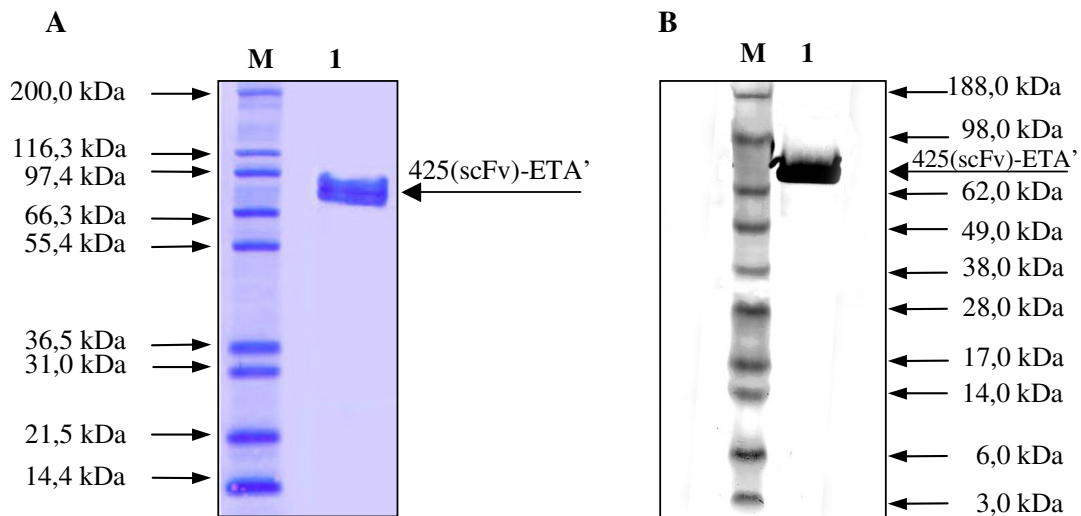


Abb. III-8: Nachweis des gereinigten 425(scFv)-ETA' Immuntoxins im SDS-PAGE-Gel und Western-Blot.

Lösliche 425(scFv)-ETA' Fusionsproteine wurden nach Isolierung aus der periplasmatischen Fraktion mittels Affinitäts-, Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration gereinigt. 20 µl der gereinigten und konzentrierten Proteinlösung wurden in einer 12%igen SDS-PAGE (II.3.4) aufgetrennt und das Gel mit Coomassie Brilliant blue (Serva) gefärbt (A). Die auf eine Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine (B) wurden mit dem Ak TC-1 und ZAM^{AP} Ak detektiert. Die Visualisierung der Banden erfolgte mit NBT/BCIP über eine AP-Reaktion. [M (A): „Mark12 Unstained Standard“ (Invitrogen), M (B): „SeeBluePlus2 Prestained Standard“ (Invitrogen), 1: vereinigte Fraktionen A2-A6 der Gelfiltration nach Konzentrierung (Abb. III-7)].

Aus Abb. III-8 ist ersichtlich, dass das Volllänge-translationsprodukt 425(scFv)-ETA' auch von dem anti-ETA spezifischen Ak TC-1 erkannt wird und die detektierte Größe mit dem erwarteten Molekulargewicht übereinstimmt. Neben der ~69 kDa Bande konnten keine weiteren Banden im SDS-PAA-Gel visualisiert werden.

III.1.2.2.4 Massenspektroskopische Analysen

Nach erfolgter Reinigung des Immuntoxins 425(scFv)-ETA' mittels IMAC (III.1.2.2.1), AEX (III.1.2.2.2) und Gelfiltration (III.1.2.2.3) wurde das Immuntoxin sowie verschiedene kontaminierende Proteine mittels Elektrospray-Ionisations (ESI)-Massenspektroskopie analysiert (II.3.6). Das im SDS-PAA-Gel und Western-Blot (Abb. III-8) detektierte 69 kDa Protein konnte dabei eindeutig als 425(scFv)-ETA' verifiziert werden. Die ESI-Massenspektren zeigten ein Molekulargewicht von 69,3 kDa, was nur geringfügig kleiner ist als die theoretisch berechnete Molekularmasse von 69,5 kDa. Des Weiteren wurde das kontaminierende ~16 kDa Protein (III.1.2.2.2), welches mittels Gelfiltration (III.1.2.2.3) eliminiert werden konnte, als ein negatives Regulatorprotein von *E. coli* (Molekulargewicht: 16,8 kDa) bestimmt. Weitere in den Ni²⁺-NTA-Elutionsfraktionen detektierbare Proteine (III.1.2.2.1) konnten mittels Massenspektroskopie als kontaminierende *E. coli* Proteine identifiziert werden. Neben Regulatorproteinen wurde z.B. eine GTP Cyclohydrolase (24,7 kDa) von *E. coli* nachgewiesen. 26 kDa und 15 kDa große Proteinbanden konnten auf Degradationsprodukte des Volllänge-proteins 425(scFv)-ETA' zurückgeführt werden.

III.1.2.2.5 Konzentrationsbestimmung des gereinigten 425(scFv)-ETA'

Die Konzentration des gereinigten 425(scFv)-ETA' wurde mit Hilfe eines Bradford-Assays, UV-Photometrie und SDS-PAGE ermittelt (II.3.5). Um eine Aussage über den Proteinverlust während der verschiedenen Reinigungsschritte treffen zu können, wurde die Konzentration des 425(scFv)-ETA' nach der Ni²⁺-NTA-Reinigung und der finalen Gelfiltration bestimmt. Die vereinigten Ni²⁺-NTA-Elutionsfraktionen (III.1.2.2.1) ergaben mit ~215 ng/µl eine Proteinausbeute von 1,6 mg/l Kultur bei einer OD_{600nm} von 7 bzw. 94 µg/g Zellpellet. Die absolute Proteinmenge des 425(scFv)-ETA' nach Gelfiltration betrug 650 µg, womit sich ein ungefährender prozentualer Verlust des 425(scFv)-ETA' von 41% berechnen lässt. Andere Expressionsversuche im 1 l Maßstab erbrachten vergleichbare Ausbeuten an gereinigtem 425(scFv)-ETA', wobei Proteinmengen zwischen 600 µg und 850 µg/l Expressionskultur bzw. 40 µg und 57 µg/g Zellpellet erreicht wurden.

III.1.2.3 Fermentation von 425(scFv)-ETA'

Die in III.1.2.1 und III.1.2.2 beschriebenen Versuche zeigten, dass 425(scFv)-ETA' in Schüttelkultur erfolgreich exprimiert und gereinigt werden konnte. Im folgenden Versuch sollte ein

Fermentationsprotokoll für 425(scFv)-ETA' etabliert werden. Das fermentierte Protein sollte anschließend gereinigt und hinsichtlich der Funktionalität überprüft werden.

In Anlehnung an die in II.3.2.2 aufgeführte Expression im Labormaßstab wurde eine Fermentation unter osmotischem Stress durchgeführt (II.3.2.3). Die Anzucht- und Induktionstemperatur sowie die IPTG-Konzentration (siehe Abb. III-9) entsprachen dabei den im Labormaßstab verwendeten Parameter (II.3.2.2). Da das in Schüttelkulturen benutzte TB-Medium recht kostenintensiv ist, wurde neben einer Fermentation von 425(scFv)-ETA' in diesem komplexen Medium simultan eine Fermentation in einem synthetischem Medium durchgeführt. Abgesehen vom osmotischen Stress bestand ein wesentlicher Unterschied zu einer Standardfermentation darin, dass es sich nicht um eine Hochzelldichtefermentation handelte, sondern die Expression des rekombinanten Proteins bei einer OD_{600nm} zwischen 5-10 induziert wurde. In Abb. III-9 ist exemplarisch der Fermentationsverlauf von 425(scFv)-ETA' in Minimalmedium gezeigt.

Nachdem die Zellen abgeerntet wurden, erfolgte ein periplasmatischer Aufschluss (II.3.2.2) von jeweils 10 g Zellmaterial sowie eine Ni^{2+} -NTA-Reinigung der periplasmatischen Fraktion (II.3.3.1). Die vereinigten Elutionsfraktionen wurden anschließend mittels einer AEX (II.3.3.2) gereinigt.

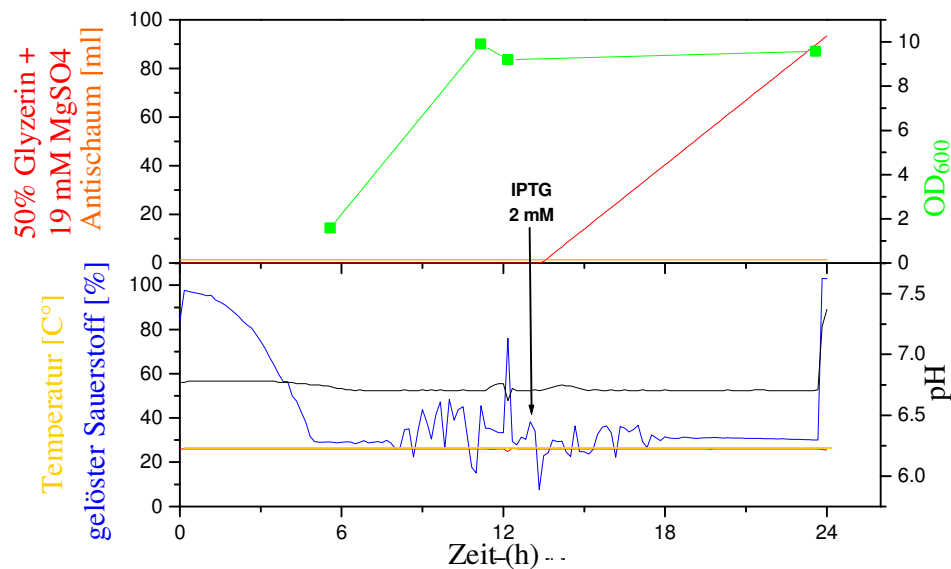


Abb. III-9: Fermentation von 425(scFv)-ETA' unter osmotischem Stress in Minimalmedium.

Die mit pBM1.1-425(scFv)-ETA' transformierten *E. coli* BL21 (DE3) Zellen wurden bei 26°C in Anwesenheit von Glukose fermentiert (II.3.2.3). Nachdem die Glukose verbraucht war und die OD_{600nm} zwischen 5-10 lag, wurde die Bakterienkultur mit 4% (w/v) NaCl, 0,5 M Sorbitol, 40 mM Betain als kompatibles Solut und 0,5 mM $ZnCl_2$ versetzt. Anschließend wurde die Expression von 425(scFv)-ETA' durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert und nach weiteren 30 min erfolgte die Zufütterung von Glycerin. Die Induktionsphase wurde für 24 h aufrechterhalten.

Die verschiedenen Fraktionen der Reinigungsschritte wurden in SDS-PAA-Gelen (II.3.4) und Western-Blots (II.3.7) analysiert. Das Ergebnis der Fermentation von 425(scFv)-ETA' in Minimalmedium und der anschließenden Reinigung des Immuntoxins ist exemplarisch in Abb. III-10 dargestellt. Die SDS-PAA-Gele und Western-Blots belegen, dass die Fermentation in

Minimalmedium erfolgreich war und 425(scFv)-ETA' exprimiert wurde. Mittels IMAC und AEX gelang es sämtliche kontaminierende Proteine von 425(scFv)-ETA' zu eliminieren. In den Fraktionen A6-A10 der AEX wurde nur die 69 kDa 425(scFv)-ETA' Bande detektiert (Abb. III-10, C) Der in Abb. III-10, D dargestellte Western-Blot identifiziert die 69 kDa Bande spezifisch als 425(scFv)-ETA'. Weiterhin ist zu erkennen, dass sowohl im Durchfluss als auch in den beiden Waschfraktionen der IMAC-Reinigung 425(scFv)-ETA' detektiert werden konnte.

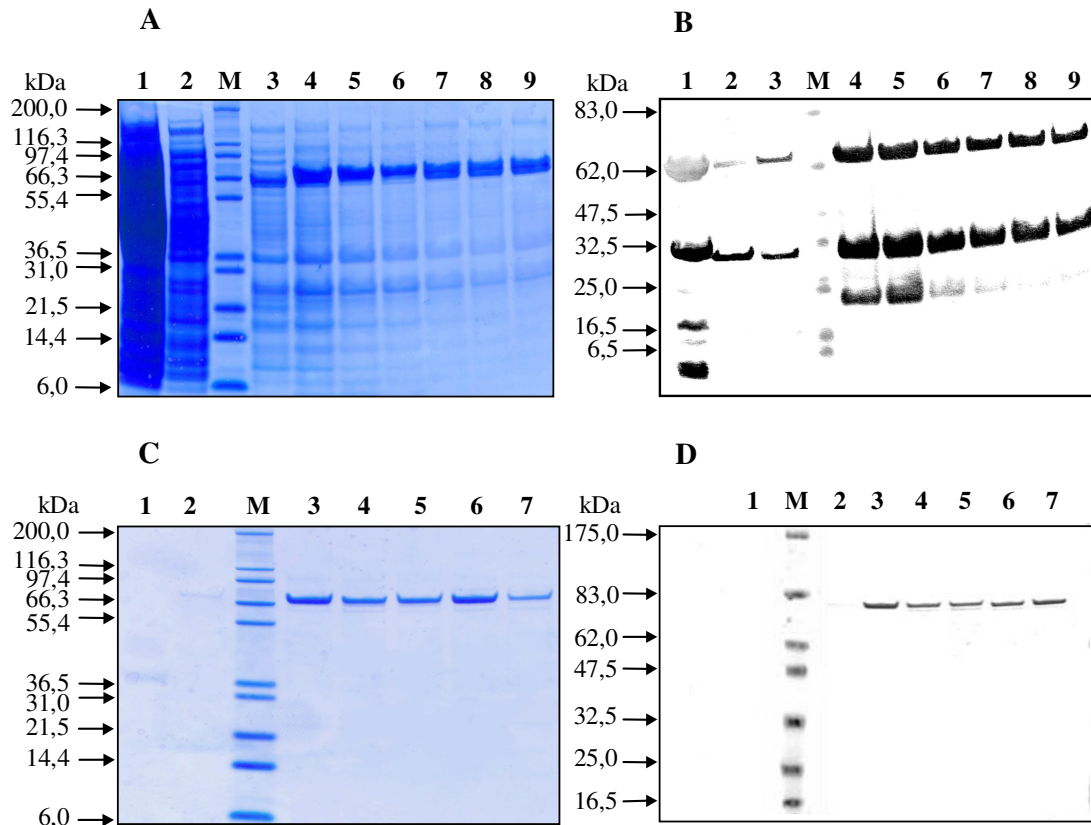


Abb. III-10: Reinigung des in Minimalmedium unter osmotischem Stress fermentierten 425(scFv)-ETA'. 10 g von 68 g Zellpellet wurden für den periplasmatischen Zellaufschluss verwendet. Verschiedene Fraktionen wurden während der Ni²⁺-NTA-Reinigung (II.3.3.1) und AEX (II.3.3.2) gesammelt und mittels SDS-PAGE (II.3.4) und Western-Blot (II.3.7) analysiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proben (15 µl) wurden die Gele mit Coomassie Brilliant blue (Serva) gefärbt (A, C). Die auf eine Nitrozellulosemembran transferierten Proteine wurden mit einem Maus-anti-penta-His und mit einem ZAM^{AP} Ak nachgewiesen (B, D). Die Visualisierung der Banden erfolgte mit NBT/BCIP über eine AP-Reaktion. [A + B: SDS-PAA-Gel und korrespondierender Western-Blot von Fraktionen aus der Ni²⁺-NTA-Reinigung; 1: Durchfluss der Ni²⁺-NTA-Säule, 2: Waschfraktion (10 mM Imidazol), 3: Waschfraktion (40 mM Imidazol), 4-9: Elutionsfraktionen 1-6, M(A): „Mark12 Unstained Standard“ (Invitrogen), M(B): „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB); C + D: SDS-PAA-Gel und korrespondierender Western-Blot von Fraktionen der AEX; 1: Fraktion A2 (Durchfluss), 2: Fraktion A5, 3: Fraktion A6, 4: Fraktion A7, 5: Fraktion A8, 6: Fraktion A9, 7: Fraktion A10, M(C): „Mark12 Unstained Standard“ (Invitrogen), M(D): „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB)].

Dies deutet darauf hin, dass die Ni²⁺-NTA-Säule überladen wurde und dementsprechend nicht alle His10-getaggtten Fusionsproteine an die Matrix binden konnten. Anschließend wurden die vereinigten AEX-Fraktionen A6-A10 hinsichtlich ihrer Bindungsaktivität und zytotoxischen Wirksamkeit gegenüber L3.6pl Zellen analysiert, wobei die Funktionalität der Immuntokine

verifiziert werden konnte (Daten nicht dargestellt). Die Konzentration der im Fermentationsmaßstab exprimierten und gereinigten Immuntoxine wurde mit ~2 mg/l Bakterienkultur (133,3 µg/g Pellet) abgeschätzt. Abschließend ist hinzuzufügen, dass die Fermentation von 425(scFv)-ETA' in TB-Medium ebenfalls zu funktionalem Immuntoxin führte, wobei die Ausbeute an gereinigtem Protein vergleichbar war mit der Ausbeute von in Minimalmedium fermentierten 425(scFv)-ETA' (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ein Protokoll zur Expression und Reinigung von 425(scFv)-ETA' im großen Maßstab erfolgreich etabliert werden konnte und zur Produktion für zukünftige klinische Studien eingesetzt werden kann.

III.1.2.4 Periplasmatische Expression von 425(scFv)

III.1.2.4.1 Expression im Schüttelmaßstab

Zur Expression des Klons pBM1.1-425(scFv) wurde die entsprechende Plasmid-DNA in einer Hitzeschocktransformation in Zellen des Stammes *E. coli* BL21 (DE3) transformiert (II.2.5.2). Da die Produktion von murinen scFv-Fragmenten in *E. coli* unter Standardbedingungen (II.3.2.1) ein etabliertes System darstellt (BANEYX 1999), wurde auf eine Expression unter osmotischem Stress verzichtet. Von den transformierten Zellen wurden 100 ml Flüssigkulturen angezogen, wobei die Expression des 425(scFv)-Fragmentes durch Zugabe von Glukose reprimiert wurde. Die Induktion der Expression erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase mit 1 mM IPTG für 6 h bei 30°C. Die Bakterienzellen wurden anschließend mittels Ultraschall aufgeschlossen und das geklärte Bakterienlysat sowie der Kulturüberstand mittels SDS-PAGE (II.3.4) und Western-Blot (II.3.7) analysiert. Die Western-Blot-Analyse der Expressionsproben zeigte, dass sowohl in der periplasmatischen Fraktion als auch in dem Kulturüberstand Banden detektiert werden konnten, die der Größe nach dem theoretisch ermittelten Molekulargewicht des 425(scFv)-Fragmentes von 30,3 kDa entsprachen (Daten nicht dargestellt). In einem korrespondierenden SDS-PAA-Gel konnte jedoch aufgrund der niedrigen Konzentration des Proteins keine Bande auf Höhe der erwarteten Größe detektiert werden (Daten nicht dargestellt). Um eine ausreichende Menge an 425(scFv) zu generieren wurde dementsprechend eine Fermentation durchgeführt (III.1.2.4.2).

III.1.2.4.2 Fermentation und Reinigung von 425(scFv)

Analog dem in II.3.2.4 beschriebenen Protokoll wurde eine Fermentation im 4 l Maßstab durchgeführt. SDS-PAGE und Western-Blot-Analysen der periplasmatischen Fraktion und des Kulturüberstandes ergaben, dass ein großer Teil der scFv-Fragmente in das Kulturmedium sezerniert wurde. Aufgrund dessen wurden die scFv-Fragmente aus dem Überstand gereinigt. Dies erfolgte im ersten Schritt über eine Ni²⁺-NTA-Reinigung, wobei aufgrund des großen

Volumens eine Streamline25 Säule benutzt wurde (II.3.3.1). Anschließend wurden die vereinigten Elutionsfraktionen mit Hilfe einer Kationenaustauschchromatographie (KEX) (II.3.3.2) weiter gereinigt. Das in Abb. III-11 dargestellte SDS-PAGE-Gel zeigt, dass die IMAC-Reinigung und KEX erfolgreich waren und keine kontaminierenden Proteine in höheren Konzentrationen neben der gewünschten 30,3 kDa scFv-Bande nachgewiesen werden konnten.

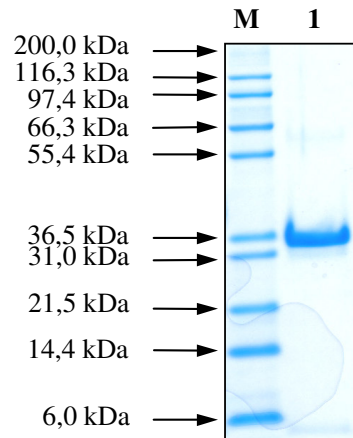


Abb. III-11: SDS-PAGE-Analyse des mittels IMAC und KEX gereinigten 425(scFv).

Das 425(scFv)-Fragment wurde in einem ansatzweisen („batch“) Fermentationsverfahren (4 l Maßstab) hergestellt (II.3.2.4). Anschließend wurden die scFv-Fragmente aus dem Kulturüberstand mittels IMAC (II.3.3.1) und KEX (II.3.3.2) gereinigt. 15 µl der vereinigten KEX-Elutionsfraktionen wurden über eine SDS-PAGE (II.3.4) aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant blue (Serva) angefärbt. Die Konzentration des 425(scFv) betrug 200 ng/µl. [M: „Mark12 Unstained Standard“ (Invitrogen), 1: vereinigte Elutionsfraktionen aus der KEX].

III.1.3 Funktionelle Charakterisierung von 425(scFv)-ETA' in vitro

Nach der periplasmatischen Expression und Reinigung des Immuntoxins 425(scFv)-ETA' wurde das rekombinante Protein hinsichtlich seiner Bindungsaktivität (III.1.3.1, III.1.3.2, III.1.3.3) und zytotoxischen Wirksamkeit (III.1.3.4) gegenüber den EGFR-positiven pankreatischen Zelllinien L3.6pl und FG charakterisiert.

III.1.3.1 Bindungsanalysen mittels Zellmembran-ELISA

Die Bindungsaktivität von 425(scFv)-ETA' gegenüber dem EGFR wurde mittels eines Zellmembran-ELISAs (II.3.9.1) überprüft. Dazu wurde das gereinigte Immuntoxin auf eine mit L3.6pl- und FG-Membranfraktionen beschichtete Maxisorp-ELISA-Platte (Nunc) aufgetragen. Als Negativkontrolle wurden weiterhin Zellmembranfraktionen von der EGFR-negativen Zelllinie HL60 auf eine ELISA-Platte aufgebracht und mit 425(scFv)-ETA' inkubiert. Der mAk425 diente als Positivkontrolle. Anhand der in Abb. III-12 gezeigten Messwerte ist ersichtlich, dass das gereinigte Immuntoxin 425(scFv)-ETA' funktional war und an die EGFR-

positiven Pankreaskarzinomzelllinien L3.6pl und FG bzw. deren Membranfraktionen binden konnte.

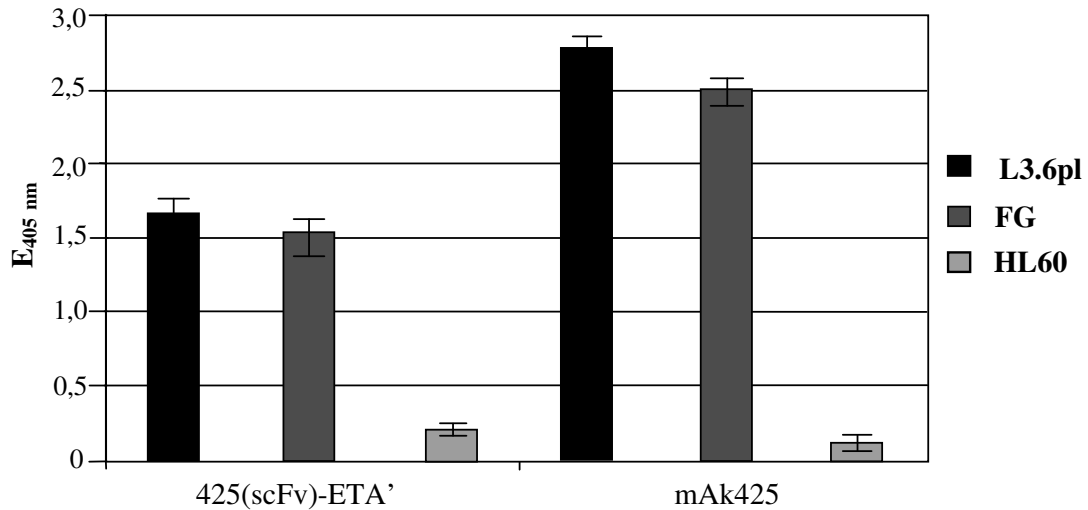


Abb. III-12: Zellmembran-ELISA (II.3.9.1) zum Nachweis der Bindungsaktivität des unter osmotischem Stress exprimierten und gereinigten 425(scFv)-ETA'.

Das exprimierte Immuntoxin 425(scFv)-ETA' wurde mittels Ni^{2+} -NTA, AEX und Gelfiltration gereinigt (III.1.2.2) und jeweils 2,5 μg auf die mit L3.6pl- und HL60-Membranfraktionen beschichteten ELISA-Platten gegeben. Gebundene Immuntoxine wurden über den His10-Tag und den entsprechenden Ak (Maus-anti-penta-His und ZAM^{HRPO}) nachgewiesen und in einer ABTS-Reaktion detektiert. Nach einer 20-minütigen Substratinkubation wurde die Extinktion bei 405 nm gemessen. Als Positivkontrolle wurde 3 μg des mAk425 verwendet und mit ZAM^{HRPO} nachgewiesen. Jede Probe wurde in einem Dreifachansatz gemessen und die entsprechenden Mittelwerte dargestellt.

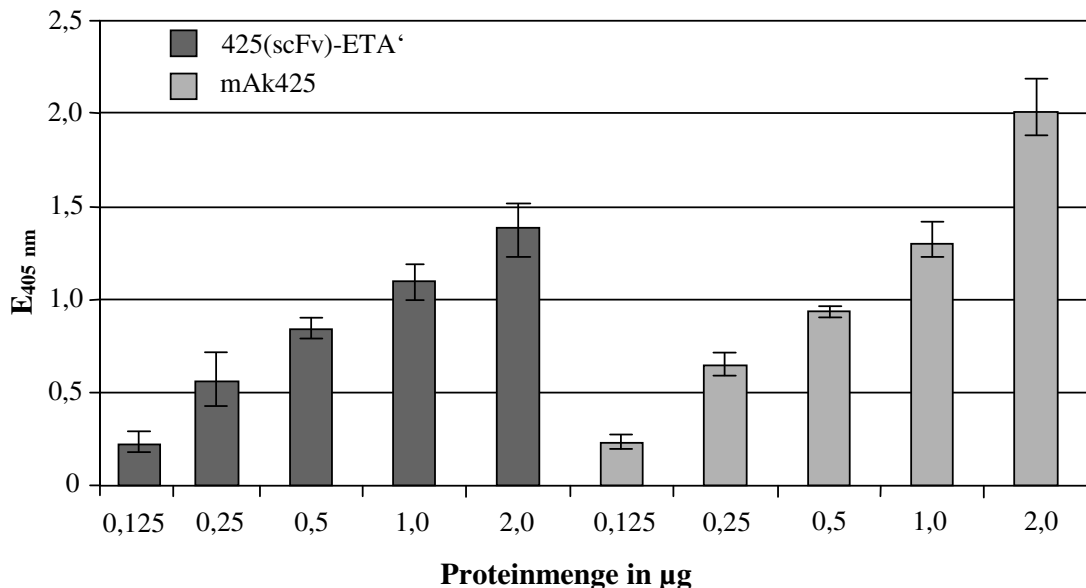


Abb. III-13: Zellmembran-ELISA mit unterschiedlichen Proteinmengen von 425(scFv)-ETA'.

Eine Verdünnungsreihe von 425(scFv)-ETA' und mAk425 wurden auf eine ELISA-Platte gegeben, die mit Membranfraktionen der Zelllinie L3.6pl beschichtet wurde. Gebundene Immuntoxine wurden mit dem Maus-anti-penta-His Ak und ZAM^{HRPO} Ak in einer ABTS-Reaktion nach 20-minütiger Substratinkubation nachgewiesen. Die Bindung von mAk425 wurde durch den ZAM^{HRPO} Ak detektiert. Pro Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der entsprechende Mittelwert der Extinktion graphisch aufgetragen.

Gegenüber der Negativzelllinie HL60 konnte dagegen keine Bindungsaktivität des Immuntoxins nachgewiesen werden. In einem weiteren Zellmembran-ELISA wurde eine Verdünnungsreihe (0,125 µg-2 µg) von 425(scFv)-ETA' auf eine mit L3.6pl-Membranfraktionen beschichtete ELISA-Platte gegeben.

Die in Abb. III-13 dargestellten Ergebnisse zeigen den direkten Zusammenhang zwischen aufgetragener Proteinmenge und Menge an bindenden Immuntoxinen. Entsprechend den steigenden Verdünnungen ist eine Abnahme der Extinktionswerte zu erkennen.

III.1.3.2 Bindungsanalysen mittels Durchflusszytometrie

Neben der Analyse der Bindungsaktivität von 425(scFv)-ETA' mittels Zellmembran-ELISA (III.1.3.1) wurde die Funktionalität der Bindungsdomäne mit Hilfe der Durchflusszytometrie (II.3.10) untersucht. Dazu wurde im Gegensatz zum ELISA das gereinigte Immuntoxin mit lebenden L3.6pl Zellen bzw. HL60 Zellen (EGFR-negativ) inkubiert.

Das Ergebnis ist in Abb. III-14 und Abb. III-15 dargestellt. Die Histogramme zeigen eindeutig, dass 425(scFv)-ETA' spezifisch an die L3.6pl Zellen gebunden hat. Die Inkubation des Immuntoxins mit der Negativzelllinie HL60 resultierte in keiner detektierbaren Fluoreszenz der Zellen (Abb. III-15).

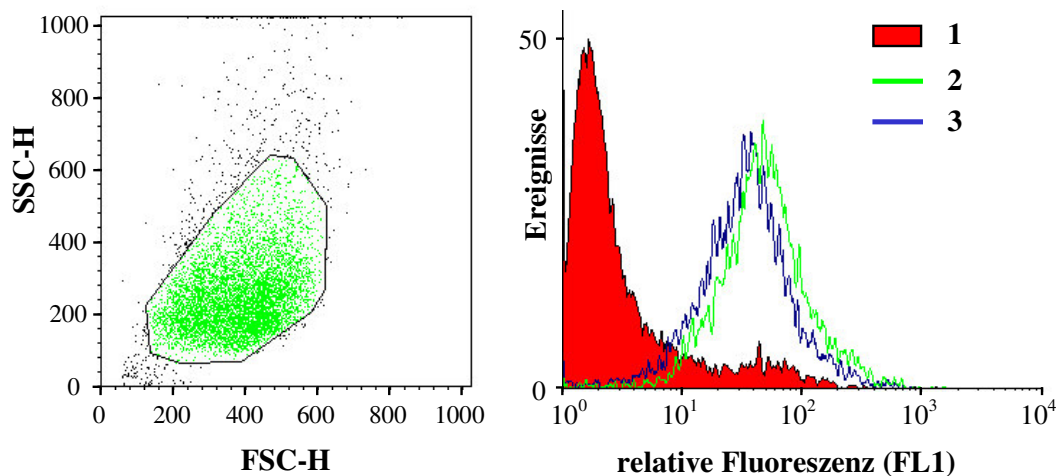


Abb. III-14: Analyse der Bindungsaktivität von 425(scFv)-ETA' gegenüber L3.6pl Zellen mittels Durchflusszytometrie.

5 µg des Immuntoxins 425(scFv)-ETA' (III.1.2.2.3) wurden in 100 µl 1x PBS mit 5x 10⁵ EGFR-positiven L3.6pl Zellen inkubiert. Detektiert wurden die gebundenen Immuntoxine mit 1 µg Maus-anti-penta-His Ak/Probe und 5 µg ZAM^{FITC} Ak/Probe. Die im Dotplot (links) grün gefärbten Messpunkte wurden in einem Histogrammplot (rechts) auf ihre Grün-Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle ausgewertet. **SSC-H:** „siteward scatter“ (Wert für die Granularität der Zellen); **FSC-H:** „forward scatter“ (Wert für die Größe der Zellen). [1: Negativkontrolle: 1x PBS + Maus-anti-penta-His Ak + ZAM^{FITC} Ak, 2: 3 µg mAk528 + ZAM^{FITC} Ak, 3: 5 µg 425(scFv)-ETA' in 1x PBS + Maus-anti-penta-His Ak + ZAM^{FITC} Ak].

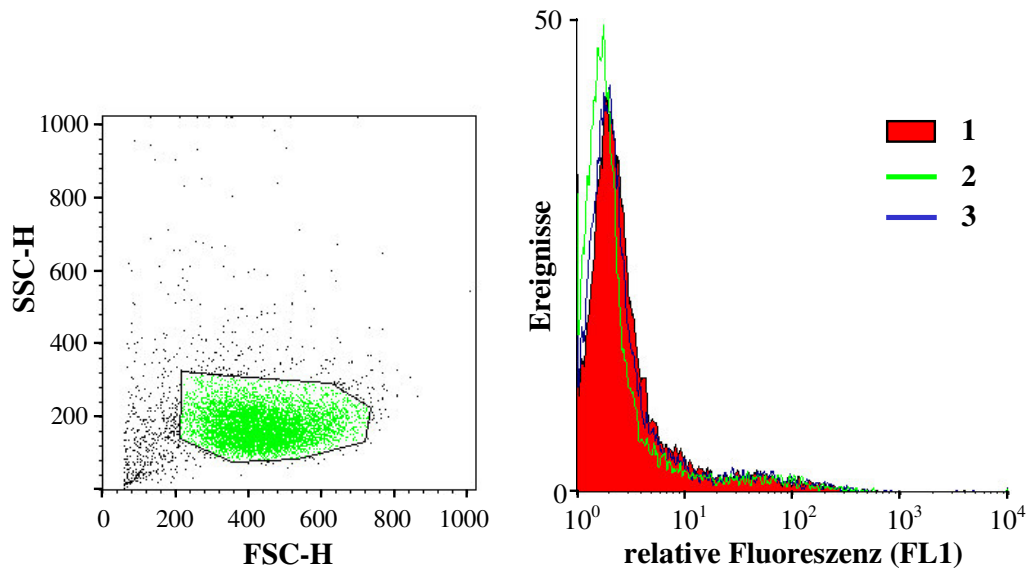


Abb. III-15: Durchflusszytometrische Analyse der Bindungsaktivität von 425(scFv)-ETA' auf HL60 Zellen.

5 μg von 425(scFv)-ETA' (III.1.2.2.3) wurden in 100 μl 1x PBS mit 5×10^5 EGFR-negativen HL60 Zellen inkubiert. Die im Dotplot (links) grün gefärbten Messpunkte wurden in einem Histogrammplot (rechts) auf ihre Grün-Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle ausgewertet. **SSC-H:** „siteward scatter“ (Wert für die Granularität der Zellen); **FSC-H:** „forward scatter“ (Wert für die Größe der Zellen). [1: Negativkontrolle: 1x PBS + Maus-anti-penta-His Ak + ZAM^{FITC} Ak, 2: 3 μg mAk528 + ZAM^{FITC} Ak, 3: 5 μg 425(scFv)-ETA' in 1x PBS + Maus-anti-penta-His Ak + ZAM^{FITC} Ak].

Diese Daten verifizieren somit die Ergebnisse des durchgeführten Zellmembran-ELISAs (III.1.3.1). Neben der Analyse der Funktionalität des durch Ni^{2+} -NTA, AEX und Gelfiltration gereinigten Immuntoxins wurden auch Bindungsanalysen nach dem ersten und zweiten Reinigungsschritt (Ni^{2+} -NTA und AEX) durchgeführt. Diese Versuche erbrachten den Nachweis, dass 425(scFv)-ETA' während der verschiedenen Reinigungsschritte nicht an Funktionalität verloren hat (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde die Bindungsaktivität von 425(scFv)-ETA' gegenüber der parentalen Pankreaskarzinomzelllinie FG und der EGFR-positiven Zelllinie LS174 mittels Durchflusszytometrie bestätigt (Daten nicht dargestellt).

Die Bindungsaktivität des als Kontrolle verwendeten 425(scFv)-Fragmentes (III.1.2.4.2) wurde ebenfalls mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. III-16). Es ist eindeutig ersichtlich, dass 425(scFv) eine spezifische Bindungsaktivität gegenüber den L3.6pl Zellen aufweist. Bei Verwendung der Negativzelllinie HL60 konnte keine Fluoreszenz der mit 425(scFv) inkubierten Zellen detektiert werden (Daten nicht dargestellt).

Neben der Überprüfung der Bindungsaktivität von 425(scFv)-ETA' gegenüber dem humanen EGFR sollte im folgenden Versuch untersucht werden, ob das Immuntoxin 425(scFv)-ETA' eine Kreuzreaktivität zu dem murinen EGFR zeigt. Diese Aussage ist hinsichtlich durchzuführender *in vivo* Experimente relevant. Für die Bindungsanalyse mittels Durchflusszytometrie wurde 425(scFv)-ETA' mit der murinen EGFR-positiven TM3 Zelllinie (II.1.4) inkubiert.

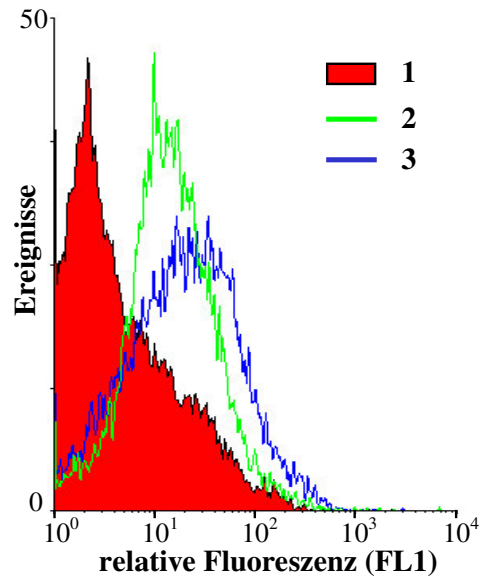


Abb. III-16: Analyse der Bindungsaktivität von 425(scFv) mittels Durchflusszytometrie.

5 μg des fermentierten und gereinigten 425(scFv)-Fragmentes (III.1.2.4.2) wurden in 100 μl 1x PBS mit 5×10^5 EGFR-positiven L3.6pl Zellen inkubiert. Detektiert wurden die gebundenen Proteine mit 1 μg Maus-anti-penta-His Ak/Probe und 5 μg ZAM^{FITC} Ak/Probe. [1: Negativkontrolle: 1x PBS + Maus-anti-penta-His Ak + ZAM^{FITC} Ak, 2: 1 μg mAk528 + ZAM^{FITC} Ak, 3: 5 μg 425(scFv) in 1x PBS + Maus-anti-penta-His Ak + ZAM^{FITC} Ak].

Aus dem in Abb. III-17 dargestellten Histogramm ist ersichtlich, dass 425(scFv)-ETA' an den murinen EGFR zu binden vermochte, da im Vergleich zu der Negativkontrolle (Probe 1) eine Fluoreszenz der mit 425(scFv)-ETA' inkubierten TM3 Zellen (Probe 2) detektiert werden konnte.

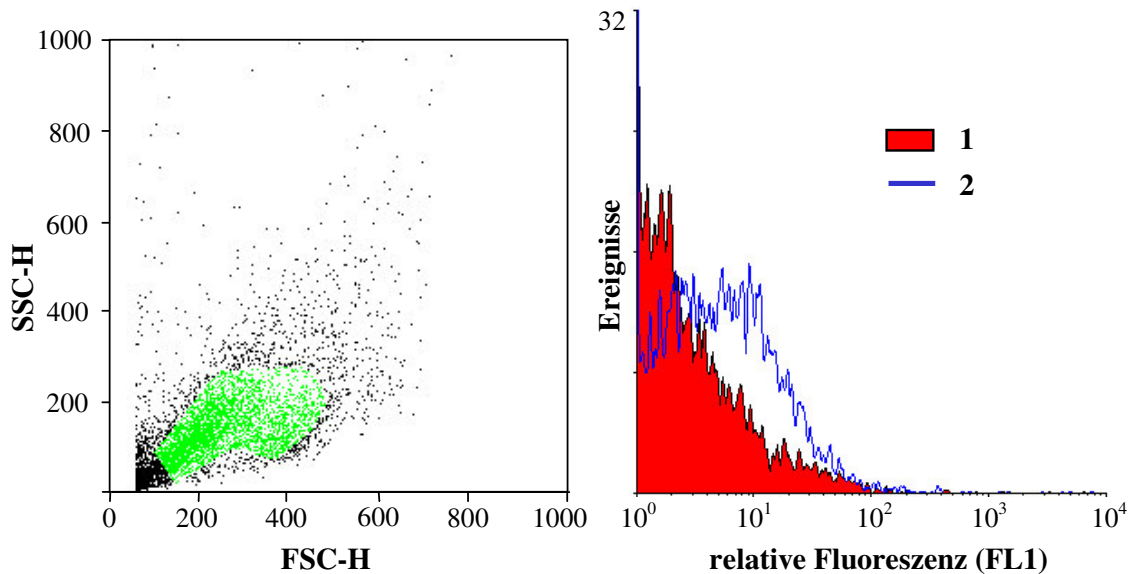


Abb. III-17: Analyse der Bindungsaktivität von 425(scFv)-ETA' gegenüber murinem EGFR.

Murine EGFR-positiv TM3 Zellen (II.1.4) wurden mit 4 μg gereinigtem 425(scFv)-ETA' inkubiert. Der Nachweis von gebundenem Immuntoxin erfolgte mit einem Maus-anti-penta-His Ak und ZAM^{FITC} Ak. Die im Dotplot (links) grün gefärbten Messpunkte wurden in einem Histogrammplot (rechts) auf ihre Grün-Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle ausgewertet. **SSC-H:** „siteward scatter“ (Wert für Granularität der Zellen); **FSC-H:** „forward scatter“ (Wert für die Größe der Zellen). [1: Negativkontrolle: 1x PBS + Maus-anti-penta-His Ak + ZAM^{FITC} Ak, 2: 4 μg 425(scFv)-ETA' in 1x PBS + Maus-anti-penta-His Ak + ZAM^{FITC} Ak].

III.1.3.3 Immunofluoreszenz-Mikroskopie

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Bindung von 425(scFv)-ETA' an den EGFR wurden L3.6pl Zellen und II A1.6 Zellen (EGFR-negativ) wie unter II.3.12 beschrieben mit dem Immuntoxin und den Nachweis-Ak inkubiert. Als Sekundär-Ak wurde ein mit AlexaFluor®488 gekoppelter Ziege-anti-Maus Ak verwendet. Die Anregungs- und Emissionswellenlänge dieses stabilen Fluorochroms liegen bei 488 nm bzw. 603 nm. Zur Sichtbarmachung der Zellkerne wurde das Kernfärbungsreagenz Draq5 benutzt, welches bei einer Wellenlänge von 633 nm angeregt wird und bei 670 nm emittiert. Die Dokumentation der roten und grünen Fluoreszenz erfolgte vollautomatisch mittels des OPERA-Systems.

Die mit 425(scFv)-ETA' inkubierten L3.6pl Zellen zeigten eine deutliche grüne Fluoreszenz, die auf eine spezifische Bindung zurückzuführen ist (Abb. III-18).

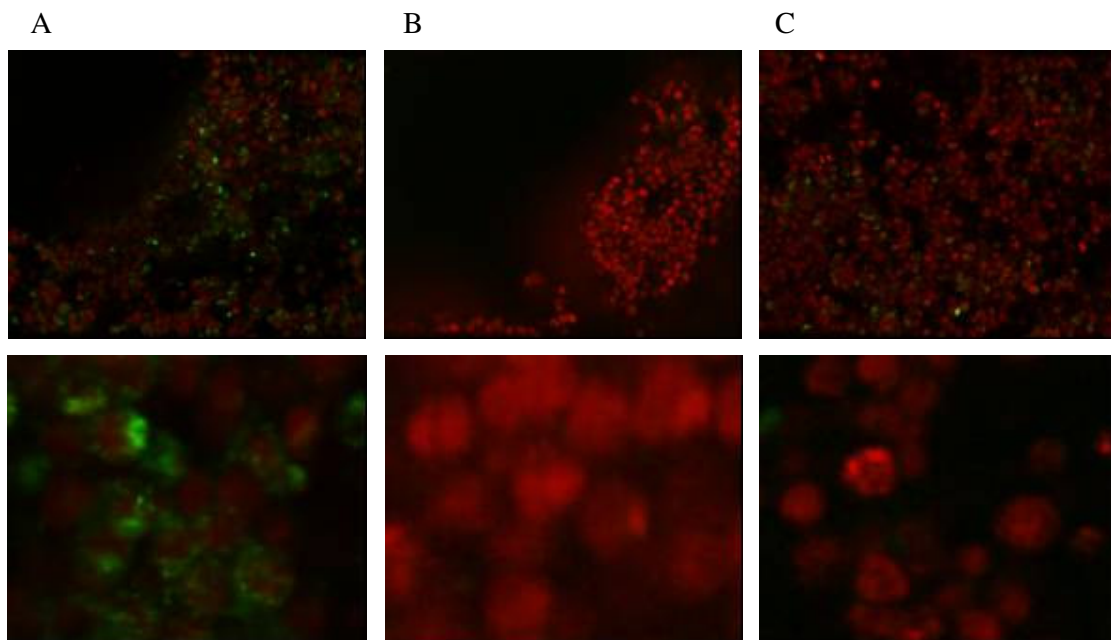


Abb. III-18: Immunofluoreszenz-Mikroskopie von L3.6pl Zellen mit 425(scFv)-ETA'.

L3.6pl Zellen wurden mit gereinigtem 425(scFv)-ETA' inkubiert (III.1.2.2). Der Nachweis des Immuntoxins erfolgte über Maus-anti-penta-His und ZAM^{ALEXA} Ak (A). Als Negativkontrollen wurden die Zellen nur mit 1x PBS inkubiert (B) bzw. mit den Nachweis-Ak (C). Alle Ansätze (A, B, C) wurden mit dem Kernfärbungsreagenz Draq5 angefärbt. Nach Abschluss der Inkubationsschritte wurden die Zellen mit einem konfokalen 20x Wasserimmersionsobjektiv in einem OPERA-System aufgenommen (obere Reihe). Ein Ausschnitt aus diesen Bildern wurde nochmals 60x vergrößert (untere Reihe). Bei den dargestellten Aufnahmen wurde mittels der Software Acapella 1.01 die emittierte grüne Fluoreszenz des Fluorochroms AlexaFluor®488 und die rote Fluoreszenz von Draq5 übereinander gelegt.

Als Negativkontrollen dienen L3.6pl Zellen, die entweder gar nicht oder nur mit den Maus-anti-penta-His und ZAM^{ALEXA} Ak behandelt wurden. Bei den unbehandelten L3.6pl Zellen (Abb. III-18, B) war erwartungsgemäß keine Fluoreszenz zu entdecken. Bei den nur mit beiden Nachweis-Ak behandelten Zellen (Abb. III-18, C) wurde eine sehr geringe Fluoreszenz auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Diese lag aber deutlich unter der Fluoreszenz der mit 425(scFv)-

ETA' behandelten Zellen (Abb. III-18, A). Zur Evaluierung einer möglichen Kreuzreaktivität des Immuntoxins 425(scFv)-ETA' gegenüber EGFR-negativen Zellen wurde die Zelllinie II A.1.6 wie unter II.3.12 beschrieben mit 425(scFv)-ETA' inkubiert. Diese EGFR-negative Zelllinie wurde für die Immunofluoreszenz-Mikroskopie gewählt, da sie im Gegensatz zu den im ELISA und Durchflusszytometrie verwendeten HL60 Zellen eine adhärent wachsende Zelllinie ist und somit im Vergleich zu Suspensionszellen auf der Zellkulturplatte nicht fixiert werden muss. Abb. III-19 zeigt, dass bei den mit 425(scFv)-ETA' inkubierten II A.1.6 Zellen keine signifikante Steigerung der durch die Maus-anti-penta-His und ZAM^{ALEXA} Ak hervorgerufenen Hintergrundfluoreszenz festgestellt werden konnte.

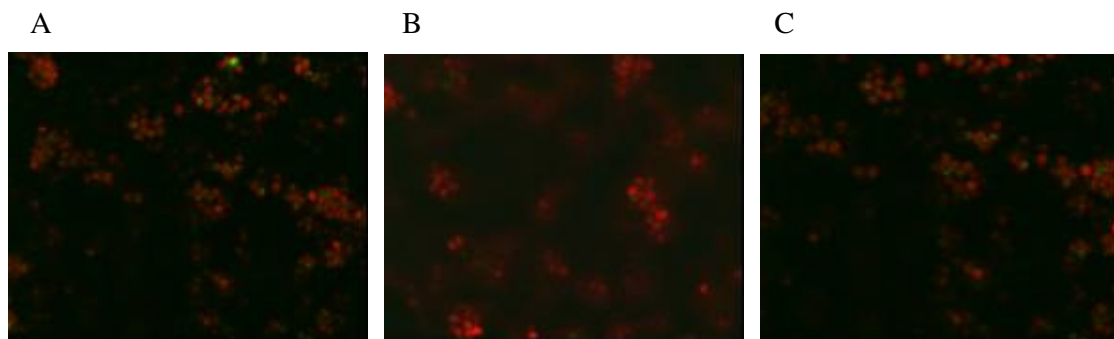


Abb. III-19: Immunofluoreszenz-Mikroskopie von II A.1.6 Zellen mit 425(scFv)-ETA'.

EGFR-negative II A.1.6 Zellen wurden mit 1 µg gereinigtem 425(scFv)-ETA' inkubiert (III.1.2.2). Die Zellen wurden wie in II.3.12 und Abb. III-18 beschrieben behandelt. Bei den dargestellten Aufnahmen handelt es sich um 20x Vergrößerungen, wobei mittels der Software Acapella 1.01 die emittierte grüne Fluoreszenz des Fluorochroms AlexaFluor[®]488 und die rote Fluoreszenz des Kernfärbungsreagens DraQ5 übereinander gelegt wurden. [A: Zellen + 425(scFv)-ETA' + Maus-anti-penta-His Ak + ZAM^{ALEXA} Ak + DraQ5, B: Negativkontrolle: Zellen + 1x PBS + DraQ5, C: Negativkontrolle: Zellen + Maus-anti-penta-His Ak + ZAM^{ALEXA} Ak + DraQ5].

III.1.3.4 Charakterisierung der zytotoxischen Aktivität mittels XTT-basierender Zytotoxizitätssassays

Nachdem die Funktionalität der Bindungsdomäne von 425(scFv)-ETA' verifiziert werden konnte (III.1.3.1, III.1.3.2, III.1.3.3), sollte in den folgenden Versuchen die Aktivität der toxischen Domäne ETA' evaluiert werden. Das Immuntoxin wird nach Bindung des 425(scFv)-Fragmentes an den EGFR der Zellen internalisiert, worauf ETA' seine toxische Wirkung in der Zelle entfalten kann, indem es die Proteinbiosynthese inhibiert. Um diese zytotoxische Aktivität zu messen, wurden Zytotoxizitätssassays mit den EGFR-positiven Pankreaskarzinomzelllinien L3.6pl und FG durchgeführt. Die Hemmung der Proteinbiosynthese durch 425(scFv)-ETA' wurde an der Metabolisierung eines gelben Tetrazoliumsalzes (XTT) in ein orangefarbiges Formazanderivat durch mitochondriale Dehydrogenaseaktivität gemessen. Dies kann in dieser Weise durchgeführt werden, da die mitochondriale Dehydrogenase vom Genom codiert ist und nicht vom autonomen Mitochondrien-Genom. Durch ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktor 2 (EF-2) und der damit verbundenen Inhibierung der Proteinbiosynthese wird in Abhängigkeit von Zeit und

Konzentration des Toxins immer weniger mitochondriale Dehydrogenase gebildet, was durch eine Abnahme des XTT-Umsatzes dokumentiert werden kann.

Die verwendeten sterilfiltrierten Immuntoxin-Proben befanden sich in 1x PBS und wurden im Dreifachansatz eingesetzt und nach Auswertung gemittelt. Die in Abb. III-20 und Abb. III-21 dargestellten Kurven dokumentieren, dass 425(scFv)-ETA' eine spezifische Toxizität gegenüber der Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl aufweist. Anhand der in Abb. III-20 gezeigten Kurve wurde die IC_{50} von 425(scFv)-ETA' mit $0,0075 \mu\text{g/ml}$ ($1,1 \times 10^{-10} \text{ M}$) berechnet. Dieser Wert stellt die Proteinkonzentration dar, bei der nur noch 50% der Zellen leben.

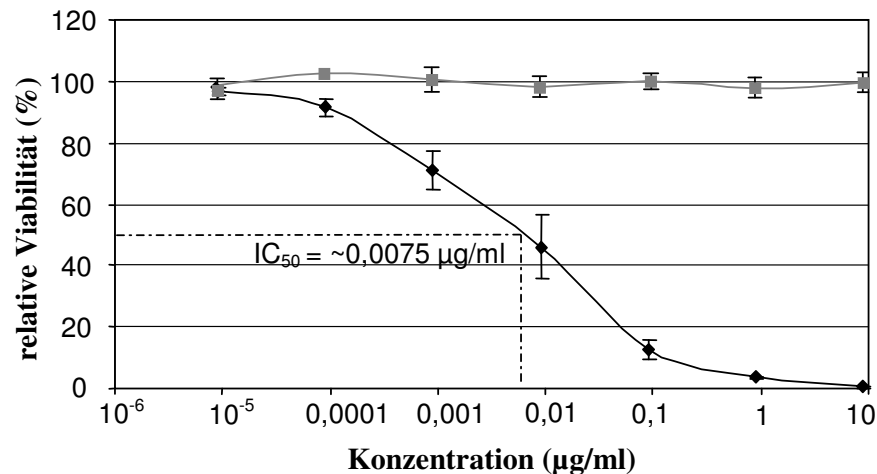


Abb. III-20: Zytotoxizitätsassay von 425(scFv)-ETA' auf der EGFR-positiven L3.6pl Zelllinie.

Das Immuntoxin 425(scFv)-ETA' wurde nach Reinigung (III.1.2.2) in 1x PBS umgepuffert und sterilfiltriert. Ausgehend von einer Anfangskonzentration von $9 \mu\text{g/ml}$ wurde 425(scFv)-ETA' in einer 1/10 Verdünnungsreihe auf L3.6pl Zellen gegeben. Nach einer 48-stündigen Inkubation der Zellen mit dem Immuntoxin wurde das Substrat XTT hinzugefügt und für 24 h inkubiert. Die Proben wurden im Dreifachansatz eingesetzt und nach der Auswertung gemittelt in das Diagramm eingetragen. Anhand der Kurve wurde graphisch die IC_{50} von 425(scFv)-ETA' bestimmt ($0,0075 \mu\text{g/ml}$). Die Proteinkonzentration ist logarithmisch dargestellt [■ : RPMI-Medium + 1x PBS, ◆ : 425(scFv)-ETA' in 1x PBS].

Neben der Evaluierung der zytotoxischen Aktivität von 425(scFv)-ETA' auf L3.6pl Zellen wurden Zytotoxizitätsassays auch mit der parentalen FG Zelllinie durchgeführt, wobei sich eine vergleichbare IC_{50} von $0,008 \mu\text{g/ml}$ ($1,2 \times 10^{-10} \text{ M}$) ergab (Daten nicht dargestellt). Die EGFR-negative Zelllinie HL60 wurde bis zu einer Immuntoxinkonzentration von $9 \mu\text{g/ml}$ bezüglich der Viabilität nicht beeinträchtigt. Weiterhin wurde die Wirkung des Immuntoxins auf die EGFR-negative Zelllinie L540 überprüft. Das Ergebnis zeigte keine zytotoxische Aktivität von 425(scFv)-ETA' gegenüber dieser Negativzelllinie (Daten nicht dargestellt).

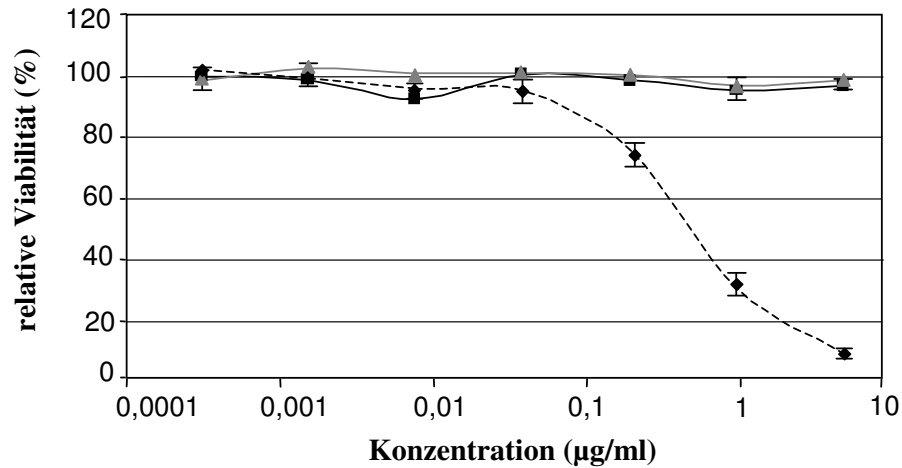


Abb. III-21: Zytotoxizitätsassay von 425(scFv)-ETA' auf der EGFR-negativen Zelllinie HL60.

Das Immuntoxin 425(scFv)-ETA' wurde nach Reinigung (III.1.2.2) in 1x PBS umgepuffert, sterilfiltriert und in 1/10 Verdünnungsschritten auf die EGFR-negative Zelllinie HL60 gegeben. Die Anfangskonzentration von 425(scFv)-ETA' betrug 9,0 µg/ml. Nach einer 48-stündigen Inkubation der Zellen mit dem Immuntoxin wurde das Substrat XTT hinzugefügt und für 24 h inkubiert (II.3.11). Die Proben wurden im Dreifachansatz eingesetzt und nach der Auswertung gemittelt in das Diagramm eingetragen [▲: RPMI-Medium + 1x PBS, ■: 425(scFv)-ETA' in 1x PBS auf HL60 Zellen, ◆: Positivkontrolle (Zeocin®)].

Um zu überprüfen, ob das scFv-Fragment 425 alleine, d.h. ohne Fusion mit der toxischen Domäne ETA' ebenfalls einen toxischen Effekt auf EGFR-positiven Zellen ausübt, wurde ein Zytotoxizitätsassay auf L3.6pl Zellen durchgeführt. Dazu wurde gereinigtes Protein verwendet, dessen Bindungsaktivität zuvor nachgewiesen wurde (Abb. III-16).

Abb. III-22 belegt, dass das scFv-Fragment 425 alleine keinen zytotoxischen Effekt auf die Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl hatte.

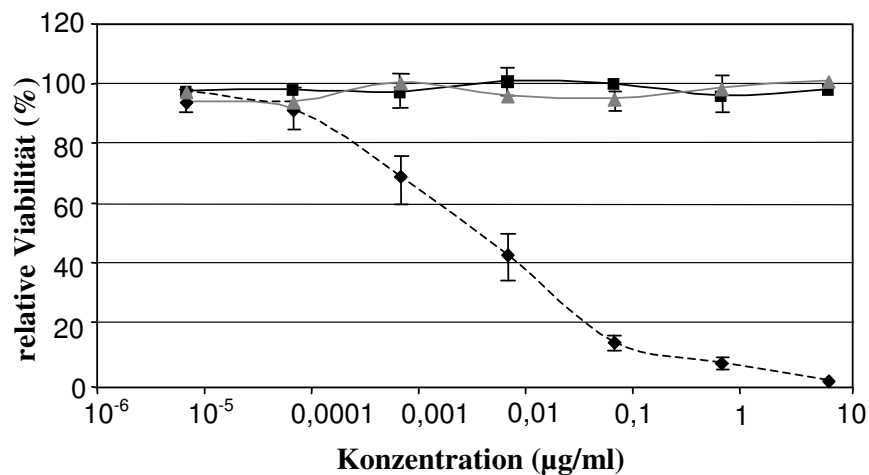


Abb. III-22: Zytotoxizitätsassay von 425(scFv)-Fragmenten auf der EGFR-positiven Zelllinie L3.6pl.

Das rekombinante Protein 425(scFv) wurde im 4 l Maßstab fermentiert (II.3.2.4) und mittels IMAC (II.3.3.1) und KEX (II.3.3.2) aus dem Kulturüberstand gereinigt. 6,5 µg 425(scFv)/ml wurden als Ausgangskonzentration auf 1x 10⁵ L3.6pl Zellen gegeben und anschließend 1/10 Verdünnungsschritte durchgeführt. Nach einer 48-stündigen Inkubation der Zellen mit dem Protein wurde das Substrat XTT hinzugefügt und für 24 h inkubiert (II.3.11). Die Proben wurden im Dreifachansatz eingesetzt und nach der Auswertung gemittelt in das Diagramm eingetragen [▲: RPMI-Medium + 1x PBS, ■: 425(scFv) in 1x PBS, ◆: Positivkontrolle (Zeocin®)].

Bis zu einer Proteinkonzentration von 6,5 µg/ml zeigten die mit dem 425(scFv)-Fragment inkubierten Zellen keine Veränderung bezüglich der Proteinsynthese im Vergleich zur Mediumkontrolle. Abschließend wurde die zytotoxische Wirksamkeit von 425(scFv)-ETA' gegenüber den murinen TM3 Zellen untersucht. Durchflusszytometrische Analysen zeigten bereits, dass 425(scFv)-ETA' an den murinen EGFR zu binden vermochte (Abb. III-17). Anhand der Abb. III-23 ist ersichtlich, dass 425(scFv)-ETA' eine deutliche zytotoxische Aktivität gegenüber den TM3 Zellen aufwies. Die IC₅₀ betrug dabei 0,004 µg/ml ($5,8 \times 10^{-11}$ M). Aufgrund von diesem Ergebnis ist eine unspezifische Toxizität von 425(scFv)-ETA' in Mäusen nicht auszuschließen.

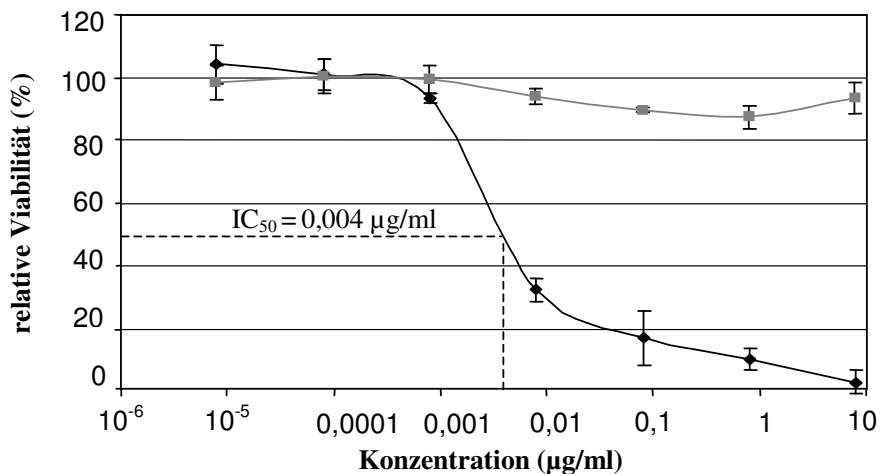


Abb. III-23: Zytotoxizitätsassay von 425(scFv)-ETA' auf murinen TM3 Zellen.

8 µg/ml 425(scFv)-ETA' wurden als Ausgangskonzentration auf 1×10^5 TM3 Zellen gegeben und anschließend 1/10 Verdünnungsschritte durchgeführt. Nach einer 48-stündigen Inkubation der Zellen mit dem Protein wurde das Substrat XTT hinzugefügt und für 24 h inkubiert (II.3.11). Die Proben wurden im Dreifachansatz eingesetzt und nach der Auswertung gemittelt in das Diagramm eingetragen. Die Konzentration ist logarithmisch aufgetragen. [■: RPMI-Medium + 1x PBS, ◆: 425(scFv)-ETA' in 1x PBS].

III.1.3.5 Stabilität von 425(scFv)-ETA' in Mausserum

Im Hinblick auf durchzuführende *in vivo* Experimente wurde im folgenden Versuch die Stabilität von 425(scFv)-ETA' in Mausserum untersucht. 2 µg des gereinigten Immuntoxins wurden in 200 µl 1:10 verdünntem Serum für verschiedene Zeiträume unter physiologischen Bedingungen inkubiert (II.3.13). Anschließend wurde sowohl die Menge an Vollängenprotein als auch die Funktionalität von 425(scFv)-ETA' nach Inkubation in Serum bestimmt. Abb. III-24 belegt, dass 425(scFv)-ETA' eine hohe Stabilität in Mausserum besitzt. Eine Inkubation des Immuntoxins von 24 h in Mausserum bei 37°C führte nicht zu einer Abnahme der Menge des Vollängenproteins. Des Weiteren konnten mittels Western-Blot-Analysen (Abb. III-24) und SDS-PAGE (Daten nicht gezeigt) keine Degradationsprodukte nachgewiesen werden. In den Proben 1-4 wurde neben der 425(scFv)-ETA' Bande noch eine weitere Bande (~67 kDa) detektiert. Da diese Bande auch in der Probe 7 (nur Serum) visualisiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass es sich um ein

kontaminierendes Protein aus dem Serum handelt, welches von dem Peroxidase (PO) gekoppelten anti-polyHis Ak unspezifisch erkannt wird.

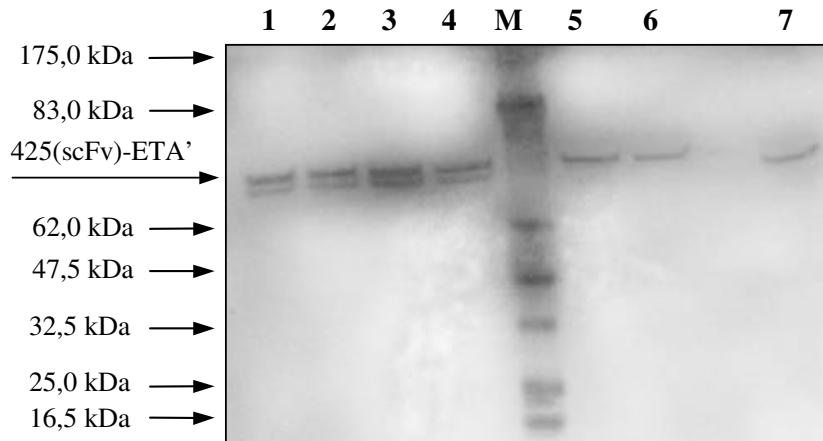


Abb. III-24: Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Stabilität von 425(scFv)-ETA' in Mausserum.

Nach einer 37°C Inkubation von 2 µg 425(scFv)-ETA' in 200 µl Mausserum (1:10 verdünnt in 1x PBS) für verschiedene Zeiträume (II.3.13) wurden die Proben in einer SDS-PAGE (II.3.4) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (II.3.7). Die Detektion der rekombinanten Proteine erfolgte mit 1:400 verdünntem PO gekoppelten anti-polyHis Ak (II.1.3). [1-4: 425(scFv)-ETA' + Mausserum, 1 h bei 37°C, 2: 425(scFv)-ETA' + Mausserum, 2 h bei 37°C, 3: 425(scFv)-ETA' + Mausserum, 5 h bei 37°C, 4: 425(scFv)-ETA' + Mausserum, 24 h bei 37°C, M: „Prestained Marker“ (Bio-Rad), 5: 425(scFv)-ETA' ohne Mausserum, 6: 425(scFv)-ETA' ohne Mausserum, 24 h bei 37°C, 7: Mausserum, 24 h bei 37°C].

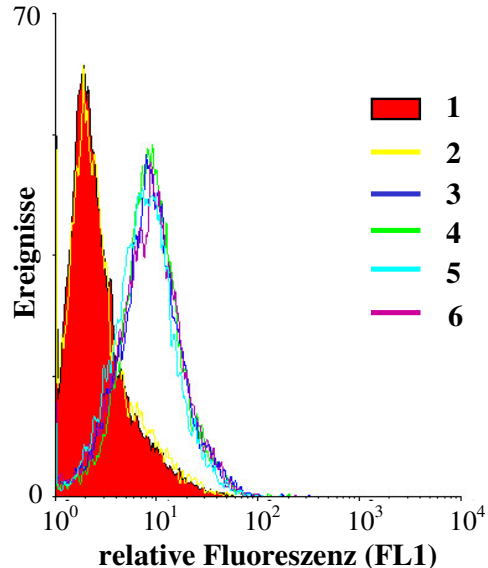


Abb. III-25: Durchflusszytometrische Analyse der Bindungsaktivität von 425(scFv)-ETA' nach Inkubation in Mausserum.

Nach der Inkubation von 425(scFv)-ETA' für 1 h, 5 h und 24 h in Mausserum bei 37°C (II.3.13) wurde die Bindungsaktivität des Immuntoxins gegenüber L3.6pl Zellen evaluiert. Der Nachweis der gebundenen rekombinanten Proteine erfolgte über den His10-Tag mit dem ALEXA[®]Fluor488 konjugierten anti-pentaHis Ak (II.1.3). Als Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit 1x PBS inkubiert. [1: Negativkontrolle: 1x PBS + Maus-anti-penta-His^{ALEXA} Ak, 2: Mausserum + Maus-anti-penta-His^{ALEXA} Ak, 3: 425(scFv)-ETA' + Mausserum (1 h) + Maus-anti-penta-His^{ALEXA} Ak, 4: 425(scFv)-ETA' + Mausserum (5 h) + Maus-anti-penta-His^{ALEXA} Ak, 5: 425(scFv)-ETA' + Mausserum (24 h) + Maus-anti-penta-His^{ALEXA} Ak, 6: 425(scFv)-ETA' + Maus-anti-penta-His^{ALEXA} Ak].

Die Überprüfung der Funktionalität von in Mausserum inkubierten Immuntoxinen mittels Durchflusszytometrie (Abb. III-25) zeigte, dass keine Abnahme der Bindungsaktivität (Probe 3-5) im Vergleich zu nicht in Serum inkubiertem 425(scFv)-ETA' (Probe 6) verzeichnet werden konnte.

III.1.4 In vivo Experimente mit 425(scFv)-ETA'

Nachdem die Bindungsaktivität und zytotoxische Wirksamkeit des periplasmatisch exprimierten und gereinigten Immuntoxins 425(scFv)-ETA' *in vitro* verifiziert werden konnte (III.1.3), sollte in folgenden Versuchen die anti-Tumoraktivität von 425(scFv)-ETA' gegenüber Pankreaskarzinomzellen *in vivo* evaluiert werden. Die Versuche erfolgten an vier bis sechs Wochen alten männlichen BALB/c Nacktmäusen (II.1.6) und wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Christiane Bruns (Chirurgische Klinik und Poliklinik Großhadern, Klinikum der Universität München (LMU)) durchgeführt. Die Produktion von reinem und funktionalem 425(scFv)-ETA' Immuntoxin wurde wie unter III.1.2.2 beschrieben durchgeführt.

III.1.4.1 Bestimmung der maximal tolerablen Dosis in Mäusen

Bevor die anti-Tumoraktivität von 425(scFv)-ETA' in Mäusen (III.1.4.2) untersucht werden konnte, wurde die maximal verträgliche Dosis (MTD) des Immuntoxins in gesunden Mäusen determiniert. Dazu wurden Gruppen von je zwei Mäusen mit verschiedenen Immuntoxin-konzentrationen (10-50 µg) behandelt (II.4.1). Das gereinigte 425(scFv)-ETA' (II.3.2.2, II.3.3) wurde in 1x PBS verdünnt und intravenös (i.v.) in die Schwanzvene appliziert. Als Kontrolle wurden zwei Mäuse nur mit 1x PBS behandelt. Sobald die Tiere klinisch eindeutige Krankheitsanzeichen zeigten (Inaktivität, Gewichtsabnahme) wurden die Tiere geopfert. Die in Tab. III-1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die MTD von 425(scFv)-ETA' in BALB/c Nacktmäusen 20 µg betrug. Nach i.v. Gabe von 30-50 µg 425(scFv)-ETA' mussten die Tiere aufgrund von Krankheitsanzeichen geopfert werden.

Tab. III-1: Bestimmung der MTD von 425(scFv)-ETA' in Nacktmäusen.

10-50 µg gereinigtes 425(scFv)-ETA' bzw. 1x PBS als Kontrolle wurden in die Schwanzvene von jeweils zwei Mäusen appliziert und die Tiere mehrere Tage beobachtet (II.4.1). In der Tabelle ist die Anzahl der überlebenden Tiere/Gesamtanzahl der behandelten Mäuse aufgeführt.

Tage nach Injektion	PBS	425(scFv)-ETA' [µg]				
		10	20	30	40	50
3	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
5	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2
8	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2
10	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2
14	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2

III.1.4.2 Anti-Tumorexperimente in einem disseminierten Mausmodell

Das erste Pilotexperiment zur Beurteilung der *in vivo* Wirksamkeit von 425(scFv)-ETA' gegenüber Pankreaskarzinomzellen erfolgte in einem disseminierten Tumormodell. Dazu wurden 1×10^6 L3.6pl Zellen i.v. in die Schwanzvene von Nacktmäusen injiziert (II.4.3). Vier Wochen nach Inokulation führten die disseminiert wachsenden Tumorzellen bei 100% der Tiere zu Mikrometastasen in der Lunge sowie zu Inzidenzen von Tumoren an dem Injektionsort. In dem innerhalb der Dissertation durchgeführten Tierexperiment sollte evaluiert werden, inwieweit 425(scFv)-ETA' eine anti-Tumoraktivität gegenüber in Mäusen disseminierten L3.6pl Zellen zeigt und die Entstehung von Metastasen verhindern kann. Das Immuntoxin wurde ebenfalls i.v. appliziert, wobei zwei verschiedene Therapiestrategien gewählt wurden. Einerseits erfolgte eine einmalige i.v. Behandlung mit der MTD von 20 μg am Tag 1 nach Tumorzellinokulation (Behandlungsgruppe 1). Eine weitere Gruppe von Tieren erhielt 4x 10 μg von 425(scFv)-ETA' an den Tagen 1, 2, 3 und 4 nach Tumorzellinjektion (Behandlungsgruppe 2). Als Kontrolle dienten Mäuse, die nur mit 1x PBS behandelt wurden (Behandlungsgruppe 3). Da das 425(scFv)-Fragment *in vitro* keine zytotoxische Aktivität gegenüber L3.6pl Zellen zeigte, wurde auf eine Behandlung von Tieren mit 425(scFv) in diesem Pilotexperiment verzichtet. Neunundvierzig Tage nach dem Beginn der Tumorzellgabe wurden alle Tiere geopfert und das Tiergewicht, Lungengewicht sowie die Anzahl der Lungenmetastasen und Schwanztumore beurteilt. Tab. III-2 zeigt, dass alle mit 1x PBS behandelten Mäuse Metastasen in der Lunge sowie Schwanztumore entwickelt haben. Die mittlere Anzahl der Lungenmetastasen betrug dabei 56,25 \pm 6,85 pro Tier. Im Gegensatz dazu wurden bei den meisten mit 425(scFv)-ETA' therapierten Mäusen keine Metastasen detektiert.

Tab. III-2: Behandlung disseminiert wachsender L3.6pl Tumore in Nacktmäusen mit 425(scFv)-ETA'.

19 Mäuse erhielten eine i.v. Injektion von 1×10^6 L3.6pl Zellen in die Schwanzvene (II.4.3). Einen Tag nach der Tumorzellinjektion wurden acht Tiere mit 1x 20 μg gereinigtem Immuntoxin (II.3.3, II.3.2.2) behandelt. Eine Gruppe von sieben Tieren erhielt eine i.v. Injektion von 4x 10 μg 425(scFv)-ETA' an den Tagen 1, 2, 3 und 4 nach Tumorzellinokulation. Vier Kontrolltiere wurden mit 1x PBS behandelt. MT: Metastasen, TU: Tumore.

	PBS	425(scFv)-ETA'	
		1x 20 μg	4x 10 μg
Anzahl Mäuse/Behandlungsgruppe	4	8	7
Anzahl Mäuse mit L3.6pl Lungen-MT/ Gesamtzahl Mäuse	4/4	3/8	2/7
Mittlere Anzahl Lungen-MT/Tier ¹ +/- Standardabweichung	56,25 +/- 6,85	0,875 +/- 1,36*	0,286 +/- 0,49°
L3.6pl Schwanz-TU [Anzahl Mäuse] ²	4/4	1/8*	0/7°

1 * $p < 0.0005$, 1x 20 μg gegenüber Kontrolle, ° $p < 0.0005$, 4x 10 μg gegenüber Kontrolle

2 * $p < 0.01$, 1x 20 μg gegenüber Kontrolle, ° $p < 0.003$, 4x 10 μg gegenüber Kontrolle

Nur 37,5% der Tiere der Behandlungsgruppe 1 (1x 20 µg) zeigten Lungenmetastasen mit einer mittleren Anzahl von 0,875 +/- 1,36 pro Tier. In der Behandlungsgruppe 2 (4x 10 µg) konnten sogar nur bei 28,6% der Mäuse Metastasen detektiert werden, wobei die mittlere Anzahl bei 0,286 +/- 0,49 pro Tier lag. Betrachtet man die Anzahl der Schwanztumore an der Injektionsstelle, so wurde nur bei einem Tier der Behandlungsgruppe 1 ein Tumor nachgewiesen.

Der Vergleich des Körpergewichts aller drei Gruppen ergab keinen signifikanten Unterschied, wobei die mit 425(scFv)-ETA' behandelten Tiere ein leicht höheres Gewicht aufwiesen (Behandlungsgruppe 1 = 23,7 +/- 3,1 g; Behandlungsgruppe 2 = 22,9 +/- 2,6 g) als die Kontrolltiere (22 +/- 2,3 g). Das mittlere Lungengewicht der Kontrollgruppe lag dagegen signifikant höher (0,23 +/- 0,04 g) im Vergleich zu dem Lungengewicht der Behandlungsgruppe 1 (0,14 +/- 0,03 g) und Behandlungsgruppe 2 (0,15 +/- 0,02 g).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine 425(scFv)-ETA' Behandlung von Mäusen, die mit L3.6pl Tumorzellen inokuliert wurden, zu einer signifikant niedrigeren Anzahl an Lungenmetastasen und Schwanztumoren führte.

III.1.4.2.1 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Neben der makroskopischen Auszählung der Lungenmetastasen wurde eine histomorphologische Untersuchung des Lungengewebes von der Kontrollgruppe (Behandlungsgruppe 3) und mit 425(scFv)-ETA' behandelten Mäusen (Behandlungsgruppe 1 und 2) durchgeführt. Dazu wurde das Lungengewebe in Formalin fixiert (II.4.4) und nach Einbettung in Paraffin (II.4.5) einer Hämatoxilin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) (II.4.6) unterzogen. Die Ergebnisse sind in Abb. III-26 dargestellt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass das Lungengewebe der mit 1x PBS behandelten Kontrolltiere mehrere Mikrometastasen aufweist (Bild A + B, Abb. III-26). Im Gegensatz dazu zeigen die angefärbten Lungengewebeschnitte der mit 425(scFv)-ETA' therapierten Mäuse keine Metastasen (Bild C + D, Abb. III-26).

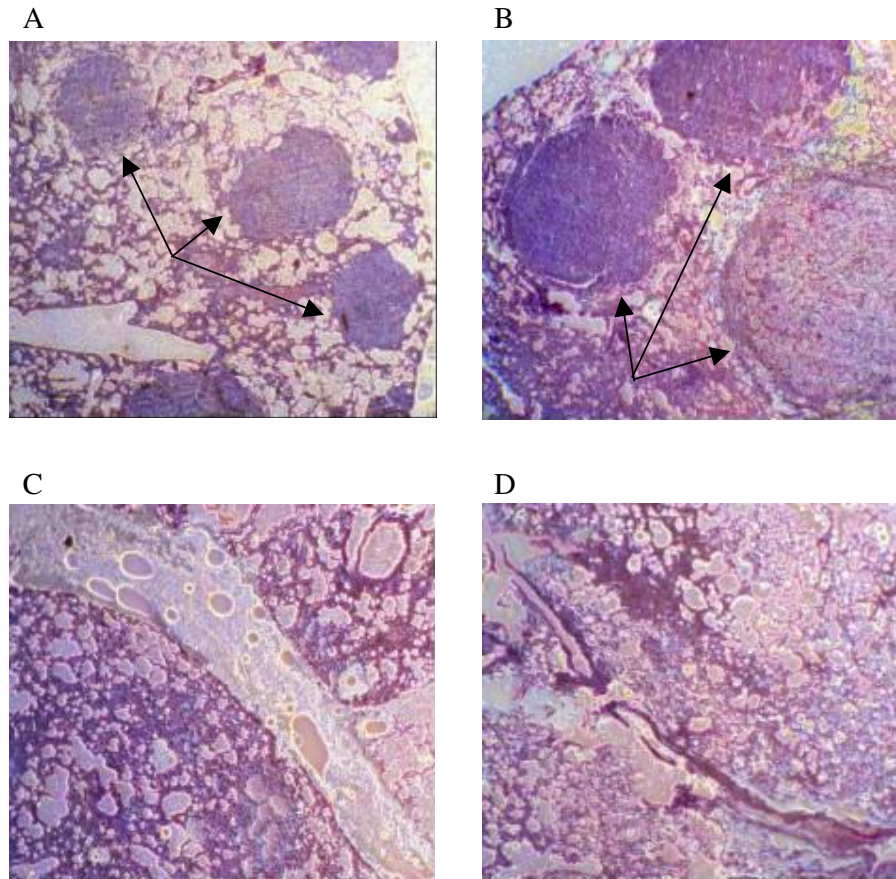


Abb. III-26: H&E-Färbung von Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingettetem Lungengewebe.

Lungengewebe von unbehandelten und mit 425(scFv)-ETA' therapierten Tieren (III.1.4.2) wurde fixiert (II.4.4) und nach Einbettung in Paraffin (II.4.5) mittels H&E (II.4.6) angefärbt. Die dargestellten Bilder sind 40x vergrößert. Die Pfeile weisen auf die im Gewebe vorhandenen Metastasen hin. [A + B: Kontrolle (1x PBS), C: 4x 10 µg 425(scFv)-ETA', D: 1x 20 µg 425(scFv)-ETA'].

III.2 Konstruktion, Expression und Charakterisierung von Gb-, Ang- und ECP-basierten Immuntoxinen

Im ersten Teil der Arbeit (III.1) wurde im Hinblick auf eine Immuntherapie von metastasierendem Pankreaskarzinom ein 425(scFv)-Immuntoxin mit dem bakteriellen Toxin ETA' generiert und charakterisiert. Im zweiten Teil der Arbeit (III.2) wurden ebenfalls 425(scFv)-basierte Immuntoxine hergestellt, die jedoch zur Reduzierung der Immunogenität humane Enzyme als Effektor-domänen (hE) enthielten. Dazu wurden das bereits als Immuntoxinkomponente beschriebene Ang sowie die Proteine ECP und Gb verwendet. Bei Ang und ECP handelt es sich um RNasen, wohingegen Gb eine proteolytische Aktivität besitzt. Um zu bewerten, ob die Position der Effektor-domänen deren Funktionalität beeinflusst, sollten sowohl 425(scFv)-Immuntoxine mit C-terminal lokalisiertem Enzym (III.2.1) als auch mit N-terminal lokalisiertem Enzym (III.2.2) hergestellt werden.

III.2.1 Generierung und Charakterisierung von 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-Gb und 425(scFv)-ECP

Zunächst wurden Immunttoxine mit C-terminal lokalisierter Effektor-domäne generiert. Die resultierenden Fusionsproteine 425(scFv)-hE wurden sowohl in *E. coli* (III.2.1.1) als auch in eukaryotischen Zellen (III.2.1.2) exprimiert, um nach ersten Expressionsstudien das besser geeignete Expressionssystem hinsichtlich Proteinausbeute, Stabilität und Funktionalität auszuwählen.

III.2.1.1 Konstruktion und Expression der Immuntoxine 425(scFv)-hE in Prokaryoten

III.2.1.1.1 Konstruktion von pBM1.1-425(scFv)-Ang, pBM1.1-425(scFv)-Gb und pBM1.1-425(scFv)-ECP

Für die prokaryotische Expression der 425(scFv)-hE Immuntoxine wurde der schon in III.1.1 beschriebene Vektor pBM1.1 (II.1.7) verwendet.

Die Klonierung der Konstrukte pBM1.1-425(scFv)-Ang, pBM1.1-425(scFv)-Gb und pBM1.1-425(scFv)-ECP erfolgte in einem Schritt. Dazu wurden sowohl die Vektoren pMSII-Ki-4(scFv)-Ang, pMSII-Ki-4(scFv)-Gb und pMSII-Ki-4(scFv)-ECP (II.1.7) als auch der Vektor pBM1.1-425(scFv)-ETA' mit den Endonukleasen *NotI* und *BspI* restringiert (II.2.2.1) und der Vektoranteil (pBM1.1-425(scFv)) bzw. die Enzyme (Ang, Gb, ECP) in einer präparativen Gelelektrophorese (II.2.3.2) gereinigt. Die Vektor-DNA wurde mit SAP dephosphoryliert (II.2.2.3) und anschließend eine Ligation (II.2.2.4) des geschnittenen pBM1.1-425(scFv)-Vektors mit den jeweiligen Enzym-Fragmenten durchgeführt. Nach der Transformation der Ligationsansätze in hitzekompetente *E. coli* XL1-blue Zellen (II.2.5.2) wurden aus rekombinanten Klonen die Plasmide isoliert (II.2.6.1), diese einer Kontrollrestriktion (II.2.2.1) unterzogen und gelelektrophoretisch aufgetrennt (II.2.3.1). Da sich die Größe des aus dem Vektor pBM1.1 herausgeschnittenen ETA'-Fragmentes (1228 bp) von der Größe der insertierten Enzym-Fragmente (Ang: 409 bp, ECP: 439 bp und Gb: 721 bp) eindeutig unterscheidet, wurde eine Restriktion mit den für die Klonierung verwendeten Enzymen *NotI* und *BspI* durchgeführt.

pBM1.1-Plasmide, welche die jeweiligen Toxin-Fragmente am 3' Ende des 425(scFv)-Fragmentes inkorporiert hatten, wurden anschließend für die Sequenzierung vorbereitet (II.2.7). Die als korrekt identifizierte Plasmid-DNA der Konstrukte pBM1.1-425(scFv)-Ang, pBM1.1-425(scFv)-Gb und pBM1.1-425(scFv)-ECP wurde zur periplasmatischen Expression der Immuntoxine in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Die DNA- und AS-Sequenzen der Enzyme Ang, ECP und Gb sind im Anhang (VII.2.2, VII.2.3, VII.2.4) abgebildet.

III.2.1.1.2 Periplasmatische Expression, Ni²⁺-NTA-Reinigung und Charakterisierung der Immuntoxine 425(scFv)-hE

Analog zu dem in Abschnitt II.3.2.2 beschriebenen Protokoll wurde eine periplasmatische Expression der rekombinanten Immuntoxine unter osmotischem Stress im 600 ml Maßstab durchgeführt. Die Induktion erfolgte nach Zugabe der Salze sowie des kompatiblen Soluts Betain durch 2 mM IPTG für 6 h bei 26°C. Nach Separation der Bakterienzellen mittels Zentrifugation wurden die Zellen durch Ultraschall (II.3.2.2) aufgeschlossen und die geklärte entsalzte periplasmatische Fraktion für die Ni²⁺-NTA-Reinigung (II.3.3.1) verwendet. Die während der Reinigung gesammelten Fraktionen wurden anschließend in einer SDS-PAGE (II.3.4) aufgetrennt und im Western-Blot (II.3.7) analysiert.

Anhand Abb. III-27 ist zu erkennen, dass alle drei rekombinanten Immuntoxine in *E. coli* exprimiert wurden und sich aus der periplasmatischen Fraktion mittels Affinitätschromatographie reinigen ließen. Die mit dem grauen Pfeil markierten Banden entsprachen der Größe nach ungefähr dem theoretisch ermittelten Molekulargewicht der Immuntoxine von 46,9 kDa (425(scFv)-ECP), 56,9 kDa (425(scFv)-Gb) und 45,5 kDa (425(scFv)-Ang).

In allen drei Western-Blots (A, B, C) konnte das rekombinante Immuntoxin nicht in der periplasmatischen Fraktion sondern erst nach erfolgter Konzentrierung durch die Ni²⁺-NTA-Reinigung in den Elutionsfraktionen detektiert werden. 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb wurden nur in der ersten Elutionsfraktion nachgewiesen, wohingegen 425(scFv)-Ang-Banden in den Elutionsfraktionen 1 bis 3 visualisiert werden konnten. Die Proteinkonzentration von allen drei Immuntoxinen war sehr gering und betrug ~15 ng/µl für 425(scFv)-Gb und 425(scFv)-ECP (Elutionsfraktion 1). Die vereinigten Elutionsfraktionen 1 bis 3 von 425(scFv)-Ang wiesen eine Konzentration von 10 ng/µl auf. Damit lässt sich eine absolute Konzentration von 6 µg/600 ml Kultur für 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb bzw. 12 µg/600 ml Kultur für 425(scFv)-Ang bestimmen. Dies entspricht einer Ausbeute von 0,01 mg/l Kultur (0,75 µg/g Zellpellet) für 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb bzw. 0,02 mg/l Kultur (1,5 µg/g Zellpellet) für 425(scFv)-Ang. Weiterhin zeigt die Abb. III-27, C, dass eine Vielzahl von Banden in den 425(scFv)-Ang Elutionsfraktionen zu erkennen sind, die kleiner als 47 kDa sind. Sehr wahrscheinlich entsprechen diese Banden größtenteils Degradationsprodukten von 425(scFv)-Ang, da die Analyse der Fraktionen aus einer Reinigung der periplasmatischen Fraktion des untransformierten Wildtyps die meisten dieser Banden nicht zeigte.

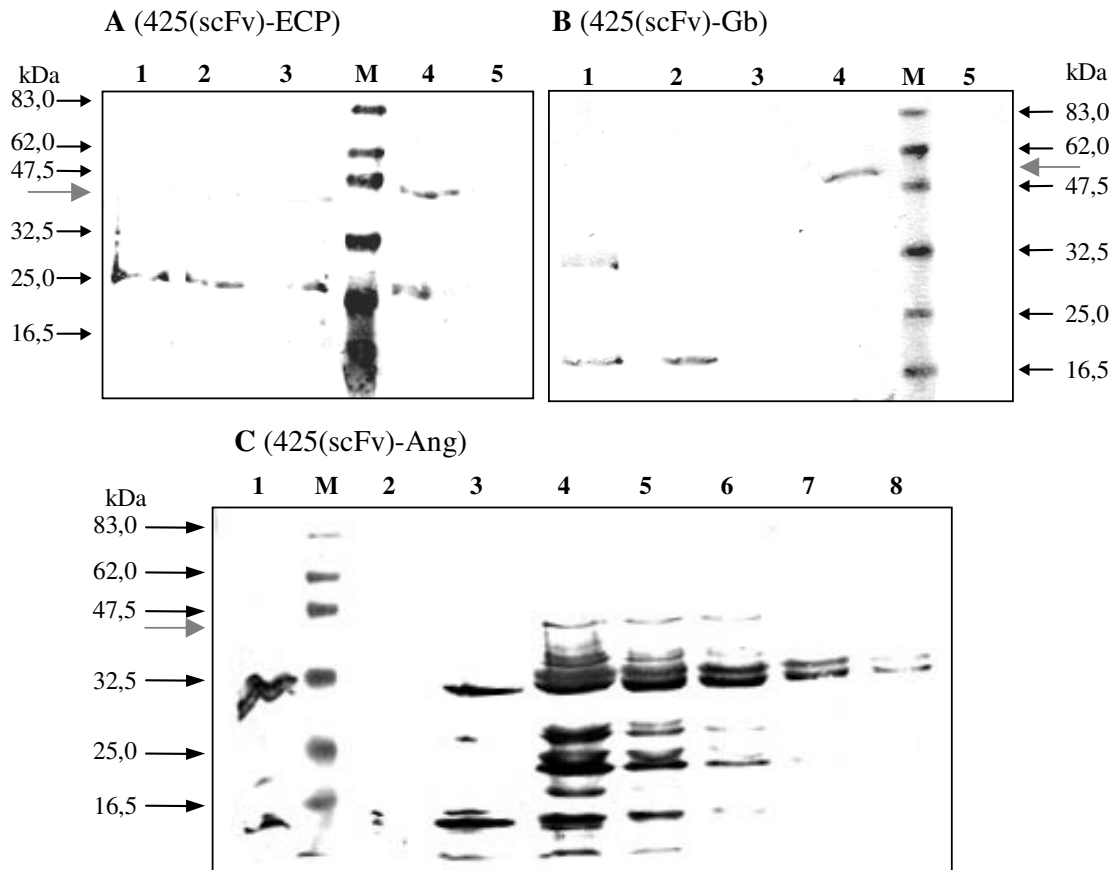


Abb. III-27: Western-Blots zur Analyse der Expression und Ni²⁺-NTA-Reinigung von 425(scFv)-ECP, 425(scFv)-Gb und 425(scFv)-Ang.

Die Immuntoxine wurden im 600 ml Maßstab unter osmotischem Stress exprimiert (II.3.2.2). Die jeweiligen entsalzten periplasmatischen Fraktionen wurden mittels einer Ni²⁺-NTA-Säule gereinigt. Nach dem Waschen mit 10 mM Imidazol wurden die Proteine mit 500 mM Imidazol eluiert und in 400 µl Fraktionen gesammelt. 15 µl der verschiedenen Fraktionen wurden in einer 12%igen SDS-PAGE (II.3.4) aufgetrennt und im Western-Blot (II.3.6) auf eine Membran transferiert. Die Immuntoxine wurden über den N-terminalen His₁₀-Tag durch einen Maus-anti-penta-His und ZAM^{AP} Ak nachgewiesen. Die Visualisierung der Banden erfolgte mit NBT/BCIP über eine AP-Reaktion. Der graue Pfeil markiert die den Immuntoxinen entsprechenden Banden. [A (425(scFv)-ECP): 1: Periplasmatische Fraktion, 2: Durchfluss der Ni²⁺-NTA-Säule, 3: Waschfraktion (10 mM Imidazol), M: „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB), 4+5: Elutionsfraktionen 1+2 (500 mM Imidazol); B (425(scFv)-Gb): 1: Periplasmatische Fraktion, 2: Durchfluss der Ni²⁺-NTA-Säule, 3: Waschfraktion (10 mM Imidazol), 4+5: Elutionsfraktionen 1+2 (500 mM Imidazol), M: „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB); C (425(scFv)-Ang): 1: Periplasmatische Fraktion, M: „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB), 2: Durchfluss der Ni²⁺-NTA-Säule, 3: Waschfraktion (10 mM Imidazol), 4-8: Elutionsfraktionen 1-5 (500 mM Imidazol)].

In der Elutionsfraktion 1 von 425(scFv)-ECP wurde ein 25 kDa Protein detektiert, was ebenfalls sehr wahrscheinlich auf ein Degradationsprodukt zurückzuführen ist. Auf eine Darstellung der korrespondierenden SDS-PAA-Gele wurde verzichtet, da aufgrund der niedrigen Konzentration keine Banden detektiert werden konnten, die eindeutig den Immuntoxinen 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-Gb und 425(scFv)-ECP entsprachen.

In nachfolgenden Experimenten sollte die Expressionsrate der periplasmatisch exprimierten Immuntoxine durch Variation der Kultur- und Induktionsbedingungen optimiert bzw. gesteigert werden. Dazu wurde z.B. der Einfluss von verschiedenen Induktionstemperaturen, Induktions-

zeiten und IPTG-Konzentrationen auf die Ausbeute untersucht. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass sich die Expressionsrate der verschiedenen Immuntoxine nicht steigern ließ (Daten nicht dargestellt).

Zur Überprüfung der Funktionalität der Immuntoxine 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-Gb und 425(scFv)-ECP wurde ein Zellmembran-ELISA (II.3.9.1) durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Mengen der jeweiligen vereinigten Elutionsfraktionen auf eine mit L3.6pl-Membranfraktionen beschichtete Maxisorp-ELISA-Platte gegeben und inkubiert. Aufgrund der hohen Imidazolkonzentration wurden die Elutionsfraktionen zuvor in 1x PBS umgepuffert. Um eine unspezifische Bindungsaktivität auszuschließen wurden die Proben ebenfalls auf eine mit EGFR-negativen HL60-Membranfraktionen beschichtete Platte gegeben. Abb. III-28 belegt, dass alle drei Ni²⁺-NTA gereinigten Immuntoxine Bindungsaktivität gegenüber der EGFR-positiven L3.6pl Zelllinie zeigten. Bei der Verwendung von HL60-Membranfraktionen konnten dagegen im Vergleich zur Negativkontrolle keine signifikant höheren Extinktionswerte detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Auf Grund der niedrigen Proteinausbeute war es nicht möglich die Funktionalität der toxischen Domänen mittels eines Zytotoxizitätsassays zu überprüfen.

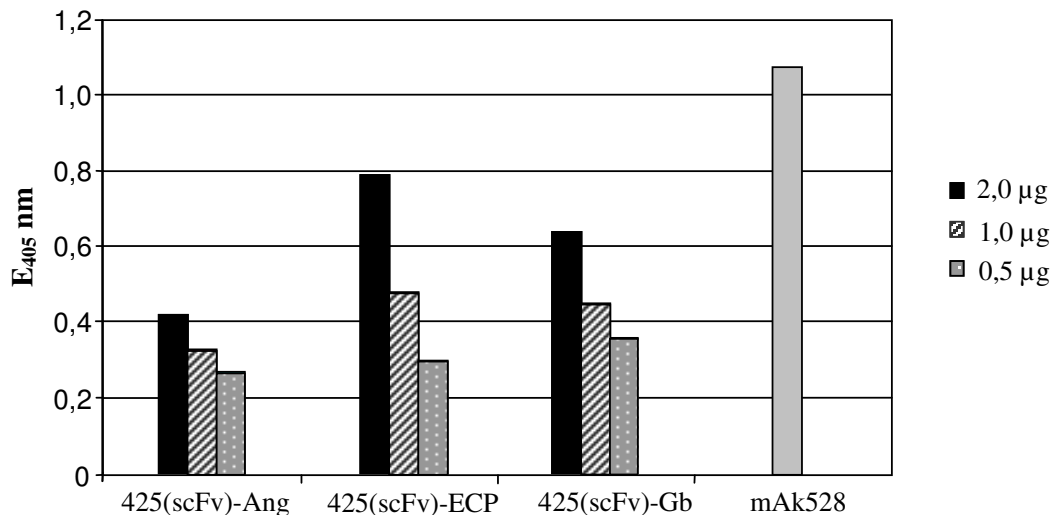


Abb. III-28: Zellmembran-ELISA zum Nachweis der Bindungsaktivität von prokaryotisch exprimierten 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-Gb und 425(scFv)-ECP.

2 µg, 1 µg und 0,5 µg der jeweiligen Elutionsfraktionen wurden für 1 h auf einer mit L3.6pl-Membranfraktionen beschichteten Platte inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Immuntoxine erfolgte mit den Ak Maus-anti-penta-His und ZAM^{HRPO}. Nach einer 20-minütigen Inkubation mit dem ABTS-Substrat wurde die Extinktion bei 405 nm gemessen. Als Positivkontrolle wurde der mAk528 (3 µg) verwendet.

III.2.1.2 Konstruktion und Expression der Immuntoxine 425(scFv)-hE in Eukaryoten

Die Expression der 425(scFv)-hE Fusionsproteine in Prokaryoten zeigte eine schlechte Proteinausbeute (III.2.1.1.2). Außerdem lagen die Immuntoxine in z.T. stark degradiert Form

vor. In folgenden Experimenten sollte überprüft werden, inwieweit die eukaryotische Expression von 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb zu höheren Ausbeuten bzw. besserer Qualität der Proteine führt.

III.2.1.2.1 Konstruktion von pMSII-425(scFv)-Ang, pMSII-425(scFv)-Gb und pMSII-425(scFv)-ECP

Für die eukaryotische Expression der Immuntoxine 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb wurde das Plasmid pMSII (II.1.7) verwendet. Die sich am N-Terminus der rekombinanten Proteine befindliche Ig κ -Signalsequenz erzwingt die Sezernierung der Immuntoxine in den Kulturüberstand. Neben einem C-terminalen His6-Tag, der für die Detektion und Reinigung der exprimierten Proteine benutzt werden kann, befindet sich in dem Plasmid noch ein zu Detektionszwecken verwendbarer C-terminaler c-myc-Tag. Die Expression der rekombinanten Proteine steht unter der Kontrolle des starken CMV-Promotors. Die in dem pMSII-Plasmid enthaltenen Gene für eine Zeocin[®]-Resistenz und dem EGFP dienen der Selektion von transfizierten Zellen (STÖCKER *et al.* 2003).

Ausgehend von den Konstrukten pBM1.1-425(scFv)-Ang, pBM1.1-425(scFv)-ECP und pBM1.1-425(scFv)-Gb (III.2.1.1.1) wurde die DNA der Immuntoxine in einem Klonierungsschritt via den Schnittstellen *Sfi*I und *Bln*I in den Vektor pMSII-Ki-4(scFv)-Ang kloniert (II.2.2.1, II.2.3.2). Dadurch wurde das Immuntoxin Ki-4(scFv)-Ang durch die jeweiligen 425(scFv)-Immuntoxine ausgetauscht. Die ligierte DNA wurde anschließend in *E. coli* XL1-blue Zellen transformiert, aus den rekombinanten Klonen die Plasmide isoliert (II.2.6.1) und diese dann mittels Kontrollrestriktion (II.2.2.1) und Gelelektrophorese (II.2.3.1) analysiert. Dazu wurden die Enzyme *Sfi*I und *Bln*I sowie die Endonuclease *Sac*I verwendet, da diese spezifisch in dem 425(scFv)-Fragment schneidet. Mittels Sequenzierung (II.2.7) wurde die korrekte Sequenz der inkorporierten DNA verifiziert. Für die nachfolgende Transfektion der DNA (II.3.1.1, III.2.1.2.2) in HEK293T Zellen wurde eine Maxipräparation (II.2.6.2) der jeweiligen Klone durchgeführt, so dass genügend Plasmid-DNA zur Verfügung stand.

III.2.1.2.2 Expression der Immuntoxine 425(scFv)-hE in Eukaryoten und Reinigung mittels Affinitätschromatographie

HEK293T Zellen wurden mit der Plasmid-DNA der Klone pMSII-425(scFv)-Ang, pMSII-425(scFv)-ECP und pMSII-425(scFv)-Gb transfiziert (II.3.1.1). Nach einer dreitägigen Inkubation wurde die Transfektionseffizienz mit Hilfe des grün-fluoreszierenden Proteins EGFP im Mikroskop kontrolliert. Die Zellen wurden anschließend in Kulturflaschen expandiert und durch Zugabe von Zeocin[®]-haltigem Medium weiter selektioniert. Nach einer Anreicherung von transfizierten Zellen bis zu 90% (II.3.1.2) wurde der Kulturüberstand der HEK293T Zellen abgenommen und auf das Vorhandensein von rekombinanten Proteinen überprüft. Dazu wurde

eine Proteinpräparation mittels Affinitätschromatographie (II.3.1.3) durchgeführt. Jeweils 15 μ l der Elutionsfraktionen wurden in SDS-PAGE (II.3.4) und Western-Blots (II.3.7) analysiert.

Der in Abb. III-29 dargestellte Western-Blot belegt, dass die drei Immuntoxine 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-Gb und 425(scFv)-ECP erfolgreich in eukaryotischen HEK293T Zellen exprimiert und in den Kulturüberstand sezerniert wurden. Weiterhin ließen sie sich über Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie reinigen und konzentrieren. Die im SDS-PAA-Gel und Western-Blot detektierten Banden entsprachen dabei ungefähr der erwarteten Größe von 45,1 kDa für das Immuntoxin 425(scFv)-Ang.

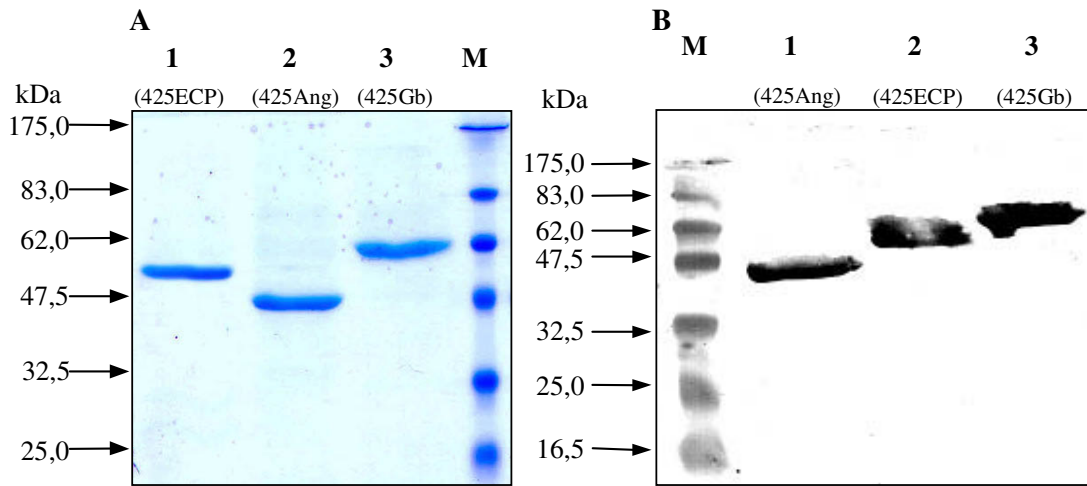


Abb. III-29: SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse von eukaryotisch exprimierten und Ni^{2+} -NTA gereinigten 425(scFv)-hE Immuntoxinen.

Jeweils 40 ml Zellkulturüberstand der transfizierten HEK293T Zellen wurden mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Die Elution der gebundenen rekombinanten Immuntoxine von der Ni^{2+} -NTA-Matrix erfolgte mit 400 μ l Elutionspuffer. 15 μ l dieser Elutionsfraktionen wurden sowohl in einer SDS-PAGE (A) aufgetrennt als auch mittels Western-Blot (B) analysiert. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie Brilliant blue (Serva) gefärbt. Die Detektion des Blots erfolgte mit einem Maus-anti-penta-His und ZAM^{AP} Ak sowie dem Substrat NBT/BCIP. [A: 1: 425(scFv)-ECP, 2: 425(scFv)-Ang, 3: 425(scFv)-Gb, M: „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB), B: M: „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB), 1: 425(scFv)-Ang, 2: 425(scFv)-ECP, 3: 425(scFv)-Gb].

Die detektierten Größen der Immuntoxine 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb lagen etwas höher als die theoretisch berechneten Größen von 46,5 kDa für 425(scFv)-ECP und 56,5 kDa für 425(scFv)-Gb. Dies kann auf posttranslationale Glykosylierungen zurückgeführt werden, da sowohl ECP als auch Gb drei bzw. zwei potentielle Glykosylierungsstellen besitzen. Anhand des SDS-PAA-Gels ist des Weiteren ersichtlich, dass in den Ni^{2+} -NTA-Elutionsfraktionen keine größeren Mengen an kontaminierenden Proteinen oder Degradationsprodukten nachgewiesen werden konnten.

Die Immuntoxine konnten im Western-Blot nicht nur über den His6-Tag sondern auch über den c-myc-Tag und einen Maus-anti-c-myc Ak detektiert werden (Daten nicht dargestellt). Die Konzentrationen der gereinigten Immuntoxine wurden auf 247 ng/ μ l für 425(scFv)-Ang, 210 ng/ μ l für 425(scFv)-ECP und 250 ng/ μ l für 425(scFv)-Gb bestimmt. Da das Elutionsvolumen jeweils 400 μ l betrug und der Überstand von 2×10^7 Zellen bzw. 0,052 g Zellen gereinigt wurde,

ergibt sich eine Ausbeute von 1,9 mg/g Zellen für 425(scFv)-Ang, 1,63 mg/g Zellen für 425(scFv)-ECP bzw. 1,92 mg/g Zellen für 425(scFv)-Gb.

III.2.1.2.3 Überprüfung der Bindungsaktivität mittels Durchflusszytometrie und Zellmembran-ELISA

Um die Bindungsaktivität der eukaryotisch exprimierten und Ni^{2+} -NTA gereinigten Immuntoxine gegenüber dem EGFR zu überprüfen, wurden sowohl durchflusszytometrische Analysen als auch Zellmembran-ELISAs durchgeführt. Für die Durchflusszytometrie wurden jeweils 5 μg von 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb mit 5×10^5 L3.6pl Zellen inkubiert. Das in Abb. III-30, A dargestellte Histogramm belegt, dass die mit den Immuntoxinen inkubierten L3.6pl Zellen eine deutliche Fluoreszenzverschiebung im Vergleich zur Negativkontrolle aufwiesen, womit die Bindungsaktivität von 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb an L3.6pl Zellen bestätigt wurde. Alle drei Immuntoxine zeigten dieselbe Bindungsaktivität, da die jeweiligen Maxima der detektierten relativen Fluoreszenz im selben Bereich lagen.

Weiterhin ist ersichtlich, dass keine Kreuzreaktivität der Immuntoxine mit der Negativzelllinie HL60 vorlag, was auf eine spezifische Bindung an den EGFR hindeutet (Abb. III-30, B).

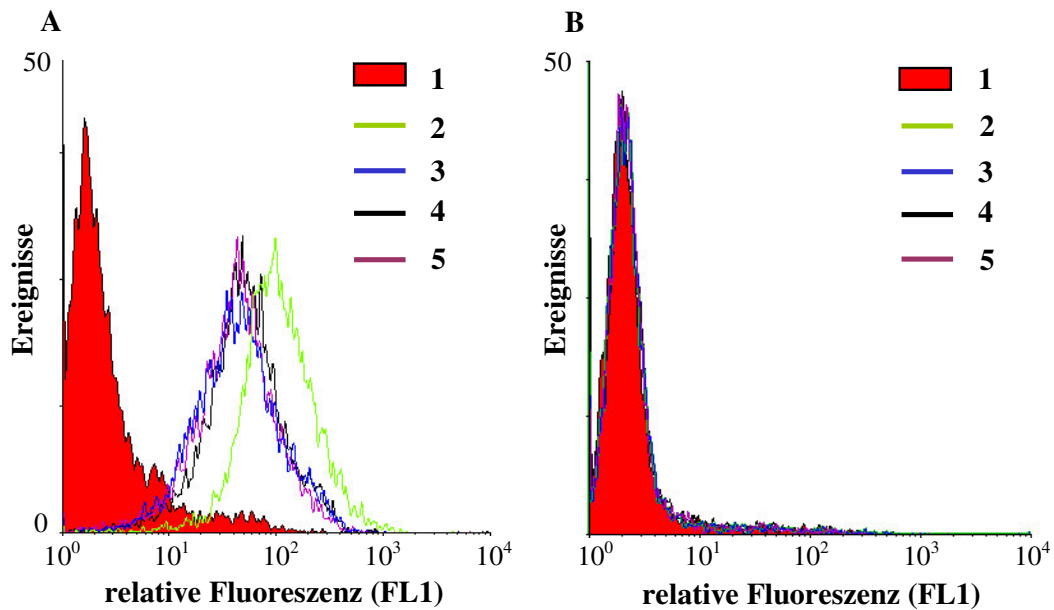


Abb. III-30: Histogramm der Durchflusszytometrie von eukaryotisch exprimierten und gereinigten Immuntoxinen.

Es wurden jeweils 5 μg affinitätsgereinigtes und in 1x PBS umgepuffertes Protein (III.2.1.2.2) mit 5×10^5 L3.6pl (A) und 5×10^5 HL60 Zellen (B) für 45 min inkubiert (II.3.10). Der Nachweis der gebundenen rekombinanten Proteine erfolgte über den c-myc-Tag mit einem Maus-anti-c-myc Ak und ZAM^{FITC} Ak (II.1.3). [1: Negativkontrolle: 1x PBS + Maus-anti-c-myc und ZAM^{FITC} Ak, 2: Positivkontrolle: mAk528 (3 μg) + ZAM^{FITC} Ak, 3: 425(scFv)-Ang + Maus-anti-c-myc und ZAM^{FITC} Ak, 4: 425(scFv)-ECP + Maus-anti-c-myc und ZAM^{FITC} Ak, 5: 425(scFv)-Gb + Maus-anti-c-myc und ZAM^{FITC} Ak].

Die mittels Durchflusszytometrie generierten Bindungsdaten der Immuntoxine wurden durch die Ergebnisse eines Zellmembran-ELISAs bestätigt. Die Daten sind in Abb. III-31 zusammengefasst. Aus den Messwerten ist ersichtlich, dass 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb funktional waren und an die immobilisierten Membranfraktionen binden konnten. An den entsprechend den steigenden Verdünnungen, abnehmenden Extinktionswerten ist der direkte Zusammenhang zwischen aufgetragener Proteinmenge und der Menge an bindenden Immuntoxinen zu erkennen.

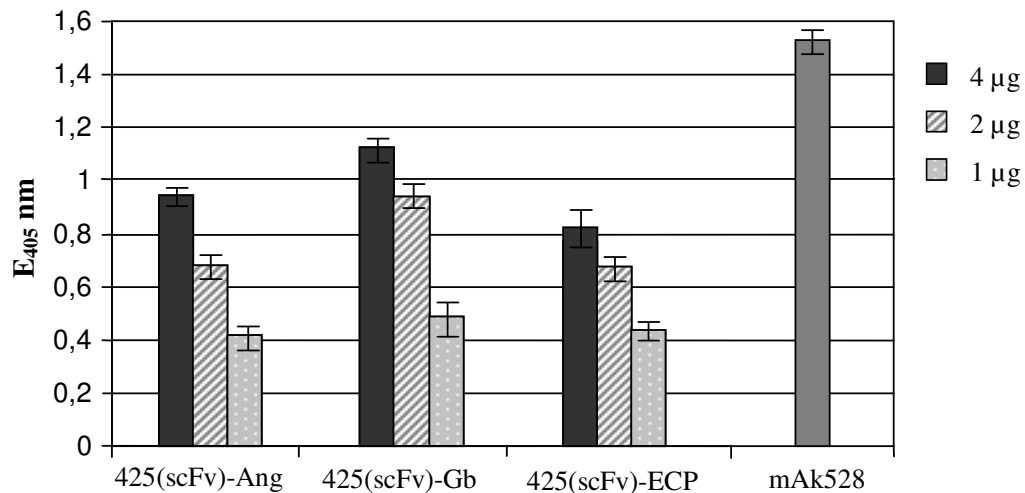


Abb. III-31: Zellmembran-ELISA von eukaryotisch exprimierten und gereinigten Immuntoxinen zum Nachweis der Bindungsaktivität.

4 µg, 2 µg und 1 µg der jeweiligen Proteinpräparationen (III.2.1.2.2) wurden für 1 h auf einer mit L3.6pl-Membranfraktionen beschichteten Platte inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der mAk528 (4 µg) verwendet. Der Nachweis der gebundenen Immuntoxine erfolgte mit den Ak Maus-anti-penta-His und ZAM^{HRPO} und dem ABTS-Substrat, welches für 20 min inkubiert wurde. Jede Probe wurde in einem Dreifachansatz gemessen und die entsprechenden Mittelwerte dargestellt.

III.2.1.2.4 Charakterisierung der zytotoxischen Aktivität gegenüber L3.6pl Zellen

Nachdem die Bindungsaktivität der Immuntoxine 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb erfolgreich verifiziert werden konnte (III.2.1.2.3), wurde anschließend die Funktionalität der toxischen Domäne evaluiert. Dazu wurde wie schon in III.1.3.4 beschrieben ein XTT-basierender Zytotoxizitätsassay durchgeführt. In Abb. III-32 ist die zytotoxische Wirkung von 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-Gb und 425(scFv)-ECP gegenüber L3.6pl Zellen dargestellt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die beiden rekombinanten Immuntoxine 425(scFv)-Ang und 425(scFv)-Gb einen zytotoxischen Effekt auf die EGFR-positiven Zellen haben. Ausgehend von den eingesetzten Anfangskonzentrationen von 0,88 µg/ml lässt sich eine IC₅₀ von ca. 0,38 µg/ml (6,7x 10⁻⁹ M) für 425(scFv)-Gb bzw. 0,43 µg/ml (9,5x 10⁻⁹ M) für 425(scFv)-Ang ermitteln. Weiterhin ist ersichtlich, dass beide Immuntoxine kein vollständiges Abtöten der Pankreas-karzinomzellen bei einer Konzentration von 0,88 µg/ml erreichen. Selbst bei einer Inkubation der Tumorzellen mit 10 µg/ml Immuntoxin wurde eine relative Viabilität von 35% nicht unterschritten (Daten nicht dargestellt). Gegenüber den EGFR-negativen Zelllinien HL60 und

L540 konnte keine zytotoxische Wirkung von 425(scFv)-Ang und 425(scFv)-Gb festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu 425(scFv)-Ang und 425(scFv)-Gb zeigte das Immuntoxin 425(scFv)-ECP keinen zytotoxischen Effekt gegenüber den L3.6pl Zellen.

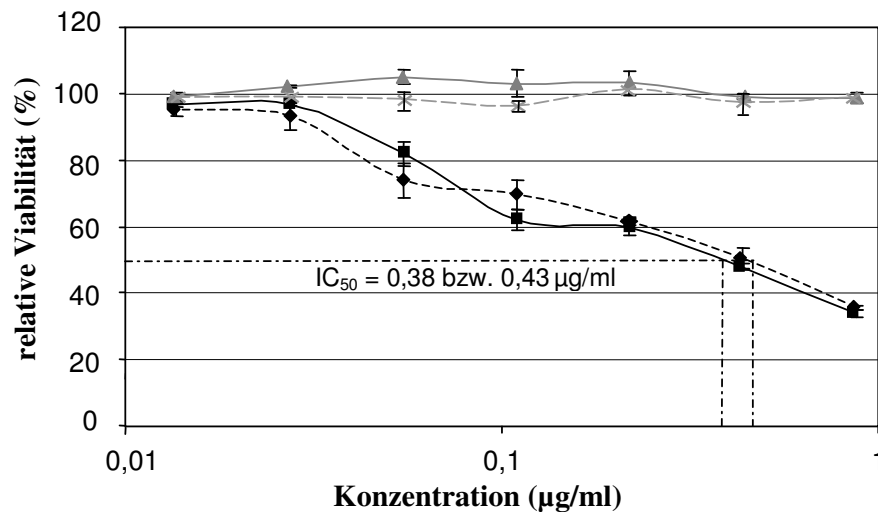


Abb. III-32: Zytotoxizitätsassay von 425(scFv)-Ang und 425(scFv)-Gb auf L3.6pl Zellen.

0,88 µg/ml der affinitätsgereinigten Immuntoxine 425(scFv)-Ang und 425(scFv)-Gb wurden als Ausgangskonzentration auf 1×10^5 L3.6pl Zellen gegeben und anschließend 1/2 Verdünnungsschritte durchgeführt. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurde das Substrat XTT hinzugefügt und für 24 h inkubiert (II.3.11). Die Proben wurden im Dreifachansatz eingesetzt und nach der Auswertung gemittelt in das Diagramm eingetragen. Die Konzentration der rekombinanten Immuntoxine sind logarithmisch aufgetragen. Anhand der Kurven wurde eine IC_{50} von 0,38 µg/ml für 425(scFv)-Gb und 0,43 µg/ml für 425(scFv)-Ang ermittelt. [▲ : RPMI-Medium + 1x PBS, ◆ : 425(scFv)-Ang in 1x PBS, ■ : 425(scFv)-Gb in 1x PBS, × : 425(scFv)-ECP in 1x PBS].

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die eukaryotische Expression der 425(scFv)-hE zu wesentlich besseren Ergebnissen bezüglich Proteinausbeute und Stabilität führte als die Expression der entsprechenden Immuntoxine in *E. coli*. Die durchschnittliche Proteinausbeute der in HEK293T Zellen exprimierten Immuntoxine lag im Bereich von ca. 1,6 bis 1,9 mg/g Zellen. In *E. coli* wurde dagegen nur eine Ausbeute von ca. 0,75 bis 1,5 µg/g Zellen erreicht. Bei dem Vergleich der Proteinmenge/g Zellen ist zu bedenken, dass der Wassergehalt der pro- und eukaryotischen Zellen nicht identisch ist. Des Weiteren war der Reinigungsgrad nach der Affinitätsreinigung mit Ni^{2+} -NTA bei eukaryotisch exprimierten Immuntoxinen höher. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in folgenden Versuchen auf eine Produktion in Prokaryoten verzichtet.

Die Bestimmung der IC_{50} von 425(scFv)-Ang und 425(scFv)-Gb ergab Werte, die mit 0,43 µg/ml bzw. 0,38 µg/ml im Vergleich zur IC_{50} von 425(scFv)-ETA' (0,0075 µg/ml) deutlich höher lagen (57 bzw. 50fach höher). 425(scFv)-ECP zeigte keinen zytotoxischen Effekt. In folgenden Experimenten (III.2.2) sollte untersucht werden, inwieweit eine N-terminale Lokalisation der Enzyme Einfluss auf die Bindungsaktivität und zytotoxische Wirksamkeit der Immuntoxine hat.

III.2.2 Generierung und Charakterisierung von Ang-425(scFv), Gb-425(scFv) und ECP-425(scFv)

III.2.2.1 Konstruktion, eukaryotische Expression und Reinigung der Immuntoxine hE-425(scFv)

Für die Fusion der hE an den N-Terminus des 425(scFv)-Fragmentes wurden die Vektoren pMSIII-Gb-Ki-4(scFv), pMSIII-ECP-Ki-4(scFv) und pMSIII-Ang-Ki-4(scFv) verwendet. Das in den Vektoren enthaltene Ki-4(scFv)-Fragment wurde mittels der Restriktionsschnittstellen *Sfi*I und *Not*I herausgeschnitten und durch das ebenfalls mit *Sfi*I und *Not*I restringierte 425(scFv)-Fragment ersetzt (II.2.2.1, II.2.3.2, II.2.2.4). Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* DH5 α Zellen transformiert (II.2.5.2) und die Plasmid-DNA von jeweils sechs rekombinanten Klonen mittels Plasmid-DNA Minipräparation (II.2.6.1), Test-Restriktion mit *Sfi*I/*Not*I sowie *Sac*I (II.2.2.1) und analytischer Agarosegelelektrophorese (II.2.3.1) überprüft. Je ein Klon mit korrektem, durch Sequenzierung verifiziertem Insert wurde ausgewählt und die Plasmid-DNA für die nachfolgende Transfektion der DNA (II.3.1.1, III.2.1.2.2) in HEK293T Zellen verwendet.

Die Etablierung von transfizierten HEK293T-Zellpopulationen erfolgte wie in II.3.1.2 beschrieben unter Zeocin[®]-Selektionsdruck und anschließender Isolierung grün fluoreszierender Zellfoci. Zur Überprüfung der Immuntoxinproduktion wurden die Zellkulturüberstände mittels Ni²⁺-NTA gereinigt und anschließend die Elutionsfraktionen analysiert.

Die in Abb. III-33, B dargestellte Western-Blot-Analyse zeigt, dass alle drei hE-425(scFv)-Immuntoxine (Ang-425(scFv), ECP-425(scFv), Gb-425(scFv)) erfolgreich exprimiert und aus dem Zellkulturüberstand gereinigt werden konnten. Die Größe der detektierten Banden entsprach dabei ungefähr den theoretisch ermittelten Molekulargewichten von 45,1 kDa für Ang-425(scFv), 46,5 kDa für ECP-425(scFv) und 56,5 kDa für Gb-425(scFv). Die Immuntoxine Gb-425(scFv) und ECP-425(scFv) weisen wie die Immuntoxine mit C-terminalen Gb und ECP (III.2.1.2.2), aufgrund von Glykosylierungen ein etwas höheres Molekulargewicht auf als das berechnete. Aus dem SDS-PAA-Gel (Abb. III-33, A) ist ersichtlich, dass die jeweiligen Elutionsfraktionen einen hohen Reinheitsgrad aufweisen und kaum kontaminierende Banden detektiert wurden. Die Proteinausbeuten der hE-425(scFv) Immuntoxine waren mit 1,6 mg/g Zellen für Gb-425(scFv), und Ang-425(scFv) und 1,3 mg/g Zellen für ECP-425(scFv) vergleichbar zu den Ausbeuten der 425(scFv)-Fusionsproteine mit C-terminal integrierten Enzymen (III.2.1.2.2).

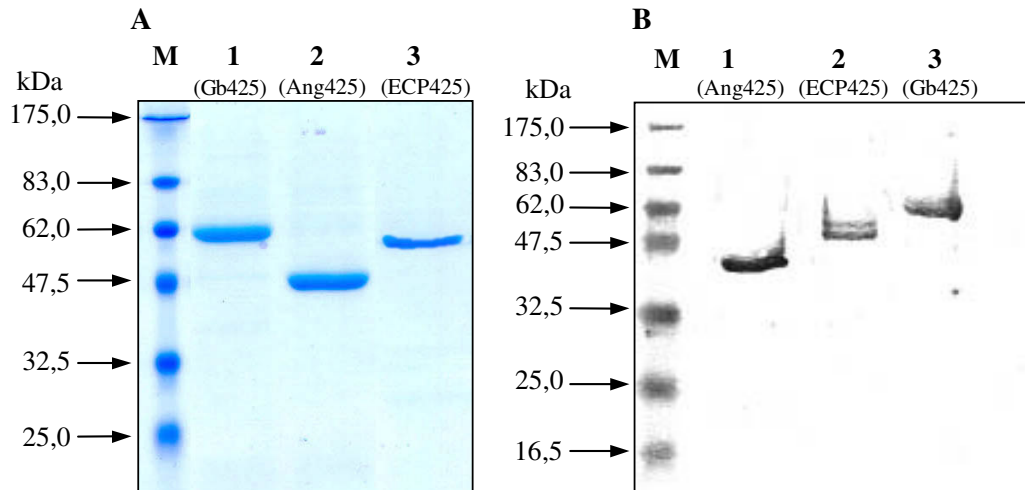


Abb. III-33: Western-Blot-Analyse und SDS-PAGE von eukaryotisch exprimierten und Ni²⁺-NTA gereinigten hE-425(scFv) Immuntoxinen.

Jeweils 40 ml Zellkulturüberstand wurden für die Proteinpräparationen (II.3.1.3) verwendet. Die Elution der an die Ni²⁺-NTA-Matrix gebundenen rekombinanten Immuntoxine erfolgte mit 400 µl Elutionspuffer. 15 µl dieser Elutionsfraktionen wurden sowohl in einer SDS-PAGE (A) aufgetrennt als auch mittels Western-Blot (B) analysiert. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie Brilliant blue (Serva) gefärbt. Detektiert wurden die Proteine im Blot mit einem Maus-anti-penta-His Ak und ZAM^{AP} Ak. Die Visualisierung der Banden erfolgte mit NBT/BCIP über eine AP-Reaktion. Die Konzentrationsbestimmung ergab für Gb-425(scFv) 210 ng/µl, für Ang-425(scFv) 205 ng/µl und für ECP-425(scFv) 170 ng/µl. [A: M: „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB), 1: Gb-425(scFv), 2: Ang-425(scFv), 3: ECP-425(scFv); B: M: „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB), 1: Ang-425(scFv), 2: ECP-425(scFv), 3: Gb-425(scFv)].

III.2.2.2 Charakterisierung der Bindungsaktivität mittels Durchflusszytometrie und Zellmembran-ELISA

Mittels durchflusszytometrischer Analysen und Zellmembran-ELISAs wurde die Bindungsaktivität der affinitätsgereinigten hE-425(scFv) Immuntoxine gegenüber der Pankreas-karzinomzelllinie L3.6pl evaluiert. Die in Abb. III-34 gezeigten Histogramme dokumentieren die EGFR-spezifische Bindung von Ang-425(scFv), ECP-425(scFv) und Gb-425(scFv). Alle drei Proben zeigten dabei vergleichbare Signalstärken auf der Zelllinie L3.6pl (Abb. III-34, A). Bindungsanalysen der hE-425(scFv) Immuntoxine auf der Negativzelllinie HL60 verifizierten, dass keine Kreuzreaktivität gegenüber der EGFR-negativen Zelllinie vorlag (Abb. III-34, B).

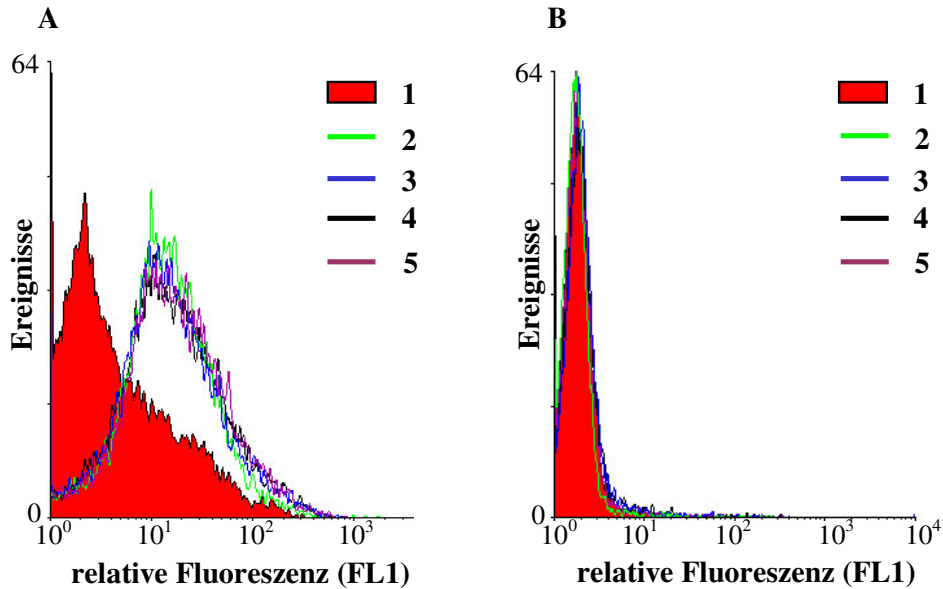


Abb. III-34: Durchflusszytometrische Analysen von Ang-425(scFv), ECP-425(scFv) und Gb-425(scFv) auf L3.6pl und HL60 Zellen.

Es wurden jeweils 5 µg affinitätsgereinigtes Protein (III.2.2.1) mit 5×10^5 L3.6pl (A) und 5×10^5 HL60 Zellen (B) für 45 min inkubiert (II.3.10). Der Nachweis der gebundenen rekombinanten Proteine erfolgte über die Ak Maus-anti-penta-His und ZAM^{FITC} (II.1.3). [1: Negativkontrolle: 1x PBS + Maus-anti-penta-His und ZAM^{FITC} Ak, 2: Positivkontrolle: mAk528 (2,5 µg)+ ZAM^{FITC} Ak, 3: ECP-425(scFv) + Maus-anti-penta-His und ZAM^{FITC} Ak, 4: Gb-425(scFv) + Maus-anti-penta-His und ZAM^{FITC} Ak, 5: Ang-425(scFv) + Maus-anti-penta-His und ZAM^{FITC} Ak].

Die Ergebnisse des Zellmembran-ELISAs verifizieren ebenfalls die Bindungsaktivität der hE-425(scFv)-Immuntoxine (Abb. III-35).

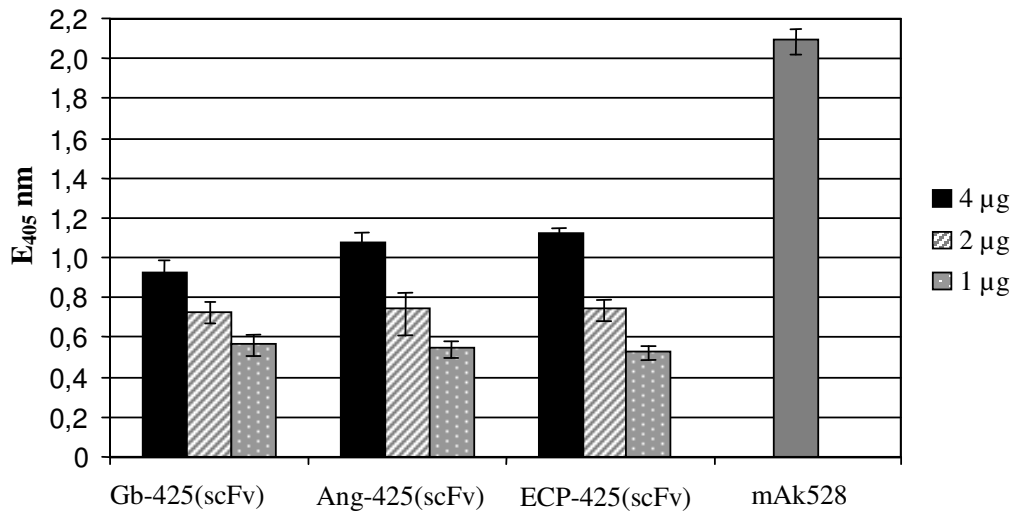


Abb. III-35: Zellmembran-ELISA eukaryotisch exprimierter und gereinigter hE-425(scFv) Immuntoxine zum Nachweis der Bindungsaktivität.

4 µg, 2 µg und 1 µg der jeweiligen Proteinpräparationen (III.2.2.1) wurden für 1 h auf eine mit L3.6pl-Membranfraktionen beschichtete Platte inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der mAk528 (5 µg) verwendet. Der Nachweis der gebundenen Immuntoxine erfolgte mit den Ak Maus-anti-penta-His und ZAM^{HRPO}. Als Substrat wurde ABTS verwendet und für 20 min inkubiert. Jede Probe wurde in einem Dreifachansatz gemessen und die entsprechenden Mittelwerte dargestellt.

Da die detektierten Extinktionswerte der jeweiligen Verdünnungen bei Ang-425(scFv), ECP-425(scFv) und Gb-425(scFv) im selben Bereich lagen, konnte auf eine vergleichbare EGFR-spezifische Bindung der drei Immuntoxine geschlossen werden. Vergleicht man weiterhin die Bindungsaktivitäten der hE-425(scFv) Immuntoxine mit den der 425(scFv)-Fusionsproteine, welche am C-Terminus die Enzyme integriert haben (425(scFv)-hE), so ist festzustellen, dass die Lokalisation der Enzyme keinen Einfluss auf die Bindungsaktivität des 425(scFv)-Fragments hatte (Daten nicht gezeigt).

III.2.2.3 Überprüfung der zytotoxischen Wirksamkeit

Mittels Zytotoxizitätsassays wurde in folgenden Experimenten untersucht, ob die N-terminal lokalisierte Enzym-Domäne in Ang-425(scFv), ECP-425(scFv) und Gb-425(scFv) funktional war und zum Abtöten der pankreatischen Tumorzellen führte.

Der in Abb. III-36 dargestellte Graph zeigt, dass die Immuntoxine Ang-425(scFv) und Gb-425(scFv) nur einen sehr schwachen zytotoxischen Effekt gegenüber den L3.6pl Zellen aufwiesen. Nur 32% bzw. 28% der Zellen konnten durch die Inkubation mit Gb-425(scFv) und Ang-425(scFv) abgetötet werden.

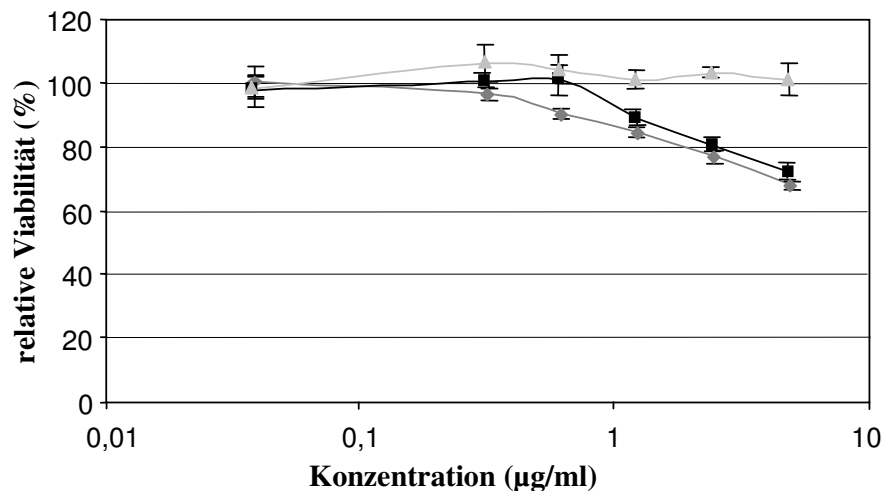


Abb. III-36: Zytotoxizitätsassay von Ang-425(scFv) und Gb-425(scFv) auf L3.6pl Zellen.

5 µg/ml der affinitätsgereinigten Immuntoxine Ang-425(scFv) und Gb-425(scFv) wurden in 1/2 Schritten verdünnt. Anschließend wurden 1×10^5 L3.6pl Zellen zu jeder Verdünnung gegeben und die Proben 48 h inkubiert. Nach 24-stündiger Substratinkubation erfolgte die Messung der $E_{(450 \text{ nm}-650 \text{ nm})}$ (II.3.11). Die Proben wurden im Dreifachansatz eingesetzt und nach der Auswertung gemittelt in das Diagramm eingetragen. [\blacktriangle : RPMI-Medium + 1x PBS, \blacksquare : 425(scFv)-Ang in 1x PBS, \blacklozenge : 425(scFv)-Gb in 1x PBS].

Dementsprechend war es nicht möglich eine IC_{50} zu berechnen. Eine unspezifische Toxizität der beiden Immuntoxine ist auszuschließen, da die Negativzelllinien HL60 und L540 bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml nicht beeinträchtigt wurden (Daten nicht dargestellt). Auch gegenüber der nicht metastatischen Pankreaskarzinomzelllinie FG konnte nur eine sehr schwache zytotoxische Aktivität von Ang-425(scFv) und Gb-425(scFv) dokumentiert werden.

ECP-425(scFv) zeigte analog zu 425(scFv)-ECP (III.2.1.2.4) keinen zytotoxischen Effekt (Daten nicht dargestellt). Somit führte eine N-terminale Lokalisation der Enzyme in den 425(scFv)-Fusionsproteinen zu einer Verschlechterung der zytotoxischen Wirksamkeit im Vergleich zu den 425(scFv)-hE Fusionsproteinen.

III.2.3 Generierung und Charakterisierung von 425(scFv)-dII-Ang, 425(scFv)-dII-ECP und 425(scFv)-dII-Gb

Das zytotoxische Potential der Ang-, ECP- und Gb-basierten Immuntoxine war geringer als das des 425(scFv)-ETA' Fusionsproteins. ECP zeigte sogar als toxische Domäne in den 425(scFv)-hE und hE-425(scFv) Immuntoxinen keinen zytotoxischen Effekt gegenüber EGFR-positiven L3.6pl Zellen. Die geringe Wirksamkeit der humanen toxischen Domänen in den 425(scFv)-Fusionsproteinen kann auf eine unzureichende Internalisierung ins Zytosol zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu ETA' enthalten die humanen Enzyme keine Translokationsdomäne, welche die Freisetzung der Effektor-domäne und deren Transfer ins Zytosol gewährleisten.

Dementsprechend sollte in folgenden Experimenten analysiert werden, inwieweit die Insertion der Translokationsdomäne von ETA' in die 425(scFv)-hE Immuntoxine die zytotoxische Wirksamkeit der Fusionsproteine verbessert. Dazu sollte mit Ausnahme der F-Helix die gesamte Translokationsdomäne von ETA' mit dem N-Terminus der verschiedenen Enzyme fusioniert werden. Die F-Helix wurde deletiert, da diese Region einen inhibitorischen Einfluss auf die Translokation von ETA ausübt, was mit bis zu einer sechsfachen Abnahme der Zytotoxizität verbunden sein kann (TAUPIAC *et al.* 1999).

Zur Amplifikation der verkürzten Translokationsdomäne (dII) wurde eine PCR-Reaktion (II.2.1) mit den Primern dII5'-*NotI* und dII3'-*XbaI* (II.1.8) durchgeführt, wobei 425(scFv)-ETA' als Matrize verwendet wurde (siehe Abb. III-37). Zur Bestimmung der optimalen Anlagerungstemperatur der beiden Primer an die Matrizen-DNA wurde zunächst eine Gradienten-PCR in dem „Programmable Thermal Controller“ PTC-200™ (MJ Research Inc, Watertown, USA) unter Verwendung der *Taq*-Polymerase durchgeführt. Es wurden Anlagerungstemperaturen zwischen 50°C und 70°C getestet, wobei sich eine Temperatur von 70°C als optimal bezüglich der Menge an gewünschtem PCR-Produkt herausstellte. Anschließend wurde die PCR-Reaktion mit optimaler Anlagerungstemperatur von 70°C unter Verwendung der „proofreading“-Polymerase (Roche) durchgeführt, um das Risiko von eventuell falsch inkorporierten Basen während der PCR zu reduzieren. Das resultierende PCR-Fragment (~336bp) wurde durch eine präparative Agarosegelelektrophorese (II.2.3.2) gereinigt und einer Restriktion mit *NotI* und *XbaI* unterzogen (II.2.2.1). Die restringierte DNA wurde in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt (II.2.3.2), das gewünschte dII-Fragment (336 bp) aus dem Gel isoliert und nach erfolgter Reinigung in die ebenfalls mit *NotI* und *XbaI* restringierten pMSII-Vektoren pMSII-425(scFv)-Ang, pMSII-

425(scFv)-ECP und pMSII-425(scFv)-Gb ligiert (II.2.2.4). Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* XL1-blue Zellen mittels Hitzeschock transformiert (II.2.5.2) und mehrere rekombinante Klone durch Restriktion und Sequenzierung (II.2.7) analysiert.

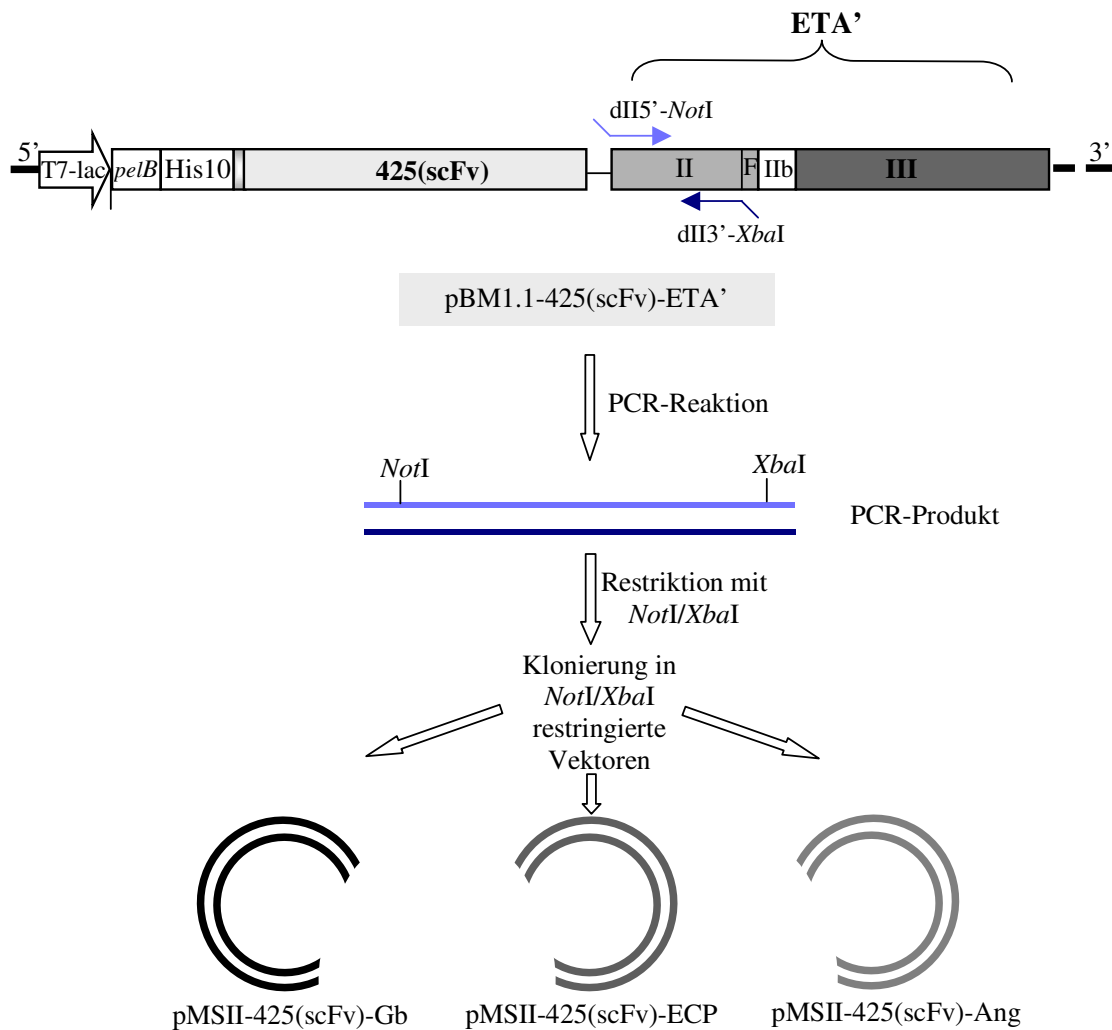


Abb. III-37: Schematische Darstellung zur Konstruktion von 425(scFv)-dII-hE Immuntoxinen.

Die Translokationsdomäne II wurde mit Ausnahme der F-Helix (F) mittels der Primer *dII5'-NotI* und *dII3'-XbaI* amplifiziert und nach Restriktion in die ebenfalls mit *NotI/XbaI* geschnittenen pMSII-Vektoren kloniert, was die Fusion der verkürzten Translokationsdomäne mit dem N-Terminus der Toxine ermöglichte. ETA' = Deletionsmutante des *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A; II = Translokationsdomäne (333 bp); IIB = Domäne unbekannter Funktion (102 bp); III = toxische Domäne (639 bp); *His10* = Polyhistidinsequenz zur Detektion und Reinigung des rekombinanten Proteins; *pelB* = Signalsequenz für den Transport ins Periplasma; T7-Promotor = IPTG induzierbar.

Die Sequenz der Translokationsdomäne ist im Anhang abgebildet (VII.2.1). Die Expression von 425(scFv)-dII-Ang, 425(scFv)-dII-ECP und 425(scFv)-dII-Gb erfolgte in eukaryotischen HEK293T Zellen (II.3.1.1). Das Ergebnis einer Proteinpräparation von jeweils 40 ml Kulturüberstand ist in Abb. III-38 dargestellt. Sowohl der Western-Blot (A) als auch das SDS-PAA-Gel (B) belegen, dass die drei Konstrukte erfolgreich in HEK293T Zellen exprimiert und aus dem Überstand gereinigt wurden. Erwartungsgemäß zeigten die Proteine aufgrund der zusätzlichen dII

Domäne ein um ca. 11,4 kDa größeres Molekulargewicht als die 425(scFv)-Fusionsproteine ohne Translokationsdomäne (III.2.2.1, III.2.1.2.2). Neben den Banden, die den Vollängenproteinen entsprachen, konnten im Western-Blot und SDS-PAA-Gel weitere Banden detektiert werden.

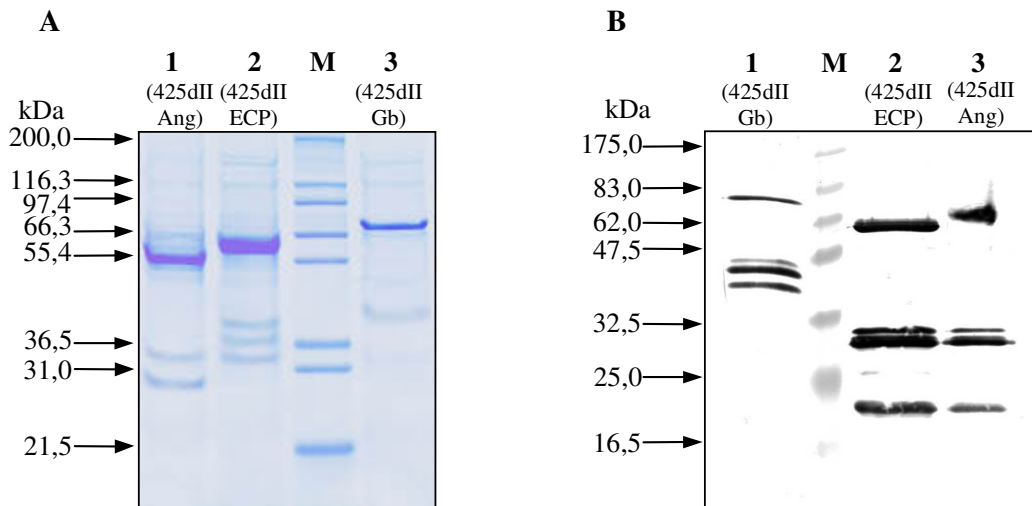


Abb. III-38: Western-Blot-Analyse und SDS-PAGE einer 40 ml Proteinpräparation von 425(scFv)-dII-Ang, 425(scFv)-dII-ECP und 425(scFv)-dII-Gb.

Jeweils 40 ml Zellkulturüberstand wurden mittels Affinitätschromatographie gereinigt (II.3.1.3). 15 µl der 400 µl Elutionsfraktionen wurden in einer 12%igen SDS-PAGE (**A**) aufgetrennt und im Western-Blot (**B**) auf eine Membran übertragen. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie Brilliant blue (Serva) gefärbt. Die Detektion der Proteine erfolgte über den His6-Tag durch die Nachweis-Ak Maus-anti-penta-His und ZAM^{AP}. Als Substrat wurde NBT/BCIP verwendet. Die Konzentrationsbestimmung ergab für 425(scFv)-dII-Gb 120 ng/µl, für 425(scFv)-dII-Ang 150 ng/µl und für 425(scFv)-dII-ECP 230 ng/µl. [**A**: 1: 425(scFv)-dII-Ang, 2: 425(scFv)-dII-ECP, M: „Mark12 Unstained Standard“ (Invitrogen) 3: 425(scFv)-dII-Gb; **B**: 1: 425(scFv)-dII-Gb, M: „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB), 2: 425(scFv)-dII-Ang, 3: 425(scFv)-dII-ECP].

Da bei den Präparationen der 425(scFv)-hE und hE-425(scFv) Immuntoxine diese Banden nicht auftraten, ist davon auszugehen, dass es sich nicht um unspezifisch erkannte Proteine aus dem Zellkulturüberstand sondern um Degradationsprodukte der Immuntoxine handelte. Die Ertragsausbeuten waren mit 0,92 mg/g Zellen für 425(scFv)-dII-Gb, 1,8 mg/g Zellen für 425(scFv)-dII-ECP und 1,2 mg/g Zellen für 425(scFv)-dII-Ang niedriger als bei den Immuntoxinen ohne dII Domäne.

Die Analyse der exprimierten 425(scFv)-dII-hE Immuntoxine mittels Zellmembran-ELISA und Durchflusszytometrie ergab, dass alle drei Fusionsproteine Bindungsaktivität gegenüber L3.6pl-Membranfraktionen bzw. Zellen zeigten (siehe Abb. III-39, Abb. III-40).

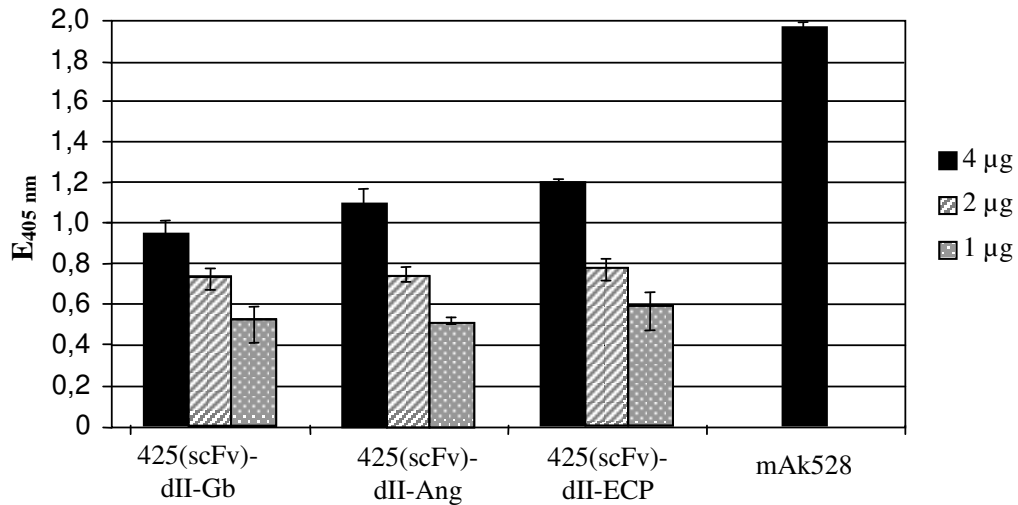


Abb. III-39: Zellmembran-ELISA zum Nachweis der Bindungsaktivität von 425(scFv)-dII-ECP, 425(scFv)-dII-Ang und 425(scFv)-dII-Gb gegenüber L3.6pl-Membranfraktionen.

4 µg, 2 µg und 1 µg der jeweiligen Proteinpräparationen wurden in den ELISA (II.3.9.1) eingesetzt. Als Positivkontrolle diente der mAk528 (4 µg). Die Detektion von gebundenen Immuntoxinen erfolgte über den His-Tag mit den Nachweis-Ak Maus-anti-penta-His und ZAM^{HRPO}. Als Substrat für die HRPO wurde ABTS hinzugefügt und für 20 min inkubiert. Jede Probe wurde in einem Dreifachansatz gemessen und die entsprechenden Mittelwerte dargestellt.

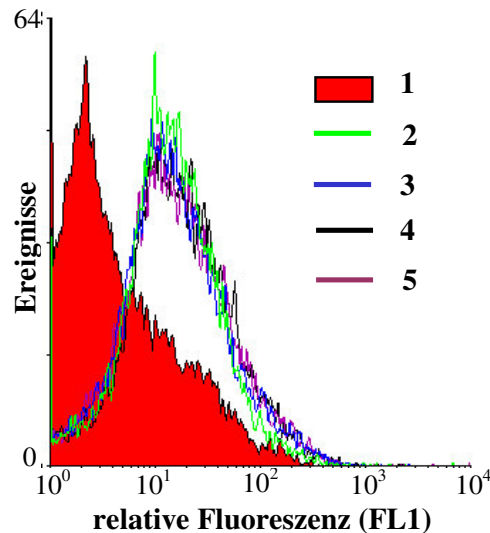


Abb. III-40: Durchflusszytometrische Analyse von 425(scFv)-dII-Ang, 425(scFv)-dII-ECP und 425(scFv)-dII-Gb auf L3.6pl Zellen.

Es wurden jeweils 5 µg affinitätsgereinigtes Protein mit 5×10^5 L3.6pl Zellen inkubiert (II.3.10). Als Positivkontrolle wurde der mAk528 (5 µg) verwendet. Der Nachweis der gebundenen rekombinanten Proteine erfolgte über die Ak Maus-anti-penta-His und ZAM^{FITC} (II.1.3). [1: Negativkontrolle: 1x PBS + Maus-anti-penta-His und ZAM^{FITC} Ak, 2: Positivkontrolle: 425(scFv)-Ang + Maus-anti-penta-His + ZAM^{FITC} Ak, 3: 425(scFv)-dII-Gb + Maus-anti-penta-His und ZAM^{FITC} Ak, 4: 425(scFv)-dII-ECP + Maus-anti-penta-His und ZAM^{FITC} Ak, 5: 425(scFv)-dII-Ang + Maus-anti-penta-His und ZAM^{FITC} Ak].

Abschließend wurden die affinitätsgereinigten 425(scFv)-dII-hE Immuntoxine hinsichtlich ihrer zytotoxischen Wirksamkeit in einem XTT-basierendem Zytotoxizitätsassay analysiert.

Die Ergebnisse belegten, dass die Zytotoxizität der 425(scFv)-dII-hE Immuntoxine gegenüber L3.6pl Zellen im Vergleich zu den Immuntoxinen ohne Translokationsdomäne nicht verbessert werden konnte sondern sogar verringert wurde (Daten nicht gezeigt).

Die Fusionsproteine 425(scFv)-dII-Ang und 425(scFv)-dII-Gb führten nur zu einem schwachen zytotoxischen Effekt, so dass eine Bestimmung der IC_{50} nicht möglich war. 425(scFv)-dII-ECP zeigte wie auch 425(scFv)-ECP und ECP-425(scFv) keine zytotoxische Wirksamkeit gegenüber EGFR-positiven Zellen.

IV DISKUSSION UND AUSBLICK

Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene rekombinante anti-EGFR Immuntoxine zur Therapie von metastasierendem Pankreaskarzinom generiert und charakterisiert.

Für eine erfolgreiche Therapie des Pankreaskarzinoms ist vor allem die vollständige und spezifische Eliminierung der malignen Zellen nach operativer Entfernung des Tumors relevant. Da die bisherigen Therapieansätze der Radio- und Chemotherapie bedingt durch ihre Unspezifität und durch auftretende Resistenzen der Pankreaskarzinomzellen für diese Aufgaben unzureichend sind (SCHNIEWIND *et al.* 2004), wurde in dieser Arbeit ein immuntherapeutischer Ansatz zur Eliminierung von residualen Zellen und der damit verbundenen Inhibierung von Metastasenbildung verfolgt. Da der EGFR auf pankreatischen Tumorzellen überexprimiert wird und dies mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (YAMANAKA *et al.* 1993; DONG *et al.* 1998), wurde als Bindungsdomäne der rekombinanten Immuntoxine das anti-EGFR 425(scFv)-Fragment verwendet und sowohl mit einem bakteriellen Toxin als auch mit drei humanen Enzymen als Effektor-domänen fusioniert. Das aus einer Deletionsmutante des bakteriellen *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (ETA) und dem 425(scFv)-Fragment bestehenden Immuntoxin 425(scFv)-ETA' wurde erfolgreich in *E. coli* exprimiert, gereinigt und funktionell charakterisiert. Dabei zeigte 425(scFv)-ETA' *in vitro* mit einer IC₅₀ von 0,0075 µg/ml eine hohe Zytotoxizität gegenüber der metastasierenden Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl. *In vivo* führte das rekombinante Immuntoxin zu einer drastischen Reduktion der Metastasenbildung von disseminiert wachsenden L3.6pl Zellen. Auch auf humanen Effektor-domänen (hE) basierende anti-EGFR Immuntoxine wurden erfolgreich generiert, in zwei Expressionssystemen exprimiert und charakterisiert. Die Produktion der hE-Immuntoxine in eukaryotischen HEK293T ergab dabei wesentlich höhere Ausbeuten als die Expression der entsprechenden Konstrukte in *E. coli*. Zwei der drei untersuchten humanen Effektor-domänen (Angiogenin (Ang) und Granzym B (Gb)) zeigten nach Fusion an den C-Terminus des 425(scFv)-Fragmentes eine zytotoxische Aktivität gegenüber L3.6pl Zellen. Somit wurden der Zielsetzung folgend alle Fragestellungen erfolgreich bearbeitet.

Zur Übersicht für die nachfolgende Diskussion sind die innerhalb dieser Arbeit generierten Immuntoxine einschließlich der Proteinausbeuten und Ergebnisse der *in vitro* Charakterisierungen in Tab. IV-1 zusammengefasst.

Tab. IV-1: Übersicht der in dieser Arbeit generierten Immuntoxine hinsichtlich Proteinausbeute und *in vitro* Charakterisierung.

Die Proteinausbeuten der in *E. coli* exprimierten Immuntoxine beziehen sich auf Expressionen in Schüttelkultur.
n.d. = nicht determiniert

	Konstrukte	Ausbeute an Ni ²⁺ -NTA gereinigtem Protein	Bindungsaktivität gegenüber EGFR	Zytotoxische Aktivität bzw. IC ₅₀ (L3.6pl Zellen)
Expression in <i>E. coli</i>	425(scFv)-ETA'	94,0 µg/g Zellen	+	0,0075 µg/ml
	425(scFv)-Ang	1,50 µg/g Zellen	+	n.d.
	425(scFv)-Gb	0,75 µg/g Zellen	+	n.d.
	425(scFv)-ECP	0,75 µg/g Zellen	+	n.d.
Expression in HEK293T Zellen	425(scFv)-Ang	1,90 mg/g Zellen	+	0,43 µg/ml
	425(scFv)-Gb	1,92 mg/g Zellen	+	0,38 µg/ml
	425(scFv)-ECP	1,63 mg/g Zellen	+	keine
	Ang-425(scFv)	1,60 mg/g Zellen	+	schwach
	Gb-425(scFv)	1,60 mg/g Zellen	+	schwach
	ECP-425(scFv)	1,30 mg/g Zellen	+	keine
	425(scFv)-dII-Ang	1,20 mg/g Zellen	+	sehr schwach
	425(scFv)-dII-Gb	0,92 mg/g Zellen	+	sehr schwach
	425(scFv)-dII-ECP	1,80 mg/g Zellen	+	keine

IV.1 Konstruktion, Expression und Charakterisierung von 425(scFv)-ETA'

IV.1.1 Expression und Reinigung von 425(scFv)-ETA'

Die meisten Erfahrungen in der Expression von rekombinanten Proteinen wurden bis dato mit *E. coli* gesammelt. Auch die Expression von ETA-basierten Immuntoxinen in *E. coli* hat sich mehrfach bewährt (REITER *et al.* 1994; SCHMIDT *et al.* 1996; SCHMIDT *et al.* 1997; AZEMAR *et al.* 2000) und führte zu hohen Produktionsraten (PASTAN und FITZ-GERALD 1989).

Es gibt generell die Möglichkeit rekombinante Proteine löslich aus dem Zytoplasma, aus zytoplasmatischen Einschlusskörpern („inclusion bodies“) oder aus dem periplasmatischen Raum der Bakterien zu gewinnen. Seit 1992 gilt die Expression von Immuntoxinen im Zytoplasma und deren Isolierung inklusive Reinigung aus den Einschlusskörpern als Standardmethode

(BUCHNER *et al.* 1992). Da die in den „inclusion bodies“ abgelagerten exprimierten Proteine meist denaturiert und vernetzt vorliegen und dementsprechend nicht aktiv sind, muss eine zum Teil aufwendige Rückfaltung der denaturierten Proteine durchgeführt werden (SHI *et al.* 1997; JAENICKE 1999). Es konnte gezeigt werden, dass unter optimierten Bedingungen in Abhängigkeit der Proteingröße und Anzahl der Disulfidbrücken nur 5 bis 10% der Proteine richtig gefaltet waren und biologische Aktivität entwickelten (BUCHNER *et al.* 1992).

Im Gegensatz zur zytoplasmatischen Expression werden die im Periplasma exprimierten Proteine nicht in Einschlusskörpern abgelagert und liegen somit in löslicher funktionaler Form vor. Zudem wird im periplasmatischen Raum die Herstellung von korrekt gefalteten Proteinen unter Ausbildung von Disulfidbrücken durch ein oxidierendes Milieu, dem Vorhandensein einer Disulfid-Oxidoreduktase (BRADWELL *et al.* 1991) sowie von Chaperonen (LANGER *et al.* 1992) ermöglicht. Da das Periplasma nur 4% des in der Zelle enthaltenen Gesamtproteins besitzt, wird des Weiteren die Anreicherung und Reinigung der exprimierten Proteine erleichtert. BARTH *et al.* (BARTH *et al.* 2000) entwickelten basierend auf den Arbeiten von Blackwell und Horgan (BLACKWELL und HORGAN 1991) ein optimiertes Protokoll zur Expression von Immuntoxinen im Periplasma. Das Prinzip beruht auf der Kultivierung der Bakterien unter osmotischem Stress in Anwesenheit von kompatiblen Soluten. Kompatible Solute bilden eine heterogene Gruppe von niedermolekularen Verbindungen, der z.B. Aminosäuren-, Betain-, Zucker- und Heterosidderivate angehören und ermöglichen als natürliche Schutzmoleküle das Überleben von halophilen und halotoleranten Bakterien unter permanenten Stressbedingungen (DA COSTA *et al.* 1998). Demnach sollen die kompatiblen Solute nach aktiver Aufnahme über proP- und proU-Transporter in das Zytoplasma (KWON und HANDLER 1995; CSONKA und EPSTEIN 1996) von unter Salzstress kultivierten Bakterien als Stressschutzfaktoren fungieren. In der Bakterienzelle schreibt man ihnen eine unmittelbare Interaktion mit den exprimierten rekombinanten Proteinen zu, was einen positiven Effekt auf die Stabilität und Faltung der Proteine bewirkt. Durch Immunpräzipitationsexperimente konnte gezeigt werden, dass durch den osmotischen Stress die Expression von Hitzeschockproteinen und Chaperonen induziert wird (BARTH *et al.* 2000). Diese Proteine spielen eine große Rolle bei der korrekten Faltung von *E. coli* Proteinen und erhöhen zusätzlich deren Löslichkeit und Stabilität.

Im Vergleich zur Standardmethode konnte mit diesem Expressionssystem die Ausbeute an funktionalem Protein drastisch gesteigert werden (BARTH *et al.* 2000).

Basierend auf den gesammelten Erfahrungen wurde 425(scFv)-ETA' im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls unter osmotischem Stress in Anwesenheit kompatibler Solute nach dem von BARTH *et al.* entwickelten Protokoll exprimiert (BARTH *et al.* 2000). Als Vektor diente das Plasmid pBM1.1, das ausgehend von dem pET27b für die periplasmatische Expression von rekombinanten Immuntoxinen in *E. coli* entwickelt wurde (MATTHEY *et al.* 1999).

Die Fusion des 425(scFv)-Fragmentes an den N-Terminus einer Deletionsmutante von ETA' erfolgte über eine Klonierung mit den Restriktionsschnittstellen *Sfi*I und *Not*I in den Vektor pBM1.1 (III.1.1). Die in dem Vektor enthaltene *pe*B-Signalsequenz gewährleistete die Sekretion des Immuntoxins 425(scFv)-ETA' in den periplasmatischen Raum. Die unter Stress exprimierten Immuntoxine wurden aus dem Periplasma isoliert und anschließend mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Expressionsversuche im 50 ml Maßstab belegten, dass 425(scFv)-ETA' unter osmotischem Stress erfolgreich produziert und aus der periplasmatischen Fraktion über Ni²⁺-NTA gereinigt werden konnte. In Western-Blot-Analysen (Abb. III-2) wurde das Immuntoxin spezifisch über den N-terminalen His10-Tag anhand seiner Größe von 69,5 kDa nachgewiesen. Weiterhin zeigte der Expressionsversuch, dass die gesamte Menge der exprimierten 425(scFv)-ETA' Fusionsproteine im Periplasma akkumuliert wurde und kein Protein im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnte. Die Sekretion von Proteinen in das Medium ist auf eine gesteigerte Porösität der Membran zurückzuführen und hängt neben bestimmten Kultivierungsbedingungen wie z.B. der Inkubationstemperatur und der Induktionszeit (PLÜCKTHUN 1991) von der Sequenz und Größe des exprimierten Proteins ab (KIPRIYANOV *et al.* 1997).

Nach der erfolgreichen Expression und Ni²⁺-NTA-Reinigung von 425(scFv)-ETA' im kleinen Maßstab wurden Expressionen im 1 l Maßstab durchgeführt, um genügend Protein für eine umfassende *in vitro* Charakterisierung zu produzieren. SDS-PAGE und Western-Blot-Analysen zeigten, dass auch im größeren Maßstab das 69,5 kDa große Vollängentranslationsprodukt von 425(scFv)-ETA' exprimiert wurde (Abb. III-3, Abb. III-4). Anhand der Western-Blot-Analyse der Waschfraktionen war zu erkennen, dass das in den Waschpuffern vorhandene Imidazol nicht zu einem Ablösen von spezifisch gebundenem Immuntoxin geführt hat, sondern nur unspezifisch gebundene Proteine von der Matrix verdrängt wurden. 425(scFv)-ETA' wurde erst durch Zugabe von 500 mM Imidazol eluiert und konnte in allen fünf Elutionsfraktionen mit abnehmender Konzentration detektiert werden.

Sowohl das SDS-PAA-Gel als auch der Western-Blot zeigten neben der 69 kDa Bande eine Reihe weiterer Proteinbanden. Durch Massenspektroskopie konnten einige dieser Proteine als kontaminierende *E. coli* Proteine identifiziert werden. Dabei handelte es sich z.B. um ein negatives Regulatorprotein (16,8 kDa) und eine GTP Cyclohydrolase (24,7 kDa) aus *E. coli*. Beide bakteriellen Proteine haben die Fähigkeit Zink zu binden. Im Fall der GTP Cyclohydrolase wurde Zink im aktiven Zentrum gefunden und ist essentiell für die Funktion des Enzyms (AUERBACH *et al.* 2000). Der negative Regulator besitzt eine Abfolge von vier Histidinresten, womit eine Bindungsaffinität für Ni²⁺-Ionen zu erklären wäre. Somit vermögen diese Proteine neben Zink auch noch andere zweiwertige Metallionen wie beispielsweise Ni²⁺-Ionen zu binden und können dementsprechend zusammen mit dem Immuntoxin 425(scFv)-ETA' über die Ni²⁺-NTA-Matrix gereinigt werden. Weiterhin wurden einige Banden als Degradationsprodukte von 425(scFv)-ETA' identifiziert. Da nach BARTH *et al.* das verwendete kompatible Solut Betain sowie durch

den Salzstress induzierte Hitzeschockproteine eine stabilisierende Wirkung auf das exprimierte Protein ausüben sollten, könnte man vermuten, dass diese Degradationen erst bei der Proteinpräparation entstanden sind (BARTH *et al.* 2000). Werden bei der Ultraschallung die kompletten Zellen zerstört, wird neben der periplasmatischen Fraktion der gesamte zytoplasmatische Inhalt freigesetzt und die in großen Mengen vorhandenen zytoplasmatischen Proteasen können zu Degradationen der rekombinanten Proteine führen (SWAMY und GOLDBERG 1982). Des Weiteren ist vorstellbar, dass die Abbauprodukte unter denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE entstanden sind, was mit einer nativen SDS-PAGE zu überprüfen bleibt.

Zur Eliminierung der kontaminierenden Proteine wurde eine Anionenaustauschchromatographie (AEX) der vereinigten Ni²⁺-NTA-Elutionsfraktionen durchgeführt. Im Gegensatz zur Affinitätschromatographie, bei der die Bindung des Immuntoxins auf der Affinität des mit ihm fusionierten His-Tags an Ni²⁺-Ionen beruht, erfolgt bei der AEX die Bindung von 425(scFv)-ETA' an eine positiv geladene Matrix über elektrostatische Wechselwirkungen. SDS-PAGE-Analysen zeigten, dass bis auf ein 16 kDa Protein die kontaminierenden Proteine von dem 425(scFv)-ETA' Immuntoxin eliminiert werden konnten (Abb. III-5). Mit Hilfe einer Gelfiltration konnte schließlich auch das 16 kDa Protein von dem 69 kDa Immuntoxin getrennt werden (Abb. III-7). Die vereinigten Gelfiltrationsfraktionen wurden konzentriert und eine Probe im SDS-PAGE und Western-Blot unter Verwendung des ETA-spezifischen Ak TC-1 und einem ZAM^{AP} Ak analysiert. Das Ergebnis belegte, dass eine dem Vollängentranslationsprodukt entsprechende 69 kDa Bande detektiert werden konnte (Abb. III-8) und keinerlei kontaminierende Proteine zu erkennen waren. Die Identität der 69 kDa Bande wurde durch Massenspektroskopie eindeutig als 425(scFv)-ETA' Bande verifiziert. Das mittels des Sequenzanalyseprogramms DNASTar berechnete Molekulargewicht von 69,461 kDa war geringfügig größer als das durch Massenspektroskopie ermittelte Gewicht von 69,266 kDa.

Eine mit Hilfe von SDS-PAGE, Bradford und UV-Photometrie vorgenommene Konzentrationsabschätzung des in Schüttelkultur exprimierten 425(scFv)-ETA' Immuntoxins ergab eine durchschnittliche Ausbeute an gereinigtem Protein von 725 µg/l Expressionskultur bei einer OD_{600nm} von 7 bzw. 48 µg/g Bakterienpellet (III.1.2.2.4). Der Reinheitsgrad des durch Ni²⁺-NTA, AEX und Gelfiltration gereinigten Immuntoxins betrug dabei ungefähr 95%. Die Bindungsaktivität sowie das zytotoxische Potential der Immuntoxinpräparation wurden in mehreren Analysen verifiziert (siehe IV.1.2). Die ermittelte Proteinausbeute von 425(scFv)-ETA' liegt im Bereich anderer unter osmotischem Stress produzierten Immuntoxine (BARTH *et al.* 1998; BARTH *et al.* 2000; BARTH *et al.* 2000; TUR *et al.* 2003). Die in der Literatur beschriebenen Proteinausbeuten von zytoplasmatisch exprimierten und aus „inclusion bodies“ isolierten ETA-basierten Immuntoxinen liegen dagegen mit 1,5 bis 2 mg/l Kultur höher als die Ausbeute des unter osmotischem Stress exprimierten 425(scFv)-ETA' (SCHMIDT *et al.* 1999; NAGATA *et al.* 2002; ONDA *et al.* 2004). Jedoch muss berücksichtigt werden, dass dieses Expressions-

protokoll nicht direkt zu funktionalem Protein führt, sondern einer zeit- und kostenaufwendigen Rückfaltung der Immuntoxine bedarf.

Zur Bereitstellung großer Proteinmengen für in Zukunft durchzuführende klinische Studien wurde innerhalb dieser Arbeit ein Fermentations- sowie Reinigungsprotokoll etabliert.

Aufgrund der dokumentierten Erfahrungen mit der Expression des Immuntoxins 425(scFv)-ETA' unter osmotischem Stress in Schüttelkultur wurde dieses Verfahren auf einen Fermentationsmaßstab von 4 l gebracht. Analog zu dem Protokoll im Labormaßstab wurden die Bakterien osmotischem Stress ausgesetzt, wobei kompatible Solute als Stressschutzfaktoren zugesetzt wurden. Zur Evaluierung eines synthetischen Minimalmediums im Vergleich zu dem in der Schüttelkultur verwendeten komplexen TB-Mediums wurden zwei Fermentationen simultan durchgeführt. Im Gegensatz zu in der Literatur beschriebenen Fermentation von rekombinanten Immuntoxinen, die unter Hochzelldichte durchgeführt werden (MCDONALD *et al.* 1996; PANDA 2003), wurde die Expression von 425(scFv)-ETA' bei einer relativ niedrigen OD_{600nm} zwischen 5 und 10 induziert. Es konnte gezeigt werden, dass mit diesem neu erprobten Fermentationsverfahren 425(scFv)-ETA' erfolgreich produziert werden konnte (Abb. III-10). Die anschließende Reinigung des 425(scFv)-ETA' Fusionsproteins aus der periplasmatischen Fraktion mittels Ni²⁺-NTA und AEX führte zu reinem funktionalem Protein. Der Vergleich der Fermentationen in Minimalmedium und komplexen Medium führte zu dem Ergebnis, dass die Proteinausbeute des in Minimalmedium exprimierten 425(scFv)-ETA' der Proteinausbeute des in TB-Medium produzierten Immuntoxins entsprach. Somit kann in folgenden Fermentationen das weitaus kostengünstigere synthetische Medium verwendet werden. Die Ausbeute an gereinigtem, funktionalem Protein liegt mit 133,3 µg/g Bakterienpellet um das dreifache höher als die Menge des in Schüttelkultur exprimierten 425(scFv)-ETA' (48 µg/g Pellet).

IV.1.2 Funktionelle in vitro Charakterisierung von 425(scFv)-ETA'

In nachfolgenden Versuchen wurde das gereinigte Immuntoxin 425(scFv)-ETA' einer umfassenden funktionellen *in vitro* Charakterisierung unterzogen. Es wurde sowohl die spezifische Bindungseigenschaft des Immuntoxins gegenüber dem EGFR evaluiert als auch die Aktivität der toxischen Effektor-domäne untersucht. Da die innerhalb dieser Arbeit generierten Immuntoxine im Hinblick auf den Einsatz als mögliche Therapeutika für das metastasierende Pankreaskarzinom untersucht werden sollten, wurden die Pankreaskarzinomzelllinien L3.6pl und FG als EGFR-positive Zelllinien für Bindungsanalysen und Zytotoxizitätsassays verwendet. Bei den L3.6pl Zellen handelt es sich um eine hoch metastatische humane Zelllinie, welche nach multiplen *in vivo* Pankreas-Leber-Selektionszyklen in der Nacktmaus aus der Zelllinie FG generiert wurde (BRUNS *et al.* 1999). Die parentalen FG Zellen wurden als eine schnell

wachsende („fast growing“ FG) Zelllinie aus der Pankreaskarzinomzelllinie COLO357 generiert und besitzen im Vergleich zu den L3.6pl Zellen eine signifikant geringere Fähigkeit zur Ausbildung von Lymphknoten- und Lebermetastasen (VEZERIDIS *et al.* 1992). Wie auch andere Pankreaskarzinomzelllinien zeigen L3.6pl und FG eine Überexpression des EGFR (CHEN und LIU 1994; LIU *et al.* 1998).

IV.1.2.1 Überprüfung der Bindungsaktivität von 425(scFv)-ETA'

Die Bindungsaktivität von 425(scFv)-ETA' wurde sowohl mittels Zellmembran-ELISA (III.1.3.1), durchflusszytometrischer Analysen (III.1.3.2) und Immunofluoreszenz-Mikroskopie (III.1.3.3) verifiziert. Die ELISA-Versuche wurden mit an ELISA-Platten immobilisierten L3.6pl- und FG-Membranfraktionen sowie EGFR-negativen HL60-Membranfraktionen durchgeführt. Es konnte eine deutliche Bindungsaktivität von 425(scFv)-ETA' gegenüber den Pankreaskarzinomzelllinien nachgewiesen werden, wohingegen die Inkubation des Immuntoxins mit HL60-Membranfraktionen zu nicht signifikant erhöhten Extinktionswerten im Vergleich zur Negativkontrolle führte (Abb. III-12). Ein Vergleich der Bindungsaktivitäten unterschiedlicher Proteinmengen des 425(scFv)-ETA' Immuntoxins belegte, dass die Bindungsaktivität mit der Proteinmenge korrelierte (Abb. III-13).

Neben Zellmembran-ELISAs wurden durchflusszytometrische Analysen zur Überprüfung der Bindungsaktivität des gereinigten Immuntoxins auf L3.6pl und HL60 Zellen durchgeführt. Die durchflusszytometrische Analyse besitzt gegenüber dem ELISA den Vorteil, dass lebende Zellen für Bindungsanalysen verwendet werden können und somit die betreffenden Oberflächenantigene in ihrer natürlichen Konformation vorliegen (JAROSZESKI und RADCLIFF 1999). Weiterhin besteht die Möglichkeit tote und abnormale Zellen von lebenden Zellen zu unterscheiden, da sowohl die Größe (FSC-H) als auch die Granularität der Zellen (SSC-H) aufgezeichnet wird. Somit können Bindungsdaten eines Konstruktes aus einer homogenen Population gewonnen werden.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie bestätigten ebenso wie die Ergebnisse des Zellmembran-ELISAs, dass das 425(scFv)-Fragment in dem 425(scFv)-ETA' Immuntoxin funktional war (Abb. III-14, Abb. III-15). Ein Vergleich der Bindungsaktivitäten von 425(scFv)-ETA' nach verschiedenen Reinigungsschritten zeigte keine Abnahme der Reaktivität, so dass auf die Untersuchung des Einflusses von stabilisierenden Agenzien wie Ektoin (ANDERSON *et al.* 2000) und Glycerin auf 425(scFv)-ETA' während der Reinigung verzichtet wurde.

Die Immunofluoreszenz-Mikroskopie wurde als dritte Methode zur Untersuchung der Bindungsaktivität bzw. Kreuzreaktivität von 425(scFv)-ETA' verwendet. Den Abb. III-18 und Abb. III-19 war zu entnehmen, dass eine spezifische Bindung von 425(scFv)-ETA' an L3.6pl Zellen nachgewiesen werden konnte.

Neben der Bestätigung der Bindungsaktivität von 425(scFv)-ETA' gegenüber dem humanen EGFR konnte weiterhin gezeigt werden, dass das 425(scFv)-Fragment an den murinen EGFR auf TM3 Zellen zu binden vermochte. Diese Kreuzreaktivität ist hinsichtlich der Durchführung von *in vivo* Experimenten in Mäusen von Bedeutung (siehe IV.1.3).

IV.1.2.2 Charakterisierung der zytotoxischen Aktivität

Nach erfolgreicher Verifizierung der Funktionalität und Spezifität der Bindungsdomäne im Immuntoxin 425(scFv)-ETA' wurden XTT-basierende Zytotoxizitätsassays zur Überprüfung der Effektor-domäne ETA' durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass 425(scFv)-ETA' gegenüber L3.6pl Zellen eine spezifische Zytotoxizität aufwies (Abb. III-20). EGFR-negative HL60 und L540 Zellen wurden dagegen nicht in ihrem Wachstum beeinträchtigt (Abb. III-21). Das zytotoxische Potential verschiedener Immuntoxine wird anhand der IC₅₀ verglichen. Dieser Wert gibt die Konzentration des Proteins an, bei der nur noch 50% der getesteten Zellen leben. Die ermittelten IC₅₀ von 425(scFv)-ETA' auf L3.6pl Zellen (0,0075 µg/ml) und FG Zellen (0,008 µg/ml) liegen im selben Konzentrationsbereich wie andere in der Literatur beschriebene ETA-basierte scFv-Immuntoxine (BARTH *et al.* 1998; BARTH *et al.* 2000; POSEY *et al.* 2002; ONDA *et al.* 2004). Auch die anti-EGFR scFv-Immuntoxine scFv(14E1)-ETA und scFv(225)-ETA zeigten mit IC₅₀ Werten zwischen 0,002 und 0,006 µg/ml ein ähnliches zytotoxisches Potential wie 425(scFv)-ETA' (SCHMIDT *et al.* 1999; AZEMAR *et al.* 2000). Bei dem Vergleich der IC₅₀ verschiedener Immuntoxine ist jedoch zu berücksichtigen, dass sowohl die Dichte des Rezeptors oder des Zielantigens auf den jeweiligen Zelllinien als auch die Affinität der Bindungsdomäne (SCHMIDT *et al.* 1997) Einfluss auf die zytotoxische Wirksamkeit des Fusionsproteins besitzt. Neben der Evaluierung der anti-Tumoraktivität von rekombinanten EGFR-spezifischen Immuntoxinen wurde die zytotoxische Aktivität chemisch konjugierter Immuntoxine von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Das Immuntoxin 425.3-PE, bestehend aus dem anti-EGFR mAk 425.3 und ETA, zeigte beispielsweise eine zytotoxische Wirkung auf verschiedenen Brustkarzinomzellen und Gliomazellen (ENGEBRAATEN *et al.* 2000; ENGEBRAATEN *et al.* 2002). Die Inkubation von 425.3-PE mit den Brustkarzinomzellen MT-1 und MA-11 erbrachten verhältnismäßig niedrige IC₅₀ von 0,0003 µg/ml bzw. 0,0004 µg/ml. Der Literatur war allerdings nicht zu entnehmen, ob die im Vergleich zu 425(scFv)-ETA' niedrigeren IC₅₀-Werte des chemisch gekoppelten 425.3-PE Konstruktes eventuell auf eine Kopplung des mAk 425.3 mit mehreren PE-Molekülen zurückzuführen ist. Zu berücksichtigen sind verschiedene Nachteile von chemisch gekoppelten Immuntoxinen gegenüber rekombinant hergestellten Immuntoxinen. So weisen die rekombinant hergestellten ETA-Fusionsproteine eine definierte Ligand-Toxin-Verbindung auf und können wesentlich einfacher und reproduzierbar in *E. coli* hergestellt und modifiziert werden (HUSTON *et al.* 1991; KREITMAN 2001; BRUELL *et al.* 2003). Zudem besitzen die scFv-basierten Immuntoxine eine geringere Molekülgröße, was mit einer schnelleren

Ausscheidung über die Niere und einer besseren Tumorpenetration verbunden ist (YOKODA *et al.* 1992). Des Weiteren muss beachtet werden, dass bei der Applikation von murinen Volllängen-Ak-Immuntoxinen in den Menschen eher die Bildung von humanen anti-Maus Ak (HAMA) induziert werden kann, als bei der Gabe von murinen scFv-basierten Immuntoxinen (VITETTA *et al.* 1993; ENGEBRAATEN *et al.* 2000).

Die Daten der Zytotoxizitätsassays bestätigen eindeutig, dass das rekombinante Immuntoxin 425(scFv)-ETA' zur spezifischen Eliminierung von metastatischen Pankreaskarzinomzellen geeignet ist. Die Rekrutierung der Immuntoxine an die Tumorzellen erfolgt dabei über das 425(scFv)-Fragment, indem es spezifisch an den auf der Zelloberfläche überexprimierten EGFR bindet. Nach der Internalisierung des Konstruktes und Freisetzung der toxischen Domäne erfolgt die Inhibierung der Proteinbiosynthese durch ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 (IGLEWSKI und KABAT 1975). Für die Internalisierung der natürlichen EGFR-Liganden mittels rezeptorvermittelter Endozytose ist eine Rezeptordimerisierung ausschlaggebend (HERBST 2004). Dreidimensionale Strukturanalysen haben gezeigt, dass die Liganden EGF und TGF α mit den beiden Domänen L1 und L2 der extrazellulären Domäne des EGFR durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Arginin und Asparagin interagieren. Die Bindung jeweils eines EGF-Moleküls an ein Rezeptormolekül bewirkt eine Konformationsänderung und induziert die Dimerisierung. Dabei interagiert eine Schleife der cysteinreichen Domäne 1 (CR1) des einen Rezeptormoleküls mit einer Tasche der CR1 Schleife des anderen EGFR (JORISSEN *et al.* 2003). Da anzunehmen ist, dass das monovalente 425(scFv)-Fragment keine Dimerisierung der EGFR bewirkt, muss die Internalisierung des Immuntoxins über einen anderen Weg erfolgen. Eine Möglichkeit wäre, dass die Aufnahme von 425(scFv)-ETA' in die Zelle im Zuge einer Liganden-unabhängigen Rezeptorwiederverwertung erfolgt. Normalerweise wird der dimerisierte Rezeptor nach Ligandenbindung und eingeleiteter Signaltransduktion über „clathrin coated pits“ internalisiert und entweder in Lysosomen degradiert oder wiederverwertet (KORC 1990; TRAN *et al.* 2003). Falls eine Liganden-unabhängige Rezeptorinternalisierung stattfinden würde und dadurch das Immuntoxin in die Zelle gelangen würde, müsste weiterhin ein Transport der Vesikel in das trans-Golginetzwerk erfolgen, damit ETA' sein zytotoxisches Potential im Zytosol ausüben könnte. Es bleibt zu überprüfen, ob die Erhöhung der Bindungswalenz des rekombinanten Immuntoxins 425(scFv)-ETA' eine Vernetzung der EGFR auf den Pankreaskarzinomzellen bewirkt und ob damit eine erhöhte Internalisierung zu einem verbesserten zytotoxischen Potential führt. BERA *et al.* zeigte z.B., dass ein bivalentes anti-ErbB2 Immuntoxin ein weitaus höheres zytotoxisches Potential gegenüber mehreren ErbB2-positiven Zelllinien besitzt als das entsprechende monovalente Immuntoxin (BERA *et al.* 1999). Auch die dokumentierten Daten des 425.3-PE Konstruktes (ENGEBRAATEN *et al.* 2000; ENGEBRAATEN *et al.* 2002) unterstützen die Annahme, dass das zytotoxische Potential von 425(scFv)-ETA' Immuntoxinen durch eine zusätzliche Bindungsdomäne erhöht werden könnte.

In weiteren Zytotoxizitätsassays wurde überprüft, ob das in Abb. III-20 dokumentierte zytotoxische Potential von 425(scFv)-ETA' nur auf das Toxin ETA zurückzuführen ist oder das 425(scFv)-Fragment ohne toxische Domäne auch einen Effekt auf die Viabilität der Zellen zeigt. Dazu wurde das Konstrukt pBM1.1-425(scFv) generiert, das scFv-Fragment periplasmatisch unter Standardbedingungen exprimiert und mittels Ni²⁺-NTA und Kationenaustauschchromatographie gereinigt (Abb. III-11). Zytotoxizitätsassays erbrachten den Nachweis, dass das 425(scFv)-Fragment ohne toxische Domäne keinen Einfluss auf die Viabilität der L3.6pl Zellen besaß (Abb. III-22).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass erstmalig das zytotoxische Potential eines rekombinanten Immuntoxins gegenüber Pankreaskarzinomzellen dokumentiert werden konnte. Bis dato wurden nur chemisch konjugierte Immuntoxine hinsichtlich einer Therapie des Pankreaskarzinoms evaluiert (GRIFFIN *et al.* 1988; PISELLI *et al.* 1995; OTSUJI *et al.* 1996). Diese weisen jedoch wie bereits oben aufgeführt einige Nachteile gegenüber den rekombinant hergestellten Immuntoxinen auf.

IV.1.3 In vivo Experimente mit 425(scFv)-ETA'

Aufgrund der vielversprechenden *in vitro* Daten des Immuntoxins 425(scFv)-ETA' (BRUELL *et al.* 2003) wurde ein Pilotexperiment zur Beurteilung der zytotoxischen Wirksamkeit von 425(scFv)-ETA' gegenüber den metastasierenden Pankreaskarzinomzellen L3.6pl *in vivo* in Kooperation mit Frau Dr. Christiane Bruns (Chirurgische Klinik und Poliklinik Großhadern, Klinikum der Universität München (LMU)) durchgeführt. Es wurde ein disseminiertes Mausmodell verwendet, bei dem intravenös (i.v.) injizierte L3.6pl Zellen in 100% der Fälle zur Ausbildung von Mikrometastasen in der Lunge sowie Schwanztumoren von unbehandelten Nacktmäusen führten. Um erste Aussagen zur Stabilität von 425(scFv)-ETA' in Mausserum treffen zu können, wurde das Immuntoxin für verschiedene Zeiten in Serum unter physiologischen Bedingungen inkubiert und anschließend sowohl die Menge eventuell entstandener Degradationsprodukte als auch die Funktionalität des Immuntoxins evaluiert. Die Versuche belegten, dass 425(scFv)-ETA' in Mausserum (2 µg in 200 µl Serum) unter physiologischen Bedingungen über 24 h stabil war und die gleiche Bindungsaktivität wie nicht in Serum inkubiertes 425(scFv)-ETA' aufwies (Abb. III-24, Abb. III-25). Das anti-CD30 Ki-4(scFv)-ETA Immuntoxin zeigte eine ähnlich hohe Stabilität in Mausserum, da es nach einer Inkubation von 24 h im Serum bei 37°C noch ca. 90% der ursprünglichen Bindungsaktivität aufwies (BARTH *et al.* 2000).

Zur Bestimmung der maximal tolerablen Dosis (MTD) von 425(scFv)-ETA' in gesunden Mäusen wurden die Tiere mit aufsteigenden Immuntoxinkonzentrationen behandelt und mehrere Tage beobachtet. Beim Auftreten von irreversiblen Toxizitäten bzw. klinisch eindeutigen Krankheitszeichen wurden die Mäuse geopfert. Mittels des durchgeführten Experiments wurde eine MTD

von 20 µg (1 mg/kg) bestimmt (Tab. III-1). Eine Immuntoxinkonzentration > 20 µg führte zu derart hohen Toxizitäten, welche eine Erholung der Mäuse nicht mehr ermöglichten. Die MTD von anti-CD30- und anti-CD25-spezifischen ETA-basierten Immuntoxinen lag mit 40 µg doppelt so hoch wie die MTD des 425(scFv)-ETA' Immuntoxins. Ausschlaggebend für eine unspezifische Toxizität des Immuntoxins im Menschen ist das Vorhandensein des Rezeptors oder des Zielantigens auf nicht malignen Zellen. Der EGFR ist beispielsweise in geringen Konzentrationen auf epithelialen Zellen der Leber und Haut exprimiert (FAILLOT *et al.* 1996; BASELGA *et al.* 2000). Die reduzierte MTD von 425(scFv)-ETA' in Nacktmäusen könnte dadurch erklärt werden, dass das Immuntoxin nach i.v. Gabe mit dem murinen EGFR auf den Leberzellen kreuzreagiert und dementsprechend Leberschäden bewirkt (BASELGA *et al.* 2000). Diese Hypothese wurde durch durchflusszytometrische Bindungsanalysen und Zytotoxizitätsassays von 425(scFv)-ETA' auf der murinen EGFR-positiven Zelllinie TM3 (MATHER 1980) unterstützt. Es konnte sowohl eine Bindungsaktivität als auch eine deutliche zytotoxische Aktivität von 425(scFv)-ETA' gegenüber den TM3 Zellen festgestellt werden (Abb. III-17, Abb. III-23). Erstaunlicherweise wurde von MURTHY *et al.* eine Kreuzreaktivität des mAk 425 mit dem murinen Rezeptor nicht beobachtet (MURTHY *et al.* 1987).

Zur Bestimmung der anti-Tumoraktivität von 425(scFv)-ETA' *in vivo* wurde zunächst eine Tumorzell dissemination durch i.v. Injektion von L3.6pl Zellen in Nacktmäusen verursacht. Einen Tag nach der Tumorzellinokulation erfolgte die Applikation des Immuntoxins, wobei zwei verschiedene Strategien evaluiert werden sollten. Ein Teil der Mäuse erhielt eine einmalige Injektion von 20 µg 425(scFv)-ETA', so dass die applizierte Gesamtmenge des Immuntoxins der MTD entsprach. Der zweite Teil der Tiere wurde mit 4x 10 µg Immuntoxin an den Tagen 1 bis 4 nach der Tumorzellinokulation behandelt. Die Gesamtmenge an injiziertem 425(scFv)-ETA' lag dabei doppelt so hoch wie die ermittelte MTD. Diese Strategie wurde gewählt, da in der Literatur mehrfach gezeigt werden konnte, dass eine wiederholte Immuntoxinapplikation über mehrere Tage im Vergleich zu einer einmaligen Gabe des Therapeutikums zu besseren Ergebnissen führte (MANSFIELD *et al.* 1997; SCHMIDT *et al.* 1999; DI PAOLO *et al.* 2003).

Es konnte dokumentiert werden, dass beide Therapiestrategien zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl von gebildeten Lungenmetastasen sowie Schwanztumoren führten (Tab. III-2). 100% der mit 1x PBS behandelten Kontrolltiere bildeten Lungenmetastasen, wobei die mittlere Anzahl 56,25 betrug. Durch eine histopathologische Untersuchung (H&E-Färbung) des Lungengewebes wurde die Formation von makroskopisch auf der Lungenoberfläche sichtbaren Metastasen bestätigt (Abb. III-26). Ebenfalls konnten bei allen Kontrolltieren Schwanztumore nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu entwickelten 62,5% (einmalige Immuntoxinapplikation) bzw. 71,4% (wiederholte Immuntoxinapplikation) der mit 425(scFv)-ETA' behandelten Mäuse keinerlei Lungenmetastasen und blieben komplett tumorfrei. Dementsprechend lag die mittlere Anzahl der Metastasen in der Lunge pro Tier mit 0,875 (einmalige Immuntoxinapplikation) bzw. 0,285

(wiederholte Immuntoxinapplikation) signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren. Es war jedoch nicht möglich einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen festzustellen. Zur besseren Evaluierung der Therapiestrategien untereinander müssten weitere Tierexperimente mit einer größeren Anzahl an Mäusen durchgeführt werden, worauf aber im Rahmen dieser Arbeit aus Kostengründen verzichtet werden musste.

Die Ergebnisse der *in vivo* Experimente zeigten, dass das disseminierte Mausmodell für eine erste Untersuchung der anti-Tumoraktivität von 425(scFv)-ETA' gegenüber Pankreaskarzinomzellen sehr gut geeignet ist. Die in Mäusen disseminiert wachsenden L3.6pl Zellen simulieren nach Standardtherapie verbliebene residuale Pankreastumorzellen, welche nach Zirkulation im Blutkreislauf zur Formation von Metastasen führen. Somit konnten, das Modell nutzend, erste Daten bezüglich der Verwendung von 425(scFv)-ETA' zur Eliminierung dieser metastasierenden Tumorzellen in einem lebenden System dokumentiert werden.

Das orthotope Tiermodell nach BRUNS *et al.* erlaubt eine Untersuchung der Wirksamkeit des Immuntoxins 425(scFv)-ETA' sowohl auf das Primärwachstum als auch auf die spontane Lymphknoten- und Lebermetastasierung und korreliert damit direkt mit dem humanen Metastasierungsverhalten (BRUNS *et al.* 1999). In Zukunft soll die Evaluierung verschiedener Therapiestrategien mit 425(scFv)-ETA' in diesem Modell durchgeführt werden (siehe IV.3). Aufgrund der festgestellten Kreuzreaktivität von 425(scFv)-ETA' mit dem murinen EGFR ist eine Einschätzung von eventuell im Menschen auftretenden Nebenwirkungen bedingt durch die Bindung des Immuntoxins an EGFR-positive nicht maligne Zellen möglich.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass 425(scFv)-ETA' sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein deutliches zytotoxisches Potential gegenüber metastasierenden Pankreaskarzinomzellen aufweist und somit einen vielversprechenden Kandidaten für weitere klinische Studien darstellt. Bis dato ist 425(scFv)-ETA' das erste rekombinante Immuntoxin, welches zur Behandlung des Pankreaskarzinoms in einem *in vivo* Modell analysiert wurde. Zu den bisherigen untersuchten immuntherapeutischen Ansätzen zählt die Applikation von anti-EGFR mAk. Der chimäre (Maus/Mensch) Ak IMC-C225 des murinen anti-EGFR mAk 225 zeigte beispielsweise einen wachstumshemmenden Effekt auf in Nacktmäusen etablierte Pankreastumore (BRUNS *et al.* 2000; OVERHOLSER *et al.* 2000). ABX-EGF, ein humaner anti-EGFR Ak, wurde ebenfalls erfolgreich zur Behandlung von Pankreastumoren in Mäusen eingesetzt (YANG *et al.* 2001).

Diese Studien bestätigen den EGFR als geeignetes Zielantigen für immuntherapeutische Ansätze zur Behandlung von Pankreastumoren. Der mAk425, aus dem das scFv-Fragment 425 generiert wurde, ist bis dato noch nicht in Studien zur Therapie des Pankreaskarzinoms untersucht worden. MA *et al.* dokumentierten eine Inhibierung der Proliferation von Brustkarzinomzellen durch die Applikation von mAk425 (MA *et al.* 1998). Weiterhin wurde der Einfluss von mAk425 auf das Wachstum von Gliomazellen evaluiert (WERSALL *et al.* 1997; EMRICH *et al.* 2002). Der Wirkmechanismus des mAk425 beruht auf der Bindung an ein Epitop der extrazellulären

Domäne des EGFR, wodurch die Interaktion des natürlichen Liganden EGF und die damit verbundene Signaltransduktionskaskade verhindert wird. Durch nachfolgende Internalisierung des EGFR-Komplexes wird der EGFR auf der Zelloberfläche herunterreguliert, was in einer Inhibierung des Wachstums der Tumorzellen resultiert (RODECK *et al.* 1990). Dabei ist die Bivalenz des mAk für die Rezeptordimerisierung und anschließender Internalisierung essentiell (FAN *et al.* 1994). In der Regel besitzen die in der Krebstherapie verwendeten mAk einschließlich des mAk425 nicht die Fähigkeit die Tumorzellen direkt abzutöten, sondern üben nur einen wachstumshemmenden Effekt aus. Beobachtete nekrotische oder zytotoxische Effekte von mAk gegenüber Tumorzellen sind auf die Fc-Teil vermittelte Rekrutierung von verschiedenen Effektorzellen, wie Makrophagen oder Granulozyten, zurückzuführen (ADAMS *et al.* 1984; RODECK *et al.* 1987; WERSALL *et al.* 1997; NISHIHARA *et al.* 2000). In den letzten Jahren wurden anti-EGFR mAk vor allem in Kombination mit Chemotherapeutika getestet, um eine gesteigerte anti-Tumoraktivität zu erreichen. BASELGA *et al.* und FAN *et al.* beschrieben dabei synergistische Effekte bei der Applikation der mAk223, mAk528 und C225 (BASELGA *et al.* 1993; FAN *et al.* 1993; BASELGA *et al.* 2000). Immuntoxine haben im Vergleich zu mAk ein weitaus höheres zytotoxisches Potential, da sie nach erfolgter Internalisierung die Tumorzellen direkt eliminieren können (CARTER 2001; SAFAVY *et al.* 2003). Aufgrund dessen wurde innerhalb dieser Arbeit die Evaluierung von anti-EGFR Immuntoxinen zur Therapie des Pankreaskarzinoms favorisiert.

IV.2 Konstruktion, Expression und Charakterisierung von Gb-, Ang- und ECP-basierten Immuntoxinen

Eines der zentralen Probleme bei der klinischen Anwendung von Immuntoxinen mit bakteriellen und pflanzlichen Toxinkomponenten stellt die Immunogenität dieser Komponenten dar. Nach Applikation der Fremdproteine können die Patienten humane anti-Toxin Ak entwickeln, die einen neutralisierenden Effekt auf die Funktion des Therapeutikums haben (VITETTA *et al.* 1993; BRINKMANN und PASTAN 1994). Neben der Bildung von anti-Toxin Ak kann es bei Verwendung von murinen Ak auch zu humanen anti-Maus Ak (HAMA) kommen (VITETTA *et al.* 1993). Um die Immunogenität der Toxinkomponenten in anti-EGFR Immuntoxinen zu reduzieren, wurden im zweiten Teil der Dissertation verschiedene 425(scFv)-Immunkonjugate unter Verwendung von humanen Enzymen wie Angiogenin (Ang), Granzym B (Gb) und eosinophil-kationischem Protein (ECP) generiert. Grundlage für diesen Ansatz bildete die in mehreren Arbeiten beschriebene Effizienz der RNase Ang als Effektor-domäne in Immuntoxinen (NEWTON *et al.* 1996; YOON *et al.* 1999; HUHNS *et al.* 2001). Die RNase ECP wurde bereits als toxische Domäne in einem chemisch konjugierten Immuntoxin verwendet und zeigte ebenfalls zytotoxisches Potential (JINNO *et al.* 2002). Basierend auf den Vorarbeiten von Dr. Michael

Stöcker sollte weiterhin die aspartatspezifische Serinprotease Gb auf ihre Eignung als zytotoxische Komponente in anti-EGFR Immuntoxinen evaluiert werden (STÖCKER 2001). Gb ist eine Komponente der zellulären Immunabwehr und steht in direktem Zusammenhang mit der Auslösung von Apoptose. Literaturrecherchen zu Beginn der Arbeit ergaben, dass noch kein Gb-basiertes rekombinantes Immuntoxin beschrieben worden ist, was die Untersuchung dieser toxischen Komponente besonders interessant macht. Die Arbeiten von BEN-YEHUDAH *et al.* und AQEILAN *et al.* zeigten, dass bereits andere proapoptotischen Proteine wie Bax, Bik und Cad als Bestandteile von Immuntoxinen verwendet wurden und erfolgreich die Apoptose von Krebszellen induzieren konnten (AQEILAN *et al.* 2003; BEN-YEHUDAH *et al.* 2003).

Aufgrund kontroverser Aussagen bezüglich der für die katalytische Aktivität notwendigen Lokalisation von Ang in Immuntoxinen wurden sowohl 425(scFv)-Fusionsproteine mit C-terminal als auch mit N-terminal lokalisiertem Ang generiert. NEWTON *et al.* und HUHN *et al.* beschrieben beispielsweise, dass ein freier N-Terminus am Ang essentiell für die Funktionalität der RNase sei (NEWTON *et al.* 1996; NEWTON *et al.* 1998; HUHN *et al.* 2001). Dagegen konnten YOON *et al.* und STÖCKER *et al.* zeigen, dass auch Immuntoxine mit C-terminal lokalisiertem Ang eine spezifische zytotoxische Aktivität gegenüber Zielzellen aufweisen (YOON *et al.* 1999; STÖCKER *et al.* 2003). Um zu untersuchen, ob die Lokalisation von ECP und Gb einen Einfluss auf die Wirksamkeit der Immuntoxine hat, wurden ebenfalls C- und N-terminale Fusionen mit dem 425(scFv)-Fragment hergestellt.

IV.2.1 Expression und funktionelle Charakterisierung von 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb

Die 425(scFv)-Immuntoxine mit C-terminal lokalisierten Effektor-domänen wurden sowohl in prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen produziert. Eine erfolgreiche Produktion von funktionalem Ang bzw. funktionalen Ang-Immuntoxinen in *E. coli* wurde bereits mehrfach beschrieben (NEWTON *et al.* 1996; HUHN *et al.* 2001). STÖCKER *et al.* wählte zur Expression von anti-CD30-Ang Immuntoxinen ein eukaryotisches Expressionssystem und konnte ebenfalls rekombinantes Protein erfolgreich produzieren (STÖCKER *et al.* 2003). Da die humanen Enzyme natürlicherweise in menschlichen Zellen exprimiert werden, sollte eine Expression in Eukaryoten begünstigt sein. Bei der Wahl des Expressionssystems für die humanen Enzyme Gb und ECP ist weiterhin zu berücksichtigen, dass diese Proteine mehrere potentielle Glykosylierungsstellen besitzen (SORRENTINO 1998; TRAPANI und SUTTON 2003) und diese Glykosylierungen Auswirkungen auf die Wirksamkeit und Proteineigenschaften der Enzyme haben können. HARRIS *et al.* beschrieben beispielsweise, dass die Expression von Gb in *E. coli* scheiterte, jedoch die Produktion in einem Hefesystem zu funktionalem Protein führte (HARRIS *et al.* 1998). Spekuliert wird, dass die Glykosylierungen einen stabilisierenden und solubilisierenden

Effekt auf die Protease Gb ausüben und somit die Produktion in einem eukaryotischen System zu besseren Ergebnissen führt. Jedoch ist des Weiteren zu berücksichtigen, dass die Zuckerreste der humanen Enzyme eventuell unspezifisch an entsprechenden Rezeptoren auf Hepatozyten binden können und somit diese schädigen. Arbeiten mit glykosylierten Ricin A-Immuntoxinen zeigten *in vivo* beispielsweise eine starke Hepatoxizität, nach Verwendung von deglykosyliertem Ricin konnte eine Schädigung der Hepatozyten verhindert werden (BLAKEY *et al.* 1988).

Aufgrund der oben diskutierten Aspekte wurden die Immuntoxine sowohl in *E. coli* als auch in eukaryotischen HEK293T Zellen exprimiert. Nach einem Vergleich der Expressionsraten sowie der Stabilität und Funktionalität der in den unterschiedlichen Systemen exprimierten Immuntoxinen, wurde das geeignetere Expressionssystem ausgewählt und für nachfolgende Versuche verwendet.

IV.2.1.1 Prokaryotische Expression

Nach erfolgreicher Klonierung der Enzyme Ang, ECP und Gb an den C-Terminus des in dem pBM1.1. Vektor enthaltenen 425(scFv)-Fragmentes wurden die durch Sequenzierung bestätigten Konstrukte in *E. coli* periplasmatisch unter osmotischem Stress exprimiert. Die Vorteile von diesem Expressionssystem wurden bereits in Abschnitt IV.1.1 diskutiert. Zur Reinigung der aus der periplasmatischen Fraktion isolierten Immuntoxine wurde eine Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt. Western-Blot-Analysen belegten, dass 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb periplasmatisch exprimiert und gereinigt werden konnten (Abb. III-27). Die Ausbeute an gereinigtem Protein war jedoch sehr gering. Für 425(scFv)-Ang wurde die Menge des exprimierten und Ni²⁺-NTA gereinigten Proteins mit 1,5 µg/g Pellet abgeschätzt, 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb wiesen sogar nur eine Proteinausbeute von 0,27 µg/g Pellet auf. Des Weiteren war dem Western-Blot zu entnehmen, dass in den Elutionsfraktionen von 425(scFv)-ECP und vor allem 425(scFv)-Ang eine Reihe von Proteinen detektiert werden konnten, die kleiner als das Vollängentranslationsprodukt waren. Da in entsprechenden Expressionskontrollen des Wildtypstammes BL21 (DE3) die meisten der Banden nicht nachgewiesen werden konnten (Daten nicht dargestellt), kann man davon ausgehen, dass es sich bei den Proteinen größtenteils um Degradationsprodukte der Immuntoxine handelte. Des Weiteren können die verkürzten Proteine auf Translationsabbrüche zurückzuführen sein, welche aufgrund des N-terminalen His10-Tags neben dem Vollängentranslationsprodukt ebenfalls detektiert werden.

Die Expressionsrate und Stabilität der Immuntoxine konnte auch durch Variation verschiedenster Parameter, wie z.B. IPTG-Konzentration, Expressionsmedium und -temperatur nicht verbessert werden. Zu untersuchen bleibt, inwieweit die Integration von verschiedenen Linkern zwischen der Bindungsdomäne und den Effektor-domänen einen Einfluss auf die Stabilität sowie die Produzierbarkeit der Immuntoxine besitzt (BARBOUR *et al.* 1995; NEWTON *et al.* 1996). Vorstellbar

wäre auch, die Fusionsproteine durch die Einführung einer Disulfidbrücke zu stabilisieren (CUMBER *et al.* 1992).

Die Analyse der Bindungsaktivität der exprimierten und Ni²⁺-NTA gereinigten Immuntoxine in Zellmembran-ELISAs ergab, dass alle drei Fusionsproteine an EGFR-positive L3.6pl-Membranfraktionen zu binden vermochten (Abb. III-28). 425(scFv)-Ang zeigte dabei die geringste Bindungsaktivität im Vergleich zu 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb. Dies könnte im Zusammenhang mit der mangelnden Stabilität des Immuntoxins stehen, denn 425(scFv)-Ang wies im Vergleich zu den anderen beiden Immuntoxinen die meisten Degradationsprodukte auf. Die unterschiedlichen Extinktionswerte könnten auch durch unterschiedlich eingesetzte Proteinmengen zu erklären sein, da sich aufgrund des geringen Reinheitsgrades der Elutionsfraktionen die Proteinmengenbestimmung als schwierig erwies. Bedingt durch die geringen exprimierten Proteinmengen war es nicht möglich weitere funktionelle Charakterisierungen wie Zytotoxizitätsassays mit 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb durchzuführen.

IV.2.1.2 Eukaryotische Expression

Für die eukaryotische Expression von 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb wurde der Vektor pMSII verwendet. Die in dem Plasmid enthaltene Igκ-Signalsequenz ermöglicht die Sekretion von rekombinanten Proteinen in den Zellkulturüberstand (COLOMA *et al.* 1992). Da der Überstand kaum kontaminierende Proteine enthält, stellt sich die Reinigung der eukaryotisch exprimierten und sekretierten Proteine im Vergleich zur Reinigung bakteriell produzierter Proteine als einfacher dar (YAZAKI *et al.* 2001; STÖCKER *et al.* 2003). Ein weiterer Vorteil liegt in der Möglichkeit, die Zellkulturüberstände direkt ohne vorherige Reinigung für erste Analysen wie z.B. Durchflusszytometrie und ELISA zu benutzen, da die Proteinmenge und der Reinheitsgrad ausreichend sind.

Wie bereits in Abschnitt IV.2.1 erwähnt, sollte die Produktion der humanen zytotoxischen Enzyme Ang, ECP und Gb in Eukaryoten begünstigt sein, da diese Proteine natürlicherweise in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Die produzierenden Zellen verfügen dabei über spezielle Mechanismen, um die intrazelluläre Wirkung der Proteine zu inhibieren (LEE und VALLEE 1993; HIRST *et al.* 2003).

Nach erfolgreicher Klonierung der Immuntoxine in den pMSII Vektor wurden HEK293T Zellen transfiziert. Die Selektion von transfizierten Klonen erfolgte mit Hilfe der durch das Plasmid vorhandenen Zeocin[®]-Resistenz sowie dem EGFP-Protein, welches neben dem Zielprotein von der bicistronischen mRNA codiert wird. Die Etablierung zu 90% transfizierter Zellpopulationen benötigte in der Regel vier Wochen. Der Transfektionsstatus wurde danach regelmäßig mittels Sichtkontrollen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

Western-Blot-Analysen und SDS-PAA-Gele bestätigten, dass die Immuntoxine 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb erfolgreich in HEK293T Zellen exprimiert und aus dem Zellkulturüberstand mittels Ni^{2+} -NTA gereinigt wurden (Abb. III-29). Die Größe der detektierten Banden in den Proteinpräparationen von 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb lagen etwas über der theoretisch berechneten Größe. Da beide Proteine Glykosylierungsstellen besitzen (HARRIS *et al.* 1998; SORRENTINO 1998), ist davon auszugehen, dass der Größenunterschied auf den Glykosylierungsstatus der Proteine zurückzuführen ist. Dem SDS-PAA-Gel der affinitätsgereinigten Proben war zu entnehmen, dass die Elutionsfraktionen aller drei Immuntoxine keine kontaminierenden Proteine aufwiesen und somit sehr rein waren.

Die abgeschätzten durchschnittlichen Proteinausbeuten lagen mit 1,9 mg/g Zellen für 425(scFv)-Ang, 1,62 mg/g Zellen für 425(scFv)-ECP und 1,92 mg/g Zellen für 425(scFv)-Gb deutlich höher als die Ausbeuten von den entsprechenden prokaryotisch exprimierten Immuntoxinen, welche sich im ng- μg Bereich/g Zellpellet bewegten (III.2.1.1.2). Im gleichen Expressionssystem produzierte Immuntoxine zeigten ähnliche bis fünffach niedrigere Ausbeuten an Ni^{2+} -NTA gereinigtem Protein (STÖCKER 2001; STÖCKER *et al.* 2003). Anhand des Western-Blots war des Weiteren zu erkennen, dass keine Degradationsprodukte der Immuntoxine nachgewiesen werden konnten (Abb. III-29). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Immuntoxine für weitere Versuche nur noch in Eukaryoten exprimiert.

Mittels durchflusszytometrischer Analysen wurde bestätigt, dass die eukaryotisch exprimierten Immuntoxine Bindungsaktivität gegenüber den EGFR-positiven L3.6pl Zellen aufwiesen (Abb. III-30). Dabei war die Bindungsaktivität der drei Fusionsproteine identisch. Die Ergebnisse des Zellmembran-ELISAs dokumentierten ebenfalls die Funktionalität der Bindungsdomäne der 425(scFv)-hE Immuntoxine (Abb. III-31), wobei die Extinktionswerte mit den jeweiligen Verdünnungsstufen korrelierten. Es wurden jedoch geringfügige Schwankungen der Extinktionswerte zwischen den Immuntoxinen in den jeweiligen Verdünnungsstufen verzeichnet. Dies könnte auf die z.T. unterschiedliche Qualität der Membranfraktionen zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu der Immobilisierung von löslichem Antigen kann die Konzentration des auf der Zelloberfläche gebundenen EGFR/Napf nicht genau quantifiziert werden. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass ein Teil der Membranvesikel „inside out“ vorliegen kann und somit der EGFR nicht zugänglich ist.

Zur Evaluierung der zytotoxischen Aktivität der in den 425(scFv)-Immuntoxinen enthaltenen Effektor-domänen Ang, ECP und Gb gegenüber Pankreaskarzinomzellen wurden Zytotoxizitätsassays durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass 425(scFv)-Ang und 425(scFv)-Gb eine spezifische toxische Aktivität gegenüber L3.6pl Zellen aufwiesen (Abb. III-32). Die ermittelten IC_{50} lagen dabei mit 0,38 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für 425(scFv)-Gb und 0,43 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für 425(scFv)-Ang deutlich über den Werten von 425(scFv)-ETA' (0,0075 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Da das *Pseudomonas* Exotoxin A als eines der potentesten Toxine gilt, die im Bereich Immuntoxine eingesetzt werden, erscheint dieses

Ergebnis nicht überraschend. Jedoch zeigten Arbeiten von NEWTON *et al.* und HUHN *et al.*, das Ang-basierte Immuntoxine durchaus ein zytotoxisches Potential im Bereich von ETA-basierten Konstrukten erreichen können (NEWTON *et al.* 1999; HUHN *et al.* 2001). So lagen die IC₅₀ von den Immuntoxinen CD30-Ligand-Ang und anti-Transferrinrezeptor-Ang bei 0,008 µg/ml bzw. 0,006 µg/ml. Hierbei bleibt zu berücksichtigen, dass sich der Vergleich der IC₅₀ von unterschiedlichen Immuntoxinen als schwierig erweist, da neben der zytotoxischen Komponente die Rezeptordichte auf der Zielzelllinie sowie die Bindungsaffinität des Bindeliganden und das Internalisierungsverhalten ausschlaggebend für das zytotoxische Potential der Immuntoxine sind. Ein Vergleich der IC₅₀ der im Rahmen dieser Arbeit konstruierten 425(scFv)-Immuntoxine ist daher noch am ehesten möglich, da sowohl der Bindeligand als auch das Testsystem bzw. die Zielzelllinien identisch sind.

Mit dem Immuntoxin 425(scFv)-ECP konnte kein zytotoxischer Effekt auf EGFR-positiven Pankreaskarzinomzelllinien festgestellt werden. Um zu überprüfen, ob eventuell die C-terminale Lokalisation der Effektor-domänen in den Immuntoxinen einen Einfluss auf die zytotoxische Wirksamkeit besitzt, wurden Konstrukte generiert, in denen die humanen Enzyme mit dem N-Terminus des 425(scFv)-Fragmentes fusioniert wurden (siehe IV.2.2).

IV.2.2 Expression und Charakterisierung von Ang-425(scFv), ECP-425(scFv) und Gb-425(scFv)

Die mittels Sequenzierung bestätigten Konstrukte ECP-425(scFv), Ang-425(scFv) und Gb-425(scFv) wurden analog nach dem für 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb beschriebenen Verfahren in eukaryotischen HEK293T Zellen exprimiert und aus dem Zellkulturüberstand gereinigt. Western-Blot-Analysen und SDS-PAA-Gele belegten, dass die Produktion und Ni²⁺-NTA-Reinigung der drei hE-425(scFv) Immuntoxine erfolgreich war (Abb. III-33). Die Größen der detektierten Proteine stimmten dabei mit den nachgewiesenen Größen der entsprechenden 425(scFv)-hE Fusionsproteine überein. ECP-425(scFv) und Gb-425(scFv) zeigten wie 425(scFv)-ECP und 425(scFv)-Gb ein etwas höheres Molekulargewicht, was wiederum durch den Glykosylierungsstatus der Proteine zu erklären ist (siehe IV.2.1.2). Vergleichbar waren der Reinheitsgrad der Ni²⁺-NTA gereinigten 425(scFv)-hE und hE-425(scFv) Immuntoxine sowie die Proteinausbeuten (1,6 mg/Zellen für Ang-425(scFv) und Gb-425(scFv), 1,3 mg/Zellen für ECP-425(scFv)).

Durchflusszytometrische Analysen sowie Zellmembran-ELISAs erbrachten den Nachweis, dass die Bindungsaktivitäten von ECP-425(scFv), Ang-425(scFv) und Gb-425(scFv) gegenüber dem EGFR identisch waren (Abb. III-34, Abb. III-35). Des Weiteren zeigte ein Vergleich der Bindungsaktivität von 425(scFv)-hE Immuntoxinen mit hE-425(scFv) Immuntoxinen, dass die

Lokalisation des 425(scFv)-Fragmentes in den Fusionsproteinen die EGFR-spezifische Bindung nicht beeinflusste.

Zur Charakterisierung der zytotoxischen Aktivität von ECP-425(scFv), Ang-425(scFv) und Gb-425(scFv) gegenüber L3.6pl Zellen und FG Zellen wurden Zytotoxizitätsassays durchgeführt. Aus den in Abb. III-36 dargestellten Ergebnissen war ersichtlich, dass Ang-425(scFv) und Gb-425(scFv) einen zytotoxischen Effekt auf L3.6pl zeigten, dieser jedoch im Vergleich zu 425(scFv)-Ang und 425(scFv)-Gb sehr schwach war. Nur bei 32% bzw. 28% der Tumorzellen konnte die Proteinbiosynthese inhibiert werden. Damit war es nicht möglich eine IC₅₀ zu bestimmen. Eine unspezifische Toxizität ist auszuschließen, da auf entsprechenden EGFR-negativen Zelllinien kein zytotoxischer Effekt beobachtet werden konnte. Mit FG Zellen durchgeführte Zytotoxizitätsassays zeigten ebenfalls nur ein schwaches zytotoxisches Potential von Ang-425(scFv) und Gb-425(scFv). Mit dem Immuntoxin ECP-425(scFv) konnte überhaupt keine Aktivität der toxischen Domäne nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine N-terminale Lokalisation der humanen Enzyme Ang, ECP und Gb in 425(scFv)-Immuntoxinen zu keiner Steigerung des zytotoxischen Potentials geführt hat. Die entsprechenden Konstrukte wiesen sogar eine geringere zytotoxische Aktivität gegenüber L3.6pl und FG Zellen auf. Dementsprechend wurde in weiteren Versuchen der Fokus auf die 425(scFv)-hE Immuntoxine gerichtet.

IV.2.3 Expression und Charakterisierung von 425(scFv)-dII-Ang, 425(scFv)-dII-ECP und 425(scFv)-dII-Gb

Das Ziel der folgenden Experimente bestand darin, dass zytotoxische Potential von 425(scFv)-Ang und 425(scFv)-Gb zu steigern. 425(scFv)-ETA' wies wie in Abschnitt IV.1.2.2 erwähnt eine deutlich niedrigere IC₅₀ im Vergleich zu 425(scFv)-Ang und 425(scFv)-Gb auf. Dies kann möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass die katalytisch-aktive Domäne der humanen Enzyme nicht effizient in das Zytoplasma der Zielzellen geschleust wird. Das *Pseudomonas* Exotoxin A verfügt über eine Translokationsdomäne, die eine aktive Translokation der katalytischen Einheit ins Zytosol fördert (SIEGALL *et al.* 1991; OGATA *et al.* 1992). Es konnte nachgewiesen werden, dass nach endozytotischer Aufnahme des Toxins in die Zelle die Translokationsdomäne an einer spezifischen Erkennungssequenz von der Protease Furin geschnitten wird, was den Transport der toxischen Domäne über das trans-Golginetzwerk und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Zytoplasma der Zelle gewährleistet (TAKAHASHI *et al.* 1995). Eine Erhöhung der toxischen Aktivität von ETA konnte durch Insertion der C-terminalen KDEL-Sequenz (ER-Retentionssignal) erreicht werden, da diese Sequenz einen effizienteren Transport in das ER bewirkt (SEETHARAM *et al.* 1991). Die als Effektordomänen verwendeten humanen Enzyme verfügen natürlicherweise nicht über derartige

Translokationsdomänen. Dies war die Rationale zur Konstruktion von 425(scFv)-hE Immuntoxinen mit integrierter ETA-Translokationsdomäne. Es wurde untersucht, inwieweit die Insertion der Domäne an den N-Terminus der Enzyme das zytotoxische Potential der Fusionsproteine verbessert. Bereits mehrfach führte der Einsatz von Translokationsdomänen oder entsprechenden molekularen Adaptoren in Immuntoxinen zu verbesserten Wirksamkeiten (FOMINAYA und WELS 1996; KELLER *et al.* 2001; HEISLER *et al.* 2003). Die von HEISLER *et al.* beschriebenen Adaptoren ermöglichen neben einem toxinunabhängigem Translokationsmechanismus sogar eine gezielte Detoxifizierung freigesetzter Metabolite (HEISLER *et al.* 2003). Basierend auf den Ergebnissen von TAUPIAC *et al.* wurde nicht die komplette ETA-Translokationsdomäne verwendet, sondern ein Konstrukt mit deletierter F-Helix (TAUPIAC *et al.* 1999). Die natürliche Translokationsdomäne von ETA besteht aus 111 As (333 bp) die sechs konsekutive α -Helixes (A-F) bilden (ALLURED *et al.* 1986). Es konnte gezeigt werden, dass die F-Helix einen inhibitorischen Einfluss auf die Translokation von ETA ausübt und somit die Deletion dieser Region zu einer verbesserten Translokation und Zytotoxizität von ETA führt (TAUPIAC *et al.* 1999).

Nach erfolgreicher Amplifikation der deletierten Translokationsdomäne mittels PCR wurde das PCR-Produkt (dII) in die Vektoren pMSII-425(scFv)-Ang und pMSII-425(scFv)-Gb kloniert. Des Weiteren wurde das Konstrukt 425(scFv)-dII-ECP generiert, um zu überprüfen, ob nach Insertion der Translokationsdomäne ein zytotoxischer Effekt des Immuntoxins nachgewiesen werden konnte. Die Konstrukte wurden in HEK293T Zellen transfiziert und erfolgreich exprimiert und gereinigt (Abb. III-38). Im Vergleich zu den entsprechenden Immuntoxinen ohne dII Domäne war die Ausbeute an gereinigtem Protein etwas geringer. Des Weiteren wurden im SDS-PAA-Gel und Western-Blot neben den Vollängenprodukten mehrere Degradationsprodukte nachgewiesen.

Die Funktionalität der Bindungsdomäne von 425(scFv)-dII-ECP, 425(scFv)-dII-Ang und 425(scFv)-dII-Gb wurde in durchflusszytometrischen Analysen und Zellmembran-ELISAs bestätigt (Abb. III-39, Abb. III-40). Dabei waren die Bindungsaktivitäten der 425(scFv)-hE mit denen der 425(scFv)-dII-hE Immuntoxine vergleichbar.

Zytotoxizitätsassays erbrachten den Nachweis, dass 425(scFv)-dII-Ang und 425(scFv)-dII-Gb nur einen sehr schwachen bzw. 425(scFv)-dII-ECP keinen zytotoxischen Effekt auf L3.6pl Zellen zeigten. Somit war es im Rahmen der Dissertation nicht möglich, durch die Insertion der Translokationsdomäne dII eine Verbesserung der Wirksamkeit der humanen Effektor-domänen zu erreichen. Die in Western-Blot-Analysen nachgewiesenen Degradationsprodukte legen die Vermutung nahe, dass die dII-enthaltenden Konstrukte aufgrund mangelnder Stabilität nicht zum gewünschten Erfolg geführt haben.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Fusionsproteine mit C-terminal lokalisierten humanen Enzymen, 425(scFv)-Ang und 425(scFv)-Gb, neben der Bindungsaktivität einen deutlichen zytotoxischen Effekt gegenüber der metastasierenden Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl zeigten.

Für das Immuntoxin 425(scFv)-ECP konnte zwar eine EGFR-spezifische Bindungsaktivität dokumentiert werden, jedoch keine zytotoxische Wirksamkeit. Dies kann auf die individuelle Empfindlichkeit der L3.6pl Zellen bzw. dem Vorhandensein von Resistenzmechanismen gegenüber der toxischen Domäne ECP zurückzuführen sein. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Expression bestimmter Toxine in eukaryotischen Zellen nur in mutierten und damit gegenüber den zu produzierenden Toxinen unempfindlichen Zelllinien möglich ist (KREK *et al.* 1995; LIU *et al.* 2000). Für Ang ist beispielsweise ein zytoplasmatischer Inhibitor (Ribonuclease-Inhibitor) beschrieben worden, der die RNase-produzierenden Zellen im menschlichen Organismus vor der toxischen Wirkung von intrazellulärem Ang schützt (LEE und VALLEE 1993). Neben peripheren Lymphozyten (RYBAK *et al.* 1987), vaskulären Endothel- und Muskelzellen (MOENNER *et al.* 1994) produzieren auch verschiedene epitheliale Tumorzelllinien verstärkt Ang (FETT *et al.* 1985; LI *et al.* 1994). Die Hauptfunktion der RNase liegt dabei in der Neovaskularisierung bzw. Angiogenese des Tumorgewebes. Aufgrund dieser Beobachtungen ist es vorstellbar, dass die Pankreaskarzinomzelllinien L3.6pl und FG ebenfalls die Fähigkeit besitzen Ang zu exprimieren und über den RNase Inhibitor verfügen. Diese Annahme, die die im Vergleich zu 425(scFv)-ETA' geringere zytotoxische Wirksamkeit von 425(scFv)-Ang auf L3.6pl Zellen erklären würde, bleibt jedoch zu überprüfen. Auch Gb-spezifische Inhibitoren wie PI-9 (Protease-Inhibitor-9) konnten in Gb-produzierenden Zellen und Tumorzellen nachgewiesen werden (TRAPANI und SUTTON 2003). Bei der Verwendung von Gb-basierten Immuntoxinen muss des Weiteren die folgende Problematik berücksichtigt werden. Eine Reihe von Tumorzelllinien zeigen eine veränderte Expression von Proto-Onkogenen oder Tumor-Suppressorgenen, was einen entscheidenden Einfluss auf das Proliferationsverhalten und Überleben der Tumorzellen hat (WAGENER 1996). Beispielsweise konnte bei verschiedenen Tumorzellen einschließlich Pankreaskarzinomzellen eine Überexpression des anti-apoptotischen Bcl2-Onkoproteins nachgewiesen werden (CAMPANI *et al.* 2001; SUN *et al.* 2002). Weiterhin wurde beobachtet, dass eine verstärkte Expression von Bcl2 eine Gb-induzierte Apoptose inhibiert (BLINK *et al.* 1999; SUTTON *et al.* 2000). Es bleibt zu überprüfen, inwieweit eine mögliche Überexpression von Bcl2 in L3.6pl Zellen Einfluss auf das zytotoxische Potential von 425(scFv)-Gb hat.

Im Zusammenhang mit Gb-basierten Immuntoxinen soll abschließend noch auf die im Oktober 2003 veröffentlichten Arbeiten von LIU *et al.* eingegangen werden. Diese Arbeitsgruppe beschreibt unter anderem die erfolgreiche Generierung und *in vitro* Charakterisierung eines anti-gp240 Immuntoxins mit Gb als Effektordomäne. Dabei wurde Gb über ein Linkerpeptid an den N-Terminus des anti-gp250 scFvMel fusioniert. Durch Abspaltung N-terminaler Tags von dem bakteriell exprimierten Protein wurde ein freier N-Terminus des Gb gewährleistet. Die IC₅₀ des auf Melanomzellen getesteten Immuntoxins GrB/scFvMel betrug 20 nM (LIU *et al.* 2003). Auch das Immuntoxin GrB/VEGF₁₂₁ zeigte einen deutlichen zytotoxischen Effekt auf den getesteten

Zielzelllinien (LIU *et al.* 2003). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse scheint eine weitere Untersuchung bezüglich des Einflusses der C- und N-terminalen Lokalisation von Gb in den 425(scFv)-Immuntoxinen als sinnvoll (siehe Ausblick). Denkbar wäre, dass ein komplett freier N-Terminus des Gb essentiell für eine 100%ige Aktivität bzw. Zytotoxizität des humanen Enzyms ist. Zwar konnte mit dem Immuntoxin 425(scFv)-Gb ein höheres zytotoxisches Potential als mit Gb-425(scFv) nachgewiesen werden, jedoch wäre es vorstellbar, dass beispielsweise durch eine unvollständige Abspaltung der Igκ-Signalsequenz, der N-Terminus des Gb nicht komplett frei ist und dies Auswirkungen auf die Aktivität von Gb hat. Des Weiteren bleibt zu überprüfen, ob die Insertion von Linkern in die Gb-basierenden 425(scFv)-Immuntoxine zu einer verbesserten toxischen Aktivität führt.

IV.3 Ausblick

Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass das generierte rekombinante Immuntoxin 425(scFv)-ETA', bestehend aus dem anti-EGFR 425(scFv)-Fragment und einer Deletionsmutante des *Pseudomonas* Exotoxin A, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine zytotoxische Aktivität gegenüber der metastatischen Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl aufwies. Die *in vivo* Aktivität von 425(scFv)-ETA' wurde dabei in einem disseminierten Pankreaskarzinommodell in immundefizienten Nacktmäusen evaluiert. Diese Pilotexperimente wurden durchgeführt, um eine erste generelle Aussage zur Wirksamkeit von 425(scFv)-ETA' *in vivo* bezüglich der Eliminierung von residualen Pankreaskarzinomzellen zu erhalten. Von großem Interesse ist die Analyse der Pharmakokinetik von 425(scFv)-ETA' sowie verschiedener Therapiestrategien in weiteren *in vivo* Experimenten. Wie bereits in dieser Arbeit beschrieben (III.1.4.2), könnte beispielsweise der Einfluss unterschiedlicher Dosen und Applikationsarten (einmalig, wiederholt) auf die Effizienz der Tumorzellelimination getestet werden.

Neben dem disseminierten Modell sollte innerhalb zukünftiger Projekte auch das orthotope Pankreaskarzinommodell zur Evaluierung der anti-Tumoraktivität von 425(scFv)-ETA' genutzt werden (BRUNS *et al.* 1999). Durch die orthotope Tumorzellinjektion von L3.6pl Zellen ist es möglich, die Wirksamkeit der Immuntoxine auf das Primärwachstum und die spontane Lymphknoten- und Lebermetastasierung zu untersuchen. Abgesehen von der systemischen Applikation sollten zusätzlich lokale Therapiestrategieansätze zur Behandlung von Primärtumoren und Metastasen untersucht werden. Da der EGFR im geringen Maße auch auf normalen Epithelialzellen wie Leber- und Hautzellen exprimiert wird, ist davon auszugehen, dass im Vergleich zur i.v. Behandlung bei einer lokalen Applikation von 425(scFv)-ETA' geringere Nebenwirkungen auftreten. Eine weitere Strategie zur Reduktion von Nebenwirkungen könnte in der Kombinationstherapie von anti-EGFR Ak und 425(scFv)-ETA' bestehen. Wie bereits in IV.1.3 diskutiert führen einige anti-EGFR Ak zur Inhibition der Proliferation von EGFR-

überexprimierenden Tumorzellen, nicht aber zur Elimination der vorhandenen Tumorzellen. Zu überprüfen bleibt, inwieweit die Applikation einer bestimmten Menge an anti-EGFR Ak die niedrig EGFR-exprimierenden nicht malignen Zellen absättigt und eine folgende Immuntoxingabe zur spezifischeren Elimination der überexprimierenden Tumorzellen führt.

Als möglicher anti-EGFR Ak könnte beispielsweise der von der FDA zugelassene humanisierte IMC225 Ak (BRUNS *et al.* 2000; OVERHOLSER *et al.* 2000) verwendet werden.

Im Zusammenhang mit Kombinationstherapien könnte des Weiteren die Applikation von 425(scFv)-ETA' und dem Chemotherapeutikum Gemcitabine im orthotopen Modell auf additive bzw. synergistische Effekte hinsichtlich Primärwachstum und Metastasierung untersucht werden. Unter den Chemotherapeutika erzielte Gemcitabine die besten klinischen Ergebnisse bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms (PROST *et al.* 2002).

Im zweiten Teil der Arbeit gelang die Konstruktion, Expression und *in vitro* Charakterisierung von anti-EGFR Immuntoxinen mit humanen Effektordomänen (hE). Um die zytotoxische Aktivität von 425(scFv)-Ang und 425(scFv)-Gb zu verbessern, sollten in Zukunft die Konstrukte vor allem hinsichtlich eines besseren Internalisierungs- und Translokationsverhaltens optimiert werden. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Fusion der humanen Enzyme mit einem molekularen Adaptor gelegt werden, der einen toxinunabhängigen Translokationsmechanismus ermöglicht (HEISLER *et al.* 2003). Um generell eine Aussage zum Internalisierungs- und Translokationsverhalten der Immuntoxine zu erhalten, könnten Untersuchungen mittels konfokaler Lasermikroskopie durchgeführt werden. Es bleibt zu überprüfen, inwieweit die Konstrukte mit integrierten Translokationsdomänen eine bessere Internalisierung der humanen Enzyme ins Zytosol aufweisen als die ursprünglichen Konstrukte. Ebenfalls sollte das Internalisierungsverhalten von 425(scFv)-ETA' im Vergleich zu den 425(scFv)-hE evaluiert werden. Die bereits existierenden Konstrukte 425(scFv)-dII-Ang und 425(scFv)-dII-Gb, welche eine verkürzte Translokationsdomäne von ETA enthalten, könnten in Hinblick auf eine höhere Stabilität optimiert werden. Beispielsweise könnte der Einfluss einer Integration von verschiedenen Linkern und Spacern auf die Stabilität und Wirksamkeit der Immuntoxine untersucht werden. In Anlehnung an die von LIU *et al.* (2003) veröffentlichten Arbeiten könnten außerdem 425(scFv)-Immuntoxine generiert werden, die einen komplett freien N-Terminus der Effektordomäne Gb gewährleisten. Es bleibt zu überprüfen, ob dieses Konstrukt zu einer verbesserten zytotoxischen Aktivität gegenüber Pankreaskarzinomzellen führt.

Ein großes Augenmerk sollte schließlich auf die Generierung von humanen anti-EGFR Ak gelegt werden, um vollständig humane Immuntoxine zur Therapie des Pankreaskarzinoms herzustellen.

V ZUSAMMENFASSUNG

Pankreaskarzinome sind die fünft häufigste Krebstodesursache bei Männern und Frauen in Europa und Nordamerika. Hauptgründe für die hohe Mortalitätsrate liegen in der späten Diagnose der Erkrankung, dem hochaggressiven und invasiven Tumorwachstum sowie der frühen Ausprägung von lymphogenen und hämatogenen Metastasen. Die derzeit angewendeten Chemo- und Radiotherapien gewährleisten keine vollständige Eliminierung von residualen Zellen und führen oftmals zu beträchtlichen Nebenwirkungen aufgrund ihrer Unspezifität. Des Weiteren beeinträchtigen auftretende Resistenzen der Pankreaskarzinomzellen gegenüber Chemo- und Radiotherapeutika die Effizienz der Therapie. Aus diesem Grunde müssen dringend neue und effizientere Diagnose- und Therapiestrategien entwickelt werden.

Der Einsatz anti-EGFR spezifischer rekombinanter Immuntoxine stellt eine vielversprechende Alternative zu den konventionell angewendeten Therapien des Pankreaskarzinoms dar. Da der EGFR im Vergleich zu nicht malignen Zellen auf den pankreatischen Tumorzellen überexprimiert ist, bietet sich dieser Rezeptor als ideales Zielantigen für die Bindung von Immuntoxinen an, die nach Internalisierung und Freisetzung der toxischen Domäne die Tumorzelle zu eliminieren vermögen. Durch diese immuntherapeutische Strategie wird eine weitaus spezifischere Eliminierung der Tumorzellen im Vergleich zur Chemo- und Radiotherapie erreicht.

Im Rahmen dieser Dissertation gelang die Konstruktion und Charakterisierung von mehreren EGFR spezifischen Immuntoxinen im Hinblick auf eine mögliche Therapie des Pankreaskarzinoms. Zunächst wurde ein chimäres Immuntoxin, bestehend aus dem murinen anti-EGFR 425(scFv)-Fragment und einer Deletionsmutante des *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA') kloniert. Das Fusionsprotein wurde periplasmatisch unter osmotischem Stress in Anwesenheit von kompatiblen Soluten in *E. coli* exprimiert. Durch Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie, Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration wurde das Immuntoxin 425(scFv)-ETA' gereinigt, wobei die durchschnittliche Ausbeute an gereinigtem Protein bei 48 µg/g Zellen lag. Nachfolgend wurde 425(scFv)-ETA' *in vitro* charakterisiert. Die Aktivität der Bindungsdomäne gegenüber den EGFR-positiven Pankreaskarzinomzelllinien L3.6pl und FG wurde dabei mittels Durchflusszytometrie, Zellmembran-ELISA und Immunofluoreszenz-Mikroskopie verifiziert. XTT-basierende Zytotoxizitätsassays zeigten, dass die toxische Domäne ETA' ebenfalls funktional war. Die IC₅₀, d.h. die Konzentration eines Proteins, die eine 50%ige Inhibition der Zellproliferation bewirkt, betrug für 425(scFv)-ETA' 0,0075 µg/ml auf L3.6pl Zellen und 0,0080 µg/ml auf FG Zellen. Neben der Bestätigung der *in vitro* Aktivität von 425(scFv)-ETA' wurde die biologische Aktivität des Immuntoxins in einem disseminierten Pankreaskarzinommodell in immundefizienten Mäusen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die einmalige und wiederholte intravenöse Gabe von 425(scFv)-ETA' zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der durch disseminiert wachsende L3.6pl Zellen hervorgerufenen Lungenmetastasen führte, was

die anti-Tumoraktivität von 425(scFv)-ETA' *in vivo* verifizierte. 425(scFv)-ETA' stellt das erste rekombinante Immuntoxin dar, welches im Hinblick auf die Eliminierung von Pankreaskarzinomzellen in einem *in vivo* Modell analysiert wurde. In Anbetracht auf in Zukunft durchzuführende Tierexperimente wurde des Weiteren ein Fermentations- und Reinigungsprotokoll erfolgreich etabliert.

Zur Reduktion der Immunogenität der anti-EGFR Immuntoxine wurden im zweiten Teil der Arbeit Fusionsproteine generiert, die als toxische Domäne die humanen Enzyme (hE) Angiogenin (Ang), Granzym B (Gb) und das eosinophil-kationische Protein (ECP) enthielten. Es wurden 425(scFv)-Immuntoxine mit sowohl C-terminal als auch N-terminal lokalisierten toxischen Domänen konstruiert. Expressionsversuche ergaben, dass die Produktion von 425(scFv)-hE Immuntoxinen in eukaryotischen HEK293T Zellen zu besseren Ergebnissen hinsichtlich Proteinausbeute und Stabilität führten im Vergleich zu der Expression der entsprechenden Immuntoxine in *E. coli*. Dementsprechend wurden 425(scFv)-Immuntoxine mit N-terminalen hE nur in HEK293T Zellen exprimiert. Die in den Zellkulturüberstand der HEK293T Zellen sekretierten Fusionsproteine wurden über eine Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend in die *in vitro* Assays eingesetzt. Mittels Durchflusszytometrie und Zellmembran-ELISA wurde die Bindungsaktivität der 425(scFv)-hE und hE-425(scFv) Immuntoxine nachgewiesen. Zytotoxizitätsassays erbrachten den Nachweis, dass 425(scFv)-Ang und 425(scFv)-Gb eine zytotoxische Aktivität gegenüber L3.6pl Zellen aufwiesen, wobei die IC₅₀ bei 0,430 bzw. 0,380 µg/ml lag. Die entsprechenden Immuntoxine mit N-terminal lokalisierten Enzymen, Ang-425(scFv) und Gb-425(scFv), zeigten dagegen eine geringere zytotoxische Aktivität. Kein zytotoxisches Potential konnte mit den ECP-basierten Immuntoxinen nachgewiesen werden. Die im Vergleich zu 425(scFv)-ETA' schlechtere IC₅₀ von 425(scFv)-Ang und 425(scFv)-Gb ist möglicherweise durch eine unzureichende Internalisierung bzw. Translokation der Effektordomänen ins Zytosol zu erklären, da im Gegensatz zu ETA diese Effektordomänen natürlicherweise keine Translokationsdomäne enthalten. Dementsprechend wurden Immuntoxine generiert, in denen der N-Terminus der hE mit einer Deletionsmutante der Translokationsdomäne von ETA fusioniert wurde. Die resultierenden Fusionsproteine 425(scFv)-dII-Ang, 425(scFv)-dII-Gb und 425(scFv)-dII-ECP konnten in HEK293T Zellen exprimiert und aus dem Überstand gereinigt werden. Des Weiteren zeigten sie Bindungsaktivität gegenüber dem EGFR. Jedoch konnte die zytotoxische Aktivität von 425(scFv)-Ang, 425(scFv)-Gb und 425(scFv)-ECP durch Insertion der Translokationsdomäne alleine nicht verbessert werden.

Abschließend ist zu sagen, dass die innerhalb dieser Arbeit beschriebenen rekombinanten anti-EGFR Immuntoxine sehr erfolgversprechende Kandidaten zur Therapie von metastasierendem Pankreaskarzinom darstellen. Vor allem das Immuntoxin 425(scFv)-ETA' zeigte *in vivo* eine hohe anti-Tumoraktivität und ist als potentiell Therapeutikum für weitere klinische Studien einsetzbar.

VI LITERATUR

- ADAMS, D. O., T. HALL, Z. STEPLEWSKI und H. KOPROWSKI (1984). "Tumors undergoing rejection induced by monoclonal antibodies of the IgG2a isotype contain increased numbers of macrophages activated for a distinctive form of antibody-dependent cytotoxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(11): 3506-10.
- ALLURED, V. S., R. J. COLLIER, S. F. CAROLL und D. B. MCKAY (1986). "Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3 Angstrom resolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **31**: 1320-24.
- ALWAN, H. A., E. J. VAN ZOELEN und J. E. VAN LEEUWEN (2003). "Ligand-induced lysosomal epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation is preceded by proteasome-dependent EGFR de-ubiquitination." *J Biol Chem* **278**(37): 35781-90.
- ANDERSON, M. M., J. D. BRECCIA und R. HATTI-KAUL (2000). "Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase." *Biotechnol Appl Biochem* **32**: 145-53.
- ANDRADE, F., L. A. CASCIOLA-ROSEN und A. ROSEN (2004). "Granzyme B-induced cell death." *Acta Haematol* **111**(1-2): 28-41.
- AQEILAN, R., R. KEDAR, A. BEN-YEHUDAH und H. LORBERBOUM-GALSKI (2003). "Mechanism of action of interleukin-2 (IL-2)-Bax, an apoptosis-inducing chimeric protein targeted against cells expressing the IL-2 receptor." *Biochem J* **370**(1): 129-40.
- AUERBACH, G., A. HERRMANN, A. BRACHER, G. BADER, M. GUTLICH, M. FISCHER, M. NEUKAMM, M. GARRIDO-FRANCO, J. RICHARDSON, H. NAR, R. HUBER und A. BACHER (2000). "Zinc plays a key role in human and bacterial GTP cyclohydrolase I." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13567-72.
- AUSUBEL, F. M., R. BRENT und R. E. KINGSTON (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, Wiley Interscience.
- AZEMAR, M., S. DJAHANSOUZI, E. JAGER, C. SOLBACH, M. SCHMIDT, A. B. MAURER, K. MROSS, C. UNGER, G. VON MINCKWITZ, P. DALL, B. GRONER und W. S. WELS (2003). "Regression of cutaneous tumor lesions in patients intratumorally injected with a recombinant single-chain antibody-toxin targeted to ErbB2/HER2." *Breast Cancer Res Treat* **82**(3): 155-64.
- AZEMAR, M., M. SCHMIDT, F. ARLT, P. KENNEL, B. BRANDT, A. PAPADIMITRIOU, B. GRONER und W. WELS (2000). "Recombinant antibody toxins specific for ErbB2 and EGF receptor inhibit the in vitro growth of human head and neck cancer cells and cause rapid tumor regression in vivo." *Int J Cancer* **86**(2): 269-75.
- BANEYX, F. (1999). "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*." *Curr Opinion in Biotechnology* **10**(5): 411-21.
- BARBOUR, N. P., M. PABORJI, T. C. ALEXANDER, W. P. COPPOLA und J. B. BOGARDUS (1995). "Stabilization of chimeric BR96-doxorubicin immunoconjugate." *Pharm Res* **12**(2): 215-22.
- BARTELS, C. J., S. A. ROSENBERG und J. C. YANG (1996). "Adoptive cellular immunotherapy of cancer in mice using allogeneic T-cells." *Ann Surg Oncol* **3**(1): 67-73.
- BARTH, S., M. HUHN, B. MATTHEY, A. KLIMKA, E. A. GALINSKI und A. ENGERT (2000). "Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions." *Appl Environ Microbiol* **66**(4): 1572-79.
- BARTH, S., M. HUHN, B. MATTHEY, R. SCHNELL, S. TAWADROS, T. SCHINKOTHE, J. LORENZEN, V. DIEHL und A. ENGERT (2000). "Recombinant anti-CD25 immunotoxin RFT5(ScFv)-ETA' demonstrates successful elimination of disseminated human Hodgkin lymphoma in SCID mice." *Int J Cancer* **86**(5): 718-24.
- BARTH, S., M. HUHN, B. MATTHEY, S. TAWADROS, R. SCHNELL, T. SCHINKOTHE, V. DIEHL und A. ENGERT (2000). "Ki-4(scFv)-ETA', a new recombinant anti-CD30 immunotoxin with highly specific cytotoxic activity against disseminated Hodgkin tumors in SCID mice." *Blood* **95**(12): 3909-14.
- BARTH, S., M. HUHN, W. WELS, V. DIEHL und A. ENGERT (1998). "Construction and in vitro evaluation of RFT5(scFv)-ETA', a new recombinant single-chain immunotoxin with specific cytotoxicity toward CD25+ Hodgkin-derived cell lines." *Int J Mol Med* **1**(1): 249-56.

- BASELGA, J., L. NORTON, H. MASUI, A. PANDIELLA, K. COPLAN, W. H. MILLER, JR. und J. MENDELSON (1993). "Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies." *J Natl Cancer Inst* **85**(16): 1327-33.
- BASELGA, J., D. PFISTER, M. R. COOPER, R. COHEN, B. BURTNES, M. BOS, G. D'ANDREA, A. SEIDMAN, L. NORTON, K. GUNNETT, J. FALCEY, V. ANDERSON, H. WAKSAL und J. MENDELSON (2000). "Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin." *J Clin Oncol* **18**(4): 904-14.
- BENHAR, I. und I. PASTAN (1994). "Cloning, expression and characterisation of the Fv fragments of the anti-carbohydrate mAbs B1 and B5 as single-chain immunotoxins." *Protein Eng* **7**(12): 1509-15.
- BEN-YEHUDAH, A., R. AQEILAN, D. ROBASHKEVICH und H. LORBERBOUM-GALSKI (2003). "Using apoptosis for targeted cancer therapy by a new gonadotropin releasing hormone-DNA fragmentation factor 40 chimeric protein." *Clin Cancer Res* **9**(3): 1179-90.
- BERA, T. K., J. VINER, E. BRINKMANN und I. PASTAN (1999). "Pharmacokinetics and antitumor activity of a bivalent disulfide-stabilized Fv immunotoxin with improved antigen binding to erbB2." *Cancer Res* **59**(16): 4018-22.
- BIRD, R. E., K. D. HARDMAN, J. W. JACOBSON, S. JOHNSON, B. M. KAUFMAN, S. M. LEE, T. LEE, S. H. POPE, G. S. RIORDAN und M. WHITLOW (1988). "Single chain antigen-binding proteins." *Science* **242**: 423-26.
- BLACKWELL, J. R. und R. HORGAN (1991). "A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form." *FEBS Lett* **295**: 10-12.
- BLAKEY, D. C., D. N. SKILLETER, R. J. PRICE und P. E. THORPE (1988). "Uptake of native and deglycosylated ricin A-chain immunotoxins by mouse liver parenchymal and non-parenchymal cells in vitro and in vivo." *Biochim Biophys Acta* **968**(2): 172-78.
- BLATTLER, W. A., J. M. LAMBERT und V. S. GOLDMACHER (1989). "Realizing the full potential of immunotoxins." *Cancer Cells* **1**(2): 50-55.
- BLINK, E. J., J. A. TRAPANI und D. A. JANS (1999). "Perforin-dependent nuclear targeting of granzymes: A central role in the nuclear events of granule-exocytosis-mediated apoptosis?" *Immunol Cell Biol* **77**(3): 206-15.
- BRADFORD, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry* **72**: 248-54.
- BRADWELL, J. C. A., K. MCGOVERN und J. BECKWITH (1991). "Identification of a protein required for disulfid bond formation in vivo." *Cell* **67**: 581-89.
- BRAND, R. E. (2001). "The diagnosis of pancreatic cancer." *Cancer J* **7**(4): 287-97.
- BRAND, R. E. und M. A. TEMPERO (1998). "Pancreatic cancer." *Curr Opin Oncol* **10**(4): 362-66.
- BRINKMANN, U. und I. PASTAN (1994). "Immunotoxins against cancer." *Biochim Biophys Acta* **1198**(1): 27-45.
- BRINKMANN, U., Y. REITER, S. H. JUNG, B. LEE und I. PASTAN (1993). "A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(16): 7538-42.
- BRUELL, D. (2001). "Bakterielle Expression und Reinigung eines Single-Chain Antikörpers sowie die Verwendung des Antikörperfragments zur Charakterisierung einer Epitopsequenz." *Diplomarbeit* RWTH Aachen.
- BRUELL, D., M. STÖCKER, M. HUH, N. REDDING, M. KUPPER, P. SCHUMACHER, A. PAETZ, C. J. BRUNS, H. J. HAISMA, R. FISCHER, R. FINNERN und S. BARTH (2003). "The recombinant anti-EGF receptor immunotoxin 425(scFv)-ETA' suppresses growth of a highly metastatic pancreatic carcinoma cell line." *Int J Oncol* **23**(4): 1179-86.
- BRUNS, C. J., M. T. HARBISON, D. W. DAVIS, C. A. PORTERA, R. TSAN, D. J. MCCONKEY, D. B. EVANS, J. L. ABBRUZZESE, D. J. HICKLIN und R. RADINSKY (2000). "Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms." *Clin Cancer Res* **6**(5): 1936-48.

- BRUNS, C. J., M. T. HARBISON, H. KUNIYASU, I. EUE und I. J. FIDLER (1999). "In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice." *Neoplasia* **1**(1): 50-62.
- BUCHNER, J., U. BRINKMANN und I. PASTAN (1992). "Renaturation of a single-chain immunotoxin facilitated by chaperones and protein disulfide isomerase." *Biotechnology (N Y)* **10**(6): 682-85.
- BUCHNER, J., I. PASTAN und U. BRINKMANN (1992). "A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies." *Anal Biochem* **205**(2): 263-70.
- BURNETTE, W. N. (1981). "Western Blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." *Anal Biochemistry* **112**: 195-203.
- BURTON, D. R. (1987). "Structure and function of antibodies." *Mol Gen of Immunoglobulins* **4**: 1-50.
- BYERS, V. S. und R. W. BALDWIN (1988). "Therapeutic strategies with monoclonal antibodies and immunoconjugates." *Immunology* **65**(3): 329-35.
- CAMPANI, D., I. ESPOSITO, U. BOGGI, D. CECCHETTI, M. MENICAGLI, F. DE NEGRI, L. COLIZZI, M. DEL CHIARO, F. MOSCA, G. FORNACIARI und G. BEVILACQUA (2001). "Bcl-2 expression in pancreas development and pancreatic cancer progression." *J Pathol* **194**(4): 444-50.
- CAMPION, S. R., M. K. GECK und S. K. NIYOGI (1993). "Cumulative effect of double-site mutations of human epidermal growth factor on receptor binding." *J Biol Chem* **268**(3): 1742-48.
- CANTLEY, L. C., K. R. AUGER, C. CARPENTER, B. DUCKWORTH, A. GRAZIANI, R. KAPPELLER und S. SOLTOFF (1991). "Oncogenes and Signal Transduction." *Cell* **64**: 281-302.
- CARPENTER, G. (1987). "Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens." *Annu Rev Biochem* **56**: 881-914.
- CARROLL, S. F. und R. J. COLLIER (1987). "Active site of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. Glutamic acid 553 is photolabeled by NAD and shows functional homology with glutamic acid 148 of diphtheria toxin." *J Biol Chem* **262**(18): 8707-11.
- CARTER, P. (2001). "Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies." *Nat Rev Cancer* **1**(2): 118-29.
- CHAN, B., W. LEE, C. X. HU, P. NG, K. W. LI, G. LO, G. HO, D. W. YEUNG und D. WOO (2003). "Adoptive cellular immunotherapy for non-small cell lung cancer: a pilot study." *Cytotherapy* **5**(1): 46-54.
- CHEN, J. und T. H. LIU (1994). "Expression of EGF, TGF- α , EGFR and c-erbB2 genes and their gene products in human pancreatic carcinoma cell lines." *Zentralbl Pathol* **140**(3): 265-70.
- CHEN, S., A. YANG, J. CHEN, T. KUTE, C. KING, J. COLLIER, Y. CONG, C. YAO und X. HUANG (1997). "Potent antitumor activity of a new class of tumour-specific killer cells." *Nature* **385**(6611): 78-80.
- CHIRON, M. F., C. M. FRYLING und D. J. FITZGERALD (1994). "Cleavage of pseudomonas exotoxin and diphtheria toxin by a furin-like enzyme prepared from beef liver." *J Biol Chem* **269**(27): 18167-76.
- CITRI, A., K. B. SKARIA und Y. YARDEN (2003). "The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3." *Exp Cell Res* **284**(1): 54-65.
- COLIGAN, J. E., A. M. KRUISBEEK und D. H. MARGULIES (1995). *Current Protocols in Immunology*. New York, Wiley Interscience.
- COLLINS, S. J. (1987). "The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation and cellular oncogene expression." *Blood* **70**(5): 1233-44.
- COLOMA, M. J., A. HASTINGS, L. A. WIMS und S. L. MORRISON (1992). "Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction." *J Immunol Methods* **152**: 89-104.
- CROWE, J., H. DOBELI, R. GENTZ, D. STUBER und K. HENCO (1994). "6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification." *Methods Mol Biol* **31**: 371-87.
- CSONKA, L. und W. EPSTEIN (1996). "Osmoregulation." *Washington, DC: ASM Press*.

- CUMBER, A. J., J. H. WESTWOOD, R. V. HENRY, G. D. PARNELL, B. F. COLES und E. J. WAWRZYNCZAK (1992). "Structural features of the antibody-A chain linkage that influence the activity and stability of ricin A chain immunotoxins." *Bioconj Chem* **3**(5): 397-401.
- DA COSTA, M., H. SANTOS und E. A. GALINSKI (1998). "An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea." *Adv Biochem Eng Biotechnol* **61**: 117-53.
- DAVIES, R. J. (1988). "Independent Mechanisms Account for the Regulation by Protein Kinase C of the Epidermal Growth Factor Receptor Affinity and Tyrosine-Protein Kinase Activity." *IJ Biol Chem* **263**: 9462-69.
- DI PAOLO, C., J. WILLUDA, S. KUBETZKO, I. LAUFFER, D. TSCHUDI, R. WAIBEL, A. PLÜCKTHUN, R. A. STAHEL und U. ZANGEMEISTER-WITKE (2003). "A recombinant immunotoxin derived from a humanized epithelial cell adhesion molecule-specific single-chain antibody fragment has potent and selective antitumor activity." *Clin Cancer Res* **9**(7): 2837-48.
- DONG, M., Y. NIO, K. J. GUO, K. TAMURA, Y. L. TIAN und Y. T. DONG (1998). "Epidermal growth factor and its receptor as prognostic indicators in Chinese patients with pancreatic cancer." *Anticancer Res* **18**(6B): 4613-19.
- DOWNWARD, J., Y. YARDEN, E. MAYES, G. SCRACE, N. TOTTY, P. STOCKWELL, A. ULLRICH, J. SCHLESSINGER und M. D. WATERFIELD (1984). "Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences." *Nature* **307**(5951): 521-27.
- EBERT, M., M. YOKOYAMA, M. S. KOBRIN, H. FRIESS, M. E. LOPEZ, M. W. BUCHLER, G. R. JOHNSON und M. KORC (1994). "Induction and expression of amphiregulin in human pancreatic cancer." *Cancer Res* **54**(15): 3959-62.
- EIKLID, K., S. OLSNES und A. PIHL (1980). "Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells." *Exp Cell Res* **126**(2): 321-26.
- EMRICH, J. G., L. W. BRADY, T. S. QUANG, R. CLASS, C. MIYAMOTO, P. BLACK und U. RODECK (2002). "Radioiodinated (I-125) monoclonal antibody 425 in the treatment of high grade glioma patients: ten-year synopsis of a novel treatment." *Am J Clin Oncol* **25**(6): 541-46.
- ENGBRAATEN, O., G. O. HJORTLAND, S. JUELL, H. HIRSCHBERG und O. FODSTAD (2002). "Intratumoral immunotoxin treatment of human malignant brain tumors in immunodeficient animals." *Int J Cancer* **97**(6): 846-52.
- ENGBRAATEN, O., G. SIVAM, S. JUELL und O. FODSTAD (2000). "Systemic immunotoxin treatment inhibits formation of human breast cancer metastasis and tumor growth in nude rats." *Int J Cancer* **88**(6): 970-76.
- ENGVALL, E. und P. PERLMAN (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of Immunoglobulin G." *Immunochemistry* **8**: 871-79.
- EVAN, G. I., G. K. LEWIS, G. RAMSAY und J. M. BISHOP (1985). "Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product." *Mol Cell Biol* **5**(12): 3610-16.
- FAILLOT, T., H. MAGDELENAT, E. MADY, P. STASIECKI, D. FOHANNO, P. GROPP, M. POISSON und J. Y. DELATTRE (1996). "A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas." *Neurosurgery* **39**(3): 478-83.
- FAN, Z., J. BASELGA, H. MASUI und J. MENDELSON (1993). "Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts." *Cancer Res* **53**(19): 4637-42.
- FAN, Z., Y. LU, X. WU und J. MENDELSON (1994). "Antibody-induced epidermal growth factor receptor dimerization mediates inhibition of autocrine proliferation of A431 squamous carcinoma cells." *J Biol Chem* **269**(44): 27595-602.
- FERNANDES-ALNEMRI, T., R. C. ARMSTRONG, J. KREBS, S. M. SRINIVASULA, L. WANG, F. BULLRICH, L. C. FRITZ, J. A. TRAPANI, K. J. TOMASELLI, G. LITWACK und E. S. ALNEMRI (1996). "In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(15): 7464-69.
- FETT, J. W., D. J. STRYDOM, R. R. LOBB, E. M. ALDERMAN, J. L. BETHUNE, J. F. RIORDAN und B. L. VALLEE (1985). "Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells." *Biochemistry* **24**(20): 5480-86.

- FITZGERALD, D., I. PASTAN und J. ROBERTUS (1998). "Clinical application of immunotoxins." *Curr Top Microbiol Immunol* **234**: 1-11.
- FOMINAYA, J. und W. WELS (1996). "Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multidomain protein. Novel non-viral gene delivery system." *J Biol Chem* **271**(18): 10560-68.
- GALINSKI, E. A. (1995). "Osmoadaptation in bacteria." *Adv Microb Physiol* **37**: 272-328.
- GALLOWAY, D. R., R. C. HEDSTROM und O. R. PAVLOVSKIS (1984). "Production and characterization of monoclonal antibodies to exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*." *Infect Immun* **44**: 262-67.
- GAO, J., H. HUANG, X. WANG, L. XU, Z. ZHENG und X. LIU (1996). "Preparation, cloning, and high level expression in *E. coli* of interleukin 2-pseudomonas exotoxin fusion genes." *Chin J Biotechnol* **12**(2): 81-87.
- GLEICH, G. J., D. A. LOEGERING, M. P. BELL, J. L. CHECKEL, S. J. ACKERMAN und D. J. MCKEAN (1986). "Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(10): 3146-50.
- GLIGOROV, J., T. ANDRE, C. EPAUD und S. CULINE (2002). "Updates on gemcitabine at the American Society of Clinical Oncology congress (ASCO, 2002)." *Bull Cancer* **89**: 134-44.
- GREENBERG, A. H. (1996). "Granzyme B-induced apoptosis." *Adv Exp Med Biol* **406**: 219-28.
- GRIFFIN, T. W., P. G. PAGNINI, J. J. MCGRATH, J. C. MCCANN und L. L. HOUSTON (1988). "In vitro cytotoxicity of recombinant ricin A chain-antitransferrin receptor immunotoxin against human adenocarcinomas of the colon and pancreas." *J Biol Response Mod* **7**(6): 559-67.
- GULLICK, W. J. (1991). "Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers." *Br Med Bull* **47**(1): 87-98.
- GUSTIN, A., L. PEDERSON, R. MILLER, C. CHAN und S. M. VICKERS (2002). "Application of molecular biology studies to gene therapy treatment strategies." *World J Surg* **26**(7): 854-60.
- HAAG, C. und G. EHNINGER (2002). "Indications for chemotherapy in cancers of the esophagus, stomach and pancreas." *Z Gastroenterol* **40** (1): 68-70.
- HAISMA, H. J., J. GRILL, D. T. CURIEL, S. HOOGELAND, V. W. VAN BEUSECHEM, H. M. PINEDO und W. R. GERRITSEN (2000). "Targeting of adenoviral vectors through a bispecific single-chain antibody." *Cancer Gene Therapy* **7**: 901-04.
- HAN, J., L. A. GOLDSTEIN, B. R. GASTMAN, C. J. FROELICH, X. M. YIN und H. RABINOWICH (2004). "Degradation of MCL-1 by granzyme B: Implications for bim-mediated mitochondrial apoptotic events." *J Biol Chem* **279**(21): 22020-29.
- HANAHAHAN, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-80.
- HARRIS, J. L., E. P. PETERSON, D. HUDIG, N. THORNBERRY und C. S. CRAIK (1998). "Definition and redesign of the extended substrate specificity of granzyme B." *J Biol Chem* **273**(42): 27264-73.
- HE, M., M. HAMON, H. LIU, A. KANG und M. J. TAUSSIG (1995). "Functional expression of a single-chain anti-progesterone antibody fragment in the cytoplasm of a mutant *Escherichia coli*." *Nucleic Acids Research* **23**: 4009-10.
- HEDBERG, M., A. BORGSTROM, S. GENELL und L. JANZON (1998). "Survival following pancreatic carcinoma: a follow-up study of all cases recorded in Malmo, Sweden, 1977-1991." *Br J Surg* **85**(12): 1641-44.
- HEISLER, I., J. KELLER, R. TAUBER, M. SUTHERLAND und H. FUCHS (2003). "A cleavable adapter to reduce nonspecific cytotoxicity of recombinant immunotoxins." *Int J Cancer* **103**(2): 277-82.
- HELLSTROM, K. E., P. GLADSTONE und I. HELLSTROM (1997). "Cancer vaccines: challenges and potential solutions." *Mol Med Today* **3**: 286-90.
- HENDLER, F. J. und B. W. OZANNE (1984). "Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors." *J Clin Invest* **74**(2): 647-51.
- HERBST, R. S. (2004). "Review of epidermal growth factor receptor biology." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **59**(2): 21-26.

- HIMMELWEIT, F. (1960). "The collected papers of Paul Ehrlich, ed F. Himmelweit". Vol 3. 1960, New York: Pergamon.
- HIRST, C. E., M. S. BUZZA, C. H. BIRD, H. S. WARREN, P. U. CAMERON, M. ZHANG, P. G. ASHTON-RICKARDT und P. I. BIRD (2003). "The intracellular granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9, is up-regulated during accessory cell maturation and effector cell degranulation, and its overexpression enhances CTL potency." *J Immunol* **170**: 805-15.
- HUANG, Z. Q., D. J. BUCHSBAUM, K. P. RAISCH, J. A. BONNER, K. I. BLAND und S. M. VICKERS (2003). "Differential responses by pancreatic carcinoma cell lines to prolonged exposure to Erbitux (IMC-C225) anti-EGFR antibody." *J Surg Res* **111**(2): 274-83.
- HUHN, M., S. SASSE, M. K. TUR, B. MATTHEY, T. SCHINKOTHE, S. M. RYBAK, S. BARTH und A. ENGERT (2001). "Human angiogenin fused to human CD30 ligand (Ang-CD30L) exhibits specific cytotoxicity against CD30-positive lymphoma." *Cancer Res* **61**(24): 8737-42.
- HUSTON, J. S., J. MCCARTNEY, M. S. TAI, C. MOTTOLA-HATSHORN, D. JIN, F. WARREN, P. KECK und H. OPPERMANN (1993). "Medical applications of single-chain antibodies." *Int Rev Immunol* **10**: 195-217.
- HUSTON, J. S., M. MUDGETT-HUNTER, M. S. TAI, J. MCCARTNEY, F. WARREN, E. HABER und H. OPPERMANN (1991). "Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins." *Methods Enzymol* **203**: 46-88.
- HWANG, J., D. J. FITZGERALD, S. ADHYA und I. PASTAN (1987). "Functional domains of *Pseudomonas* exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in *E.coli*." *Cell* **48**: 129-36.
- IGLEWSKI, B. H. und D. KABAT (1975). "NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(6): 2284-88.
- INBAR, D., J. HOCHMAN und D. GIVOL (1972). "Localization of the antibody combining site within the variable portions of heavy and light chains." *Proc Natl Acad Sci USA* **69**: 2659-62.
- JAENICKE, R. (1999). "Stability and folding of domain proteins." *Prog Biophys Mol Biol* **71**: 155-241.
- JANS, D. A., P. JANS, L. J. BRIGGS, V. SUTTON und J. A. TRAPANI (1996). "Nuclear transport of granzyme B (fragmentin-2). Dependence of perforin in vivo and cytosolic factors in vitro." *J Biol Chem* **271**(48): 30781-89.
- JAROSZESKI, M. J. und G. RADCLIFF (1999). "Fundamentals of flow cytometry." *Mol Biotechnol* **11**(1): 37-53.
- JINNO, H., M. UEDA, S. OZAWA, T. IKEDA, M. KITAJIMA, T. MAEDA und M. SENO (2002). "The cytotoxicity of a conjugate composed of human epidermal growth factor and eosinophil cationic protein." *Anticancer Res* **22**(6C): 4141-45.
- JONES, B., J. P. TITE und C. A. JANEWAY (1986). "Different phenotypic variants of the mouse B cell tumor A20/2J are selected by antigen- and mitogen triggered cytotoxicity of L2T4-positive, IA restricted T cell clones." *J Immunol* **136**(1): 348-56.
- JORISSEN, R. N., F. WALKER, N. POULIOT, T. P. GARRETT, C. W. WARD und A. W. BURGESS (2003). "Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling." *Exp Cell Res* **284**(1): 31-53.
- KABAT, E. A., T. T. WU, M. REID-MILLER, H. M. PERRY und K. S. GOTTESMAN (1990). "Sequences of proteins of immunological interest." U.S. Department of Health, Fifth Edition.
- KAM, C. M., D. HUDIG und J. C. POWERS (2000). "Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors." *Biochim Biophys Acta* **1477**(1-2): 307-23.
- KAPP, U., J. WOLF, C. VON KALLE, S. TAWADROS, A. ROTTGEN, A. ENGERT, C. FONATSCH, H. STEIN und V. DIEHL (1992). "Preliminary report: growth of Hodgkin's lymphoma derived cells in immune compromised mice." *Ann Oncol* **3** (4): 21-23.
- KELLER, J., I. HEISLER, R. TAUBER und H. FUCHS (2001). "Development of a novel molecular adapter for the optimization of immunotoxins." *J Control Release* **74**(1-3): 259-61.
- KETTLEBOROUGH, C. A., J. SALDANHA, V. J. HEATH, C. J. MORRISON und M. M. BENDIG (1991). "Humanization of a mouse monoclonal antibody by CDR-grafting: the importance of framework residues on loop conformation." *Protein Engineering* **4**: 773-83.

- KIPRIYANOV, S. M., H. MOLDENHAUER und M. LITTLE (1997). "High level production of soluble single chain antibodies in small-scale E. coli cultures." *J Immunol Methods* **200**: 69-77.
- KOBRIN, M. S., H. FUNATOMI, H. FRIESS, M. W. BUCHLER, P. STATHIS und M. KORC (1994). "Induction and expression of heparin-binding EGF-like growth factor in human pancreatic cancer." *Biochem Biophys Res Commun* **202**(3): 1705-09.
- KÖHLER, G. und C. MILSTEIN (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* **256**: 495-97.
- KONDO, T., D. FITZGERALD, V. K. CHAUDHARY, S. ADHYA und I. PASTAN (1988). "Activity of immunotoxins constructed with modified *Pseudomonas* exotoxin A lacking the cell recognition domain." *J Biol Chem* **263**: 9470-75.
- KORC, M. (1990). "Potential role of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer." *Int J Pancreatol* **7**(1-3): 71-81.
- KOUNNAS, M. Z., R. E. MORRIS, M. R. THOMPSON, D. J. FITZGERALD, D. K. STRICKLAND und C. B. SAELINGER (1992). "The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes *Pseudomonas* exotoxin A." *J Biol Chem* **267**(18): 12420-23.
- KREITMAN, R. J. (2001). "Chimeric fusion proteins-*Pseudomonas* exotoxin-based." *Curr Opin Investig Drugs* **2**(9): 1282-93.
- KREITMAN, R. J. und I. PASTAN (1995). "Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of *Pseudomonas* exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor." *Biochem J* **307** (1): 29-37.
- KREITMAN, R. J. und I. PASTAN (1995). "Targeting *Pseudomonas* exotoxin to hematologic malignancies." *Semin Cancer Biol* **6**(5): 297-306.
- KREITMAN, R. J., R. K. PURI und I. PASTAN (1995). "Increased antitumor activity of a circularly permuted interleukin 4-toxin in mice with interleukin 4 receptor-bearing human carcinoma." *Cancer Res* **55**(15): 3357-63.
- KREITMAN, R. J., W. H. WILSON, K. BERGERON, M. RAGGIO, M. STELTER-STEVENSON, D. J. FITZGERALD und I. PASTAN (2001). "Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia." *N Engl J Med* **345**: 241-47.
- KREK, C. E., C. A. LADINO, V. S. GOLDMACHER, W. A. BLATTLER und B. C. GUILD (1995). "Expression and secretion of a recombinant ricin immunotoxin from murine myeloma cells." *Protein Eng* **8**(5): 481-89.
- KROLICK, K. A., J. W. UHR, S. SLAVIN und E. S. VITETTA (1982). "In vivo therapy of a murine B cell tumor (Bcl1) using antibody-ricin A chain immunotoxins." *J Exp Med* **155**(6): 1797-809.
- KULKE, M. H. (2002). "Metastatic pancreatic cancer." *Curr Treat Options Oncol* **3**(6): 449-57.
- KWON, H. und J. HANDLER (1995). "Cell volume regulated transportes of compatible osmolytes." *Curr Opin Cell Biol* **7**: 465-71.
- LAEMMLI, U. K. (1970). "Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**: 680-85.
- LANDIS, S. H., T. MURRAY, S. BOLDEN und P. A. WINGO (1999). "Cancer statistics, 1999." *CA Cancer J Clin* **49**(1): 8-31.
- LANGER, T., C. LU, H. ECHOLS, J. FLANAGAN, M. K. HAYER und F. U. HARTL (1992). "The E. coli heat shock proteins GroEL and GroES modulate the folding of the β -lactamase precursor." *EMBO J* **9**: 2315-19.
- LE, X., Q. SHI, B. WANG, Q. XIONG, C. QIAN, Z. PENG, X. C. LI, H. TANG, J. L. ABBRUZZESE und K. XIE (2000). "Molecular regulation of constitutive expression of interleukin-8 in human pancreatic adenocarcinoma." *J Interferon Cytokine Res* **20**(11): 935-46.
- LEE, F. S. und B. L. VALLEE (1993). "Structure and action of mammalian ribonuclease (angiogenin inhibitor)." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **44**: 1-30.
- LI, D., J. BELL, A. BROWN und C. L. BERRY (1994). "The observation of angiogenin and basic fibroblast growth factor gene expression in human colonic adenocarcinomas, gastric adenocarcinomas, and hepatocellular carcinomas." *J Pathol* **172**(2): 171-75.

- LIBERMANN, T. A., N. RAZON, A. D. BARTAL, Y. YARDEN, J. SCHLESSINGER und H. SOREQ (1984). "Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors." *Cancer Res* **44**(2): 753-60.
- LINSKENS, R. K., R. P. GOLDING, C. J. VAN GROENINGEN und G. GIACCONE (2000). "Severe acute lung injury induced by gemcitabine." *Neth J Med* **56**(6): 232-35.
- LIU, N., T. FURUKAWA, M. KOBARI und M. S. TSAO (1998). "Comparative phenotypic studies of duct epithelial cell lines derived from normal human pancreas and pancreatic carcinoma." *Am J Pathol* **153**(1): 263-69.
- LIU, Y., L. H. CHEUNG, W. N. HITTELMAN und M. G. ROSENBLUM (2003). "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* **2**(12): 1341-50.
- LIU, Y., L. H. CHEUNG, P. THORPE und M. G. ROSENBLUM (2003). "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* **2**(10): 949-59.
- LIU, Y. Y., I. GORDIENKO, A. MATHIAS, S. MA, J. THOMPSON, J. H. WOO und D. M. NEVILLE (2000). "Expression of an anti-CD3 single-chain immunotoxin with a truncated diphtheria toxin in a mutant CHO cell line." *Protein Expr Purif* **19**: 304-11.
- LOBUGLIO, A. F. und M. N. SALEH (1992). "Monoclonal antibody therapy of cancer." *Crit Rev Oncol Hematol* **13**(3): 271-82.
- LOWENSTEIN, E. J., R. J. DALY, A. G. BATZER, W. LI, B. MARGOLIS, R. LAMMERS, A. ULLRICH, E. Y. SKOLNIK, D. BAR-SAGI und J. SCHLESSINGER (1992). "The SH2 and SH3 Domain-Containing Protein GRB2 Links Receptor Tyrosine Kinases to ras Signaling." *Cell* **70**: 431-42.
- MA, L., C. GAUVILLE, Y. BERTHOIS, A. DEGEORGES, G. MILLOT, P. M. MARTIN und F. CALVO (1998). "Role of epidermal-growth-factor receptor in tumor progression in transformed human mammary epithelial cells." *Int J Cancer* **78**(1): 112-19.
- MANSFIELD, E., P. AMLOT, I. PASTAN und D. J. FITZGERALD (1997). "Recombinant RFB4 immunotoxins exhibit potent cytotoxic activity for CD22-bearing cells and tumors." *Blood* **90**(5): 2020-26.
- MATHER, J. P. (1980). "Establishment and characterization of two distinct mouse testicular epithelial cell lines." *Biol Reprod* **23**(1): 243-52.
- MATTHEY, B., A. ENGERT, A. KLIMKA, V. DIEHL und S. BARTH (1999). "A new series of pET-derived vectors for high efficiency expression of Pseudomonas exotoxin-based fusion proteins." *Gene* **229**(1-2): 145-53.
- MCDONALD, J. R., M. ONG, C. SHEN, Z. PARANDOOSH, B. SOSNOWSKI, S. BUSSELL und L. L. HOUSTON (1996). "Large-scale purification and characterization of recombinant fibroblast growth factor-saporin mitotoxin." *Protein Expr Purif* **8**(1): 97-108.
- MCLAUGHLIN, P. (2001). "Rituximab: perspective on single agent experience, and future directions in combination trials." *Crit Rev Oncol Hematol* **40**(1): 3-16.
- MCLAUGHLIN, P., A. J. GRILLO-LOPEZ, B. K. LINK, R. LEVY, M. S. CZUCZMAN, M. E. WILLIAMS, M. R. HEYMAN, I. BENICE-BRUCKLER, C. A. WHITE, F. CABANILLAS, V. JAIN, A. D. HO, J. LISTER, K. WEY, D. SHEN und B. K. DALLAIRE (1998). "Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program." *J Clin Oncol* **16**(8): 2825-33.
- MENDELSON, J. (1997). "Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy." *Clin Cancer Res* **3**(2): 2703-07.
- MITRAKI, A., B. FANE, C. HAASE-PETTINGELL, J. STUREVANT und J. KING (1991). "Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation." *Science* **253**: 54-58.
- MODJTAHEDI, H. und C. DEAN (1996). "Monoclonal antibodies to the EGF receptor act as betacellulin antagonists." *Biochem Biophys Res Commun* **221**(3): 625-30.
- MODJTAHEDI, H., S. A. ECCLES, G. BOX, J. STYLES und C. J. DEAN (1993). "Antitumor activity of combinations of antibodies directed against different epitopes on the extracellular domain of the human EGF receptor." *Cell Biophys* **22**(1-3): 129-46.

- MOENNER, M., M. GUSSE, E. HATZI und J. BADET (1994). "The widespread expression of angiogenin in different human cells suggests a biological function not only related to angiogenesis." *Eur J Biochem* **226**(2): 483-90.
- MORGAN, R. T., L. K. WOODS, G. E. MOORE, L. A. QUINN, L. MCGAVRAN und S. G. GORDON (1980). "Human cell line (COLO357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma." *Int J Cancer* **25**: 591-98.
- MURTHY, U., A. BASU, U. RODECK, M. HERLYN, A. H. ROSS und M. DAS (1987). "Binding of an antagonistic monoclonal antibody to an intact and fragmented EGF-receptor polypeptide." *Arch Biochem Biophys* **252**(2): 549-60.
- NAGATA, S., M. ONDA, Y. NUMATA, K. SANTORA, R. BEERS, R. J. KREITMAN und I. PASTAN (2002). "Novel anti-CD30 recombinant immunotoxins containing disulfide-stabilized Fv fragments." *Clin Cancer Res* **8**(7): 2345-55.
- NEWTON, D. L., L. BOQUE, A. WLODAWER, C. Y. HUANG und S. M. RYBAK (1998). "Single amino acid substitutions at the N-terminus of a recombinant cytotoxic ribonuclease markedly influence biochemical and biological properties." *Biochemistry* **37**(15): 5173-83.
- NEWTON, D. L., O. ILERCIL, D. W. LASKE, E. OLDFIELD, S. M. RYBAK und R. J. YOULE (1992). "Cytotoxic ribonuclease chimeras. Targeted tumoricidal activity in vitro and in vivo." *J Biol Chem* **267**(27): 572-78.
- NEWTON, D. L., D. POLLOCK, P. DITULLIO, Y. ECHELARD, M. HARVEY, B. WILBURN, J. WILLIAMS, H. R. HOOGENBOOM, J. C. RAUS, H. M. MEADE und S. M. RYBAK (1999). "Antitransferrin receptor antibody-RNase fusion protein expressed in the mammary gland of transgenic mice." *J Immunol Methods* **231**(1-2): 159-67.
- NEWTON, D. L. und S. M. RYBAK (2001). "Preparation and preclinical characterization of RNase-based immunofusion proteins." *Methods Mol Biol* **160**: 387-406.
- NEWTON, D. L., Y. XUE, K. A. OLSON, J. W. FETT und S. M. RYBAK (1996). "Angiogenin single-chain immunofusions: influence of peptide linkers and spacers between fusion protein domains." *Biochemistry* **35**(2): 545-53.
- NICHOLSON, D. W. und N. A. THORNBERRY (1997). "Caspases: killer proteases." *Trends Biochem Sci* **22**(8): 299-306.
- NISHIHARA, T., T. SAWADA, A. YAMAMOTO, Y. YAMASHITA, J. J. HO, Y. S. KIM und K. H. CHUNG (2000). "Antibody-dependent cytotoxicity mediated by chimeric monoclonal antibody Nd2 and experimental immunotherapy for pancreatic cancer." *Jpn J Cancer Res* **91**(8): 817-24.
- OGATA, M., V. K. CHAUDHARY, I. PASTAN und D. J. FITZGERALD (1990). "Processing of Pseudomonas exotoxin by a cellular protease results in the generation of a 37,000-Da toxin fragment that is translocated to the cytosol." *J Biol Chem* **265**(33): 20678-85.
- OGATA, M., C. M. FRYLING, I. PASTAN und D. J. FITZGERALD (1992). "Cell-mediated cleavage of Pseudomonas exotoxin between Arg279 and Gly280 generates the enzymatically active fragment which translocates to the cytosol." *J Biol Chem* **267**(35): 25396-401.
- ONDA, M., Q. C. WANG, H. F. GUO, N. K. CHEUNG und I. PASTAN (2004). "In vitro and in vivo cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9(Fv)-PE38 against breast cancer, osteosarcoma, and neuroblastoma." *Cancer Res* **64**(4): 1419-24.
- OTSUJI, E., T. YAMAGUCHI, H. TSURUTA, Y. YATA, H. NISHI, K. OKAMOTO, K. TANIGUCHI, M. KATO, T. KOTANI, K. KITAMURA und T. TAKAHASHI (1996). "Effects of neocarzinostatin-chimeric Fab conjugates on the growth of human pancreatic carcinoma xenografts." *Br J Cancer* **73**(10): 1178-82.
- OVERHOLSER, J. P., M. C. PREWETT, A. T. HOOPER, H. W. WAKSAL und D. J. HICKLIN (2000). "Epidermal growth factor receptor blockade by antibody IMC-C225 inhibits growth of a human pancreatic carcinoma xenograft in nude mice." *Cancer* **89**(1): 74-82.
- PAI, L. H., R. WITTES, A. SETSER und I. PASTAN (1996). "Treatment of advanced solid tumors with the immunotoxin LMB-1: an antibody linked to Pseudomonas exotoxin." *Nat Med* **2**: 350-53.
- PAI-SCHERF, L. H., J. VILLA, D. PEARSON, T. WATSON, E. LIU, M. C. WILLINGHAM und I. PASTAN (1999). "Hepatotoxicity in cancer patients receiving erb-38, a recombinant immunotoxin that targets the erbB2 receptor." *Clin Cancer Res* **5**(9): 2311-15.

- PANDA, A. K. (2003). "Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of Escherichia coli." *Adv Biochem Eng Biotechnol* **85**: 43-93.
- PARDOLL, D. M. (1995). "Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy." *Annu Rev Immunol* **13**: 399-415.
- PARHAM, P. (1986). "Handbook of Experimental Immunology Vol I: Immunochemistry." *Blackwell Scientific Publications* Chapter 14: 1-23.
- PASTAN, I. (2003). "Immunotoxins containing Pseudomonas exotoxin A: a short history." *Cancer Immunol Immunother* **52**(5): 338-41.
- PASTAN, I. und D. J. FITZ-GERALD (1989). "Pseudomonas Exotoxin: chimeric toxins." *J Biol Chem* **264**: 15157-60.
- PAYNE, G. (2003). "Progress in immunoconjugate cancer therapeutics." *Cancer Cell* **3**(3): 207-12.
- PEGRAM, M. D., A. LIPTON, D. F. HAYES, B. L. WEBER, J. M. BASELGA, D. TRIPATHY, D. BALY, S. A. BAUGHMAN, T. TWADDELL, J. A. GLASPY und D. J. SLAMON (1998). "Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment." *J Clin Oncol* **16**(8): 2659-71.
- PINKOSKI, M. J., M. HOBMAN, J. A. HEIBEIN, K. J. TOMASELLI, F. LI, P. SETH, C. J. FROELICH und R. C. BLEACKLEY (1998). "Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B- perforin-mediated apoptosis." *Blood* **92**: 1044-54.
- PISELLI, P., S. VENDETTI, F. POCCIA, R. CICCONE, M. MATTEI, A. BOLOGNESI, F. STIRPE und V. COLIZZI (1995). "In vitro and in vivo efficacy of heat shock protein specific immunotoxins on human tumor cells." *J Biol Regul Homeost Agents* **9**(2): 55-62.
- PLÜCKTHUN, A. (1991). "Strategies for the expression of antibody fragments in Escherichia coli." *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* **2**: 88-96.
- PORTER, R. R. (1959). "The hydrolysis of rabbit gamma-globulin and antibodies with crystalline papain." *Biochem J* **73**: 119-26.
- POSEY, J. A., M. B. KHAZAEI, M. A. BOOKMAN, A. NOWROUZI, W. E. GRIZZLE, J. THORNTON, D. E. CAREY, J. M. LORENZ, A. P. SING, C. B. SIEGALL, A. F. LOBUGLIO und M. N. SALEH (2002). "A phase I trial of the single-chain immunotoxin SGN-10 (BR96 sFv-PE40) in patients with advanced solid tumors." *Clin Cancer Res* **8**(10): 3092-99.
- PRESTA, L. G. (2002). "Engineering antibodies for therapy." *Curr Pharm Biotechnol* **3**(3): 237-56.
- PROST, P., M. YCHOU und D. AZRIA (2002). "Gemcitabine and pancreatic cancer." *Bull Cancer* **89**: 91-95.
- PURI, R. K., M. OGATA, P. LELAND, G. M. FELDMAN, D. FITZGERALD und I. PASTAN (1991). "Expression of high-affinity interleukin 4 receptors on murine sarcoma cells and receptor-mediated cytotoxicity of tumor cells to chimeric protein between interleukin 4 and Pseudomonas exotoxin." *Cancer Res* **51**: 3011-17.
- RAGNHAMMAR, P. (1996). "Anti-tumoral effect of GM-CSF with or without cytokines and monoclonal antibodies in solid tumors." *Med Oncol* **13**: 167-76.
- REITER, Y., U. BRINKMANN, S. H. JUNG, B. LEE, P. G. KASPRZYK, C. R. KING und I. PASTAN (1994). "Improved binding and antitumor activity of a recombinant anti-erbB2 immunotoxin by disulfide stabilization of the Fv fragment." *J Biol Chem* **269**(28): 18327-31.
- REITER, Y., R. J. KREITMAN, U. BRINKMANN und I. PASTAN (1994). "Cytotoxic and antitumor activity of a recombinant immunotoxin composed of disulfide-stabilized anti-Tac Fv fragment and truncated Pseudomonas exotoxin." *Int J Cancer* **58**(1): 142-49.
- REITER, Y., L. H. PAI, U. BRINKMANN, Q. C. WANG und I. PASTAN (1994). "Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of a recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment." *Cancer Res* **54**(10): 2714-18.
- REITER, Y. und I. PASTAN (1996). "Antibody engineering of recombinant Fv immunotoxins for improved targeting of cancer: disulfide-stabilized Fv immunotoxins." *Clin Cancer Res* **2**(2): 245-52.
- REITER, Y. und I. PASTAN (1998). "Recombinant Fv immunotoxins and Fv fragments as novel agents for cancer therapy and diagnosis." *Trends Biotechnol* **16**(12): 513-20.

- REITER, Y., A. F. WRIGHT, D. W. TONGE und I. PASTAN (1996). "Recombinant single-chain and disulfide-stabilized Fv-immunotoxins that cause complete regression of a human colon cancer xenograft in nude mice." *Int J Cancer* **67**(1): 113-23.
- RODECK, U., M. HERLYN, D. HERLYN, C. MOLTHOFF, B. ATKINSON, M. VARELLO, Z. STEPLEWSKI und H. KOPROWSKI (1987). "Tumor growth modulation by a monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor: immunologically mediated and effector cell-independent effects." *Cancer Res* **47**(14): 3692-96.
- RODECK, U., N. WILLIAMS, U. MURTHY und M. HERLYN (1990). "Monoclonal antibody 425 inhibits growth stimulation of carcinoma cells by exogenous EGF and tumor-derived EGF/TGF- α ." *J Cell Biochem* **44**(2): 69-79.
- ROSENBERG, H. F. (1995). "Recombinant human eosinophil cationic protein. Ribonuclease activity is not essential for cytotoxicity." *J Biol Chem* **270**(14): 7876-81.
- ROSENBERG, H. F. (1998). "The eosinophil ribonucleases." *Cell Mol Life Sci* **54**(8): 795-803.
- ROTHENBERG, M. L., J. L. ABBRUZZESE, M. MOORE, R. K. PORTENOY, J. M. ROBERTSON und H. J. WANEBO (1996). "A rationale for expanding the endpoints for clinical trials in advanced pancreatic carcinoma." *Cancer* **78**(3): 627-32.
- RYBAK, S. M., J. W. FETT, Q. Z. YAO und B. L. VALLEE (1987). "Angiogenin mRNA in human tumor and normal cells." *Biochem Biophys Res Commun* **146**(3): 1240-48.
- SACHS, L. (1992). "Angewandte Statistik - Anwendung stochastischer Methoden." Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- SAFAVY, A., J. A. BONNER, H. W. WAKSAL, D. J. BUCHSBAUM, G. Y. GILLESPIE, M. B. KHAZAELI, R. ARANI, D. T. CHEN, M. CARPENTER und K. P. RAISCH (2003). "Synthesis and biological evaluation of paclitaxel-C225 conjugate as a model for targeted drug delivery." *Bioconjug Chem* **14**(2): 302-10.
- SAIKI, R. K., D. H. GELFAND und E. AL. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase." *Science* **239**: 487-91.
- SAITO, T., S. OKADA, K. OHSHIMA, E. YAMADA, M. SATO, Y. UEHARA, H. SHIMIZU, J. E. PESSIN und M. MORI (2004). "Differential activation of epidermal growth factor receptor (ErbB1/EGFR) downstream signaling pathways by Betacellulin and EGF." *Endocrinology* **145** (9): 4232-43.
- SALOMON, D. S., R. BRANDT, F. CIARDIELLO und N. NORMANNO (1995). "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies." *Crit Rev Oncol Hematol* **19**(3): 183-232.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH und E. AL. (1996). "Molecular Cloning - A Laboratory Manual." 3rd edition. Cold Spring Harbor, New York.
- SANCHEZ, L., M. AYALA, F. FREYRE, I. PEDROSO, H. BELL, V. FALCON und J. GAVILONDO (1999). "High cytoplasmic expression in E. coli, purification, and in vitro refolding of a single chain Fv antibody fragment against the hepatitis B surface antigen." *Journal of Biotechnology* **72**: 13-20.
- SANGER, F., S. NICKLEN und A. R. COULSON (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-67.
- SAXENA, S. K., S. M. RYBAK, R. T. DAVEY, JR., R. J. YOULE und E. J. ACKERMAN (1992). "Angiogenin is a cytotoxic, tRNA-specific ribonuclease in the RNase A superfamily." *J Biol Chem* **267**(30): 21982-86.
- SCHMIDT, M., N. E. HYNES, B. GRONER und W. WELS (1996). "A bivalent single-chain antibody-toxin specific for ErbB-2 and the EGF receptor." *Int J Cancer* **65**(4): 538-46.
- SCHMIDT, M., M. MAURER-GEBHARD, B. GRONER, G. KOHLER, G. BROCHMANN-SANTOS und W. WELS (1999). "Suppression of metastasis formation by a recombinant single chain antibody-toxin targeted to full-length and oncogenic variant EGF receptors." *Oncogene* **18**(9): 1711-21.
- SCHMIDT, M., E. VAKALOPOULOU, D. W. SCHNEIDER und W. WELS (1997). "Construction and functional characterization of scFv(14E1)-ETA - a novel, highly potent antibody-toxin specific for the EGF receptor." *Br J Cancer* **75**(11): 1575-84.
- SCHMIDT, M. und W. WELS (1996). "Targeted inhibition of tumour cell growth by a bispecific single-chain toxin containing an antibody domain and TGF α ." *Br J Cancer* **74**(6): 853-62.

- SCHNIEWIND, B., M. CHRISTGEN, R. KURDOW, S. HAYE, B. KREMER, H. KALTHOFF und H. UNGEFROREN (2004). "Resistance of pancreatic cancer to gemcitabine treatment is dependent on mitochondria-mediated apoptosis." *Int J Cancer* **109**(2): 182-88.
- SEETHARAM, S., V. K. CHAUDHARY, D. FITZGERALD und I. PASTAN (1991). "Increased cytotoxic activity of Pseudomonas exotoxin and two chimeric toxins ending in KDEL." *J Biol Chem* **266**(26): 17376-81.
- SENA-ESTEVEZ, M., Y. SAEKI, S. M. CAMP, E. A. CHIOCCA und X. O. BREAKEFIELD (1999). "Single-step conversion of cells to retrovirus vector producers with herpes simplex virus-Epstein-Barr virus hybrid amplicons." *J Virol* **73**(12): 10426-39.
- SHI, L., S. MAI, S. ISRAELS, K. BROWNE, J. A. TRAPANI und A. H. GREENBERG (1997). "Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization." *J Exp Med* **185**(5): 855-66.
- SHI, P. Y., N. MAIZELS und M. WEINER (1997). "Recovery of soluble active recombinant protein from inclusion bodies." *BioTechniques* **23**: 1036-38.
- SHI, Q., X. LE, B. WANG, Q. XIONG, J. L. ABBRUZZESE und K. XIE (2000). "Regulation of interleukin-8 expression by cellular pH in human pancreatic adenocarcinoma cells." *J Interferon Cytokine Res* **20**(11): 1023-28.
- SHRESTA, S., C. T. PHAM, D. A. THOMAS, T. A. GRAUBERT und T. J. LEY (1998). "How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?" *Curr Opin Immunol* **10**: 581-87.
- SIEGALL, C. B., M. OGATA, I. PASTAN und D. J. FITZGERALD (1991). "Analysis of sequences in domain II of Pseudomonas exotoxin A which mediate translocation." *Biochemistry* **30**(29): 7154-59.
- SMITH, J. J., R. DERYNCK und M. KORC (1987). "Production of transforming growth factor alpha in human pancreatic cancer cells: evidence for a superagonist autocrine cycle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(21): 7567-70.
- SORRENTINO, S. (1998). "Human extracellular ribonucleases: multiplicity, molecular diversity and catalytic properties of the major RNase types." *Cell Mol Life Sci* **54**(8): 785-94.
- SPOONER, R. A., D. J. ALLEN, A. A. EPENETOS und J. M. LORD (1994). "Expression of immunoglobulin heavy chain-ricin A chain fusions in mammalian cells." *Mol Immunol* **31**: 117-25.
- STANG, E., F. D. BLYSTAD, M. KAZAZIC, V. BERTELSEN, T. BRODAHL, C. RAIBORG, H. STENMARK und I. H. MADSHUS (2004). "Cbl-Dependent Ubiquitination is Required for Progression of EGF Receptors into Clathrin-coated Pits." *Mol Biol Cell* **15**(8): 3591-604.
- STÖCKER, M. (2001). "Eukaryontische Expression CD30-spezifischer Immuntoxine mit humanen Effektordomänen zur Behandlung des Hodgkin Lymphoms." *Dissertation* Medizinische Fakultät der Universität Köln.
- STÖCKER, M., M. K. TUR, S. SASSE, A. KRUSMANN, S. BARTH und A. ENGERT (2003). "Secretion of functional anti-CD30-angiogenin immunotoxins into the supernatant of transfected 293T-cells." *Protein Expr Purif* **28**: 211-19.
- SUGIMURA, K. und N. HIGASHI (1988). "A novel outer-membrane-associated protease in Escherichia coli." *J Bacteriol* **170**: 3650-54.
- SULKOWSKI, E. (1985). "Immobilised Metal Affinity Chromatography." *Trends Biotechnol* **3**: 1-7.
- SUN, C. Y., B. L. WANG, C. Q. HU, R. Y. PENG, Y. B. GAO, Q. Y. GU und D. W. WANG (2002). "Expression of the bcl-2 gene and its significance in human pancreatic carcinoma." *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **1**(2): 306-08.
- SUTTON, V. R., J. E. DAVIS, M. CANCELLA, R. W. JOHNSTONE, A. A. RUEFLI, K. SEDELIES, K. A. BROWNE und J. A. TRAPANI (2000). "Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation." *J Exp Med* **192**(10): 1403-14.
- SWAMY, K. H. S. und A. L. GOLDBERG (1982). "Subcellular distribution of various proteases in E. coli." *J Bacteriol* **149**: 1027-33.
- TAKAHASHI, S., T. NAKAGAWA, T. BANNO, T. WATANABE, K. MURAKAMI und K. NAKAYAMA (1995). "Localization of furin to the trans-Golgi network and recycling from the cell surface involves Ser and Tyr residues within the cytoplasmic domain." *J Biol Chem* **270**(47): 28397-401.

- TALMADGE, K. und W. GILBERT (1982). "Cellular location affects protein stability in Escherichia coli." *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 1830-33.
- TAUPIAC, M. P., M. BEBIEN, M. ALAMI und B. BEAUMELLE (1999). "A deletion within the translocation domain of Pseudomonas exotoxin A enhances translocation efficiency and cytotoxicity concomitantly." *Mol Microbiol* **31**(5): 1385-93.
- TJANDRA, J. J., L. RAMADI und I. F. MCKENZIE (1990). "Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients." *Immunol Cell Biol* **68**(6): 367-76.
- TOM, B. H., L. P. RUTZKY, M. M. JAKSTYS, R. OYASU, C. I. KAYE und B. D. KAHAN (1976). "Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line." *In Vitro* **12**(3): 180-91.
- TOWBIN, H., T. STAEBLIN und J. GORDON (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-54.
- TRAN, D. D., H. R. RUSSELL, S. L. SUTOR, J. VAN DEURSEN und R. J. BRAM (2003). "CAML is required for efficient EGF receptor recycling." *Dev Cell* **5**(2): 245-56.
- TRAPANI, J. A., P. JANS, M. J. SMYTH, C. J. FROELICH, E. A. WILLIAMS, V. R. SUTTON und D. A. JANS (1998). "Perforin-dependent nuclear entry of granzyme B precedes apoptosis, and is not a consequence of nuclear membrane dysfunction." *Cell Death Differ* **5**(6): 488-96.
- TRAPANI, J. A. und V. R. SUTTON (2003). "Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions." *Curr Opin Immunol* **15**(5): 533-43.
- TSAO, M. S., H. ZHU und J. VIALLET (1996). "Autocrine growth loop of the epidermal growth factor receptor in normal and immortalized human bronchial epithelial cells." *Exp Cell Res* **223**(2): 268-73.
- TUR, M. K., M. HUHN, S. SASSE, A. ENGERT und S. BARTH (2001). "Selection of scFv phages on intact cells under low pH conditions leads to a significant loss of insert-free phages." *Biotechniques* **30**: 412-13.
- TUR, M. K., M. HUHN, T. THEPEN, M. STÖCKER, R. KROHN, S. VOGEL, E. JOST, R. OSIEKA, J. G. VAN DE WINKEL, R. FISCHER, R. FINNERN und S. BARTH (2003). "Recombinant CD64-specific single chain immunotoxin exhibits specific cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells." *Cancer Res* **63**(23): 8414-19.
- ULLRICH, A. und J. SCHLESSINGER (1990). "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity." *Cell* **61**(2): 203-12.
- USHIRO, H. und S. COHEN (1980). "Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes." *J Biol Chem* **255**(18): 8363-65.
- VEZERIDIS, M. P., G. N. TZANAKAKIS, P. A. MEITNER, C. M. DORMEUS und L. M. TIBBETS (1992). "In vivo selection of a highly metastatic cell line of a human pancreatic carcinoma in the nude mouse." *Cancer* **69**: 2060-63.
- VITETTA, E., P. THROPE und J. UHR (1993). "Immunotoxins: magic bullets or misguided missiles?" *Immunol Today* **14**: 252-59.
- VITETTA, E. S. und J. W. UHR (1985). "Immunotoxins." *Annu Rev Immunol* **3**: 197-212.
- WAGENER, C. (1996). "Einführung in die molekulare Onkologie." Georg Thieme Verlag Stuttgart New York.
- WAGNER, C., C. IKING-KONERT, B. DENEFLER, S. STEGMAIER, F. HUG und G. M. HANSCH (2004). "Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils." *Blood* **103**(3): 1099-104.
- WALL, J. G. und A. PLÜCKTHUN (1999). "The hierarchy of mutations influencing the folding of antibody domains in Escherichia coli." *Protein Eng* **12**(7): 605-11.
- WANEBO, H. J. und M. P. VEZERIDIS (1996). "Pancreatic carcinoma in perspective. A continuing challenge." *Cancer* **78**(3): 580-91.
- WARSHAW, A. L. und C. FERNANDEZ-DEL CASTILLO (1992). "Pancreatic carcinoma." *N Engl J Med* **326**(7): 455-65.
- WELS, W., I. M. HARWERTH, M. MUELLER, B. GRONER und N. E. HYNES (1992). "Selective inhibition of tumor cell growth by a recombinant single-chain antibody-toxin specific for the erbB-2 receptor." *Cancer Res* **52**(22): 6310-17.

- WERSALL, P., I. OHLSSON, P. BIBERFELD, V. P. COLLINS, S. VON KRUSENSTJERNA, S. LARSSON, H. MELLSTEDT und J. BOETHIUS (1997). "Intratumoral infusion of the monoclonal antibody, mAb 425, against the epidermal-growth-factor receptor in patients with advanced malignant glioma." *Cancer Immunol Immunother* **44**(3): 157-64.
- WILSON, C. M. (1983). "Staining of proteins on gel: comparison of dye and procedures." *Methods in Enzymology* **91**: 236-47.
- WINTER, G. und C. MILSTEIN (1991). "Man-made antibodies." *Nature* **349**: 293-99.
- WINTER, H. und B. A. FOX (1999). "Adoptive cellular immunotherapy of cancer." *Curr Opin Mol Ther* **1**(1): 89-97.
- WU, D. Y., L. UGOZZOLI, B. K. PAL und R. B. WALLACE (1991). "The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction." *DNA Cell Biology* **10**: 233-38.
- XIONG, H. Q. und J. L. ABBRUZZESE (2002). "Epidermal growth factor receptor-targeted therapy for pancreatic cancer." *Semin Oncol* **29**: 31-37.
- YAMANAKA, Y., H. FRIESS, M. S. KOBRIN, M. BUCHLER, H. G. BEGER und M. KORC (1993). "Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness." *Anticancer Res* **13**(3): 565-69.
- YANG, X. D., X. C. JIA, J. R. CORVALAN, P. WANG und C. G. DAVIS (2001). "Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy." *Crit Rev Oncol Hematol* **38**(1): 17-23.
- YAZAKI, P. J., L. SHIVELY, C. CLARK, C. W. CHEUNG, W. LE, B. SZPIKOWSKA, J. E. SHIVELY, A. A. RAUBITSCHKEK und A. M. WU (2001). "Mammalian expression and hollow fiber bioreactor production of recombinant anti-CEA diabody and minibody for clinical applications." *J Immunol Methods* **253**: 195-208.
- YOKODA, T., D. E. MILENIC, M. WITHLOW und J. SCHLOM (1992). "Rapid tumor penetration of a single chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms." *Cancer Res* **52**: 3402-08.
- YOON, J. M., S. H. HAN, O. B. KOWN, S. H. KIM, M. H. PARK und B. K. KIM (1999). "Cloning and cytotoxicity of fusion proteins of EGF and angiogenin." *Life Sci* **64**(16): 1435-45.

VI.1 Eigene Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

BRUELL, D., M. STÖCKER, M. HUH, N. REDDING, M. KUPPER, P. SCHUMACHER, A. PAETZ, C. J. BRUNS, H. J. HAISMA, R. FISCHER, R. FINNERN und S. BARTH (2003). „The recombinant anti-EGF receptor immunotoxin 425(scFv)-ETA' suppresses growth of a highly metastatic pancreatic carcinoma cell line.“ *Int J Oncol* **23**(4): 1179-86.

folgende Publikation wurde beim *Int J Oncol* eingereicht:

BRUELL, D., C. J. BRUNS, M. YEZHELYEV, M. HUH, J. MÜLLER, I. ISCHENKO, R. FISCHER, R. FINNERN, K. W. JAUCH und S. BARTH. „Recombinant anti-EGFR immunotoxin 425(scFv)-ETA' demonstrates anti-tumor activity against disseminated human pancreatic cancer in nude mice.“

Tagungsbeiträge

LifeTecXchange Congress, Aachen

BRUELL, D., STÖCKER, M., REDDING N., SCHUMACHER P., BRUNS C.J., HAISMA H.J., FISCHER R., FINNERN R. und BARTH S. (2003). „Eucaryotically expressed anti-EGFR-angiogenin immunotoxins are suppressing growth of human pancreatic carcinoma.“

95th AACR Annual Meeting, Orlando, Florida, USA

DANIELA BRUELL, MAKSIM YEZHELYEV, IVAN ISCHENKO, MICHAEL HUHN, CHRISTIANE J. BRUNS, THOMAS BRABLETZ, HIDDE HAISMA, RAINER FISCHER und RICARDA FINNERN. (2004) „Specific cytotoxic activity of a recombinant anti-EGF receptor immunotoxin 425(scFv)-ETA' towards a highly metastatic pancreatic carcinoma cell line.“

VII ANHANG

VII.1 Abkürzungen

α	anti (in Verbindung mit Antikörpern)
AA	Acrylamid
ABTS	2,2-Azino-di-3-ethylbenzthiazolinsulfonat
AEX	Anionenaustauschchromatographie
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Amp	Ampizillin
Amp R	Ampizillin Resistenz
Ang	humanes Angiogenin
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
CDR	„complementarity determining region“
C _H	konstante Region der schweren Kette
c-myc	humanes Peptid zur Protein-Markierung („Tag“)
C-Region	konstante Region
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dII	deletierte Translokationsdomäne von ETA
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECP	eosinophil-kationisches Protein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	„enhanced green fluorescence protein“
EGFR	„epidermal growth factor receptor“
ELISA	„Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay“
ER	endoplasmatisches Retikulum
ETA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Exotoxin A
ETA'	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Exotoxin A (Deletionsmutante)
<i>et al.</i>	und andere
Fab	„fragment antigen binding“
F(ab) ₂	zwei über eine Disulfidbrücke verbundene Fab-Fragmente
FACS	„fluorescent activated cell sorter“
Fc	„fragment crystallisable“, konstante Ak-Region
FDA	„Food and Drug Administration“
FITC	FluoreceinIsoThioCyanat
Fv	„fragment variable“
g	Erdbeschleunigung (9,8 ms ⁻²)
g	Gramm
Gb	Granzym B
h	Stunde(n)
hE	humane Effektordomäne
His6-Tag	6facher Oligohistidinrest
H-Kette	schwere Kette
HRPO	„horse radish peroxidase“, Meerrettichperoxidase
IDA	Iminodiessigsäure
IgG	Immunglobulin der Subklasse G
IEP	isoelektrischer Punkt
IMAC	immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropylthiogalaktosid

IRES	interne ribosomale Eintrittsequenz
i.v.	intravenös
IVS	synthetisches Intron
IC ₅₀	Proteinkonzentration, die die Viabilität der behandelten Zellen auf 50% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen senkt
kDa	Kilodalton
KDEL	ER-Rückhaltesignal
Kan	Kanamycin
Kan R	Kanamycin Resistenz
L-Kette	leichte Kette
LB	Luria Broth
M	molare Masse
mAk	monoklonaler Antikörper
mAu	„milli absorbance units“
MCS	„multiple cloning site“
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
min	Minute(n)
mM	Millimolar
MTD	maximal tolerable Dosis
NBT	Nitroblautetrazolium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NTA	N-nitrilo-tri-essigsäure
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
ori	„origin of replication“
p.a.	„pro analysi“
PAA	Polyacrylamid
PAGE	PAA-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Saline
PBS-T	PBS + 0,05% (v/v) Tween-20
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenverlängerungs-Reaktion
pelB	bakterielles Signalpeptid zur periplasmatischen Expression
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PO	Peroxidase
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
scFv	„single chain fragment of the variable region“, Einzelkettenantikörper aus V _H und V _L
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Totalmonomer-Konzentration (in Verbindung mit PAA-Gelen)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
T _p	Anlagerungstemperatur eines Oligonukleotids
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TB-Medium	Terrific-Broth-Medium
U	„units“, z.B. bei Enzymaktivität
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	„volume per volume“, Volumen pro Volumen
V _H	variable Region der schweren Kette
V _L	variable Region der leichten Kette
Vol.	Volumen
V-Region	variable Region
w/v	„weight per volume“, Gewicht pro Volumen
ZAM	Ziege-anti-Maus

VII.2 Sequenzen

VII.2.1 425(scFv)-ETA'

Die CDRs der V_H und V_L des 425(scFv)-Fragmentes sowie des Linkers sind farblich hervorgehoben. C-Terminal folgt die Sequenz der Deletionsmutante des *Pseudomonas* Exotoxin A. Sie enthält keine Bindungsdomäne sondern beginnt mit der Translokationsdomäne. Diese ist aus sechs Helixen aufgebaut (A-F), wobei die F-Helix markiert ist. Darauf folgt eine Domäne unbekannter Funktion und die katalytische Domäne.

ATG	GCG	CAG	GTG	CAA	CTG	CAG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAA	CTG	GTG	AAG	CCT	GGG	GCT	TCA	GTG	AAG
M	A	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K
TTG	TCT	TGC	AAG	GCT	TCC	GGC	TAC	ACC	TTC	AAC	AGC	CAC	TGG	ATG	CAC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGG
L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	H	W	M	H	W	V	K	Q	R
GCT	GGA	CAA	GGC	CTT	GAG	TGG	ATC	GGA	GAG	TTT	AAT	CCC	AGC	AAC	GGC	CGT	ACT	AAC	TAC	AAT
A	G	Q	G	L	E	W	I	G	E	F	N	P	S	N	G	R	T	N	Y	N
GAG	AAA	TTC	AAG	AGC	AAG	GCC	ACA	CTG	ACT	GTA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAA
E	K	F	K	S	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q
CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TAC	TGT	GCC	AGT	CGG	GAC	TAT	GAT	TAC
L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	S	R	D	Y	D	Y
GAC	GGA	CGG	TAC	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGC	GGT
D	G	R	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	G	G	G
GGC	TCG	GGC	GGT	GGT	GGG	TCG	GGT	GGC	GGG	GGA	TCT	GAC	ATC	GAG	CTC	ACC	CAG	TCT	CCA	GCA
G	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	D	I	E	L	T	Q	S	P	A
ATC	ATG	TCT	GCA	TCT	CCA	GGG	GAG	AAG	GTC	ACT	ATG	ACC	TGC	AGT	GCC	AGC	TCA	AGT	GTA	ACT
I	M	S	A	S	P	G	E	K	V	T	M	T	C	S	A	S	S	S	V	T
TAC	ATG	TAT	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	CCA	GGA	TCC	TCC	CCC	AGA	CTC	CTG	ATT	TAT	GAC	ACA	TCC
Y	M	Y	W	Y	Q	Q	K	P	G	S	S	P	R	L	L	I	Y	D	T	S
AAC	CTG	GCT	TCT	GGA	GTC	CCT	GTT	CGT	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACC	TCT	TAC	TCT	CTC
N	L	A	S	G	V	P	V	R	F	S	G	S	G	S	G	T	S	Y	S	L
ACA	ATC	AGC	CGA	ATG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT	TAT	TAC	TGC	CAG	CAG	TGG	AGT	AGT	CAC
T	I	S	R	M	E	A	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	W	S	S	H
ATA	TTC	ACG	TTC	GGC	TCG	GGG	ACA	GAA	CTC	GAG	ATC	AAA	CGG	GCG	GCC	GCA	GAG	CTC	GCT	TCC
I	F	T	F	G	S	G	T	E	L	E	I	K	R	A	A	A	E	L	A	S
GGA	GGT	CCC	GAG	GGC	GGC	AGC	CTG	GCC	GCG	CTG	ACC	GCG	CAC	CAG	GCC	TGC	CAC	CTG	CCG	CTG
G	G	P	E	G	G	S	L	A	A	L	T	A	H	Q	A	C	H	L	P	L
GAG	ACT	TTC	ACC	CGT	CAT	CGC	CAG	CCG	CGC	GGC	TGG	GAA	CAA	CTG	GAG	CAG	TGC	GGC	TAT	CCG
E	T	F	T	R	H	R	Q	P	R	G	W	E	Q	L	E	Q	C	G	Y	P
GTG	CAG	CGG	CTG	GTC	GCC	CTC	TAC	CTG	GCG	GCG	CGA	CTG	TCA	TGG	AAC	CAG	GTC	GAC	CAG	GTG
V	Q	R	L	V	A	L	Y	L	A	A	R	L	S	W	N	Q	V	D	Q	V
ATC	CGC	AAC	GCC	CTG	GCC	AGC	CCC	GGC	AGC	GGC	GGC	GAC	CTG	GGC	GAA	GCG	ATC	CGC	GAG	CAG
I	R	N	A	L	A	S	P	G	S	G	G	D	L	G	E	A	I	R	E	Q
CCG	GAG	CAG	GCC	CGT	CTC	GCG	CTG	ACC	CTG	GCC	GCC	GCC	GAG	AGC	GAG	CGC	TTC	GTC	CGG	CAG
P	E	Q	A	R	L	A	L	T	L	A	A	A	E	S	E	R	F	V	R	Q
GGC	ACC	GGC	AAC	GAC	GAG	GCG	GGA	GCG	GCC	AAC	GCC	GAC	GTG	GTG	AGC	CTG	ACC	TGC	CCG	GTC
G	T	G	N	D	E	A	G	A	A	N	A	D	V	V	S	L	T	C	P	V
GCC	GCC	GGT	GAA	TGC	GCG	GGC	CCG	GCG	GAC	AGC	GGC	GAC	GCC	CTG	CTG	GAG	CGC	AAC	TAT	CCC
A	A	G	E	C	A	G	P	A	D	S	G	D	A	L	L	E	R	N	Y	P
ACT	GGC	GCG	GAG	TTC	CTC	GGC	GAC	GGC	GGC	GAC	GTC	AGC	TTC	AGC	ACC	CGC	GGC	ACG	CAG	AAC
T	G	A	E	F	L	G	D	G	G	D	V	S	F	S	T	R	G	T	Q	N

CDR-H1
CDR-H2
CDR-H3
Linker
CDR-L1
CDR-L2
CDR-L3
Translokationsdomäne
Furinschnittstelle
F-Helix
Domäne unbekannter Funktion
katalytische Domäne

TGG ACG GTG GAG CGG CTG CTC CAG GCG CAC CGC CAA CTG GAG GAG CGC GGC TAT GTG TTC GTC
 W T V E R L L Q A H R Q L E E R G Y V F V
GGC TAC CAC GGC ACC TTC CTC GAA GCG GCG CAA AGC ATC GTC TTC GGC GGG GTG CGC GCG CGC
 G Y H G T F L E A A Q S I V F G G V R A R
AGC CAG GAT CTC GAC GCG ATC CGG CGC GGT TTC TAT ATC GCC GGC GAT CCG GCG CTG GCC TAC
 S Q D L D A I W R G F Y I A G D P A L A Y
GGC TAC GCC CAG GAC CAG GAA CCC GAC GCG CGC GGC CGG ATC CGC AAC GGT GCC CTG CTG CGG
 G Y A Q D Q E P D A R G R I R N G A L L R
GTC TAT GTG CCG CGC TCT AGC CTG CCG GGC TTC TAC CGC ACC GGC CTG ACC CTG GCC GCG CCG
 V Y V P R S S L P G F Y R T G L T L A A P
GAG GCG GCG GGC GAG GTC GAA CGG CTG ATC GGC CAT CCG CTG CCG CTG CGC CTG GAC GCC ATC
 E A A G E V E R L I G H P L P L R L D A I
ACC GGC CCC GAG GAG GAA GGC GGG CGC CTG GAG ACC ATT CTC GGC TGG CCG CTG GCC GAG CGC
 T G P E E E E G G R L E T I L G W P L A E R
ACC GTG GTG ATT CCC TCG GCG ATC CCC ACC GAC CCG CGC AAC GTC GGC GGC GAC CTC GAC CCG
 T V V I P S A I P T D P R N V G G D L D P
TCC AGC ATC CCC GAC AAG GAA CAG GCG ATC AGC GCC CTG CCG GAC TAC GCC AGC CAG CCC GGC
 S S I P D K E Q A I S A L P D Y A S Q P G
AAA CCG CCG CGC GAG GAC CTG AAG TAA
 K P P R E D L K

VII.2.2 Ang

CAG GAT AAC TCC AGG TAC ACA CAC TTC CTG ACC CAG CAC TAT GAT GCC AAA CCA CAG GGC CCG
 Q D N S R Y T H F L T Q H Y D A K P Q G R
GAT GAC AGA TAC TGT GAA AGC ATC ATG AGG AGA CGG GGC CTG ACC TCA CCC TGC AAA GAC ATC
 D D R Y C E S I N R R R G L T S P C K D I
AAC ACA TTT ATT CAT GGC AAC AAG CGC AGC ATC AAG GCC ATC TGT GAA AAC AAG AAT GGA AAC
 N T F I H G N K R S I K A I C E N K N G N
CCT CAC AGA GAA AAC CTA AGA ATA AGC AAG TCT TCT TTC CAG GTC ACC ACT TGC AAG CTA CAT
 P H R E N L R I S K S S F Q V T T C K L H
GGA GGT TCC CCC TGG CCT CCA TGC CAG TAC CGA GCC ACA GCG GGG TTC AGA AAC GTT GTT GGT
 G G S P W P P C Q Y R A T A G F R N V V V
GCG TGT GAA AAT GGC TTA CCT GTC CAC TTG GAT CAG TCA ATT TTC CGT CGT CCG
 A C E N G L P V H L D Q S I F R R P

VII.2.3 ECP

AGA CCC CCA CAG TTT ACG AGG GCT CAG TGG TTT GCC ATC CAG CAC ATC AGT CTG AAC CCC CCT
 R P P Q F T R A Q W F A I Q H I S L N P P
CGA TGC ACC ATT GCA ATG CGG GCA ATT AAC AAT TAT CGA TGG CGT TGC AAA AAC CAA AAT ACT
 R C T I A M R A I N N Y R W R C K N Q N T
TTT CTT CGT ACA ACT TTT GCT AAT GTA GTT AAT GTT TGT GGT AAC CAA AGT ATA CGC TGC CCT
 F L R T T F A N V V N V C G N Q S I R C P
CAT AAC AGA ACT CTC AAC AAT TGT CAT CGG AGT AGA TTC CGG GTG CCT TTA CTC CAC TGT GAC
 H N R T L N N C H R S R F R V P L L H C D
CTC ATA AAT CCA GGT GCA CAG AAT ATT TCA AAC TGC AGG TAT GCA GAC AGA CCA GGA AGG AGG
 L I N P G A Q N I S N C R Y A D R P G R R
TTC TAT GTA GTT GCA TGT GAC AAC AGA GAT CCA CGG GAT TCT CCA CGG TAT CCT GTG GTT CCA
 F Y V V A C D N R D P R D S P R Y P V V P
GTT CAC CTG GAT ACC ACC ATC
 V H L D T T I

VII.2.4 Gb

<u>ATC</u>	<u>ATC</u>	<u>GGG</u>	<u>GGA</u>	<u>CAT</u>	<u>GAG</u>	<u>GCC</u>	<u>AAG</u>	<u>CCC</u>	<u>CAC</u>	<u>TCC</u>	<u>CGC</u>	<u>CCC</u>	<u>TAC</u>	<u>ATG</u>	<u>GCT</u>	<u>TAT</u>	<u>CTT</u>	<u>ATG</u>	<u>ATC</u>	<u>TGG</u>
I	I	G	G	H	E	A	K	P	H	S	R	P	Y	M	A	Y	L	M	I	W
<u>GAT</u>	<u>CAG</u>	<u>AAG</u>	<u>TCT</u>	<u>CTG</u>	<u>AAG</u>	<u>AGG</u>	<u>TGC</u>	<u>GGT</u>	<u>GGC</u>	<u>TTC</u>	<u>CTG</u>	<u>ATA</u>	<u>CAA</u>	<u>GAC</u>	<u>GAC</u>	<u>TTC</u>	<u>GTG</u>	<u>CTG</u>	<u>ACA</u>	<u>GCT</u>
D	Q	K	S	L	K	R	C	G	G	F	L	I	Q	D	D	F	V	L	T	A
<u>GCT</u>	<u>CAC</u>	<u>TGT</u>	<u>TGG</u>	<u>GGA</u>	<u>AGC</u>	<u>TCC</u>	<u>ATA</u>	<u>AAT</u>	<u>GTC</u>	<u>ACC</u>	<u>TTG</u>	<u>GGG</u>	<u>GCC</u>	<u>CAC</u>	<u>AAT</u>	<u>ATC</u>	<u>AAA</u>	<u>GAA</u>	<u>CAG</u>	<u>GAG</u>
A	H	C	W	G	S	S	I	N	V	T	L	G	A	H	N	I	K	E	Q	E
<u>CCG</u>	<u>ACC</u>	<u>CAG</u>	<u>CAG</u>	<u>TTT</u>	<u>ATC</u>	<u>CCT</u>	<u>GTG</u>	<u>AAA</u>	<u>AGA</u>	<u>CCC</u>	<u>ATC</u>	<u>CCC</u>	<u>CAT</u>	<u>CCA</u>	<u>GCC</u>	<u>TAT</u>	<u>AAT</u>	<u>CCT</u>	<u>AAG</u>	<u>AAC</u>
P	T	Q	Q	F	I	P	V	K	R	P	I	P	H	P	A	Y	N	P	K	N
<u>TTC</u>	<u>TCC</u>	<u>AAC</u>	<u>GAC</u>	<u>ATC</u>	<u>ATG</u>	<u>CTA</u>	<u>CTG</u>	<u>CAG</u>	<u>CTG</u>	<u>GAG</u>	<u>AGA</u>	<u>AAG</u>	<u>GCC</u>	<u>AAG</u>	<u>CGG</u>	<u>ACC</u>	<u>AGA</u>	<u>GCT</u>	<u>GTG</u>	<u>CAG</u>
F	S	N	D	I	M	L	L	Q	L	E	R	K	A	K	R	T	R	A	V	Q
<u>CCC</u>	<u>CTC</u>	<u>AGG</u>	<u>CTA</u>	<u>CCT</u>	<u>AGC</u>	<u>AAC</u>	<u>AAG</u>	<u>GCC</u>	<u>CAG</u>	<u>GTG</u>	<u>AAG</u>	<u>CCA</u>	<u>GGG</u>	<u>CAG</u>	<u>ACA</u>	<u>TGC</u>	<u>AGT</u>	<u>GTG</u>	<u>GCC</u>	<u>GGC</u>
P	L	R	L	P	S	N	K	A	Q	V	K	P	G	Q	T	C	S	V	A	G
<u>TGG</u>	<u>GGG</u>	<u>CAG</u>	<u>ACG</u>	<u>GCC</u>	<u>CCC</u>	<u>CTG</u>	<u>GGA</u>	<u>AAA</u>	<u>CAC</u>	<u>TCA</u>	<u>CAC</u>	<u>ACA</u>	<u>CTA</u>	<u>CAA</u>	<u>GAG</u>	<u>GTG</u>	<u>AAG</u>	<u>ATG</u>	<u>ACA</u>	<u>GTG</u>
W	G	Q	T	A	P	L	G	K	H	S	A	T	L	Q	E	V	K	M	T	V
<u>CAG</u>	<u>GAA</u>	<u>GAT</u>	<u>CGA</u>	<u>AAG</u>	<u>TGC</u>	<u>CAA</u>	<u>TCT</u>	<u>GAC</u>	<u>TTA</u>	<u>CGC</u>	<u>CAT</u>	<u>TAT</u>	<u>TAC</u>	<u>GAC</u>	<u>AGT</u>	<u>ACC</u>	<u>ATT</u>	<u>GAG</u>	<u>TTG</u>	<u>TGC</u>
Q	E	D	R	K	C	E	S	D	L	R	H	Y	Y	D	S	T	I	E	L	C
<u>GTG</u>	<u>GGG</u>	<u>GAC</u>	<u>CCA</u>	<u>GAG</u>	<u>ATT</u>	<u>AAA</u>	<u>AAG</u>	<u>ACT</u>	<u>TCC</u>	<u>TTT</u>	<u>AAG</u>	<u>GGG</u>	<u>GAC</u>	<u>TCT</u>	<u>GGA</u>	<u>GGC</u>	<u>CCT</u>	<u>CTT</u>	<u>GTG</u>	<u>TGT</u>
V	G	D	P	E	I	K	K	T	S	F	K	G	D	S	G	G	P	L	V	C
<u>AAC</u>	<u>AAG</u>	<u>GTG</u>	<u>GCC</u>	<u>CAG</u>	<u>GGC</u>	<u>ATT</u>	<u>GTC</u>	<u>TTC</u>	<u>TAT</u>	<u>GGA</u>	<u>CGA</u>	<u>AAC</u>	<u>AAT</u>	<u>GGC</u>	<u>ATG</u>	<u>CCT</u>	<u>CCA</u>	<u>CGA</u>	<u>GCC</u>	<u>TGC</u>
N	K	V	A	Q	G	I	V	S	Y	G	R	N	N	G	N	P	P	R	A	C
<u>ACC</u>	<u>AAA</u>	<u>GTC</u>	<u>TCA</u>	<u>AGC</u>	<u>TTT</u>	<u>GTA</u>	<u>CAC</u>	<u>TGG</u>	<u>ATA</u>	<u>AAG</u>	<u>AAA</u>	<u>ACC</u>	<u>ATG</u>	<u>AAA</u>	<u>CGC</u>	<u>TAC</u>				
T	K	V	S	S	F	V	H	W	I	K	K	T	M	K	R	Y				

VII.3 Buchstabencode für Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Aspartat	P	Prolin
E	Glutamat	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die einen Anteil an der Durchführung dieser Dissertation haben. Besonders bedanken möchte ich mich im Einzelnen bei folgenden Personen:

Herrn Prof. Dr. R. Fischer danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation am Institut für Biologie VII der RWTH Aachen anzufertigen sowie für die Übernahme des Referats und für die freundliche Betreuung.

Für die freundliche Übernahme des Koreferats danke ich Herrn Prof. Dr. F. Kreuzaler.

Die vorliegende Dissertation wurde unter Anleitung von Herrn Dr. Dr. Priv. Doz. Stefan Barth durchgeführt. Ihm danke ich für wissenschaftliche Anregungen und seine Diskussionsbereitschaft.

Frau Dr. Ricarda Finnern danke ich für die ausführliche Begutachtung dieser Arbeit und für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Christiane J. Bruns für die Kooperation und Durchführung der Tierexperimente an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern, LMU München. Bei Herrn Prof. Dr. Hidde Haisma möchte ich mich für die Bereitstellung des 425(scFv)-Fragmentes bedanken.

Michael Huhn danke ich für die Hilfe bei der prokaryotischen Expression sowie für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen.

Für die Bereitstellung der pMS-Plasmide und der Plasmide pBM1.1-Ki-4(scFv)-ETA' und pBM1.1-M12(scFv) danke ich Michael Stöcker und Mehmet Tur.

Bei Jürgen Müller möchte ich mich für die geduldige Durchführung und Hilfe bei der Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration bedanken.

Weiterhin danke ich Stephan und Dirk für die Fermentationen von 425(scFv)-ETA' und 425(scFv).

Bei Nicole möchte ich mich für die große Hilfsbereitschaft insbesondere bei der Arbeit in der Zellkultur und für ihre Freundschaft bedanken.

Ganz besonders wird mir das angenehme Arbeitsklima und die in jeder Hinsicht hilfreiche und freundliche Unterstützung der Doktoranden untereinander in Erinnerung bleiben. Insbesondere Petra, Antje, Tim und Vicky danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen aber vor allem für die zahlreichen amüsanten Momente, die den zum Teil schwierigen Laboralltag sehr aufgeheitert haben.

Markus und Ines Cavalari danke ich neben der Hilfe bei der Durchsicht der Dissertation vor allem für die Freundschaft und moralische Unterstützung.

Ganz besonders danke ich Petra, die mich während meiner dreijährigen Dissertationszeit sehr unterstützt hat und mit mir durch „Dick und Dünn“ gegangen ist. Dank gilt auch für die schnelle und gründliche Korrektur meiner Arbeit.

Ein sehr großer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester für ihre Unterstützung während dieser Doktorarbeit. Besonders habe ich mich über die ausführliche Korrektur und das Engagement von Birgit und Charly gefreut.

Meinem Freund Günther gilt der größte Dank, da er mich während der Dissertation sehr unterstützt hat und immer viel Verständnis und Geduld aufgebracht hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniela Brüll
Geburtsdatum: 04.02.1976
Geburtsort: Aachen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1981 bis 1985 Grundschule Heimbach
1985 bis 1995 St. Angela Gymnasium, Düren
Schulabschluss Allgemeine Hochschulreife

Studium:

10.1995 - 08.2001 Diplomstudiengang Biologie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
Prüfungsfächer:
Molekularbiologie, Biotechnologie, Mikrobiologie, molekulare Pathologie

10.2000 – 08.2001 Diplomarbeit am Institut für Biologie I der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen unter der Leitung von Professor Dr. F. Kreuzaler
Thema der Diplomarbeit: „Bakterielle Expression und Reinigung eines Single-Chain Antikörpers sowie die Verwendung des Antikörper-fragmentes zur Charakterisierung einer Epitopsequenz“

Promotion:

09.2001 – 11.2004 Promotion am Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME in Aachen, Abteilung Pharmazeutische Produktentwicklung unter der Leitung von Professor Dr. R. Fischer