



Doctoral Thesis

A novel proteomic technology for the discovery of markers for tumor targeting

Author(s):

Rybak, Jascha-Nikolai

Publication Date:

2005

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005141701> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

**A NOVEL PROTEOMIC TECHNOLOGY FOR THE
DISCOVERY OF MARKERS FOR TUMOR TARGETING**

A dissertation submitted to the

Swiss Federal Institute of Technology Zurich

for the degree of

Doctor of Natural Sciences

presented by

Jascha-Nikolai Rybak

Dipl.-Biochem., Eberhard Karls Universität Tübingen

born October 24th, 1976

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Dario Neri, examiner

Prof. Dr. Michael Detmar, co-examiner

Dr. Giuliano Elia, co-examiner

1.1 Summary

In this thesis, I describe the development and application of a novel technology for the discovery of tumor-associated markers for the diagnosis and therapy of cancer.

Cancer is today one of the most feared diseases. Classical anti-cancer therapy, including chemotherapy and irradiation, often suffers from poor selectivity and, thus, from severe toxic side effects to healthy tissues. One avenue towards more selective, better anti-cancer drugs consists in the targeted delivery of bioactive molecules (drugs, cytokines, procoagulant factors, photosensitizers, radionuclides, etc.) to the tumor environment by means of binding molecules (e.g., antibodies) specific to tumor-associated antigens. The selective accumulation of drugs at the tumor site will spare normal tissues and will lead to an increased therapeutic index of the drug, i.e. a higher efficacy with less side effects. The same strategy, using ligands coupled to imaging agents (e.g., fluorophores or radionuclides), can also be useful for the diagnostic localization of tumor lesions. One of the major challenges for these biomedical approaches consists of the identification of suitable antigens, which are specifically and abundantly expressed in the tumor, and which are accessible to intravenously injected ligands.

We have developed a novel methodology, based on the vascular perfusion of tumor-bearing animals or of human surgical specimens from cancer patients with a reactive ester derivative of biotin, which enables the covalent modification of proteins readily accessible from the bloodstream. The procedure eliminates from circulation by washing both blood cells and proteins, which could compete with the biotinylation reaction. As a result, accessible proteins carrying primary amino groups (e.g., unprotected exposed N-termini or lysine side-chains) are covalently modified with biotin. Due to the high affinity of streptavidin for biotin, biotinylated proteins can be efficiently purified from total tissue extracts on streptavidin resin in the presence of strong detergents. Unbiotinylated proteins can be washed away, while the biotinylated proteins retained on the resin can be submitted to identification by mass spectrometric techniques. Without such a reduction of proteome complexity, the identification of these accessible antigens out of the crude tissue extracts by proteomic methodologies would be extremely difficult due to the large amounts of intracellular proteins.

After implementation of suitable vascular perfusion protocols and a strategy for the proteomic investigation of the labeled proteins, we applied our methodology to the *in*

vivo biotinylation of a number of tumor mouse models and to the *ex vivo* biotinylation of surgically resected tumor-bearing human kidneys. Histochemical staining of perfused tissues revealed a successful biotinylation, preferentially of vascular and perivascular structures. We were able to identify hundreds of proteins labeled with biotin in this procedure in healthy tissues and in tumors. While a part of these proteins were found in several tissue, we also identified organ- and tumor-specific markers. Among the proteins recovered only from the tumor specimens, we identified antigens which already had been shown previously to be tumor-associated, e.g., integrin α_v , vitronectin, tumor endothelial marker 4 or melanoma-associated antigen MG50. Moreover, we identified a number of interesting marker candidates, which have not yet been extensively characterized as tumor-associated targets, such as TIAM1, PTK7, fibulin-3 and periostin. Initial validation of some of the identified candidate targets by immunohistochemistry, Western blot, and PCR analyses confirmed a preferential expression in tumors, as compared to normal organs.

1.2 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit beschreibe ich die Entwicklung und Anwendung einer neuen Technologie zur Entdeckung von tumor-assoziierten Markern für die Diagnose und Therapie von Krebs.

Krebs ist heutzutage eine der meist gefürchteten Krankheiten. Konventionelle Krebstherapie, einschliesslich Chemotherapie und Strahlentherapie, ist oft nicht selektiv genug und führt daher zu schweren Nebenwirkungen in gesunden Geweben. Eine Möglichkeit zur Entwicklung von selektiveren, besseren Krebsmedikamenten besteht in der gezielten Anreicherung von Wirkstoffen am Ort des Tumors mit Hilfe von Bindungsmolekülen (z.B. Antikörpern), die tumor-spezifische Antigene erkennen und binden. Dies führt dazu, dass gesundes Gewebe verschont bleibt und dass der therapeutische Index des Medikamentes erhöht wird, d.h., dass die Wirksamkeit verstärkt und die Nebenwirkungen verringert werden. Der gleiche Ansatz kann auch für die diagnostische Lokalisierung von Tumoren genutzt werden, wenn man Bindungsmoleküle einsetzt, an die bildgebende Reagenzien (wie z.B. Fluorophore oder radioaktive Moleküle) gekoppelt sind. Eine der grössten Herausforderungen für die Umsetzung dieser biomedizinischen Strategien besteht in der Identifizierung von geeigneten Antigenen, die spezifisch und in genügender Menge im Tumor vorkommen und die für intravenös applizierte Bindungsmoleküle erreichbar sind.

Wir haben eine neue Methode entwickelt, die darauf basiert, dass Tiermodelle mit Tumoren oder menschliche chirurgische Proben von Krebspatienten mit einem reaktiven Ester-Derivat von Biotin perfundiert werden. Dies ermöglicht die kovalente Bindung von Biotin an solche Proteine, die von der Blutbahn her leicht erreichbar sind. Bei der Perfusion werden Blutzellen und Blutproteine, die bei der Biotinylierungsreaktion stören könnten, aus den Blutgefässen herausgespült und in den Geweben zugängliche Proteine, die primäre Aminogruppen (z.B. ungeschützte, exponierte Aminotermini oder Lysin-Seitenketten) enthalten, kovalent mit Biotin markiert. Aufgrund der hohen Affinität von Streptavidin zu Biotin, können die biotinylierten Proteine mit Hilfe von immobilisiertem Streptavidin effizient aus dem Gesamt-Gewebeextrakt heraus aufgereinigt werden, auch in Anwesenheit von starken Detergenzien. Nicht-biotinylierte Proteine können gewaschen werden, während die biotinylierten Proteine, die vom Streptavidin gebunden wurden, mit Hilfe von massenspektrometrischen Methoden analysiert und identifiziert werden können. Ohne

eine derartige Reduktion der Komplexität des untersuchten Proteoms wäre es wegen der grossen Mengen von intrazellulären Proteinen sehr schwierig, diese zugänglichen Antigene aus dem Gesamt-Extrakt heraus zu identifizieren.

Nach der Implementierung geeigneter Protokolle für die vaskulären Perfusionen und einer Strategie zur proteomischen Untersuchung der markierten Proteine, wendeten wir unsere Technologie für die *in vivo* Biotinylierung von verschiedenen Tumor-Maus-Modellen und für die *ex vivo* Biotinylierung von chirurgisch entfernten menschlichen Nieren mit Tumoren an. Histochemische Färbungen der perfundierten Gewebe zeigten eine erfolgreiche Biotinylierung, bevorzugt von vaskulären und peri-vaskulären Strukturen. Wir konnten hunderte von Proteinen in gesunden Geweben und in Tumoren identifizieren, die bei der Perfusion mit Biotin markiert worden waren. Während ein Teil dieser Proteine in mehreren Geweben gefunden wurde, konnten wir auch organ- und tumor-spezifische Marker identifizieren. Unter den Proteinen, die ausschliesslich in den Tumor-Proben gefunden wurden, konnten wir Antigene identifizieren, für die bereits zuvor gezeigt worden war, dass sie tumor-assoziiert sind, z.B. Integrin α_v , Vitronectin, Tumor Endothelialer Marker 4 oder Melanom-assoziiertes Antigen MG50. Darüber hinaus identifizierten wir eine Reihe von interessanten Marker-Kandidaten, die noch nicht weitergehend als tumor-assoziierte Zielmoleküle beschrieben worden sind, wie z.B. TIAM1, PTK7, Fibulin-3 und Periostin. Eine erste Validierung einiger der identifizierten Zielmolekül-Kandidaten mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen, Westernblot- und PCR-Analysen bestätigte eine verstärkte Expression dieser Proteine in Tumoren im Vergleich zu normalen Organen.