

Polyionische Fusionspeptide als Kopplungsmotiv in Immuntoxinen

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Franziska Gehle

geb. am 17.05.1982 in Greven

Gutachter: PD Dr. habil. Hauke Lilie
Prof. Dr. Mike Schutkowski
Dr. Ulrich Brinkmann

Datum der Verteidigung: 27.06.2016

Zusammenfassung

Im Rahmen heutiger biotechnologischer Möglichkeiten werden Proteine rekombinant produziert und deren Funktionen modifiziert oder auch neu kombiniert. Eine einfache und modular anwendbare Plattform für die Herstellung artifizierlicher bifunktionaler Proteine ist der Einsatz polyionischer Fusionspeptide. Hierbei handelt es sich um ein Kopplungsmotiv, das aufgrund elektrostatischer Anziehung zur Heterodimerisierung führt. Konkret werden die beiden Kopplungspartner rekombinant mit jeweils entgegengesetzt geladenen polyionischen Fusionspeptiden hergestellt. Diese können N- oder C-terminal oder in frei zugänglichen Loop-Regionen lokalisiert sein. Die polyionischen Fusionspeptide bestehen aus einem Cystein und einer Sequenz von in der Regel acht geladenen Aminosäureresten. Aufgrund der ionischen Wechselwirkungen zwischen den Fusionspeptiden wird eine heterodimere Assoziation erzielt. Als Folge stehen die beiden Cysteine in räumlicher Nähe zueinander und bilden unter geeigneten Redoxbedingungen eine kovalente Disulfidbrücke. Mit diesem System werden bereits bei einem äquivalenten Einsatz der Kopplungspartner in niederen mikromolaren Konzentrationen Kopplungsausbeuten von 80 % erzielt.

Mittels polyionischer Fusionspeptide hergestellte Kopplungsprodukte zeigten in bisherigen Studien *in vitro* die gewünschten Bifunktionalitäten. Das polyionisch fusionierte Immuntoxin B3-PE38, eine Fusion zwischen dem tumorspezifischen Antikörperfragment dsFvB3 (B3) und einer Variante des *Pseudomonas* Exotoxin (PE38), und das genetisch fusionierte, analoge Immuntoxin LMB-7 zeigten in bisherigen *In-vitro*-Studien eine vergleichbare biologische Aktivität. Allerdings konnte in *In-vivo*-Studien eine erfolgreiche Tumorregression im Xenograft-Mausmodell nur für LMB-7 bestätigt werden. Da der wichtigste Unterschied zwischen B3-PE38 und LMB-7 die polyionischen Fusionspeptide des B3-PE38 sind, wird vermutet, dass diese polyionischen Sequenzen der Grund für die fehlende Aktivität von B3-PE38 *in vivo* sind.

Innerhalb dieser Arbeit sollte am Beispiel des B3-PE38 das System der polyionischen Fusionspeptide optimiert werden, so dass eine biologische Wirkung des Immuntoxins *in vivo* erzielt werden kann. Dazu wurden die polyionischen Fusionspeptide im Aufbau modifiziert: Zwischen das artifizierliche Cystein, welches benachbart zum Kopplungspartner positioniert ist, und die polyionische Sequenz wurde eine Thrombinspaltstelle eingefügt. Durch einen Thrombinverdau konnten die geladenen Aminosäuren der polyionischen Sequenz nach Ausbildung der intermolekularen Disulfidbrücke erfolgreich entfernt werden. Dieses, nun als B3-PE38_C bezeichnete Immuntoxin, wurde *in vitro* analysiert. Die biologische Aktivität des

Konstruktes in Zellkultur ist weiterhin mit LMB-7 und auch mit B3-PE38 ohne die Thrombinspaltstelle vergleichbar, jedoch sind die Kopplungsausbeuten mit 60 % etwas geringer.

Durch eine Charakterisierung der polyionischen Wechselwirkungen konnte gezeigt werden, dass die Kopplungsausbeute durch die Länge der polyionischen Sequenz beeinflusst wird. Je länger die polyionische Sequenz, desto besser ist die primäre elektrostatische Anziehung zwischen den Monomeren. Anhand der Messungen von spaltbaren polyionischen Fusionspeptiden mit sechs, acht und zehn geladenen Aminosäuren kann vorhergesagt werden, dass jede Verlängerung um eine weitere geladene Aminosäure die Assoziationskonstante um den Faktor 2,15 bzw. die Energie um 1,8 kJ/mol erhöht.

Zusätzlich wurde ein weiteres Immuntoxin in dieser Arbeit eingeführt. Es basiert auf einem Derivat des Neuropeptid Y ($[F^7, P^{34}]NPY$) und dem bereits beschriebenen Toxin PE38. Das Konstrukt wurde sowohl über die nicht spaltbaren ($[F^7, P^{34}]NPY-PE38$) als auch über die spaltbaren Fusionspeptide ($[F^7, P^{34}]NPY-PE38_{CX}$) hergestellt. Auch mit diesen Immuntoxinen wurde die Vergleichbarkeit ihrer biologischen Aktivität in Zellkultur unabhängig von der Art der polyionischen Fusionspeptide nachgewiesen. Mit beiden Varianten wurde im unteren nanomolaren Konzentrationsbereich eine zelltypspezifische, gerichtete Zelladressierung erzielt. Die Aktivierung des humanen Y_1 -Rezeptors führte zur rezeptorvermittelten Internalisierung der Immuntoxine und zu nachfolgender Zytotoxizität des *Pseudomonas* Exotoxins auf die hY_1R -positiven Zellen. Diese spezifische Zelladressierung eines Proteintoxins über die Ligand-Rezeptor-Interaktion zwischen NPY und dem humanen Y_1 -Rezeptor wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gezeigt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Krebs und seine Behandlung	1
1.2	Immuntoxine	4
1.2.1	Die Toxineinheit von Immuntoxinen	5
1.2.2	Die <i>Targeting</i> -Komponente in Immuntoxinen	9
1.2.3	Die Fusionierung von <i>Targeting</i> -Komponente und Toxineinheit zum Immuntoxin	11
1.3	Problemstellung der Arbeit	13
1.3.1	Übersicht der in dieser Arbeit eingesetzten Proteine	16
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.2	Molekularbiologische Methoden	33
2.2.1	Agarosegelelektrophorese	33
2.2.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
2.2.3	Gewinnung von Plasmid-DNA	33
2.2.4	Restriktionsverdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	33
2.2.5	Polymerasekettenreaktion	34
2.2.6	Vorbereitung von Oligonukleotiden für die Ligation	35
2.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten	35
2.2.8	Sequenzierung von DNA und Synthese von Oligonukleotiden	35
2.2.9	Konstruktion von Expressionsvektoren	35
2.3	Stammhaltung und Kultivierung von Mikroorganismen	38
2.3.1	Stammhaltung und Anzucht von Mikroorganismen	38
2.3.2	Herstellung elektrokompeter Zellen	38
2.3.3	Transformation von Mikroorganismen durch Elektroporation	39
2.3.4	Proteinherstellung im Schüttelkolben	39
2.3.5	Proteinherstellung im Bioreaktor	39
2.4	Proteinreinigung	40
2.4.1	Zellaufschluss zur Reinigung der löslich produzierten Proteine	40
2.4.2	Chromatographische Methoden	41
2.4.3	Reinigung von sfBFP-CxEn	42
2.4.4	Reinigung von MBP-CxRn	42
2.4.5	Reinigung von E8xC-PE38 und von E8C-PE38	43
2.4.6	Isolierung und Solubilisierung von <i>inclusion bodies</i>	43
2.4.7	Renaturierung des B3-Antikörperfragmentes	44
2.4.8	Reinigung des B3-CxR8	45
2.4.9	Reinigung der Kopplungsprodukte	45

2.5	Proteinchemische und analytische Methoden	46
2.5.1	Peptidsynthese von NPY-Varianten	46
2.5.2	Überführung eines Trifluoracetates in ein Acetat	46
2.5.3	SDS-PAGE	47
2.5.4	Spektroskopische Methoden	48
2.5.5	Analytische Ultrazentrifugation	50
2.5.6	Ionenaustauschchromatographie zur Analytik der polyionischen Fusionspeptide	53
2.5.7	Massenspektrometrie	54
2.5.8	Nachweis freier Thiolgruppen	54
2.5.9	Proteinbestimmung nach Bradford	54
2.5.10	NaDOC-Fällung	55
2.5.11	Heterodimerisierung von Proteinen über polyionische Fusionspeptide	55
2.5.12	Thrombinverdau der polyionischen Fusionspeptide	56
2.6	Zellbiologische Methoden	56
2.6.1	Stammhaltung humaner, adhärenter Zellen	56
2.6.2	Kryokonservierung von Zellen	57
2.6.3	Reaktivierung kryokonservierter Zellen	57
2.6.4	Internalisierungsstudien	57
2.6.5	Zytotoxizitätsstudien	58
2.6.6	Durchflusszytometrie	58
2.6.7	Kristallviolettassay	60
3	Ergebnisse	63
3.1	Analytik der Kopplungseigenschaften der spaltbaren Fusionspeptide	64
3.1.1	Herstellung und Reinigung von MBP-CxR _n und sfBFP-CxE _n	65
3.1.2	Eigenschaften von sfBFP-CxE _n	65
3.1.3	Eigenschaften von MBP-CxR _n	69
3.1.4	Bestimmung der Dissoziationskonstante der polyionischen Systeme	71
3.1.5	Einfluss der Ionenstärke auf die Assoziation polyionischer Systeme	73
3.1.6	Bestimmung des Redoxpotentials der Disulfidbrücke der polyionischen Fusionspeptide	75
3.1.7	Zusammenfassung der Analytik der spaltbaren Fusionspeptide	76
3.2	Biologische Aktivität von B3-PE38 _{CX}	77
3.2.1	Herstellung und Reinigung der Einzelkomponenten B3-CxR ₈ und E ₈ xC-PE38	78
3.2.2	Herstellung und Reinigung des Immunkonjugates B3-PE38 _{CX}	80
3.2.3	Thrombinspaltung des Immunkonjugats B3-PE38 _{CX}	81
3.2.4	Wachstumskinetik von MCF7 Zellen unter Einfluss von B3-PE38 _C	82
3.2.5	Zeitabhängige Applikation von B3-PE38 _C	83
3.2.6	Mehrfachapplikation von B3-PE38 _C	84
3.2.7	Bestimmung der Toxizität von B3-PE38 _C	84
3.2.8	Zusammenfassung der Ergebnisse zu B3-PE38 _{CX} und B3-PE38 _C	85
3.3	Herstellung und Analytik des neuartigen bifunktionalen Konstruktes [F ⁷ , P ³⁴]NPY-PE38	86
3.3.1	Strukturelle Eigenschaften des CK ₈ -[F ⁷ , P ³⁴]NPY	87
3.3.2	Internalisierungsstudien von CK ₈ -[F ⁷ , P ³⁴]NPY über hY ₁ R	89

3.3.3	Herstellung und Reinigung von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$	90
3.3.4	Biologische Aktivität von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ in Zellkultur	91
3.3.5	Herstellung und Reinigung von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38_{CX}$	93
3.3.6	Thrombinspaltung von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38_{CX}$	95
3.3.7	Biologische Aktivität von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38_{CX}$	95
3.3.8	Zusammenfassender Vergleich der Immuntoxine $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ und $[F^7, P^{34}]NPY-PE38_{CX}$	96
4	Diskussion	98
4.1	Polyionische Fusionspeptide im Vergleich zu anderen Technologien	99
4.2	Eigenschaften der spaltbaren polyionischen Fusionspeptide	101
4.3	Anwendung der verschiedenen Immuntoxine	106
5	Ausblick	111
 Literaturverzeichnis		 113
Abbildungsverzeichnis		128
A Abkürzungsverzeichnis		130
B Übersicht über Proteine und Konstrukte mit polyionischen Fusionspeptiden		132
C Gensequenzen der in dieser Arbeit hergestellten Proteine		134
D Danksagung		141

1. Einleitung

1.1. Krebs und seine Behandlung

Das Zusammenspiel von Zellen im Körper unterliegt einer sehr feinen Steuerung. Wachstum, Teilung, Differenzierung und Apoptose von Zellen sind nur einige Mechanismen, die koordiniert in Geweben ablaufen. In jeglicher Körperzelle können Störungen auftreten und zur Entwicklung von Krebs führen. Somit ist unter dem Begriff Krebserkrankung ein sehr breites Spektrum maligner Entartungen zu fassen. Neben genetischer Disposition und spontanen Mutationen führen Umwelteinflüsse zur Zellentartung. Diese können in physikalische Karzinogene (z. B. UV-Strahlung), chemische Karzinogene (z. B. Zigarettenrauch, Aflatoxine) und biologische Karzinogene (z. B. humane Papillomviren, *Helicobacter pylori* Bakterien) unterteilt werden (Wagener and Müller, 2009).

Krebs wurde in Deutschland im Jahre 2010 fast 477 300-mal (KiD, 2013) diagnostiziert und umfasst eine große Vielfalt an Erkrankungsformen. Allen liegt eine maligne Entartung körpereigener Zellen zugrunde, welche nicht ausreichend oder gar nicht vom Immunsystem erkannt werden. Unter Entartung versteht man vielschichtige Mechanismen, die oftmals schrittweise auftreten und schließlich zur Krebserkrankung führen. In der Regel kommt es zu unbegrenztem Zellwachstum. Zellen werden apoptoseresistent. Das Tumorsystem bildet eigene Wachstumsfaktoren, während es insensitiv gegenüber hemmenden Signalen ist. Zur Versorgung werden Blutgefäße gebildet. Es kommt zur Infiltration von Nachbargewebe oder sogar zur Bildung von Tochtergeschwulsten, sogenannten Metastasen, außerhalb des Ursprungsgewebes (Hannan and Weinberg, 2011; Chaffer and Weinberg, 2011).

Generell unterscheidet man systemische Krebserkrankungen des blutbildenden oder lymphatischen Systems (Leukämien und Lymphome) von soliden Tumoren, die aus einem festen Gewebeverband heraus entstehen. Hier gibt es wiederum drei Typen. Karzinome haben ihren Ursprung in epithelalem Gewebe, während Sarkome aus Binde- oder Stützgewebe

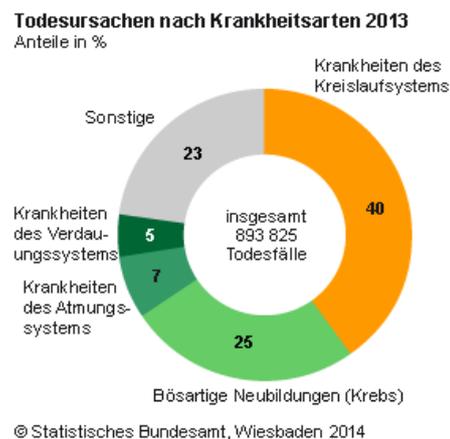


Abbildung 1.1.: Übersicht über Todesursachen in Deutschland 2013. Laut Daten des Statistischen Bundesamtes waren im Jahre 2013 Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache nach Erkrankungen des Kreislaufsystems.

stammen. Blastome hingegen sind embryonale Tumoren, sie treten oftmals im Kindesalter auf. Allgemein steigt die Krebsinzidenz mit fortschreitendem Alter. Im Jahr 2013 waren laut Statistischen Bundesamtes in Deutschland Krebserkrankungen mit einem Anteil von 25 % die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislaufkrankungen (Abb. 1.1). Innerhalb der Krebserkrankungen machen Tumoren der Lunge, der Brust, der Prostata und des Darms mehr als 50 % aller Erkrankungen aus (Abb. 1.2)(KiD, 2013). Die Prognosen der Patienten variieren stark, je nach Krebsart und Krankheitsstadium zum Zeitpunkt der Diagnose.

In der Krebstherapie gibt es drei klassische Behandlungssäulen: die Operation, die Bestrahlung und die Chemotherapie. Die ersten beiden wirken lokal begrenzt, auf mechanischem und physikalischem Wege. Die Chemotherapie wirkt systemisch, was z. B. auch die Behandlung von Metastasen ermöglicht. Um Nebenwirkungen gering zu halten, muss die pharmakologische Behandlung die Tumorzellen über Zellmerkmale angreifen, die möglichst nur das kranke Gewebe betreffen. Da Tumorgewebe körpereigenes Gewebe ist, ist die Suche nach spezifischen Tumoreigenschaften eine Herausforderung. In der klassischen Chemotherapie läuft die Ansteuerung über die oftmals sehr hohe Teilungsrate der Tumorzellen im Vergleich zu gesundem Gewebe. So greifen Chemotherapeutika in Mitoseprozesse ein, wie die DNA-Replikation (Alkylanzien, (Kohn et al., 1987)) oder die Bildung des Spindelapparates (Vinkaalkaloide, (Jordan et al., 1991)). Jedoch gibt es auch physiologisch teilungsaktive Zellen wie Knochenmarkszellen, Haarfollikel oder Schleimhäute des Magen-Darm-Traktes. Hier sind schwerwiegende Nebenwirkungen wie Haarausfall, Anämie und Stomatitis unausweichlich. Ferner sind nicht alle Zellen eines Tumors homogen. So gibt es durchaus chemoresistente Zellen innerhalb von Tumoren, z. B. aufgrund geringerer Teilungsraten (Song et al., 2009) oder aufgrund von Resistenztransportern (Frank et al., 2005). Dies sind Gründe für die Entwicklung weiterer pharmakologischer Therapieansätze. So treten bei einigen Tumorzellen Stoffwechselwege verstärkt auf, die im gesunden Gewebe weniger aktiv sind oder die für die gesunde Zelle nicht essentiell sind. Hier setzen einige Therapien an. Es ist die Hormontherapie bei Brustkrebs zu nennen. Durch Tyrosinkinaseinhibitoren wird die Signaltransduktion gehemmt (Imatinib, (Buchdunger et al., 1996)) und der Proteasomhemmer Bortezomib blockiert die Proteindegradation in den stoffwechselaktiven Tumorzellen (Hideshima et al., 2001).

Vielfältige Möglichkeiten in der Krebstherapie bieten monoklonale Antikörper. Sie sind gegen Epitope auf verschiedenen Antigenen, wie Proteine oder Zucker, gerichtet und mit ihnen werden diverse Wirkungen erzielt. Das Paul-Ehrlich-Institut stellt eine aktuelle Liste mit 46 therapeutischen Antikörpern, die in Deutschland auf dem Markt sind, auf seiner Internetseite zur Verfügung (<http://www.pei.de/DE/arzneimittel/immunglobuline-monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper-node.html>) [Stand: 04.12.2015]. Ein Großteil von diesen ist bei malignen Erkrankungen indiziert. So ist der chimäre Antikörper Rituximab zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen und chro-

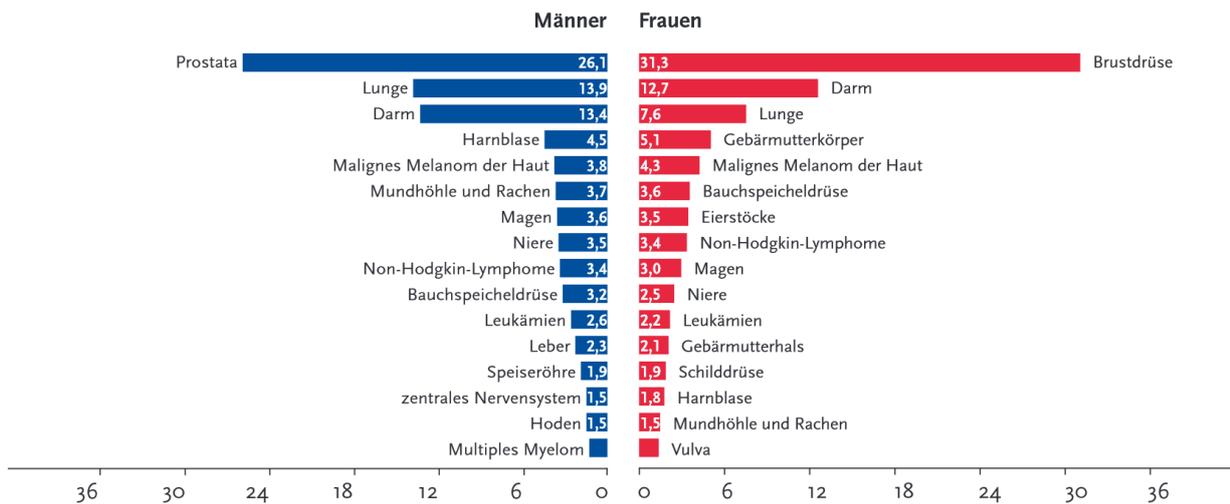


Abbildung 1.2.: „Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010“, Abbildung aus (KiD, 2013)

nischer lymphatischer Leukämie zugelassen. Der Antikörper bindet das Oberflächenantigen CD20. Dies führt zur Aktivierung des körpereigenen Immunsystems, indem über den F_c -Teil komplementabhängige Zytotoxizität (CDC, (Di Gaetano et al., 2003)) sowie antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC, (Cartron et al., 2002)) vermittelt werden. Auch wird bei einigen Zellen durch die Bindung des Rituximabs an das Epitop Apoptose induziert (Roche, 2014). Andere Antikörper verhindern durch die Epitopbindung zelluläre Prozesse wie Signaltransduktion oder Angiogenese. Trastuzumab blockiert durch Bindung des Her2/neu-Rezeptors dessen Signalkaskade, die Wachstums- und Zellteilungssignale vermittelt (Valabrega et al., 2007). Die Gefäßbildung in Tumoren wird durch Sauerstoffmangel und Ausschüttung von vaskulärem endotheliale Wachstumsfaktor induziert. Dieser kann durch Antikörper wie Bevacizumab neutralisiert werden. Die folgende Behinderung der Vaskularisation führt zu einer Unterversorgung des Tumors (Ferrara et al., 2004; Muller et al., 1998). Neben der Ausnutzung dieser intrinsischen Aktivitäten der Immunglobuline gibt es auch Zulassungen für modifizierte Antikörper mit artifiziellen Wirkmechanismen.

Die modifizierten Antikörper sind sehr unterschiedlich aufgebaut. Allen gemein ist jedoch, dass zumindest die variablen Domänen für die Epitopbindung erhalten sind. Im bispezifischen, trifunktionalen Antikörper Catumaxomab werden zwei unterschiedliche variable Domänen kombiniert, so dass mit der einen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (epCAM) an der Krebszelle gebunden wird. Diese wird durch die zweite variable Domäne mit zytotoxischen T-Zellen verbrückt. Der erhaltene F_c -Teil vermittelt weiterhin die $F_{c\gamma}$ -Rezeptor vermittelten Wirkungen, wie die ADCC (Chelius et al., 2010).

Weitere Modifizierungen verfolgen die Nutzung der Antikörper für den zielgerichteten Transport anderer Substanzen zum Tumor. Diese Immunkonjugate werden sowohl mit dem Ziel der Krebsdiagnose als auch für die Therapie eingesetzt. Hierbei handelt es sich um

Antikörper oder deren abgewandelte Formen, die gegen Tumorzellmerkmale gerichtet sind. Diese werden kovalent mit weiteren funktionalen Molekülen, wie radioaktiven oder zytotoxischen Substanzen, verbunden, so dass es zu einem zielgerichteten Transport der Substanzen zum Tumorgewebe kommt. In Deutschland zugelassene Arzneimittel sind der mit radioaktivem Yttrium beladene CD20-Antikörper Ibritumomab-Tiuxetan, ebenso Brentuximab Vedotin und Trastuzumab Emtansin. Bei diesen handelt es sich um CD30- bzw. HER2-Antikörper, die mit den zytotoxischen Substanzen Monomethyl Auristatin E (Younes et al., 2012; Francisco et al., 2003) und dem Maytansinoid DM1 fusioniert vorliegen (Lewis Phillips et al., 2008). Durch die Antikörperfusion wird der Einsatz hochtoxischer Moleküle möglich, die ohne die gerichtete Zelladressierung zu intolerablen Nebenwirkungen führen würden. Liegt ein Antikörper oder Antikörperfragment mit einem Proteintoxin fusioniert vor, wird dieses Konstrukt als Immuntoxin bezeichnet. Ein solches ist in Deutschland noch nicht zugelassen, wenn auch einige dieser Konstrukte in der klinischen Phase der Forschung sind (<http://clinicaltrials.gov>, Stand: 16.10.2015).

1.2. Immuntoxine

Immuntoxine und deren Herstellung sind Thema dieser Arbeit. Die Definition der Immuntoxine als bifunktionale Proteine, bestehend aus einem Antikörper und einem Proteintoxin zur zielgerichteten Therapie, wird in der Regel noch weiter gefasst. So kann die *Targeting*-Einheit neben Antikörperstrukturen und deren Derivaten durchaus auch *Scaffold*-Moleküle sowie Proteinstrukturen beinhalten, durch die eine zielgerichtete Ansteuerung von Tumorzellen ermöglicht wird. Unter diese weiter gefasste Definition fällt beispielsweise das von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene Arzneimittel Denileukin-diftitox. Dieses Immuntoxin beinhaltet die enzymatisch aktiven Sequenzen des Diphterietoxins und Teile des humanen Interleukin-2 für die Zelladressierung (Kiyokawa et al., 1991). Zwar wird das Immuntoxin an alle drei bekannten Arten des IL-2-Rezeptors gebunden, jedoch internalisiert der hoch affine Rezeptor besonders effizient. Er ist hauptsächlich auf den anvisierten Leukämie- und Lymphomzellen und weniger auf den gesunden Zellen zu finden, so dass an diesen Zellen das Toxin seine toxische Wirkung entfaltet (Manoukian and Hagemeyer, 2009; Caligiuri et al., 1990). Dies ist ein Beispiel für die erfolgreiche Anwendung von Immuntoxinen.

Viele weitere Immuntoxine sind in der Pipeline und werden in klinischen Studien getestet. Jedoch sind auch schon einige dieser Konstrukte in der klinischen Phase gescheitert, was an einem unpassenden Verhältnis von unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu positiver Wirkung liegt. Bei den unerwünschten Arzneimittelwirkungen unterscheidet man zwischen unspezifischen und spezifischen. Spezifische sind solche, die auftreten, da das Arzneimittel seine Wirkung nicht nur am gewünschten *Target*, also den Tumorzellen, ausübt, sondern

ebenso an physiologisch vorkommenden Epitopen bindet und dort seine Wirkung entfaltet. Die unspezifischen Nebenwirkungen können durch vielfältige, oftmals unklare Mechanismen entstehen. Bei den Immuntoxinen immer wieder auftretend ist das *Vascular-Leak*-Syndrom, welches auf Schädigung von Gefäßendothel zurückzuführen ist. Dies führt zu Ödemen bis hin zu lebensgefährlichen Organversagen (Baluna et al., 1999). Der Mechanismus ist noch ungeklärt.

Eine geringe Immunogenität der Immuntoxine ist ebenso wichtig (De Groot and Scott, 2007). Je weniger Antikörper während der Behandlung gegen das Immuntoxin gebildet werden, desto länger ist eine wirksame Anwendung am einzelnen Patienten möglich. Besonders von Patienten, deren Immunsystem intakt ist, können während der Behandlung neutralisierende Antikörper gebildet werden. Eine parallele Immunsuppression zur Immuntoxinbehandlung ist zwar möglich, jedoch mit zusätzlichen Nebenwirkungen verbunden und auch nicht zwingend zielführend. Hierzu läuft zur Zeit eine Studie, bei der zur Behandlung von adulter T-Zell-Leukämie das Immuntoxin LMB-2 zusammen mit den immunsuppressiven Zytostatika Cyclophosphamid und Fludarabin verabreicht wird (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00924170). Neben der Entfernung von B- und T-Zellepitopen können Moleküle auch durch PEGylierungen in ihrer Immunogenität modifiziert werden. Mit PEGylierungen kann auch die Pharmakokinetik der Moleküle gesteuert werden (Caliceti and Veronese, 2003). Immuntoxine müssen ausreichend lang im Körper verbleiben, um an die entsprechenden Gewebe zu gelangen und nicht vorzeitig eliminiert zu werden. Sie sollen möglichst spezifisch am Tumor und bestenfalls auch an Metastasen ihre zytotoxische Aktivität entfalten. Die Gewebepenetration ist hier ein weiterer, wichtiger Faktor, damit der Gesamttumor behandelt wird und nicht nur äußere Schichten. Dies bedeutet, dass das Immuntoxin nicht zu groß werden darf und auch, dass das *Targeting*-Modul nicht so hoch affin sein darf, dass es direkt nach Austritt aus den Gefäßen fest bindet, so dass kein Eindringen ins Tumorgewebe stattfindet (Adams et al., 2001).

Bei der Herstellung von Immuntoxinen muss zum einen eine geeignete Kombination aus Toxin und *Targeting*-Einheit gefunden werden. Im Weiteren müssen die beiden Komponenten auf geeignete Weise zu einer Einheit fusioniert werden. In den folgenden Abschnitten werden wichtige Aspekte zu diesen Bereichen dargestellt.

1.2.1. Die Toxineinheit von Immuntoxinen

Toxine, die in Immuntoxinen eingesetzt werden, sind oftmals natürlich vorkommende Toxine aus Pflanzen oder Bakterien. In klinischen Studien befinden sich lt. der Internetseite ClinicalTrials.gov (Stand: 08.10.2015) zur Zeit unter anderem Immuntoxine mit Ricin A (Deglycosylated Ricin A Chain-Conjugated Anti-CD19/Anti-CD22 Immunotoxins, ClinicalTrials.gov Identifier:NCT01408160), Diphtheria Toxin (A-dmDT390-bisFv(UCHT1), Clinical-

Trials.gov Identifier: NCT0061120), Shiga like Toxin A (MT-3724, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02556346) und sehr häufig auch *Pseudomonas* Exotoxin A (MOC31PE, LMB-2, D2C7-IT ClinicalTrials.gov Identifiers: NCT02219893, NCT00924170, NCT02303678). Diese Toxine sind in der Regel für den Einsatz als Toxinkomponente im Fusionskonstrukt modifiziert. Wichtig ist die Entfernung ihrer natürlichen Bindedomäne, um unspezifische Nebenwirkungen durch das Toxin zu vermeiden. Diese wird letztendlich durch die *Targeting*-Komponente im Fusionskonstrukt ersetzt. In Hinsicht auf eine geringe Immunogenität ist neben den schon beschriebenen Möglichkeiten der Epitopentfernung, PEGylierung und Immunsuppression zusätzlich die Suche nach humanen Toxinen eine Option, was zu sogenannten humanisierten Immuntoxinen führt (Mathew and Verma, 2009). Hier werden RNasen oder auch proapoptotische Faktoren als Toxinkomponente getestet.

Das bereits erwähnte *Pseudomonas* Exotoxin (PE) ist eine häufig verwendete Toxinkomponente in Immuntoxinen. Das Volllängenprotein besteht aus 613 Aminosäuren (Gray et al., 1984). Seine Struktur wurde bereits 1986 aufgeklärt (Allured et al., 1986) und konnte später noch genauer dargestellt werden (Wedekind et al., 2001). Das Toxin katalysiert den Transfer eines ADP-Ribose-Restes von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) auf den eukaryotischen Elongationsfaktor 2. Dies führt zur Inhibierung der Proteinsynthese, was die Zelle in die Apoptose und den Zelltod führt. Damit gehört es zur Gruppe der NAD⁺-Diphthamid-ADP-Ribosyltransferasen (EC 2.4.2.36). Die Struktur (Abb. 1.3) weist drei Domänen auf, von denen Domäne I in die zwei sequentiell getrennten, jedoch strukturell benachbarten Teile Ia und Ib unterteilt ist. Domäne Ia ist die natürliche Bindedomäne mit Affinität für LRP-1 (CD91) und LRP-1B (Kounnas et al., 1992), für Domäne Ib ist keine spezifische Funktion bekannt. Domäne II ist für die intrazelluläre Translokation essentiell und Domäne III schließlich ist katalytisch aktiv und vermittelt die zytotoxische Modifikation des Elongationsfaktors (Siegall et al., 1989). Bis heute ist nicht jeder Schritt des Toxins von der Zelloberfläche bis zur Entfaltung der toxischen Aktivität im Cytosol abschließend geklärt. Abbildung 1.4 gibt einen Überblick, soweit der Mechanismus bis heute verstanden ist. Es wird vermutet, dass bereits ein Molekül, welches das Zytoplasma erreicht, zum Zelltod führt. Dabei weist vieles darauf hin, dass weniger als 1 % internalisierter Moleküle den retrograden Transport vollständig durchlaufen (Weldon and Pastan, 2011). Wichtig bei PE als toxischer Komponente in Immuntoxinen ist deren Internalisierung, damit die zytotoxische Aktivität entfaltet werden kann.

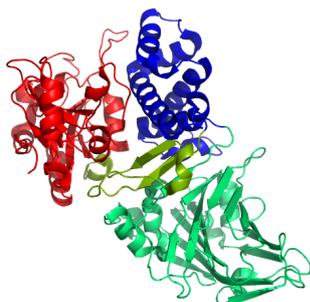


Abbildung 1.3.:

Struktur von *Pseudomonas* Exotoxin. Die Cartoondarstellung zeigt die drei farblich hervorgehobenen strukturellen Domänen des *Pseudomonas* Exotoxins. Domäne I wird sequentiell durch Domäne II (blau) in die beiden Abschnitte Ia (grün) und Ib (gelbgrün) geteilt. Domäne Ia ist die natürliche Bindedomäne, die Funktion von Ib ist nicht geklärt. Die intrazelluläre Translokation wird durch Domäne II vermittelt. Die katalytisch aktive Domäne ist Domäne III (rot). Protein Data Bank code, 1lkq

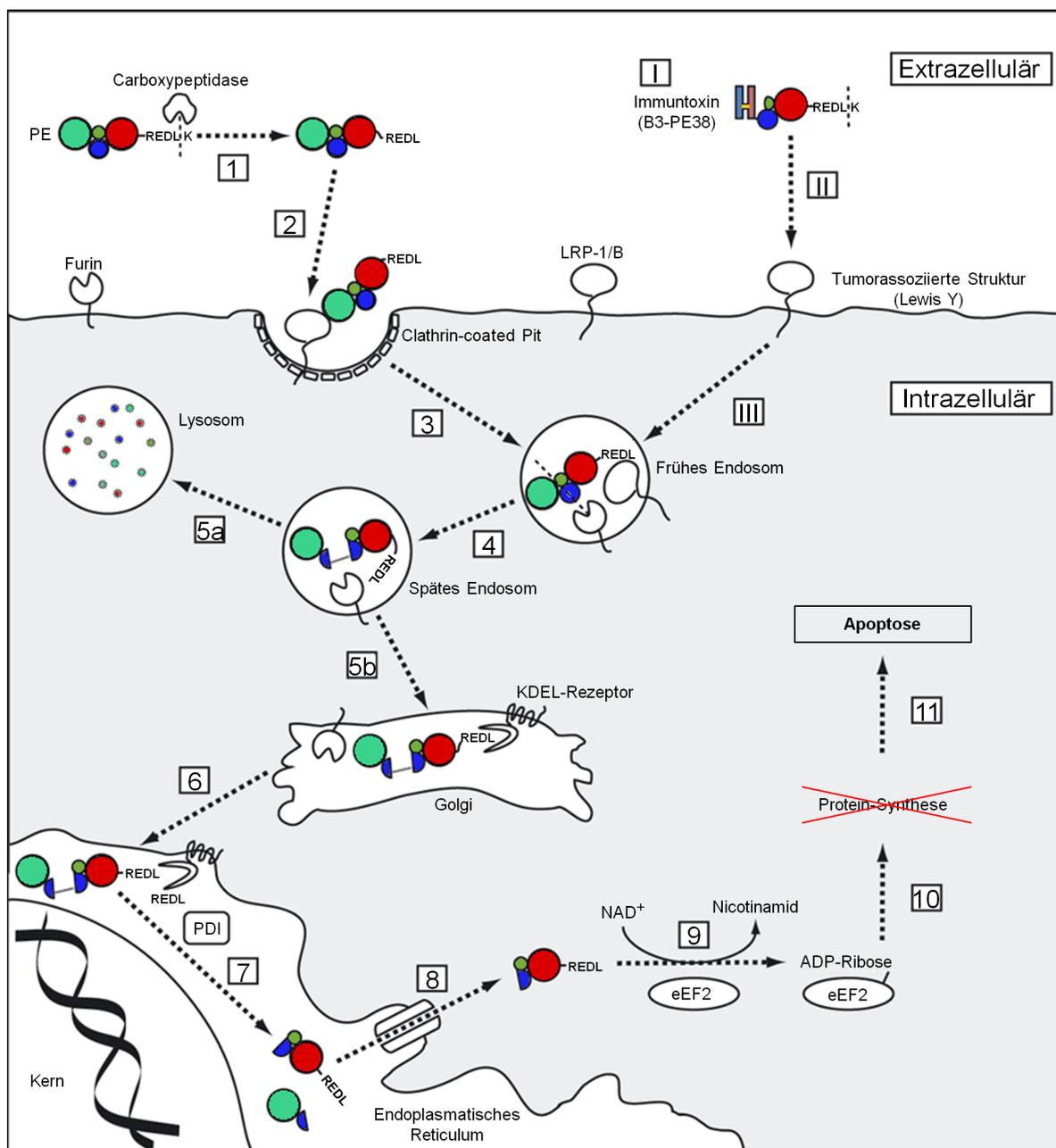


Abbildung 1.4.: Schematische Übersicht über den Wirkmechanismus von *Pseudomonas* Exotoxin. Dargestellt ist der Hauptmechanismus, soweit er aktuell nachvollziehbar ist. Andere vorgeschlagene Wege scheinen eine untergeordnete Rolle zu spielen (Weldon and Pastan, 2011). Zunächst wird das C-terminale Lysin vom Protein abgespalten, wodurch die REDL-Sequenz frei wird. Dieses erfolgt vermutlich durch extrazelluläre Carboxypeptidasen (1). Nach der Bindung über Domäne Ia an LRP-1 oder LRP-1B (2) erfolgt die Internalisierung über *Clathrin-coated Pits* ins frühe Endosom (3). Im Endosom kommt es zur Spaltung von Domäne II (4), wodurch das Toxin in zwei Ketten unterteilt wird, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Ausgehend vom späten Endosom kann es entweder zum lysosomalen Abbau des PE kommen (5a) oder aber es gelangt in den Golgi Apparat (5b). Dort kann es aufgrund der C-terminalen -REDL Sequenz an den KDEL-Rezeptor binden, was den retrograden Transport ins Endoplasmatische Reticulum (ER) ermöglicht (6). Hier erfolgt die Trennung der beiden Ketten durch die Reduktion der Disulfidbrücke durch Protein Disulfid Isomerasen (PDI) (7). Nur der C-terminale Teil des PE, der die katalytisch aktive Domäne III, Domäne Ib sowie Teile von Domäne II beinhaltet, wird ins Cytosol transportiert. Dies könnte über das zum ERAD-System zugehörige Sec61 Translocon erfolgen (8). Im Cytosol schließlich erfolgt die Übertragung des ADP-Ribosyl-Restes von einem NAD^+ auf den Diphthamidrest des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (eEF2) (9). Dadurch wird die Proteinsynthese gestoppt (10), was zur Apoptose führt (11). Abbildung modifiziert aus Weldon and Pastan (2011)

PE38 Für die Anwendung des PE in Immuntoxinen wurden schon viele Varianten erprobt (Abb. 1.5). Nachdem zunächst das Volllängentoxin eingesetzt wurde (FitzGerald et al., 1984), kam recht schnell eine sogenannte PE40-Variante ohne die Bindedomäne Ia zum Einsatz (Chaudhary et al., 1989; Hwang et al., 1987). Über viele Jahre etabliert hat sich das PE38, bei dem zusätzlich noch ein Teil von Ib entfernt wurde ($\Delta 1-250$ und $\Delta 365-380$), wodurch es noch etwas kleiner wird (Siegall et al., 1989). Das resultierende Proteintoxin weist ein Molekulargewicht von 38 kDa auf. Es wurde bereits vielfältig in Immuntoxinen eingesetzt. Zwar ist noch keines dieser Fusionskonstrukte zugelassen, jedoch sind einige in klinischen Studien (s.o.). Ein Problem ist die schon thematisierte Immunogenität. So bildeten z. B. 88 % der behandelten Patienten innerhalb des ersten Behandlungszyklus neutralisierende Antikörper gegen das PE38 enthaltende SS1P (Hassan et al., 2007). Neuere Varianten des PE zielen auf eine Reduktion der Immunogenität ab, einerseits durch eine weitere Verringerung der Proteingröße und andererseits durch die Eliminierung von potentiellen Antikörperepitopen (Weldon et al., 2009; PEP, 2015). Bei der Variante PE(LR) wurden Sequenzen entfernt, die als Substrat lysosomaler Proteasen fungieren, was den intrazellulären Abbau reduziert. Diese Modifikation zeigt zusätzlich eine Reduktion unspezifischer Aktivitäten in Mäusen (Weldon et al., 2009).

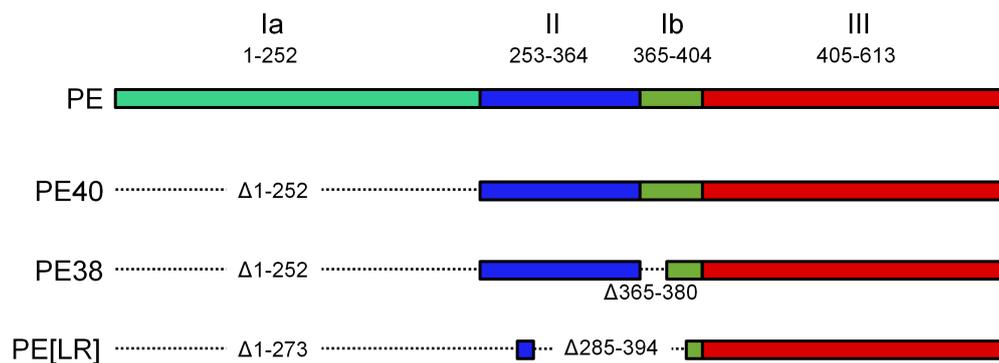


Abbildung 1.5.: Schematische Darstellung der Entwicklung von Pseudomonas Exotoxin A als Toxin-komponente in Immuntoxinen. Zu Anfang wurde das Gesamttoxin (PE) eingesetzt. Um Nebenwirkungen und Immunantworten zu verringern, wurde und wird das Toxin immer weiter auf die Kernfunktionalitäten im Einsatz als Immuntoxin reduziert (PE40 und PE38). Essentiell für die NAD^+ -Diphthamid-ADP-Ribosyltransferase-Aktivität sind Domäne III und der C-terminale Teil von Ib. Bei der LR-Variante wurden schließlich noch Erkennungssequenzen für die lysosmale Degradation in den Domänen II und Ib entfernt. Bei Domäne II bleibt die essentielle Furinerkennungssequenz erhalten. Abbildung modifiziert nach Weldon and Pastan (2011)

In dieser Arbeit kam die PE38 Variante zum Einsatz. In vorklinischen Versuchen führt ihr Einsatz bei erfolgreichem *Targeting* zu eindeutig toxischen Effekten. Ein humaner Einsatz war in dieser Arbeit nicht geplant. Somit war eine weiter optimierte Variante bzgl. der Immunogenität nicht notwendig. Das PE38 wurde in dieser Arbeit analog zur Position der natürlichen Bindedomäne N-terminal mit den *Targeting*-Komponenten dsFvB3 (Abschnitt 1.2.2, S. 9) oder mit $[\text{F}^7, \text{P}^{34}]\text{NPY}$ (Abschnitt 1.2.2, S. 10) fusioniert. Hierzu wurde der N-

Terminus von PE38 um ein negativ geladenes Fusionspeptid erweitert (Abschnitt 1.2.3, S. 12).

1.2.2. Die *Targeting*-Komponente in Immuntoxinen

Die *Targeting*-Komponente eines Immuntoxins vermittelt die Spezifität seiner toxischen *Payload*. Bei der Auswahl ist somit zunächst eine geeignete Zielstruktur für das Tumorgewebe wichtig. Es kommen neben tumorspezifischen Antikörperepitopen auch Rezeptoren in Frage, die mittels ihrer Liganden angesteuert werden können. Vorteilhaft für die Gewebepenetration sind sowohl eine kleine Größe der *Targeting*-Komponente als auch eine spezifische Affinität für die Zielstruktur. Eine geringe Immunogenität ist ebenso wichtig. Bei natürlichen Liganden sollte die Immunogenität unproblematisch sein und bei Antikörperformen sind humane oder humanisierte Sequenzen vorteilhaft. Auch in Immuntoxinen kann mit bispezifischen Antikörpern gearbeitet werden. Dies führt zu sogenannten bispezifischen Immuntoxinen, was die Selektivität von Immuntoxinen noch erhöhen kann.

In dieser Arbeit wurden zwei sehr unterschiedliche *Targeting*-Komponenten eingesetzt, die im Folgenden vorgestellt werden. Es handelt sich um das Antikörperfragment dsFvB3 und um die Variante [F⁷, P³⁴]NPY des Peptidhormons Neuropeptid Y (NPY).

dsFvB3 Der murine Antikörper B3 (Pastan et al., 1991) bindet das blutgruppenverwandte Antigen Lewis^Y, ein Tetrasaccharid, das auf bis zu 70 % aller Karzinome, also epithelialen Tumorzellen, exprimiert wird (Schuster et al., 2005; Yin et al., 1996). Physiologisch wird dieses auch auf Epithelzellen des Gastro-Intestinal-Trakts präsentiert (Sakamoto et al., 1989). Zur Anwendung in Immuntoxinen wurde der B3-Antikörper auf die kleinste funktionelle Einheit für die spezifische Bindung, das Fv Fragment FvB3, reduziert (Abb. 1.6). Die entsprechenden Anteile an schwerer und leichter Kette wurden zunächst kovalent über eine *Linker*-Sequenz verknüpft und die variable Domäne als *single chain* hergestellt (scFvB3, (Brinkmann et al., 1991)). Eine bessere Stabilität bei 37 °C wird jedoch durch die separate Herstellung der beiden Ketten und eine Disulfidverbrückung über eingefügte Cysteine hergestellt (dsFvB3, (Brinkmann et al., 1993)). Beide Varianten wurden erfolgreich in Immuntoxinen als *Targeting*-Komponenten eingesetzt. So ist LMB-7 ein Immuntoxin aus scFvB3 und PE38, wohingegen LMB-9 aus dsFvB3 und PE38 zusammengesetzt ist. Die Fusionierung von *Targeting*- und Toxinkomponente erfolgte auf genetischer Ebene.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls mit einem Fusionskonstrukt aus dsFvB3 und PE38 gearbeitet. Die Fusionierung erfolgte jedoch posttranslational über polyionische Fusionspeptide (Abschnitt 1.2.3, S. 12). Die schwere Kette des dsFvB3 wurde mit einem C-terminal lokalisierten, positiv geladenen Fusionspeptid hergestellt und wurde hierüber mit PE38 (Abschnitt 1.2.1, S. 8) fusioniert.

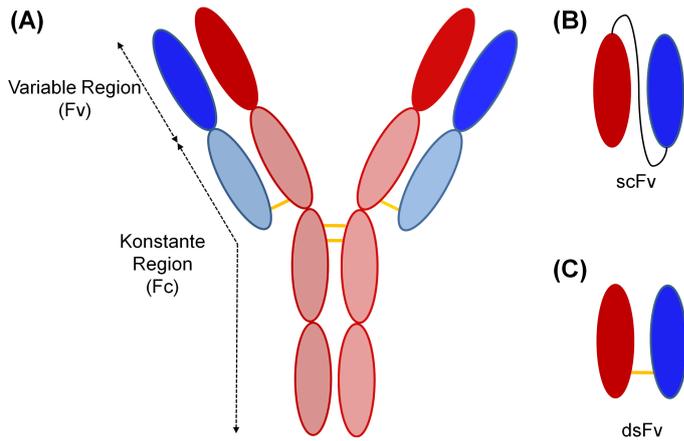


Abbildung 1.6.:

Der Antikörper B3 als *Targeting*-Komponente in Immuntoxinen. In erster Generation wurde das murine Immunglobulin G gegen das Lewis^Y-Antigen (B3 Antikörper) in voller Länge eingesetzt (Pai et al., 1996) (A). Es folgte die Reduktion auf den Fv Teil. Zur Stabilisierung wurden die beiden Ketten zunächst über einen (G₄S)₃-Linker (schwarz) verknüpft und als *Single-chain*-Konstrukt (scFv) hergestellt (Brinkmann et al., 1991) (B). Später stellte sich eine Disulfidbrücke (gelb) zwischen artifiziell eingeführten Cysteinen als bessere Stabilisierungsmaßnahme heraus (dsFv) (Brinkmann et al., 1993) (C).

[F⁷, P³⁴]NPY Während der Antikörper B3 und seine Derivate schon vielfältig in Immuntoxinen erprobt sind, wird eine Variante des Neuropeptid Y (NPY), bezeichnet als [F⁷, P³⁴]NPY, in dieser Arbeit erstmalig als *Targeting*-Komponente eingesetzt. NPY gehört zusammen mit dem Peptid YY (PYY) und dem pankreatischen Polypeptid (PP) zur NPY-Familie (Larhammar, 1996). Sie bestehen jeweils aus 36 Aminosäuren mit einem amidierten C-Terminus und aktivieren sogenannte Y-Rezeptoren (Michel et al., 1998). Die Affinitäten zu diesen G-proteingekoppelten Rezeptoren, von denen im Menschen die Subtypen hY₁R, hY₂R, hY₄R und hY₅R nachgewiesen sind, variieren zwischen den Peptiden. NPY und PYY aktivieren hauptsächlich hY₁R, hY₂R und hY₅ (Lindner et al., 2008), während hY₄R primär durch PP aktiviert wird (Lundell et al., 1995). Alle vier Rezeptorsubtypen können nach Aktivierung durch Peptide der NPY Familie internalisiert werden (Böhme et al., 2008). Auch konnten für kleinere *Payloads*, wie ¹¹¹In-labeled 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (Zwanziger et al., 2008) oder Carababoran *Cluster* (Ahrens et al., 2011, 2015), die kovalent über die Seitenkette des Lysins an Position vier im NPY eingeführt wurden, eine Internalisierung gezeigt werden. Der humane Y₁Rezeptor (hY₁R) wird in verschiedenen epithelialen, endokrinen und embryonalen Tumoren überexprimiert (Körner and Reubi, 2007). Besonders ist seine Inzidenz von 85 % in Brustkrebstumoren und entsprechenden Metastasen der Lymphe. Dort ist er in hoher Dichte über den gesamten Tumor gleichmäßig verteilt zu finden. Im gesunden Gewebe ist der hY₁R nicht nachzuweisen. Hier dominiert hY₂R (Reubi et al., 2001).

Das in dieser Arbeit eingesetzte [F⁷, P³⁴]NPY basiert auf porcinem NPY (pNPY) (Abb. 1.7). Die Aminosäuren 13–36 des pNPY bilden eine amphipathische α -Helix (Monks et al., 1996). Mit der Einführung des Prolins an Position 34 (Q34P) wird die Affinität an hY₂R gemindert (Fuhlendorff et al., 1990), der weitere Austausch an Position 7 (N7F) ist für die reduzierte Affinität an hY₅R verantwortlich (Söll et al., 2001). Somit bindet [F⁷, P³⁴]NPY mit einem K_I von 0,009 nM sehr selektiv hY₁R, während es zu den beiden anderen Rezeptor-

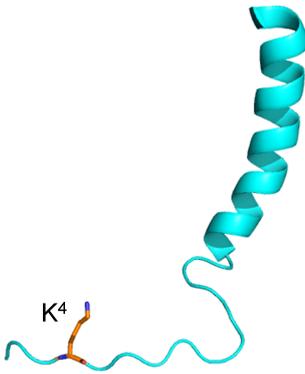


Abbildung 1.7.:

Kristallstruktur des porcinen Neuropeptides Y (pNPY). Gezeigt wird pNPY in Cartoondarstellung (cyan) sowie die Seitenkette von Lysin 4 in Stabdarstellung (orange). Über diese Seitenkette erfolgte die orthogonale Modifikation mit polyionischen Fusionspeptiden. Protein Data Bank Code: 1F8P

subtypen mit $K_I = 32$ nM (hY_2R) und $K_I = 34$ nM (hY_5R) um mehrere Größenordnungen weniger affin ist (Söll et al., 2001). Die Aktivierung des hY_1R durch $[F^7, P^{34}]NPY$ führt zur Internalisierung der Rezeptoren. Diese Tatsachen machen $[F^7, P^{34}]NPY$ zu einer möglichen *Targeting*-Komponente in Immuntoxinen, die hY_1R überexprimierende Brustkrebstumoren adressieren sollen. Zusätzlich ist die Peptidstruktur des $[F^7, P^{34}]NPY$ von Vorteil. Die Herstellung kann synthetisch erfolgen, was verschiedenste Modifikationen ermöglicht. Auch zeigen kleine Peptide generell eine gute Gewebepenetration und ihre Antigenität ist eher gering (Reubi, 2003). Die oftmals geringe Halbwertszeit von Peptiden konnte für $[F^7, P^{34}]NPY$ in Blutplasma nicht bestätigt werden. Im Vergleich zu NPY mit 25 h zeigte $[F^7, P^{34}]NPY$ eine Halbwertszeit von 40–50 h (Khan et al., 2007).

$[F^7, P^{34}]NPY$ wurde über die Seitenkette des Lysin an Position vier in dieser Arbeit mit polyionischen Fusionspeptiden (Abschnitt 1.2.3, S. 12) während der chemischen Synthese gekoppelt.

1.2.3. Die Fusionierung von *Targeting*-Komponente und Toxineinheit zum Immuntoxin

Die Fusionierung von Toxineinheit und *Targeting*-Komponente zum funktionellen Immuntoxin ist ein wichtiger Vorgang. Bei beiden Einheiten müssen die Funktionalitäten erhalten bleiben, es sollte ein homogenes Produkt entstehen mit einheitlichen Eigenschaften. Auch sollte die Herstellung kostengünstig und effizient erfolgen.

In der Praxis werden Immuntoxine oftmals genetisch fusioniert. Hier besteht die Gefahr der unlöslichen Expression, da das Gesamtkonstrukt größer als seine Einzelkomponenten ist. Auch kann eine Einheit die Faltung des anderen Teils ungünstig beeinflussen. Ist jedoch das Herstellungsprotokoll erst einmal erstellt, werden einheitliche Produkte erzielt.

Eine zweite Lösung ist die Herstellung der Einzelkomponenten und ihre anschließende Fusionierung in vitro. Eine chemische Fusionierung führt oftmals zu uneinheitlichen Koppelungsprodukten. Daher wird an spezifischen Fusionstechnologien geforscht. Diese reichen von der Anwendung von Enzymen (Kornberger and Skerra, 2013; Levary et al., 2011) über

Proteinsplicing (Thiel et al., 2014) bis hin zur Ausnutzung hoch affiner *Tags*, wie *Coiled-coil*-Strukturen (Arndt et al., 2001). Hier liegt der Vorteil in der modularen Anwendbarkeit.

Polyionische Fusionspeptide In den letzten Jahren wurde an einer sehr simplen und effizienten Methode der Fusionierung über ionische Wechselwirkungen mit anschließender Ausbildung einer Disulfidbrücke geforscht. Hierzu werden die beiden Zielproteine mit sogenannten polyionischen Fusionspeptiden hergestellt, die eine gerichtete Heterodimerisierung ermöglichen. Klassischerweise bestehen die Fusionspeptide aus acht geladenen Aminosäuren und einem Cystein (Richter et al., 2001; Stubenrauch et al., 2001; Kleinschmidt et al., 2003; Bergelt et al., 2009). Während eines der beiden zu fusionierenden Proteine mit einem in der Regel aus Argininen bestehenden positiv geladenen Fusionspeptid ausgestattet wird, erhält das zweite Protein eine negativ geladene Glutamatsequenz, selten auch eine Aspartatsequenz. Aufgrund elektrostatischer Anziehung in Puffersystemen mit geringer Ionenstärke erfolgt eine heterodimere Assoziation der Reaktionspartner. Dadurch werden die Cysteine innerhalb der Fusionspeptide räumlich angenähert und eine Oxidation führt zur kovalenten Fusionierung der beiden Proteine. Diese kann durch kupferkatalysierte Luftoxidation oder auch durch den Zusatz redoxaktiver Substanzen wie Glutathion erfolgen (Bergelt et al., 2009; Stubenrauch et al., 2001) (Abb. 1.8). Mit dieser Technologie wird das Heterodimer bei einem Einsatz der Monomere in Konzentrationen im niedrigen mikromolaren Bereich mit Ausbeuten von bis zu 80 % gewonnen (Kleinschmidt et al., 2003; Bergelt et al., 2009).

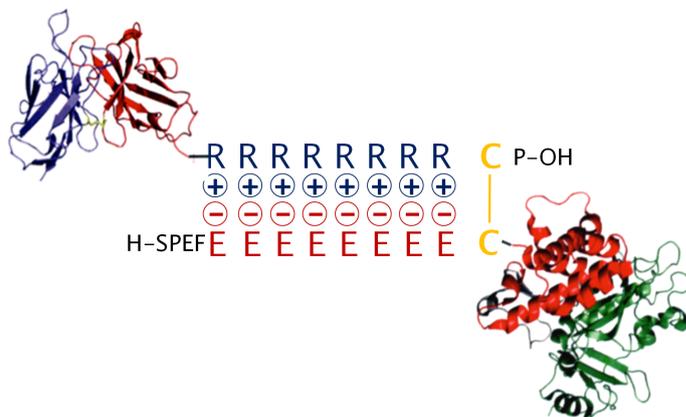


Abbildung 1.8.:

Schematische Darstellung des Aufbaus klassischer polyionischer Fusionspeptide am Beispiel des Immuntoxins B3-PE38. Ein Fusionspartner wird mit einem achtfach positiv geladenen und cysteinenthaltenden Fusionspeptid (blau) versehen. Hier ist es das Antikörperfragment dsFvB3. Der zweite Partner, hier PE38, wird mit dem negativ geladenen Gegenstück fusioniert (rot). Durch elektrostatische Anziehung der entgegengesetzten Ladungen erfolgt eine Heterodimerisierung und anschließend eine Oxidation der Cysteinreste zur kovalenten Disulfidbrücke (gelb)

Die Fusionspeptide wurden bereits sehr variabel an verschiedenen Proteinen angeordnet. Sie wurden N- und C-terminal (Kleinschmidt et al., 2003) sowie innerhalb einer *Loop*-Region (Stubenrauch et al., 2001) exprimiert. Gearbeitet wurde bislang vor allem mit verschiedenen *Payload*-Proteinen, wie Listeriolysin O (Bergelt et al., 2009), Granzym B (Kurschus et al., 2004), virusähnlichen Partikeln (Stubenrauch et al., 2001), Fluoreszenzproteinen (Frost, 2009) oder auch Pseudomonas Exotoxin (Kleinschmidt et al., 2003; Frost, 2009). Als *Targeting*-Komponente kam bislang CD4 (Jäger, 2005), häufiger dsFvB3 (Stubenrauch et al.,

2001; Kleinschmidt et al., 2003; Frost, 2009) zum Einsatz. Eine Übersicht von Proteinen, die mit den klassischen polyionischen Fusionspeptiden hergestellt worden sind, findet sich in Tabelle 1.1. Die Funktionalitäten aller Proteine blieben auch mit den polyionischen Fusionspeptiden erhalten (Lilie et al., 2013). Zusätzlich zu den üblichen Reinigungsprotokollen der einzelnen Proteine ermöglichen die Fusionspeptide eine sehr effiziente Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie.

Tabelle 1.1.: Anwendung polyionischer Fusionspeptide zur Herstellung chimärer Proteine

Protein	Funktion	Peptid	Lokalisation	Quelle
CD4	<i>Targeting</i>	-R ₈ C	C-Terminus	Jäger (2005)
dsFvB3	<i>Targeting</i>	-R ₈ C	C-Terminus	Stubenrauch et al. (2001); Kleinschmidt et al. (2003); Kurschus et al. (2004); Bergelt et al. (2009); Frost (2009)
Listeriolysin O	<i>Payload</i>	E ₈ C-	N-Terminus	Bergelt et al. (2009)
Granzym B	<i>Payload</i>	-CD ₈	C-Terminus	Kurschus et al. (2004)
PE	<i>Payload</i>	E ₈ C-	N-Terminus	Kleinschmidt et al. (2003); Frost (2009)
Virusähnliche Partikel	<i>Payload</i>	-E ₈ C-	<i>loop</i>	Stubenrauch et al. (2001); Jäger (2005)

1.3. Problemstellung der Arbeit

Bislang haben sich die polyionischen Fusionspeptide für die Suche nach neuen Kombinationen von *Targeting*-Komponente und *Payload* insbesondere für bifunktionale Immuntoxine als praktikabel erwiesen. Sie lassen sich problemlos an verschiedenen Positionen in Proteine einführen, ermöglichen einfache Reinigungsprotokolle und hohe Heterodimerisierungsraten.

Bezüglich ihrer biologischen Funktionalität wurde am Beispiel des Immuntoxins B3-PE38 die Vergleichbarkeit mit seinen genetisch fusionierten Analoga LMB-7 und LMB-9 in vitro nachgewiesen (Kleinschmidt et al., 2003; Frost, 2009). Diese Vergleichbarkeit war in vivo jedoch nicht mehr gegeben. Im Mausmodell mit einem Xenograft-Tumor fehlte beim polyionisch fusionierten B3-PE38 die Wirkung, während mit LMB-7 eine Tumorregression erzielt wurde (Frost, 2009). Verschiedene In-vitro-Versuche, die den Unterschied am lebenden Organismus erfassen sollten, waren nicht erfolgreich. So interagiert B3-PE38 weder mit Plasmaproteinen noch scheint die Passage des Gefäßendothels problematisch zu sein (Fleischer, 2010). Auch die Diffusion in dreidimensionale Strukturen und die dortige Toxizität sind gewährleistet (Poenick et al., 2014).

Obwohl kein konkreter Vorgang nachweisbar ist, der auf die fehlende Wirkung des über die klassischen polyionischen Fusionspeptide hergestellten Immuntoxins B3-PE38 in der Maus

Hinweise gibt, so liegt dennoch die Hypothese nah, dass an unbekannter Stelle oder auch an verschiedenen Stellen im Organismus die polyionischen Peptide Grund für die fehlende Wirksamkeit am Tumor sind. Denn sie sind der einzige Unterschied zwischen B3-PE38 und der genetisch fusionierten Variante. Um die polyionischen Fusionspeptide für die Suche nach neuen Proteinkombinationen einzusetzen, wäre es wünschenswert, dass sie für Versuche der gesamten präklinischen Phase eingesetzt werden können. Diese beinhaltet neben In-vitro-Versuchen auch Tierversuche. Um auch die In-vivo-Versuche zu ermöglichen, soll die polyionische Fusionstechnologie in dieser Arbeit weiterentwickelt werden. Zwei Ansätze wurden in Betracht gezogen. Eine Option war die Verkürzung der polyionischen Sequenzen. Als zweiter Ansatz wurde durch die Einführung einer Thrombinschnittstelle zwischen Cystein und ionischer Sequenz die Entfernung der gesamten ionischen Sequenzen nach erfolgter kovalenter Verbindung der beiden Proteine ermöglicht. Eine schematische Darstellung der ursprünglichen, klassischen Fusionspeptide findet sich in Abb. 1.8. Die in dieser Arbeit eingeführten spaltbaren Fusionspeptide werden in Abbildung 1.9 dargestellt.

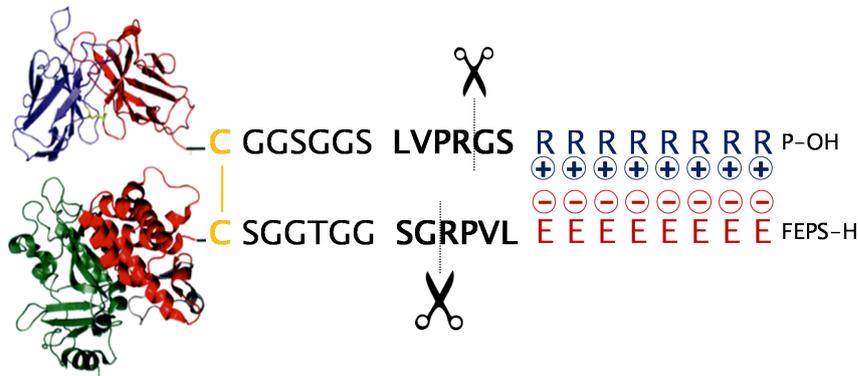


Abbildung 1.9.: Schematische Darstellung des Aufbaus spaltbarer polyionischer Fusionspeptide am Beispiel des Immuntoxins B3-PE38_{CX}. N-terminal lokalisiert, wie hier beim PE38 (unterer Teil), beginnen die polyionischen Fusionspeptide zunächst mit der geladenen Sequenz (rot), gefolgt von der Thrombinschnittstelle (**schwarz**). Zwischen dieser und dem Cystein (orange) ist eine *Linker*-Sequenz eingeschoben (schwarz). Danach folgt die Proteinsequenz. Die Reihenfolge ist umgekehrt, wenn das Fusionspeptid C-terminal angebracht ist, wie beim dsFvB3 (oberer Teil). Direkt an das Protein schließt sich das Cystein (orange) an. Es folgen *linker* (schwarz) und Thrombinschnittstelle (**schwarz**). Abschließend folgt die geladene Sequenz (blau).

Konkret wurde für die Weiterentwicklung der polyionischen Fusionspeptide weiterhin mit dsFvB3 und PE38 als Komponenten für das nun als B3-PE38_{CX} bezeichnete, spaltbare Immuntoxin verwendet. Die Analytik dieses Immuntoxins erfolgte im Vergleich zu bestehenden Daten von B3-PE38 und auch LMB-7 und LMB-9.

Es sollte jedoch auch die Modularität der spaltbaren Fusionspeptide in dieser Arbeit nachvollzogen werden. Dazu wurde die *Targeting*-Komponente dsFvB3 durch die hY₁R-spezifische NPY-Variante [F⁷, P³⁴]NPY ausgetauscht. Das Immuntoxin aus [F⁷, P³⁴]NPY und PE38 wurde mit beiden Fusionspeptiden, den klassischen ([F⁷, P³⁴]NPY-PE38) und den spaltbaren ([F⁷, P³⁴]NPY-PE38_{CX}), hergestellt, die biologische Aktivität in Zellkultur

vermessen und die Ergebnisse untereinander verglichen.

Zur Überprüfung der Option der Verkürzung der polyionischen Sequenzen wurde die Längenabhängigkeit der Assoziation der polyionischen Fusionspeptide biophysikalisch untersucht. Es wurden Fusionspeptide mit sechs, acht und zehn geladenen Aminosäuren eingesetzt. Als Fusionspartner wurde mit nicht toxischen Proteinen gearbeitet. Bei diesen handelt es sich um eine blau fluoreszierende Variante des *superfolder*-GFP, das sfBFP (Pedelacq et al., 2006), welche C-terminal mit den unterschiedlich langen negativ geladenen Fusionspeptiden hergestellt wurde. Als Kopplungspartner kam Maltosebindeprotein mit den positiven Fusionspeptiden, ebenfalls C-terminal positioniert, zum Einsatz.

Zusammengefasst sollten in dieser Arbeit die Kopplungseigenschaften der spaltbaren Fusionspeptide analysiert, die Anwendbarkeit der mit ihnen fusionierten Immuntoxine gezeigt und ihre Modularität nachvollzogen werden.

1.3.1. Übersicht der in dieser Arbeit eingesetzten Proteine

Tabelle 1.2.: Darstellung der Monomere mit einem klassischen Fusionspeptid und ihrer Fusionsprodukte. Die klassischen Fusionspeptide bestehen aus einer Sequenz von acht gleichen, geladenen Aminosäuren (Aminosäure im Einbuchstabencode mit Kennzeichnung der Anzahl 8) und einem benachbarten Cystein (C). Um proteolytischen Abbau einzuschränken, schließen die C-terminal lokalisierten Peptide in der Regel mit einem ergänzenden Prolin ab.

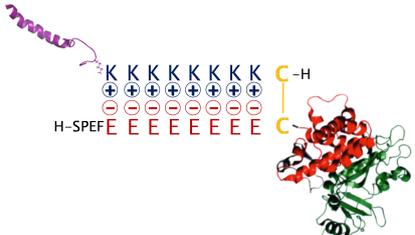
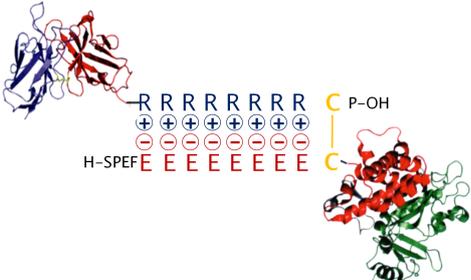
Bezeichnung	Schema des Konstruktes	Beschreibung
CK ₈ -[F ⁷ , P ³⁴]NPY		[F ⁷ , P ³⁴]NPY mit klassischem Lysinpeptid am K ⁴
E ₈ C-PE38		PE38 mit klassischem Glutamatpeptid, N-terminal
[F ⁷ , P ³⁴]NPY-PE38		Fusionskonstrukt aus CK ₈ -[F ⁷ , P ³⁴]NPY und E ₈ C-PE38
B3-PE38		Fusionskonstrukt aus dsFvB3 und E ₈ C-PE38, wurde für diese Arbeit nicht hergestellt, jedoch oft zitiert

Tabelle 1.3.: Darstellung der Monomere mit spaltbaren Fusionspeptiden. Die spaltbaren Fusionspeptide beinhalten eine Sequenz jeweils gleicher, geladener Aminosäuren (Einbuchstabencode der Aminosäure), eine Thrombinerkennungssequenz mit einem neutralen *linker* (in der Bezeichnung als x gekennzeichnet) und ein Cystein (C). Die Anzahl geladener Aminosäuren im Peptid ist tiefgestellt gekennzeichnet (6, 8, 10). Das „n“ als Index umfasst das benannte Protein mit der Sechser-, Achter-, und Zehnersequenz.

Bezeichnung	Schema des Konstruktes	Beschreibung
$K_8xC-[F^7, P^{34}]NPY$		$[F^7, P^{34}]NPY$ mit spaltbarem Lysinpeptid am K^4
B3-CxR ₈		dsFvB3 mit spaltbarem Argininpeptid am C-Terminus der schweren Kette
B3(V _H)-CxR ₈		schwere Kette des B3-CxR ₈
B3(V _H)-C		schwere Kette mit gespaltenem Fusionspeptid
$E_8xC-PE38$		PE38 mit spaltbarem Glutamatpeptid, N-terminal
C-PE38		PE38 mit gespaltenem Fusionspeptid
MBP-CxR _n		MBP mit spaltbarem Argininpeptid, C-terminal. Es gibt Varianten mit $n = 6, 8, 10$
MBP-C		MBP mit gespaltenem Fusionspeptid
sfBFP-CxE _n		sfBFP mit spaltbarem Glutamatpeptid, C-terminal. Es gibt Varianten mit $n = 6, 8, 10$
sfBFP-C		sfBFP mit gespaltenem Fusionspeptid

Tabelle 1.4.: Darstellung der Heterodimere, die über spaltbare Fusionspeptide hergestellt wurden

Bezeichnung	Schema des Konstruktes	Beschreibung
$[F^7, P^{34}]NPY-PE38_{CX}$		Fusionskonstrukt aus $K_8xC-[F^7, P^{34}]NPY$ und $E_8xC-PE38$ mit vollständigen Fusionspeptiden
$[F^7, P^{34}]NPY-PE38_C$		mit gespaltenen Fusionspeptiden
$B3-PE38_{CX}$		Fusionskonstrukt aus $B3-CxR_8$ und $E_8xC-PE38$ mit vollständigen Fusionspeptiden
$B3-PE38_C$		mit gespaltenen Fusionspeptiden
$MBP-sfBFP_{CX}$		Fusionskonstrukt aus $MBP-CxR_n$ und $sfBFP-CxE_n$ mit vollständigen Fusionspeptiden

2. Material und Methoden

2.1. Material

In folgenden Tabellen wird das zur Anfertigung dieser Arbeit verwendete Material aufgelistet, wie Chemikalien, Reagenzien, Lösungen und Geräte. Chemikalien wurden, falls nicht anders erwähnt, im Reinheitsgrad „zur Analyse“ eingesetzt.

Tabelle 2.1.: Chemikalienliste

Substanz	Bezugsquelle
2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol (Tris)	MP Biomedicals Deutschland GmbH, Eschwege
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, München
Aceton	KMF Laborchemie GmbH, Lohmar
Acetonitril	VWR, Darmstadt
Acrylamid-Bisacrylamid stock solution (37,5:1), 30 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agar-Agar, Kobe 1, pulverisiert	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ameisensäure, 98 - 100 %	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V	AppliChem, Darmstadt
Chloramphenicol	AppliChem, Darmstadt
Coomassie Brilliantblau G 250	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, München
Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT _{red})	MP Biomedicals Deutschland GmbH, Eschwege
Essigsäure, 96 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol, 96 %	KMF Laborchemie GmbH, Lohmar
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege
Formaldehyd Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, München
Glucose Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glutathion, oxidiert (GSSG)	AppliChem, Darmstadt
Glutathion, reduziert (GSH)	AppliChem, Darmstadt
Glycerol	Chemie-Vertrieb, Magdeburg
Guanidiniumhydrochlorid (GdmHCl)	NIGU Chemie GmbH, Waldkraiburg
Hefeextrakt, pulverisiert	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Fortsetzung von Tabelle 2.1, Chemikalienliste

Substanz	Bezugsquelle
Imidazol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem, Darmstadt
Isopropylalkohol	VWR, Darmstadt
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	AppliChem, Darmstadt
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
L-Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
L-Arginin	Ajinomoto, Japan
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure(MES)	Sigma-Aldrich GmbH, München
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat (NaDOC)	Berlin-Chemie, Berlin
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat Pentahydrat	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Protaminsulfatsalz aus Lachs	Sigma-Aldrich GmbH, München
Salzsäure, 37 %	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP)	Merck, Darmstadt
Trans-4,5,-Dihydroxy-1,2-Dithian (DTT _{ox})	Sigma-Aldrich GmbH, München
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt

Tabelle 2.2.: Liste verwendeter Enzyme und Standards

Enzym/Standard	Bezugsquelle
Alkaline Phosphatase	Thermo Scientific, vormals Fermentas
Benzonase ®	Merck, Darmstadt
Lysozym	Merck, Darmstadt
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, vormals Fermentas
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten, EDTA-frei	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Thermo Scientific, vormals Fermentas
<i>EcoRI</i> , fast digest	
<i>NdeI</i> , fast digest	
<i>BamHI</i> , fast digest	
<i>Acc65I</i> , fast digest	
<i>Bsp119I (BstBI)</i> , fast digest	
<i>HindIII</i> , fast digest	
<i>NheI</i> , fast digest	
<i>XhoI</i> , fast digest	
SUMO Protease (0.16 µg/ml)	AG Dr. Hanner, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
T4 DNA Ligase (5 U/µl)	Thermo Scientific, vormals Fermentas
T4 Polynucleotid Kinase	Thermo Scientific, vormals Fermentas
Thrombin from bovine plasma, 50 NIH-U/mg for Biochemistry	Merck, Darmstadt
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific, vormals Fermentas

Tabelle 2.3.: Verbrauchsmaterial

Material	Bezugsquelle
Amicon Ultra Centrifugal Filters (4 und 15 ml, MWCO 3 und 10 kDa)	Merck Millipore, Darmstadt
BD® Plastipak® Einmalspritzen (5 und 50 ml)	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg
Kryogefäße (1,2 ml)	TPP, Schweiz
Dialysemembran Spectra/Por®7 MWCO 1 kDa	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dialysemembran Spectra/Por® MWCO 6–8 kDa	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Parafilm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	VWR International GmbH, Darmstadt, vormals PEQLAB Biotechnologie GmbH
peqGOLD Gel Extraction Kit	VWR International GmbH, Darmstadt, vormals PEQLAB Biotechnologie GmbH
Pipettenspitzen (0,1–10; 2–200; 50–1000; 1000–5000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Polypropylene tubes with screw closure (15 und 50 ml)	TPP, Schweiz
Safe-lock tubes (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten (1, 2, 5, 10, 25 ml)	TPP, Schweiz
Spectra/Por®Clips	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Universalindikatorpapier, pH 1–11	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Zellkulturflaschen (25 und 75 cm ²)	TPP, Schweiz
ZipTip C ₄	Millipore, Schwalbach

Tabelle 2.4.: Bakterien und Humane Zelllinien

Tabelle 2.4 Teil 1: Bakterien

Bakterienstamm	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	Stratagene, Heidelberg
Genotyp: <i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Cam</i> ^r]	
<i>E. coli</i> XL1 blue	Stratagene, Heidelberg
Genotyp: <i>E. coli</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac</i> ^r ZΔ <i>M15 Tn10</i> Tet ^r]	

Tabelle 2.4 Teil 2: Humane Zelllinien

Zelllinie	ATCC number
HEK-293 humane embryonale Nierenzelllinie kultiviert in DMEM/Hams F12 mit Zusatz von 15 % FBS, 1 % stabiles Glutamin and 1 % AB/AM zur Verfügung gestellt von AG Prof. Dr. A. G. Beck-Sickinger, Universität Leipzig	CRL-1573
MCF7 humane Brustkrebszelllinie kultiviert in RPMI Medium mit Zusatz von 10 % FBS, 1 % stabiles Glutamin und 1 % AB/AM	HTB-22
SK-N-MC humane Neuroblastomzelllinie kultiviert in Minimum Essential Medium (MEM) mit Zusatz von 10 % FBS, 2 % stabiles Glutamin, 0,2 % nicht-essentielle Aminosäuren (100fache Stammlösung), 1 mM Natriumpyruvat und 1 % AB/AM-Lösung zur Verfügung gestellt von AG Prof. Dr. A. G. Beck-Sickinger, Universität Leipzig	HTB-10

Tabelle 2.5.: Plasmide

Tabelle 2.5 Teil 1: Ausgangsplasmide

Plasmid	Bezugsquelle
pET-SUMO-E8CPE38 modifizierter pET-SUMO-Vektor mit dem E ₈ C-PE38-Gen; ermöglicht die N-terminale SUMO-Fusion	Stefan Frost, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
pB3-V_H-R8CP Derivat des pYR38-2 nach Reiter et al. (1995), mit dem Gen für die schwere Kette des dsFvB3, C-terminal um das klassische Polyargininfusionspeptid erweitert	Kay Stubenrauch, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
pET21a(+)-GFPR8C pET21a(+)-Vektor mit dem Gen für <i>elevated green fluorescent protein</i> mit C-terminalem, klassischen Argininfusionspeptid	Stefan Frost, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
pET22b(+)-RFPE8C pET22b(+)-Vektor mit dem Gen für <i>red fluorescent protein</i> mit C-terminalem, klassischem Glutamatfusionspeptid	Stefan Frost, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
pMal c5G Vektor zur Herstellung von Proteinen als Maltosebindeprotein-Fusion, diente als Vorlage für die MBP-Gensequenz	New England Biolabs, Frankfurt/Main
pET23dK-sfGFP diente als Vorlage für die sfGFP-Gensequenz	Patrick Studte, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Tabelle 2.5 Teil 2: in dieser Arbeit erstellte Plasmide

Plasmid	Ursprungsplasmid	Eigenschaft
pET-SUMO-E8xCPE38	pET-SUMO-E8CPE38	enthält das Gen für PE38 mit N-terminalem spaltbarem Glutamatfusionspeptid als N-terminale SUMO-Fusion
pB3-V _H -CxR8	pB3-V _H -R8CP	enthält das Gen der schweren Kette von dsFvB3, C-terminal um das spaltbare Polyargininfusionspeptid verlängert
pET21a(+)-MBP-CxR6/ -CxR8/ -CxR10	pET21a(+)-GFPR8C	enthalten das Gen für Maltosebindetein, C-terminal um ein spaltbares Fusionspeptid mit 6, 8 oder 10 Argininen verlängert
pET22b(+)-sfBFP-CxE6/ -CxE8/ -CxE10	pET22b(+)-RFPE8C	enthalten das Gen für <i>superfolder blue fluorescent protein</i> (sfBFP), C-terminal um ein spaltbares Fusionspeptid mit 6, 8 oder 10 Glutamatresten verlängert

Tabelle 2.6.: Für molekularbiologische Arbeiten eingesetzte Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomics, Ebersberg, hergestellt und geliefert. Die kurzen Klonierungsprimer wurden in „Primerqualität“ geliefert. Mutageneseprimer lagen „Hypur“, salz- und schutzgruppenfrei vor. Die Oligonukleotide für die direkte Hybridisierung waren über eine *Reversed-Phase*-Chromatographie gereinigt („HPSF“).

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Klonierungs- und Mutageneseprimer	
PE38	
PE38fw	ataggtaccggcggttcttgcgcttccggagtc
PE38rev	acctaagcttctcgaattctc
dsV _H B3	
B3fw	atatacatatggatgtgaagctg
B3rev	ataaggatccgccagaaccgccgcaagagcctgcggagacagtgaccag
sfGFP und sfBFP	
sfGBFPfw	atataatgagtaaaggcgaagagctgac
sfGBFPrev	ttaggatccgccagaccgccgaatacagctcgtccatgcc
MBPNdeI-BamHI	
MBPfw	atagacatatgaaaatcgaagaaggtaaactg
MBPprev	taatatggatccgccagaaccgccgcaagtctgcgcgtctttcag
Oligonukleotide zur Hybridisierung	
E ₈ xC-PE38	
PEE8fw	cgaagaggaggaagaggaggaggaactggtgccgcgcggcagcggcg
PEE8rev	gtaccgccgctgccgcgcggcaccagttctctctctctctctctctt
dsV _H B3-CxR ₈	
BR8fw	gatccctggtgccgcgcggcagccgctcgtcgcctcgcgcgctgcccataatg
BR8rev	aattcattatgggcgacggcgcgacggcgacgagctgccgcgcggcaccagg
sfBFP-CxE _n	
ME6fw	gatccctggtgccgcgcggcagcgaagaagaagaagaagaacatgataac
ME6rev	tcgagttatcatggttcttcttcttcttcttctcgtgccgcgcggcaccagg
ME8fw	gatccctggtgccgcgcggcagcgaagaagaagaagaagaagaagagccatgataac
ME8rev	tcgagttatcatggctcttcttcttcttcttcttctcgtgccgcgcggcaccagg
ME10fw	gatccctggtgccgcgcggcagcgaagaagaagaagaagaagaagaagaggaacatgataac
ME10rev	tcgagttatcatggttcttcttcttcttcttcttcttcttctcgtgccgcgcggcaccagg
MBP-CxR _n	
sR6fw	gatccctggtgccgcgcggcagccgacgtcgacgacgcccggggcccgtagtaag
sR6rev	aattcttactacgggcccggcgtcgtcgacgtcggctgccgcgcggcaccagg
sR8fw	gatccctggtgccgcgcggcagccgacgtcgacgacgcccggcgacgtggcccgtagtaag
sR8rev	aattcttactacgggcccagctcgcggcgctcgtcgacgtcggctgccgcgcggcaccagg
sR10fw	gatccctggtgccgcgcggcagccgacgtcgacgacgcccggcgacgtgccctggcccgtagtaag
sR10rev	aattcttactacgggcccagcgacgtcgcggcgctcgtcgacgtcggctgccgcgcggcaccagg
Primer für Quick-Change-Mutagenese	
sfBFPfw	ctggttaccactctgaccCACggcgtgcaatgttttagc
sfBFPrev	gctaaaacattgcacgccGTGggtcagagtgtaaccag

Tabelle 2.7.: NPY-Derivate

In dieser Tabelle ist Material gelistet, welches von der Gruppe von Prof. Dr. A. G. Beck-Sickinger, Universität Leipzig, freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Hierbei handelt es sich zusätzlich zu den schon erwähnten Zelllinien (Tabelle 2.4 Teil 3) um NPY-Derivate. Diese wurden in Leipzig synthetisiert und HPLC-gereinigt. Nach Gefriertrocknung wurden sie mir als Lyophilisat überlassen. Mit einem Stern gekennzeichnete Lysinreste (K*) sind über die Seitenkette mit der Peptidsequenz in der Folgezeile modifiziert.

Peptid	Sequenz
pNPY	H-YPSKPDNPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLITRQRY-NH ₂
[F ⁷ , P ³⁴]NPY	H-YPSKPDFPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLITRPRY-NH ₂
CK ₈ -[F ⁷ , P ³⁴]NPY	H-YPSK*PDFPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLITRPRY-NH ₂ H-CKKKKKKKK-K*
K ₈ xC-[F ⁷ , P ³⁴]NPY	H-YPSK*PDFPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLITRPRY-NH ₂ H-KKKKKKKKLVPRGSGGSGGSCGS-K*
[Ala ³¹ , Aib ³²]NPY	H-YPSKPDNPGEDAPAEDLARYYSALRHYINL-Ala-Aib-RQRY-NH ₂ hhY ₅ R-Agonist, (Cabrele et al., 2000))
BIBP3226	nicht peptidischer hY ₁ R-Antagonist (Rudolf et al., 1994)

Tabelle 2.8.: Liste der Geräte und Zubehör

Gerät/Zubehör	Bezugsquelle
Absaugsystem	
VACCU Hand Controller mit Pumpe und Absaugflasche	Brand GmbH, Wertheim
Autoklaven	
Variolac ®	H + P Labortechnik, Oberschleißheim
ELSA	H + P Labortechnik, Oberschleißheim
CD Spektroskope	
Jasco J 810 Spectropolarimeter	Jasco GmbH, Groß-Umstadt
Peltier element: Jasco PTL-423S	Jasco GmbH, Groß-Umstadt
Software: Spectra Manager	
Rührbare Halbmikroküvette QS	Hellma Analytics, Müllheim
2 mm Küvette QS	Hellma Analytics, Müllheim
Chromatographiesysteme	
ÄKTA <i>purifier</i>	GE Healthcare, München, vormals Amersham Pharmacia Biotech
Fraktionskollektor Frac900	GE Healthcare, München, vormals Amersham Pharmacia Biotech
Fraktionskollektor Frac950	GE Healthcare, München
software UNICORN 5.31 und 5.1	

Fortsetzung von Tabelle 2.8, Liste der Geräte und Zubehör

Gerät/Zubehör	Bezugsquelle
Chromatographiesäulen	
HiLoad Superdex 75 prep grade 16/60, SV 120 ml SV	GE Healthcare, München
HiTrap FF, SV 5 ml	GE Healthcare, München
HiTrap Q HP, SV 1 und 5 ml	GE Healthcare, München
HiTrap SP HP, SV 1 und 5 ml	GE Healthcare, München
MBPTrap HP, SV 5 ml	GE Healthcare, München
POROS 20 HQ, SV 1,66 ml	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, vormals applied biosystems
Durchflusszytometer	
FACS Calibur	Becton-Dickinson, Heidelberg
software CellQuestPro	
Flowing Software 2.5	Cell Imaging Core, University of Turku (Finnland)
Elektroporator	
Gene Pulser II	BioRad, München
Elektroporationsküvette, 2 mm	BioRad, München
Fermenter und Kontrollelemente	
Biostat C 10 l Reaktor	Sartorius AG, Göttingen, vormals B. Braun Melsungen AG
Maihak Unor 610	SICK AG, Waldkirch
Maihak Oxor 610	SICK AG, Waldkirch
Protos	Knick, Berlin
Software: Simatic PCS 7 Process Control System	Siemens AG, München
Fluoreszenzspektrometer	
FluoroMax 2	ISA Instruments, München
FluoroMax 3	ISA Instruments, München
Peltier element: LFI-3751	Wavelength Electronics, AMS Technologies, Martinsried
software: DataMax	
FluoroMax 4	HORIBA Jobin Yvon GmbH, Unterhaching
software: FluorEssence 3.5	
Halbmikroküvette QS	Hellma Analytics, Müllheim
Gelelektrophoreseapparaturen	
EPS 200	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
EPS 600	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hämocytometer	
	Brand GmbH, Wertheim

Fortsetzung von Tabelle 2.8, Liste der Geräte und Zubehör

Gerät/Zubehör	Bezugsquelle
Inkubator für die Zellkultur	
Hera Cell	Heræus, Hanau
Konzentratoren	
Vivaflow 200, MWCO 10 000, HY	Sartorius AG, Göttingen
Laminar airflow box	
HERA <i>safe</i>	Heræus, Hanau
Lyophilisationsanlage	
BETA 1-16	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz
Magnetrührer	
COMBIMAG	REOIKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
MR 1000	Heidolph, Schwabach
RCT Basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskope	
TELAVAL3	Carl Zeiss, Jena
Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena
pH-Meter pH526	
	WTW, Weilheim
Pipetten	
Pipettenset „research“	Eppendorf, Hamburg
accu jet® pipette controller	Eppendorf, Hamburg
Pumpen	
Peristaltic Pump P-1	GE Healthcare, München
313U/D	Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen/Anstel
Rotationsinkubatoren und Schüttler	
Certomat® BS-T	B. Braun Biotech, Melsungen
VKS 75 Control	Edmund Bühler, Hechingen
Thermocycler gradient	
	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer	
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
UV Imager Gel iX	
	Intas Science Imaging Instruments GmbH , Göttingen

Fortsetzung von Tabelle 2.8, Liste der Geräte und Zubehör

Gerät/Zubehör	Bezugsquelle
UV-Vis Spektroskopie	
DU 7400 Spectrophotometer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Multiskan GO 3.2 Mikrotiterplatten-Spektrophotometer	Thermo Scientific, Braunschweig
Nanophotometer Classic	Implen GmbH, München
Ultrospec 4000	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Absorptionsküvetten QS (Makro, Halbmi- kro, Mikro)	Hellma Analytics, Müllheim
Vortex-Genie2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waagen	
BP 2100 S	Sartorius, Göttingen
BP 4100 S	Sartorius, Göttingen
MC1 Research RC 210 P	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	
GFL 1092	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burg- wedel
Geräte für den Zellaufschluss	
Hochdruckhomogenisator, Micron LAB 40	APV, Lübeck
Hochdruckhomogenisator, LAB 60	APV, Lübeck
Ultra-Turrax T25	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Zentrifugen	
Avanti™J-20	Beckman Coulter, Krefeld
Avanti™J-25	Beckman Coulter, Krefeld
Avanti™J-30I	Beckman Coulter, Krefeld
Biofuge <i>pico</i>	Heræus, Hanau
Biofuge <i>fresco</i>	Heræus, Hanau
Cryofuge 6000i	Heræus, Hanau
Optima XL-A	Beckman Coulter, Krefeld
ProteomeLab XL-I	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge 5702R	Eppendorf, Hamburg
Rotoren	
JA 20	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
JA 30.50 Ti	
JLA 8.100	
JLA 16.250	
An-50 Ti	

Tabelle 2.9.: Fertiglösungen für die Zellkultur

Lösung	Bezugsquelle
Antibiotika-Antimykotika-Lösung (AB/AM)	GE Healthcare, München, vormals PAA Laboratories GmbH
DMEM/HAM's F12	GE Healthcare, München, vormals PAA Laboratories GmbH
FACSClean	Becton-Dickinson, Heidelberg
FACSFlow	Becton-Dickinson, Heidelberg
FACSRinse	Becton-Dickinson, Heidelberg
Fetales Rinderserum (FBS)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Minimum Essential Medium (MEM)	GE Healthcare, München, vormals PAA Laboratories GmbH
Natriumpyruvat (100 mM Stammlösung)	ThermoFisher Scientific, vormals Gibco
Non essential amino acids (Stammlösung, 100×)	ThermoFisher Scientific, vormals Gibco
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	GE Healthcare, München, vormals PAA Laboratories GmbH
RPMI ohne Glutamin	GE Healthcare, München, vormals PAA Laboratories GmbH
Stabiles Glutamin (200 mM in 0,9 % NaCl)	GE Healthcare, München, vormals PAA Laboratories GmbH
Trypsin-EDTA-Lösung	GE Healthcare, München, vormals PAA Laboratories GmbH

Tabelle 2.10.: Zusammensetzung von Lösungen im Laboralltag

Lösung	Zusammensetzung
Lösungen für die Herstellung von <i>E. coli</i> im Schüttelkolben	
SOC-Medium (<i>super optimal broth</i> mit Zusatz von Glucose (Hanahan, 1983))	0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose)
LB-Medium (lysogeny broth medium (Bertani, 1951))	10 g/l Pepton, 5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, pulverisiert
LB-Agar	LB-Medium, mit Zusatz von 15 g/l Agar-Agar
Ampicillin Stammlösung	100 mg/ml
Chloramphenicol Stammlösung	35 mg/ml in Ethanol
Kanamycin Stammlösung	35 mg/ml
Tetracyclin Stammlösung	12,5 mg/ml in Ethanol
IPTG Stammlösung	1 M IPTG
Lösung für Agarose-Gelelektrophorese	
TAE-Puffer (50×)	1 M Tris, 2 M Essigsäure, 0,5 M EDTA, pH 8,0

Fortsetzung von Tabelle 2.10, Zusammensetzung von Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
DNA-Auftragspuffer (5×)	50 % (v/v) Glycerol, 50 % (v/v) TAE-Puffer (1×), 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, pH 7,2
Lösungen für SDS-PAGE	
Trenngelpuffer (4×)	1,5 M Tris, pH 8,8, 0,8 % SDS
Sammelgelpuffer (4×)	0,5 M Tris, pH 6,8, 0,8 % SDS
Elektrophoresepuffer (5×)	125 mM Tris, pH 8,3, 1,25 M Glycin, 17,5 mM SDS
Probenpuffer (5×)	250 mM Tris, pH 8,0, 5 % SDS, 50 % Glycerol, 0,005 % Bromphenolblau
Probenpuffer, reduzierend (5×)	Probenpuffer mit 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
Coomassiefärbung nach Fairbanks et al. (1971)	
Lösung A	10 % (v/v) Essigsäure, 25 % Isopropylalkohol, 0,05 % Coomassiebrilliantblau
Lösung B	10 % (v/v) Essigsäure, 10 % Isopropylalkohol, 0,005 % Coomassiebrilliantblau
Lösung C	10 % (v/v) Essigsäure, 0,002 % Coomassiebrilliantblau
Entfärber	10 % (v/v) Essigsäure
Lösungen in der Zellkultur	
Kryomedium	10 % DMSO (v/v) in FBS
Propidiumiodid	2,5 µg/ml in PBS

Tabelle 2.11.: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE

Es wurden Trenngele mit 12 % oder 15 % Polyacrylamid verwendet, die jeweils mit 6 %igem Sammelgel überschichtet waren. Die Mengenangaben in dieser Tabelle sind für jeweils 3 Gele.

Bestandteil und Volumeneinheit	Sammelgel		
	6 %	12 %	15 %
30 % Acrylamid Stammlösung (ml)	1,20	4,00	5,00
Sammel- oder Trenngelpuffer (4×) (ml)	1,50	2,50	2,50
dd H ₂ O (ml)	3,30	3,50	2,50
TEMED (µl)	6,00	8,00	8,00
20 % (w/v) APS (µl)	40,00	60,00	60,00

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Agarosegelelektrophorese

DNA-Moleküle wurden mittels Agarosegelelektrophorese sowohl analytisch als auch präparativ aufgetrennt. Dazu wurde mit 1 % Agarose in TAE-Puffer (Tab. 2.10) gearbeitet, dem 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt war. Der TAE-Puffer diente ebenso als Laufpuffer. Zur Vorbereitung der Proben wurden diese mit 20 % (v/v) DNA-Auftragspuffer (5×) versetzt und anschließend in die Geltaschen überführt. Die Trennung der Moleküle erfolgte in einer horizontalen Gelkammer bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 400 mA für ca. 45 min. Die Detektion erfolgte im Anschluss unter UV-Licht aufgrund des interkalierten Fluoreszenzfarbstoffes (Maniatis et al., 1975).

2.2.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die Banden zügig unter langwelligem UV-Licht mit einem Skalpell markiert, um sie anschließend bei Tageslicht auszuschneiden. Somit sollte die Einwirkung der mutagenen Strahlung minimiert werden. Es folgte eine Gelextraktion mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit nach Gebrauchsanweisung.

2.2.3. Gewinnung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus 5 ml Flüssigkulturen in LB-Medium nach 12-16 h Wachstum bei 37 °C extrahiert. Sie folgte dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim, 1983). Die Durchführung wurde nach Herstellerangaben mit dem Kit peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I durchgeführt. Die Elution von den Säulen erfolgte mit 50 µl Wasser (bidest.). Im Anschluss wurde die DNA bei -20 °C gelagert.

Konzentrationsbestimmungen der Plasmid-DNA erfolgten UV/VIS-spektrophotometrisch. Dabei wurde als Näherung angenommen, dass 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml bei einer Wellenlänge von 260 nm eine Absorption von 1 aufweist.

2.2.4. Restriktionsverdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

In dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA an spezifischen palindromischen Erkennungssequenzen schneiden. In dieser Arbeit wurden Nukleasen, die sogenannte *sticky ends* bilden, eingesetzt. Sie ermöglichen eine gerichtete Ligation. Die *Fast-Digest*-Enzyme wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt: 1 µl Enzym für 1 µg plasmid DNA oder 0,2 µg PCR Produkt. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung. Bei einer Linearisierung von Plasmid-DNA in präparativen Ansätzen wurde zusätzlich Alkaline Phosphatase zugesetzt, um eine Religation zu verhindern.

Im Anschluss an einen DNA-Verdau erfolgte in der Regel eine Auftrennung der Fragmente im Agarosegel (Abschnitt 2.2.1, S. 33) zu rein analytischen Zwecken oder auch zur Präparation bestimmter Fragmente für eine weitere Verwendung (Abschnitt 2.2.2, S. 33).

2.2.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion wird DNA anhand einer *Template*-Sequenz in mehreren Zyklen amplifiziert (Mullis et al., 1986). Diese Zyklen beinhalten zunächst den Schritt der Strangtrennung doppelsträngiger DNA, im anschließenden *Annealing* erfolgt die Anlagerung von *Primern* an die komplementären Sequenzen des *Templates*. Unter Einsatz von thermostabiler Polymerase erfolgt die Verlängerung der DNA (Elongation). Durch mehrfache Wiederholung dieses Zyklus erfolgt eine Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenzen. Unter Verwendung nicht rein komplementärer *Primer* lassen sich gerichtet Mutationen in die Sequenz des *Templates* einfügen. So wurden an den Flanken der amplifizierten Gene Erkennungssequenzen von Endonukleasen oder Teile der Kodierung des polyionischen Fusionspeptides eingefügt. Auch die Mutation von sfGFP zu sfBFP erfolgte über einen Mutageneseprimer. (Abschnitt 2.2.9, S. 35).

Die Tabellen 2.12 und 2.13 stellen das Pipettierschema für die PCR-Ansätze und den Temperaturverlauf während der Durchführung dar. Für die Ansätze wurde mit einem Basisvolumen von 10 μl pro PCR Ansatz gerechnet. Jedoch wurde in der Regel ein *Mastermix* für mehrere Reaktionen frisch angesetzt.

Tabelle 2.12.: Pipettierschema für 10 μl PCR-Ansatz

Lösung	Volumen (μl)	Endkonzentration
<i>Pfu</i> -Reaktionspuffer mit 20 mM MgSO_4 (10 \times)	1,0	1 \times
25 mM MgSO_4	1,0	2,5 mM
dNTP Mix (je 10 mM)	0,2	je 0,2 mM
<i>Template</i>	0,1 μl	ca. 1 ng/ μl
5'- <i>Primer</i> (10 pmol/ μl)	0,4	0,4 pmol/ μl
3'- <i>Primer</i> (10 pmol/ μl)	0,4	0,4 pmol/ μl
<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/ μl)	0,2	0,05 U/ μl
DMSO (100 %)	0–0,3	0–3 %
steriles H_2O bidest.	ad 10.0	

Im Anschluss an die PCR folgte eine Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.2.1, S. 33), entweder analytisch oder zur Präparation der amplifizierten DNA (Abschnitt 2.2.2, S. 33). Für eine Ligation in linearisierte Plasmid-DNA wurden die Fragmente durch einen Restriktionsverdau (Abschnitt 2.2.4, S. 33) vorbereitet, um die gewünschten terminalen *sticky ends* zu erhalten.

Tabelle 2.13.: Temperaturzyklus der PCR-Reaktionen

Zykluszahl	Schritt	Dauer	Temperatur
1×	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
26×	Denaturierung	95 °C	1 min
	<i>Annealing</i>	berechnete $T_m - 5$ °C	1 min
	Elongation	72 °C	2 min/kb
1×	Finale Elongation	72 °C	10 min

Die *primerspezifische* T_m wurde mit dem Programm Serial Cloner berechnet. Die Berechnung ist abhängig von der Länge der Sequenz und dem Verhältnis von AT- zu GC-Gehalt.

2.2.6. Vorbereitung von Oligonukleotiden für die Ligation

Zum Einfügen der Gensequenzen, welche die polyionischen Peptidsequenzen kodieren, wurden komplementäre Oligonukleotide entworfen und kommerziell erworben. Vor der Insertion in dephosphorylierte DNA wurden die Einzelstränge hybridisiert, indem sie auf ca. 10 °C über die errechnete Schmelztemperatur erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wurden. Ebenfalls erfolgte eine Phosphorylierung der Oligonukleotide am 5'-Ende mit T4-Polynucleotid-Kinase nach Herstellerangaben.

2.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA wurde linearisierte Plasmid-DNA mit der Gensequenz aus einer PCR-Amplifikation und/oder mit hybridisierten Oligonukleotiden unter Einsatz von T4-DNA-Ligase unter Zusatz des Kofaktors ATP inkubiert. Dabei wurde 50 ng Plasmid-DNA verwendet. Die zu ligierenden Fragmente wurden in fünf- oder zehnfach molarem Überschuss eingesetzt. Sollten PCR-Produkt und Oligonukleotid ligiert werden, erfolgte dies in einem Schritt als 3-Fragmentligation. Die Ligation selbst erfolgte entweder für 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlraum. Anschließend wurde ein Aliquot elektrokompenter *E. coli XL1 blue* Zellen mittels Elektroporation mit 2 µl des Ligationsansatzes transformiert (Abschnitte 2.3.2, S. 38 und 2.3.3, S. 39).

2.2.8. Sequenzierung von DNA und Synthese von Oligonukleotiden

Die Sequenzierung von DNA sowie die Herstellung von Oligonukleotiden für die Nutzung als Primer während der PCR oder für die Insertion in Plasmid-DNA erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics, Ebersberg.

2.2.9. Konstruktion von Expressionsvektoren

Die Konstruktion der Expressionsvektoren wurde mit den in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Methoden (2.2.1–2.2.8) durchgeführt. Als Ausgang dienten verschiedene

Expressionsvektoren, die Proteine mit nicht spaltbaren polyionischen Fusionspeptiden kodieren.

Prinzipiell wurde zunächst aus dem jeweiligen Plasmid mittels Restriktionsverdau das Gen des ursprünglichen Zielproteins entfernt. Stattdessen wurden zwei DNA-Fragmente, die durch eine dritte Restriktionsschnittstelle untereinander gerichtet annealen konnten, über gleiche Überhänge wieder einligiert. Bei den beiden Fragmenten handelt es sich zum einen um ein Oligonucleotid, welches die polyionische Sequenz und die Thrombinschnittstelle kodiert, sowie zum anderen um ein PCR-Produkt mit dem Zielgen als *template*. Diesem war über Mutageneseprimer zusätzlich die Kodierung für das Cystein sowie eine Linkersequenz aus sechs Aminosäuren angefügt.

Für fast alle Konstrukte erfolgten die Mutationen für eine C-terminale polyionische Modifizierung. Dazu wurden auf genetischer Ebene in 5'- nach 3'-Richtung zunächst das Gen mit der über PCR eingefügten Mutation für Cystein und Linker und schließlich das Oligonucleotid für Thrombinerkennungssequenz und polyionische Sequenz angefügt. Für E₈xC-PE38 war die Modifikation N-terminal vorgesehen und somit erfolgte die Klonierungsstrategie spiegelverkehrt.

Im Folgenden werden die einzelnen Klonierungsstrategien genauer ergänzt. Die Sequenzen aller neu konstruierten Gene sind im Anhang (Anhang C, Seite 134) aufgeführt.

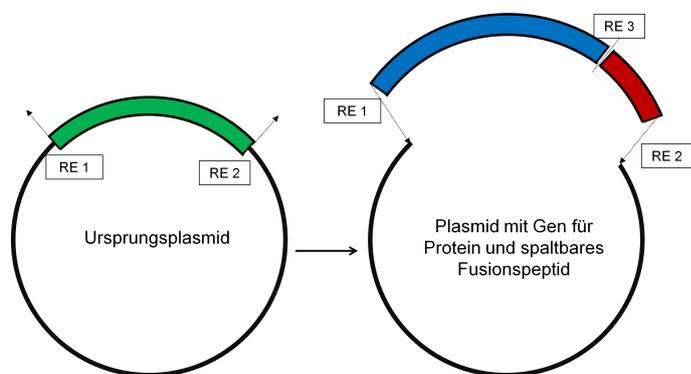


Abbildung 2.1.:

Die Klonierung der Gene für Proteine mit spaltbaren Fusionspeptiden erfolgte durch das Ausschneiden des im Plasmid bereits integrierten Gens (grün) durch zwei Restriktionsenzyme (RE 1 und RE 2). Anschließend wurde das neue Zielgen inklusive der Codierung für ein Cystein, einen neutralen *linker* und eine dritte Endonukleaseschnittstelle (RE 3) (blau) über die erste Restriktionsschnittstelle eingefügt. Zusätzlich wurde ein Oligopeptid (rot), ebenfalls mit der Restriktionsschnittstelle von RE 3 und der Schnittstelle von RE 2 flankiert, eingefügt. Das Oligopeptid beinhaltet die Kodierung für die Thrombinschnittstelle und die geladenen Aminosäuren.

MBP-CxR_n

Ausgehend von einem pET21a(+)-Vektor, der bereits das Gen für GFP-R₈C enthielt (Frost, 2009), wurden Plasmide konstruiert, die das Maltosebindeprotein mit dem C-terminalen, spaltbaren Polyargininpeptid kodieren. Es wurden Konstrukte für polyionische Ketten aus sechs, acht und zehn Argininen erstellt.

Tabelle 2.14.: Klonierungsstrategien

RE sind die Restriktionsenzyme, die für die Klonierung verwendet wurden. Mit RE 1 und RE 2 wurde das Ursprungsgen entfernt, wobei RE 1 am 5'-Ende und RE 2 am 3'-Ende schneidet. RE 3 ist eine neu eingefügte Schnittstelle am Übergang zwischen den Genabschnitten für die *Linker*sequenz und die Thrombinschnittstelle. Sie verbindet ein PCR-Produkt und eine synthetisierte Oligonukleotidsequenz.

Ursungsplasmid	RE 1	RE 2	RE 3
pET-SUMO-E8CPE38	BstBI	HindIII	Acc65I
pB3-V _H -R8CP	NdeI	EcoRI	BamHI
pET21a(+)-GFPR8C	NheI	EcoRI	BamHI
pET22b(+)-RFPE8C	NdeI	XhoI	BamHI

Aus dem Ursungsplasmid pET21a(+)-GFPR8C wurde mit NheI und EcoRI die GFP-R₈C-kodierende Sequenz entfernt. In den so linearisierten Vektor wurde dann das modifizierte MBP-Gen und ein Oligonukleotid, die untereinander über Überhänge einer BamHI Schnittstelle ligieren konnten, eingefügt. Als PCR-Template für das Maltosebindeproteingen diente der pMal_c5G-Vektor der Firma New England Biolabs. Die verschieden langen polyionischen Sequenzen wurden durch entsprechend unterschiedlich konstruierte Oligonukleotide eingefügt.

sfBFP-CxE_n

Das Gen von sfBFP wurde nach Pedelacq et al. (2006) durch zielgerichtete Mutagenese (Y66H) aus dem pET23dK-sfGFP-Plasmid gewonnen.

Ausgangsvektor für die Herstellung von sfBFP-CxE_n mit vier, sechs, acht oder zehn Glutamatresten war pET22b(+) mit dem Gen für RFP-E₈C (Frost, 2009) flankiert durch NdeI und XhoI. Mit diesen Restriktionsenzymen wurde das Gen samt polyionischer Sequenz aus dem Vektor entfernt. Einligiert wurde das modifizierte sfBFP-Gen (PCR-Produkt) sowie je eines der Oligonukleotide für die entsprechende Polyglutamatsequenz. PCR-Konstrukt und Oligonukleotid wurden über BamHI-*sticky ends* ligiert.

Die Arbeiten zu diesen Konstrukten wurden von Susanne Przybilski und Saskia Lentze, beide Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, durchgeführt.

E₈xC-PE38

Die Einführung der Thrombinerkennungssequenz in den polyionischen *tag* des E₈C-PE38 erfolgte durch Modifikation des Plasmids pET-SUMO-E8CPE38 (Frost, 2009).

Für die Klonierung wurde das E₈C-PE38-Gen mit BstBI und HindIII aus dem Vektor entfernt und stattdessen das gewünschte Oligonukleotid und das PCR-Produkt, beide über Acc65I-Überhänge assoziiert, einligiert. Das PE38-Gen mit dem N-terminal-kodierten Cystein wurde aus dem Ursungsplasmid amplifiziert, wobei am 5'-Ende durch einen Muta-

geneseprimer zusätzlich der neutrale *linker* GGTGGS kodiert wurde. Das Oligonukleotid kodiert das Octaglutamat und die Thrombinschnittstelle.

B3(V_H)-CxR₈

Ausgehend vom pB3(V_H)-R8CP (Frost, 2009) wurde die schwere Kette des dsFvB3-Antikörpers mit der thrombinspaltbaren Variante des Fusionspeptides modifiziert. Auch hier diente das Gen in dem Ursprungsplasmid als *Template* für die PCR. Über den Mutageneseprimer wurde die Kodierung für das C-terminale Cystein und den Linker eingefügt. Das Oligonukleotid beinhaltet die Thrombinschnittstelle und den Octaarginintag. Aus dem Ursprungsplasmid wurde zunächst mit NdeI und EcoRI das Gen herausgeschnitten. Die Ligation von PCR-Produkt und Oligonukleotid erfolgte durch diese Überhänge und einen zusätzlichen BamHI-Überhang zwischen diesen beiden Fragmenten.

2.3. Stammhaltung und Kultivierung von Mikroorganismen

2.3.1. Stammhaltung und Anzucht von Mikroorganismen

Generell erfolgte die Kultivierung von Mikroorganismen bei 37 °C in LB-Medium (Bertani, 1951) unter Zusatz von Antibiotika, entsprechend der jeweiligen Resistenzen. Elektrokompente Zellen wurden mit den entsprechend vorgehaltenen Plasmiden im Bedarfsfall transformiert (2.3.3) und über Nacht auf LB-Agar angezogen. In dieser Form erfolgte eine Lagerung bis zu maximal vier Wochen bei 4 °C. Für die Herstellung von Biomasse wurde eine Kolonie gepickt und sukzessive bis zum gewünschten Maßstab (5 ml, 200 ml, 1 l oder auch 10 l) kultiviert. Für die Herstellung von Maltosebindeprotein-Varianten wurde das LB-Medium zusätzlich mit 20 mM Natriumphosphat auf pH 7,0 gepuffert und mit 2 % Glucose supplementiert. Auch für die Herstellung der leichten Kette des B3-Antikörpers im Bioreaktor wurde das Medium angepasst (2.3.5).

2.3.2. Herstellung elektrokompenter Zellen

Elektrokompente Zellen wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt. Es wurden 200 ml LB-Medium in einem 1-l-Schikanekolben 1:100 aus einer 5-ml-Vorkultur des gewünschten *E.coli*-Stammes inokuliert. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C. Die Sauerstoffzufuhr wurde durch Schwenken mit 90 rpm gewährleistet. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3–0,4 wurde die Fermentationsbrühe auf Eis für 30 min abgekühlt. Alle folgenden Schritte erfolgten ebenso auf Eis oder bei 4 °C in der Zentrifuge. Die Zellen wurden bei 5000 rpm für 15 min abzentrifugiert und das Medium entfernt. Es folgten mehrere Waschschrte mit eisgekühltem Glycerol (10 %, v/v), in denen das Pellet in schrittweise reduzierten Volumina (200 ml,

100 ml, 20 ml) resuspendiert und anschließend erneut 10 min zentrifugiert wurde. Final wurde in 200 μ l Glycerol resuspendiert und zu 50 μ l aliquotiert. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Elektroporation bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.3.3. Transformation von Mikroorganismen durch Elektroporation

Für die Transformation elektrokompeter *E. coli*-Zellen wurden diese auf Eis aufgetaut und mit 0,5 μ l gereinigter Plasmid-DNA oder mit 2 μ l Ligationsansatz versetzt. Der Ansatz wurde in eine sterile und gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte im Anschluss mit dem Gene Pulser II bei einem Widerstand von 200 Ω , einer Spannung von 1,8 kV sowie einer Kapazität von 25 μ F. Direkt nach dem Puls wurden die Zellen in 500 μ l vorgewärmtem SOC-Medium (Hanahan, 1983) aufgenommen und eine Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 600 rpm im Thermocycler inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit den gewünschten Antibiotika auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ Kolonien angezogen.

2.3.4. Proteinherstellung im Schüttelkolben

Die Proteinherstellung erfolgte in 5-l-Schikanekolben je mit 1 l Medium befüllt. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL verwendet. Zunächst wurde eine mit dem gewünschten Plasmid transformierte *E. coli*-Kolonie von der LB-Agarplatte gepickt und in 5 ml Flüssigmedium angezogen. Es folgte der Ansatz einer Vorkultur durch Animpfen von 200 ml Medium im 1-l-Schikanekolben (1:500) und Inkubation über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und ca. 70 rpm. Mit dieser Vorkultur wurden am nächsten Morgen die Hauptkulturen 1:50 inokuliert und die Inkubation unter identischen Bedingungen fortgesetzt. Es erfolgte die regelmäßige Kontrolle der optischen Dichte bei $\lambda = 600\text{ nm}$ (OD_{600}). Bei einer ungefähren OD_{600} von 0,8 wurde die Proteinherstellung durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultivierung für weitere vier Stunden fortgesetzt. Für die Ernte wurden die Zellen in der Zentrifuge bei 5 000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ vom Medium separiert, das Medium autoklaviert und verworfen und die Zellen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zum Aufschluss gelagert.

Für die Kontrolle der Proteinproduktion wurden regelmäßig Proben genommen, und nach einer Zentrifugation wurde das Zellpellet zu einer $\text{OD}_{600} = 1$ in Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,4 mit 200 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 5 mM EDTA, 1,5 mg Lysozym/g Biofeuchtmasse) resuspendiert. Es folgte ein Zellaufschluss mittels Ultraschallsonde und die Analyse mittels SDS-PAGE (2.5.3).

2.3.5. Proteinherstellung im Bioreaktor

In dieser Arbeit wurde das Fragment der schweren Kette des B3-Antikörpers (V_H) durch Fermentation im 10-l-Bioreaktor hergestellt. Die Vorkulturen (zunächst 20-ml-, dann 200-

ml-Maßstab) wurden in LB-Medium unter Zusatz von Ampicillin und Chloramphenicol bei 37 °C angezogen. Die Hauptkultur wurde im Anschluss im *fed-batch*-Verfahren durchgeführt. Das Hauptmedium (5 l, mit 50 g/l pasteuem Hefeextrakt, 0,5 g/l NH₄Cl, 11 g/l Glycerol, 11 g/l KH₂PO₄×3H₂O) wurde im Fermenter zubereitet und sterilisiert. Im Anschluss wurde das Medium noch durch zuvor sterilisierte Lösungen vervollständigt (0,8 g Thiamin, 3,4 g MgSO₄, 100 mg/l Ampicillin, 34 mg/l Chloramphenicol). Die Inokulation der Hauptkultur erfolgte aus einer 200-ml-Vorkultur. Die Fermentation erfolgte konstant bei 37 °C, der pH-Wert wurde mit Phosphorsäure oder Ammoniak auf pH 7,0 reguliert. Die Sauerstoffzufuhr wurde auf 25 % pO₂ eingestellt. Das *Feeding* (4 l, mit 300 g/l pasteuem Hefeextrakt, 250 ml/l Glycerol, 5 g/l MgSO₄, 100 mg/l Ampicillin, 34 mg/l Chloramphenicol) erfolgte mit einer Basiszufuhr von 20 g/h und, beginnend nach 6,5 h Fermentationszeit, einer exponentiellen Steigerung bis auf 380 g/h. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 74 wurde mit 1 mM IPTG induziert und nach 3 h die Fermentation beendet. Durch Zentrifugation wurde schließlich aus 8340 g Kulturmasse 1130 g Biofeuchtmasse gewonnen. Die Durchführung erfolgte freundlicherweise unter Verantwortung von Dipl.-Ing. Sebastian Schaepe, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

2.4. Proteinreinigung

Die Gewinnung von gereinigtem Protein aus Biofeuchtmasse wurde in mehreren Schritten durchgeführt. Alle hier eingesetzten Proteine lagen intrazellulär vor, so dass immer mit einem Zellaufschluss (2.4.1) begonnen wurde. Durch einen folgenden Zentrifugationsschritt folgte die Separation von löslichen Zellbestandteilen im Überstand und unlöslichen Bestandteilen im Pellet. Lediglich die beiden Ketten des B3-CxR₈ wurden unlöslich in *inclusion bodies* gewonnen, renaturiert und dann gereinigt. Alle übrigen Proteine wurden löslich gewonnen und nach dem Zellaufschluss durch verschiedene Chromatographieschritte aus dem Überstand gereinigt. Im Anschluss an eine Reinigung erfolgte eine UV/VIS-spektrometrische Bestimmung der Proteinkonzentration. Die aliquotierten Proteinlösungen wurden bei -80 °C gelagert.

2.4.1. Zellaufschluss zur Reinigung der löslich produzierten Proteine

Für den Zellaufschluss wurden ca. 10 g der gewünschten Biomasse im später verwendeten Chromatographiepuffer mit Hilfe eines UltraTurrax gründlich suspendiert (ca. 5 ml Puffer/g BFM). Es wurden 1,5 mg Lysozym/g Biofeuchtmasse (BFM) sowie eine Proteaseinhibitortablette/50 g BFM zugesetzt und der Ansatz 30 min bei 4 °C vorinkubiert. Es folgte der eigentliche Zellaufschluss mittels Hochdruckdispersion in der Micron Lab 40 über 4 Pässen. Im Anschluss wurde DNA durch Zugabe von 0,1 % (w/v) Protaminsulfat und 40 min

Inkubation auf Eis gefällt. Die Abtrennung unlöslicher Bestandteile inklusive der DNA-Präzipitate erfolgte durch Zentrifugation bei 100 000 g für 30 min bei 4 °C . Der Überstand wurde für einen Benzonaseverdau noch verbliebener Nukleinsäuren auf pH 8 eingestellt. Zusätzlich wurden 3 mM MgCl₂ sowie 20 µl Benzonase zugefügt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abschluss wurden bei 100 000 g und 4 °C über 1 h erneut unlösliche Bestandteile entfernt und das Zielprotein durch Chromatographie aus dem Überstand gereinigt.

2.4.2. Chromatographische Methoden

Die Chromatographie kam hauptsächlich im Zusammenhang mit der Reinigung von Proteinen zum Einsatz. Sie diente jedoch auch zur Konzentrierung, Umpufferung/Entsalzung oder kam als analytische Methode (2.5.6) zum Einsatz. Daher werden nun zunächst die Chromatographiemethoden im Allgemeinen erläutert, bevor die konkreten Reinigungsschritte verschiedener Proteine folgen.

Die verschiedenen Chromatographieschritte wurden an ÄKTA purifier Systemen bei 4 °C durchgeführt. Die Puffer wurden temperiert, frisch entgast und filtriert. Als Prozesskontrolle wurde die Leitfähigkeit im Eluat aufgezeichnet. Eine Detektion der Proteine im Eluat erfolgte über UV-Messungen bei bis zu drei verschiedenen Wellenlängen. In einigen Fällen wurde noch eine SDS-PAGE (2.5.3) durchgeführt, um Elutionsfraktionen zu analysieren.

Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und geladener Matrix. Somit erfolgt eine Auftrennung anhand von Ladungen. Je nach Ladungsart wird zwischen Anionen- und Kationenaustauschchromatographie unterschieden. Eine Elution wurde durch Erhöhung der Ionenstärke im Puffer mit NaCl erzielt. Aufgrund der polyionischen Peptide der hier eingesetzten Proteine war die Ionenaustauschchromatographie in dieser Arbeit eine Standardmethode, die bei jeder Reinigung zum Einsatz kam.

Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf spezifischen Interaktionen des Proteins mit der Säulenmatrix, an der entsprechende Liganden immobilisiert sind. Eine Elution erfolgt in der Regel durch Konkurrenz. In dieser Arbeit wurde die immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC), im Besonderen die Nickel-Chelatchromatographie, für die Reinigung der PE38-Varianten eingesetzt. Deren Hexahistidintag komplexiert mit den immobilisierten Ni²⁺-Ionen der Matrix. Die Elution erfolgt durch einen Imidazolgradienten. Für eine weitere Affinitätschromatographie wurde die Bindung von Maltosebindeprotein

an Dextrin bei der Reinigung der Maltosebindeprotein-Varianten ausgenutzt. Eine Elution wurde durch Maltose im Elutionspuffer gewährleistet.

Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie sorgt für eine Trennung von Proteinen anhand ihrer hydrodynamischen Radii. Die Auftrennung nach Größe ermöglicht u. a. die Separation von Monomeren und Di- bzw. Oligomeren oder auch das Entsalzen und Umpuffern von Proben. Die stationäre Phase besteht aus porösem Material, in das kleine Proteine besser eindringen als große, wodurch das Diffusionsvolumen für letztere kleiner ist. Sie werden zuerst eluiert. Es folgen Moleküle mit immer kleiner werdenden hydrodynamischen Radii. Mangels spezifischer Interaktion der Proteine mit der Matrix erfolgt eine Verdünnung der Proteine.

2.4.3. Reinigung von sfBFP-CxE_n

Die Herstellung und Reinigung der verschiedenen sfBFP-Varianten wurde von Anne Pospisil (sfBFP-CxE₈) und Saskia Lentze (sfBFP-CxE₆, sfBFP-CxE₁₀), beide Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, durchgeführt. Das Zielprotein wurde aus dem Zelllysate nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 in zwei chromatographischen Schritten gewonnen. Die Anionenaustauschchromatographie an einer HiTrap Q HP Säule (5 ml SV) erfolgte mit einer Gradientenelution, bei der über 20 SV der NaCl-Gehalt auf 2 M eingestellt wurde. Es folgte eine Größenausschlusschromatographie (HiLoad Superdex 75 prep grade 16/60, 120 ml SV). Das sfBFP konnte anhand seiner Absorption bei 380 nm detektiert werden.

2.4.4. Reinigung von MBP-CxR_n

Für die Reinigung der MBP-Varianten wurde das Zelllysate (2.4.1) auf pH 6,2 eingestellt. Bei diesem pH-Wert erfolgte eine Kationenaustauschchromatographie in MBPX-A-Puffer (50 mM MES, pH 6,2 mit 1 mM EDTA). Das Protein wurde an die Säulenmatrix (HiTrap SP HP, 5 ml SV) gebunden und mit 20 SV MBPX-A-Puffer gewaschen. Eluiert wurde mit einem Gradienten über 20 SV auf 2 M NaCl (MBPX-B: 50 mM MES, pH 6,2 mit 1 mM EDTA, 2 M NaCl). Nach Zusammenführen der MBP enthaltenden Fraktionen wurde der Fraktionspool mit Verdünnungspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,0 mit 1 mM EDTA) 1:3 verdünnt, um die Salzkonzentration herabzusetzen und den pH-Wert auf > 7,0 einzustellen. Eine Affinitätschromatographie an einer Dextrinmatrix (MBP Trap, 5 ml SV) schloss sich an. Es wurde nach der Bindung an die Matrix mit 20 SV MBP-Trap-Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,4 mit 200 mM NaCl, 1 mM EDTA) gewaschen. Die Elution erfolgte isokratisch mit 10 mM Maltose in MBP-Trap-Puffer.

2.4.5. Reinigung von E_{8x}C-PE38 und von E₈C-PE38

Die *Pseudomonas* Exotoxin Varianten wurden beide als His₆-SUMO-Fusionsprotein hergestellt. Die Reinigung erfolgte, dem Protokoll von Stefan Frost (Frost, 2009) folgend, in drei Chromatographieschritten. Zunächst wurde das Protein über den His₆-tag an die Ni²⁺-Ionen der Nickel-NTA-Säulenmatrix (HisTrap FF, 5 ml SV) gebunden. Diese war mit NTA-A-Puffer (25 mM Natriumphosphat, pH 7,4 mit 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol) äquilibriert. Nach ausgiebigem Waschen mit NTA-A-Puffer wurde mit einem Gradienten von 10 mM auf 500 mM Imidazol über 5 Säulenvolumina eluiert. Nach der Vereinigung der E_{8x}C-PE38 enthaltenden Fraktionen wurde die Proteinlösung zunächst gegen Spaltungspuffer (25 mM Tris, pH 7,4 mit 150 mM NaCl) dialysiert und im Anschluss der His₆-SUMO-tag nach Zugabe von SUMO-Protease mit einer Endkonzentration von 12,5 µg/ml für 5 h abgespalten. Es folgte ein erneuter Affinitätschromatographielauf mit identischem Puffersystem. Das Zielprotein wurde im Durchlauf aufgefangen und abgespaltener *tag*, unvollständig verdautes Protein sowie die Protease selbst wurden an der Säule immobilisiert und später in einer Stufe mit 500 mM Imidazol in NTA-A-Puffer eluiert. Vor dem Auftrag auf eine Anionenaustauschersäule (POROS 20 HQ, 1,66 ml SV) wurde der Durchfluss mit dem dreifachen Volumen Laufpuffer IEX-A (25 mM Tris/HCl, pH 7,4 mit 2 mM EDTA) verdünnt. Die Elution nach dem Waschen mit IEX-A erfolgte über eine Erhöhung der Salzkonzentration von 0 M auf 1,0 M NaCl über 50 Säulenvolumina. Eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration auf 2 M NaCl folgte über weitere 25 Säulenvolumina. Die Fraktionen, die E_{8x}C-PE38 enthielten, wurden entsprechend der Ergebnisse einer SDS-PAGE vereinigt.

2.4.6. Isolierung und Solubilisierung von *inclusion bodies*

In dieser Arbeit wurde die schwere Kette des dsFvB3-CxR₈ (B3-CxR₈) unlöslich in *E. coli* als *inclusion bodies* (IB's) produziert (2.3.5). Die Isolierung der IB's erfolgte nach einem Protokoll, beschrieben in Rudolph et al. (1997). Zunächst wurden 150 g Biofeuchtmasse in 800 ml 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 mit 1 mM EDTA mithilfe eines Ultra Turrax resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 3 mg Lysozym pro Gramm Biofeuchtmasse und einer Proteaseinhibitortablette. Nach dem Lysozymverdau für 1,5 h bei 7 °C wurde der mechanische Aufschluss über 6 Passagen bei ca. 600 bar durch Hochdruckdispersion in der Gaulin Lab 60 durchgeführt. Dem Zellaufschluss wurden 3 mM MgCl₂ und 40 µl Benzonase zugefügt sowie der pH-Wert auf pH 8,0 korrigiert. Der Nukleinsäureverdau erfolgte für 1 h bei 8 °C. Nach Zugabe des halben Volumens tritonhaltigen Puffers (1,5 M NaCl, 60 mM EDTA, 6 % (v/v) Triton X-100, pH 7,0) wurde eine weitere Stunde bei 8 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die IB's und weitere unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 4 °C und 38 400 g für 30 min vom löslichen Überstand separiert. Das Pellet wurde nun zweimalig mit 200 ml 670 mM Tris, pH 7,0, 33 mM EDTA, 500 mM NaCl, 2 % (v/v) Triton X-100

und sechsmal mit je 200 ml 100 mM Tris, pH 7,0, 20 mM EDTA gewaschen. Dazu wurde das Pellet im jeweiligen Puffer gründlich resuspendiert und im Anschluss zentrifugiert. Die so gewonnenen IB's (12,0 g aus 150 g BFM) wurden bei -20°C gelagert.

Im Weiteren wurden 4,2 g der IB's solubilisiert. Sie wurden in 42 ml 100 mM TrisHCl, pH 8,0 mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 1 mM EDTA, 100 mM Dithiothreitol (DTT) aufgenommen und 3 h im Becherglas bei Raumtemperatur gerührt. Der pH-Wert wurde im Anschluss mit 1 M HCl auf 2,5 abgesenkt und nicht gelöste Bestandteile durch Zentrifugation bei 100 000 g und 20°C für 1 h abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde das DTT durch Dialyse bei 4°C entfernt. Im ersten Schritt wurde über Nacht gegen 1 Liter 4 M Guanidiniumhydrochlorid, pH 2,0 und abschließend für 24 h gegen 2 Liter 4 M Guanidiniumhydrochlorid, pH 3,0 dialysiert. Ausgefallene Bestandteile wurden durch erneute Zentrifugation bei 100 000 g und 4°C für 1 h abgetrennt, bevor das Solubilisat bei -80°C gelagert wurde.

Die leichte Kette des Antikörperfragmentes lag bereits solubilisiert vor. Diese Vorbereitungen waren durch Dr. Sabine Bergelt, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, durchgeführt worden. Um eine vollständige Reduktion der Thiolgruppen nach der Lagerung zu gewährleisten, wurde das Solubilisat aufgetaut, der pH-Wert auf 8,0 mit NaOH angehoben und mit 100 mM DTT ein reduzierendes Milieu erreicht. Nach 2 h Reduktionszeit bei Raumtemperatur wurde der pH-Wert mit HCl wieder auf 2,5 abgesenkt und, wie bereits für die Solubilisierung der schweren Kette, eine zweifache Dialyse zum Entfernen des DTTs durchgeführt.

Eine Analyse mittels Proteinbestimmung nach Bradford (2.5.9) und densitometrischer Auswertung eines Gels nach SDS-PAGE (2.5.3) beider Solubilisate ergab, dass die schwere Kette in einer Proteinlösung mit 19 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein einen Anteil von 19% ausmachte. Die leichte Kette lag in einer Lösung mit 22 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein mit einem Anteil von 22% vor.

2.4.7. Renaturierung des B3-Antikörperfragmentes

Die Renaturierung des B3-CxR₈ erfolgte durch Verdünnung der Solubilisate in 5 l Renaturierungspuffer. Zunächst wurde ein Redox-*Shuffling*-Milieu aus oxidiertem Glutathion (GSSG) und seiner reduzierten Form (GSH) eingestellt, was nach 4 Tagen zum oxidierenden Milieu verschoben wurde. Es wurde eine Konzentration von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Antikörperprotein eingestellt, wobei die schwere Kette (21,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) im fünffach molaren Überschuss der leichten Kette (3,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) vorlag.

Der Renaturierungspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,5 mit 500 mM L-Arginin, 1 mM EDTA) wurde filtriert, entgast und auf Renaturierungstemperatur von 15°C temperiert. Für ein stabiles Redoxsystem wurde der Ansatz regelmäßig mit N_2 begast und überschichtet.

Erst kurz vor Beginn der Rückfaltung wurden je 1 mM GSH und GSSG im Puffer gelöst. Die Solubilisate wurden vorab gemischt und tropfenweise in 8 ml Einheiten unter Rühren im Renaturierungspuffer verdünnt. Jeder Puls dauerte 15 min und zwischen den Pulsen wurde der Ansatz 45 min ruhen gelassen. Am vierten Tag nach Beginn der Renaturierung wurde durch Zugabe von 4,6 mM GSSG ein stärker oxidierendes Milieu eingestellt, um die Ausbildung der Disulfidbrücken zu begünstigen. Einen Tag später wurde die Renaturierung durch Zentrifugation bei 25 800 g und 4 °C für 1 h beendet. Bei diesem Schritt wurden Aggregate entfernt, die für eine erneute Rückfaltung bei -20 °C gelagert wurden. Es folgte eine Aufkonzentrierung mittels *Cross Flow*-Filtration (Vivaflow 200) auf ein Endvolumen von 80 ml. Das Konzentrat wurde zweimalig gegen 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 mit 200 mM NaCl, 1 mM EDTA dialysiert und aus dieser Lösung heraus gereinigt (2.4.8).

2.4.8. Reinigung des B3-CxR₈

Nach Zentrifugation des aufkonzentrierten und dialysierten Rückfaltungsansatzes (2.4.7) bei 100 000 g und 4 °C über 1 h wurde aus dem Überstand das B3-CxR₈ gereinigt. Die Reinigung erfolgte in zwei Chromatographieschritten, wobei der Kationenaustauschchromatographie eine Größenausschlusschromatographie angeschlossen wurde. Zwischen den Reinigungsschritten und zum Abschluss wurde das Antikörperfragment durch eine erneute Bindung an die Ionenaustauschermatrix und eine Stufenelution aufkonzentriert.

Die Ionenaustauschchromatographie erfolgte an einer HiTrap SP HP, 5 ml SV in 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 mit 200 mM NaCl, 1 mM EDTA. Das Zielprotein wurde zunächst an der Matrix gebunden und mit 15 SV Laufpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte in einem Gradienten, bei dem die NaCl Konzentration im Puffer zunächst über 40 SV auf 1 M und dann über weitere 3 SV auf 2 M erhöht wurde. Nach Analytik mittels SDS-PAGE (2.5.3) wurden die Fraktionen, die B3-CxR₈ enthielten, vereinigt und konzentriert. Die Konzentrierung erfolgte unter denselben Pufferbedingungen und über die gleiche Säule wie zuvor die Reinigung, allerdings wurde die Salzkonzentration in einer Stufe auf 2 M NaCl erhöht.

Es folgte eine Größenausschlusschromatographie (HiLoad Superdex 75 prep grade 16/60, 120 ml SV) weiterhin mit dem 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,4 mit 200 mM NaCl, 1 mM EDTA. Nach Identifizierung der B3-CxR₈ enthaltenden Fraktionen mittels SDS-PAGE, wurden die entsprechenden Fraktionen vereinigt und es folgte eine erneute Konzentrierung.

2.4.9. Reinigung der Kopplungsprodukte

Die Kopplungsprodukte B3-PE38_{CX}, [F⁷,P³⁴]NPY-PE38 und [F⁷,P³⁴]NPY-PE38_{CX} wurden nach erfolgter Heterodimerisierung über Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Bei diesem Schritt konnten die Heterodimere von Monomeren und Homodimeren separiert werden. Die Kopplungsansätze wurden an einer Ionenaustauschermatrix (HiTrap SP HP bei

[F⁷, P³⁴]NPY-PE38_{CX} oder Q HP, 1 ml SV bei B3-PE38_{CX} und [F⁷, P³⁴]NPY-PE38) gebunden. Im Durchfluss befanden sich die Monomere mit der gleichen Ladung wie die Matrix. Der Elutionsgradient wurde zunächst über 20 SV auf 240 mM NaCl, über weitere 20 SV auf 1 M NaCl und schließlich noch über 3 SV auf 2 M NaCl eingestellt. Eluiert wurde zuerst das Kopplungsprodukt und im Anschluss der nicht fusionierte Anteil an Protein mit dem zur Matrix entgegengesetzt geladenen Fusionspeptid.

2.5. Proteinchemische und analytische Methoden

2.5.1. Peptidsynthese von NPY-Varianten

Die in dieser Arbeit verwendeten NPY-Varianten wurden freundlicherweise durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Annette Beck-Sickinger, Universität Leipzig, synthetisch hergestellt, mittels HPLC gereinigt und mir als Lyophilisat zur Verfügung gestellt (Tab. 2.7, S. 27).

Die Herstellung der linearen Peptide erfolgte über automatisierte Peptidsynthese. Die Herstellungsstrategie für CK₈-[F⁷, P³⁴]NPY und K₈xC-[F⁷, P³⁴]NPY wird im Folgenden kurz erläutert.

Für beide Peptide wurde die NPY-Kernsequenz zunächst automatisiert synthetisiert. Es wurde der N-Terminus über die Einführung von Boc-Tyr(tBu)-OH permanent geschützt und an Position 4 wurde jeweils ein orthogonal geschütztes Lysin eingeführt, um die Seitenkettenmodifikation durchzuführen.

Zur Herstellung von CK₈-[F⁷, P³⁴]NPY wurde orthogonal geschütztes Fmoc-Lys(Dde)-OH an Position 4 eingesetzt. Nach selektiver Entfernung des Dde mit Hydrazin, wurde die ϵ -NH₂-Gruppe des Lysin 4 mittels automatisierter Synthese verlängert.

Bei der Herstellung von K₈xC-[F⁷, P³⁴]NPY wurde Fmoc-Lys(Mmt)-OH an Position 4 des Kernpeptides eingesetzt. Die Abspaltung von Mmt erfolgte unter leicht sauren Bedingungen und war gefolgt von einem manuellen Anbringen von Fmoc-Ser-OH an die ϵ -NH₂-Gruppe des Lysin 4. Über das manuell eingeführte Fmoc-Ser wurde die Seitenkette automatisiert bis zum Fmoc-Leu-OH der Thrombinspaltstelle verlängert und ein Acetylierungsschritt zur Blockierung bisher entstandener Fehlsequenzen durchgeführt. Schließlich wurde der Octalysintag automatisiert angefügt.

2.5.2. Überführung eines Trifluoracetates in ein Acetat

Die synthetisch hergestellten NPY-Varianten lagen zunächst zu ca. 30 % als Trifluoracetat vor. Da die korrespondierende Trifluoressigsäure eine sehr starke Säure ist, wurden die Peptide vor ihrer Anwendung in den Versuchen durch Verdrängung mit schwächeren, weniger flüchtigen Säuren umgesalzen.

Zunächst wurden 3 mg des Peptidlyophilisates in 1 ml einer 80 mM Salzsäureverdünnung gelöst und mehrere Stunden inkubiert, bevor die Flüssigkeit zusammen mit der Trifluoressigsäure durch Lyophilisation entfernt wurde. Dieser Vorgang wurde zunächst mit 80 mM Salzsäure und dann noch zweimalig mit 5 %iger Essigsäure wiederholt, so dass am Ende das Acetatsalz vorlag.

2.5.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Elektrophorese werden Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität getrennt. Die elektrophoretische Mobilität beschreibt das Gleichgewicht zwischen Beschleunigung und Reibungskräften eines Moleküls in einem elektrischen Feld.

Bei der SDS-PAGE werden Proteine anhand ihres Laufverhaltens durch ein Polyacrylamidgel (PAGE) getrennt. Dazu werden die Proben zunächst mit Natriumdodecylsulfat (SDS) im Probenpuffer inkubiert. Dieses Detergens adsorbiert an die Proteine und führt zu einer negativen Gesamtladung und somit zu einer unidirektionalen Bewegung im elektrischen Feld. Da nach der Assoziation mit SDS oftmals das Masse-zu-Ladungsverhältnis der Proteine einander sehr ähnlich ist, wird eine Trennung relativ zur Proteinmasse erzielt. Die Proben wurden entweder unter reduzierenden Bedingungen, was durch Zugabe von β -Mercaptoethanol erzielt wurde, präpariert oder auch unter nicht reduzierenden Bedingungen. Ein Viertel des Probenvolumens wurde an entsprechendem Probenpuffer (Tab. 2.10, S. 31) zur Probe zugegeben und anschließend der Ansatz 5–20 min bei 95 °C erhitzt oder aber für 20 min bei 40 °C und 300 rpm inkubiert.

Es wurde das Prinzip der diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli (1970) angewandt, wobei ein 6 %iges Sammelgel mit 12 %igen oder 15 %igen Trenngelen kombiniert wurde. Die Durchführung erfolgte bei einer Stromstärke von 35 mA für 35–50 min.

Zur Detektion der Proteinbanden kamen zum einen die Coomassie-Brillant-Blaufärbung (Fairbanks et al., 1971) und zum anderen die sensitivere Methode der Silberfärbung (Nesterenko et al., 1994) zum Einsatz.

Densitometrie

Die Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau erlaubt eine annähernd quantitative Bestimmung gleicher Proteine innerhalb eines Gels anhand der Farbintensität der Banden im Vergleich zu einer Kalibriergeraden. Die Gele wurden mit Hilfe eines handelsüblichen Scanners (HP ScanJet 3300C) mit einer Auflösung von 600 dpi digitalisiert. Im Anschluss erfolgte die Auswertung mit dem Programm AIDA Image Analyzer.

2.5.4. Spektroskopische Methoden

Bei der Spektroskopie im Allgemeinen werden Wechselwirkungen von elektromagnetischer Strahlung mit Materie analysiert. In dieser Arbeit wurden drei spektroskopische Methoden angewandt, die im Folgenden erläutert werden.

UV/VIS-Spektroskopie

UV/VIS-Spektroskopie ist eine Methode, bei der die Lichtabsorption von Molekülstrukturen je nach Wellenlänge gemessen wird. In der Anwendung wurde sie zur Konzentrationsbestimmung von gereinigten Proteinen eingesetzt. Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan (Trp) und Tyrosin (Tyr) sowie Cystine (Disulfidbrücken) tragen zur Absorption eines Proteins bei $\lambda = 280$ nm bei. Um diese Wellenlänge herum zeigen Proteinspektren ein Maximum. Aus den Anteilen der eben genannten Strukturen in einem Protein lässt sich nach Pace et al. (1995) die spezifische Absorption (ϵ_{280nm}) des zu untersuchenden Proteins berechnen.

$$\epsilon_{280nm} [M^{-1}cm^{-1}] = 5\,500 \times n_{Trp} + 1\,490 \times n_{Tyr} + 125 \times n_{Disulfide} \quad (2.1)$$

n = Anzahl der indizierten Strukturelemente im Protein

Mithilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes und des spezifischen Absorptionskoeffizienten lässt sich aus der Absorption der Proteinlösung bei 280 nm die Konzentration errechnen.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \times c \times d \quad (2.2)$$

A : gemessene Absorption
 I_0 : Intensität des eingestrahlteten Lichtes
 I : Intensität des transmittierten Lichtes
 ϵ : molarer Absorptionskoeffizient ($M^{-1} \times cm^{-1}$)
 c : Konzentration des Proteins (mol/l)
 d : Schichtdicke der Probe (cm)

Als Besonderheit ist die Konzentrationsbestimmung der sfBFP-Varianten hervorzuheben. Hier wurde die Absorption des Chromophors bei 380 nm und der experimentell bestimmte molare Absorptionskoeffizient (3.1.2, S. 65) bei dieser Wellenlänge herangezogen, da eine nicht quantifizierte Überlappung der Chromophorabsorption bei der Absorption bei 280 nm beobachtet werden konnte. Somit war für dieses Protein die Gleichung 2.1 in der Praxis nicht anwendbar.

Fluoreszenzspektroskopie

Moleküle, die Fluorophore enthalten, emittieren Licht bei ihrem Übergang aus dem angeregten in den Grundzustand. Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin und somit auch die meisten Proteine besitzen fluoreszierende Eigenschaften. Die Gesamtfluoreszenzaktivität hängt sowohl von der Gesamtverteilung dieser Aminosäuren im Protein als auch von Umgebungsfaktoren wie der Polarität ab. Eine besondere Rolle spielen die Fluoreszenzproteine, bei denen weitere chromophore Strukturen vorhanden sind, die zusammen mit ihrer durch die Proteinfaltung gebildeten Umgebung im oftmals sichtbaren Wellenlängenbereich Licht emittieren.

In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzspektroskopie zur Analytik der sfBFP-Varianten angewandt, indem die Emissionsspektren nach Anregung bei 380 nm in 25 mM Natriumphosphat, pH 7,4; 1 mM EDTA verglichen wurden.

Circulardichroismus

Bei der Messung des Circulardichroismus wird die Differenz von links und rechts polarisiertem Licht gemessen. Chirale Zentren und generell chirale Strukturen sowie Konformations- und Umgebungseinflüsse führen zu unterschiedlicher Absorption gegensätzlich polarisiertes Lichtes. Somit lassen sich durch die Messung Rückschlüsse auf die Anteile sekundärer Strukturanteile in Proteinen ziehen.

Gemessen wurden NPY-Varianten bei 10 °C in 20 mM Tris/HCl, pH 8.0 mit 2 mM EDTA und 50 mM NaCl. Es kam eine Küvette mit 0,1 cm Schichtdicke zum Einsatz. Das Protein lag mit 100 µg /ml in Lösung vor.

Die Umrechnung der Messwerte von gemessener Elliptizität in molare Elliptizität erfolgte nach Formel 2.3

$$\Theta_{molar} = \frac{\Theta}{c \times d \times 10} \quad (2.3)$$

Θ_{molar} : molare Elliptizität
 Θ : gemessene Elliptizität (mdeg)
 c : Proteinkonzentration (mol/l)
 d : Schichtdicke (cm)

Die Bestimmung der Sekundärstrukturanteile erfolgte mit dem Dekonvolutionsprogramm „cdnn“ (Böhm et al., 1992).

2.5.5. Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation wurde für die Analytik der Interaktion zwischen den Fusionspeptiden mit Thrombinerkennungssequenz eingesetzt. Dazu wurden als Modellproteine die verschiedenen sfBFP- und MBP-Varianten verwendet, wobei jeweils Proteine mit gleicher Anzahl geladener Aminosäuren in der polyionischen Sequenz kombiniert wurden. In Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen bei 40 000 rpm für jeweils 2 Stunden bei 20 °C wurde der Heterodimerstatus der jeweiligen sfBFP-Variante verfolgt. Es wurde die Absorption bei 375 nm im Versuch aufgezeichnet und später ausgewertet. Die Versuche und Auswertung der Rohdaten wurden durch Dr. habil. Hauke Lilie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, in einer Proteome Lab XL-I von Beckman Coulter durchgeführt. Es kam ein 8-Loch-Rotor (An-50 Ti) mit Doppelsektorzellen zum Einsatz.

Drei verschiedene Fragestellungen wurden mit der analytischen Ultrazentrifugation untersucht. Zum einen wurden die ionischen Wechselwirkungen zwischen den polyionischen Fusionspeptiden analysiert, indem die Dissoziationskonstante bestimmt und im weiteren der Einfluss von NaCl auf diese Wechselwirkung quantifiziert wurde. Diese beiden Versuche wurden unter reduzierenden Bedingungen in Anwesenheit von Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) durchgeführt. In der dritten Versuchsanordnung wurde die Stärke der Disulfidbrücke untersucht. Hier erfolgte die Messung des Anteils kovalent gebundener Heterodimere unter unterschiedlichen Redoxbedingungen, eingestellt mit variierenden Verhältnissen an oxidiertem zu reduziertem Dithiothreitol (DTT_{ox} und DTT).

K_D -Bestimmung der polyionischen Fusionspeptide

Für die Bestimmung des K_D -Wertes zwischen den geladenen Ketten der polyionischen Fusionspeptide wurden reduzierende Bedingungen eingestellt (25 mM Natriumphosphat, pH 7,4 mit 1 mM EDTA, 1 mM TCEP), um die Ausbildung des Disulfides zu verhindern. Es wurde zu 1,5 μM sfBFP-CxE_n die entsprechende Variante MBP-CxR_n in aufsteigenden Konzentrationen zugegeben (MBP-CxR₆: 0–150 μM / MBP-CxR₈: 0–100 μM / MBP-CxR₁₀: 0–40 μM).

Zusätzlich zu den Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen wurde bei diesen Versuchen mit denselben Proben noch ein Gleichgewichtslauf angeschlossen. Dieser erfolgte bei 12 000 rpm über mindestens 25 h.

Die Auswertung erfolgte anhand der Signalstärke (Gleichung 2.4) und anhand des Massenwirkungsgesetzes (Gleichung 2.5). Durch Umformung gelangt man zu Gleichung 2.6.

$$s = s_0 + ds \times \frac{D}{M_t} \quad (2.4)$$

s : Messsignal
 s_0 : Grundsignal
 ds : Differenz s_{max} und s_{min}
 D : Dimerkonzentration
 M_t : Gesamt MBP

$$K_D = \frac{M_f \times B_f}{D} \quad (2.5)$$

mit

$$B_f = B_t - D$$

$$M_f = M_t - D$$

K_D : Dissoziationskonstante
 B_f und B_t : Konzentration von freiem und Gesamt-sfBFP
 M_f und M_t : Konzentration von freiem und Gesamt-MBP

$$\Leftrightarrow D = \frac{M_t + B_t + K_D}{2} \pm \sqrt{-\left(\frac{M_t + B_t + K_D}{2}\right)^2 + M_t \times B_t} \quad (2.6)$$

$$\Delta G^0 = -R \times T \times \ln K_D \quad (2.7)$$

Zur weitergehenden Auswertung wurde ein Kooperativitätsmodell herangezogen. Dieses basiert auf der Annahme, dass ausgehend von einer initialen Affinität (K_i) jede zusätzliche Ladung das polyionische System um einen konstanten Kooperativitätsfaktor (x) stabilisiert. Somit können mit Hilfe der daraus resultierenden Gleichung 2.8 Vorhersagen zu Wechselwirkungen polyionischer Fusionspeptide anderer Längen (mit n Ladungen) gemacht werden.

$$K_a = \frac{1}{K_D} = K_i \times x^{(n-1)} \quad (2.8)$$

Bestimmung des IC₅₀ von NaCl

Die Bestimmung des IC₅₀ von NaCl auf die Assoziation der polyionischen Fusionspeptide erfolgte unter identischen Pufferbedingungen wie bei der K_D -Bestimmung (25 mM Natri-

umphosphat, pH 7,4 mit 1 mM EDTA, 1 mM TCEP). Jedoch wurden die Proteine jeweils äquimolar zu 20 μM eingesetzt und NaCl in Konzentrationen von 0–1 000 mM zugesetzt.

Aus den experimentellen Daten wurde durch eine numerische Näherung mit Hilfe des Programms DynaFit (Kuzmic, 1996) die Salzkonzentration bestimmt, bei welcher das Assoziat zur Hälfte dissoziiert war. Aus diesem IC_{50} -Wert wurde dann in Anlehnung an die Gleichung von Cheng und Prusoff (2.9) der K_I bestimmt.

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{S}{K_D}} \quad (2.9)$$

K_I : Inhibitorische Konstante von NaCl auf die ionischen Wechselwirkungen der polyionischen Fusionspeptide

IC_{50} : Inhibitorische Konstante von NaCl unter Versuchsbedingungen

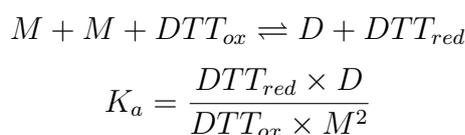
S : MBP-CxR_n-Konzentration (M)

K_D : Dissoziationskonstanten der polyionischen Systeme

Bestimmung des Redoxpotentials der Disulfidbindung zwischen den polyionischen Fusionspeptiden mit Thrombinerkennungssequenz

Die Einstellung des Redoxgleichgewichtes erfolgte einerseits ausgehend vom Kopplungsprodukt nach kupferkatalysierter Luftoxidation (2.5.11) und andererseits in einem zweiten Versuch ausgehend von den Monomeren. Für die Einstellung verschiedener Redoxbedingungen wurden immer 50 mM DTT_{ox} und verschiedene Konzentrationen DTT_{red} (0/1/2/5/10/20/50 μM) dem Puffer zugegeben. Die Ansätze beinhalteten jeweils 10 μM beider Proteine und wurden in gut entgastem Redoxpuffer (25 mM Natriumphosphat, pH 8.0 mit 1 mM EDTA, DTT und DTT_{ox}) mit Stickstoff überschichtet für 20 h bei 20 °C inkubiert. Zum Abschluss wurde das eingestellte Redoxgleichgewicht durch Inkubation mit 40 mM Jodacetamid und Absenken des pH-Wertes auf ca. 7,0 zum Stillstand gebracht. Die Ansätze wurden verdünnt auf 1,5 μM sfBFP-Variante und unter Zusatz von 1 M NaCl, um rein ionisch stabilisierte Heterodimere zu unterdrücken, in der analytischen Ultrazentrifuge vermessen.

Die Auswertung erfolgte ausgehend vom Massenwirkungsgesetz und der zu 2.10 umgeformten Gleichung. Für die hier vollzogenen Berechnungen wurde die chemische Aktivität gleich der Proteinkonzentration gesetzt.



mit

$$D = \frac{M_t - M_f}{2}$$

$$M = -\frac{1}{4 \times K_a} \times \frac{DTT_{red}}{DTT_{ox}} \pm \sqrt{\left(\frac{1}{4 \times K_a} \times \frac{DTT_{red}}{DTT_{ox}}\right)^2 + \left(\frac{M_t}{2 \times K_a} * \frac{DTT_{red}}{DTT_{ox}}\right)} \quad (2.10)$$

M : Monomeraktivität

D : Dimeraktivität

M_t : Aktivität an Gesamt-Monomer

Mit Hilfe der Gleichgewichtskonstante und der Nernst-Gleichung (Gleichung 2.11) lässt sich das Redoxpotential errechnen.

$$\Delta E_D^{0'} = \Delta E_{DTT}^{0'} - \frac{R \times T}{z \times F} \times \ln K_a \quad (2.11)$$

$\Delta E_{DTT}^{0'}$: Redoxpotential von DTT (0,366 V (Cleland, 1964))

R : Gaskonstante (8,3144621 J/(mol×K))

T : Temperatur (295,15 K)

z : übertragene Elektronen ($z = 2$)

F : Faraday-Konstante (96485,3365 J/(V×mol))

Dieses erlaubt eine Aussage über die freie Energie der Bindung. Sie wird mithilfe der Gibbs-Gleichung (Gleichung 2.12) berechnet.

$$\Delta G^{0'} = -z \times F \times \Delta E_D^{0'} \quad (2.12)$$

2.5.6. Ionenaustauschchromatographie zur Analytik der polyionischen Fusionspeptide

Das Prinzip der Ionenaustauschchromatographie wurde bereits im Abschnitt 2.4.2 beschrieben. Die Stärke der Bindung eines Proteins an eine geladene Matrix erfolgt in Abhängigkeit seiner Ladung. Da in dieser Arbeit mit sfBFP- und MBP-Varianten mit unterschiedlich langen polyionischen Sequenzen gearbeitet wurde, wurde mit dieser Methode untersucht, inwiefern dieser Ladungsunterschied am Bindungsverhalten an die Matrix sichtbar wird. Dazu wurden die gereinigten Proteine auf die dem Fusionspeptid entgegengesetzt geladene Säule gebracht und im Gradient eluiert.

Von den drei sfBFP-Varianten wurden in getrennten Läufen je 200 µl einer ca. 28 µM Lösung auf die Anionenaustauschersäule HiTrap Q HP (1 ml SV), äquilibriert mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 mit 1 mM EDTA, geladen. Nach Waschen mit 10 SV des Äquilibrierungspuffers folgte ein Gradient unter Zusatz von 0–2 M NaCl über 20 SV. Die Detektion des Fluoreszenzproteins erfolgte über die Chromophorabsorption bei 380 nm.

Die MBP-Varianten mit den Argininsequenzen wurden im Gemisch auf die Anionenaustauschersäule HiTrap SP HP (1 ml SV), äquilibriert mit 50 mM MES, pH 6,2 mit 1 mM EDTA, aufgetragen und über einen Gradienten von 25 SV mit 0–2 M NaCl eluiert. Es erfolgte die Detektion bei 280 nm.

Ferner wurde jeweils ein Ansatz eines Thrombinverdaus einer der Varianten auf die Säule aufgetragen.

2.5.7. Massenspektrometrie

Massenspektrometrie wurde als analytische Methode verwendet, um Massen zu verifizieren oder auch Modifikationen zu erkennen. Die Proben wurden zur Vorbereitung mit C₄-Matrix beladenen Pipettenspitzen (ZipTip, Millipore) nach Herstellerprotokoll entsalzen. Gemessen wurde mit dem Ultraflex-II TOF/TOF Massenspektrometer mit MALDI-Quelle der Firma Bruker Daltonik und mit dem Synapt G2 Q-TOF-Massenspektrometer mit nanoESI-Quelle gekoppelt mit dem nanoACQUITY UPLC System der Firma Waters. Die Messungen erfolgten freundlicherweise durch Frau Dr. Angelika Schierhorn, Serviceeinheit für Massenspektrometrie am Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

2.5.8. Nachweis freier Thiolgruppen

Der Nachweis freier Thiolgruppen erfolgte nach der colorimetrischen Methode (Ellman, 1959). Das eingesetzte Reagenz 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) reagiert bei pH 8,0 quantitativ mit freien Thiolgruppen. Dabei entsteht das gelbe 2-Nitro-5-thiobenzoat-anion, welches bei einer Wellenlänge von 412 nm detektierbar ist. Über den molaren Absorptionskoeffizienten von 13 600 M⁻¹cm⁻¹ lässt sich die Konzentration der freien Thiolgruppen berechnen. In dieser Arbeit wurden 0,1 mM DTNB im Reaktionsansatz eingesetzt. Es wurde aus einer Stammlösung (2 mM DTNB in 50 mM Natriumacetat, pH 5,5) 1:20 in 100 mM Tris, pH 8,0 verdünnt. Die Messung erfolgte nach 5 min Inkubationszeit.

2.5.9. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung mit Coomassie-Brillant-Blau nach (Bradford, 1976) beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm infolge der Bindung des Farbstoffes an Proteine in saurem Milieu. Mit der Messung der Absorption

und Erstellung einer Kalibriergeraden kann die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmt werden. Es wurde der Bio-Rad Proteinassay nach Angaben des Herstellers bei der Proteinbestimmung der Resolubilisate nach IB-Präparation eingesetzt (2.4.6). Die Kalibriergerade wurde mit BSA als Standardprotein erstellt.

2.5.10. Quantitative Fällung von Proteinen mit Natriumdeoxycholat/Trichloressigsäure (NaDOC-Fällung)

Mit dieser Methode nach Arnold and Ulbrich-Hofmann (1999) kann Protein quantitativ gefällt werden. Die Methode kam in dieser Arbeit für die Konzentrierung aus verdünnten Lösungen und zum Entfernen von Guanidiniumhydrochlorid vor SDS-PAGE (2.5.3) zum Einsatz. Der Proteinlösung wurden 10 % (v/v) 1%ige NaDOC-Lösung zugegeben sowie 20 % (v/v) 50%ige TCA-Lösung. Der Ansatz wurde gründlich gemischt. Das Präzipitat wurde in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (15 min bei 13 000 rpm) und anschließend in Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Trocknung wurden die Präzipitate in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

2.5.11. Heterodimerisierung von Proteinen über polyionische Fusionspeptide

Die Herstellung der hier eingesetzten Heterodimere erfolgte über polyionische Fusionspeptide. Die ionischen Wechselwirkungen bewirken die Heterodimerassoziation aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen in einer Umgebung geringer Ionenstärke. Zusätzlich werden die in den polyionischen Peptiden integrierten Cysteinreste in räumliche Nähe zueinander gebracht und bilden unter entsprechend eingestellten Redoxbedingungen eine Disulfidbrücke, die beide Proteine kovalent miteinander verbindet.

Kopplung mittels Redoxshuffling

Für die präparative Herstellung von Heterodimeren kam in dieser Arbeit standardmäßig Redoxpuffer, pH 8,0 (20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA) mit 100 μ M Redoxsystem aus reduziertem (20 μ M) und oxidiertem (80 μ M) Glutathion zum Einsatz. Es wurde bei 22 °C über mehrere Stunden inkubiert. Die Verhältnisse der Reaktionspartner zueinander sowie die genaue Inkubationszeit sind in Tabelle 2.15 gelistet.

Tabelle 2.15.: Reaktionsbedingungen für die präparative Heterodimerisierung im Redoxshufflingpuffer

Protein 1	μ M	Protein 2	μ M	Reaktionszeit
CK ₈ -[F ⁷ , P ³⁴]NPY	4	E ₈ C-PE38	4	8 h
K ₈ xC-[F ⁷ , P ³⁴]NPY	4	E ₈ xC-PE38	4	25 h
dsFvB3-CxR ₈	4	E ₈ xC-PE38	9	24 h

Kopplung mit kupferkatalysierter Luftoxidation

Das Prinzip der kupferkatalysierten Luftoxidation wurde für die Oxidation der MBP-Varianten mit den entsprechenden sfBFP-Partnern zum Heterodimer zur Analytik in der Ultrazentrifuge angewandt (2.5.5). Die Proteine lagen äquimolar mit 30 μM im EDTA- und NaCl-freien Puffer (25 mM Natriumphosphat, pH 8,0) vor. Zunächst wurden sie durch Zugabe von 60 μM DTT vorreduziert. Nach 30 min wurde dann 1 μM CuCl_2 zugesetzt. Die Luftoxidation erfolgte über 48 h bei 22 °C .

2.5.12. Thrombinverdau der polyionischen Fusionspeptide

Für den Thrombinverdau wurde den Proteinlösungen 0,05 NIH-U Thrombin pro Mikrogramm Protein zugesetzt. Dabei lagen die Proteine für die Anwendung auf den Zellen in PBS (1,68 mM Na_2HPO_4 , 1,47 mM KH_2PO_4 , pH 7,4 mit 2,68 mM KCl, 137 mM NaCl) vor. Bei Kopplungsprodukten und positiv geladenen *tags* erfolgte der Verdau für 4 h bei 22 °C. Aufgrund der schlechteren Affinität der negativ geladenen Fusionspeptide wurden diese 21 h verdaut. Die verlängerte Inkubation galt auch für $[\text{F}^7, \text{P}^{34}]\text{NPY-PE38}_{\text{CX}}$.

2.6. Zellbiologische Methoden

2.6.1. Stammhaltung humaner, adhärenter Zellen

In dieser Arbeit kamen ausschließlich adhärent wachsende, humane Zelllinien zum Einsatz. Die routinierte Stammhaltung und Pflege beinhaltete die Anzucht in 25 cm^2 -Kulturflaschen im entsprechenden Medium (Tab. 2.4 Teil 2). Das Wachstum erfolgte in Brutschränken der Firma Heraeus bei 37 °C , 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchte. Alle benötigten Lösungen wurden vor Verbringen auf die Zellen auf 37 °C vorgewärmt.

Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage, bei Erreichen von ungefähr 80 % Konfluenz, passagiert. Dazu wurde das alte Medium durch Absaugen entfernt und die Zellen kurz mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Zum Lösen und Vereinzeln der Zellen wurden sie mit einer Trypsin-EDTA-Lösung 3–5 min inkubiert. Der Prozess wurde durch Zugabe des Kulturmediums gestoppt, wenn ein Abrunden und Lösen der Zellen mikroskopisch sichtbar waren. Anschließend wurden die Zellen noch kurz mechanisch durch Auf- und Abpipettieren suspendiert. Ein Teil der Zellsuspension wurde in eine neue Kulturflasche, in die 8–10 ml frisches Medium vorgelegt waren, passagiert.

Für Experimente wurden die Zellen in bestimmten Konzentrationen in *Well*-Platten verschiedener Größe (12-, 24-, 96-*well*-Platten) passagiert. Dazu wurde nach dem Trypsinieren die Zelldichte der Suspension in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und entsprechende Verdünnungen hergestellt und ausgesät.

Zellen wurden maximal bis zur 30. Passage eingesetzt.

Zum Betrachten der Zellen und Auszählen wurde ein Inversmikroskop, TELVAL3, verwendet.

2.6.2. Kryokonservierung von Zellen

Für die langfristige Aufbewahrung eukaryontischer Zellen wurden diese bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Vorbereitung dieser Lagerung wurden die Zellen bis zu 80 % Konfluenz in 75 cm^2 -Flaschen kultiviert und in Kryomedium (10 % DMSO in fetalem Rinderserum) mechanisch mit einem Zellschaber und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren suspendiert. Die Suspension wurde in 1 ml Volumina in Kryoschraubgefäßen aliquotiert. Die Abkühlung erfolgte langsam mit -1 °C pro Minute durch Abkühlen in einem Isopropanol befülltem Behälter bis auf -80 °C . Im Anschluss wurden die Kryokulturen direkt in die Stickstofflagerung überführt.

2.6.3. Reaktivierung kryokonservierter Zellen

Für die Reaktivierung der gelagerten Zelllinien wurde ein Gefäß aus der Flüssigstickstofflagerung entnommen und zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellen wurden sofort in einer vorgewärmten 25 cm^2 -Flasche in 10 ml Kulturmedium verdünnt. Darin konnten sie bei Standardbedingungen anwachsen. Am Folgetag wurde entweder nur das Medium gewechselt oder je nach Zelldichte auch direkt die erste Passage vorgenommen.

2.6.4. Internalisierungsstudien

Die Internalisierungsstudien wurden von Dr. Sven Hofmann, Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Annette Beck-Sickinger, Universität Leipzig durchgeführt.

Es wurde mit stabil transfizierten HEK293-Zellen gearbeitet, die mit gelb fluoreszierendem Protein markierte hY_1R oder hY_2R exprimieren (HEK293_hY1R_EYFP und HEK293_hY1R_EYFP). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM/Ham's F12 (1:1 v/v) (Lonza, Toulouse, Frankreich) supplementiert mit 15 % (v/v) hitzeinaktiviertem FBS (Biochrom, Merck KGaA, Berlin, Deutschland) und Hygromycin B (100 $\mu\text{g/ml}$, Invivogen, San Diego, CA, USA). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden nach Hofmann et al. (2013) durchgeführt.

Die Zellen wurden in einem $\mu\text{-Slide 8 well chambered}$ Deckglas (ibidi, Martinsried, Deutschland) ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen 30 min in Opti-MEM *reduced serum* Medium (Gibco Life Technologies, Darmstadt, Germany) inkubiert und dann eine Zellkernfärbung mit Hoechst 33342 (0,5 mg/ml, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) durchgeführt. Die verschiedenen NPY-Peptide wurden in Tris-Puffer (20 mM Tris, pH 8,0 mit 50 mM NaCl, 2 mM EDTA) gelöst und Verdünnungen mit einer Endkonzentration von 100 nM in Opti-MEM (10 % Tris-Puffer/90 % Opti-MEM v/v) hergestellt.

Die Stimulation der Zellen erfolgte bei 37 °C für 1 h. Als Kontrollen dienten Zellen, die in 10 % Tris-Puffer/90 % Opti-MEM (v/v) ohne Peptid inkubiert wurden. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mit einem ApoTome Imaging System, ausgerüstet mit einer Heating Insert P Lab-tek S1 Einheit und AxioVision 4.6 Software.

2.6.5. Zytotoxizitätsstudien

Um die biologische Aktivität der Immunotoxine zu quantifizieren, wurde die Wirkung auf eukaryontische Zellen getestet. Diese wurden 48 h mit definierten Toxinkonzentrationen inkubiert und die Lebendzellzahl im Anschluss quantifiziert. Aus der Abhängigkeit von Lebendzellzahl und Toxinkonzentration wurde die effektive halbmaximale Konzentration (EC₅₀) mittels Regression berechnet.

Zunächst wurden, wie in 2.6.1 beschrieben, 25 000 Zellen pro *well* und 500 µl in 24-*well*-Platten ausgesät. Nach 24 h Anwuchszeit wurde das Medium entfernt und durch 400 µl frisches ersetzt. Diesem wurden im Vierfachansatz je 100 µl einer Toxinlösung pro *well* zugesetzt. Es folgte eine Inkubation über 48 h. Die Versuche für [F⁷, P³⁴]NPY-PE38_C auf MCF7 erfolgten über 2,5 h Inkubation der Zellen mit Toxin und anschließendem Waschen und Mediumswechsel. Auch in diesem Fall wurde nach 48 h die Zytotoxizität bestimmt.

Für die Bestimmung der Zellzahl und des Anteils lebender Zellen wurden die gesamten Zellen aus den *wells* gesammelt. Dazu wurde zunächst der Überstand abgenommen und in Reaktionsgefäße überführt, die Zellen mit 750 µl PBS gewaschen und dieses ebenfalls überführt. Die Zellen wurden nach Lösen mit 100 µl Trypsin-EDTA und Abstoppen der Reaktion mit 900 µl der entsprechenden Medium-PBS-Mischung zusätzlich mechanisch durch Pipettieren resuspendiert und zur restlichen Lösung im Gefäß zupipettiert. Es folgte das Pelletieren der Zellen in der Zentrifuge bei 4 °C , 500 g für 10 min. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 1 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Entfernen der Waschlösung wurden die Zellen in 100 µl Propidiumjodidlösung (2,5 µg/ml PBS) aufgenommen und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Propidiumjodid interkaliert in DNA, wodurch seine Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Lösung deutlich ansteigt. Da es intakte Membranen gesunder Zellen nicht passiert, werden nur tote und geschädigte Zellen gefärbt. Nach der Inkubation wurde das Probevolumen mit PBS auf 200 µl erhöht und die so vorbereiteten Zellsuspensionen dunkel bei 4 °C bis zur anschließenden durchflusszytometrischen Messung (2.6.6) gelagert.

2.6.6. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde am FACS calibur Gerät von Becton-Dickinson ausgeführt, wobei FACS für *fluorescence associated cell sorting*, also die fluoreszenzbasierte Zellsortierung steht. In dieser Arbeit wurde zwar nicht sortiert, jedoch wurden die Einzelzellen an-

hand ihrer Fluoreszenz und Lichtstreuungseigenschaften einzeln analysiert. Im FACS-Gerät werden die Zellen innerhalb eines Hüllstroms durch hydrodynamische Fokussierung perl-schnurförmig aufgereiht und passieren einzeln ein optisches System mit einem Argonlaser, der Licht der Wellenlänge 488 nm abstrahlt. Detektiert werden durch verschiedene Filter und Detektoren sowohl Streulicht zu Aussagen über Größe und Granularität der Zellen als auch die Fluoreszenzemission der Zellen. Für die Zytotoxizitätsmessungen wurde die Größe der Zellen sowie deren Propidiumjodidfluoreszenz gemessen. Vermessen wurde nicht die Gesamtprobe, sondern das Aliquot, was in 35 sec die Messzelle durchlief.

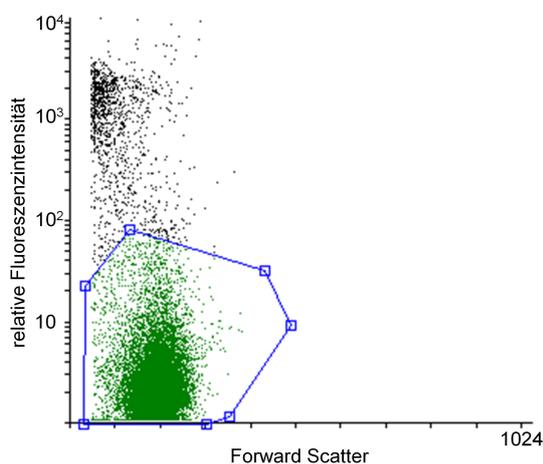
Die Durchführung erfolgte mit den in Tabelle (2.16) eingestellten Geräteparametern in der Steuerungssoftware CellQuestPro.

Tabelle 2.16.: Geräteparameter für Zytotoxizitätsstudien

alle Zelllinien				
Flow:		high		
Messdauer:		35 sec		
MCF7-Zellen				
Detektor	Spannung	Amplifier	Gain	Mode
FSC	E^{-1}	4,3		lin
SSC	340	1,00		lin
FL2	560	1,00		lin
SK-N-MC-Zellen				
Detektor	Spannung	Amplifier	Gain	Mode
FSC	E^{-1}	4,37		lin
SSC	340	1,00		lin
FL2	552	1,00		lin

Zur Auswertung kamen die Programme Flowing Software 2.5 und CellQuestPro zum Einsatz. Die Daten wurden in sogenannten DotPlots zunächst graphisch analysiert. In dieser Darstellung werden die Zellen entsprechend ihrer relativen Größe und gelbroten Fluoreszenzintensität als Punkte in einem Graphen dargestellt. Es wurden die Zellen mit niedriger Fluoreszenz der lebenden Population zugerechnet (Abb. 2.2).

Um Ergebnisse verschiedener Ansätze zu vergleichen, wurden die Werte normalisiert, indem in jedem Versuchsansatz die höchste Zellzahl als 100 % und keine Zellen als 0 % definiert wurden. Die Fehler berechnen sich aus der Standardabweichung der Vierfachansätze. Zur Berechnung der EC_{50} -Werte wurden die Prozent lebender Zellen gegen die logarithmierte Toxinkonzentration aufgetragen und im Programm SigmaPlot nach Gleichung 2.13 eine

**Abbildung 2.2.:**

Darstellung eines DotPlots zur Auswertung der FACS-Daten. Es wurden die Daten des *Forward Scatter*-Signals als relatives Maß für die Größe der Zellen sowie das Fluoreszenzsignal als Maß für die Färbung durch Propidiumiodid aufgetragen. Zellen mit einer schwachen Fluoreszenzintensität werden als Lebendpopulation definiert (grün).

Regression erstellt, die den EC_{50} beinhaltet.

$$y = y_{min} + \frac{y_{min} - y_{max}}{1 + 10^{(\log EC_{50} - x) \times hillslope}} \quad (2.13)$$

y : Lebendzellzahl (%)

EC_{50} : Konzentration des halbmaximalen Effektes (M)

x : Konzentration des untersuchten Proteins (M)

$hillslope$: Faktor zur Anpassung der Steigung

Bei mehreren Messreihen wurden die normierten Werte einer Varianzanalyse unterzogen und auf Homogenität geprüft (Chi-Quadrat-Homogenitätstest bei zwei Messreihen und Bartlett-Test bei mehr Messreihen). Konnte auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ Homogenität gezeigt werden, so wurden die Daten zusammengenommen und daraus der EC_{50} nach Gleichung 2.13 bestimmt (Bleymüller and Weißbach, 2015; Sachs, 1999).

2.6.7. Kristallviolettassay

Zur Analytik der Zellzahl auch in großen Ansätzen ist die Quantifizierung der Zellen mit Kristallviolett eine effektive Methode (Gillies et al., 1986). Sie erlaubte in dieser Arbeit die parallele Bestimmung größerer Versuchsansätze in kleinen Volumina (96-well-Platten) und auch die Auswertung zu unterschiedlichen Zeitpunkten, indem Zellen zunächst mit 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert wurden, was sie, bei 4 °C mit PBS beschichtet, einige Tage lagerbar machte. Für die Auswertung wurden die Zellen eines Versuches mit dem Triphenylmethanfarbstoff (0,02% in PBS) 30 min angefärbt. Nach gründlichem Waschen mit Wasser zum Entfernen nicht aufgenommenen Farbstoffes wurde intrazelluläres Kristallviolett mit 180 µl 70% Ethanol pro well über 3 h herausgelöst. Die Absorption der Lösung bei 578 nm korrelierte mit der Zellzahl (Reile et al., 1990). Die Ansätze erfolgten für die Kontrollen

und jede Toxinkonzentration in 16facher Bestimmung, wobei bei der Auswertung Werte mit Schwankungen, die größer als die doppelte Standardabweichung waren, nicht berücksichtigt wurden. Aufgrund der Vielfältigkeit dieser Methoden konnten der Einfluss verschiedener B3-PE38_C Konzentrationen auf die Wachstumskinetik von MCF7-Zellen über mehrere Tage (2.6.7), der Einfluss in Abhängigkeit der Inkubationszeit auf das Wachstum (2.6.7) sowie das Zellwachstum nach mehrfacher Applikation (2.6.7) untersucht werden.

Wachstumskinetik

Die Wachstumskinetik wurde über die Zeitpunkte $t = 0, 48, 96, 144, 196$ h bestimmt. Für jeden Zeitpunkt war eine 96-well-Platte vorgesehen, die mit 750 Zellen pro Kavität angeimpft und zunächst 24 h inkubiert wurde. Es wurde das Wachstum nur in Medium, in 160 μ l Medium mit 40 μ l PBS anstelle entsprechender Toxinverdünnung und in Toxinverdünnung mit Endkonzentrationen von 0,2 nM, 1,0 nM und 5 nM verfolgt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde je eine Platte mit Zellen fixiert, in PBS gelagert und am Ende der Versuchsreihe gefärbt und vermessen.

In der Auswertung wurde eine sogenannte T/C-Korrektur nach Gleichung 2.14 durchgeführt (Bernhardt et al., 1992). Diese Berechnung erlaubt die Differenzierung zwischen zytotoxischen, zytocidalen und zytostatischen Effekten auf die Zellen anhand der Relation des Wachstums der behandelten zum Wachstum der Kontrollzellen.

$$T/C_{korrr}(\%) = \frac{A_T - A_{c,0}}{A_C - A_{c,0}} \times 100 \quad (2.14)$$

A_T : Absorption toxinbehandelter Zellen

A_C : Absorption Kontrollzellen

$A_{c,0}$: Absorption Kontrollzellen zum Zeitpunkt $t = 0$

Zeitabhängige Applikation

In diesem Versuchsansatz wurde untersucht, wie sich die Dauer der Toxinapplikation auf das Zellwachstum auswirkt. Auch hier wurden 750 Zellen pro Kavität ausgesät und einen Tag vorinkubiert. Es wurde mit 5 nM [F⁷, P³⁴]NPY-PE38_C-Konzentration gearbeitet. Ab Beginn der Inkubation wurde nach 30, 60, 120 und 240 min die Toxinverdünnung entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und in 200 μ l Medium weiter inkubiert. Zusätzlich wurde eine Messreihe dauerhaft in der Toxinverdünnung belassen. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 48, 96, 144, 196$ h wurden die Zellen fixiert und mittels Kristallviolettassay ausgewertet.

Mehrfachapplikation

Für die Mehrfachapplikation wurden 750 Zellen pro Kavität im 96-*well*-Format ausgesät. Nach 24 h Anwachsen wurde das erste Mal Toxin appliziert. Dazu wurden die Zellen mit 100 µl Toxinverdünnung in Medium (0,25/ 0,5/ 1,0/ 2,5 nM) inkubiert. Nach diesem Prinzip folgten auch die zweite und dritte Applikation im Abstand von jeweils 48 h, wobei bei den Zellen, die nicht neu inkubiert wurden, das Medium gewechselt wurde. Alle Ansätze wurden dann 144 h nach Beginn der ersten Inkubation fixiert und gefärbt.

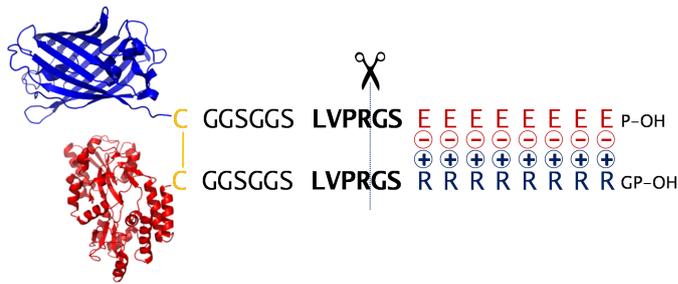
3. Ergebnisse

Polyionische und cysteinhaltige Fusionspeptide haben sich als sehr vielfältig einsetzbares, modulares System erwiesen, um effizient Heterodimere in Form von Immunkonjugaten herzustellen (Lilie et al., 2013; Richter et al., 2001; Kleinschmidt et al., 2003; Kurschus et al., 2004; Bergelt et al., 2009; Frost, 2009). Die kovalente Fusion von Proteinen über dieses System hat den Vorteil hoher Ausbeuten auch schon bei geringen Proteinkonzentrationen im mikromolaren Bereich. Ebenso ist die Herstellung der Einzelkomponenten nach bereits etablierten Protokollen weiterhin möglich. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, durch die stabile Interaktion mit Ionenaustauschermatrizes die Reinigung zu vereinfachen. Des Weiteren kann die matrixassoziierte Faltung durch sie ermöglicht werden. Die Fusionspeptide sind somit über die Dimerisierung hinaus in Bezug auf die Herstellung der Ausgangsproteine von Nutzen. Die biologische Aktivität der Einzelproteine bleibt in der Regel nach Einführung der *tags* erhalten (Lilie et al., 2013).

Das über die klassischen Fusionspeptide hergestellte Heterodimer B3-PE38 wurde in vorhergehenden Arbeiten ausführlich hinsichtlich seiner biologischen Aktivität analysiert und konnte mit LMB-7 (Brinkmann et al., 1992), dem genetisch fusionierten Analogon, verglichen werden. Dabei zeigten In-vitro-Versuche in Zellkultur für beide Konstrukte sehr ähnliche toxische Aktivitäten, die im Mausmodell allerdings so nicht bestätigt werden konnten (Frost, 2009).

Eine Weiterentwicklung dieser Fusionspeptide in dieser Arbeit soll dazu führen, dass die entsprechenden Fusionskonstrukte auch in vivo die erwartete biologische Aktivität zeigen. Dabei sollen die Vorteile der Fusionstechnologie gewahrt bleiben. Hierzu sollen nach erfolgreicher Heterodimerisierung die polyionischen Sequenzen der *tags* mithilfe eines Thrombinverdau entfernt werden. Dazu wurde das Cystein der Fusionspeptide proteinnah positioniert und zwischen Cystein und polyionischer Kette eine Sequenz aus neutralem Linker und Thrombinerkennungssequenz eingeführt (Abb. 3.1). Dies gewährleistet nach Abspaltung der polyionischen Sequenzen weiterhin die kovalente Verbrückung der Fusionspartner aufgrund der verbleibenden Disulfidbindung.

Zunächst wurde der Prozess der Heterodimerisierung der neu designten, durch Thrombin spaltbaren Fusionspeptide biophysikalisch analysiert. Die Ergebnisse werden im nun folgenden Teil (Abschnitt 3.1, Seite 64) dargestellt. Es folgt die Analytik der biologischen Aktivität des Modellkonjugates, wegen des weiterentwickelten *tags* nun als B3-PE38_{CX} (Konjugat voller Länge, inklusive polyionischer Sequenz) oder B3-PE38_C (verdautes Konjugat, ohne

**Abbildung 3.1.:**

Schema der spaltbaren polyionischen Fusionspeptide, an beiden Fusionspartnern C-terminal lokalisiert. Am C-Terminus der Proteine MBP (rot) und sfBFP (blau) sind zunächst die Cysteine (orange) lokalisiert. Es folgen ein neutraler *Linker* (schwarz), die Thrombinerkennungssequenz (**schwarz**), und die polyionische Sequenz (rot und blau).

polyionische Sequenzen) gekennzeichnet (Abschnitt 3.2, S. 77).

Um den flexiblen Einsatz der Fusionspeptide im Kontext unterschiedlicher Konjugate zu zeigen, wurde in einem weiteren Schritt das Antikörperfragment dsFvB3 durch ein Peptidhormon ersetzt. Das 36-aminosäurenlange $[F^7, P^{34}]NPY$ ist ein selektiver Ligand des G-Protein-gekoppelten Rezeptors hY_1 , der brustkrebsassoziiert überexprimiert wird. Mit diesem Konstrukt wurde anstelle eines Immuntargetings des Toxins eine Rezeptorinternalisierung angestrebt. Der polyionische *tag* wurde über klassische Peptidsynthese an einer Lysin-Seitenkette anstelle der Hauptkette eingefügt. Für die Herstellung dieses Konstruktes kamen sowohl das klassische Fusionspeptid ohne Thrombinschnittstelle als auch das weiterentwickelte, spaltbare Fusionspeptid zum Einsatz. Die Analytik der biologischen Aktivität der Konstrukte ($[F^7, P^{34}]NPY-PE_{38}$) und ($[F^7, P^{34}]NPY-PE_{CX}/[F^7, P^{34}]NPY-PE_C$) wird in Abschnitt (3.3, Seite 86) gezeigt.

3.1. Analytik der Kopplungseigenschaften der spaltbaren Fusionspeptide

Die Kopplungseigenschaften der spaltbaren Fusionspeptide wurden hinsichtlich verschiedener Aspekte untersucht:

- die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Peptiden (Abschnitt 3.1.4, Seite 71)
- der Einfluss der Ionenstärke auf die Wechselwirkungen (Abschnitt 3.1.5, Seite 73)
- die Bildung der kovalenten Bindung durch Ausbildung einer Disulfidbrücke in Abhängigkeit des Redoxsystems (Abschnitt 3.1.6, Seite 75)

Bei diesen Untersuchungen wurde zusätzlich der Einfluss der Länge der polyionischen Sequenzen analysiert. Es kamen spaltbare Fusionspeptide mit sechs, acht und zehn geladenen Aminosäureresten ($n = 6, 8$ oder 10) zum Einsatz. Dazu wurden als Modellsystem jeweils C-terminal Maltosebindeprotein mit den Argininsequenzen verschiedener Länge ($MBP-CxR_n$)

und *superfolder blue fluorescent protein* (sfBFP) mit den Glutamatsequenzen (sfBFP-CxE_n) hergestellt. Paare mit jeweils gleicher Anzahl geladener Reste wurden heterodimerisiert.

Ursprünglich war vorgesehen, die Kopplungseigenschaften der polyionischen Fusionspeptide anhand der Interaktion von sfBFP-CxE_n mit sfGFP mit Polyargininfusionspeptiden (sfGFP-CxR_n) zu untersuchen. Methodisch hätte mit diesem Proteinpaar der Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) gemessen werden können. Jedoch zeigte zum einen sfGFP-CxR_n eine hohe Aggregationstendenz. Zum anderen wurde für *green fluorescent protein* (GFP) eine Dimerisierungstendenz mit einer Dissoziationskonstante von ca. 100 µM beschrieben (Phillips Jr, 1997). Diese Assoziation ist auch bei sfGFP und sfBFP zu erwarten und würde die polyionisch vermittelte Assoziation synergistisch unterstützen und damit die Analyse der polyionischen Fusionspeptide stark verfälschen. Daher wurde auf diesen experimentellen Ansatz verzichtet und MBP in Kombination mit sfBFP als Modellprotein gewählt.

3.1.1. Herstellung und Reinigung von MBP-CxR_n und sfBFP-CxE_n

Nach der Konstruktion der Expressionsvektoren (Abschnitt 2.2.9, Seite 35) erfolgte die Herstellung der MBP- und sfBFP-Varianten löslich in *E. coli* BL 21 codon plus (DE3) RIL (Abschnitt 2.3.4, Seite 39). Die Konstrukte wurden jeweils mit polyionischen Sequenzen von sechs, acht und zehn geladenen Resten hergestellt und gereinigt. Zunächst erfolgte im ersten Schritt eine Anreicherung der Proteine über Ionenaustauschchromatographie. Im zweiten Schritt wurden die MBP-Varianten über eine Affinitätschromatographie an einer Dextrinsäule gereinigt (Abschnitt 2.4.4, Seite 42) und bandenrein im SDS-PAGE-Gel gewonnen (Abb. 3.2).

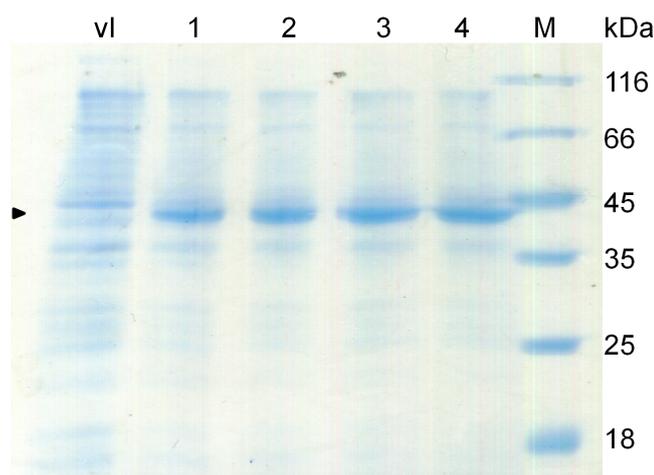
Die sfBFP-Varianten wurden im zweiten Schritt über eine Größenausschlusschromatographie gereinigt, um vor allem auch Nukleinsäuren zu entfernen (Abschnitt 2.4.3, Seite 42) (Lentze, 2013). Die Ausbeuten werden in Tabelle 3.1 gelistet.

Alle gereinigten Proteine wurden mittels Massenspektrometrie verifiziert. Die Länge der polyionischen Sequenzen hatte keinen sichtbaren Einfluss auf die Produktionsrate in *E. coli*. MBP liefert sehr ähnliche Ausbeuten mit neun bis zehn Milligramm pro Liter Kultur je Variante. Die Ausbeuten der sfBFP-CxE_n-Varianten sind aufgrund der Herstellung durch unterschiedliche Experimentatoren schwerlich untereinander vergleichbar.

3.1.2. Eigenschaften von sfBFP-CxE_n

Spektroskopische Eigenschaften von sfBFP

Das eingesetzte Protein sfBFP wurde für diese Arbeit durch den Aminosäureaustausch (Y66H) aus *superfolder green fluorescent protein* (Pedelacq et al., 2006) gewonnen. Es wurde



(a)

(b)

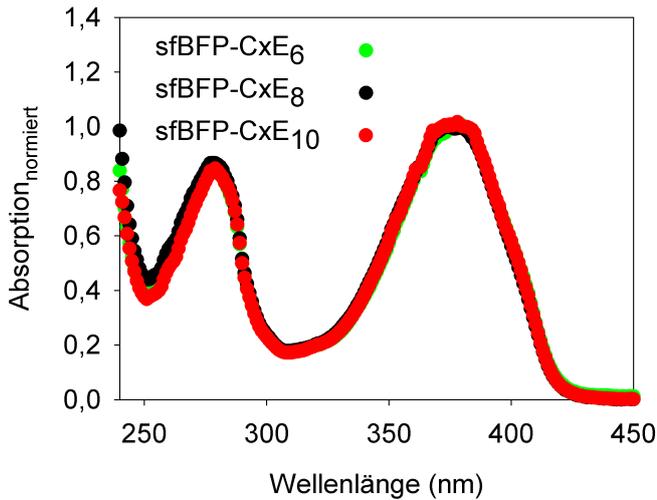
Abbildung 3.2.: SDS-PAGE-Analytik der Herstellung (a) und Reinigung (b) von MBP-CxR₆. Gezeigt sind 15%ige Polyacrylamidgele, Coomassie gefärbt. Nach Induktion von MBP-CxR₆ in *E. coli* wurden zu verschiedenen Zeiten Aliquots der Kultur entnommen, auf OD₆₀₀ = 1 verdünnt und davon je 20 µl für die SDS-PAGE verwendet. Im Gel ist vor der Induktion (vl) kein Zielprotein auszumachen. Bereits 1 h nach Induktion (1a) ist MBP-CxR₆ als deutliche Bande unterhalb der 45 kDa-Bande des Markers (M) sichtbar. Diese intensiviert sich noch 2 und 3 Stunden nach Induktion (2a),(3a) bis zur Ernte 4 h nach Induktion (4a). Für die Reinigungsanalytik wurden je 2 µl vom löslichen Teil des Zellaufschlusses (1b) bzw. von den vereinigten Elutionsfraktionen aufgetragen. Bereits der erste Schritt, die Ionenaustauschchromatographie an SP-Sepharose führt bei pH 6,2 zu deutlich angereichertem Zielprotein (2b). Nach der Affinitätschromatographie an Dextrinmatrix liegt MBP-CxR₆ konzentriert und in einer Reinheit von >95 % vor (3b).

Tabelle 3.1.: Ausbeuten der Reinigung der sfBFP- und MBP-Varianten

Protein	n	Ausbeute	je l Kulturvolumen	je g Biofeuchtmasse
sfBFP-CxE _n	6		20 mg/l	2,6 mg/g
	8		41 mg/l	14 mg/g
	10		14,8 mg/l	4,8 mg/g
MBP-CxR _n	6		33,4 mg/l	9,7 mg/g
	8		27,8 mg/l	8,8 mg/g
	10		31,1 mg/l	9,9 mg/g

vor seinem Einsatz als Bindungspartner hinsichtlich seiner spektroskopischen Eigenschaften und hinsichtlich der unterschiedlichen Ladungen analysiert.

Im Absorptionsspektrum (Abb. 3.3) sind zwei Maxima auszumachen. Zum einen das typische Proteinmaximum bei 280 nm Wellenlänge, bedingt durch die aromatischen Aminosäuren und den spezifischen sfBFP-Chromophor. Das zweite Maximum bei 380 nm ist die Absorption des Chromophors. Aufgrund der Absorption des Chromophors bei 280 nm ist eine Konzentrationsbestimmung bei dieser Wellenlänge nach Pace et al. (1995) nicht möglich. Deshalb wurde der molare Absorptionskoeffizient bei 380 nm bestimmt. Es wurde der Weg über den densitometrischen Vergleich mit sfGFP-Banden im Gel nach SDS-PAGE

**Abbildung 3.3.:**

UV-Absorptionsspektren von sfBFP-CxE_n in 25 mM Natriumphosphat, pH 7,4; 1 mM EDTA, normiert auf $E_{380nm} = 1$. Die Spektren aller sfBFP-CxE_n weisen nahezu die gleichen Absorptionseigenschaften auf, mit zwei Maxima bei $\lambda = 280$ nm und $\lambda = 380$ nm. Dezent Abweichungen bei $\lambda = 280$ nm sind auf unterschiedliche Anteile an Verunreinigungen zurückzuführen. Ein Einfluss der verschiedenen Fusionspeptide auf die Absorptionseigenschaften von sfBFP können ausgeschlossen werden.

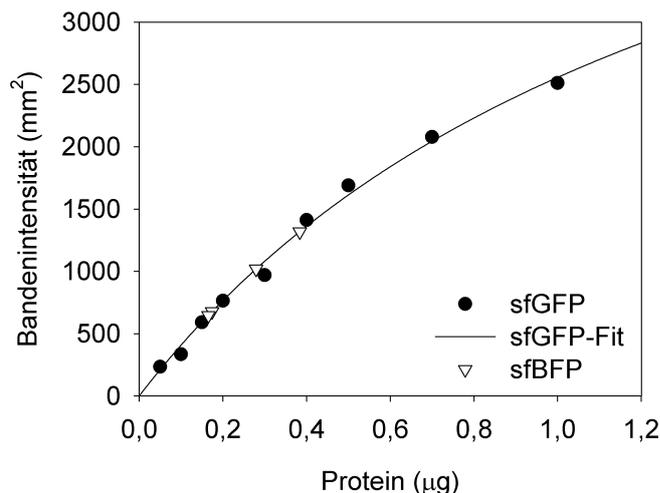
zur Konzentrationsbestimmung einer sfBFP-Lösung mit bekannter Absorption gewählt. Der Absorptionskoeffizient des sfGFP bei 485 nm von $83\,300\text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ist aus der Literatur bekannt (Pedelacq et al., 2006). Da beide superfolder Varianten sequentiell bis auf die Punktmutation identisch sind, ist davon auszugehen, dass sie durch Coomassie-Brillant-Blau in gleicher Intensität angefärbt werden. Es wurde eine Kalibrierung der Gelbanden nach SDS-PAGE mit bekannten Konzentrationen sfGFP durchgeführt und auf dem gleichen Gel Aliquots einer sfBFP-Lösung mit bekannter Absorption analysiert. Über die Kalibrierung mit Gleichung 3.1 wurde für die sfBFP-Varianten die Konzentration bestimmt und in Kombination mit der bekannten Absorption mittels Lambert-Beer-Gesetz (Abb. 3.4 und Gleichung 2.2, S. 48) der molare Absorptionskoeffizient von $56\,900 \pm 6000 \times \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ bei 380 nm bestimmt. Mit diesem wurden im Weiteren in dieser Arbeit die sfBFP-Konzentrationen bestimmt (Abschnitt 2.5.4, S. 48).

$$y = (6158,2 \times x)/(1,409 + x) \quad (3.1)$$

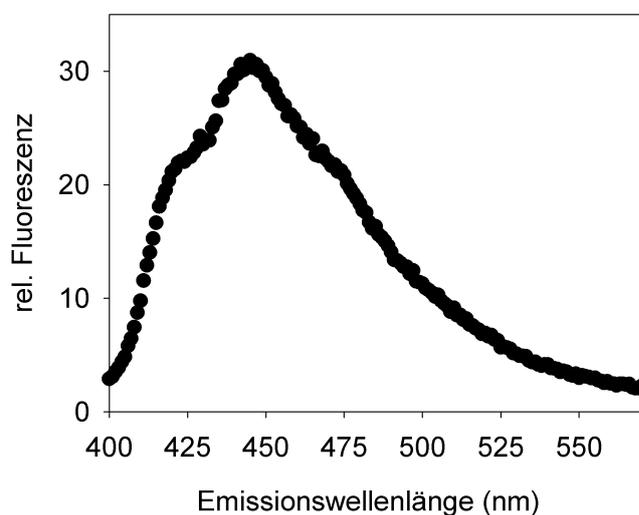
y : Bandenintensität (mm^2)

x : [sfBFP] (μg)

Weder die Absorptionseigenschaften noch die Fluoreszenzemission der drei sfBFP-CxE_n-Varianten werden durch die Fusionspeptide beeinflusst (Abb. 3.5). Ein Einfluss der starken Ladungsdichte auf die Struktur des Chromophors ist somit auszuschließen.

**Abbildung 3.4.:**

Regressionskurve zur Bestimmung des spezifischen Absorptionskoeffizienten von sfBFP. Es wurden verschiedene Mengen sfGFP (0,05–1 µg) und unterschiedliche Volumina einer sfBFP-Lösung (0,75/1/1,5/2,2 µl) bekannter Absorption $A_{380} = 0,3678$ mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert und densitometrisch ausgewertet. Anhand der Kalibriergeraden für sfGFP konnten für die vier Verdünnungen von sfBFP die Konzentrationen ermittelt werden. Aus Absorption und Konzentrationen der sfBFP-Lösung wurde der spezifische Absorptionskoeffizient von sfBFP bei 380 nm mit $\epsilon = 56\,900 \pm 6000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ bestimmt.

**Abbildung 3.5.:**

Fluoreszenzemissionsspektrum von sfBFP-CxE₈. Die Anregung der 0,24 µM Lösung erfolgte bei $\lambda = 380 \text{ nm}$ (25 mM Natriumphosphat, pH 7,4; 1 mM EDTA). Die Emission zeigt ein Fluoreszenzmaximum im blauen Bereich bei $\lambda = 445 \text{ nm}$.

Affinität der sfBFP-Spezies an Anionenaustauschermatrix

Um den Einfluss der unterschiedlich langen polyionischen Sequenzen auf die Gesamtladung des Proteins zu untersuchen, wurde die Interaktion der sfBFP-Varianten mit einer Anionenaustauschermatrix analysiert. Die gereinigten Spezies wurden dabei an die quarternären Ammoniumgruppen ($-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) der Q-Sepharose-Matrix über ionische Wechselwirkungen gebunden und mit einem NaCl-Gradienten eluiert (Abschnitt 2.5.6, S. 53).

Wie zu erwarten, nimmt mit zunehmender Peptidlänge, also steigender Ladungszahl der Fusionspeptide, die Affinität an die Matrix zu (Abb. 3.6a). Die Kettenlänge hat einen deutlichen Einfluss auf die Affinität an die Matrix. SfBFP selbst hat einen berechneten isoelektrischen Punkt von $\text{pI} = 5,9$ und liegt somit unter Messbedingungen (pH 7,4) selbst mit 5,6 Ladungen negativ geladen vor. Dies erklärt die Interaktion des thrombingespaltene

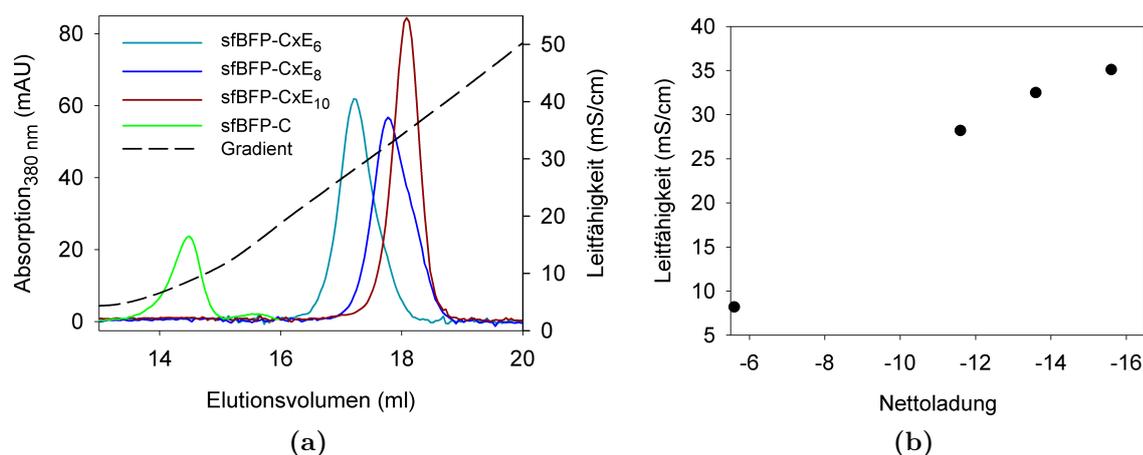


Abbildung 3.6.: (a) Elutionsprofile der sfBFP-Varianten von starker Anionenaustauschermatrix (HiTrap Q HP) in 50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten (0–2 M NaCl). Unter diesen Bedingungen interagiert sfBFP-C aufgrund seiner negativen Nettoladung (-5,6) mit der Matrix, jedoch sind die Interaktionen mit unverdaulichem Fusionspeptid deutlich stärker. In Abhängigkeit der Ladung erfolgt die Elution. (b) Grafische Auftragung der Nettoladung entsprechender sfBFP-Varianten gegen die Leitfähigkeit, bei der eine Elution von der Anionenaustauschermatrix erfolgte. Demnach steigt mit zunehmender Ladung des Proteins auch die Affinität zur Matrix. Es besteht allerdings kein linearer Zusammenhang zwischen Nettoladung der entsprechenden sfBFP-Spezies und der Stärke der Bindung an die Matrix.

sfBFP-C mit der Matrix. Mangels der Glutamatsequenz zeigt sfBFP-C eine deutlich schwächere Interaktion mit der Matrix als die ungespaltenen Varianten. Die Elution erfolgt gleich zu Beginn des Gradienten bei einer Leitfähigkeit von 8,2 mS/cm, während die Varianten mit kompletten Fusionspeptiden bei 28,2 (n= 6), bei 32,5 (n= 8) und bei 35,1 mS/cm (n= 10) eluieren. Jedoch ist kein linearer Zusammenhang zwischen Nettoladung des Proteins und der Affinität an die Matrix gegeben (Abb. 3.6b). Dies könnte z. B. daran liegen, dass die Ladungsdichte der Säule zu gering ist oder die Anordnung der Ladungen nicht ideal, um im Fall von sfBFP-CxE₁₀ alle zehn Ladungen des Fusionspeptides und die Ladungen des Proteins selbst gleichzeitig zu binden.

3.1.3. Eigenschaften von MBP-CxR_n

Das Maltosebindeprotein wird als Fusion zur Erhöhung der Löslichkeit von Proteinen und zu deren Reinigung mittels spezifischer Affinitätschromatographie eingesetzt. Die C-terminale Verlängerung des MBP mit dem positiv geladenen Polyargininpeptid beeinträchtigt diese Eigenschaften nicht. Die Bindung an die Dextrinsäule ist weiterhin gegeben. Die Proteine lagen in Konzentrationen von bis zu 290 μ M löslich vor. Die UV/Vis-Spektren zeigen trotz der hohen positiven Ladungsdichte der Polyargininpeptide ein ausgeprägtes Minimum um 250 nm (Abb. 3.7); es ist daher nicht von einer Assoziation negativ geladener Nuklein-

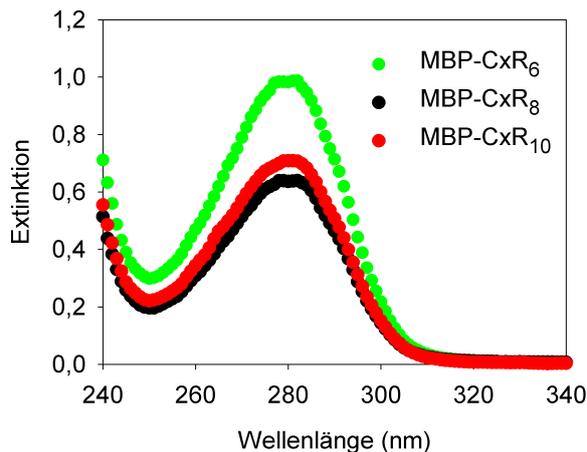


Abbildung 3.7.:

UV-Spektren der MBP-Varianten in 20 mM Tris/HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, 10 mM Maltose. Die unterschiedliche Absorption ergibt sich aus den unterschiedlichen Konzentrationen der Proteine. Für alle Varianten liegt das Verhältnis der Absorption $260_{nm}/280_{nm}$ bei $< 0,5$ und impliziert eine vollständige Abtrennung von Nukleinsäuren.

säuren an die *tags* auszugehen, die eine Dimerisierung mit den entgegengesetzt geladenen Fusionspeptiden kompetitieren würden.

Affinität von MBP-CxR_n an Kationenaustauschermatrix

Auch bei den MBP-Varianten konnte, wie bei den sfBFP-CxE_n-Varianten, ein Einfluss der Anzahl geladener Aminosäurereste auf die Interaktionsstärke mit den Sulphopropylgruppen ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$) einer Kationenaustauschermatrix beobachtet werden (Abb. 3.8).

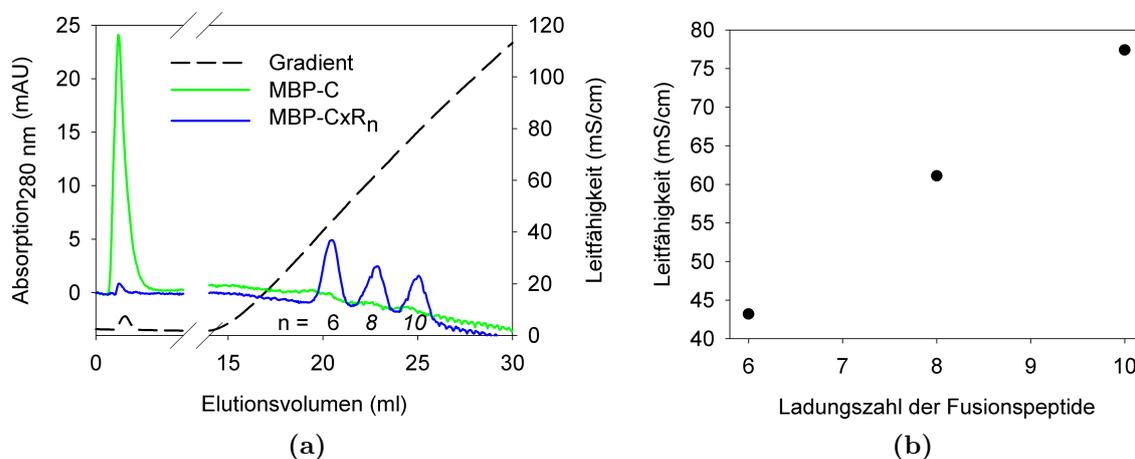


Abbildung 3.8.: (a) Elutionsprofile der MBP-Varianten von starker Kationenaustauschermatrix (HiTrap SP HP) in 50 mM MES, pH 6,2; 1 mM EDTA. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten (0–2 M NaCl). Unter diesen Bedingungen interagiert MBP-C nicht mit der Matrix. (b) Grafische Auftragung der Ladung der Fusionspeptide gegen die Leitfähigkeit, bei der eine Elution der entsprechenden MBP-Varianten von der Kationenaustauschermatrix erfolgte. Die Interaktionsstärke der MBP-Varianten mit vollständigen ungespaltenen Fusionspeptiden korreliert linear mit der Anzahl ihrer Ladungen.

Während thrombinverdautes MBP-C, was bei gegebenem pH laut des errechneten $\text{pI} = 5,1$ negativ geladen vorliegt, im Durchfluss zu finden ist, eluieren die vollständigen Proteine

in Abhängigkeit der Anzahl ihrer positiven Ladungen bei Leitfähigkeitswerten von 43,2 (n= 6), von 61,6 (n= 8) und von 77,4 mS/cm (n= 10). Sowohl die Tatsache, dass das MBP selbst keine Affinität zeigt, als auch die fast lineare Abhängigkeit der Affinitäten von der Ladungsanzahl legen nahe, dass die MBP-Varianten unter den Versuchsbedingungen nur über die Fusionspeptide mit der Matrix interagieren.

3.1.4. Bestimmung der Dissoziationskonstante der polyionischen Systeme

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten der polyionischen Systeme mit unterschiedlich langen geladenen Sequenzen wurde zum jeweiligen sfBFP-CxE_n der entsprechend geladene MBP-CxR_n-Partner zutitriert. Um in diesem Versuchsaufbau die Ausbildung der Cystinbindung zu verhindern, wurden reduzierende Bedingungen eingestellt (Abschnitt 2.5.5, S. 50). Mittels nicht reduzierender SDS-PAGE wurde das Fehlen kovalenter Dimere verifiziert. Die Interaktion der Varianten wurde über die Sedimentationsgeschwindigkeit während der analytischen Ultrazentrifugation verfolgt. Dies geschah durch die Detektion des sfBFPs anhand seiner Chromophorabsorption. Mit steigendem Anteil an Dimeren steigt der Sedimentationskoeffizient $s(\text{app})$ von 2,29 S (reines Monomer) auf 4,69 S (maximale Heterodimerisierung), Abbildung 3.9. Die K_D -Werte wurden nach Gleichung 2.6 (S. 51) berechnet und sind in Tabelle 3.2 gelistet. Aus ihnen lässt sich die freie Energie (ΔG^0) der Wechselwirkung zwischen den polyionischen Systemen bestimmen (Gleichung 2.7, S. 51) sowie Rückschlüsse auf den Heterodimerisierungsanteil bei bekannter Proteinkonzentration ziehen. Diese Werte wurden im Gleichgewichtslauf bestätigt (Abb. 3.9).

Die Ergebnisse zeigen, wie erwartet, eine stark ausgeprägte Kooperativität der polyionischen Wechselwirkung mit steigender Anzahl an Ladungen (Abb. 3.10). Unter der vereinfachenden Annahme, dass jede zusätzliche Ladung diese kooperativen Wechselwirkungen um den gleichen Faktor stabilisiert, lassen sich anhand der vorliegenden Daten für die polyionischen Fusionspeptide sowohl die Energie der zugrunde liegenden Wechselwirkungen als auch ein Kooperativitätsfaktor bestimmen. Für die primäre einzelne Wechselwirkung ergibt sich mit einer Assoziationskonstante von $K_a = 450 \text{ M}^{-1}$ bzw. einer Dissoziationskonstante von $K_D = 2,2 \text{ mM}$ eine Energie von $\Delta G^0 = 14,4 \text{ kJ/mol}$ und ein Kooperativitätsfaktor x von 2,15. Das heißt, jede weitere ionische Wechselwirkung erhöht die Assoziationskonstante um den Faktor 2,15 bzw. die Energie um 1,8 kJ/mol. Mit dem vorliegenden quantitativen Modell steht nun eine zuverlässige Prognosemöglichkeit für die Affinität polyionischer Fusionspeptide anderer Länge zur Verfügung. Dennoch muss hier erwähnt werden, dass dieses relativ einfache statische Modell nicht unter allen Randbedingungen einsetzbar ist. Werden polyionische Fusionspeptide unterschiedlicher Länge verwendet, so kommt es zu deutlichen Abweichungen.

Die Kontrolle mit dem gemischten System aus MBP-CxR₆ und sfBFP-CxE₁₀ weist einen

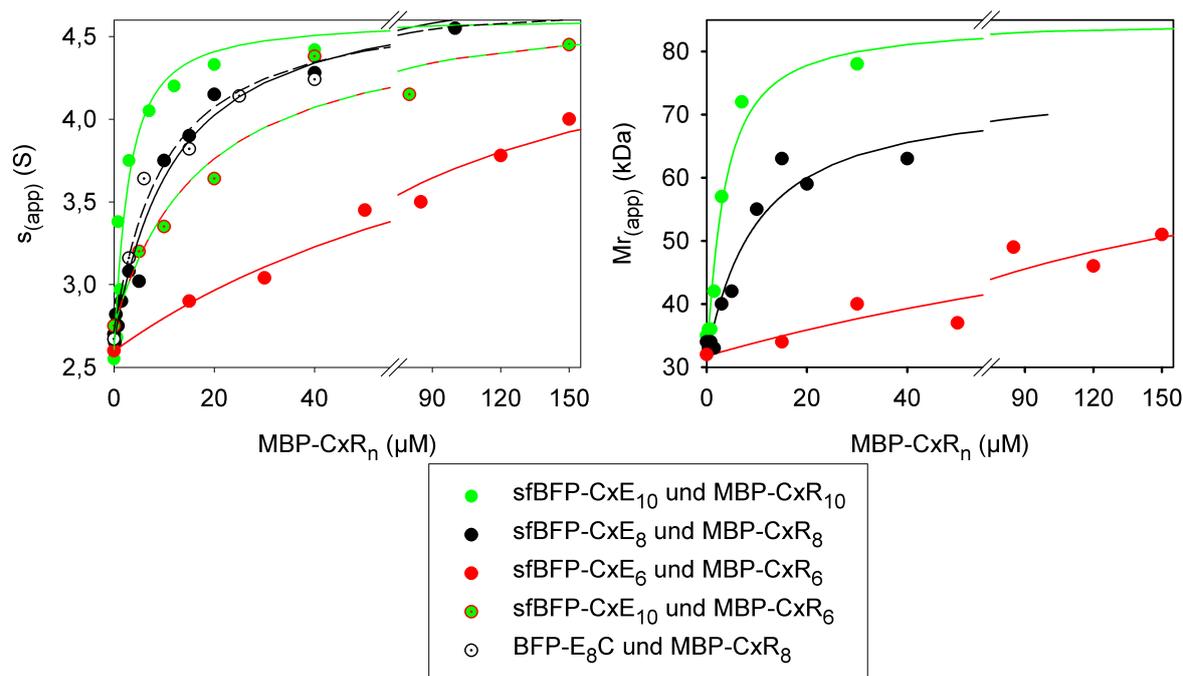


Abbildung 3.9.: Affinitäten der ionischen Wechselwirkungen zwischen spaltbaren polyionischen Fusionspeptiden. Die Messungen erfolgten mittels analytischer Ultrazentrifugation im Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment (links) bei 40 000 rpm für 2 h und im Gleichgewichtslauf (rechts) bei 12 000 rpm für mindestens 24 h, jeweils bei 20 °C. In 25 mM Natriumphosphat, pH 7,4 mit 1 mM EDTA, 1 mM TCEP wurde je 1,5 µM einer sfBFP Variante mit verschiedenen Konzentrationen einer MBP-Variante versetzt und der Ansatz vermessen. Die Linien zeigen die Regressionskurven zu den Messpunkten, aus denen die Dissoziationskonstanten berechnet wurden.

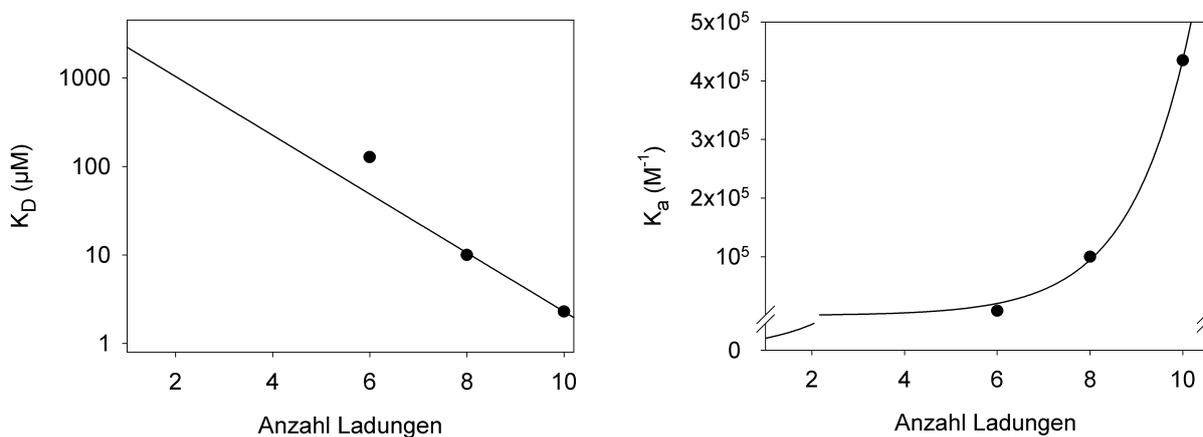


Abbildung 3.10.: Untersuchung zur Abhängigkeit zwischen Ladungsanzahl polyionischer Fusionspeptide und deren Bindungsstärke unter Anwendung eines Kooperativitätsmodells. Unter der vereinfachenden Annahme kooperativer Wechselwirkungen zwischen polyionischen Fusionspeptiden lässt sich an Hand der Gleichung $K_a = \frac{1}{K_D} = K_i \times x^{(n-1)}$ für die primäre ionische Wechselwirkung ein $K_i = 450 \text{ M}^{-1}$ bestimmen. Jede weitere Wechselwirkung (n) erhöht die Assoziationskonstante um Faktor $x = 2,15$.

Tabelle 3.2.: Dissoziationskonstanten und freie Energien der ionischen Wechselwirkungen zwischen sfBFP-CxE_n und MBP-CxR_n

sfBFP-CxE _n	MBP-CxR _n	K _D (μM)	ΔG ⁰ (kJ/mol)
MBP-CxR ₆	sfBFP-CxE ₆	127±41	21,1
MBP-CxR ₈	sfBFP-CxE ₈	10±2	27,1
MBP-CxR ₁₀	sfBFP-CxE ₁₀	2,3±0,4	30,6
Kontrollen:			
MBP-CxR ₆	sfBFP-CxE ₁₀	16	26,0
MBP-CxR ₈	BFP-E ₈ C (Frost, 2009)	9	27,4

ähnlichen K_D-Wert wie das Achtersystem auf. Daraus lässt sich schließen, dass die ionische Interaktion dynamisch ist und nicht eine einmal eingegangene Assoziation statisch erhalten bleibt. In diesem Fall haben die sechs Ladungen der MBP-Variante im einfachsten Fall fünf Möglichkeiten, um mit der E₁₀-Sequenz der sfBFP-Variante vollständig zu interagieren. Dadurch verbessert sich die Affinität des Sechser*tags* im gemischten System im Vergleich zum reinen Sechsersystem mit einer kompletten Interaktionsmöglichkeit: Die Wahrscheinlichkeit einer effektiven Assoziation ist erhöht und die der Dissoziation gesenkt. Aber dennoch sind nur sechs positive Ladungen vorhanden, die die Gesamtstabilität erhalten, so dass nicht der K_D-Wert des reinen Zehnersystems erzielt wird.

Die weitere Kontrolle mit der Mischung von spaltbarem und nicht-spaltbarem Fusionspeptid im Achtersystem unterstützt die These der Assoziation rein aufgrund der polyionischen Sequenz. Eine weitere Interaktion durch andere Strukturen kann somit ausgeschlossen werden.

Die Assoziation im Sechsersystem mit einem K_D-Wert über 100 μM ist so gering, dass die Ausbeute einer Kopplung bei niedrigen mikromolaren Proteinkonzentrationen sehr gering wäre. Es bräuchte deutlich höhere Proteinkonzentrationen für eine effektive Kopplung mit Ausbeuten größer 50 %. Aus diesem Grund werden im Folgenden nur noch die höher affinen Achter- und Zehnersysteme hinsichtlich des Einflusses der Ionenstärke und der Redoxeeigenschaften der Disulfidbindung analysiert.

3.1.5. Einfluss der Ionenstärke auf die Assoziation polyionischer Systeme

Ionische Wechselwirkungen werden durch Ionen in ihrer Umgebung stark beeinflusst. Sie können durch die Anwesenheit von Ionen im Lösungsmittel konkurrierend unterbunden werden. Dies führt zu einer Unterdrückung der ionischen Assoziation zwischen den sfBFP- und MBP-Spezies. Somit lässt sich ein IC₅₀-Wert von NaCl als einfaches monovalentes Salz für das Achter- und Zehnersystem bestimmen, indem zuvor nicht-kovalent gebildeten Heterodimeren verschiedene Salzkonzentrationen zugesetzt werden. Der Dimerstatus wird nach Gleichgewichtseinstellung mittels analytischer Ultrazentrifugation bestimmt (Abschnitt 2.5.5, S. 51). Die Daten wurden mit dem Programm DynaFit numerisch gefittet.

Folgende drei Gleichgewichtsreaktionen wurden zugrunde gelegt:



K_D : Dissoziationskonstante aus Abschnitt 3.1.4

K_D^* : Dissoziationskonstante zwischen Salz und dem jeweiligen Fusionspeptid, für beide als gleich angenommen, Unbekannte im *fit*

Dies führte zu *fits*, die in Abbildung 3.11 dargestellt sind.

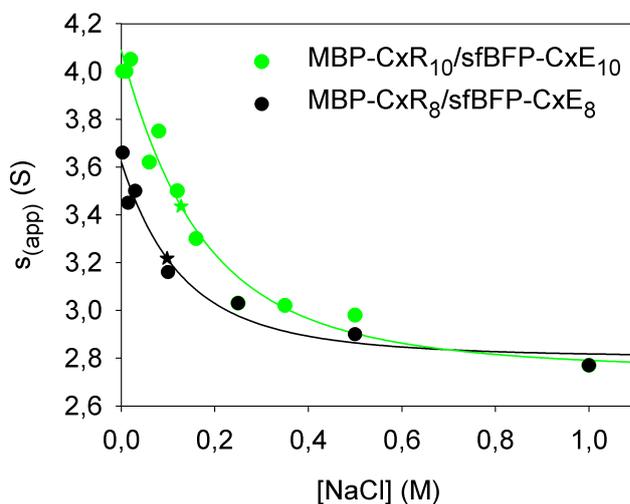


Abbildung 3.11.:

Bestimmung der IC_{50} -Werte von NaCl auf die ionischen Wechselwirkungen der spaltbaren polyionischen Fusionspeptide bei äquimolarem Einsatz der Monomere von je 20 μM . Dargestellt sind die Messpunkte aus einer Sedimentationsgeschwindigkeitsmessung mittels analytischer Ultrazentrifugation in 25 mM Natriumphosphat, pH 7,4 unter reduzierenden Bedingungen. Die ebenfalls dargestellten *fits* wurden numerisch ermittelt. Die IC_{50} -Werte sind 98 mM für das Achter- und 128 mM für das Zehnersystem.

Aus den im *fit* berechneten Maxima und Minima der Heterodimere wurde nun die Salzkonzentration berechnet, bei der unter den gegebenen Versuchsbedingungen die halbmaximale Heterodimerkonzentration vorliegt. Dies ist im Achtersystem bei 98 mM NaCl und im Zehnersystem bei 128 mM NaCl der Fall.

Aus diesen Konzentrationen wurde analog der Cheng und Prusoff Gleichung (Gleichung 2.9, S. 52) der K_I von Kochsalz berechnet. Es ergab sich für das Achtersystem ein K_I von 33 mM sowie für das Zehnersystem ein K_I von 13 mM NaCl. Dies bedeutet letztendlich, dass die Wechselwirkung des Salzes am Zehnersystem stärker ist als am Achtersystem. Dieser Effekt könnte aus der stärkeren Ladung des Zehnersystems resultieren. Da aber auch die Affinität der polyionischen Fusionspeptide im Zehnersystem ($K_D = 2,3 \mu\text{M}$) deutlich höher ist als im Achtersystem ($K_D = 10 \mu\text{M}$, s. Tab. 3.2), ist dennoch eine höhere Salzkonzentration für die Konkurrenz der Assoziation im Zehnersystem notwendig.

3.1.6. Bestimmung des Redoxpotentials der Disulfidbrücke der polyionischen Fusionspeptide

Die polyionischen Sequenzen enthalten neben den geladenen Aminosäuren zusätzlich ein Cystein. Dieses kann unter geeigneten Redoxbedingungen mit dem Cystein der Partnersequenz eine Disulfidbrücke ausbilden. Die Bestimmung des Redoxpotentials der ausgebildeten Disulfidbrücke zwischen den beiden Fusionspartnern MBP und sfBFP erfolgte über Gleichgewichtseinstellungen zwischen Heterodimer und den Monomeren in Redoxpuffer (Abb. 3.12). Die verschiedenen Redoxbedingungen wurden mit Dithiothreitol in reduziertem (DTT_{red}) und oxidiertem Zustand (DTT_{ox}) eingestellt und anschließend der Sedimentationskoeffizient in der analytischen Ultrazentrifuge bestimmt (Abschnitt 2.5.5, S. 52).

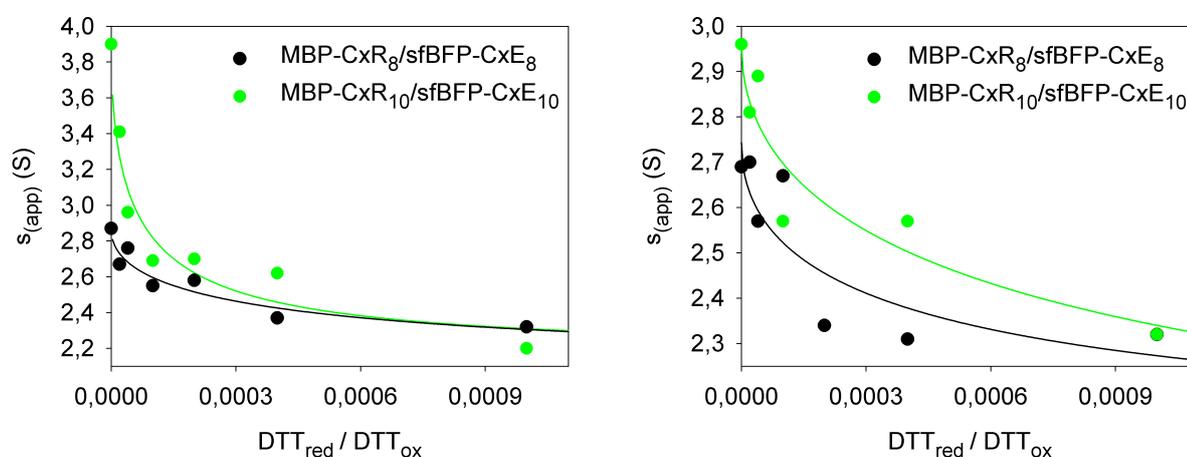


Abbildung 3.12.: Bestimmung des Redoxpotentials der Disulfidbrücke zwischen spaltbaren polyionischen Fusionspeptiden. Hierzu erfolgte die Messung des Monomer-Dimer-Gleichgewichtes unter verschiedenen Redoxbedingungen. Die Einstellung entsprechender Redoxbedingungen erfolgte im Puffer (25 mM Natriumphosphat, pH 8,0 mit 1 mM EDTA) durch Zusatz von DTT_{red} und DTT_{ox} in definierten Verhältnissen. Das Gleichgewicht wurde mittels analytischer Ultrazentrifugation durch Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeiten analysiert. Die Messung erfolgte nach Blockade freier Cysteine mit Iodacetamid in Gegenwart von 1 M NaCl. Die Gesamtmonomerkonzentration lag für beide MBP-CxR_n und sfBFP-CxE_n bei je 10 μM . Es wurde entweder vom Heterodimer (links) oder von den jeweiligen Monomeren (rechts) ausgegangen. Die Ergebnisse beider experimenteller Ansätze zeigen für jeweils beide Systeme Redoxpotentiale (ΔE^0) von rund -400 mV.

Ausgehend vom voroxidierten Heterodimer ergab sich unter Anwendung des Massenwirkungsgesetzes und der daraus abgeleiteten Formel 2.10, S. 53, ein K_a von 13,8 für das Achter- und ein K_a von 2,3 für das Zehnersystem. Damit ergeben sich nach der Nernstgleichung 2.11, S. 53, Redoxpotentiale von -399 mV ($n=8$) und -371 mV ($n=10$), was sich nach Gleichung 2.12, S. 53, in freie Energien von 18,4 kcal/mol ($n=8$) und 17,1 kcal/mol ($n=10$) umrechnen lässt.

Alternativ wurde das Experiment ausgehend von den freien Monomeren durchgeführt. Wie zu erwarten wurden hier ähnliche Werte für die Ausbildung der Disulfidbrücken ermit-

telt mit $K_a = 45$ ($n = 8$) und $K_a = 94$ ($n = 10$), was Redoxpotentialen von -414 mV ($n = 8$) und -424 mV ($n = 10$) und freien Energien von $19,1$ kcal/mol ($n = 8$) und $19,5$ kcal/mol ($n = 10$) entspricht.

Aufgrund des starken Rauschens der Daten sind diese Werte nur als eine Näherung zu sehen, die demnach zeigen, dass die Stabilität der Bindung zwischen spaltbaren Fusionspeptiden vergleichbar ist mit der Bindung der klassischen Variante (Frost, 2009; Lilie et al., 2013).

Tabelle 3.3.: Übersicht zu den Redoxpotentialen der polyionischen Fusionspeptide mit Sequenzen aus acht und zehn geladenen Resten und daraus berechnete freie Energien

n	Ausgangsmaterial	K_a	ΔE^0	ΔG^0
8	Heterodimer	13,8	-399 mV	18,4 kcal/mol
	Monomere	45	-414 mV	19,1 kcal/mol
10	Heterodimer	2,3	-371 mV	17,1 kcal/mol
	Monomere	94	-424 mV	19,5 kcal/mol

3.1.7. Zusammenfassung der Analytik der spaltbaren Fusionspeptide

Bei der Analytik der spaltbaren Fusionspeptide wurden sowohl der Kopplungsvorgang der ionischen Assoziation sowie die Konkurrenz dieser durch NaCl als auch die Stabilität der ausgebildeten Disulfidbrücke untersucht. Bei diesen Vorgängen wurde der Einfluss der Anzahl geladener Aminosäuren (6, 8 und 10) in den Peptiden analysiert.

Die ionische Assoziation wird mit steigender Ladungsmenge energiereicher und weist entsprechend geringere K_D -Werte auf. Sechs Ladungspaare haben die schwächste Interaktion ($K_D = 127$ μ M). Sie ist so gering, dass eine effektive Heterodimerisierung im mikromolaren Konzentrationsbereich zu präparativen Zwecken nicht möglich ist. Somit wurden im weiteren Verlauf das Achtersystem ($K_D = 10$ μ M) und das Zehnersystem ($K_D = 2,3$ μ M) analysiert. Die freie Energie der Bindungen hat zwischen den beiden Systemen eine Differenz von $3,5$ kJ/mol. Berechnungen anhand eines Kooperativitätsmodells führen zu der Aussage, dass jede weitere ionische Wechselwirkung die Assoziation um weitere $1,8$ kJ/mol erhöht.

Diese ionischen Wechselwirkungen zwischen den Fusionspeptiden lassen sich durch Erhöhung der Ionenstärke des Puffers mit NaCl kompetitieren. Entsprechend der stärkeren ionischen Wechselwirkungen ist auch der IC_{50} -Wert von NaCl bei dem Zehnersystem höher als beim Achtersystem. Die stärkeren ionischen Wechselwirkungen zeigen sich auch im K_I zu NaCl, welches eine höhere Affinität an das Zehner- als an das Achtersystem hat ($K_I = 13$ im Vergleich zu $K_I = 33$ beim Achtersystem).

Ob die Stabilität der Disulfidbrücke durch die Stärke der ionischen Wechselwirkungen beeinflusst wird, kann nicht abschließend geklärt werden, da die Methode der Redoxpotentialbestimmung mittels analytischer Ultrazentrifugation nicht genau genug war, um Unterschie-

de unterhalb von wenigen kcal/mol, wie sie bei der ionischen Wechselwirkung nachgewiesen wurden, aufzudecken. Jedoch ist insgesamt das Redoxpotential von ca. -400 mV zwischen den ionischen Fusionspeptiden deutlich niedriger als von Disulfidbrücken wie in GSSG, wo bei pH 8 und 22 °C ein Redoxpotential von -264 mV (Wunderlich and Glockshuber, 1993) bestimmt wurde. Dies weist generell auf eine deutliche Stabilisierung der Disulfidbrücke durch die zusätzliche ionische Assoziation hin. Diese wird wahrscheinlich auch mit größerer Stärke des Zehnersystems im Vergleich zum Achtersystem besser stabilisieren.

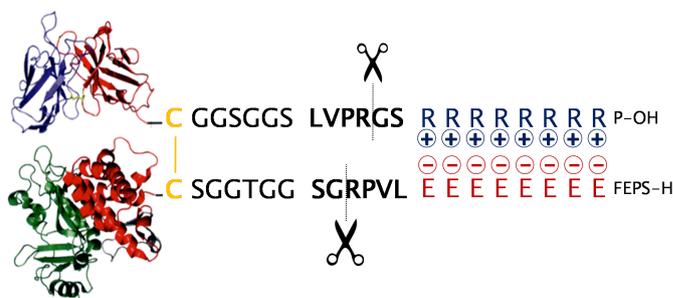
Auch mit der neuen Variante der Fusionspeptide, bei der die ionischen Sequenzen durch einen Thrombinverdau entfernt werden können, ist eine erfolgreiche Fusion der Reaktionspartner möglich. Es ist eine Ladungssequenz von mindestens acht Resten nötig, um im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich Kopplungsausbeuten von mehr als 50 % zu erzielen.

3.2. Biologische Aktivität von B3-PE38_{CX}, einem Immuntoxin, das mittels spaltbarer Fusionspeptide hergestellt wurde

Nachdem sich die spaltbaren Fusionspeptide mit Sequenzen von acht und zehn Ladungen in Bezug auf die Kopplungseigenschaften als effizient für Heterodimerisierungsreaktionen gezeigt haben, wurde nun das Immuntoxin B3-PE38_{CX} hergestellt.

Mit diesem Konstrukt soll getestet werden, ob die neuen Fusionspeptide die Funktionalität des bifunktionalen Proteins beeinflussen. Zu dem analogen Immuntoxin B3-PE38, welches über die klassischen Fusionspeptide ohne Thrombinspaltstelle hergestellt worden war, gibt es bereits Daten zur biologischen Aktivität (Kleinschmidt et al., 2003; Frost, 2009). Da die klassischen Fusionspeptide acht geladene Aminosäuren beinhalten, wurde wegen der Vergleichbarkeit auch in dieser Arbeit mit dem Achtersystem weitergearbeitet. Ebenso wurde die Positionierung der spaltbaren Fusionspeptide gleich gehalten. Sie sind am C-Terminus der schweren Kette des dsFvB3 (B3(V_H)-CxR₈) und am N-Terminus des PE38 fusioniert. Um die polyionischen Sequenzen nach erfolgter kovalenter Bindung sinnvoll abspalten zu können, wurden die Abschnitte des Fusionspeptids am N-Terminus von PE38 in umgekehrter Reihenfolge zur komplementären Peptidsequenz am C-Terminus der schweren Kette des dsFvB3 angeordnet (Abb. 3.13).

Bei den vorhergehenden Analysen wurde B3-PE38 bereits biophysikalisch analysiert. Die Aktivität von PE38 blieb auch mit C-terminaler, polyionischer Fusion und im Immuntoxin erhalten. Als Maß dafür wurde die Bindung von NAD⁺ bestimmt. Die Dissoziationskonstante des freien E₈C-PE38 lag bei 76 µM und die des B3-PE38 bei 53 µM. Für PE40 ohne Fusionspeptid wurde die Dissoziationskonstante von 32 µM veröffentlicht (Kleinschmidt, 2004; Beattie et al., 1996). Frost (2009) zeigte die Kompetition der Bindung von B3-R₈C durch das

**Abbildung 3.13.:**

Schematische Darstellung des Immuntoxins B3-PE38_{CX}. Das Polyargininpeptid ist am C-terminalen Ende der schweren Kette des dsFvB3 fusioniert. Das komplementäre Polyglutamatpeptid befindet sich am N-Terminus von PE38. Entsprechend sind die Segmente der Fusionspeptide angeordnet.

spezifische Kompetitorpeptid APWLYGPAGGGD (Hoess et al., 1993). Dies zeigt die funktionelle Integrität des Antikörperfragments im Kontext des polyionischen Fusionspeptids. Thermische Denaturierungsversuche zeigten strukturelle Integrität und Unabhängigkeit von dsFvB3 und PE38 im Immuntoxin. Die Stabilität des Immuntoxins war bei 37 °C gegeben, weshalb einen Einsatz in Zellkultur möglich ist (Kleinschmidt et al., 2003).

Kleinschmidt (2004) zeigte ferner spezifische Wirkung des klassisch, polyionisch fusionierten B3-PE38 auf Lewis^Y-positiven MCF7-Zellen im Gegensatz zur unspezifischen Wirkung auf Lewis^Y-negativen Zellen, die vergleichbar mit der Wirkung des freien E₈C-PE38 ist.

3.2.1. Herstellung und Reinigung der Einzelkomponenten B3-CxR₈ und E₈xC-PE38

Die Herstellung und Reinigung des Antikörperfragmentes dsFvB3 sowie des PE38 mit den weiterentwickelten Fusionspeptiden erfolgte nach Protokollen, die für die Proteine mit den klassischen Fusionspeptiden bereits etabliert wurden (Frost, 2009).

Herstellung und Reinigung B3-CxR₈

Das Antikörperfragment B3-CxR₈ wurde durch die separate Herstellung von leichter und schwerer Kette als *inclusion bodies* und anschließender Rückfaltung und Reinigung gewonnen (Abschnitte 2.3.5, S. 39, und 2.4.6–2.4.8, S. 43ff).

Dafür wurde die Mischung der solubilisierten schweren und leichten Kette (Molverhältnis 5 zu 1 bzw. 3,28 µg/ml und 0,51 µg/ml) in 5 Pulsen zu je 8 ml tropfenweise in 5 l Renaturierungspuffer verdünnt. Nach Renaturierung und Ausbildung der Disulfidverbrückung unter oxidierenden Bedingungen wurden durch Zentrifugation Aggregate entfernt und der Überstand mit dem löslichen Antikörperfragment auf 80 ml konzentriert. Die Zweischrereinigung mittels Kationenaustausch- und Größenausschlusschromatographie lieferte eine Ausbeute von 1,89 mg Antikörperfragment aus einem Renaturierungsansatz; die Reinheit des Antikörperfragments ist in Abbildung 3.14 gezeigt.

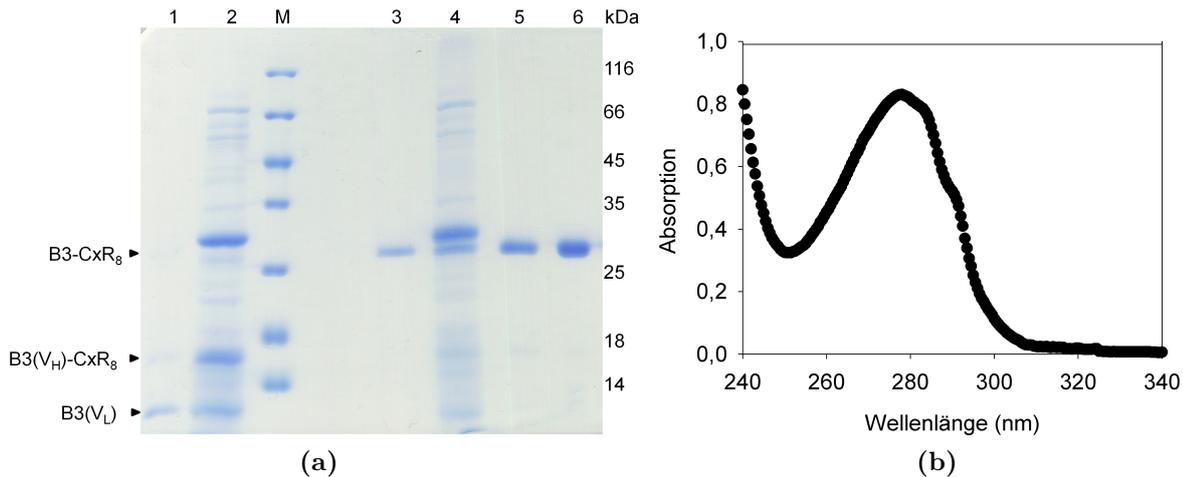


Abbildung 3.14.: Reinigung des Antikörperfragments B3-CxR₈. (a) Analytik der Reinigung von B3-CxR₈ mittels SDS-PAGE. Gezeigt ist ein 15%iges Polyacrylamidgel, Coomassie gefärbt. Die ersten beiden Spuren zeigen reduzierte Proben des Konzentrats nach der Rückfaltung (1) und des Proteins nach der Ionenaustauschchromatographie (2). Die weiteren Proben wurden nicht reduziert. (3) zeigt eine B3-CxR₈-Referenz, (4) das Konzentrat, (5) B3-CxR₈ nach der Ionenaustauschchromatographie, (6) das final gereinigte Protein nach der Größenausschlusschromatographie. (b) Das gereinigte Protein zeigt ein typisches Protein-UV-Spektrum, mit einem Maximum bei 280 nm. Das Verhältnis der Absorptionen $260_{nm}/280_{nm} = 0,56$ weist auf erfolgreiche Abtrennung von DNA hin.

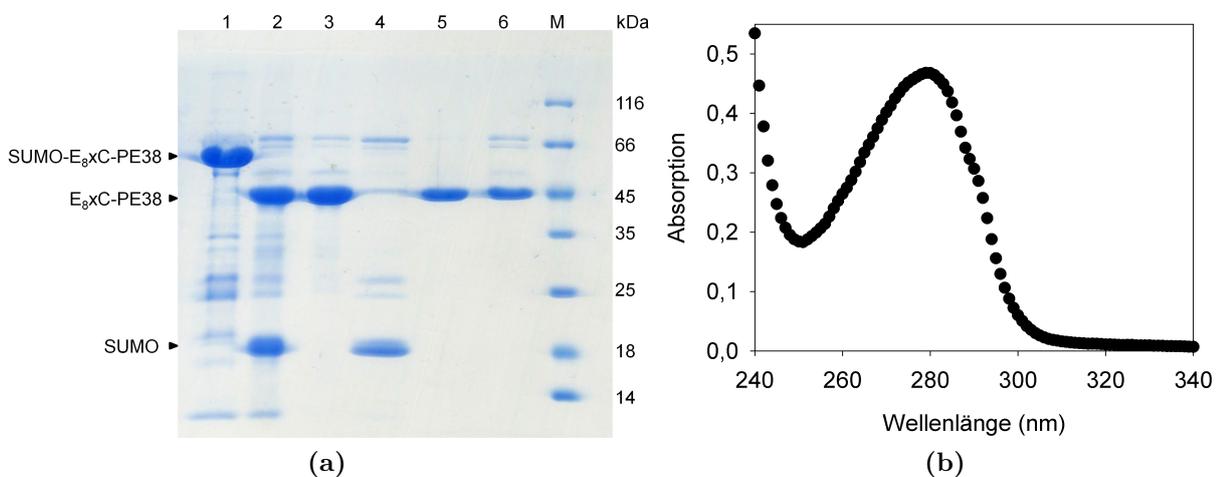


Abbildung 3.15.: Reinigung von E₈xC-PE38. (a) Analytik der Reinigung von E₈xC-PE38 mittels nicht reduzierender SDS-PAGE. Gezeigt ist ein 15%iges Polyacrylamidgel, Coomassie gefärbt. Zu Beginn wurde das His₆-SUMO-E₈xC-PE38 aus dem Zellextrakt über Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (Nickel-NTA) gereinigt (1), es folgte der SUMO-Verdau (2) und ein erneuter Lauf über die Nickel-NTA Matrix. E₈xC-PE38 wurde im Durchfluss aufgefangen (3), während das gespaltene His₆-SUMO gebunden hat und eluiert wurde (4). Auf der Ionenaustauschermatrix (POROS HQ) eluierte bandenreines E₈xC-PE38 (5) mit bereits sichtbarer Tendenz zur Oligomerisierung (6). (b) UV-Spektrum von E₈xC-PE38. Das Verhältnis der Absorptionen $260_{nm}/280_{nm} = 0,57$ weist auf erfolgreiche Abtrennung von DNA hin.

Herstellung und Reinigung E₈xC-PE38

E₈xC-PE38 wurde als SUMO-Fusion löslich hergestellt. Die Reinigung erfolgte in einem ersten Schritt mittels Nickel-Affinitätschromatographie. Sie wurde durch einen N-terminalen His₆-tag an der SUMO-Fusion ermöglicht. Nach einem SUMO-Verdau wurden die Protease und der SUMO-tag in einem erneuten Lauf über die Nickel-Affinitätsmatrix entfernt. Als letzter Schritt erfolgte eine Anionenaustauschchromatographie (Abschnitt 2.4.5, S. 43). Es wurden 3,5 mg Protein aus einem Liter Kulturmedium bzw 0,8 mg Protein aus einem Gramm Biofeuchtmasse gewonnen. Die Reinheit des gewonnenen E₈xC-PE38 ist in Abbildung 3.15 gezeigt. Auch die hier hergestellte Variante des PE38 mit dem spaltbaren Fusionspeptid zeigt eine Affinität von 54 μ M zu NAD⁺ (nicht gezeigt), also eine ähnliche Aktivität wie das Toxin mit dem klassischen Fusionspeptid (Kleinschmidt et al., 2003).

3.2.2. Herstellung und Reinigung des Immunkonjugates B3-PE38_{CX}

Die Kopplung des Antikörperfragmentes B3-CxR₈ und der *Pseudomonas* Exotoxin Variante E₈xC-PE38 erfolgte in dieser Arbeit über die thrombinspaltbaren Fusionspeptide. Es wurde die Methode des Redoxshufflings angewandt (Abschnitt 2.5.11, S. 55), wobei E₈xC-PE38 im 2,25fach-molaren Überschuss eingesetzt wurde. Nach 24 h Inkubation waren laut Analyse mittels nicht reduzierender SDS-PAGE und densitometrischer Auswertung 65 % des B3-CxR₈ kovalent fusioniert (Abb. 3.16a).

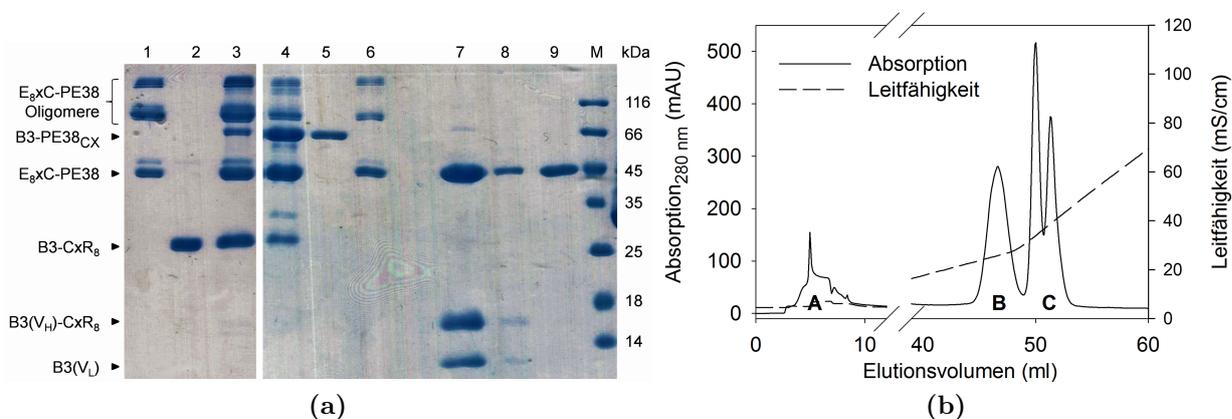


Abbildung 3.16.: Herstellung und Reinigung des Immuntoxins B3-PE38_{CX} (a) SDS-PAGE-Analytik der Herstellung und Reinigung B3-PE38_{CX}. Gezeigt ist ein 15%iges Polyacrylamidgel, Coomassie gefärbt. (1) E₈xC-PE38; (2) B3-CxR₈; (3) Kopplungsansatz 0 h; (4) Kopplungsansatz 24 h; (5) B3-PE38_{CX}, gereinigt; (6) ungekoppeltes E₈xC-PE38, gereinigt; (7) Kopplungsansatz 24 h reduziert; (8) B3-PE38_{CX}, gereinigt, reduziert; (9) ungekoppeltes E₈xC-PE38, gereinigt, reduziert; (b) Elutionsprofil der Reinigung von B3-PE38_{CX} mittels Anionenaustauschchromatographie an einer HiTrap Q HP Säule. B3-CxR₈ findet sich im Durchfluss (A). Eluiert wird im NaCl-Gradienten bei steigender Leitfähigkeit zunächst das Immuntoxin B3-PE38_{CX} (B) vor E₈xC-PE38 (C).

Der Kopplungsansatz wurde über Anionenaustauschchromatographie gereinigt (Abb. 3.16b). Die Elution erfolgte über einen zunächst flachen Gradienten von 0–240 mM NaCl über 20 SV,

währenddessen das Kopplungsprodukt eluierte; anschließend wurde der Gradient gesteigert (240 mM–1000 mM NaCl über weitere 20 SV) und freies E₈xC-PE38 zurückgewonnen. Nicht fusionierter Antikörper mit seinen positiven Ladungen wurde von der Säulenmatrix nicht gebunden und fand sich im Durchfluss.

3.2.3. Thrombinspaltung des Immunkonjugats B3-PE38_{CX}

Die Thrombinspaltung von B3-PE38_{CX} erfolgte in PBS. Ein vollständiger Verdau des Immunkonjugats wurde mit 0,05 NIH-U Thrombin pro 1 µg gereinigten Immuntoxin innerhalb von vier Stunden bei Raumtemperatur erzielt (Abb. 3.17). Auffällig ist bei der Betrachtung im Gel unter nicht idealen Bedingungen (in Redoxpuffer mit Glutathion, 0,005 NIH-U/1 µg Gesamtprotein), dass das Antikörperfragment mit dem positiv geladenen Fusionspeptid deutlich schneller verdaut wird als das negativ geladene Peptid am Toxin (Abb. 3.18). Diese Beobachtung, dass das negativ geladene Peptid deutlich langsamer verdaut wird als das positiv geladene, gilt für alle in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Konstrukte. Eine Erklärung dafür ist ein negativ geladener Bereich um das aktive Zentrum von Thrombin (Stubbs and Bode, 1993).

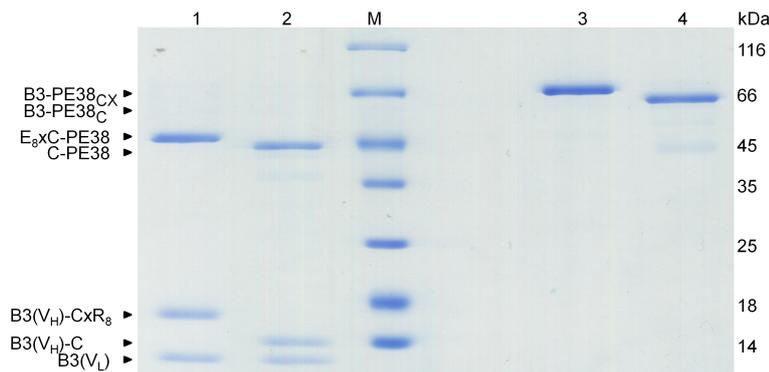


Abbildung 3.17.: SDS-PAGE-Analytik der Thrombinspaltung von B3-PE38_{CX}. Gezeigt ist ein 15%iges Polyacrylamidgel, Coomassie gefärbt. Der Verdau erfolgte mit 0,05 NIH-U Thrombin pro 1 µg Immuntoxin über 4 h bei Raumtemperatur. B3-PE38_{CX} (1 und 3); B3-PE38_C (2 und 4); Unter reduzierenden Bedingungen (1, 2) sieht man den Verdau der einzelnen Immuntoxinkomponenten, E₈xC-PE38 zu E₈C-PE38_{CX} und B3(V_H)-CxR₈ zu B3(V_H)-C, während B3(V_L) nicht verändert wird. Werden die Proben nicht reduziert (3,4), sieht man das veränderte Laufverhalten des kompletten Immuntoxins aufgrund des Verdau.

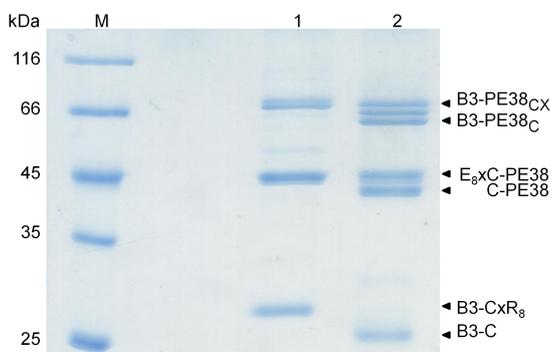


Abbildung 3.18.:

SDS-PAGE-Analytik einer unvollständigen Thrombinspaltung eines Kopplungsansatzes von B3-PE38_{CX}. Gezeigt ist ein 15%iges Polyacrylamidgel, Coomassie gefärbt. Kopplungsansatz vor Verdau (1) und teilweise gespalten (2). Während B3-CxR₈ vollständig gespalten ist, ist E₈xC-PE38 noch nicht komplett verdaut. Das Immuntoxin liegt als ungespaltene, einfach gespaltene und vollständig gespaltene Spezies vor.

Auch nach der Spaltung bleiben die beiden Proteine kovalent über die Disulfidbrücke verbunden. Das Heterodimer wurde in diesem Zustand für die Zellkultur eingesetzt.

3.2.4. Wachstumskinetik von MCF7 Zellen unter Einfluss von B3-PE38_C

Die biologische Aktivität des Fusionskonstruktes B3-PE38_C ohne den geladenen Teil des Fusionspeptides auf Zellen wurde an MCF7 Zellen getestet. Diese Zellen wurden bereits in früheren Arbeiten als Lewis^Y-positiv detektiert (Kleinschmidt, 2004). Lewis^Y ist das spezifische Antigen des B3-Antikörpers. MCF7-Zellen internalisieren das Antigen nach Bindung des B3, so dass das Immuntoxin intrazellulär wirken kann. Ferner zeigten sich MCF7-Zellen praktikabel für den Einsatz als B3-PE38 sensitives Xenograft-Modell in Mäusen (Pai et al., 1992; Pastan et al., 1995; Frost, 2009). Die Zellen wurden über 192 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Immuntoxins inkubiert. Es wurde alle zwei Tage die Zellzahl anhand der colorimetrischen Auswertung des Kristallviolettassay nach Gillies et al. (1986) bestimmt (Abb. 3.19). Nach 144 h Inkubationszeit erreichte die Anzahl der Kontrollzellen unter Versuchsbedingungen ein Maximum. Danach nahm die Zellzahl aufgrund von Kontaktinhibition und vermutlich auch Nährstoffmangel wieder ab. Die Auswertung des Wachstums der toxinbehandelten Zellen erfolgte in Relation zum Wachstum der Kontrollpopulation an entsprechenden Zeitpunkten nach dem Kinetikassay nach Bernhardt et al. (1992) (Gleichung 2.14, S. 61). Dazu wurde die Zellzahl der behandelten Zellen zu der Kontrolle der gleichen Wachstumszeit in Relation gesetzt. Zusätzlich einbezogen wurde die initiale Zellmenge zum Zeitpunkt der Toxinzugabe, was eine bessere Unterscheidung zwischen zytozidalem und zytostatischem Effekt ermöglicht (Bernhardt et al., 1992).

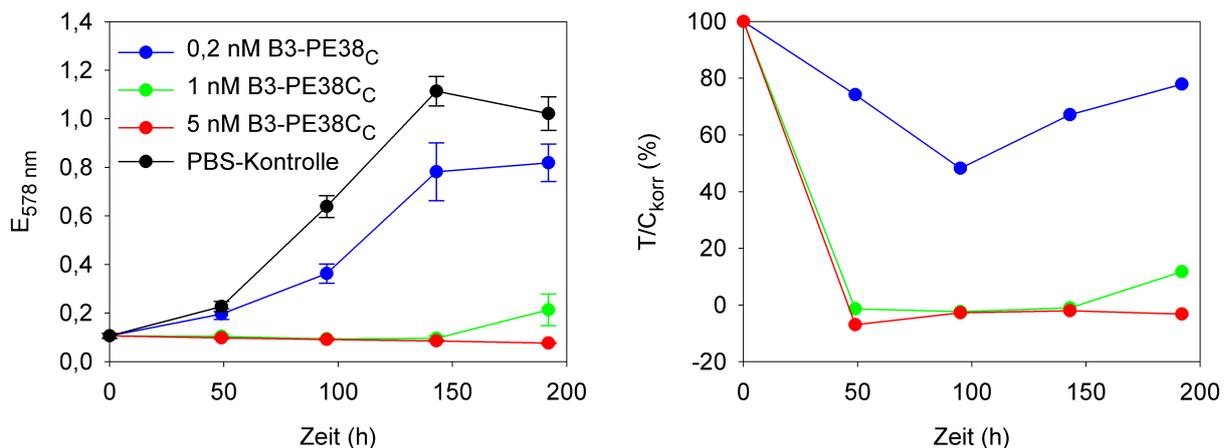


Abbildung 3.19.: Wachstumskinetik von MCF7-Zellen, inkubiert mit B3-PE38_C (links) und zugehörige T/C_{korr} -Analytik (rechts). Die Zellen wurden bis zu 196 h mit den angegebenen Immuntoxin-Konzentrationen und mit PBS als Kontrolle inkubiert und alle 48 h wurde ein Anteil der Versuchsansätze fixiert und die Zellzahl colorimetrisch anhand des Kristallviolettassays nach Gillies et al. (1986) ermittelt (links). Das reduzierte Wachstum der inkubierten MCF7-Zellen im Vergleich zur PBS-Kontrolle erweist sich nach T/C_{korr} -Analytik nach Bernhardt et al. (1992) als zytotoxischer Effekt (rechts).

B3-PE38_C erwies sich demnach als zytotoxisch. Bei allen drei eingesetzten Toxinkonzentrationen kam es zu einem initialen Abfall der T/C_{korrr} -Werte. Bei der Inkubation mit den beiden geringeren Konzentrationen folgte später jedoch wieder ein Anstieg der Werte. Dies bedeutet, dass zunächst das Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich herabgesenkt ist. Der Zellpopulation wurde geschadet. Jedoch tritt nach 100 bzw. 150 Stunden eine Erholung auf, die Zellpopulation nähert sich der Menge der Kontrollzellen wieder an. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass nicht alle Zellen getötet wurden. Die nicht abgetöteten Zellen können regenerieren. Jedoch führt die Inkubation mit der hohen Immuntoxinkonzentration von 5 nM sogar zu T/C_{korrr} -Werten unter Null, was auf Zelllyse hinweist, da die Zellpopulation unterhalb ihrer Größe zum Zeitpunkt der Toxinzugabe sinkt. Hier findet keine Erholung der Population mehr statt (Bernhardt et al., 1992). Dies weist auch darauf hin, dass das Immuntoxin über den gesamten Zeitraum von 196 Stunden weiterhin als aktives Heterodimer vorlag.

3.2.5. Zeitabhängige Applikation von B3-PE38_C

Mit diesem Versuch sollte die nötige Inkubationsdauer von B3-PE38_C abgeschätzt werden, die zu einem messbaren zytotoxischen Effekt auf MCF7-Zellen führt. Es wurden Zellen über unterschiedliche Dauer mit gespaltenem B3-PE38_C inkubiert und anschließend das Zellwachstum nach weiterem Wachstum bis zu 196 h in Medium mittels Kristallviolettassay analysiert (Abb. 3.20). Die eingesetzte Immuntoxinkonzentration von 5 nM zeigte die deutlichste Toxizität im Kinetikassay (Abschnitt 3.2.4, S. 82) und liegt auch deutlich über dem EC_{50} -Wert (Abschnitt 3.2.7, S. 84). Somit lässt der Einsatz des Immuntoxins in dieser Konzentration gut messbare Effekte erwarten.

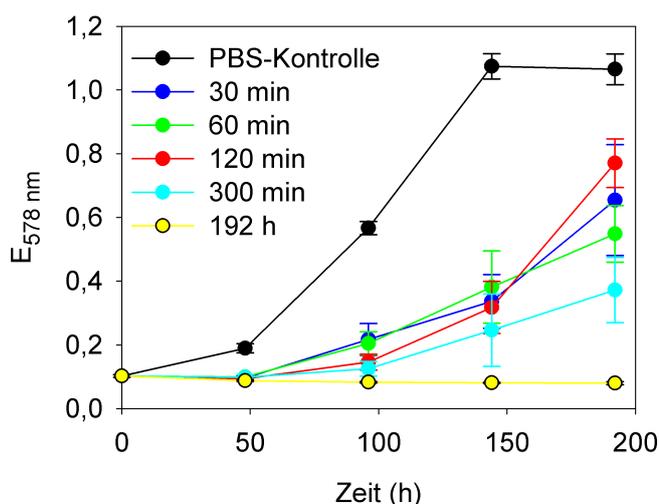


Abbildung 3.20.:

Zeitabhängige Applikation von B3-PE38_C auf MCF7-Zellen. Die Zellen wurden 30–300 min mit 5 nM B3-PE38_C inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde das Toxin durch Waschen mit PBS entfernt und die Zellen in Medium bis zu 196 h weiterinkubiert. Als Kontrollen wurde ein Ansatz mit PBS und ein anderer durchgängig mit Toxin inkubiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte colorimetrisch mittels Kristallviolettassay nach Gillies et al. (1986). Der zytotoxische Effekt des Immuntoxins zeigt sich bereits nach einer Inkubationszeit von 30 min.

Der Versuch zeigte, dass bereits bei einer 30-minütigen Inkubation das Zellwachstum

gegenüber der Kontrolle reduziert war. Eine Erhöhung der Inkubationszeit auf bis zu 300 min führt hierbei zu einer weiteren Reduktion des Zellwachstums. Jedoch ist auch in diesem Versuch eine Erholung der Zellen zu beobachten. Nur bei der permanenten Inkubation mit B3-PE38_C über die gesamte Meßzeit von 196 h nimmt die Zellmasse nicht mehr zu.

3.2.6. Mehrfachapplikation von B3-PE38_C

Im Hinblick auf eine potentielle In-vivo-Anwendung wurde der Effekt wiederholter Inkubation bei unterschiedlichen Konzentrationen von MCF7-Zellen mit B3-PE38_C untersucht (Abb. 3.21). Wie zu erwarten, ist der toxische Effekt umso größer, je höher die Immuntoxin-konzentration ist. Eine wiederholte Anwendung jedoch führt zu keiner weiteren Abnahme der Zellzahl, was sich vermutlich auf die sich erholende Zellpopulation (Abschnitt 3.2.4) zurückführen lässt, die auch bei einer Mehrfachgabe des Immuntoxins weiter regeneriert.

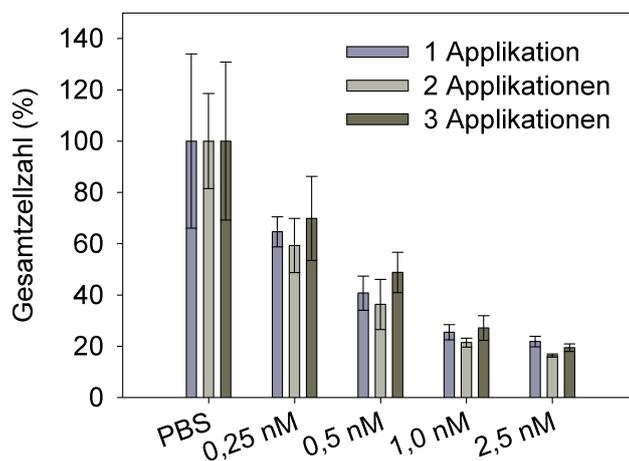


Abbildung 3.21.: Mehrfachapplikation von B3-PE38_C auf MCF7-Zellen. Es erfolgte eine Mehrfachapplikation von vier verschiedenen Konzentrationen des Immuntoxins, die entsprechend gekennzeichnet sind. Die Zellen wurden 1–3mal inkubiert, die Abstände zwischen den Applikationen betragen 48 h. Die Zellzahl aller Ansätze wurde nach 144 h Wachstum colorimetrisch mit dem Kristallviolettassay (Gillies et al., 1986) bestimmt. In der Abbildung sind die Werte über die PBS-Werte normiert, welche auf 100 % gesetzt sind.

3.2.7. Bestimmung der Toxizität von B3-PE38_C

Zusätzlich zu den qualitativen Aussagen aus den letzten Versuchen zur biologischen Aktivität des Immuntoxins B3-PE38_C wurde eine Quantifizierung der Toxizität durchgeführt. Dazu wurden MCF7-Zellen mit 0–120 nM Immuntoxin inkubiert. Nach 48 h erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mittels Durchflusszytometrie (Abb. 3.22). Aus den Messdaten wurde mittels Regressionskurve (2.13, S.60) die Konzentration bestimmt, bei der 50 % des maximalen Effektes auftrat, bezeichnet als EC₅₀. Dieser liegt für B3-PE38_C bei $0,7 \pm 0,1$ nM

($n=4$), wenn das Immuntoxin bis zum Endpunkt der Inkubation auf den Zellen verbleibt. Eine Reduktion der Einwirkzeit auf 150 min und weiteres Zellwachstum in Medium verdoppelt diesen Wert auf $1,3 \pm 0,1$ nM ($n=4$).

Im Vergleich dazu liegt der EC_{50} -Wert des freien C-PE38 bei $45,5 \pm 19,6$ nM ($n=8$). Das freie Toxin wurde am Cystein mit Iodacetamid alkyliert, um vergleichbare Bedingungen herzustellen, wie sie für das Immunkonjugat gelten. Die Einwirkzeit lag ebenfalls bei 150 min.

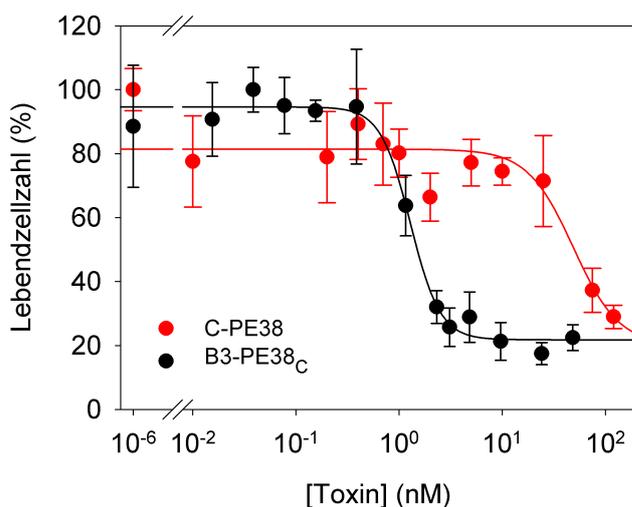


Abbildung 3.22.: Bestimmung der EC_{50} -Werte von B3-PE38_C auf MCF7-Zellen. Die Bestimmung erfolgte durch Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen B3-PE38_C bzw. C-PE38-Referenz für 150 min. Nach weiterem Wachstum in Medium wurde nach 48 h die Zellzahl lebender Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt und normiert. Hier dargestellt sind Datensätze mit $n=4$, die durchgängigen Linien sind die Anpassungskurven an die experimentell bestimmten Datenpunkte.

3.2.8. Zusammenfassung der Ergebnisse zu B3-PE38_{CX} und B3-PE38_C

In diesem Kapitel 3.2 wurden Eigenschaften des Immuntoxins B3-PE38_{CX} hinsichtlich seiner Herstellung und vor allem hinsichtlich seiner biologischen Aktivität in Zellkultur auf MCF7-Zellen getestet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf Kontrollen zur Spezifität von B3-PE38_C anhand von Lewis^Y-negativen Zellen verzichtet, da die Zelltypspezifität von B3 im Kontext von Immuntoxinen sowohl für genetisch fusionierte Immuntoxine (LMB-7, LMB-9) als auch für B3-PE38, welches über klassische polyionische Fusionspeptide gekoppelt wurde, umfangreich belegt ist (Brinkmann et al., 1991; Reiter et al., 1995, 1994; Kleinschmidt et al., 2003; Frost, 2009).

Die Herstellung und Reinigung der Einzelkomponenten war weiterhin mittels der polyionischen Sequenzen nach den bereits etablierten Protokollen nach Frost (2009) möglich. Bei der kovalenten Heterodimerisierung wurde eine Ausbeute von 65 % erzielt. Sie erfolgte durch

ein Redoxshuffling mit Glutathion. Bei der Reinigung des Dimers kamen die Fusionspeptide erfolgreich zum Einsatz. Durch sie konnten freie Edukte vom Produkt effektiv über eine Ionenaustauschchromatographie mit Gradientenelution separiert werden. Vor dem Einsatz in Zellkultur wurden die ionischen Sequenzen durch Thrombinspaltung vom Immuntoxin entfernt. Die kovalente Bindung blieb weiter erhalten.

Die zytotoxische Aktivität des gespaltenen B3-PE38_C wurde in Zellkultur an der Lewis^Y-positiven Zelllinie MCF7 nachgewiesen. Der Effekt nimmt mit steigender Inkubationsdauer sowie mit steigender Toxinkonzentration zu. Der EC₅₀-Wert liegt bei 1,3 nM bei einer Einwirkzeit von 150 min. Dieser Wert ist durchaus vergleichbar mit den Werten für B3-PE38 und LMB-9 von 1,7 nM (112 ng/ml) für B3-PE38 und 4,52 nM (286 ng/ml) für LMB-9 (Kleinschmidt et al., 2003), die mit fast gleicher Methode, jedoch einer Einwirkzeit über die gesamten 48 h ebenfalls auf MCF7-Zellen ermittelt wurden. Auf dieser Zelllinie jedoch starben die Zellen in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen nicht gänzlich ab. In der Regel blieb nach 48 h eine Zellpopulation von ungefähr 30 % der Ausgangsmenge zurück, die sich erholen konnte. Auf sie hatte auch eine Mehrfachgabe keinen positiven Effekt. Da dennoch eine deutliche Reduktion des Zellmaterials durch B3-PE38_C erzielt wurde, ist ein MCF7-Xenograft-Maus-Modell sinnvoll einzusetzen, um nachzuweisen, ob durch die Abtrennung der geladenen Aminosäuren das Heterodimer In-vivo-Aktivität zeigt. Dies sollte allerdings mit einer MCF7-Zelllinie erfolgen, in der sich möglichst noch keine oder zumindest nur eine sehr geringe resistente Subpopulation gegenüber den Immuntoxinen ausgebildet hat.

3.3. Herstellung und Analytik des neuartigen bifunktionalen Konstruktes [F⁷, P³⁴]NPY-PE38

Die Modularität der Fusionspeptide wurde in dieser Arbeit genutzt, um das bifunktionelle Protein [F⁷, P³⁴]NPY-PE38 herzustellen. Anstelle des tumorspezifischen Antikörperfragments dsFvB3 wurde eine Variante des Peptidhormons Neuropeptid Y (NPY) mit PE38 über die polyionischen Wechselwirkungen und eine Disulfidbrücke kovalent fusioniert. Die eingesetzte NPY-Variante bindet und aktiviert spezifisch den hY₁-Rezeptor und wird als [F⁷, P³⁴]NPY bezeichnet. Somit erfolgt die Zelladressierung des [F⁷, P³⁴]NPY-PE38 nicht mehr über Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, sondern über Rezeptor-Ligand-Interaktion. NPY-PE38 ist daher strenggenommen kein Immuntoxin. Im Folgenden wird dennoch dieser Ausdruck auf NPY-PE38 angewendet. Immuntoxin bezeichnet hierbei generell ein Konjugat aus *targeting*-Komponente und Toxin. Der Einsatz des Peptid-Liganden [F⁷, P³⁴]NPY als *targeting*-Komponente macht insofern Sinn, als dass der GPCR-Rezeptor hY₁ in Tumorgeewebe der Brust sowohl in häufiger Inzidenz als auch in hoher Dichte vorliegt (Reubi et al., 2001), während dies in gesundem Gewebe nicht der Fall ist. Ferner wird der durch Ligan-

denbindung aktivierte Rezeptor internalisiert, wodurch der Toxinteil ins Zellinnere gebracht wird.

Das Peptidhormon wurde synthetisch hergestellt. Auf diesem Wege wurde die Modifikation mit dem polyionischen Peptid über die Lysinseitenkette an Position vier des Peptidhormons eingeführt. Dass Modifikationen an dieser Position die Ligand-Rezeptor-Interaktion weiterhin ermöglichen, wurde bereits zuvor gezeigt (Zwanziger et al., 2008; Ahrens et al., 2011, 2015). Eine Modifikation am N-Terminus des $[F^7, P^{34}]NPY$ mit der polyionischen Sequenz führt zu einer Variante mit deutlich geringerer spezifischer Toxizität des korrespondierenden Immuntoxins im Vergleich zur Variante mit der Modifikation am Lysin vier (Daten nicht gezeigt).

Die Synthese aller in dieser Arbeit verwendeten NPY-Varianten wurde freundlicherweise durch Mitglieder der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Annette G. Beck-Sickinger, Institut für Biochemie, Universität Leipzig, durchgeführt und zur Verfügung gestellt. Die Herstellung von PE38 wird in den Abschnitten 2.3.4, S. 39, 2.4.5, S. 43 und 3.2.1, S. 80 beschrieben.

NPY-PE38 wurde zunächst mit den klassischen Fusionspeptiden ohne Thrombinspaltstelle generiert ($[F^7, P^{34}]NPY-PE38$), im Verlauf der Arbeit erfolgte zusätzlich die Fusionierung über die thrombinspaltbare Variante ($[F^7, P^{34}]NPY-PE38_{CX}$) (Abb. 3.23). Die Abschnitte 3.3.1–3.3.4, S. 87ff., beinhalten die Ergebnisse zu $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ und die folgenden Abschnitte 3.3.5–3.3.7, S. 93ff., stellen die Ergebnisse dar, die mit dem Konstrukt $[F^7, P^{34}]NPY-PE38_{CX}$ erzielt wurden.

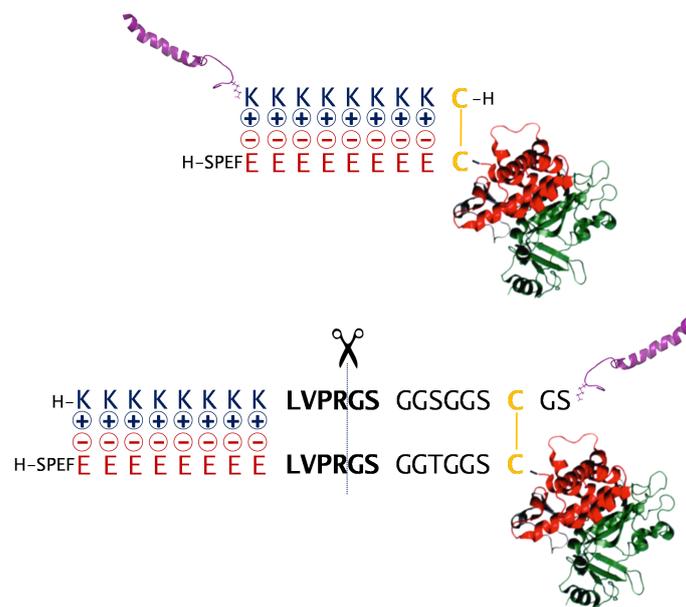


Abbildung 3.23.:

Schema von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ mit den klassischen Fusionspeptiden (oben) und von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38_{CX}$ mit den spaltbaren Fusionspeptiden (unten)

3.3.1. Strukturelle Eigenschaften des $CK_8-[F^7, P^{34}]NPY$

Da das Polylysinfusionspeptid (CK_8) mit seinen neun Aminosäureresten immerhin 20 % des Gesamtpeptides $CK_8-[F^7, P^{34}]NPY$ ausmacht, sollte untersucht werden, ob durch diese Modifikation die Struktur des Peptidhormonteils stark beeinträchtigt wird. Dazu wurde mittels CD-Spektrometrie eine Sekundärstrukturanalyse durchgeführt (Abschnitt 2.5.4, S.

49). Verglichen wurden die CD-Spektren von 205 bis 260 nm von $[F^7, P^{34}]NPY$ und $CK_8-[F^7, P^{34}]NPY$ mithilfe des auf neuronalen Netzwerken basierenden Dekonvolutionsprogrammes „cdnn“ (Böhm et al., 1992).

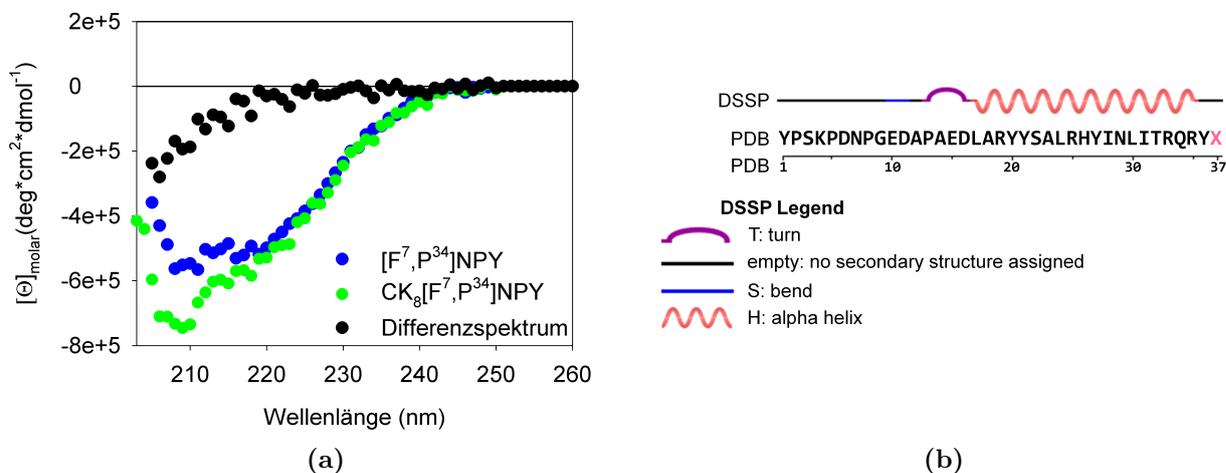


Abbildung 3.24.: (a) CD-Spektren von $[F^7, P^{34}]NPY$ und $CK_8-[F^7, P^{34}]NPY$. Aufgenommen mit je 100 $\mu\text{g/ml}$ Protein in einer 0,1 cm Küvette in 20 mM Tris, pH 8,0; 2 mM EDTA, 50 mM NaCl bei 10 °C. In schwarz ist zusätzlich das Differenzspektrum dargestellt. (b) Sekundärstrukturanalyse von $[F^7, P^{34}]NPY$. Quelle: „Sequence Chain View“ zum PDB-Eintrag 1F8P.

Beide NPY-Varianten zeigen fast identische Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturen (Abb. 3.24a). Die Struktur wird durch α -helikale Anteile dominiert (46 % $[F^7, P^{34}]NPY$ und 45 % $CK_8-[F^7, P^{34}]NPY$). *Random Coil* wird auf 25 % ($[F^7, P^{34}]NPY$) bzw. 26 % ($CK_8-[F^7, P^{34}]NPY$) berechnet. Beta-*Turn* liegt bei beiden Varianten bei 15 %. Es wird auch Beta-*Sheet* mit 12 % Anteil an der Gesamtstruktur berechnet. Diese Daten entsprechen auch in etwa den Sekundärstrukturanteilen der Ausgangsvariante pNPY. Laut Berechnungen mit dem Programm DSSP (Kabsch and Sander, 1983) aus den PDB-Daten von Struktur 1F8P (porcine neuropeptide Y bound to DPC micelles) zeigt dieses Peptid einen alphahelicalen Anteil von 53 %, 17 % *Turn* und *Bend* sowie 31 % undefinierte Struktur. Nur Beta-*Sheet* findet sich in dieser DSSP Analytik, beruhend auf den Kristallstrukturdaten, nicht wieder (Abb. 3.24b). Diese Differenz beruht vermutlich auf der geringen Auflösung der CD-Spektren gerade bei niedrigen Wellenlängen.

Dennoch zeigen die CD-Spektren eine ähnliche Faltung von polyionisch modifiziertem und unmodifiziertem $[F^7, P^{34}]NPY$, die insgesamt der des Ausgangs-peptids pNPY ähneln. Das Differenzspektrum zeigt keinen signifikanten Sekundärstrukturanteil des polyionischen Fusionspeptides, sondern deutet eher auf eine *Random Coil*-Struktur hin.

Es lässt sich also folgern, dass die NPY-Struktur auch mit der Modifikation am Lysin vier erhalten bleibt. Die Einführung des Polylysinpeptides erhöht leicht den *Random Coil*-Anteil. Auch das Differenzspektrum weist auf *Random Coil*-Struktur des Fusionspeptides hin.

3.3.2. Internalisierungsstudien von $CK_8-[F^7, P^{34}]NPY$ über hY_1R

Zur Kontrolle der Funktionalität des polyionisch modifizierten $CK_8-[F^7, P^{34}]NPY$ wurden Internalisierungsstudien an stabil transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Diese synthetisierten mit gelb fluoreszierenden Protein markierten hY_1R oder hY_2R . Ohne Stimulation konnte aufgrund der gelben Fluoreszenz für beide Rezeptortypen Membranständigkeit nachgewiesen werden, abgesehen von geringen intrazellulären Anteilen aufgrund von Biosyntheseprozessen (Abb.3.25).

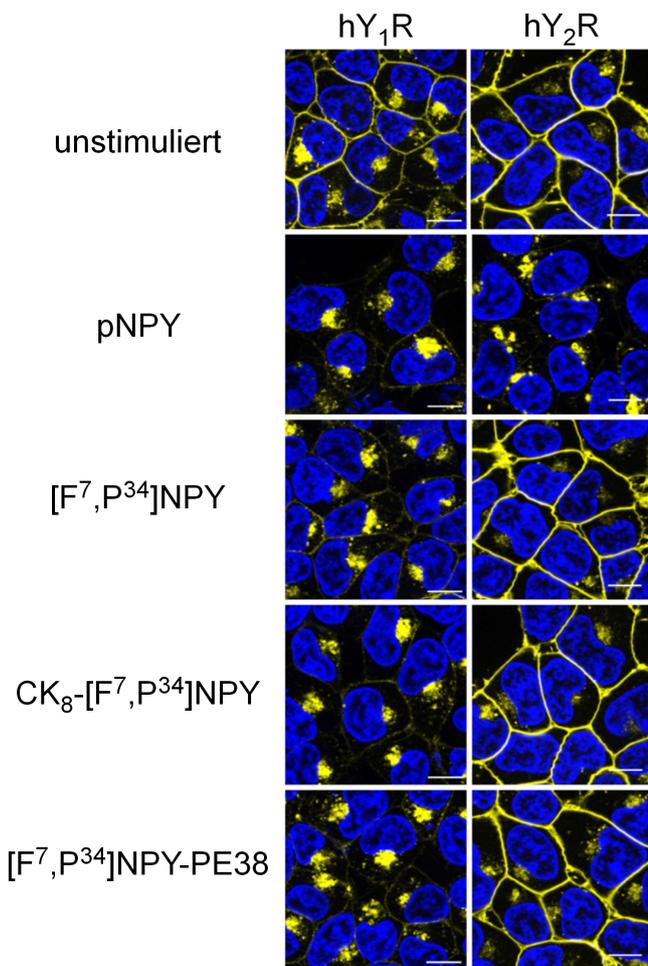


Abbildung 3.25.:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Rezeptorinternalisierungsstudien auf HEK293 Zellen, die stabil hY_1R oder hY_2R synthetisieren. Die Rezeptoren sind zusätzlich C-terminal mit gelb fluoreszierendem Protein fusioniert. Die Stimulation erfolgte jeweils mit 100 nM Peptid für 1 h. Zellkerne sind mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt. Maßstab: 10 μm . Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Eine Stimulation der Zellen mit NPY führt zu einer Internalisierung beider Rezeptorsubtypen, was am Verschwinden der Oberflächenfluoreszenz der Zellen sichtbar wird. Das hY_1R -selektive $[F^7, P^{34}]NPY$ führt, wie erwartet, nur zur Internalisierung der hY_1R , während hY_2R weiterhin, wie auch bei unstimulierten Zellen, in der Zellmembran lokalisiert bleibt. Diese Selektivität und Funktionalität bleibt auch beim $CK_8-[F^7, P^{34}]NPY$ trotz der Modifikation mit dem Polylysinpeptid erhalten. Sogar die Vergrößerung der Modifikation durch die Bildung des Immuntoxins mit PE38 beeinträchtigt weder die selektive Aktivierung des Rezeptors noch die Internalisierung des gesamten Immuntoxin- hY_1R -Komplexes (Abb. 3.25).

3.3.3. Herstellung und Reinigung von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$

Die Herstellung des Fusionskonstruktes $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ wurde mittels des klassischen Fusionspeptides erzielt. Im Redoxpuffer unter geringer Ionenstärke konnte das Heterodimer mit bis zu 80 % Ausbeute gewonnen werden. Dies ergab eine densitometrische Analyse nach der Auftrennung des Reaktionsansatzes mittels SDS-PAGE (Abb 3.26).

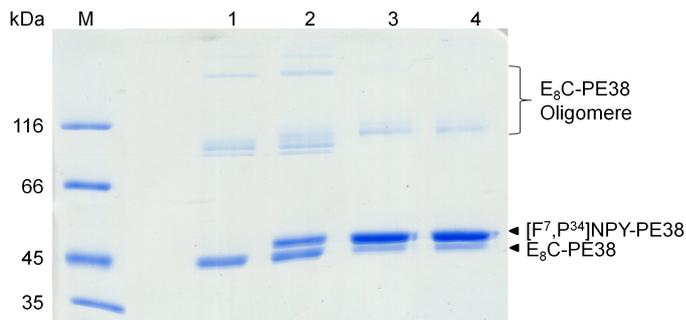


Abbildung 3.26.:

SDS-PAGE-Analytik der Kopplungsreaktion von $CK_8-[F^7, P^{34}]NPY$ und $E_8C-PE38$ unter nicht reduzierenden Bedingungen. Die Kopplung erfolgte ausgehend von je $4 \mu M$ $CK_8-[F^7, P^{34}]NPY$ und $E_8C-PE38$ (1) in Redoxpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,0 mit 50 mM NaCl, 2 mM EDTA) mittels Redoxshuffling (20 μM GSH und 80 μM GSSG) bei $22^\circ C$. Analysiert wurde die Reaktion zu Beginn (2) und nach 4 h (3) und 8 h (4) Reaktionszeit. Gezeigt ist ein 12%iges Polyacrylamidgel, Coomassie gefärbt.

Der Heterodimerisierungsansatz von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ wurde zur Abtrennung freier Spezies an einer Anionenaustauschermatrix (HiTrap Q HP) gereinigt. Im Durchfluss wurde das freie $CK_8-[F^7, P^{34}]NPY$ -Peptid mit seinem positiv geladenen *tag* eluiert, das nicht an die positiv geladene Matrix bindet. Im fusionierten Zustand werden die negativen Ladungen des Polyglutamatpeptides teilweise durch die Lysinreste des $CK_8-[F^7, P^{34}]NPY$ neutralisiert, so dass hier die Bindung schwächer ist als die der freien Exotoxinmoleküle. Entsprechend wurde während der Gradientenelution zunächst das Immuntoxin eluiert, gefolgt von der freien Exotoxinspezies (Abb. 3.27).

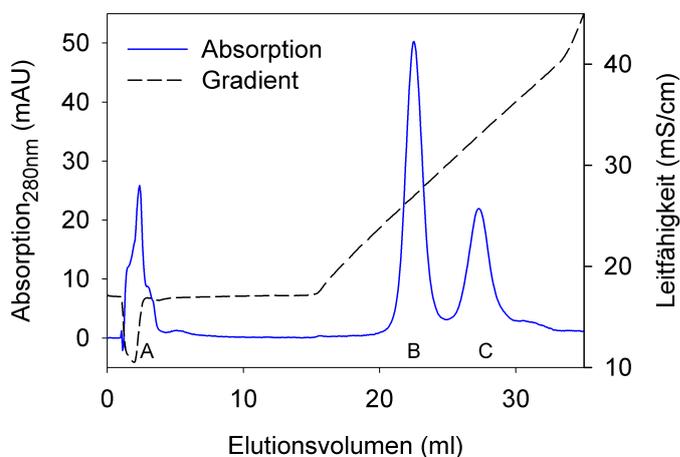


Abbildung 3.27.:

Reinigung von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$. An der Anionenaustauschermatrix (HiTrap Q HP) binden das Immuntoxin (B) und die freien Exotoxinspezies (C). Sie können in einem linearen NaCl-Gradienten getrennt eluiert werden. $CK_8-[F^7, P^{34}]NPY$ ist im Durchfluss (A) zu finden.

3.3.4. Biologische Aktivität von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ in Zellkultur

Die biologische Aktivität des Immuntoxins $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ wurde durch Bestimmung der EC_{50} -Werte in Zellkultur nach 48 h Inkubation analysiert. Es wurde mit den hY_1R -positiven Zelllinien SK-N-MC und MCF7 sowie mit der hY_1R -negativen Kontrollzelllinie HEK-293 gearbeitet.

Für beide hY_1R -positiven Zelllinien zeigte sich mit einem EC_{50} -Wert im niedrigen nanomolaren Bereich (SK-N-MC: $EC_{50} = 3,6 \pm 0,7$ nM, $n = 4$, Abb. 3.28b und MCF7: $EC_{50} = 2,7 \pm 0,5$ nM, $n = 16$, Abb.3.28a) eine hohe Affinität des Immuntoxins für den Rezeptor. Im Vergleich dazu schädigt das freie Toxin ohne die zelladressierende Komponente die Zellen erst mit einer ca. sieben Mal höheren Konzentration (SK-N-MC: $24,1 \pm 3,1$ nM, $n = 4$ und MCF7: $19,4 \pm 2,3$ nM, $n = 12$). Dies weist darauf hin, dass die Fusion mit $[F^7, P^{34}]NPY$ zu einer deutlich verbesserten Internalisierung von PE38 in die Zellen führt. Auf der Kontrollzelllinie HEK-293 waren keine Unterschiede in der Toxizität zwischen Immuntoxin und freiem Toxin nachweisbar, die EC_{50} -Werte sind mit $48,1 \pm 6,2$ nM ($n = 4$) und $47,6 \pm 14,2$ nM ($n = 4$) im Rahmen der Fehler identisch (Abb. 3.28c). Da in diesen Zellen kein hY_1R exprimiert ist, kann das Immuntoxin keine zelloberflächenspezifische Interaktion vermitteln.

Ob die Toxizität von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ auf hY_1R -positiven Zellen tatsächlich auf der Interaktion des $[F^7, P^{34}]NPY$ mit dem hY_1R und anschließender Internalisierung des Fusionskonstruktes beruht, wurde in weiteren Experimenten untersucht. So konnte in Gegenwart des hY_1R -Antagonisten, dem BIBP3226 (Rudolf et al., 1994), die toxische Aktivität des Immuntoxins auf den hY_1R -positiven Zelllinien in Abhängigkeit der BIBP3226-Konzentration reduziert werden. Auf SK-N-MC Zellen wurde die Toxizität auf das Aktivitätslevel des freien Toxins herabgesetzt (Abb. 3.28b). Dieser Antagonismus bestätigt eine spezifische Toxizität von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$, die über den hY_1R vermittelt wird.

Auch auf MCF7 Zellen konnte die spezifische Toxizität unter Anwesenheit von BIBP3226 unterdrückt werden. Jedoch ist die Toxizität des $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ in Anwesenheit des Antagonisten immer noch höher als die des freien $E_8C-PE38$. Da in der Literatur immer wieder neben dem hY_1R auch die Expression von hY_5R kontrovers diskutiert wird (Sheriff et al., 2010; Te Kamp et al., 2014), wurde auf dieser Zelllinie der EC_{50} -Wert auch noch in Anwesenheit eines hY_5R -Agonisten, $[Ala^{31}, Aib^{32}]NPY$, bestimmt. Bei einer möglichen, zusätzlichen Internalisierung des Immuntoxins über hY_5R neben der Internalisierung über hY_1R sollte der hY_5R -Agonist diese Interaktion unterbinden. Tatsächlich zeigt sich eine dezente Erhöhung des EC_{50} -Wertes von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ in Anwesenheit des $[Ala^{31}, Aib^{32}]NPY$. Werden im Weiteren die Interaktionen mit beiden hY Rezeptoren unterdrückt, also der EC_{50} in Anwesenheit von BIBP3226 und $[Ala^{31}, Aib^{32}]NPY$ gemessen, so wird wieder der Wert der unspezifischen Toxizität wie bei der Toxinkontrolle gemessen (Abb. 3.28a).

Es zeigt sich also, dass die verwendeten MCF7-Zellen vermutlich nicht nur hY_1R -, sondern

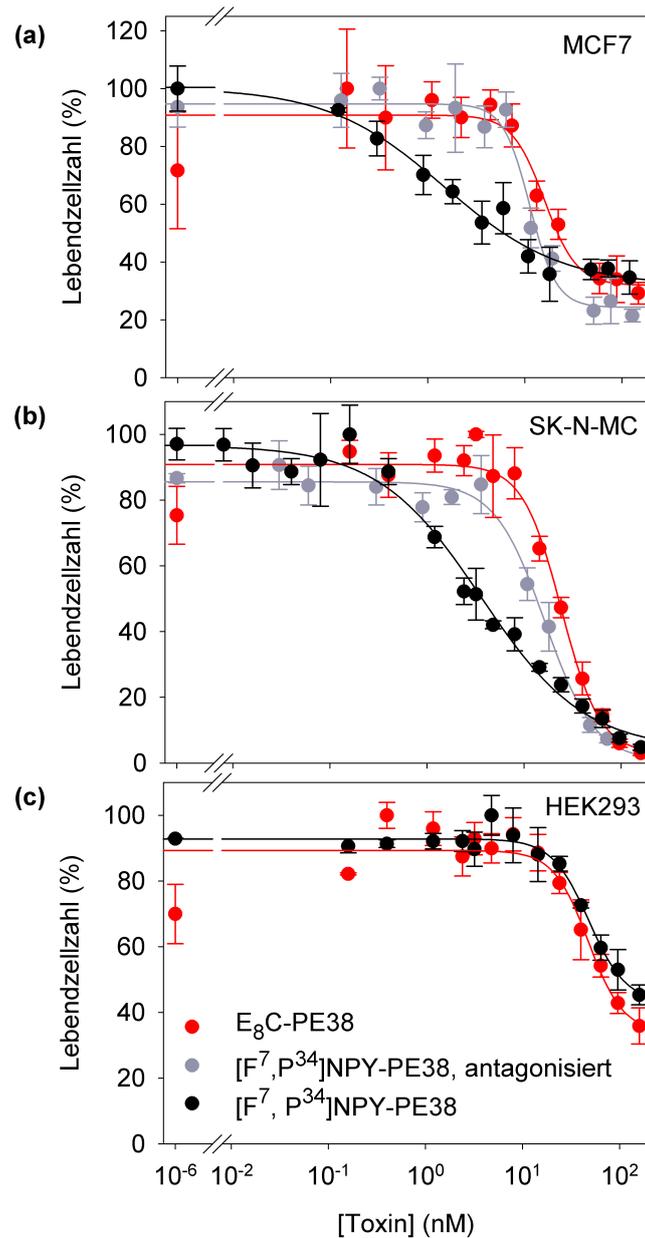


Abbildung 3.28.: Bestimmung der EC_{50} -Werte von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ auf (a) MCF7, (b) SK-N-MC sowie (c) HEK293-Zellen. Die Zellen wurden für 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ oder $E_8C-PE38$ inkubiert. Das Immuntoxin wurde bei MCF7-Zellen noch zusätzlich in Anwesenheit von $1 \mu M$ hY_1R -Antagonist (BIBP3226) und 120 nM hY_5R -Agonist ($[Ala^{31}, Aib^{32}]NPY$) und bei SK-N-MC-Zellen in Anwesenheit von $1 \mu M$ hY_1R -Antagonist (BIBP3226) auf die Zellen gebracht. Nach 48 h Inkubation wurde die Zahl lebender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Der EC_{50} -Wert von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ auf MCF7 und SK-N-MC-Zellen liegt deutlich unterhalb der Werte, die mit freiem $E_8C-PE38$ erzielt wurden. Diese spezifische Wirkung lässt sich allein durch BIBP3226 auf SK-N-MC Zellen antagonisieren. Auf MCF7-Zellen wird zusätzlich eine hY_5R -Aktivität kompetitiert. Auf den HEK293 Zellen als Negativkontrolle sind die Aktivitäten von Immuntoxin und freiem Toxin im Rahmen der Fehler gleich. Hier dargestellt sind Datensätze mit $n = 4$, die durchgängigen Linien zeigen die Anpassungskurven an die experimentellen Daten.

auch hY_5R -positiv sind und dass das $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ zum Teil auch über diesen Rezeptor bindet und toxisch wirkt. Obwohl $[F^7, P^{34}]NPY$ laut Literatur mit einem K_I von 0,009 nM eine hohe Selektivität für hY_1R aufweist, bindet es dennoch mit einem K_I von 34 nM auch an hY_5R (Söll et al., 2001). Daher ist die Vermittlung der Toxizität über hY_5R ein weiteres Indiz für die integrale Funktionalität von $CK_8-[F^7, P^{34}]NPY$ trotz seiner Polylysinmodifikation.

Ein negativer Einfluss auf das Zellwachstum durch BIBP3226 und $[Ala^{31}, Aib^{32}]NPY$ selbst war bei den eingesetzten Konzentrationen der beiden Substanzen nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Bei einem Vergleich der Wirkung von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ auf die beiden hY_1R -positiven Zelllinien fällt auf, dass SK-N-MC-Zellen bei hohen Konzentrationen an Immuntoxin nach 48 h vollständig absterben, wohingegen bei den MCF7-Zellen eine Restpopulation von ca. 30 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen bleibt. MCF7-Zellen sind Caspase3-negativ (Jänicke et al., 1998), einem wichtigen Apoptosefaktor. Da *Pseudomonas* Exotoxin Zellen in die Apoptose führt, liegt die Vermutung nahe, dass MCF7-Zellen weniger effektiv durch PE38 in die Apoptose getrieben werden. Das heißt, das angestrebte Ziel, mit dem Immuntoxin $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ eine gerichtete Zelladressierung zu erzielen und den Gesamtkomplex aus *Targeting*- und Toxineinheit spezifisch über hY_1R in die Zelle zu internalisieren, ist auf beiden Zelllinien erreicht. Allerdings ist das in der Regel hochwirksame PE38 auf MCF7-Zellen keine günstige *Payload*.

Diese These wird durch die Ergebnisse, die mit $B3-PE38_{CX}$ erzielt wurden, unterstützt. Der Mechanismus der Zelladressierung mittels Antigen-Antikörper-Interaktion ist ein anderer als der der Rezeptor-Ligand-Interaktion des $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$. Dennoch verbleiben auch bei der Anwendung von $B3-PE38_{CX}$ nach seiner Anwendung auf MCF7-Zellen lebende Zellen. Im Falle der Zytotoxizitätstests ist der Anteil nach 48 h ebenfalls rund 30 % (Abschnitt 3.2.7, S. 84). Bei den Versuchen zur Wachstumskinetik (Abschnitt 3.2.4, S. 82) wird deutlich, dass die lebenden Zellen auch regenerationsfähig sind. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich hier um Zellen von Subpopulationen handelt, bei denen noch weitere Wege zur Apoptose eingeschränkt sind.

Zusammenfassend zeigt die Tatsache auch, dass die Zytotoxizität der beiden Immuntoxine $B3-PE38_{CX}$ und $NPY-PE38$ nach spezifischer Zelladressierung und Internalisierung tatsächlich über die Aktivität des *Pseudomonas* Exotoxins vermittelt wird.

3.3.5. Herstellung und Reinigung von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38_{CX}$

Die Kopplung von $K_8xC-[F^7, P^{34}]NPY$ und $E_8xC-PE38$ zum Immunkonjugat $[F^7, P^{34}]NPY-PE38_{CX}$ mit spaltbarer polyionischer Sequenz erfolgt wie auch bei der Herstellung von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ in Redoxpuffer unter geringer Ionenstärke. Es wurde äquimolar mit 4 μM je Reaktionspartner gearbeitet und eine Reaktionszeit von 25 h zugelassen. Die Kopplung

der Partner erfolgte laut densitometrischer Auswertung zu 60 % (Abb. 3.29). Im Anschluss wurde das Kopplungsprodukt von den ungekoppelten Edukten durch Kationenaustauschchromatographie an einer HiTrap SP HP getrennt. Das mit der Sulphopropyl-Matrix identisch geladene E_8xC -PE38 wurde im Durchfluss eluiert. Mit steigender Ionenstärke wurde das Kopplungsprodukt vor dem K_8xC -[F⁷, P³⁴]NPY eluiert (Abb. 3.30).

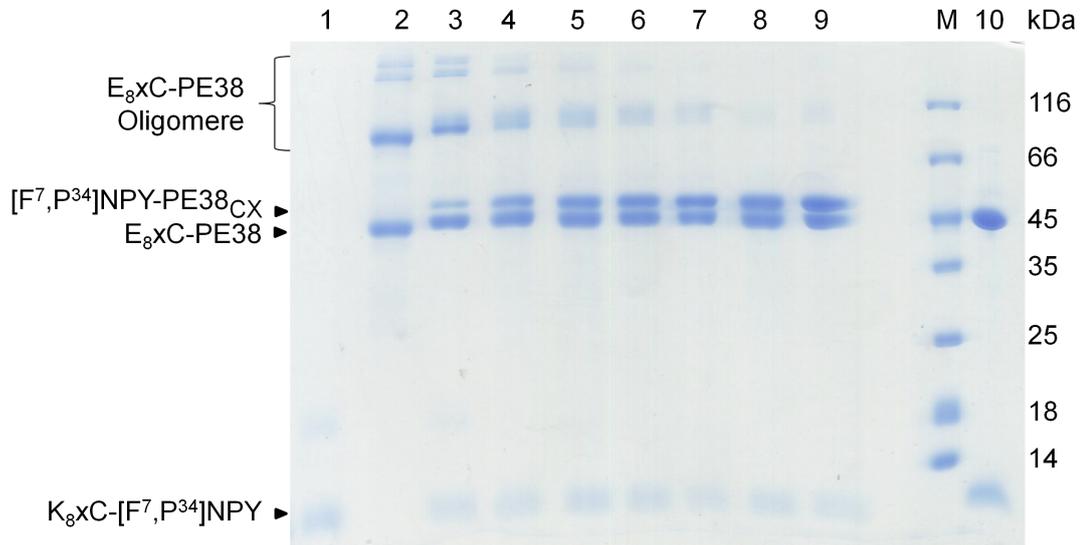


Abbildung 3.29.: SDS-PAGE-Analytik zur Herstellung von [F⁷, P³⁴]NPY-PE38_{CX}. Gezeigt ist ein 12%iges Polyacrylamidgel, Coomassie gefärbt. Proben 1–9 sind nicht reduziert: (1) K_8xC -[F⁷, P³⁴]NPY-Referenz; (2) E_8xC -PE38-Referenz; (3–9) Kopplungsansatz nach 0-0,5-1,5-3-5,5-21-25 h; (10) Kopplungsansatz, reduziert; Die Kopplung erfolgte ausgehend von je 4 µM K_8xC -[F⁷, P³⁴]NPY und E_8xC -PE38 in Redoxpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,0 mit 50 mM NaCl, 2 mM EDTA) mittels Redoxshuffling (20 µM GSH und 80 µM GSSG) bei 22 °C.

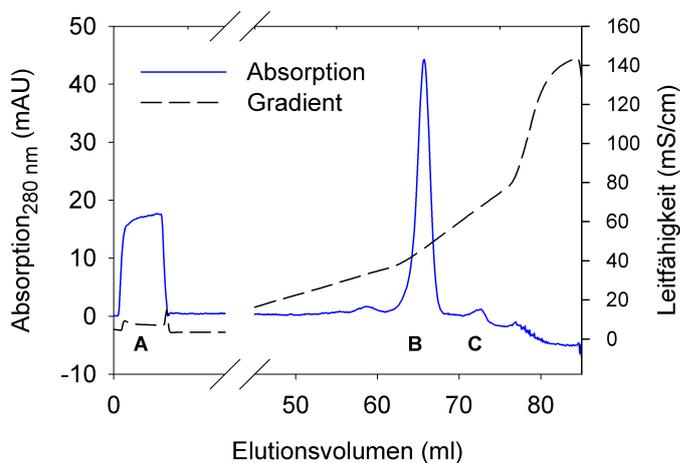


Abbildung 3.30.:

Reinigung von [F⁷, P³⁴]NPY-PE38_{CX} an einer HiTrapSP-Säule. Freies E_8xC -PE38 bindet nicht an die Matrix (A). [F⁷, P³⁴]NPY-PE38_{CX} (B) und das freie K_8xC -[F⁷, P³⁴]NPY (C) können in einem linearen NaCl-Gradienten getrennt eluiert werden.

3.3.6. Thrombinspaltung von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38_{CX}$

Zur Anwendung auf Zellen wurden die geladenen Sequenzen von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38_{CX}$ mittels Thrombinverdau entfernt. In Anwesenheit von 0,05 NIH-U Thrombin pro μg Immuntoxin war eine Inkubationszeit von 21 h bei Raumtemperatur für eine vollständige Spaltung nötig (Abb. 3.31).

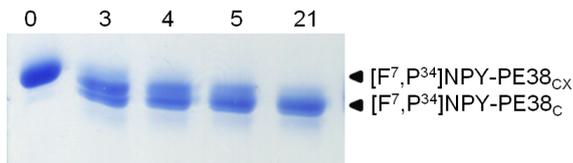


Abbildung 3.31.:

SDS-PAGE-Analytik des Verlaufs der Thrombinspaltung von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38_{CX}$. Verdaut wurde das gereinigte Protein (Peak B in Abb. 3.30). Proben wurden zu den indizierten Zeiten (0-3-4-5-21 h) genommen und unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Gezeigt ist ein 15%iges Polyacrylamidgel, Coomassie gefärbt.

3.3.7. Biologische Aktivität von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38_{CX}$

Die biologische Aktivität von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38_C$ wurde, wie auch die von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$, in Zellkultur an den hY_1R -positiven Zelllinien SK-N-MC und MCF7 getestet (Abb. 3.32). Bei den SK-N-MC-Zellen liegt der EC_{50} des Immuntoxins bei $8,2 \pm 3,1$ nM ($n = 4$) um Faktor 5 niedriger als der durch die unspezifische Toxizität des mit Iodacetamid alkylierten C-PE38 ($42,9 \pm 20,7$ nM, $n = 4$).

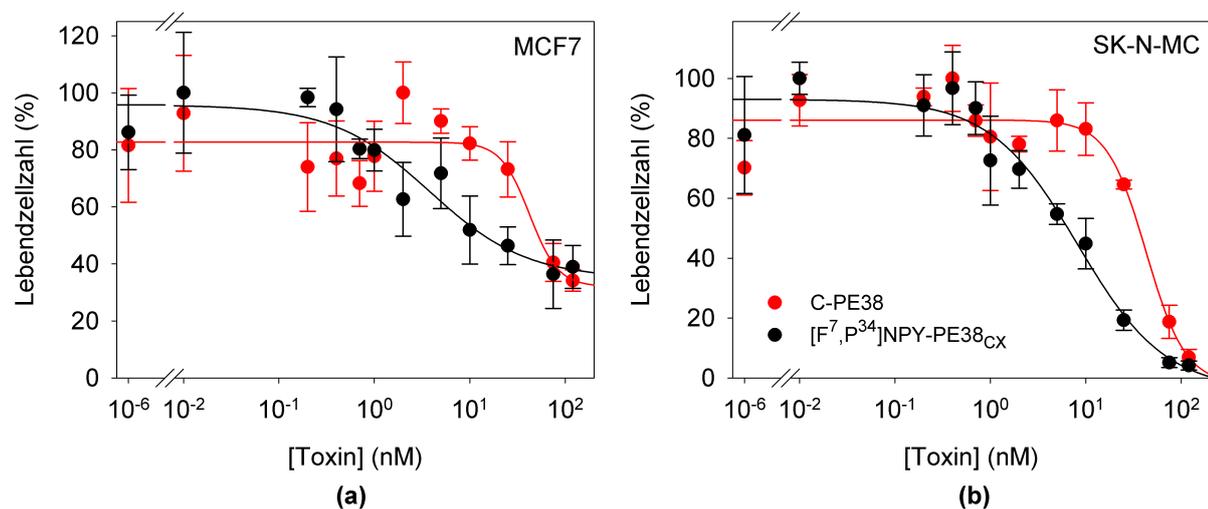


Abbildung 3.32.: Bestimmung der EC_{50} -Werte von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38_C$ auf (a) MCF7, (b) SK-N-MC-Zellen. Die Zellen wurden für 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen $[F^7, P^{34}]NPY-PE38_C$ oder mit Iodacetamid alkyliertem C-PE38 inkubiert. Nach 48 h Inkubation wurde die Zahl lebender Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Der EC_{50} -Wert von $[F^7, P^{34}]NPY-PE38_C$ auf MCF7 und SK-N-MC-Zellen liegt deutlich unterhalb der Werte, die mit alkyliertem C-PE38 erzielt wurden. Hier dargestellt sind Datensätze mit $n = 4$, die durchgängigen Linien zeigen die Anpassungskurven an die experimentellen Daten.

Auf MCF7 Zellen liegt die unspezifische Toxizität von C-PE38 bei einem EC_{50} -Wert von $45,5 \pm 19,6$ nM. Durch die Fusionierung zum Immuntoxin sinkt dieser Wert auf $3,8 \pm 2,2$ nM. Die Antagonisierung der spezifischen Toxizität durch BIBP3226 und $[Ala^{31}, Aib^{32}]NPY$ ist möglich. Demnach sind die Aktivitäten in der Zellkultur zwischen $[F^7, P^{34}]NPY$ -PE38 und $[F^7, P^{34}]NPY$ -PE38_{CX} durchaus vergleichbar, und es wurde auf den zusätzlichen Spezifitätstest mittels einer Negativzelllinie verzichtet. Dieser wurde mit $[F^7, P^{34}]NPY$ -PE38 erfolgreich durchgeführt (Abschnitt 3.3.4, S. 91).

3.3.8. Zusammenfassender Vergleich der Immunttoxine $[F^7, P^{34}]NPY$ -PE38 und $[F^7, P^{34}]NPY$ -PE38_{CX}

In diesem Kapitel wurde das Immuntoxin NPY-PE38 vorgestellt. Es wurde mit zwei Varianten gearbeitet. Eine Variante wurde über die klassischen polyionischen Fusionspeptide hergestellt, die zweite über die in dieser Arbeit etablierten spaltbaren Fusionspeptide.

Die Einführung des hY_1R -Liganden $[F^7, P^{34}]NPY$ als *Targeting*-Komponente eines Immunttoxins mit PE38 als Toxinkomponente führt zu zelltypspezifischer Toxizität. Diese wird vermittelt durch die Ligand-Rezeptor-Interaktion und die folgende Internalisierung des Gesamtkomplexes. Die Modifikation des $[F^7, P^{34}]NPY$ an der Seitenkette des Lysins an Position vier erlaubt weiterhin die Bindung an den Rezeptor. Dies konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden. Jedoch wurde in dieser Arbeit erstmals ein Protein zur Modifizierung verwendet. Dieses ist mit ca. 40 kDa deutlich größer als alle bisher verwendeten chemischen Modifikationen. Auch die hohe Ladungsdichte durch die Fusionsproteine stört die Interaktion mit hY_1R nicht. Die Anwesenheit eines Antagonisten verhindert die spezifische Bindung des Immunttoxins, was unspezifische Zelltoxizität wie beim freien PE38 zur Folge hat.

Ebenso ist die Internalisierung des Gesamtkomplexes in die beiden hY_1R -positiven Zelllinien MCF7 und SK-N-MC offensichtlich ausschließlich die Folge der Rezeptorbindung, unabhängig von der Kopplung des 40 kDa großen Proteintoxins.

Beide Varianten des $[F^7, P^{34}]NPY$ -PE38 zeigen in Zellkultur sehr ähnliche Eigenschaften. In Tabelle 3.4 sind die Aktivitäten der beiden Immunttoxine $[F^7, P^{34}]NPY$ -PE38 und $[F^7, P^{34}]NPY$ -PE38_{CX} noch einmal dargestellt. Beide Immunttoxine zeigen auf beiden hY_1R -positiven Zelllinien Aktivitäten mit EC_{50} -Werten im niedrigen nanomolaren Bereich. Zelltypspezifität wurde anhand des $[F^7, P^{34}]NPY$ -PE38 nachgewiesen.

Unterschiede liegen in der Herstellung. Hier ist der erhöhte Aufwand der Synthese des K_8xC - $[F^7, P^{34}]NPY$ im Vergleich zum CK_8 - $[F^7, P^{34}]NPY$ zu nennen. Dieser liegt der verlängerten *tag*-Länge durch die *Linker*-Sequenz und Thrombinschnittstelle zugrunde. Ferner ist die Kopplungsausbeute deutlich geringer (60 % statt 80 %). An den Arbeitsschritten zu Fusionierung und Reinigung selbst hat sich nichts geändert. Hier ist der Arbeitsaufwand, welcher die Inkubation im Redoxpuffer und eine Reinigung mittels Ionenaustauschchromatogra-

Tabelle 3.4.: Aktivitäten der beiden Immuntoxine $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ und $[F^7, P^{34}]NPY-PE38_C$ in Zellkultur

Zelllinie	Toxin	Zusatz	EC ₅₀ (nM)	n =
SK-N-MC	$[F^7, P^{34}]NPY-PE38$		$3,6 \pm 0,7$	4
	$[F^7, P^{34}]NPY-PE38$	BIBP3226	$17,9 \pm 5,0$	8
	E ₈ C-PE38		$24,1 \pm 3,1$	4
	$[F^7, P^{34}]NPY-PE38_C$		$8,2 \pm 3,1$	4
	C-PE38		$42,9 \pm 20,7$	4
MCF7	$[F^7, P^{34}]NPY-PE38$		$2,7 \pm 0,5$	16
	$[F^7, P^{34}]NPY-PE38$	BIBP3226	$8,41 \pm 1,2$	8
	$[F^7, P^{34}]NPY-PE38$	BIBP3226, [Ala ³¹ , Aib ³²]NPY	$11,2 \pm 1,08$	4
	E ₈ C-PE38		$19,4 \pm 2,34$	12
	$[F^7, P^{34}]NPY-PE38_C$		$3,8 \pm 2,2$	4
HEK-293	C-PE38		$45,5 \pm 19,6$	8
	$[F^7, P^{34}]NPY-PE38$		$48,1 \pm 6,2$	4
	E ₈ C-PE38		$47,6 \pm 14,2$	4

phie umfasst, weiterhin sehr gering. Die Entfernung der geladenen Sequenzen erfordert beim $[F^7, P^{34}]NPY-PE_{CX}$ die zusätzliche Thrombinspaltung, wohingegen $[F^7, P^{34}]NPY-PE38$ nur mit den geladenen Sequenzen eingesetzt werden kann. Ob der Mehraufwand der Abtrennung der polyionischen Sequenz zu einer Aktivität in vivo führt, muss noch in weiterführenden Arbeiten am Tiermodell gezeigt werden. Die Voraussetzungen für solch einen Versuch sind mit dieser Arbeit geschaffen.

4. Diskussion

Im Rahmen der biotechnologischen Möglichkeiten werden immer häufiger funktionelle Einheiten verschiedener rekombinant hergestellter Proteine zu neuen bifunktionalen Proteinen kombiniert. Diese Heterodimere werden z.B. in der Krebstherapie als Immuntoxine eingesetzt. In den letzten Jahren wurde eine Methode zur In-vitro-Herstellung von Heterodimeren mittels polyionischer Fusionspeptide als spezifischem Dimerisierungsmotiv entwickelt. Die klassische Variante dieser Fusionspeptide basiert auf der Expression der zwei zu fusionierenden Proteinkomponenten, welche, jeweils am N- oder C-Terminus oder sogar in eine *loop*-Struktur integriert, um eine Sequenz positiv oder negativ geladener Aminosäuren sowie ein Cystein verlängert werden. Die entgegengesetzt geladenen Sequenzen dieser Fusionspeptide bedingen eine gerichtete Heterodimerisierung aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen. Dies führt zu einer engen räumlichen Annäherung der zusätzlich eingeführten Cysteine. Unter entsprechenden Redoxbedingungen bilden diese eine kovalente Disulfidbrücke aus, so dass das kovalent verbundene Heterodimer entsteht (Richter et al., 2001; Stubenrauch et al., 2001).

Die geladenen Sequenzen dieser modular einsetzbaren Fusionspeptide haben sich als multifunktional erwiesen, indem sie neben der Heterodimerisierung auch Proteinreinigung und matrixassoziierte Faltungsvorgänge ermöglichen (Sassenfeld and Brewer, 1984; Stempfer et al., 1996; Lilie et al., 2013).

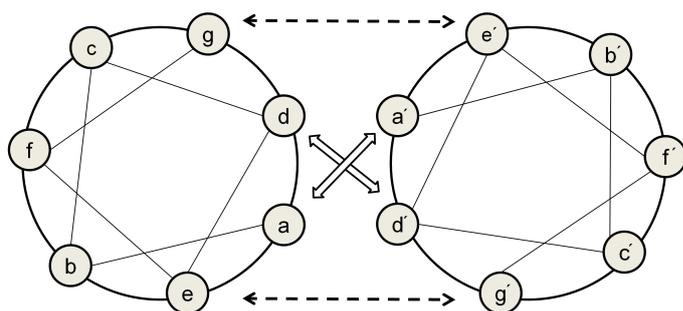
Nach erfolgter kovalenter Dimerisierung und Reinigung sind die geladenen Sequenzen nicht mehr essentiell. Sie tragen nicht zur Aktivität des Heterodimers bei. Jedoch sind ionische Interaktionen, z. B. mit anderen Proteinen oder biologischen Oberflächen, denkbar, so dass die hohe Ladungsdichte auf die Aktivität der Fusionskonstrukte indirekt einen negativen Einfluss haben kann. Daher wurde das Konzept der polyionischen Fusionsproteine innerhalb dieser Arbeit weiterentwickelt. Mit dem Ziel nach der Kopplung der Fusionspartner die polyionische Sequenz unter Beibehaltung der kovalenten Disulfidbrücke zu entfernen, wurde eine Thrombinspaltstelle zwischen dem zum Protein benachbarten Cystein des Fusionspeptides und der polyionischen Sequenz integriert. Diese nun spaltbaren Peptide erlauben die Entfernung der geladenen Sequenzen nach der kovalenten Kopplung und vor der Anwendung der Produkte.

4.1. Polyionische Fusionspeptide im Vergleich zu anderen Technologien zur Fusionierung

In den meisten Fällen werden Immuntoxine genetisch fusioniert und biotechnologisch als bifunktionales Protein hergestellt, was oftmals die Etablierung aufwendiger Expressions- und Rückfaltungsprotokolle beinhaltet. Polyionische Fusionspeptide sind eine schnelle und einfache Kopplungsalternative, was gerade auch bei initialen *Screening*-Versuchen auf der Suche nach neuen bifunktionalen Proteinkombinationen ein wichtiger Vorteil ist. Die Proteinsynthese wird in der Regel wenig beeinflusst und die Reinigung erleichtert; die Kopplung erfolgt bereits in geringen Konzentrationen mit einer hohen Ausbeute und die polyionischen Sequenzen können entfernt werden, so dass, bis auf die essentielle Disulfidbrücke, kaum Reste der Fusionspeptide im Endprodukt enthalten sind.

Jedoch gibt es auch weitere Prinzipien der kovalenten Proteinmodifizierung nach vorhergehender nicht-kovalenter, gerichteter Assoziation der Reaktionspartner mittels *Peptidtags*. Vielfach angewandt und in verschiedene Richtungen entwickelt sind die sogenannten *Coiled-coil*-Strukturen als Dimerisierungsmotiv, ein Strukturmotiv, das in vielen natürlich vorhandenen Proteinen eine Homo- oder Heterodimerisierung induziert. Beispiele sind Tropomyosin (McLachlan and Stewart, 1975) oder die Transkriptionsfaktoren Fos und Jun, die sowohl homodimer als auch heterodimer vorliegen (O’Shea et al., 1989). *Coiled-coil*-Strukturen beruhen auf α -Helices, die sich zu einer Mehrfachhelix winden. Typisch ist der Aufbau der Helices aus sich wiederholenden Heptaden (Aminosäuren a–g) mit hydrophoben Aminosäuren an den Positionen a und d (Abb. 4.1). Diese bilden einen hydrophoben Kern nach dem „knobs-into-holes“-Prinzip (Crick, 1953). Geladene Aminosäuren an Positionen e und g stabilisieren Dimere durch ionische Wechselwirkungen und führen, ähnlich den polyionischen Fusionspeptiden, zur Heterodimerisierung. Dieses Prinzip wurde bei der Herstellung artifizierlicher *Coiled-coil*-Peptide ausgenutzt (O’Shea et al., 1993; Litowski and Hodges, 2002). Für eine stabile Dimerisierung sind mindestens drei Heptaden notwendig. Litowski and Hodges (2002) erzielten mit ihren artifizierlichen *Coiled-coil*-Strukturen eine hohe Affinität mit einer Bindungsenergie von 9,6 kcal/mol und einem K_D -Wert von 70 nM. Ein Vorteil für eine biotechnologische Anwendung der *Coiled-coil*-Peptide gegenüber den polyionischen Fusionspeptiden ist die geringere Salzabhängigkeit ihrer Interaktion aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen.

Das System von Litkowski wurde bereits zur Proteinmodifikation *in vitro* und in Zellkultur eingesetzt (Reinhardt et al., 2014a). Mittels der *Coiled-coil*-Peptide aus je 21 Aminosäuren wurden ein synthetisch hergestellter Thioester aus *Coiled-coil*-Peptid und einem organischen Molekül und ein Protein mit N-terminalem Cystein plus *Coiled-coil*-Peptid für einen Acyltransfer ausgerichtet. Die Thiolgruppe des Cysteins greift das aktivierte Carbonyl-C-Atom des Thioesters nukleophil an. Über einen sich anschließenden NS-shift mit der

**Abbildung 4.1.:**

Helixrad-Darstellung zweier assoziierter *Coiled-coil*-Heptaden. Dargestellt ist der Querschnitt durch ein *Coiled-coil*-assoziiertes Dimer. Die hydrophoben Interaktionen, ausgehend von hydrophoben Aminosäuren an Positionen a und d, sind mit breiten Pfeilen symbolisiert. Sie können durch benachbarte ionische Wechselwirkungen geladener Aminosäuren in Positionen e und g stabilisiert sein, gekennzeichnet durch schmale gestrichelte Pfeile. Abbildung modifiziert nach Litowski and Hodges (2002)

α -Aminogruppe des Cysteins wird eine neue Peptidbindung ausgebildet. Aufgrund der hohen Affinität zwischen den *Coiled-coil*-Peptiden erfolgen Assoziation und Acyltransfer innerhalb von Minuten. Limitierend bei dieser Fusionierung ist die Stabilität des Thioesters, der in wässrigen Puffersystemen zur spontanen Hydrolyse neigt. Eben dieser Thioester macht diesen sogenannten „proteintemplat-vermittelten Acyltransfer“ (Reinhardt et al., 2014b) vor allem für die chemische Modifikation eines Proteins einsetzbar. Die kovalente Heterodimerisierung von Proteinen steht bei dieser Reaktion eher nicht im Fokus. Ferner bleibt nach dem Acyltransfer ein Peptid im Fusionsprodukt integriert, während das zweite frei wird. Für die Kopplung zweier Proteine über diese *Coiled-coil*-Peptide wäre, wie bei den polyionischen Fusionspeptiden, die Einführung einer kovalenten Verknüpfung sinnvoll. Ansonsten liegt das Dimer in einem konzentrationsabhängigen Gleichgewicht mit den nicht assoziierten Monomeren vor, wie es für *coiled-coil*-stabilisierte variable Antikörperdomänen gezeigt wurde (Arndt et al., 2001). Bereits natürlicherweise existieren *Coiled-coil*-Strukturen, die zusätzlich stabilisiert sind. Unter den üblicherweise intrazellulären reduzierenden Bedingungen liegt Occludin als Heterodimer an Zonula-Occludens-Protein gebunden vor. Walter et al. (2009) konnten zeigen, dass oxidativer Stress zur kovalenten Stabilisierung von Homodimeren über Cysteine in dessen C-terminaler *Coiled-coil*-Domäne führen. Artifiziiell hergestellte *Coiled-coil*-Dimere können über den Austausch einer hydrophoben Wechselwirkung durch eine Disulfidbrücke oder auch eine kovalente Stabilisierung anstelle ionischer Wechselwirkung stabilisiert werden (Wuo et al., 2015; Bianchi et al., 2005), was zu einer kovalenten Verbindung der beiden Fusionspartner führt.

Die gerichtete, kovalente Kopplung zweier rekombinant hergestellter Proteine *in vitro* über Peptidbindungen kann beispielsweise durch die Verwendung von Split-Inteinen oder über enzymatische Ligationsverfahren realisiert werden. Bei beiden Methoden wird ein Protein C-terminal über den N-Terminus des zweiten Proteins mit einer Peptidbindung verknüpft. Bei den Split-Inteinen verläuft dies über ein Protein-Spleißen *in trans*, wobei die Intein-domäne in gespaltener Form an den C-Terminus des einen sowie den N-Terminus des zweiten

Proteins rekombinant angefügt wird. Die Inteinfragmente assoziieren zum aktiven Intein, so dass die beiden Proteine durch Protein-Spleißen über eine Peptidbindung miteinander verknüpft werden (Mootz, 2007). Hierbei bleibt methodisch immer ein freies, somit in gewissem Maße reaktives Cystein zurück, was zur Dimerisierung oder Aggregation führen kann. Split-Inteine wurden bislang nur bei kleinen, löslichen Proteinen erfolgreich eingesetzt. So wurden bovine pankreatische Ribonuklease (RNaseA) und Restriktionsendonuklease von *Haemophilus parainfluenzae* (Hpal) semisynthetisch aus dem synthetisch hergestellten C-terminalen Peptid und dem rekombinant hergestellten, entsprechend C-terminal verkürzten Protein über Inteine zu aktiven Enzymen fusioniert (Evans et al., 1998). Ferner wurden Löslichkeitsprobleme im Zusammenhang mit den oftmals langen Inteinfragmenten von hundert oder mehr Aminosäuren berichtet (Thiel et al., 2014). Hinsichtlich der enzymatischen Ligationsverfahren wurden in den letzten zehn Jahren eine Reihe von Methoden entwickelt, welche die Fusionierung sowohl synthetischer Peptide als auch rekombinanter Proteine ermöglichen. Ein prominentes Beispiel ist die aus *Staphylococcus aureus* stammende Transpeptidase Sortase A. Das Enzym besitzt die Erkennungssequenz LPXTG und spaltet die Peptidbindung zwischen Threonin und Glycin. Sortase ist in der Lage, das Acyl-Enzymintermediat, das mit der Carbonylfunktion des Threonins während der Katalyse gebildet wird, im Deacylierungsschritt durch eine Aminolyse zu spalten. Dabei agiert die α -Aminogruppe eines extern zugeführten Oligoglycins als Nukleophil (Schmohl and Schwarzer, 2014). Auf diese Weise konnte ein rekombinantes Fab-Fragment gegen den humanen, epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 mit dem Pflanzentoxin Gelonin modifiziert werden. Hierzu wurde das Antikörperfragment C-terminal um die Erkennungssequenz von Sortase A und das Gelonin N-terminal um zwei Glycine erweitert. Die Fusion der beiden Proteine erfolgte bei einer recht hohen Antikörperkonzentration von 50 μ M und 1,5 Mol-Äquivalenten Gelonin mit einer Ausbeute von ca. 50 % (Kornberger and Skerra, 2013). Limitierend bei dieser Reaktion ist ein thermodynamisches Gleichgewicht mit der Abgangsgruppe. Diese enthält ebenfalls ein Glycin und kann somit auch als Nukleophil fungieren. Somit werden bis zu 20fache Überschüsse an Nukleophil benötigt, um Ausbeuten von mehr als 80 % zu erzielen (Levary et al., 2011). Auch das Enzym muss äquimolar eingesetzt werden, da Sortase eine sehr niedrige katalytische Effizienz aufgrund eines hohen K_M -Wertes für die Erkennungssequenz von 8,7 mM aufweist.

4.2. Kopplungseigenschaften und technologische Aspekte der spaltbaren polyionischen Fusionspeptide

Die neu angeordneten, spaltbaren Fusionspeptide führen erfolgreich zur kovalenten Kopplung zweier Proteine mit achtfach entgegengesetzt geladenen Peptiden. Dies wurde an den

drei Konstrukten MBP-sfBFP_{CX}, B3-PE38_{CX} und [F⁷, P³⁴]NPY-PE38_{CX} gezeigt. Die ionischen Wechselwirkungen zwischen den spaltbaren Fusionspeptiden und den damit verbundenen hohen lokalen Konzentrationen der in den Peptiden enthaltenen Cysteine führen zu einer starken Oxidationstendenz dieser Cysteine, was sich in einem Redoxpotential der Disulfidbrücke im Bereich von -400 mV bei pH 8,0 ohne Salzzusatz widerspiegelt. Dies ist vergleichbar mit dem von DTT, einem starken Reduktionsmittel (-366 mV lt. Cleland (1964)), und entspricht auch in etwa den Werten, die für die klassischen Fusionspeptide ermittelt wurden (-380 mV lt. Lilie et al. (2013)). Auch die Stärke der reinen ionischen Interaktionen der Systeme mit acht Ladungen ist für klassische und spaltbare polyionische Peptide vergleichbar und wurde in dieser Arbeit mit $\Delta G = 6,5$ kcal/mol bestimmt. Dieser Wert ist identisch, wenn ein klassisches Fusionspeptid mit einem spaltbaren kombiniert wird. Die Art des Fusionspeptidaufbaus hat folglich keinen Einfluss auf die Stärke der ionischen Wechselwirkungen. Allerdings ist die Affinität der klassischen Fusionspeptide in der Literatur mit einem K_D -Wert von 250 nM beschrieben (Lilie et al., 2013) und liegt deutlich unter dem hier bestimmten (10 μ M). Dieser Unterschied ist durch das Messsystem bedingt. Zur Messung der Assoziation der klassischen Fusionspeptide wurde die Assoziation zwischen BFP-E₈C und *enhanced green fluorescent protein* (EGFP-R₈C) mittels Fluoreszenz-Energie-Transfer-Messungen bestimmt (Frost, 2009). In diesen Messungen wurde nicht berücksichtigt, dass eine Dimerisierung unabhängig von den polyionischen Fusionspeptiden zwischen GFP und ihm gleichen Strukturen wie dem BFP auftritt (Yang et al., 1996). Diese Dimerisierung des GFP ist mit einem K_D von ca. 100 μ M zwar nur schwach ausgeprägt (Phillips Jr, 1997), trägt aber in Kombination mit der durch die polyionischen Fusionspeptide induzierten Dimerisierung in kooperativer Weise deutlich zur Assoziation bei. Diese zusätzliche Interaktion zwischen zwei Fluoreszenzproteinen ist auch der Grund, weshalb in dieser Arbeit von der Analytik der Fusionspeptide mittels Fluoreszenz-Energie-Transfer-Messungen abgesehen wurde.

Obwohl der K_D -Wert der ionischen Wechselwirkungen der Achtersysteme bei 10 μ M liegt, werden dennoch unter geeigneten Redoxbedingungen Ausbeuten der kovalenten Fusion von ca. 60 % erzielt, wenn die Monomere mit nur je 4 μ M eingesetzt werden. Dies lässt sich durch den Entzug der kovalent gebundenen Heterodimere aus dem Gleichgewicht der nicht kovalenten Assoziation begründen. Bei den klassischen Fusionspeptiden ist dieser Effekt größer. Hier werden einheitlich Ausbeuten von bis zu 80 % erzielt (Abschnitt 3.3.3, S. 90, (Kleinschmidt et al., 2003; Bergelt et al., 2009)). Gemischte Disulfide mit Glutathion des Redoxpuffers sind bei der Assoziation mit klassischen Fusionspeptiden fast nicht nachweisbar (Richter et al., 2001). Da durch die Einführung der strukturell flexiblen *Linker*sequenz sowie der Thrombinerkennungsequenz bei den spaltbaren Peptiden ein Abstand von zwölf Aminosäuren zwischen Cystein und den geladenen Aminosäuren entstanden ist, ist nach der Assoziation die lokale Konzentration der Cysteine geringer als bei den klassischen Fusionspeptiden; dies

erschwert die Ausbildung der Disulfidbrücke, die Ausbeute sinkt leicht. Zusätzlich steigt der Anteil gemischter Disulfide mit Glutathion. Solche konnten in der Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend scheinen beim klassischen Fusionspeptid bereits acht geladene Aminosäuren auszureichen, um optimale Bedingungen für die Ausbildung der Disulfidbrücke zu schaffen. Diese Theorie wird dadurch unterstützt, dass die Erhöhung der Anzahl an Ladungen auf zehn im klassischen Fusionspeptid die Ausbeute des kovalent verbundenen Produkts nicht weiter erhöht; sie bleibt bei 80% (Richter et al., 2001). Im Gegensatz dazu wird angenommen, dass die verbesserte Affinität bei den spaltbaren Fusionspeptiden mit zehn Ladungen zu einer besseren kovalenten Dimerisierung führt. Dies deutet sich schon in den Redoxversuchen an, in denen mit dem Zehnersystem höhere Dimerisierungsraten gezeigt werden als für die Achtersysteme. Die geringeren Ausbeuten mit dem spaltbaren Achtersystem im Vergleich zum klassischen Fusionspeptid können folglich durch Verlängerung der geladenen Sequenzen zum Zehnersystem kompensiert werden.

Anhand der quantitativen Auswertung der längenabhängigen Assoziation der polyionischen Fusionspeptide (Abschnitt 3.1.4, S. 71) lassen sich generell gezielt polyionische Fusionspeptide mit vorab kalkulierten Affinitäten konstruieren. Nach diesem einfachen, quantitativen Modell erfolgt die primäre ionische Wechselwirkung der polyionischen Fusionspeptide mit einer Assoziationskonstanten von $K_a = 450 \text{ M}^{-1}$ ($\Delta G^0 = 14,4 \text{ kJ/mol}$). Dieser Wert liegt beträchtlich höher als allgemein angegebene Assoziationskonstanten für Salze, die im Bereich von $0,2\text{--}0,5 \text{ M}^{-1}$ in Wasser liegen (Creighton, 1993), was einer Energie von $1,6\text{--}3,8 \text{ kJ/mol}$ pro ionischer Wechselwirkung entspricht. Diese Diskrepanz lässt sich durch die hohe lokale Ladungsdichte der polyionischen Fusionspeptide erklären. Eine einzelne Ladung des Fusionspeptides wird bei der Wechselwirkung mit dem entgegengesetzt geladenen polyionischen Peptid nicht nur mit einer Ladung, sondern mit der gesamten Ladungsdichte des Peptides interagieren; somit ist diese Wechselwirkung stabiler als die einzelner Ionen. Die abgeleiteten quantitativen Vorhersagen zur Kooperativität der polyionischen Wechselwirkungen aus dem Modell mit $1,8 \text{ kJ/mol}$ für jede zusätzliche ionische Wechselwirkung passt sehr gut zu den oben genannten Energien. Dies scheint zwar tendenziell eher niedrig zu sein, jedoch wurden die Daten zu den polyionischen Fusionspeptiden in Puffer mit 25 mM Natriumphosphatsalzen ermittelt, wodurch die ionischen Wechselwirkungen insgesamt schwächer als in Wasser sind. Vergleicht man jedoch die Stärke der ionischen Wechselwirkungen der peripher angeordneten Fusionspeptide mit ionischen Wechselwirkungen innerhalb eines gefalteten Proteins, so ist die Kooperativität innerhalb der Fusionspeptide geringer als zwischen strukturell stabilisierten ionischen Wechselwirkungen innerhalb eines Proteins. Hier weisen einzelne ionische Wechselwirkungen Stabilitäten auf im Bereich von $4\text{--}12 \text{ kJ/mol}$ (Creighton, 1983; Fersht, 1972; Goldenberg, 1985).

Bei den klassischen Fusionspeptiden hat sich das Achtersystem bewährt. Hier ist ein Optimum zwischen dem Anspruch an eine hohe Affinität für eine hohe Kopplungsausbeute und

an eine möglichst kurze Ladungssequenz gefunden. Für die spaltbaren Fusionspeptide hat das Zehnersystem Vorteile. Für die spätere Anwendung hat die Länge der polyionischen Sequenz aufgrund der vorhergehenden Abspaltung keinen Einfluss bei den spaltbaren polyionischen Fusionspeptiden. Hier ist vor allem eine hohe Fusionsausbeute wichtig. Limitiert wird die Länge der polyionischen Sequenz durch mögliche Ausbildung von Sekundärstrukturen sowie durch Syntheseprobleme.

Für eine Abspaltung der polyionischen Sequenzen von den Fusionspeptiden kann prinzipiell jede spezifische Protease mit ihrer entsprechenden Spaltsequenz verwendet werden. Voraussetzung ist allerdings, dass die in enger Nachbarschaft zur Spaltstelle befindliche Assoziation der polyionischen Sequenzen sterisch nicht den Zugang der Protease zur Spaltstelle blockiert. In dieser Arbeit wurde für die Spaltung Thrombin eingesetzt. Neben den Peptidsequenzen muss nach der Spaltung auch die Dosierung des Thrombins beachtet werden. Ohne Abtrennung des Thrombins aus dem Ansatz bestünde bei einer biologischen Anwendung der generierten Immuntoxine im Tiermodell die Möglichkeit der Bildung von Embolien (Gomi et al., 1990; Paul et al., 1993). Dennoch wurde Thrombin als Spaltungsenzym ausgewählt, da es sehr spezifisch nach dem Arginin in der Erkennungssequenz spaltet und dies unter nicht reduzierenden Bedingungen möglich ist. Dies ist eine essentielle Voraussetzung, um die kovalente Disulfidbrücke zwischen den beiden Komponenten zu bewahren.

Was den Vorteil der Modularität angeht, so sind auch die spaltbaren Fusionspeptide weiterhin flexibel einsetzbar. Sie können genauso als N- wie auch als C-terminale Fusion eingesetzt werden. Jedoch ist die Anwendung innerhalb eines Proteinloops, wie beim Virus-hüllprotein VP1 mit den klassischen Fusionspeptiden angewandt (Stubenrauch et al., 2001), in diesem Fall nicht mehr sinnvoll, da eine Spaltung das Gesamtprotein betreffen würde. Als Alternative kann das spaltbare polyionische Peptid synthetisch hergestellt und durch Verwendung einer chemoselektiven Funktionalität wie der eines Succinimides oder Maleimides über nukleophile Aminosäurefunktionalitäten von Lysinen oder Cysteinen an Seitenketten des Zielproteins fusioniert werden. Mit dieser Methode erhält man allerdings in der Regel heterogene Produktgemische mit unterschiedlichen Eigenschaften. Eine regiospezifische Kopplung des polyionischen Peptides könnte durch das Einführen nichtproteinogener Aminosäuren im Zielprotein erzielt werden, die bioorthogonale Reaktivitäten aufweisen (Wang and Schultz, 2005). Dies ist jedoch durchaus anspruchsvoll und bedarf einer Erweiterung des genetischen Codes. Praktikabel ist die Einführung des polyionischen Fusionspeptides bei synthetisch hergestellten Peptiden durch eine geeignete orthogonale Schutzgruppenstrategie, wie es in dieser Arbeit für das [F⁷, P³⁴]NPY erfolgreich durchgeführt wurde.

Zusätzlich zur Positionierung der polyionischen Peptide an den Proteinen ist die in seltenen Fällen beobachtete Interaktion der ionischen Sequenzen mit geladenen Oberflächen möglicher Zielproteine zu beachten. Die Wahrscheinlichkeit einer solchen konkurrierenden Wechselwirkung ist durch den längeren und flexibleren Aufbau beim spaltbaren Fusionspep-

tid höher als beim klassischen. Dies führt insbesondere bei geringer Ionenstärke des Puffers, die für die gerichtete Assoziation grundlegend ist, zu konkurrierenden Wechselwirkungen mit dem Protein. So ist EGFP mit dem klassischen Polyargininpeptid löslich (Frost, 2009). Die C-terminale Fusion der spaltbaren Variante hingegen führt zu einer sehr schlechten Löslichkeit des Proteins in Puffersystemen mit geringer Ionenstärke. Mit steigender Ionenstärke des Puffersystems geht das Protein wieder in Lösung. Auch die Spaltung des Fusionspeptides erhöht die Löslichkeit. Somit ist davon auszugehen, dass in diesem Fall die geringe Löslichkeit des EGFP-CxR₈ auf ionischen Wechselwirkungen zwischen dem Polyarginin und negativen Ladungen der EGFP-Oberfläche basiert, so dass die Hydrophilie des Gesamtkonstruktes durch Ladungsabschirmung deutlich herabgesenkt war (Daten nicht gezeigt). Ähnliches wurde bislang nur bei Granzym B und dem klassischen negativ geladenen Fusionspeptid beobachtet (Kurschus et al., 2004). Die Wechselwirkung mit der positiven Oberfläche des Granzym B reduzierte die Zugänglichkeit des *tags* und somit auch die Fusionsraten mit dsFvB3-R₈C. Hier wurden dennoch hohe Kopplungsausbeuten erzielt, indem die Reaktivität des Cysteins am dsFvB3-R₈C durch Aktivierung mit Dithiopyridin erhöht wurde (Kurschus et al., 2004). Diese Interaktionen haben lediglich die Löslichkeit des Proteins und die Reaktivität der Fusionspeptide gemindert. Die Funktionalitäten der Proteine selbst wurden jedoch nicht beeinflusst. Im Normalfall ist eine Verbesserung der Löslichkeit des Proteins durch die geladenen Fusionspeptide und eine freie Exposition der Ladungen im wässrigen Puffer zu erwarten. Im polaren Umfeld wässriger Lösungsmittel bleiben sogar auch Struktur und Funktionalität von [F⁷, P³⁴]NPY erhalten, obwohl das Peptidhormon selbst kaum größer als das Fusionspeptid ist.

Zusammenfassend ist unter technologischem Aspekt herauszustellen, dass auch die thrombinspaltbare Variante der polyionischen Fusionspeptide als ein modulares System zur Herstellung bifunktionaler Proteine einsetzbar ist. Die Herstellung erfolgt rekombinant N- oder C-terminal zusammen mit den Proteinen. Innerhalb eines Proteins ist eine Fusionierung eines Peptides über gerichtete chemische Reaktionen möglich. Trotz der kurzen Länge von 21 Aminosäuren werden hohe intermolekulare Affinitäten und dadurch spezifische Heterodimerisierungen mit hohen Ausbeuten auch im niederen mikromolaren Konzentrationsbereich erzielt. Auch was die Auswahl der zu koppelnden Proteine angeht, sind die spaltbaren Fusionspeptide in weitem Rahmen einsetzbar.

Dass die kovalente Disulfidbrücke, die über die polyionischen Fusionspeptide erzielt wird, im Gegensatz zu einer Peptidbindung reduziert werden kann, hat bei der Anwendung von Immuntoxinen durchaus Vorteile. Im intrazellulären, reduzierenden Milieu werden die beiden Komponenten getrennt, so dass das Toxin freigegeben wird. Extrazellulär scheint die Disulfidbrücke auch ohne die Stabilisierung durch die ionischen Wechselwirkungen ausreichend stabil zu sein. So zeigt sich im Versuch der zeitabhängigen Applikation mit B3-PE38_C in Zellkultur ein deutlich schlechteres Zellwachstum bei dauerhafter Inkubation der Zellen

mit dem Immuntoxin im Vergleich zu einer Inkubation von nur fünf Stunden. Daraus lässt sich zurückschließen, dass auch nach 5 h noch aktives Immuntoxin im Medium vorhanden ist. In Anbetracht der Halbwertszeit von LMB-7 und von B3-PE38 von einer halben bis einer Stunde in Mäusen (Reiter et al., 1994; Frost, 2009) ist von einer ausreichenden Stabilität für Mausversuche auszugehen.

Ein weiterer Aspekt in Hinblick auf eine Anwendung *in vivo* ist die potentielle Immunogenität der polyionischen Fusionspeptide. Nach der Immunisierung eines Kaninchens mit B3-PE38, das über die klassischen, nicht spaltbaren polyionischen Fusionspeptide hergestellt war, zeigte das polyklonale Antiserum keinerlei Affinität für die polyionischen Fusionspeptide (Frost, 2009). Auch bei den spaltbaren polyionischen Fusionspeptiden ist keine Antigenität zu erwarten, da sie ohne die polyionischen Sequenzen eingesetzt werden sollen. Allerdings sollten die freien geladenen Sequenzen vor einer Anwendung *in vivo* über Affinitäts- und Ionenaustauschermatrizes entfernt werden, besonders wenn eine Zehnersequenz oder eine höhere zum Einsatz kommen. In dem Fall sind immunogene Wirkungen zu erwarten. So gibt es beispielsweise Antikörper gegen Nonaarginine kommerziell zu erwerben (Anti-Polyarginine: Rabbit Poly Arginine 9R Antibody, Cell Applications, Inc. in San Diego, USA). Ferner sind Polylysinverbindungen als Adjuvantien einsetzbar zur Bildung von Antikörpern gegen Haptene (Clementi et al., 1991; Romestand et al., 2010). Durch sie ist eine verstärkte Immunantwort möglich.

4.3. Anwendung der Immunttoxine B3-PE38_{CX} und [F⁷, P³⁴]NPY-PE38 bzw. [F⁷, P³⁴]NPY-PE38_{CX}

Die Einführung der Thrombinspaltstelle zur Entfernung der polyionischen Sequenz nach kovalenter Heterodimerisierung erfolgte aufgrund der Ergebnisse von Frost (2009). In dessen Arbeit wurde gezeigt, dass das über polyionische Fusionspeptide hergestellte Immuntoxin B3-PE38 in Zellkultur vergleichbare biologische Aktivität wie das genetisch fusionierte Analogon LMB-7 aufweist. Im Mausmodell jedoch war das B3-PE38 dem LMB-7 deutlich unterlegen. Bislang wurde kein konkreter Grund für diese unerwartete Differenz *in vivo* gefunden. So war das Immuntoxin über 2 h im Blutkreislauf als intaktes Heterodimer nachweisbar bei annähernd ähnlicher Halbwertszeit wie beim LMB-7 (Frost, 2009; Reiter et al., 1994). Auch die Penetration des Immunttoxins in Gewebe und dessen Zytotoxizität wurde anhand von dreidimensionalen MCF7-Zellkulturen *in vitro* nachvollzogen (Te Kamp et al., 2014). Daher wurde im weiteren getestet, ob B3-PE38 mit Serumbestandteilen oder Membranen interagiert, so dass ein Übertritt aus dem Blutkreislauf verhindert wird. *In vitro* hatten Serumkonzentrationen von 80% im Zellmedium jedoch keinen negativen Einfluss auf die Zytotoxizität. Hier können starke Wechselwirkungen zwischen Serumbestandteilen

wie Albumin und dem Immuntoxin, die die Aktivität des Immuntoxins beeinträchtigen, ausgeschlossen werden. Auch *Transwell*-Experimente mit bovinen endothelialen Aortazellen GM-7373 zur Simulation des Durchtritts von polyionisch fusionierten Konjugaten durch Gefäßendothel brachten keinen Hinweis auf die fehlende Wirkung *in vivo* (Fleischer, 2010). Bei diesen *In-vitro*-Experimenten ist jedoch zu beachten, dass im Serum die Gerinnungsfaktoren weitestgehend entfernt wurden. Diese interagieren mit negativ geladenen Phospholipiden, die nach Läsionen von Endothelzellen oder von aktivierten Blutplättchen präsentiert werden. Dadurch werden verschiedene Gerinnungsfaktoren gebunden und lokal konzentriert (Dahlbäck, 2000). Hier wäre ein Interaktionspotential mit den geladenen Fusionspeptiden denkbar. Auch wurde bereits für Polylysin ein Einfluss auf die Aktivierung von Faktor Xa und von Prothrombin gezeigt (Lundblad and Roberts, 1982; Vogel et al., 1976). Sollte dennoch ein Übertritt des Immuntoxins in extravasale Gewebe möglich sein, so sind dort ggf. extrazelluläre Gewebefaktoren vorhanden, die mit den Fusionspeptiden interagieren können. Daher kann ein *In-vitro*-System nur bedingt die Situation *in vivo* repräsentieren. Bislang bleibt ein Grund für die fehlende Wirkung von B3-PE38 *in vivo* noch offen.

Da der Hauptunterschied zwischen LMB-7 und B3-PE38 die Art der Fusionierung und somit die geladenen Sequenzen sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit geschaffen, diese geladenen Sequenzen vor der Anwendung zu entfernen. Daher wurde auch als ein Anwendungsbeispiel B3-PE38_C hergestellt und dessen Vergleichbarkeit mit B3-PE38 *in vitro* nachgewiesen. Als zweites anwendungsbezogenes Immuntoxin wurde NPY-PE38 hergestellt. Mit [F⁷, P³⁴]NPY wird ein neues *Targeting*-Modul in Immuntoxinen getestet.

Als *In-vitro*-Modell wurde in Zellkultur mit MCF7-Zellen gearbeitet. Auch wenn sich die Brustkrebs-Zelllinie im Zusammenhang mit dem Apoptose induzierenden PE38 nicht als ideal erwiesen hat, wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit mit den Daten zu B3-PE38 weiterhin mit MCF7-Zellen gearbeitet. Zusätzlich exprimiert diese Zelllinie auch den Rezeptor für NPY, hY₁R, was sie für Zytotoxizitätstests mit NPY-PE38 prädestiniert, so dass auch ein direkter Vergleich der Zytotoxizität der beiden Immuntoxine B3-PE38 und NPY-PE38 möglich ist.

Bei allen Aktivitätsbestimmungen der in dieser Arbeit hergestellten Immuntoxine auf MCF7-Zellen wurden nie alle MCF7-Zellen zum Absterben gebracht. Es blieb immer eine lebende Restpopulation unabhängig von der *Targeting*-Komponente erhalten. Nach 48 h belief sich diese auf 20–30 % der Kontrollpopulation zum gleichen Zeitpunkt. Die überlebenden Zellen konnten je nach Inkubationsdauer und Toxinkonzentration weiterwachsen. MCF7-Zellen sind aufgrund einer Deletion Caspase-3-negativ, einem wichtigen Apoptosefaktor (Jänicke et al., 1998). Auch für LMB-7 auf MCF7-Zellen wurde eine Induktion der Apoptose nachgewiesen, hier läuft sie aber entsprechend über andere Faktoren ab (Keppler-Hafkemeyer et al., 1998). Da *Pseudomonas* Exotoxin jedoch im Normalfall Caspase 3 aktiviert (Jenkins et al., 2004), ist es möglich, dass daher nicht alle MCF7-Zellen durch das

Toxin sterben. Wahrscheinlich ist auch die Anwesenheit von Subpopulationen, die aufgrund weiterer Faktoren noch weniger PE38-sensitiv sind. Bei den SK-N-MC-Zellen hingegen wird der Gesamtpopulation essentiell durch NPY-PE38 geschadet. Es bleibt bei entsprechend hohem Immuntoxineinsatz keine Lebendpopulation zurück.

Die Regeneration der resistenten MCF7-Zellen nach Behandlung mit B3-PE38_C tritt *in vitro* etwas schneller auf als bei B3-PE38. Dies führt zu einem geringfügig erhöhten EC₅₀-Wert und einer geringeren Effektivität bei Mehrfachapplikation. Dennoch sollte diese Tatsache einer vergleichenden *In-vivo*-Anwendung nicht im Wege stehen. Bei dem klassisch hergestellten B3-PE38 war kein Effekt auf MCF7-Xenograft-Tumoren in Mäusen nachweisbar. Sollte das Fusionsprodukt ohne Ladungen nun wirksam auf das Tumorgewebe sein, kann eine Tumorregression erwartet werden. Zusätzlich kann vorab nach einer weniger resistenten Subpopulation von MCF7-Zellen gesucht werden. Idealerweise sollte dann die Wirkung identisch zur genetisch fusionierten Variante LMB-7 sein. Auf jeden Fall sollte in weiterführenden Arbeiten eine Anwendung von B3-PE38_C im Tiermodell nachweisen können, ob die polyionischen Sequenzen im Immuntoxin B3-PE38 mit klassischen Fusioneptiden, wie postuliert, die biologische Aktivität des Immuntoxins unterdrücken.

Das Immuntoxin mit B3 als *Targeting*- und PE38 als Toxinkomponente wird für eine pharmakologische Anwendung in der Praxis nicht von Interesse sein. Die genetisch fusionierte Variante LMB-7 hat in der klinischen Phase I aufgrund zu hoher gastrointestinaler und renaler Toxizität und dabei fehlender Wirkung (Pastan et al., 2007) nicht die Anforderungen zur Anwendung als Arzneimittel erfüllt. Die Nebenwirkungen sind unter anderem auf Interaktionen des dsFvB3 mit physiologisch vorkommenden Lewis^Y-Antigenen des Magens und der Nieren zurückzuführen. Hier zeigt sich, wie diffizil die selektive Adressierung von Tumorgewebe zu erzielen ist.

Daher wird kontinuierlich weiter nach Möglichkeiten der spezifischen Zelladressierung von Immuntoxinen und anderen pharmazeutisch wirksamen Substanzen gesucht bei gleichzeitiger Vermeidung unerwünschter Arzneimittelwirkungen. Hierzu gehören zum einen eine geringe unspezifische Aktivität des Toxins sowie eine hohe Affinität des *Targeting*-Moduls an sein *Target* und somit eine hohe therapeutische Breite. Zum anderen ist eine Adressierung des Tumorgewebes über Strukturen, die idealerweise nur dort vorhanden sind, essentiell, um Nebenwirkungen zu verhindern.

Neben dem *Targeting* über monoklonale Antikörper und deren Derivate ist ein weiterer Ansatz die Zelladressierung über Rezeptorliganden. So bindet das einzige von der FDA zugelassene Immuntoxin Denileukindiftitox den Interleukin-2-Rezeptor (Kiyokawa et al., 1991). In dieser Arbeit wurden mit dem Immuntoxin [F⁷, P³⁴]NPY-PE38 hY₁R-positive Zellen angesteuert. Dieser Ansatz beruht auf der Beobachtung, dass z.B. im Brustkrebsgewebe ein *switch* der Expression von hY₂R zu hY₁R stattfindet, so dass hY₁R in hoher Inzidenz und gleichmäßiger Verteilung im neoplastischen Gewebe vorzufinden ist, nicht aber im ent-

sprechenden gesunden Gewebe (Reubi et al., 2001). Dieser Effekt könnte auf Redifferenzierungsprozessen beruhen, da die umgekehrte Entwicklung während Differenzierungsprozessen beobachtet wurde (DiMaggio et al., 1994).

In dieser Arbeit wurden mit $[F^7, P^{34}]$ NPY-PE38 und $[F^7, P^{34}]$ NPY-PE38_{CX} erstmals Immunttoxine über hY₁R gegen Tumorzellen gerichtet. Die Daten, die in dieser Arbeit mit $[F^7, P^{34}]$ NPY-PE38 in Zellkultur erzielt wurden, sind vielversprechend für weiterführende Tests. Die Internalisierung des hY₁R als Folge der spezifischen Rezeptoraktivierung, die es für den Einsatz als *Targeting*-Komponente prädestiniert, bleibt im ersten Schritt, der Fusionierung von NPY mit dem Polylysinpeptid, erhalten (Abschnitt 3.3.2, S. 89). Auch im zweiten Schritt, der Heterodimerisierung mit PE38, blieben die spezifische Bindung an hY₁R und die Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes erhalten. Dabei war der Toxinteil trotz der Größe von 39 kDa kein Hindernis bei der Internalisierung des Rezeptor-Ligand-Toxin-Komplexes. Dies ist eine essentielle Beobachtung, da bislang nur kleinere Moleküle als *Payload* von NPY-Derivaten eingeführt wurden. Dazu gehören Daunorubicin, ^{99m}Tc-label, das Chelatormolekül 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure oder Carbaborancluster (Langer et al., 2001; Zwanziger et al., 2008; Ahrens et al., 2011). Die Möglichkeit der Internalisierung auch größerer *Payloads* unterstreicht die Eignung von hY₁R als Zielstruktur. In der Konsequenz erwies sich $[F^7, P^{34}]$ NPY-PE38 als hochwirksames und zelltypspezifisches Immuntoxin mit einem EC₅₀-Wert von 2,7 nM. Damit zeigt $[F^7, P^{34}]$ NPY-PE38 eine ähnlich hohe Zytotoxizität wie B3-PE38.

Neben allen Vorteilen bleibt die Frage nach spezifischen Nebenwirkungen von $[F^7, P^{34}]$ NPY-PE38, die sich erst im lebenden Organismus zeigen werden. So ist NPY im zentralen Nervensystem an der Regulation wichtiger Funktionen wie der Steuerung von Hormonsekretion aus der Hypophyse, der Regulation des Hungergefühls und der Anxiolyse beteiligt (McDonald et al., 1985; Gerald et al., 1996; Heilig et al., 1993). Auch wurde die Diffusion von NPY über die Blut-Hirn-Schranke gezeigt (Kastin and Akerstrom, 1999). Jedoch war dies für ^{99m}Tc-gelabeltes $[F^7, P^{34}]$ NPY nach peripherer Applikation im Menschen nicht der Fall. Im Szintigramm wurde keine Radioaktivität im zentralen Nervensystem aufgezeichnet (Khan et al., 2010). Im Immuntoxin liegt das hY₁R-spezifische Analogon zusätzlich an das deutlich größere PE38 gekoppelt vor, so dass eine Diffusion ins zentrale Nervensystem und damit verbundene Nebenwirkungen zunächst nicht zu befürchten sind. In der Peripherie ist NPY unter anderem an der Vasokonstriktion beteiligt (Wahlestedt et al., 1990; Modin et al., 1991). Bei hypertensiven Patienten werden in dem Zusammenhang erhöhte NPY-Werte festgestellt (Solt et al., 1990), auch scheint ein Einfluss auf die Nierenfunktion zu folgen (Allen et al., 1985). Hier sind folglich spezifische Nebenwirkungen des NPY-PE38 zu erwarten. Im besagten Szintigramm von Patienten, denen ^{99m}Tc-gelabeltes $[F^7, P^{34}]$ NPY verabreicht wurde, waren Anreicherungen in Blase und Niere erkennbar (Khan et al., 2010).

Die bei hohen Konzentrationen mögliche Bindung des NPY-PE38 an hY₅R ist sehr wahr-

scheinlich ein zellkulturspezifisches Problem. Im lebenden Organismus wird eine Immuntoxinanreicherung bis in hohe Konzentrationen nur im wirklich stark hY₁R-exprimierenden Gewebe, also dem Tumor selbst, erwartet. Hier wäre die Wirkung über einen anderen Rezeptor nicht nachteilig. Im gesunden Gewebe sollte eine so starke Anreicherung nicht auftreten. Auch eine Wirkung aufgrund hoher hY₅R ist unwahrscheinlich, da der hY₅R in peripherem Gewebe fast nicht nachgewiesen wurde (Cox, 2007).

Bislang hat sich Brustkrebs als die Tumorerkrankung herausgestellt, bei der die Gewebeadressierung über hY₁R am wahrscheinlichsten erfolgreich sein wird. Hier wurde hY₁R in hoher Inzidenz und vor allem auch hoher Dichte und gleichmäßiger Verteilung nachgewiesen (Reubi et al., 2001). In ersten Studien konnten Tumore und sogar Metastasen über radioaktives NPY diagnostiziert werden (Khan et al., 2010). Bei einem therapeutischen Ansatz muss jedoch auch beachtet werden, dass bei estrogensensitiven Tumoren der Estrogenspiegel der Patienten medikamentös erniedrigt wird. Dies führt zu einer Herabregulation der hY₁R in vitro und im MCF7-Xenograft (Memminger et al., 2012). Die umgekehrte Beobachtung der Hochregulation von hY₁R durch Estrogen wurde bereits zuvor, ebenfalls an MCF7-Zellen, gemacht (Amlal et al., 2006). Dieser These müsste noch in Patientengewebe nachgegangen werden. Die Studie von Reubi et al. (2001) beruht auf Gewebeproben, die während Operationen gewonnen wurden. Zu dem Zeitpunkt unterliegen die Patientinnen in der Regel noch keiner Hormonbehandlung (MCA, 2012).

Generell war es möglich, in vitro wirksame Immuntoxine in dieser Arbeit zu etablieren, die mit spaltbaren polyionischen Fusionspeptiden hergestellt worden sind. Neben der bereits bekannten *Targeting*-Toxin-Kombination B3-PE38_{CX} wurde auch die neue *Targeting*-Komponente [F⁷, P³⁴]NPY mit dem *Pseudomonas* Exotoxin erfolgreich kombiniert. Hier wurden viele Versuche auch mit der über die klassischen Fusionspeptide gekoppelten Variante durchgeführt. Für alle Varianten steht im Folgenden noch die Anwendung in einem lebenden Organismus aus. Für B3-PE38_C besteht das Ziel, den möglichen Transfer von In-vitro-Anwendungen nach In-vivo-Modellen mit den gespaltenen Fusionspeptiden zu zeigen. Ist dies gelungen, kann mit NPY-PE38_C die Tumorthherapie weiter untersucht werden.

5. Ausblick

Die klassischen polyionischen Fusionspeptide als artifizielles, modulares Heterodimerisierungsmotiv konnten in dieser Arbeit weiterentwickelt werden. Es wurden spaltbare polyionische Fusionspeptide designt, die eine Entfernung der polyionischen Sequenzen vor der Anwendung der bifunktionalen Produkte zulassen. Die Entfernung der polyionischen Peptide sowie des Thrombins sind mittels weiterer Chromatographieschritte mit Ionenaustauscher- und Benzamidinmatrix denkbar.

Die Analytik der Kopplungseigenschaften dieser spaltbaren Fusionspeptide erfolgte zum Großteil bezüglich der ionischen Wechselwirkungen. Hier steht eine genauere Messung der Stabilität der Disulfidbrücke aus. Zum einen ist der Einfluss der benachbarten polyionischen Wechselwirkungen auf das Redoxpotential der Disulfidbrücke noch nicht geklärt. Hier könnte ein direkter Vergleich zwischen den klassischen und den spaltbaren Fusionspeptiden zeigen, inwiefern der Abstand zwischen den Ladungen und der Disulfidbrücke, der durch die eingefügte Thrombinschnittstelle mit *linker*-Sequenz entsteht, einen Einfluss hat. Zum anderen ist auch die Redoxstabilität der Disulfidbrücke ohne die ionischen Wechselwirkungen für die Anwendung von Interesse. Um die Genauigkeit dieser Messungen zu erhöhen, sollten nicht nur die Konzentrationen der Monomere bestimmt werden, sondern auch die Redoxshufflingkomponenten quantifiziert werden. Eine Etablierung von HPLC-Methoden zur Auftrennung und Quantifizierung aller Redoxpartner ist eine Möglichkeit.

Die Redoxstabilität der Disulfidbrücke nach der Entfernung der ionischen Sequenzen ist besonders auch *in vivo* über pharmakokinetische Untersuchungen im Tier, zunächst der Maus, zu analysieren. Wichtig ist, dass die Immuntoxine ausreichend stabil zirkulieren, um die Zielstrukturen intakt zu adressieren. Das heißt, die Immuntoxine selbst müssen intakt den Tumor erreichen und dazu dürfen sie nicht zu schnell eliminiert werden; die Halbwertszeit sollte nicht zu kurz sein. Hier gibt der Konzentrationsverlauf des Immuntoxins im Blut wichtige Rückschlüsse. Im Idealfall ließe sich auch ein Konzentrationsverlauf im Tumorgewebe aufzeichnen und generell die Verteilung im Körper nachvollziehen. Realistischer jedoch ist zunächst einmal der grundlegende Nachweis des angereicherten, funktionellen Immuntoxins im Tumorgewebe. Dafür braucht es eine spezifische, sensitive Nachweismethode.

Indirekt ließe sich durch den Nachweis der erwarteten biologischen Aktivität des B3-PE38_C, eine Tumorregression, die Anreicherung im Tumorgewebe zeigen. Für die Analytik der Pharmakodynamik stehen vergleichende Versuche mit B3-PE38 und LMB-7 im Xenograft-Mausmodell aus. Zeigen diese Versuche den erfolgreichen Transfer der *In-vitro*-

Aktivität in das Mausmodell, steht auch der Anwendung der NPY-PE38 Immuntoxine nichts mehr entgegen. Hier kann ein weiterer Vergleich zwischen dem über klassische und dem über spaltbare polyionische Fusionspeptide hergestellten Immuntoxin erfolgen. Ein weiter gestecktes Ziel ist jedoch eine mögliche Tumorthherapie über die Adressierung von hY₁R und auch ein Nachweis von Nebenwirkungen. Bei einem Einsatz der NPY-Immuntoxine an einem MCF7-Xenograft sollte die Problematik der hY₁R-Herabregulierung in möglichen weiterführenden Versuchen miteinbezogen werden.

Literaturverzeichnis

- (2012). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms.
- (2013). *Krebs in Deutschland 2009/2010*, volume 9. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).
- (2015). Modified Pseudomonas Exotoxin A, US 2015/0099707 A1.
- Adams, G. P., Schier, R., McCall, A. M., Simmons, H. H., Horak, E. M., Alpaugh, R. K., Marks, J. D., and Weiner, L. M. (2001). High Affinity Restricts the Localization and Tumor Penetration of Single-Chain Fv Antibody Molecules. *Cancer Research*, 61(12):4750–4755.
- Ahrens, V. M., Frank, R., Boehnke, S., Schütz, C. L., Hampel, G., Iffland, D. S., Bings, N. H., Hey-Hawkins, E., and Beck-Sickinger, A. G. (2015). Receptor-Mediated Uptake of Boron-Rich Neuropeptide Y Analogues for Boron Neutron Capture Therapy. *ChemMedChem*, 10(1):164–172.
- Ahrens, V. M., Frank, R., Stadlbauer, S., Beck-Sickinger, A. G., and Hey-Hawkins, E. (2011). Incorporation of ortho-Carboranyl-N ϵ -Modified l-Lysine into Neuropeptide Y Receptor Y1- and Y2-Selective Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(7):2368–2377.
- Allen, J. M., Raine, A. E. G., Ledingham, J. G. G., and Bloom, S. R. (1985). Neuropeptide Y: a novel renal peptide with vasoconstrictor and natriuretic activity. *Clinical Science*, 68(4):373–377.
- Allured, V. S., Collier, R. J., Carroll, S. F., and McKay, D. B. (1986). Structure of exotoxin A of Pseudomonas aeruginosa at 3.0-Angstrom resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(5):1320–1324.
- Amlal, H., Faroqui, S., Balasubramaniam, A., and Sheriff, S. (2006). Estrogen Up-regulates Neuropeptide Y Y1 Receptor Expression in a Human Breast Cancer Cell Line. *Cancer Research*, 66(7):3706–3714.
- Arndt, K. M., Müller, K. M., and Plückthun, A. (2001). Helix-stabilized fv (hsfv) antibody fragments: substituting the constant domains of a fab fragment for a heterodimeric coiled-coil domain1. *Journal of Molecular Biology*, 312(1):221–228.

- Arnold, U. and Ulbrich-Hofmann, R. (1999). Quantitative Protein Precipitation from Guanidine Hydrochloride-Containing Solutions by Sodium Deoxycholate/Trichloroacetic Acid. *Analytical Biochemistry*, 271(2):197–199.
- Baluna, R., Rizo, J., Gordon, B. E., Ghetie, V., and Vitetta, E. S. (1999). Evidence for a structural motif in toxins and interleukin-2 that may be responsible for binding to endothelial cells and initiating vascular leak syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7):3957–3962.
- Beattie, B. K., Prentice, G. A., and Merrill, A. R. (1996). Investigation into the Catalytic Role for the Tryptophan Residues within Domain III of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A. *Biochemistry*, 35:15134–15142.
- Bergelt, S. (2010). *Bifunktionelle artifizielle Immunkonjugate zur Eliminierung von Krebszellen*. PhD thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Bergelt, S., Frost, S., and Lilie, H. (2009). Listeriolysin O as cytotoxic component of an immunotoxin. *Protein Science*, 18(6):1210–1220.
- Bernhardt, G., Reile, H., Birnböck, H., Spruß, T., and Schönenberger, H. (1992). Standardized kinetic microassay to quantify differential chemosensitivity on the basis of proliferative activity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 118(1):35–43.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis - I. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62:293–300.
- Böhm, G., Muhr, R., and Jaenicke, R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Engineering*, 5(3):191–195.
- Bianchi, E., Finotto, M., Ingallinella, P., Hrin, R., Carella, A. V., Hou, X. S., Schleif, W. A., Miller, M. D., Geleziunas, R., and Pessi, A. (2005). Covalent stabilization of coiled coils of the HIV gp41 N region yields extremely potent and broad inhibitors of viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36):12903–12908.
- Birnboim, H. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. In Ray Wu, Lawrence Grossman, K. M., editor, *Recombinant DNA Part B*, volume 100 of *Methods in Enzymology*, pages 243 – 255. Academic Press.
- Bleymüller, J. and Weißbach, R. (2015). *Statistik für Wirtschaftswissenschaftler*. Vahlen, 17 edition.

- Böhme, I., Stichel, J., Walther, C., Mörl, K., and Beck-Sickinger, A. G. (2008). Agonist induced receptor internalization of neuropeptide Y receptor subtypes depends on third intracellular loop and C-terminus. *Cellular Signalling*, 20:1740–1749.
- 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(72):248 – 254.
- Brinkmann, U., Buchner, J., and Pastan, I. (1992). Independent domain folding of Pseudomonas exotoxin and single-chain immunotoxins: influence of interdomain connections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(7):3075–3079.
- Brinkmann, U., Pai, L. H., FitzGerald, D. J., Willingham, M., and Pastan, I. (1991). B3(Fv)-PE38KDEL, a single-chain immunotoxin that causes complete regression of a human carcinoma in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(19):8616–8620.
- Brinkmann, U., Reiter, Y., Jung, S. H., Lee, B., and Pastan, I. (1993). A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(16):7538–7542.
- Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Müller, M., Druker, B. J., and Lydon, N. B. (1996). Inhibition of the Abl Protein-Tyrosine Kinase in Vitro and in Vivo by a 2-Phenylaminopyrimidine Derivative. *Cancer Research*, 56(1):100–104.
- Cabrele, C., Langer, M., Bader, R., Wieland, H. A., Doods, H. N., Zerbe, O., and Beck-Sickinger, A. G. (2000). The First Selective Agonist for the Neuropeptide YY5Receptor Increases Food Intake in Rats. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46):36043–36048.
- Caliceti, P. and Veronese, F. M. (2003). Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(10):1261–1277.
- Caligiuri, M. A., Zmuidzinas, A., Manley, T. J., Levine, H., Smith, K. A., and Ritz, J. (1990). Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *The Journal of Experimental Medicine*, 171(5):1509–1526.
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., and Wathier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc γ RIIIa gene. *Blood*, 99(3):754–758.
- Chaffer, C. L. and Weinberg, R. A. (2011). A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science*, 331(6024):1559–1564.

- Chaudhary, V. K., Queen, G., Junghans, R. P., Waldmann, T. A., FitzGerald, D. J., and Pastan, I. (1989). A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to *Pseudomonas* exotoxin. *Nature*, 339(6223):394–397.
- Chelius, D., Ruf, P., Gruber, P., Plösch, M., Liedtke, R., Gansberger, E., Hess, J., Wasiliu, M., and Lindhofer, H. (2010). Structural and functional characterization of the trifunctional antibody catumaxomab. *mAbs*, 2(3):309–319.
- Cleland, W. W. (1964). Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups. *Biochemistry*, 3(4):480–482.
- Clementi, M., Marini, S., Condo, S., and Giardina, B. (1991). Antibodies against small molecules. *Ann. Ist. Super. Sanita*, 27(1):139–144.
- Cox, H. M. (2007). Neuropeptide Y receptors; antiseecretory control of intestinal epithelial function. *Autonomic Neuroscience*, 133(1):76–85.
- Creighton, T. E. (1983). An empirical approach to protein conformation stability and flexibility. *Biopolymers*, 22(1):49–58.
- Creighton, T. E., editor (1993). *Proteins, Structure and Molecular Properties*. W. H. Freeman and Company, 2 edition.
- Crick, F. H. C. (1953). The packing of α -helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallographica*, 6(8-9):689–697.
- Dahlbäck, B. (2000). Blood coagulation. *The Lancet*, 355(9215):1627–1632.
- De Groot, A. S. and Scott, D. W. (2007). Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends in Immunology*, 28(11):482–490.
- Di Gaetano, N., Cittera, E., Nota, R., Vecchi, A., Grieco, V., Scanziani, E., Botto, M., Introna, M., and Golay, J. (2003). Complement Activation Determines the Therapeutic Activity of Rituximab In Vivo. *The Journal of Immunology*, 171(3):1581–1587.
- DiMaggio, D. A., Farah JM, J., and Westfall, T. C. (1994). Effects of differentiation on neuropeptide-Y receptors and responses in rat pheochromocytoma cells. *Endocrinology*, 134(2):719–727.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1):70 – 77.
- Evans, T. C., Benner, J., and Xu, M.-Q. (1998). Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element. *Protein Science*, 7(11):2256–2264.

- Fairbanks, G., Steck, T. L., and Wallach, D. F. H. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10(13):2606–2617.
- Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H.-P., and Novotny, W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 3(5):391–400.
- Fersht, A. R. (1972). Conformational equilibria in α - and δ -chymotrypsin. *Journal of Molecular Biology*, 64(2):497–509.
- FitzGerald, D. J., Waldmann, T. A., Willingham, M. C., and Pastan, I. (1984). Pseudomonas exotoxin-anti-TAC. Cell-specific immunotoxin active against cells expressing the human T cell growth factor receptor. *Journal of Clinical Investigation*, 74(3):966–971.
- Fleischer, S. (2010). Einfluss von Serum auf die Zytotoxizität des Immuntoxins dsFvB3-PE38 *in vitro*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Francisco, J. A., Cervený, C. G., Meyer, D. L., Mixan, B. J., Klussman, K., Chace, D. F., Rejniak, S. X., Gordon, K. A., DeBlanc, R., Toki, B. E., Law, C.-L., Doronina, S. O., Siegall, C. B., Senter, P. D., and Wahl, A. F. (2003). cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood*, 102(4):1458–1465.
- Frank, N. Y., Margaryan, A., Huang, Y., Schatton, T., Waaga-Gasser, A. M., Gasser, M., Sayegh, M. H., Sadee, W., and Frank, M. H. (2005). ABCB5-Mediated Doxorubicin Transport and Chemoresistance in Human Malignant Melanoma. *Cancer Research*, 65(10):4320–4333.
- Frost, S. (2009). *Charakterisierung artifizieller Fusionsproteine auf Basis polyionischer Fusionspeptide*. PhD thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Fuhlendorff, J., Gether, U., Aakerlund, L., Langeland-Johansen, N., Thøgersen, Hgersen, H., Melberg, S. G., Olsen, U. B., Thastrup, O., and Schwartz, T. W. (1990). [Leu³¹, Pro³⁴]neuropeptide Y: a specific Y₁ receptor agonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(1):182–186.
- Gerald, C., Walker, M. W., Criscione, L., Gustafson, E. L., Batzl-Hartmann, C., Smith, K. E., Vaysse, P., Durkin, M. M., Laz, T. M., Linemeyer, D. L., Schaffhauser, A. O., Whitebread, S., Hofbauer, K. G., Taber, R. I., Brancheck, T. A., and Weinshank, R. L. (1996). A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature*, 382(6587):168–171.

- Gillies, R., Didier, N., and Denton, M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures . *Analytical Biochemistry*, 159(1):109 – 113.
- Goldenberg, D. P. (1985). Dissecting the roles of individual interactions in protein stability: Lessons from a circularized protein. *J. Cell. Biochem.*, 29(4):321–335.
- Gomi, K., Zushi, M., Honda, G., Kawahara, S., Matsuzaki, O., Kanabayashi, T., Yamamoto, S., Maruyama, I., and Suzuki, K. (1990). Antithrombotic effect of recombinant human thrombomodulin on thrombin- induced thromboembolism in mice. *Blood*, 75(7):1396–1399.
- Gray, G. L., Smith, D. H., Baldrige, J. S., Harkins, R. N., Vasil, M. L., Chen, E. Y., and Heyneker, H. L. (1984). Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the exotoxin A structural gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(9):2645–2649.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4):557–580.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5):646–674.
- Hassan, R., Bullock, S., Premkumar, A., Kreitman, R. J., Kindler, H., Willingham, M. C., and Pastan, I. (2007). Phase I Study of SS1P, a Recombinant Anti-Mesothelin Immunotoxin Given as a Bolus I.V. Infusion to Patients with Mesothelin-Expressing Mesothelioma, Ovarian, and Pancreatic Cancers. *Clinical Cancer Research*, 13(17):5144–5149.
- Heilig, M., McLeod, S., Brot, M., Heinrichs, S. C., Menzaghi, F., Koob, G. F., and Britton, K. T. (1993). Anxiolytic-Like Action of Neuropeptide Y: Mediation by Y1 Receptors in Amygdala, and Dissociation from Food Intake Effects. *Neuropsychopharmacology*, 8(4):357–363.
- Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V. J., Elliott, P. J., Adams, J., and Anderson, K. C. (2001). The Proteasome Inhibitor PS-341 Inhibits Growth, Induces Apoptosis, and Overcomes Drug Resistance in Human Multiple Myeloma Cells. *Cancer Research*, 61(7):3071–3076.
- Hoess, R., Brinkmann, U., Handel, T., and Pastan, I. (1993). Identification of a peptide which binds to the carbohydrate-specific monoclonal antibody B3. *Gene*, 128(1):43–49.
- Hofmann, S., Frank, R., Hey-Hawkins, E., Beck-Sickinger, A. G., and Schmidt, P. (2013). Manipulating Y receptor subtype activation of short neuropeptide Y analogs by introducing carbaboranes. *Neuropeptides*, 47(2):59–66.

- Hwang, J., Fitzgerald, D. J., Adhya, S., and Pastan, I. (1987). Functional domains of pseudomonas exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in E. coli. *Cell*, 48(1):129–136.
- Jenkins, C. E., Swiatoniowski, A., Issekutz, A. C., and Lin, T.-J. (2004). Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A Induces Human Mast Cell Apoptosis by a Caspase-8 and -3-dependent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35):37201–37207.
- Jäger, C. (2005). *Die Entwicklung eines Targeting-Moduls zur HIV-Therapie*. PhD thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Jänicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., and Porter, A. G. (1998). Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Morphological Changes Associated with Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 273(16):9357–9360.
- Jordan, M. A., Thrower, D., and Wilson, L. (1991). Mechanism of Inhibition of Cell Proliferation by Vinca Alkaloids. *Cancer Research*, 51(8):2212–2222.
- Kabsch, W. and Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22(12):2577–2637.
- Kastin, A. J. and Akerstrom, V. (1999). Nonsaturable entry of neuropeptide Y into brain. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 276(3):E479–E482.
- Keppler-Hafkemeyer, A., Brinkmann, U., and Pastan, I. (1998). Role of Caspases in Immunotoxin-Induced Apoptosis of Cancer Cells. *Biochemistry*, 37(48):16934–16942. PMID: 9836586.
- Khan, I. U., Reppich, R., and Beck-Sickinger, A. G. (2007). Identification of Neuropeptide Y Cleavage Products in Human Blood to Improve Metabolic Stability. *PeptideScience*, 88(2):182–189.
- Khan, I. U., Zwanziger, D., Böhme, I., Javed, M., Naseer, H., Hyder, S. W., and Beck-Sickinger, A. G. (2010). Neuropeptid-Y- Analoga zur Brustkrebsdiagnostik: von der Synthese zur klinischen Anwendung. *Angewandte Chemie*, 122:1174–1177.
- Kiyokawa, T., Williams, D. P., Snider, C. E., Strom, T. B., and Murphy, J. R. (1991). Protein engineering of diphtheria-toxin-related interleukin-2 fusion toxins to increase cytotoxic potency for high-affinity IL-2-receptor-bearing target cells. *Protein Engineering*, 4(4):463–468.
- Kleinschmidt, M. (2004). *Design modularer Immunotoxine unter Verwendung polyionischer Fusionspeptide*. PhD thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Kleinschmidt, M., Rudolph, R., and Lilie, H. (2003). Design of a Modular Immunotoxin Connected by Polyionic Adapter Peptides. *Journal of Molecular Biology*, 327:445–452.
- Kohn, K. W., Hartley, J. A., and Mattes, W. B. (1987). Mechanisms of DNA sequence selective alkylation of guanine-N7 positions by nitrogen mustards. *Nucleic Acids Research*, 15(24):10531–10549.
- Kornberger, P. and Skerra, A. (2013). Sortase-catalyzed in vitro functionalization of a HER2-specific recombinant Fab for tumor targeting of the plant cytotoxin gelonin. *mAbs*, 6(2):354–366.
- Körner, M. and Reubi, J. C. (2007). NPY receptors in human cancer: A review of current knowledge. *Peptides*, 28:419–425.
- Kounnas, M. Z., Morris, R. E., Thompson, M. R., FitzGerald, D. J., Strickland, D. K., and Saelinger, C. B. (1992). The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A. *Journal of Biological Chemistry*, 267(18):12420–12423.
- Kurschus, F. C., Kleinschmidt, M., Fellows, E., Dornmair, K., Rudolph, R., Lilie, H., and Jenne, D. E. (2004). Killing of target cells by redirected graysin B in the absence of perforin. *FEBS Letters*, 562:87–92.
- Kuzmic, P. (1996). Program DYNAFIT for the Analysis of Enzyme Kinetic Data: Application to HIV Proteinase. *Analytical Biochemistry*, 237(2):260–273.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227:685–780.
- Langer, M., Kratz, F., Rothen-Rutishauser, B., Wunderli-Allenspach, H., and Beck-Sickinger, A. G. (2001). Novel Peptide Conjugates for Tumor-Specific Chemotherapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(9):1341–1348.
- Larhammar, D. (1996). Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regulatory Peptides*, 62(1):1–11.
- Lentze, S. (2013). Affinitäten polyionischer Fusionspeptide. Bachelorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Levary, D. A., Parthasarathy, R., Boder, E. T., and Ackerman, M. E. (2011). Protein-Protein Fusion Catalyzed by Sortase A. *PLoS ONE*, 6(4):e18342–.

- Lewis Phillips, G. D., Li, G., Dugger, D. L., Crocker, L. M., Parsons, K. L., Mai, E., Blättler, W. A., Lambert, J. M., Chari, R. V., Lutz, R. J., Wong, W. L. T., Jacobson, F. S., Koeppen, H., Schwall, R. H., Kenkare-Mitra, S. R., Spencer, S. D., and Sliwkowski, M. X. (2008). Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody-Cytotoxic Drug Conjugate. *Cancer Research*, 68(22):9280–9290.
- Lilie, H., Richter, S., Bergelt, S., Frost, S., and Gehle, F. (2013). Polyionic and cysteine-containing fusion peptides as versatile protein tags. *Biological Chemistry*, 394(8):995–1004.
- Lindner, D., Stichel, J., and Beck-Sickinger, A. G. (2008). Molecular recognition of the NPY hormone family by their receptors. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 24(9):907–17.
- Litowski, J. R. and Hodges, R. S. (2002). Designing Heterodimeric Two-stranded α -Helical Coiled-coils: effects of hydrophobicity and α -helical propensity on protein folding, stability and specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40):37272–37279.
- Lundblad, R. L. and Roberts, H. R. (1982). The acceleration by polylysine of the activation of factor X by factor IXa. *Thrombosis Research*, 25(4):319–329.
- Lundell, I., Blomqvist, A. G., Berglund, M. M., Schober, D. A., Johnson, D., Statnick, M. A., Gadski, R. A., Gehlert, D. R., and Larhammar, D. (1995). Cloning of a Human Receptor of the NPY Receptor Family with High Affinity for Pancreatic Polypeptide and Peptide YY. *Journal of Biological Chemistry*, 270(49):29123–29128.
- Maniatis, T., Jeffrey, A., and Van deSande, H. (1975). Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry*, 14(17):3787–3794.
- Manoukian, G. and Hagemester, F. (2009). Denileukin diftitox: a novel immunotoxin. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(11):1445–1451.
- Mathew, M. and Verma, R. S. (2009). Humanized immunotoxins: A new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy. *Cancer Science*, 100(8):1359–1365.
- McDonald, J. K., Lumpkin, M. D., Samson, W. K., and McCann, S. M. (1985). Neuropeptide Y affects secretion of luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(2):561–564.
- McLachlan, A. and Stewart, M. (1975). Tropomyosin coiled-coil interactions: Evidence for an unstaggered structure. *Journal of Molecular Biology*, 98(2):293–304.

- Memminger, M., Keller, M., Lopuch, M., Pop, N., Bernhardt, G., von Angerer, E., and Buschauer, A. (2012). The neuropeptide y y(1) receptor: a diagnostic marker? Expression in mcf-7 breast cancer cells is down-regulated by antiestrogens in vitro and in xenografts. *PloS one*, 7(12):e51032.
- Michel, M. C., Beck-Sickinger, A. G., Cox, H., Doods, H. N., Herzog, H., Larhammer, D., Quirion, R., Schwartz, T., and Westfall, T. (1998). XVI. International Union of Pharmacology Recommendations for the Nomenclature of Neuropeptide Y, Peptide YY, and Pancreatic Polypeptide Receptors. *Pharmacological Reviews*, 50(1):143–150.
- Modin, A., Pernow, J., and Lundberg, J. M. (1991). Evidence for two neuropeptide Y receptors mediating vasoconstriction. *European Journal of Pharmacology*, 203(2):165–171.
- Monks, S. A., Karagianis, G., Howlett, G. J., and Norton, R. S. (1996). Solution structure of human neuropeptide Y. *Journal of Biomolecular NMR*, 8(4):379–390.
- Mootz, H. D. (2007). Protein-Spleißen durch Inteine – Fundgrube für proteinchemische Anwendungen. *BIOspektrum*, 02:165–167.
- Muller, Y. A., Chen, Y., Christinger, H. W., Li, B., Cunningham, B. C., Lowman, H. B., and de Vos, A. M. (1998). VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Structure*, 6(9):1153–1167.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1:263–273.
- Nesterenko, M. V., Tilley, M., and Upton, S. J. (1994). A simple modification of Blum’s silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 28(3):239–242.
- O’Shea, E., Rutkowski, R., Stafford, W., and Kim, P. (1989). Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun. *Science*, 245(4918):646–648.
- O’Shea, E. K., Lumb, K. J., and Kim, P. S. (1993). Peptide ‘Velcro’: Design of a heterodimeric coiled coil. *Current Biology*, 3(10):658–667.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 4(11):2411–2423.

- Pai, L. H., Batra, J. K., FitzGerald, D. J., Willingham, M. C., and Pastan, I. (1992). Antitumor Effects of B3-PE and B3-LysPE40 in a Nude Mouse Model of Human Breast Cancer and the Evaluation of B3-PE Toxicity in Monkeys. *Cancer Research*, 52(11):3189–3193.
- Pai, L. H., Wittes, R., Setser, A., Willingham, M. C., and Pastan, I. (1996). Treatment of advanced solid tumors with immunotoxin LMB-1: An antibody linked to Pseudomonas exotoxin. *Nat Med*, 2(3):350–353.
- Pastan, I., Hassan, R., FitzGerald, D. J., and Kreitman, R. J. (2007). Immunotoxin Treatment of Cancer. *Annual Review of Medicine*, 58(1):221–237.
- Pastan, I., Lovelace, E. T., Gallo, M. G., Rutherford, A. V., Magnani, J. L., and Willingham, M. C. (1991). Characterization of Monoclonal Antibodies B1 and B3 That React with Mucinous Adenocarcinomas. *Cancer Research*, 51(14):3781–3787.
- Pastan, I. H., Pai, L. H., Brinkmann, U., and Fitzgerald, D. J. (1995). Recombinant Toxins: New Therapeutic Agents for Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 758(1):345–354.
- Paul, W., Gresele, P., Momi, S., Bianchi, G., and Page, C. (1993). The effect of defibrotide on thromboembolism in the pulmonary vasculature of mice and rabbits and in the cerebral vasculature of rabbits. *British Journal of Pharmacology*, 110(4):1565–1571.
- Pedelacq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C., and Waldo, G. S. (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 24(1):79–88.
- Phillips Jr, G. N. (1997). Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Current Opinion in Structural Biology*, 7(6):821–827.
- Poenick, S., Jahnke, H.-G., Eichler, M., Frost, S., Lilie, H., and Robitzki, A. A. (2014). Comparative label-free monitoring of immunotoxin efficacy in 2D and 3D mamma carcinoma in vitro models by impedance spectroscopy. *Biosensors & bioelectronics*, 53:370–6.
- Reile, H., Birnböck, H., Bernhardt, G., Spruß, T., and Schönenberger, T. (1990). Computerized determination of growth kinetic curves and doubling times from cells in microculture. *Analytical Biochemistry*, 187(2):262 – 267.
- Reinhardt, U., Lotze, J., Zernia, S., Mörl, K., Beck-Sickinger, A. G., and Seitz, O. (2014a). Peptide-Templated Acyl Transfer: A Chemical Method for the Labeling of Membrane Proteins on Live Cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(38):10237–10241.

- Reinhardt, U., Lotze, J., Zernia, S., Mörl, K., Beck-Sickinger, A. G., and Seitz, O. (2014b). Proteintemplat-vermittelter Acyltransfer: eine chemische Methode für die Markierung von Membranproteinen an lebenden Zellen. *Angew. Chem.*, 126(38):10402–10406.
- Reiter, Y., Brinkmann, U., Jung, S.-H., Pastan, I., and Lee, B. (1995). Disulfide stabilization of antibody Fv: computer predictions and experimental evaluation. *Protein Engineering*, 8(12):1323–1331.
- Reiter, Y., Pai, L. H., Brinkmann, U., Wang, Q.-c., and Pastan, I. (1994). Antitumor Activity and Pharmacokinetics in Mice of a Recombinant Immunotoxin Containing a Disulfide-stabilized Fv Fragment. *Cancer Research*, 54(10):2714–2718.
- Reubi, J. C. (2003). Peptide Receptors as Molecular Targets for Cancer Diagnosis and Therapy. *Endocr Rev*, 24(4):389–427.
- Reubi, J. C., Gugger, M., Waser, B., and Schaer, J.-C. (2001). Y₁-Mediated Effect of Neuropeptide Y in Cancer: Breast Carcinomas as Targets. *Cancer Research*, 61:4636–4641.
- Richter, S. A., Stubenrauch, K., Lilie, H., and Rudolph, R. (2001). Polyionic fusion peptides as specific dimerization motifs. *Protein Engineering*, 14(10):775–783.
- Roche (2014). Fachinformation MabThera i.v. Zulassungsnr: EU/1/98/067/001.
- Romestand, B., Rolland, J.-L., Commeyras, A., Coussot, G., Desvignes, I., Pascal, R., and Vandenabeele-Trambouze, O. (2010). Dendrigraft Poly-l-lysine: A Non-Immunogenic Synthetic Carrier for Antibody Production. *Biomacromolecules*, 11(5):1169–1173.
- Rudolf, K., Eberlein, W., Engel, W., Wieland, H. A., Willim, K. D., Entzeroth, M., Wienen, W., Beck-Sickinger, A. G., and Doods, H. N. (1994). The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide Y Y₁ receptor antagonist: BIBP3226. *European Journal of Pharmacology*, 271(2-3):R11—R13.
- Rudolph, R., Boehm, G., Lilie, H., and R, J. (1997). *Protein function - a practical approach*, chapter Folding Proteins, pages 57–99. IRL Press at Oxford University Press.
- Sachs, L. (1999). *Angewandte Statistik*. Springer, 9 edition.
- Sakamoto, J., Watanabe, T., Tokumaru, T., Takagi, H., Nakazato, H., and Lloyd, K. O. (1989). Expression of Lewisa, Lewisb, Lewisx, Lewisy, Sialyl-Lewisa, and Sialyl-Lewisx Blood Group Antigens in Human Gastric Carcinoma and in Normal Gastric Tissue. *Cancer Research*, 49(3):745–752.

- Sassenfeld, H. M. A. and Brewer, S. J. (1984). A Polypeptide Fusion Designed for the Purification of Recombinant Proteins. *Nature Biotechnology*, 2(1):76–81.
- Schmohl, L. and Schwarzer, D. (2014). Sortase-mediated ligations for the site-specific modification of proteins. *Current Opinion in Chemical Biology*, 22:122–128.
- Schuster, M., Umana, P., Ferrara, C., Brünker, P., Gerdes, C., Waxenecker, G., Wiederkum, S., Schwager, C., Loibner, H., Himmler, G., and Mudde, G. C. (2005). Improved Effector Functions of a Therapeutic Monoclonal Lewis Y-Specific Antibody by Glycoform Engineering. *Cancer Research*, 65(17):7934–7941.
- Sheriff, S., Ali, M., Yahya, A., Haider, K. H., Balasubramaniam, A., and Amlal, H. (2010). Neuropeptide Y Y5 Receptor Promotes Cell Growth through Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling and Cyclic AMP Inhibition in a Human Breast Cancer Cell Line. *Molecular Cancer Research*, 8(4):604–614.
- Siegall, C. B., Chaudhary, V. K., FitzGerald, D. J., and Pastan, I. (1989). Functional analysis of domains II, Ib, and III of Pseudomonas exotoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 264(24):14256–14261.
- Söll, R. M., Dinger, M. C., Lundell, I., Larhammer, D., and Beck-Sickinger, A. G. (2001). Novel analogues of neuropeptide Y with a preference for the Y₁-receptor. *European Journal of Biochemistry*, 268:2828–2837.
- Solt, V. B., Brown, M. R., Kennedy, B., Kolterman, O. G., and Ziegler, M. G. (1990). Elevated Insulin, Norepinephrine, and Neuropeptide Y in Hypertension. *American Journal of Hypertension*, 3(11):823–828.
- Song, B., Wang, Y., Xi, Y., Kudo, K., Bruheim, S., Botchkina, G. I., Gavin, E., Wan, Y., Formentini, A., Kornmann, M., Fodstad, O., and Ju, J. (2009). Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene*, 28(46):4065–4074.
- Stempfer, G., Holl-Neugebauer, B., and Rudolph, R. (1996). Improved Refolding of an Immobilized Fusion Protein. *Nature Biotechnology*, 14(3):329–334.
- Stubbs, M. T. and Bode, W. (1993). A player of many parts: The spotlight falls on thrombin's structure. *Thrombosis Research*, 69(1):1–58.
- Stubenrauch, K., Gleiter, S., Brinkmann, U., Rudolph, R., and Lilie, H. (2001). Conjugation of an antibody Fv fragment to a virus coat protein: cell-specific targeting of recombinant polyoma-virus-like particles. *Biochem. J.*, 356:867–873.

- Te Kamp, V., Lindner, R., Jahnke, H.-G., Krinke, D., Kostelnik, K. B., Beck-Sickinger, A. G., and Robitzki, A. A. (2014). Quantitative impedimetric NPY-receptor activation monitoring and signal pathway profiling in living cells. *Biosensors & bioelectronics*.
- Thiel, I. V., Volkmann, G., Pietrokovski, S., and Mootz, H. D. (2014). An Atypical Naturally Split Intein Engineered for Highly Efficient Protein Labeling. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(5):1306–1310.
- Valabrega, G., Montemurro, F., and Aglietta, M. (2007). Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Annals of Oncology*, 18(6):977–984.
- Vogel, C. N., Butkowski, R. J., Mann, K. G., and Lundblad, R. L. (1976). Effect of polylysine on the activation of prothrombin. Polylysine substitutes for calcium ions and factor V in the factor Xa catalyzed activation of prothrombin. *Biochemistry*, 15(15):3265–3269.
- Wagener, C. and Müller, O., editors (2009). *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. Georg Thieme Verlag, 3 edition.
- Wahlestedt, C., Hakanson, R., Vaz, C. A., and Zukowska-Grojec, Z. (1990). Norepinephrine and neuropeptide Y: vasoconstrictor cooperation in vivo and in vitro. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 258(3):R736–R742.
- Walter, J. K., Rueckert, C., Voss, M., Mueller, S., Piontek, J., Gast, K., and Blasig, I. E. (2009). The Oligomerization of the Coiled Coil-domain of Occludin Is Redox Sensitive. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165(1):19–27.
- Wang, L. and Schultz, P. G. (2005). Expanding the Genetic Code. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(1):34–66.
- Wedekind, J. E., Trame, C. B., Dorywalska, M., Koehl, P., Raschke, T. M., McKee, M., FitzGerald, D., Collier, R. J., and McKay, D. B. (2001). Refined crystallographic structure of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its implications for the molecular mechanism of toxicity. *Journal of Molecular Biology*, 314(4):823–837.
- Weldon, J. E. and Pastan, I. (2011). A guide to taming a toxin – recombinant immunotoxins constructed from *Pseudomonas* exotoxin A for the treatment of cancer. *FEBS Journal*, 278(23):4683–4700.
- Weldon, J. E., Xiang, L., Chertov, O., Margulies, I., Kreitman, R. J., FitzGerald, D. J., and Pastan, I. (2009). A protease-resistant immunotoxin against CD22 with greatly increased activity against CLL and diminished animal toxicity. *Blood*, 113(16):3792–3800.

- Wunderlich, M. and Glockshuber, R. (1993). Redox properties of protein disulfide isomerase (dsba) from escherichia coli. *Protein Science*, 2(5):717–726.
- Wuo, M. G., Mahon, A. B., and Arora, P. S. (2015). An Effective Strategy for Stabilizing Minimal Coiled Coil Mimetics. *J. Am. Chem. Soc.*, 137(36):11618–11621.
- Yang, F., Moss, L. G., and Phillips, G. N. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotech*, 14(10):1246–1251.
- Yin, Beatrice W. T. and Finstad, C., Kitamura, K., Federici, M., Welshinger, M., Kudryashov, V., Hoskins, W., Welt, S., and Lloyd, K. (1996). Serological and immunochemical analysis of Lewis Y (Ley) blood group antigen expression in epithelial ovarian cancer. *International journal of cancer*, 65(4):406–412.
- Younes, A., Yasothan, U., and Kirkpatrick, P. (2012). Brentuximab vedotin. *Nat Rev Drug Discov*, 11(1):19–20.
- Zwanziger, D., Khan, I. U., Neundorf, I., Sieger, S., Lehmann, L., Friebe, M., Dinkelborg, L., and Beck-Sickinger, A. G. (2008). Novel Chemically Modified Analogues of Neuropeptide Y for Tumor Targeting. *Bioconjugate Chemistry*, 19(7):1430–1438.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Todesursachen in Deutschland	1
1.2	Lokalisation der Krebserkrankungen in Deutschland	3
1.3	Struktur von <i>Pseudomonas</i> Exotoxin A	6
1.4	Wirkmechanismus von <i>Pseudomonas</i> Exotoxin	7
1.5	Entwicklung von <i>Pseudomonas</i> Exotoxin A als Toxinkomponente in Immuntoxinen	8
1.6	Der Antikörper B3 als <i>Targeting</i> -Komponente in Immuntoxinen	10
1.7	Struktur von pNPY	11
1.8	Aufbau der klassischen polyionischen Fusionspeptide	12
1.9	Aufbau der spaltbaren polyionischen Fusionspeptide	14
2.1	Klonierungsstrategie	36
2.2	Beispieldarstellung eines DotPlots	60
3.1	Schematische Darstellung der spaltbaren polyionischen Fusionspeptide	64
3.2	Herstellung und Reinigung von MBP-CxR ₆	66
3.3	UV/Vis-Spektren von sfBFP-CxE _n	67
3.4	Bestimmung des spezifischen Absorptionskoeffizienten von sfBFP	68
3.5	Fluoreszenzmissionsspektrum von sfBFP	68
3.6	Verhalten der sfBFP-Varianten an Anionenaustauschermatrix	69
3.7	UV-Spektren der MBP-Varianten	70
3.8	Verhalten der MBP-Varianten an Kationenaustauschermatrix	70
3.9	Affinitäten der ionischen Wechselwirkungen zwischen spaltbaren polyionischen Fusionspeptiden	72
3.10	Kooperativitätsmodell zur Bestimmung der Stärke polyionischer Wechselwirkungen zwischen Fusionspeptiden	72
3.11	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte von NaCl auf die ionischen Wechselwirkungen polyionischer Fusionspeptide	74
3.12	Bestimmung des Redoxpotentials der Disulfidbrücke zwischen spaltbaren polyionischen Fusionspeptiden	75
3.13	Schematische Darstellung von B3-PE38 _{CX}	78

3.14	Reinigung von B3-CxR ₈	79
3.15	Reinigung von E ₈ xC-PE38	79
3.16	Reinigung von B3-PE38 _{CX}	80
3.17	SDS-PAGE-Analytik der Thrombinspaltung von B3-PE38 _{CX}	81
3.18	SDS-PAGE-Analytik einer unvollständigen Thrombinspaltung von B3-PE38 _C	81
3.19	Wachstumskinetik von MCF7-Zellen unter B3-PE38 _C	82
3.20	Zeitabhängige Applikation von B3-PE38 _C auf MCF7-Zellen	83
3.21	Mehrfachapplikation von B3-PE38 _C auf MCF7-Zellen	84
3.22	Bestimmung der EC ₅₀ -Werte von B3-PE38 _C auf MCF7-Zellen	85
3.23	Schematische Darstellung von [F ⁷ , P ³⁴]NPY-PE38 und [F ⁷ , P ³⁴]NPY-PE38 _{CX}	87
3.24	Sekundärstruktur von CK ₈ -[F ⁷ , P ³⁴]NPY	88
3.25	hY ₁ R-vermittelte Internalisierung von CK ₈ -[F ⁷ , P ³⁴]NPY in HEK293-Zellen	89
3.26	Herstellung von [F ⁷ , P ³⁴]NPY-PE38	90
3.27	Reinigung von [F ⁷ , P ³⁴]NPY-PE38	90
3.28	Bestimmung der biologischen Aktivität von [F ⁷ , P ³⁴]NPY-PE38	92
3.29	Herstellung von [F ⁷ , P ³⁴]NPY-PE38 _{CX}	94
3.30	Reinigung von [F ⁷ , P ³⁴]NPY-PE38 _{CX}	94
3.31	Thrombinspaltung von [F ⁷ , P ³⁴]NPY-PE38 _{CX}	95
3.32	Bestimmung der biologischen Aktivität von [F ⁷ , P ³⁴]NPY-PE38 _C	95
4.1	Helixrad-Darstellung zweier assoziierter <i>Coiled-coil</i> -Heptaden	100

A. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
AB/AM	Antibiotika-Antimykotikalösung
ADCC	antikörperabhängige Zytotoxizität
Aib	α -Aminoisobuttersäure
[Ala ³¹ , Aib ³²]NPY	spezifischer hY ₅ R-Agonist, Derivat des Neuropeptid Y
APS	Ammoniumperoxodisulfat
B3	s. dsFvB3
B3(V _H)	schwere Kette des dsFvB3
B3(V _L)	leichte Kette des dsFvB3
BFM	Biofeuchtmasse
BIBP3226	nicht peptidischer hY ₁ R-Antagonist; N2-(Diphenylacetyl)-N-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-D-argininamid
BSA	Bovines Serumalbumin
CDC	komplementabhängige Zytotoxizität
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsFvB3, auch B3	disulfidverbrücktes Fv-Fragment des Anti-Lewis ^Y -Antikörpers B3
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure), Ellmans Reagenz
DTT und DTT _{red}	Dithiothreitol, reduzierte Form
DTT _{ox}	Dithiothreitol, oxidierte Form
EC ₅₀	Konzentration einer Substanz mit der die Hälfte ihrer maximalen Wirkung erzielt wird
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
[F ⁷ , P ³⁴]NPY	spezifischer hY ₁ R-Agonist, Derivat des Neuropeptid Y
FBS	Fetales Rinderserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
GSH	Glutathion, reduzierte Form
GSSG	Glutathion, oxidierte Form
hY ₁ R, hY ₅ R	humaner Neuropeptid Y-Rezeptor Subtyp 1 bzw. Subtyp 5
IB's	<i>Inclusion Bodies</i>

Fortsetzung des Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
IMAC	immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
Le ^Y	Lewis ^Y , B3-Antigen
LMB-7	genetisch fusioniertes Immuntoxin aus ssFvB3 und PE38
LMB-9	genetisch fusioniertes Immuntoxin aus dsFvB3 und PE38
MBP	Maltose Bindeprotein
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NAD	Nicotinaminadenindinukleotid
NaDOC	Natriumdeoxycholat
NPY	Neuropeptid Y
[F ⁷ , P ³⁴]NPY	spezifischer hY ₁ R-Agonist, Derivat des Neuropeptid Y
OD ₆₀₀	Optische Dichte, gemessen bei $\lambda = 600 \text{ nm}$
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, <i>phosphor buffered saline</i>
PE	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin A
PE38	verkürzte Variante von <i>Pseudomonas</i> Exotoxin A für den Einsatz als Toxineinheit in Immuntoxinen; verkürzt um Domäne Ia und Teile von Ib
pDNA	Plasmid-DNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sfBFP	<i>superfolder blue fluorescent protein</i> , blau fluoreszierende Proteinvariante
sfGFP	<i>superfolder green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierende Proteinvariante
SUMO	Löslichkeitsvermittelndes Fusionsprotein (<i>small ubiquitin-like modifier</i>)
SV	Säulenvolumen
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol

B. Übersicht über Proteine und Konstrukte mit polyionischen Fusionspeptiden

Bezeichnung	Erklärung
Proteine und Kopplungsprodukte mit klassischen Fusionspeptiden	
CK ₈ -[F ⁷ , P ³⁴]NPY	[F ⁷ , P ³⁴]NPY mit klassischem Lysinpeptid am K ⁴
E ₈ C-PE38	PE38 mit klassischem Glutamatpeptid, N-terminal
[F ⁷ , P ³⁴]NPY-PE38	Fusionskonstrukt aus CK ₈ -[F ⁷ , P ³⁴]NPY und E ₈ C-PE38
B3-PE38	Fusionskonstrukt aus dsFvB3 und E ₈ C-PE38, wurde für diese Arbeit nicht hergestellt, jedoch oft zitiert
Proteine und Kopplungsprodukte mit spaltbaren Fusionspeptiden	
K ₈ xC-[F ⁷ , P ³⁴]NPY	[F ⁷ , P ³⁴]NPY mit spaltbarem Lysinpeptid am K ⁴
B3-CxR ₈	dsFvB3 mit spaltbarem Argininpeptid am C-Terminus der schweren Kette
B3(V _H)-CxR ₈	schwere Kette des B3-CxR ₈ mit spaltbarem Argininpeptid am C-Terminus
B3(V _H)-C	schwere Kette des B3-CxR ₈ mit gespaltenem Fusionspeptid
E ₈ xC-PE38	PE38 mit spaltbarem Glutamatpeptid, N-terminal
C-PE38	E ₈ xC-PE38 mit gespaltenem Fusionspeptid
MBP-CxR _n	MBP mit spaltbarem Argininpeptid, C-terminal. Es gibt Varianten mit n = 6, 8, 10
MBP-C	MBP-CxR _n mit gespaltenem Fusionspeptid
sfBFP-CxE _n	sfBFP mit spaltbarem Glutamatpeptid, C-terminal. Es gibt Varianten mit n = 6, 8, 10
sfBFP-C	sfBFP-CxE _n mit gespaltenem Fusionspeptid
[F ⁷ , P ³⁴]NPY-PE38 _{CX}	Fusionskonstrukt aus K ₈ xC-[F ⁷ , P ³⁴]NPY und E ₈ xC-PE38 mit vollständigen Fusionspeptiden
[F ⁷ , P ³⁴]NPY-PE38 _C	Fusionskonstrukt aus K ₈ xC-[F ⁷ , P ³⁴]NPY und E ₈ xC-PE38 mit gespaltenen Fusionspeptiden

Fortsetzung der Übersicht über Proteine und Konstrukte mit polyionischen Fusionspeptiden

Bezeichnung	Erklärung
B3-PE38 _{CX}	Fusionskonstrukt aus B3-CxR ₈ und E ₈ xC-PE38 mit vollständigen Fusionspeptiden
B3-PE38 _C	Fusionskonstrukt aus B3-CxR ₈ und E ₈ xC-PE38 mit gespaltenen Fusionspeptiden
MBP-sfBFP _{CX}	Fusionskonstrukt aus MBP-CxR _n und sfBFP-CxE _n mit vollständigen Fusionspeptiden

C. Gensequenzen der in dieser Arbeit hergestellten Proteine

MBP-CxR₆

ATGAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCT
ATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAAAGATAACCGGAATTAAG
TCACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATTCACACAGGTTGCGGCAA
CTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACG
CTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGC
TGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTACC
CGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAAGATCTGCTGCCGAACC
CGCCAAAACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTGGATAAAGAAGCTGAAAGCGAAA
GGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAACCGTACTTCACCTGGCCGCTG
ATTGCTGCTGACGGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGTACGACATT
AAAGACGTGGGCGTGGATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCCTGGT
TGACCTGATTA AAAACAAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGA
AGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGGGCATG
GTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAACGGTACTGCCGACCTT
CAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCGTGCTGAGCGCAGGTATTAACGC
CGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAAAGAGTTCCTCGAAAACCTATCTGCTGAC
TGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCCGTAGCGC
TGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGTGAAAGATCCGCGTATTGCCGCCACTATGG
AAAACGCCCAGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCCGCTTTCT
GGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCCAGCGGTTCGTCAGACTGTCG
ATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTTGCGGCGGTTCTGGCGGATCCCTGGTG
CCGCGCGGCAGCCGACGTCGACGACGCCGGGGCCCG

MBP-CxR₈

ATGAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCT
ATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAAAGATAACCGGAATTAAG
TCACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATTCACACAGGTTGCGGCAA
CTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACG

CTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGC
TGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTACC
CGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAAGATCTGCTGCCGAACC
CGCCAAAACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTGGATAAAGAAGTAAAGCGAAA
GGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAACCGTACTTCACCTGGCCGCTG
ATTGCTGCTGACGGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGTACGACATT
AAAGACGTGGGCGTGGATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCCTGGT
TGACCTGATTAATAAACAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGA
AGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGGGCATG
GTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAAACGGTACTGCCGACCTT
CAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCGTGCTGAGCGCAGGTATTAACGC
CGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAAGAGTTCCTCGAAAACCTATCTGCTGAC
TGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCCGTAGCGC
TGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGTGAAGATCCGCGTATTGCCGCCACTATGG
AAAACGCCCAGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCCGCTTTCT
GGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCCAGCGGTGCTCAGACTGTGCG
ATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTTGCGGCGGTTCTGGCGGATCCCTGGTG
CCGCGCGGCAGCCGACGTCGACGACGCCGGCGACGTGGCCCG

MBP-CxR₁₀

ATGAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCT
ATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAAAGATAACCGGAATTAAG
TCACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATTCACACAGGTTGCCGCAA
CTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACG
CTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGC
TGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTACC
CGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAAGATCTGCTGCCGAACC
CGCCAAAACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTGGATAAAGAAGTAAAGCGAAA
GGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAACCGTACTTCACCTGGCCGCTG
ATTGCTGCTGACGGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGTACGACATT
AAAGACGTGGGCGTGGATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCCTGGT
TGACCTGATTAATAAACAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGA
AGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGGGCATG
GTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAAACGGTACTGCCGACCTT
CAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCGTGCTGAGCGCAGGTATTAACGC
CGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAAGAGTTCCTCGAAAACCTATCTGCTGAC

TGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGGTGCCGTAGCGC
TGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGTGAAAGATCCGCGTATTGCCGCCACTATGG
AAAACGCCCAGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCCGCTTTCT
GGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCCAGCGGTTCGTCAGACTGTCCG
ATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTTGCGGGCGGTTCTGGCGGATCCCTGGTG
CCGCGCGGCAGCCGACGTCGACGACGCCGGCGACGTCGCCGTGGCCCC

sfBFP-CxE₆

ATGAGTAAAGGCCGAAGAGCTGTTCACTGGCGTTGTTCCGATTCTGGTCTGAAC
TGGATGGTGATGTTAACGGCCACAAATTCAGCGTCCGTGGGGAAGGCGAGGGT
GATGCTACAAATGGCAAACCTGACCCTGAAATTCATCTGTACCACCGGGAAACTG
CCTGTTCCCTTGGCCTACACTGGTTACCACTCTGACCTATGGCGTGCAATGTTTT
AGCCGCTATCCTGATCACATGAAACAGCACGATTTCTTCAAAGCGCTATGCCT
GAAGGTTATGTCCAAGAGCGTACCATCAGCTTTAAAGACGATGGCACCTATAAA
ACCCGTGCCGAGGTGAAATTCGAAGGTGATACCCTGGTCAACCGTATTGAACTG
AAAGGGATCGATTTCAAAGAGGACGGCAACATTCTGGGCCATAAACTGGAGTA
TAACTTCAACAGCCATAACGTGTACATTACCGCCGACAAACAGAAAAACGGGAT
CAAAGCGAACTTCAAATCCGCCACAACGTGGAAGATGGTTCCGTTCAGCTGGC
AGATCATTATCAGCAGAACACCCCGATTGGAGATGGTCCTGTACTGCTGCCGGA
CAATCACTATCTGAGCACCCAGTCAGTGCTGAGTAAAGACCCGAACGAAAAACG
TGACCACATGGTGCTGCTGGAGTTTGTACAGCGGCCGGTATTACACATGGCAT
GGACGAGCTGTATAAATGCGGCGGTTCTGGCG_{gate}CCTGGTGCCGCGCGGCAGC
GAAGAAGAAGAAGAACA

MBP-CxR₈

ATGAGTAAAGGCCGAAGAGCTGTTCACTGGCGTTGTTCCGATTCTGGTCTGAAC
TGGATGGTGATGTTAACGGCCACAAATTCAGCGTCCGTGGGGAAGGCGAGGGT
GATGCTACAAATGGCAAACCTGACCCTGAAATTCATCTGTACCACCGGGAAACTG
CCTGTTCCCTTGGCCTACACTGGTTACCACTCTGACCTATGGCGTGCAATGTTTT
AGCCGCTATCCTGATCACATGAAACAGCACGATTTCTTCAAAGCGCTATGCCT
GAAGGTTATGTCCAAGAGCGTACCATCAGCTTTAAAGACGATGGCACCTATAAA
ACCCGTGCCGAGGTGAAATTCGAAGGTGATACCCTGGTCAACCGTATTGAACTG
AAAGGGATCGATTTCAAAGAGGACGGCAACATTCTGGGCCATAAACTGGAGTA
TAACTTCAACAGCCATAACGTGTACATTACCGCCGACAAACAGAAAAACGGGAT
CAAAGCGAACTTCAAATCCGCCACAACGTGGAAGATGGTTCCGTTCAGCTGGC

AGATCATTATCAGCAGAACACCCCGATTGGAGATGGTCCTGTACTGCTGCCGGA
CAATCACTATCTGAGCACCCAGTCAGTGCTGAGTAAAGACCCGAACGAAAAACG
TGACCACATGGTGCTGCTGGAGTTTGTACAGCGGCCGGTATTACACATGGCAT
GGACGAGCTGTATAAATGCGGCGGTTCTGGCGGATCCCTGGTGCCGCGCGGCA
GCGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAGCCA

sfBFP-CxE₁₀

ATGAGTAAAGGCGAAGAGCTGTTCACTGGCGTTGTTCCGATTCTGGTCTGAAC
TGGATGGTGATGTTAACGGCCACAAATTCAGCGTCCGTGGGGAAGGCGAGGGT
GATGCTACAAATGGCAAACCTGACCCTGAAATTCATCTGTACCACCGGGAACTG
CCTGTTCCCTTGGCCTACACTGGTTACCACTCTGACCTATGGCGTGCAATGTTTT
AGCCGCTATCCTGATCACATGAAACAGCACGATTTCTTCAAAGCGCTATGCCT
GAAGGTTATGTCCAAGAGCGTACCATCAGCTTTAAAGACGATGGCACCTATAAA
ACCCGTGCCGAGGTGAAATTCGAAGGTGATACCCTGGTCAACCGTATTGAACTG
AAAGGGATCGATTTCAAAGAGGACGGCAACATTCCTGGGCCATAAACTGGAGTA
TAACTTCAACAGCCATAACGTGTACATTACCGCCGACAAACAGAAAAACGGGAT
CAAAGCGAACTTCAAATCCGCCACAACGTGGAAGATGGTTCCGTTCAGCTGGC
AGATCATTATCAGCAGAACACCCCGATTGGAGATGGTCCTGTACTGCTGCCGGA
CAATCACTATCTGAGCACCCAGTCAGTGCTGAGTAAAGACCCGAACGAAAAACG
TGACCACATGGTGCTGCTGGAGTTTGTACAGCGGCCGGTATTACACATGGCAT
GGACGAGCTGTATAAATGCGGCGGTTCTGGCGGATCCCTGGTGCCGCGCGGCA
GCGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAGGAACCA

E₈C-PE38 nach Frost (2009)

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACGGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCG
GCAGCGCTAGCATGTTCGGACTCAGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCCAGAGGTCA
AGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCACATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCTT
CAGAGATCTTCTTCAAGATCAAAAAGACCACTCCTTTAAGAAGGCTGATGGAAG
CGTTCGCTAAAAGACAGGGTAAGGAAATGGACTCCTTAAGATTCTTGTACGACG
GTATTAGAATTCAAGCTGATCAGACCCCTGAAGATTTGGACATGGAGGATAACG
ATATTATTGAGGCTCACAGAGAACAGATTGGTGGTTCCCCAGAATTCGAAGAGG
AGGAAGAGGAGGAGGAATGCGCTTCCGGAGGTCCCGAGGGCGGCAGCCTGGCC
GCGCTGACCGCGCACCAAGGCTTGCCACCTGCCGCTGGAGACTTTCACCCGTCAT
CGCCAGCCGCGCGGCTGGGAACAACCTGGAGCAGTGCGGCTATCCGGTGCAGCG
GCTGGTCGCCCTCTACCTGGCGGCGCGGCTGTCGTGGAACCAGGTGCACCAGGT

GATCCGCAACGCCCTGGCCAGCCCCGGCAGCGGCGGCGACCTGGGGCGAAGCGA
TCCGCGAGCAGCCGGAGCAGGCCCGTCTGGCCCTGACCCTGGCCGCCGCCGAGA
GCGAGCGCTTCGTCCGGCAGGGCACCGGCAACGACGAGGCCGGCGCGGCCAAC
GGCCCCGGCGACAGCGGGCAGCCCTGCTGGAGCGCAACTATCCCCTGGCGCG
GAGTTCCTCGGGCAGGGCGGCGACGTCAGCTTCAGCACCCGCGGCACGCAGAAC
TGGACGGTGGAGCGGCTGCTCCAGGCGCACCCGCCAACTGGAGGAGCGCGGCTA
TGTGTTTCGTGGCTACCACGGCACCTTCCTCGAAGCGGGCGAAAGCATCGTCTT
CGGCGGGGTGCGCGCGCGCAGCCAGGACCTCGACGCGATCTGGCGCGGTTTCT
ATATCGCCGGCGATCCGGCGCTGGCCTACGGCTACGCCCAGGACCAGGAACCCG
ACGCACGCGGCCGGATCCGCAACGGTGCCCTGCTGCGGGTCTATGTGCCGCGCT
CGAGCCTGCCGGGCTTCTACCGCACCCAGCCTGACCCTGGCCGCGCCGGAGGCGG
CGGGCGAGGTCGAACGGCTGATCGGCCATCCGCTGCCGCTGCGCCTGGACGCCA
TCACCGGCCCCGAGGAGGAAGGCGGGCGCCTGGAGACCATTCTCGGCTGGCCG
CTGGCCGAGCGCACCGTGGTGATTCCCTCGGGCAGTCCCACCGACCCGCGCAAC
GTCGGCGGCGACCTCGACCCGTCCAGCATCCCCGACAAGGAACAGGCGATCAGC
GCCCTGCCGGACTACGCCAGCCAGCCCGGCAAACCGCCGCGCGAGGACCTGAAG

His₆-SUMO-E₈xC-PE38

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACGGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCG
GCAGCGCTAGCATGTTCGGACTCAGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCCAGAGGTCA
AGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCACATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCTT
CAGAGATCTTCTTCAAGATCAAAAAGACCACTCCTTTAAGAAGGCTGATGGAAG
CGTTCGCTAAAAGACAGGGTAAGGAAATGGACTCCTTAAGATTCTTGTACGACG
GTATTAGAATTCAAGCTGATCAGACCCCTGAAGATTTGGACATGGAGGATAACG
ATATTATTGAGGCTCACAGAGAACAGATTGGTGGTTCCCCAGAATTCGAAGAGG
AGGAAGAGGAGGAGGAACTGGTGCCGCGCGGCAGCGGCGGTACCGGCGGTCT
TGCGCTTCCGGAGGTCCCGAGGGCGGCAGCCTGGCCGCGCTGACCGCGCACCCAG
GCTTGCCACCTGCCGCTGGAGACTTTCACCCGTCATCGCCAGCCGCGCGGCTGG
GAACAACCTGGAGCAGTGCGGCTATCCGGTGCAGCGGCTGGTCGCCCTCTACCTG
GCGGCGCGGCTGTCGTGGAACCAGGTCGACCAGGTGATCCGCAACGCCCTGGC
CAGCCCCGGCAGCGGGCGGCGACCTGGGCGAAGCGATCCGCGAGCAGCCGGAGC
AGGCCCGTCTGGCCCTGACCCTGGCCGCCGCCGAGAGCGAGCGCTTCGTCCGGC
AGGGCACCCGGCAACGACGAGGCCGGCGCGGCCAACGGCCCGGCGGACAGCGGC
GACGCCCTGCTGGAGCGCAACTATCCCCTGGCGCGGAGTTCCTCGGCGACGGC
GGCGACGTCAGCTTCAGCACCCGCGGCACGCAGAACTGGACGGTGGAGCGGCT

GCTCCAGGCGCACCGCCAACCTGGAGGAGCGCGGCTATGTGTTTCGTTCGGCTACCA
CGGCACCTTCCTCGAAGCGGCGCAAAGCATCGTCTTCGGCGGGGTGCGCGCGCG
CAGCCAGGACCTCGACGCGATCTGGCGCGGTTTCTATATCGCCGGCGATCCGGC
GCTGGCCTACGGCTACGCCAGGACCAGGAACCCGACGCACGCGGCCGGATCCG
CAACGGTGCCCTGCTGCGGGTCTATGTGCCGCGCTCGAGCCTGCCGGGCTTCTA
CCGCACCAGCCTGACCCTGGCCGCGCCGGAGGCGGGCGAGGTCGAACGGC
TGATCGGCCATCCGCTGCCGCTGCGCCTGGACGCCATCACCGGCCCGAGGAGG
AAGGCGGGCGCCTGGAGACCATTCTCGGCTGGCCGCTGGCCGAGCGCACCGTG
GTGATTCCCTCGGCGATCCCCACCGACCCGCGCAACGTCGGCGGGCGACCTCGAC
CCGTCCAGCATCCCCGACAAGGAACAGGCGATCAGCGCCCTGCCGGACTACGCC
AGCCAGCCCGCAAACCGCCGCGCGAGGACCTGAAG

B3-CxR₈

B3(V_H)-CxR₈: ATGGATGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCA
GCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATTCACTTTCAGTGA
CTATTACATGTATTGGGTTTCGCCAGACTCCAGAGAAGTGTCTCGAGTGGGTCCG
ATACATTAGTAATGATGATAGTTCCGCCGCTTATTCAGACACTGTAAAGGGCCG
GTTACACCATCTCCAGAGACAATGCCAGGAACACCCTCTACCTGCAAATGAGCCG
TCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATATATTA TACTGCGCAAGAGGACTGGCCTGGGG
AGCCTGGTTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCCGCAGGCTC
TTGCGGCGGTTCTGGCGGATCCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCGTCGTCCCGTCCG
CCGCCGTCGCCCA

B3(V_L), Aminosäuresequenz lt. Bergelt (2010): MDVLMTQSPLSLPVSLGDQASISC
RSSQIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR
VEAEDLGVYYCFQGSHVPFTFGCGTKLEIK

D. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen denjenigen meinen Dank zum Ausdruck bringen, ohne die diese Arbeit nicht vorliegen würde.

- Herrn PD Dr. Hauke Lilie, für die Vergabe des Themas, die fachliche Betreuung und Unterstützung sowie seine lehrreiche Diskussionsbereitschaft.
- Frau Prof. Dr. Annette Beck-Sickinger und Frau Prof. Dr. Andrea Robitzki und ihren Arbeitsgruppen für die Kooperation auch über die gemeinsame Zeit im SFB 610 hinaus; besonders auch Dr. Sven Hofmann für den kontinuierlichen, unkomplizierten Informationsaustausch und sein Durchhaltevermögen bei der Synthese des $K_8xC-[F^7, P^{34}]NPY$.
- Der gesamten AG Lilie, besonders unserer technischen Assistentin Renate Nitsch und meinem Bench- und Schreibtischnachbarn Martin Voigtmann, sowie allen Kollegen aus der Biotechnologie für die gute Zusammenarbeit, das freundliche, zuvorkommende Betriebsklima und die gegenseitige Unterstützung.
- Meiner Familie und meinen Freunden für sehr facettenreiche Unterstützung wie gemeinsame Ausgleichsaktivitäten, Gespräche, Technikunterstützung, Babysitten, viel Geduld. Ihr wart und seid eine unersetzliche Energiequelle.
- Meinem Marcus und unserem Sohn Anton.

Lebenslauf

von Franziska Gehle

Universitäre Ausbildung und beruflicher Werdegang

02/2011–12/2014	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG von PD Dr. Hauke Lilie, Institut für Biochemie und Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2008–12/2010	Masterstudium „Pharmaceutical Biotechnology“ an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Abschluss als Master of Science
01/2007–09/2008	Anstellung als Apothekerin in öffentlichen Apotheken
12/2006	Erteilung der Approbation als Apothekerin
11/2005–10/2006	Pharmaziepraktikum
10/2001–10/2005	Pharmaziestudium an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

