



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

Design zytotoxischer RNase A-Tandemenzyme als potentielle Antitumortheraeutika

Dissertation

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

vorgelegt der

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

von

Franziska Leich

geboren am 12.10.1979 in Karl-Marx-Stadt

Gutachter:

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

Halle/Saale, August 2008

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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

Symbole und Abkürzungen

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

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

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

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

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Der Einsatz extrazellulärer Ribonukleasen (RNasen) als zytotoxische Wirkstoffe ist ein erfolgversprechender therapeutischer Ansatz für die Behandlung von Tumorerkrankungen. Aufgrund ihrer Ribonukleinsäure- (RNA) spaltenden Aktivität sind RNasen prinzipiell für alle Zellen toxisch, jedoch besitzen verschiedene RNasen eine selektive Wirkung auf Tumorzellen. Ihr Einsatz als Tumortheraeutika scheint daher aussichtsreich, zumal RNasen aus Säugetieren deutlich verringerte systemische Toxizitäten aufweisen als viele der bisher verwendeten bakteriellen bzw. pflanzlichen Toxine, was eine bessere Verträglichkeit erwarten lässt.

Onconase (ONC), eine RNase aus den Oozyten des Nördlichen Leopardfroschs *Rana pipiens*, befindet sich derzeit in Phase IIIb der klinischen Testungen (Alfacell Inc., Somerset, NJ, USA). Der entscheidende Nachteil der ONC-Behandlung liegt jedoch in einer dosisabhängigen Nephrotoxizität, wohingegen RNasen aus Säugetieren im Gegensatz zur ONC nicht in den Nieren angereichert werden.

Ein Problem bei der Verwendung von RNasen als Tumortheraeutika stellt die Anwesenheit des zytosolischen RNase-Inhibitors (RI) dar, der extrazelluläre RNasen der RNase A-Superfamilie mit hoher Affinität bindet und inaktiviert. Die geringe zytotoxische Potenz von RNase A aus Rinderpankreas wird daher vor allem dem Umstand zugeschrieben, dass RNase A mit hoher Affinität vom RI gebunden und dadurch inaktiviert wird. Für die Entwicklung wirksamer Enzympräparate gilt es also, Konstrukte zu kreieren, die ihre katalytische Aktivität - die Spaltung von RNA - unter physiologischen Bedingungen beibehalten. Das bedeutet, dass sie eine ausreichend hohe Stabilität besitzen und effektiv in die Zielzellen internalisiert werden müssen, dass sie katalytisch aktiv und gegen intrazelluläre Proteasen resistent sein sollten, sowie durch den zelleigenen RI nicht inaktiviert werden dürfen.

Die vorliegende Arbeit verfolgte einen Ansatz zum Design neuartiger, auf RNase A-basierender Antitumortheraeutika und beruht auf der Idee, gentechnisch zwei nicht zytotoxische monomere RNase A-Moleküle durch einen Peptidlinker zu fusionieren und somit sogenannte Tandemenzyme zu konstruieren, bei denen aus sterischen Gründen maximal eine RNase A-Einheit durch den RI gebunden werden kann. Die zweite RNase A-Einheit könnte somit enzymatisch aktiv bleiben und dadurch die gewünschte zytotoxische Wirkung entfalten. Durch Variation des Peptidlinkers, der die beiden Einheiten verknüpft, besteht die Möglichkeit, den Abstand der beiden RNase A-Einheiten und ihre sterische Anordnung zu modulieren und auf diese Weise die Eigenschaften des Konstrukts (Stabilität, Aktivität, Internalisierungseffizienz etc.) zu optimieren.

Aufbauend auf der in der Diplomarbeit entwickelten Strategie zur Erzeugung der *rnase A-tandemenzym*-Gene durch Genduplikation sollte durch die weitere Modifizierung der Linkersequenz deren Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften der Konstrukte analysiert werden. Kernstücke der vorliegenden Arbeit waren neben dieser umfassenden biophysikalischen Untersuchung sowohl die Evaluierung des zytotoxischen Potentials als auch die umfangreiche Charakterisierung der RI-Bindung an die RNase A-

Tandemenzyme. Die Komplexbildung mit RI sollte dabei mittels Nativ-PAGE, Ultrazentrifugation und limitierter Proteolyse eingehend analysiert und unter Verwendung der 3D-Struktur der RNase A-Tandemenzyme (erhalten durch Röntgenstrukturanalyse nach Kristallisation) zusätzlich modelliert werden. Neben der Evaluierung der oben genannten Kriterien sollten ferner die Effizienz der Internalisierung in die Zelle und nachfolgend die subzelluläre Lokalisation der RNase A-Tandemenzyme untersucht werden. Aus diesen Ergebnissen sollten allgemeine Aussagen zur Verwendbarkeit von Proteinen als Therapeutika abgeleitet und spezielle Aussagen über die Anforderungen an RNase A-basierende Antitumortheraeutika getroffen werden können.

2 Theoretischer Teil

2.1 Therapiekonzepte zur Krebsbekämpfung

2.1.1 Klassische Therapieansätze

Die Zahl der Krebsneuerkrankungen liegt weltweit bei über 10 Millionen pro Jahr. 250 von 100000 Menschen sterben an einer Krebserkrankung (Arnold und Ulbrich-Hofmann, 2006). In der Bundesrepublik Deutschland war in der Vergangenheit kein landesweites, einheitliches System zur Erfassung von Krebserkrankungen vorhanden. Lediglich die Sterbestatistik wird seit Mitte des vorigen Jahrhunderts flächendeckend dokumentiert. Unter den Todesursachen nahmen im Jahr 2003 bösartige Neubildungen den 2. Platz hinter den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems ein (Abb. 1). Es kann damit gerechnet werden, dass jeder dritte Deutsche im Laufe seines Lebens von einer Krebserkrankung betroffen ist. Dies verdeutlicht die hohe Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Tumorerkrankungen. Daher stellt die Bekämpfung von Krebs eine der wichtigsten Herausforderungen der modernen Medizin dar.

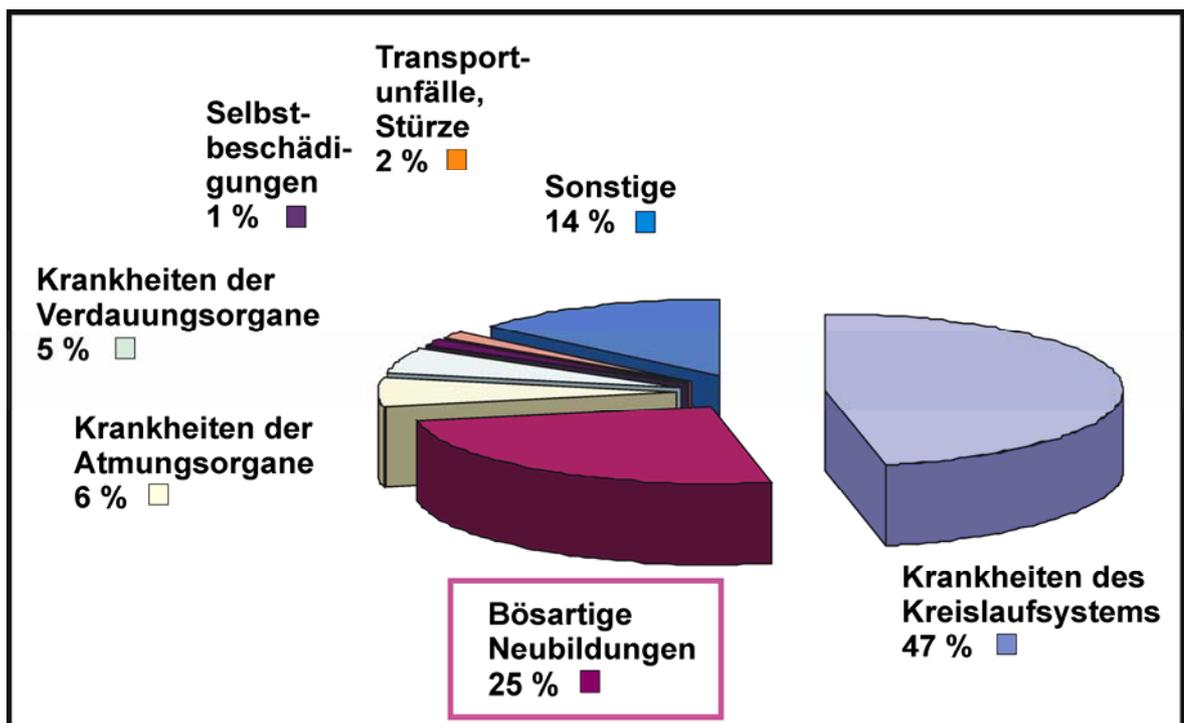


Abb. 1: Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2003

Nach Daten aus dem Bundesministerium für Gesundheit 2005.

Die Möglichkeiten der Krebsbehandlung und damit die Heilungschancen haben sich in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert. Ein Grund dafür ist die rechtzeitige Erkennung von Krebs, da dieser in frühen Stadien der Krankheit oftmals mit einer Chance von über 90% heilbar ist. Derzeit werden im Wesentlichen drei Therapieformen für die Behandlung eingesetzt: Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie (Johannes und Decaudin, 2005). Bei der Operation werden einzelne, örtlich begrenzte

Tumore chirurgisch entfernt. Dies ist aber meist nur möglich, solange sich der Krebs noch nicht auf das gesamte Organ ausgebreitet hat.

Bei der Strahlentherapie wird energiereiche Strahlung gezielt auf das Tumorgewebe gerichtet, um eine maximale Zerstörung des Tumors bei möglichst geringer Schädigung des normalen Gewebes zu erreichen. Als Strahlenquelle verwendet man natürliche radioaktive Isotope. Durch die Strahleneinwirkung hervorgerufene Ionisationsvorgänge lösen in der bestrahlten lebenden Materie eine Vielzahl von strahlenchemischen Vorgängen aus, wie z.B. Chromosomenbrüche. Die Strahlung zerstört damit unter anderem die DNA der Krebszellen, wodurch diese dann nicht mehr lebensfähig sind und absterben. Die Dosis an Strahlen, die zum Erreichen der Rezidivfreiheit verabreicht werden muss, ist jedoch größer als die Strahlendosis, die vermieden werden sollte, um gesundes Gewebe nicht zu schädigen.

Unter Chemotherapie versteht man die Applikation von Substanzen wie Cisplatin, Mitomycin, Doxorubicin oder 5-Fluorouracil, die durch Eingriff in den Stoffwechsel (Behinderung biochemischer Stoffwechselfvorgänge durch die Ähnlichkeit mit physiologischen Intermediärprodukten) und in Zellteilungsvorgänge (Interkalation in Nukleinsäuren, Quervernetzung von Nukleinsäuren, Kernspindelgifte) entweder zytostatisch oder zytotoxisch-zytolytisch wirken (Joensuu, 2008). Ob es letztlich nur zu einer Proliferationshemmung oder doch zu einer letalen Wirkung kommt, ist häufig von der Konzentration der verabreichten Substanzen abhängig, generell sind jedoch bereits für zytostatische Effekte hohe intrazelluläre Dosen erforderlich. Prinzipiell können diese Substanzen ihre Wirkung bei allen Zellen entfalten, jedoch zeigen Tumorzellen aufgrund ihres veränderten Stoffwechsels und der erhöhten Proliferation eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika. Gesunde Zellen, die sich zumeist in der G₀-Phase befinden, werden weniger stark beeinträchtigt, da Chemotherapeutika häufig zyklusphasenspezifisch sind (Joensuu, 2008). Die Nebenwirkungen einer Chemotherapie sind oft Durchfall, Übelkeit, Haarausfall und Einschränkungen der Herz-, Lungen- und Nierenfunktion (*British Cancer Agency*; <http://www.bccancer.bc.ca/default.htm>).

Ein weiterer Nachteil dieser Behandlungsform ist die Entwicklung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika. Dieses Phänomen ist als *multiple drug resistance* (MDR) bekannt und wird bei vielen Tumoren mit der Überexpression bestimmter Proteine in den Membranen der Tumorzellen in Verbindung gebracht, die in der Lage sind, chemotherapeutische Moleküle wieder aus der Zelle herauszupumpen (Sonneveld, 2000; Shtil, 2002; Swerts et al., 2006). Als Beispiele hierfür sind das *multiple drug resistance gp170 permeability glycoprotein* (Pgp, MDR1; Juliano und Ling, 1976), das *multi drug resistance protein 1* (MRP1), das *multi drug resistance related protein* (MDRP; Cole et al., 1992) oder das *lung resistance protein* (LRP; Scheffer et al., 1995; Izquierdo et al., 1996) zu nennen.

2.1.2 Ausgewählte neuere Therapiekonzepte

Aufgrund der beschriebenen Nebenwirkungen gibt es eine Reihe neuer Therapiekonzepte, die in Zukunft eine größere Bedeutung bei der Behandlung von Krebs haben werden. Durch die unzureichende Spezifität der Standardtherapien werden neben den erkrankten Zellen oftmals auch gesunde Zellen geschädigt. Deshalb versucht man inzwischen vermehrt, Zytostatika so zu verändern oder zu applizieren, dass sie selektiv nur im Tumorgewebe zur Wirkung kommen.

In neuen Therapieansätzen wird beispielsweise versucht, inaktive Vorläufermoleküle (*prodrugs*) zu verwenden, die gezielt im Gewebe durch exogene Faktoren wie Licht oder Chemikalien oder durch endogene Enzyme aktiviert werden können. Ein Beispiel für die enzymatische Aktivierung stellt das mit Spacersequenzen modifizierte, 200-fach weniger aktive Doxorubicin-glucuronid dar (Bosslet et al., 1998). In Krebszellen überexprimierte β -Glucuronidase spaltet diese Sequenzen ab und aktiviert das Zytostatikum direkt im Tumorgewebe (Bosslet et al., 1998; Leenders et al., 1999).

Dennoch werden aber häufig nicht alle Tumorzellen eliminiert. Diese sogenannten residuellen Tumorzellen führen dann zur Bildung von Metastasen oder Rezidiven und stellen den Hauptgrund für einen Krankheitsrückfall dar. Dies verdeutlicht, dass bei der Entwicklung von neuen Therapiestrategien der Fokus auf die spezifische Eliminierung jeder malignen Zelle gerichtet sein sollte.

Die dafür erforderliche gezielte Anreicherung der Wirkstoffe, ein Prozess der als *drug targeting* bezeichnet wird, erfolgt hauptsächlich durch Vektorisierung des Toxins mit natürlichen Liganden, Antikörpern oder Antikörperfragmenten, die spezifisch Krebszellen erkennen (Johannes und Decaudin, 2005). Zusätzlich ist in den letzten Jahrzehnten das Interesse an einer Therapie mit monoklonalen Antikörpern, die bereits längere Zeit als Diagnostika etabliert sind, zunehmend gewachsen.

2.1.2.1 Therapeutische Antikörper

Die Idee, Antikörper in der Krebstherapie einzusetzen, ist schon sehr alt. Paul Ehrlich erkannte bereits 1897 die Bedeutung der Immunabwehr im Rahmen der Behandlung bösartiger Krankheiten („Seitenkettentheorie“ von 1897 in „*The collected Papers of Paul Ehrlich*“; Ehrlich, 1956). Die molekulare Charakterisierung von Immunglobulinen (Edelman et al., 1968) und die Erfindung der Hybridomtechnik zur Herstellung monoklonaler Antikörper im Jahre 1975 (Köhler und Milstein, 1975) verbesserten die diagnostischen Möglichkeiten in der Onkologie und eröffneten zugleich neue therapeutische Perspektiven.

Monoklonale Antikörper haben den Vorteil, dass sie – anders als Chemotherapeutika und Strahlenbehandlung – auf spezifisch ausgewählte Zielzellen wie z.B. Krebszellen abzielen und dabei gesundes Gewebe intakt lassen. Die Toxizität und die Nebenwirkungen sind damit vergleichsweise gering und die Therapie somit besser tolerierbar. Die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern stellt besonders für Patienten, die nicht auf die gängigen Therapien ansprechen (MDR), einen enormen

therapeutischen Fortschritt dar. Zusätzlich erschließt sich die Möglichkeit, herkömmliche Behandlungsmethoden und Antikörpertherapie zu kombinieren, um additive oder gar synergistische Effekte zu erzielen.

Probleme beim Einsatz von monoklonalen Antikörpern ergeben sich zum einen aus der Tatsache, dass die meisten Antikörper gegen Antigene gerichtet sind, die in geringen Mengen auch auf gesunden Zellen nachweisbar sind, und zum anderen aus der Tatsache, dass viele Teilaspekte der Wirkung von Antikörpern, z.B. die antikörpervermittelte Komplementaktivierung (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC), die antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC), die Aktivierung unspezifischer Killerzellen und die Blockierung bestimmter biologischer Funktionen des Antigens, noch weitgehend ungeklärt sind. Aber auch unabhängig vom Wirkmechanismus des Antikörpers können Hypersensitivitätsreaktionen auftreten, die der Antikörper als organismusfremdes Protein auslöst (Adams und Weiner, 2005).

Der Beginn des Einsatzes monoklonaler Antikörper in der Krebstherapie war die Einführung von Rituximab (MabThera®, Roche Pharma) im Jahr 1998 für die Behandlung chemotherapieresistenter maligner follikulärer Lymphome und von Trastuzumab (Herceptin®, Roche Pharma) für die Behandlung therapieresistenter Mammakarzinome im Jahr 2000.

Die Mechanismen, durch welche Antikörper ihre therapeutische Wirkung im Organismus entfalten können, sind sehr vielfältig. Man kann dabei generell zwischen direkten und indirekten Mechanismen unterscheiden. Die direkte Wirkung eines Antikörpers beruht allein auf der Bindung an sein Antigen. So können Interaktionen zwischen Rezeptoren (wie z.B. für Wachstumsfaktoren) und ihren Liganden unterbunden werden, indem der Antikörper entweder den Liganden oder den Rezeptor selbst bindet und damit einen blockierenden Effekt ausübt. Herceptin® wirkt unter anderem durch Blockade des Rezeptors Her2 (*human epidermal growth factor receptor type 2*, auch als Her2/neu oder ErbB2 bezeichnet), wodurch die Interaktion mit dem epithelialen Wachstumsfaktor (*epithelial growth factor*, EGF) verhindert wird, was wiederum zur Hemmung wachstums- und proliferationsfördernder Signale führt (Harries und Smith, 2002). Alternativ erfolgt das unmittelbare Induzieren von antiproliferativen und proapoptischen intrazellulären Signalen durch Kreuzvernetzung von Oberflächenantigenen wie z.B. durch den zur Behandlung von Non-Hodkin-Lymphomen eingesetzten Antikörper MabThera®, der an das B-Zell-Antigen CD20 bindet (Shan et al., 1998; Ghetie et al., 2001; Johnson und Glennie, 2003).

Wichtige indirekte Mechanismen therapeutischer Antikörper sind die ADCC und CDC (Bokemeyer und Panse, 2005; Zafir-Lavie et al., 2007). Der therapeutische Effekt der ADCC beruht auf der Erkennung des Fc-Teils (konstante Region) des an die Tumorzelle gebundenen Antikörpers durch die Fc γ -Rezeptoren von Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten und natürlichen Killerzellen, welche die Tumorzelle durch die Ausschüttung zytolytischer Substanzen wie Perforin und Granzym oder durch Phagozytose zerstören, wohingegen die CDC die Komplementkaskade und die komplementabhängige Lyse der Zellen auslöst. Nach der Bindung an die Tumorzelle

werden die Kohlenhydratketten der CH₂-Domänen der Antikörper aufgrund einer Konformationsänderung für das Komplementsystem zugänglich. Dabei werden mehrere Antikörper über den C1-Komplex des Komplementsystems miteinander verbunden. Über den klassischen Weg der Komplementaktivierung wird die Schädigung der Zellmembran eingeleitet, die zur Lyse der Zelle führt (Bokemeyer und Panse, 2005). So wird z.B. der therapeutische Effekt von MabThera® zum Teil auch der CDC zugeschrieben (van Meerten et al., 2006).

2.1.2.2 Antikörperkonjugate

Die Wirkmechanismen unkonjugierter therapeutischer Antikörper sind oft von weiteren Effektorcomponenten abhängig, z.B. von natürlichen Killerzellen und Makrophagen. Eine Möglichkeit, solche Abhängigkeiten zu umgehen, ist es, die Wirkung zytotoxischer Substanzen mit der Spezifität von Antikörpern zu kombinieren und somit zugleich die systemische Toxizität dieser Substanzen zu reduzieren. Durch die Kopplung an Antikörper ist es möglich, die Wirkstoffe direkt an oder in die Tumorzelle zu befördern und diese unabhängig von weiteren Effektormechanismen abzutöten. Der entscheidende Punkt ist dabei der Wirkort der zytotoxischen Komponente. Liegt dieser im Inneren der Krebszelle ist es unbedingt erforderlich, dass das Antigen nach Bindung des Antikörpers internalisiert wird.

Für die Anwendung von Radionuklid-gekoppelten Antikörpern ist dies jedoch nicht erforderlich. Die verwendeten Radionuklide sind meistens β -Strahler wie z.B. ¹³¹Iod, ⁹⁰Yttrium, ¹⁸⁶Rhenium oder ¹⁸⁸Rhenium. Der Vorteil von Radionukliden ist ihre Fähigkeit, auch benachbarte Tumorzellen zu töten (*bystander effect*). Dadurch werden auch Krebszellen attackiert, die ihr Antigen bereits verloren haben. Ibritumomab tiuxetan (Zevalin®, Bayer Schering Pharma) und Tositumomab (Bexxar®, Corixa Corporation, Seattle, WA, U.S.A), an ⁹⁰Yttrium bzw. ¹³¹Iod gekoppelte murine CD20-Antikörper, wurden bereits für die Therapie von Non-Hodkin-Lymphomen von der *US Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen. Hauptproblem der Radioimmuntherapie ist, dass durch das Zirkulieren der Radionuklide im Kreislauf das Knochenmark permanent radioaktiver Strahlung ausgesetzt ist, was zu schwerer Knochenmarksdepression führen kann (Sharkey und Goldenberg, 2006).

Eine weitere Anwendungsform von Immunkonjugaten sind antikörpergekoppelte Chemotherapeutika. Hierfür wurden zunächst klassische Zytostatika verwendet. Um eine Tumorzelle abzutöten, müssen jedoch sehr viele der herkömmlichen Zytostatikamoleküle in die Zelle gelangen. Dies kann aber oft wegen zu geringer Zielantigendichte auf der Tumorzelle und der begrenzten Zahl pro Antikörper koppelbarer Moleküle nicht in ausreichendem Maße bewerkstelligt werden. Deshalb verfolgt man die Strategie, Wirkstoffe mit sehr viel höherem zytotoxischen Potential für die Herstellung von Immunkonjugaten zu verwenden (z.B. Calicheamicine; Hinman et al., 1993).

Eine andere Möglichkeit, die Effizienz von Antitumor-Antikörpern zu verbessern, ist die Strategie des *pre-targeting*. Bei der ADEPT (*antibody directed enzyme prodrug therapy*) bindet zunächst ein tumorspezifischer Antikörper, der mit einem Enzym fusioniert ist, an der Oberfläche von Krebszellen (Niculescu-Duvaz et al., 1999; Syrigos und Epenetos,

1999). Anschließend wird dem Patienten ein pro-toxisches Agens verabreicht, das sich im gesamten Körper verteilt, jedoch im Idealfall nur durch das tumorassoziierte Antikörper-Enzymkonjugat direkt an der Krebszelle aktiviert wird.

Trotz der anfänglichen Misserfolge der Immunkonjugate in klinischen Studien und der Komplikationen, die in Verbindung mit den verwendeten Wirkkomponenten und den erforderlichen chemischen Linkern auftreten, macht der klinische Nutzen von Mylotarg® (Anti-CD33-Antikörper•Calicheamicin-Konjugat zur Behandlung von akuter myeloider Leukämie; Wyeth, Philadelphia, USA) deutlich, dass die Kopplung von Antikörper und Wirkstoff einen vielversprechenden, neuen Ansatz in der Krebstherapie darstellt und so im Vergleich zu den herkömmlichen Zytostatika ein besseres Toxizitätsprofil erreicht werden kann.

2.1.2.3 Immunotoxine

Zu den Immunkonjugaten zählen auch die Immunotoxine. Es handelt sich dabei um komplexe Makromoleküle, die aus zwei unterschiedlichen funktionellen Einheiten zusammengesetzt sind: einer Zellbindungsdomäne (Antikörper oder Antikörperfragment) und einer Toxindomäne (Barth et al., 1997). Im Gegensatz zu den herkömmlichen Immunkonjugaten sind Immunotoxine zwar ebenso chimäre Antikörpermoleküle, aber statt der niedermolekularen chemischen Substanzen enthalten diese natürlich vorkommende toxische und katalytisch aktive Enzyme als Wirkkomponenten. Nach der notwendigen Internalisierung des Immunotoxins wird im Zytosol durch die zytotoxische Komponente die Proteinbiosynthese inaktiviert und die Apoptose induziert (Frankel et al., 2000). So wurden beispielsweise pflanzliche Toxine wie Ricin aus der Rizinuspflanze (*Ricinus communis*), Saporin aus dem echten Seifenkraut (*Saponaria officinalis*), Gelonin aus *Gelonium multiflorum*, oder auch die bakteriellen Toxine Diphtherietoxin aus *Corynebacterium diphtheriae* bzw. Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* als toxische Komponenten für Immunotoxine verwendet (Govindan et al., 2005; Johannes und Decaudin, 2005).

Im Vergleich zu den Immunkonjugaten besitzen die Immunotoxine den entscheidenden Vorteil, dass aufgrund der katalytischen Potenz der Toxine einige wenige Moleküle pro Zelle ausreichen, um diese abzutöten.

Obwohl sich eine Vielzahl von weiteren Immunotoxinen in klinischen Prüfungen befinden (Frankel et al., 2000), bleiben die Erfolge jedoch aufgrund der hohen Immunogenität und Toxizität im Patienten weit hinter den Erwartungen zurück (Thrush et al., 1996; Rybak und Newton, 1999). Zusätzlich stellt die eingeschränkte Tumorpenetration der Immunotoxine ein Problem dar, so dass aufgrund ihrer guten Zugänglichkeit vornehmlich hämatologische Tumore im Mittelpunkt der Indikationsgebiete von systemisch applizierten Immunotoxinen stehen. Die hauptsächlich auftretende Nebenwirkung bei der Immunotoxinbehandlung ist die Permeabelisierung von Blutgefäßen durch die Bindung der Toxinkomponente an Endothelzellen (*vascular leak syndrome*), was den Austritt von Flüssigkeiten und Serumproteinen aus dem Blut in die umliegenden Gewebe zur Folge hat (Stone et al., 1996; Messmann et al., 2000).

Ein weiteres Problem ist die Immunantwort der Patienten gegen die verwendeten Antikörper oder die Toxinkomponente, die zu einer Neutralisierung der Moleküle im Patienten führt und die Wiederholung der Behandlung untersagt (Amlot et al., 1993; Grossbard et al., 1999). Nur durch die Entwicklung neuer, milder und immunologisch tolerierter Konstrukte können die starken Nebenwirkungen der Immunotoxine verbessert werden (Makarov und Ilinskaya, 2003).

Die Lösung des immunologischen Problems ist die Verwendung von humanen Proteinen mit zytotoxischem Potential, wie z.B. RNasen. Der wesentliche Vorteil der Verwendung humaner RNasen als Toxinkomponente im Immunotoxin liegt in der nicht vorhandenen Toxizität dieser RNasen im extrazellulären Raum. Rybak und Newton (1999) stellten zunächst verschiedene Fusionsproteine her, in denen ausgewählte RNasen durch chemische Kopplung oder bereits auf Genebene mit sogenannten *cell targeting agents* (Antikörper, Antikörperfragmente bzw. Wachstumsfaktoren) verbunden wurden. Neuere Ansätze gehen in Richtung humaner Antikörper-RNase-Konjugate und die Fusionierung von RNase und Antikörper erfolgt durch Peptidlinker anstelle chemischer Kopplung. So wurde beispielsweise humane pankreatische RNase (HPR) in Fusionsmolekülen verwendet, deren Antikörperfragmente spezifisch CD71 (Zewe et al., 1997) bzw. ErbB2-positive Karzinome erkennen (De Lorenzo et al., 2004; De Lorenzo et al., 2007). Die von De Lorenzo beschriebenen Fusionsproteine waren die ersten vollständig humanen Antikörper-RNase-Konstrukte. Neben der geringen Immunogenität ist auch die geringe Größe vieler RNasen, die für die Tumorpenetration entscheidend ist, ein Vorteil. Die Antikörper-gekoppelten RNasen stellen somit eine neue Generation von Immunotoxinen mit extrem geringer Immunogenität dar, deren therapeutisches Potential in Zukunft in klinischen Studien noch getestet werden muss.

2.2 RNasen als potentielle Antitumorthapeutika

Da die biologische Funktion der RNasen hauptsächlich im Abbau zellulärer RNA besteht, können sie als Toxine mit vielversprechendem therapeutischen Antitumorpotential betrachtet werden (Makarov und Ilinskaya, 2003). Nach der Internalisierung in die Zielzelle könnten exogene RNasen oder RNasen anderer Spezies durch enzymatischen RNA-Abbau die Proteinbiosynthese inhibieren und dadurch apoptotische Prozesse induzieren.

Jedoch schützt sich die Zelle vor dem Abbau ihrer RNA durch Fremd-RNasen mit der Anwesenheit großer Mengen an RI im Zytosol, der extrazelluläre RNasen der RNase A-Superfamilie mit hoher Affinität bindet und inaktiviert (2.3.1), was bei der möglichen Anwendung von RNasen als Antitumorthapeutika ein Problem darstellen kann. Die Schutzfunktion des RI bezüglich zellulärer RNA ist jedoch begrenzt. Sollte es einer RNase gelingen, der Bindung an den RI zu entgehen (Evasion) oder durch eine hohe Internalisierungsrate gegenüber RI im Überschuss vorzuliegen, führt dies zum schnellen RNA-Abbau und damit zum Zelltod.

Die Wirkung von RI ist klassenspezifisch. Beispielsweise inhibiert der humane RI (hRI) Amphibien-RNasen wie ONC nur schlecht, jedoch ausgezeichnet RNasen anderer Säuger, während diese wiederum nicht durch RI aus Amphibien und Vögeln inhibiert werden (Roth, 1963).

2.2.1 Vorkommen und biologische Aktivität verschiedener RNasen

Lebende Zellen enthalten ungefähr 20 verschiedene Exo- und Endonukleasen, deren Funktion in der Prozessierung der RNA und im RNA-*turn over* liegt (Makarov und Ilinskaya, 2003).

Einige Vertreter der verschiedenen RNase-Familien weisen jedoch neben dem digestiven Abbau von RNA eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten (wie Blutgefäßbildung, Zyto-, Spermato- und Embryotoxizität) auf. Diese RNasen werden unter dem Akronym „RISBASEN“ (**RI**bonuclease with **S**pecial **B**iological **A**ctions) zusammengefasst. Viele RISBASEN sind gegenüber bestimmten Zelltypen selektiv zytotoxisch. Diese unerwarteten biologischen Eigenschaften verschiedener RISBASEN eröffnen neuartige Möglichkeiten zur Behandlung unterschiedlicher Krankheiten.

Die in Bakterien, Pilzen und höheren Pflanzen vorkommenden zytotoxischen RNasen tragen zum Schutz des Organismus durch den Abbau von viraler Fremd-RNA bei (*host defense*; Rybak und Newton, 1999). Die hochspezifischen RNasen aus Pilzen inaktivieren die Ribosomen durch Spaltung einer einzigen Phosphodiesterbindung der großen ribosomalen RNA (28S-rRNA) im sogenannten Sarcin-Ricin-*loop* (Wool et al., 1992; Kao und Davies, 1999; Olmo et al., 2001), inhibieren dadurch die Translation und werden daher als Ribotoxine bezeichnet (2.3.2.4). Die Ribotoxine gehören aufgrund von Strukturhomologien zur RNase T1-Familie, einer Gruppe mikrobieller, extrazellulärer RNasen, zu der etwa 25 verschiedene Enzyme mit sowohl eukaryotischem als auch prokaryotischem Ursprung gehören (Hartley, 1980; Yoshida, 2001).

Die in Bakterien vorkommenden plasmidcodierten Colicine E3, E4 und E6 sind ebenfalls spezifische RNasen, die kleine rRNA-Moleküle (16S-rRNA) in sensitiven Konkurrenzstämmen spalten können (James et al., 1996), wohingegen die Colicine E5 und D spezifisch die Anticodons verschiedener tRNAs spalten (Ogawa et al., 1999; Tomita et al., 2000).

Die in der Tabak-Art *Nicotiana glauca* gefundenen Genprodukte der S-Locus-Allele (S-Glykoproteine) konnten ebenfalls als RNasen identifiziert werden (McClure et al., 1989). Dieser S-Genlocus ist verantwortlich für die Kontrolle der gametophytischen Selbstinkompatibilität, einer im Pollenschlauch erfolgenden Strategie von Samenpflanzen, nach einer Bestäubung die Befruchtung durch eigenen Pollen (Autogamie) oder genetisch ähnlichen Pollen zu verhindern. Aus den verschiedenen S-Locus-Allelen entstehen Proteine mit meist kleinen, aber wichtigen Unterschieden, die zur (Selbst-)Erkennung notwendig sind.

Auch Amphibien besitzen sekretorische, zytotoxische RNasen für Abwehrreaktionen und zur physiologischen Zellablation. Untersuchungen der Zusammenhänge zwischen Entwicklung und Wachstumsregulation führten zur Entdeckung dieser zytotoxischen

Enzyme in den amphibischen Oozyten. Diese RNasen wurden aufgrund von Sequenz- und Strukturhomologien der pankreatischen RNase A-Familie (Klasse 9) zugeordnet (Ardelt et al., 1991; Irie et al., 1998).

RNase A (2.5) aus dem Rinderpankreas ist der prominenteste Vertreter dieser RNase-Superfamilie und gehört der Klasse der sekretorischen oder Säuger-RNasen (Klasse 1, Pankreas-Typ) an (Beintema, 1998). Zum pankreatischen Typ zählen zudem z.B. die HPR und die *bovine seminal* (BS) RNase. Homologe Vertreter der RNase A-Superfamilie wurden bisher ausschließlich bei Vertebraten gefunden. Andere Vertreter der Superfamilie sind die nicht-sekretorischen RNasen (z.B. *eosinophil derived neurotoxin*, EDN, oder *eosinophil cationic protein*, ECP), die Angiogenine und die Amphibien-RNasen (z.B. aus *Rana catesbeiana*, *Rana japonica* oder ONC aus *Rana pipiens*).

Einige dieser Proteine erfüllen nicht nur digestive Aufgaben. So stimuliert z.B. das Plasmaenzym Angiogenin das Wachstum neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Blutgefäßen (Riordan, 1997; Vallee und Riordan, 1997). Die in den eosinophilen Granulozyten vorkommenden basischen Proteine ECP und EDN sind die einzigen Vertreter der RNase-Familie mit antiparasitärer Wirkung gegenüber Eingeweidewürmern (McLaren et al., 1981). Neben dieser helminthotoxischen Aktivität besitzen diese beiden RNasen eine selektiv zytotoxische Wirkung auf bestimmte Zellen des zentralen Nervensystems (Gleich et al., 1986; Gullberg et al., 1986). BS-RNase (2.3.2.1), das einzige dimere Homologe der RNase A, wirkt auf Tumorzellen selektiv zytotoxisch. Neben dieser Antitumoraktivität zeigt BS-RNase zusätzlich immunosuppressive, embryotoxische und aspermatogene Eigenschaften (D'Alessio et al., 1997). Eine selektive Zytotoxizität konnte ebenfalls für die Amphibien-RNasen nachgewiesen werden. Die Lektine aus *Rana catesbeiana* und *Rana japonica* verursachen ausschließlich die Agglutination von transformierten Zellen und auch ONC aus *Rana pipiens* (2.3.2.3) ist ein effektives Antitumormedikament (Kamiya et al., 1990; Ardelt et al., 1991; Okabe et al., 1991).

2.2.2 Untersuchungen zur Antitumoraktivität von RNasen

Im Jahr 1946 wurde RNase A erstmals in künstlich befruchtete Froscheier (aus *Rana temporaria*) injiziert, wodurch die weitere Zellteilung verhindert und die Degeneration dieser Zellen ausgelöst wurde (Thomas et al., 1946). Diese durch die Injektion von RNase A hervorgerufenen Effekte wurden nachfolgend unter Verwendung von Froscheiern aus *Rana fusca* (Ledoux et al., 1954) oder von Hühnerfibro- und -myoblasten bestätigt (Firket et al., 1955). Die bahnbrechenden Experimente von Ledoux und seinen Mitarbeitern an Tumorzellen *in vitro* (Ledoux und Baltus, 1954; Ledoux, 1956) und die Versuche zur Unterdrückung des Tumorwachstums *in vivo* (Injektion von RNase A in Mäusetumore; Ledoux, 1955a; 1955b; Ledoux und Revell, 1955) waren schließlich Auslöser vielfältiger Untersuchungen zu Möglichkeiten einer klinischen Anwendung von RNasen. Die toxische Wirkung von RNase A gegenüber Tumorzellen war jedoch an hohe Enzymkonzentrationen gebunden.

1973, fast 20 Jahre nach der Pionierarbeit von Ledoux, wurde im Plasma von Bullenspermien ein Homologes der RNase A entdeckt, das bereits in geringeren Konzentrationen und ohne direkte Injektion zytotoxisch wirkt (BS-RNase; Matoušek,

1973). RNasen können somit eine natürliche Antitumoraktivität besitzen, ohne dass eine direkte Injektion erforderlich ist. Die erhöhte Spezifität und Selektivität gegenüber Tumorzellen wird vor allem dem Umstand zugeschrieben, dass diese meist einen höheren Gehalt an negativ geladenen Phospholipiden in ihren Membranen aufweisen (James et al., 1956; Kojima, 1993; Slivinsky et al., 1997) und dadurch die Interaktion mit kationischen RNasen (hoher Gehalt an basischen Aminosäureresten) verstärkt und die Internalisierung erleichtert wird.

Ebenfalls im Jahr 1973 konnte dem Extrakt aus Embryonen des Nördlichen Leopardfroschs *Rana pipiens* Antitumoraktivität nachgewiesen werden (Shogen und Yoan, 1973), wobei jedoch das verantwortliche Enzym (ONC) erst 18 Jahre später identifiziert und der RNase A-Superfamilie zugeordnet werden konnte (Ardelt et al., 1991). ONC (2.3.2.3) besitzt eine hohe zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen (Darzynkiewicz et al., 1988; Mikulski et al., 1990a; Mikulski et al., 1992) und ist das einzige derartige Enzym, das sich derzeit im klinischen Test befindet (Phase IIIb, Alfacell, Somerset, New Jersey, USA). Ein Synergie-Effekt kann durch Kombination mit klassischen Chemotherapeutika erreicht werden (Mikulski et al., 1990b; Mikulski et al., 1992) und dies sogar bei *multi drug resistance* der MDR1-Form. Der entscheidende Nachteil der ONC-Behandlung, die dosisabhängige und reversible Nephrotoxizität (Vasandani et al., 1999), könnte durch wiederholte Applikation geringerer Dosen vermutlich umgangen werden. Dafür spricht, dass die Antitumorwirksamkeit von ONC auf A549-Tumore (humane karzinogene alveoläre Epithelzelltumore) durch die wiederholte Applikation kleinerer ONC-Mengen im Vergleich zur einmaligen Verabreichung einer hohen Dosis *in vivo* weiter gesteigert werden konnte (Lee und Shogen, 2008). Interessanterweise werden Säuger-RNasen im Gegensatz zu ONC nicht in den Nieren angereichert (Vasandani et al., 1999).

Wie im Kapitel 2.2.1 aufgeführt, enthalten auch andere Amphibien in ihren Oozyten zytotoxische RNasen. So interagieren die Proteine aus *Rana catesbeiana*- bzw. *Rana japonica*-Eiern über Sialinsäurereste mit bestimmten Glykoproteinen (Sialoglykoproteinrezeptoren) auf der Oberfläche von Tumorzellen und zeigen dadurch Antitumoraktivität (Nitta et al., 1987; Nitta et al., 1994a; Nitta et al., 1994b). Die untersuchten Zellkulturen entwickelten jedoch nach längerer Inkubationszeit mit diesen RNasen Resistenzen, wohingegen bei ONC-Verabreichung trotz jahrelanger Therapie keinerlei Resistenzentwicklung nachgewiesen werden konnte.

2.2.3 Mechanistische Grundlagen der Zytotoxizität von RNasen

Während die RNasen aus *Rana catesbeiana* (RC-RNase) und *Rana japonica* (RJ-RNase) den Zelltod bereits durch die Bindung an die Zelloberfläche durch die Induktion der Zellagglutination verursachen (Youle und D'Alessio, 1997), müssen die bekannten anderen sekretorischen RNasen für eine zytotoxische Wirkung in das Zytosol der jeweiligen Zellen gelangen. Es ist noch nicht vollständig geklärt, wie diese extrazellulären Enzyme das Zytosol erreichen. Abb. 2 zeigt eine Vorstellung über den Ablauf dieses Vorgangs. Der erste Schritt des Transports in die Zellen ist eine Interaktion zwischen dem Enzym und der Plasmamembran der Zielzelle. Extrazelluläre RNasen der RNase A-Superfamilie sind Moleküle mit hoher positiver Nettoladung, die durch elektrostatische Wechselwirkungen an die negativ geladenen Zelloberflächen adsorbieren und sich dadurch extrazellulär anreichern. Dadurch wird eine effiziente rezeptor- und transporterunabhängige Internalisierung in die Zellen bewirkt (Futami et al., 2001; Ilinskaya et al., 2002).

ONC bindet jedoch vermutlich durch Rezeptoren an die Plasmamembran (2.3.2.3; Wu et al., 1993). Dies führt zu einer spezifischen Anreicherung des Enzyms in sogenannten *coated pits*, aus denen das Enzym anschließend durch clathrinvermittelte Endozytose ins Innere der Zielzelle gelangt (Rodriguez et al., 2007). Die intrazelluläre Route der ONC entspricht der des Transferrins und führt durch das Rezeptor-Recycling-Kompartiment (frühes Endosom; Rodriguez et al., 2007). Der Mechanismus der Translokation des Enzyms aus diesem Kompartiment in das Zytosol ist dabei jedoch noch unbekannt, er erfordert aber keine Absenkung des pH-Werts in den Endosomen (Haigis und Raines, 2003). Die intrazellulären Routen anderer sekretorischer RNasen wurden ebenfalls durch die Verwendung von Wirkstoffen, die den intrazellulären Transport an unterschiedlichen Stellen unterbrechen oder durch Kollokalisationsstudien mit Markerenzymen einzelner Organellen bzw. mit Substanzen mit bekanntem zellulären Aufnahmemechanismus (z.B. Transferrin) teilweise aufgeklärt (Benito et al., 2008).

Die Internalisierung von RNase A und von HPR erfolgt ebenfalls durch einen endozytotischen Aufnahmemechanismus, gefolgt von der Translokation ins Zytoplasma, die vermutlich ebenso über die Endosomen erfolgt (Haigis und Raines, 2003; Bosch et al., 2004). Diese Internalisierungsprozesse unterscheiden sich aber deutlich von dem der ONC, da ein Teil der internalisierten RNasen im Gegensatz zur ONC den abbauenden Kompartimenten (Lysosomen) zugeführt wird (Bosch et al., 2004; Leich et al., 2007).

Innerhalb der Zelle treffen die RNasen auf verschiedene Proteasen und im Zytosol zusätzlich auf den RI. Nur RNasen, die das Zytosol erreichen und sich dort der Bindung und Inaktivierung durch den RI sowie einem proteolytischen Verdau entziehen können, sind in der Lage zelluläre RNA zu spalten. Die damit verbundene Induktion apoptotischer Prozesse führt letztendlich zum Zelltod.

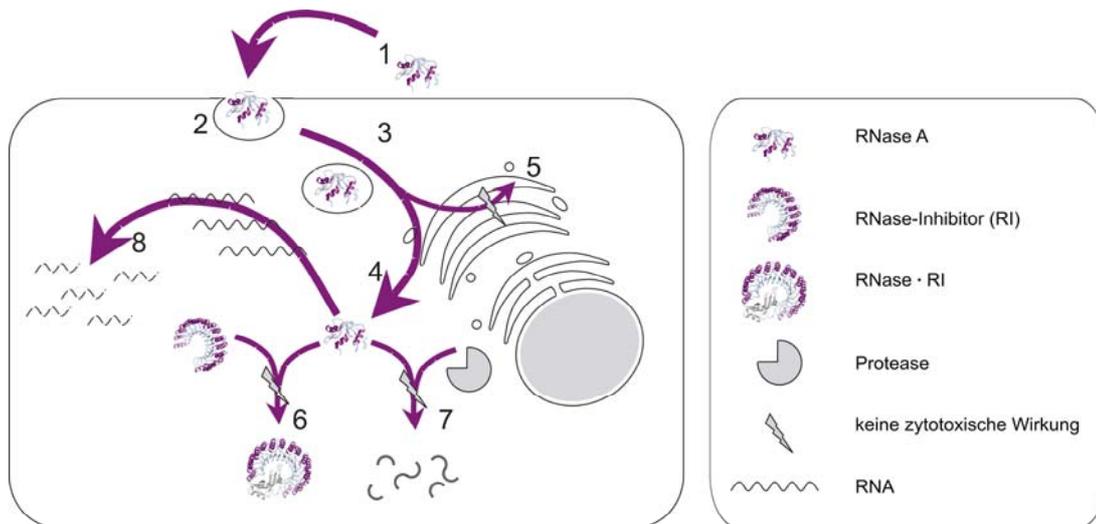


Abb. 2: Mutmaßliche intrazelluläre Route von RNase A

Die RNase A-Moleküle interagieren zunächst mit der Plasmamembran der Zielzelle (1) und gelangen durch Endozytose ins Innere der Zelle (2). Die umhüllten Vesikel fusionieren mit einem Endosom (3) mit nachfolgender Freisetzung der RNase A ins Zytosol (4) oder anschließender Einlagerung in die Zellorganellen (5). Im Zytosol treffen die RNase A-Moleküle auf den RI (6) und verschiedene Proteasen (7). Nur die RNase A-Moleküle, die sich der Inaktivierung durch den RI und dem proteolytischen Verdau entziehen können, spalten zelluläre RNA (8) und induzieren dadurch den Zelltod.

2.3 RI und seine Rolle in der RNase-vermittelten Zytotoxizität

2.3.1 Struktur und Funktion des RI

Der RI ist ein zytosolisches 50-kDa-Protein, das etwa 0,08% der gesamten im Zytosol von Säugerzellen vorkommenden Proteine ausmacht (Nadano et al., 1994; Haigis et al., 2003). Die intrazelluläre Konzentration wird somit auf ca. 4 μM geschätzt (Haigis et al., 2003). Das Inhibitor-Protein besteht aus 15 sich wiederholenden Leucin-reichen β - α -Einheiten (*leucine-rich repeats, LRRs*), die symmetrisch in Form eines Hufeisens angeordnet sind (Abb. 3; Kobe und Deisenhofer, 1993). Leucin ist dabei mit einem Anteil von 18% die am häufigsten auftretende Aminosäure des Proteins (Blackburn et al., 1977; Burton und Fucci, 1982). Die β -Stränge der *LRRs* bilden ein Faltblatt, welches das Innere des Inhibitors ausmacht und eine weitläufige Fläche für die Interaktion mit anderen Proteinen (RNasen der RNase A-Superfamilie) bildet. Die α -Helices sind dagegen an der Außenseite lokalisiert (Abb. 3). Der aus Schweinepankreas gewonnene Inhibitor (pRI) enthält 30, das humane Protein (hRI) hingegen 32 reduzierte Cysteinreste (Hofsteenge et al., 1988; Lee et al., 1988). Der RI benötigt für seine Aktivität eine reduzierende Umgebung, wie sie im Zytosol vorhanden ist. Die Oxidation von RI ist ein hochkooperativer Prozess (Fominaya und Hofsteenge, 1992). In seiner oxidierten Form verliert der Inhibitor die Fähigkeit, RNase A zu binden und wird rasch durch zelluläre Proteasen abgebaut (Blazquez et al., 1996). Somit könnte die Aktivität von RI im Zytosol über oxidative Prozesse reguliert werden.

RI bildet mit pankreatischen RNasen wie RNase A einen nichtkovalenten 1:1-Komplex (Abb. 3; Blackburn und Jaikhani, 1979). Der K_d -Wert des pRI•RNase A-Komplexes liegt bei $6,7 \times 10^{-14}$ M (Vicentini et al., 1990) und der des hRI•RNase A-Komplexes bei $4,4 \times 10^{-14}$ M (Lee et al., 1989a; Lee et al., 1989b). Der K_d -Wert für den Komplex aus hRI und Angiogenin liegt außergewöhnlich tief bei $7,1 \times 10^{-16}$ M (Lee et al., 1989a; Lee et al., 1989b), wobei auch der hRI•HPR-Komplex einen ähnlich niedrigen K_d -Wert aufweist ($K_d = 2,9 \times 10^{-16}$ M; Johnson et al., 2007). Damit gehören die Wechselwirkungen innerhalb dieser Komplexe zu den stärksten bekannten nichtkovalenten Protein-Ligand-Wechselwirkungen, vergleichbar mit den Wechselwirkungen zwischen Avidin und Biotin ($K_d = 6 \times 10^{-16}$ M; Green, 1975).

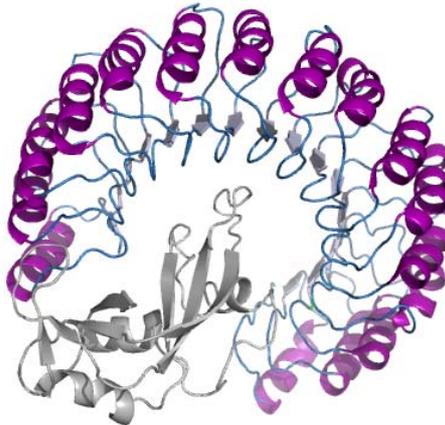


Abb. 3: Kristallstruktur des pRI•RNase A-Komplexes

Das Modell wurde der Brookhaven Proteindatenbank (PDB-Eintrag 1DFJ) entnommen und mit dem Programm Pymol (DeLano, 2002) erstellt. RNase A ist grau dargestellt.

Die Kontaktfläche zwischen RI und RNase A innerhalb des RI•RNase A-Komplexes ist mit 2900 \AA^2 um 60% größer als die eines typischen Antikörper•Antigen-Komplexes ($K_d \approx 10^{-12}$ M; Kobe und Deisenhofer, 1995; Dickson et al., 2005). Diese ausgedehnte Kontaktfläche bedingt die außergewöhnlich hohe Affinität des RI gegenüber RNasen. Von den 12 am Katalysemechanismus beteiligten Aminosäureresten der RNase A sind 7 in die intermolekularen Wechselwirkungen mit RI involviert (Kobe und Deisenhofer, 1996), so dass RNase A nach der Bindung an den RI keine RNA-Spaltung mehr katalysieren kann.

Neben RNase A, HPR und Angiogenin werden auch andere Säuger-RNasen, wie EDN oder die Monomere der BS-RNase, wirkungsvoll inhibiert (Papageorgiou et al., 1997; Iyer et al., 2005; Lee und Raines, 2005; Johnson et al., 2007). Die Tatsache, dass es sich bei allen bekannten RI-Liganden um sekretorische RNasen handelt und RI ausschließlich im Zytosol lokalisiert ist, führte zur Hypothese, dass der RI dem Schutz zellulärer RNA vor der Wirkung ins Zytosol gelangter sekretorischer RNasen dient (Hofsteenge, 1997). Erstaunlicherweise enthalten aber auch humane Erythrozyten signifikante Mengen an RI ohne jedoch RNA oder RNasen zu beinhalten (Moenner et al., 1998). Aufgrund der bereits erwähnten Oxidationssensitivität des RI wurde zudem eine Sensorfunktion für den Oxidationszustand der Zelle und eine Schutzfunktion vor oxidativen Schäden abgeleitet.

So schützt die Überexpression des *ri*-Gens in Gliazellen der Ratte diese vor wasserstoffperoxidinduziertem Stress (Cui et al., 2003). Der RI könnte somit auch ein bestimmender Faktor der Lebenserwartung sein und einen Marker des Alters darstellen.

2.3.2 Natürliche RNasen mit Antitumorwirkung

2.3.2.1 BS-RNase

Die BS-RNase ist ein 27 kDa großes, im Rindersperma vorkommendes homodimeres Protein. Die Aminosäuresequenz der Monomere stimmt zu 83% mit der RNase A-Sequenz überein (Lee und Raines, 2005). Die BS-RNase ist der einzige natürliche Vertreter der pankreatischen RNasen mit dimerer Struktur. Das Dimer entsteht durch die Ausbildung von zwei intermolekularen Disulfidbrücken zwischen dem Cys31 einer Einheit und dem Cys32 der zweiten Einheit und umgekehrt. Die dimere Struktur der BS-RNase ist essentiell für deren zytotoxische Wirkung, da das Dimer aufgrund sterischer Abschirmung nicht vom RI gebunden werden kann (Murthy et al., 1996). Der K_d -Wert ist mit einem Wert von $> 2 \mu\text{M}$ angegeben (Antignani et al., 2001), der IC_{50} -Wert (Konzentration an Toxin im Zellkulturmedium, bei der 50% der Zellen überleben) liegt bei $1,3 \mu\text{M}$ (Lee und Raines, 2005). BS-RNase existiert in zwei miteinander im Gleichgewicht stehenden Formen: einem *M*×*M*-*domain-swapped*-RNase-Dimer (Abb. 4A), bei dem die N-terminale Helix einer Untereinheit mit dem jeweiligen Restmolekül der anderen Untereinheit interagiert und einer *M*=*M*-Form (Abb. 4B), bei der diese Wechselwirkung nicht auftritt (Piccoli et al., 1992; Kim et al., 1995a). Das Verhältnis der *M*×*M* : *M*=*M*-Form liegt bei 2:1 (Piccoli et al., 1992). Zwei weitere Aminosäuren, Pro19 und Leu28, spielen neben den beiden Cysteinresten bei der Ausbildung dieser dimeren Struktur eine bedeutende Rolle. Pro19 trägt entscheidend zur korrekten Konformation der *loop*-Region bei, die die N-terminale Helix mit dem restlichen Proteinmolekül verbindet (Mazzarella et al., 1993). Leu28 ist dagegen für hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den beiden monomeren Untereinheiten verantwortlich (Mazzarella et al., 1993).

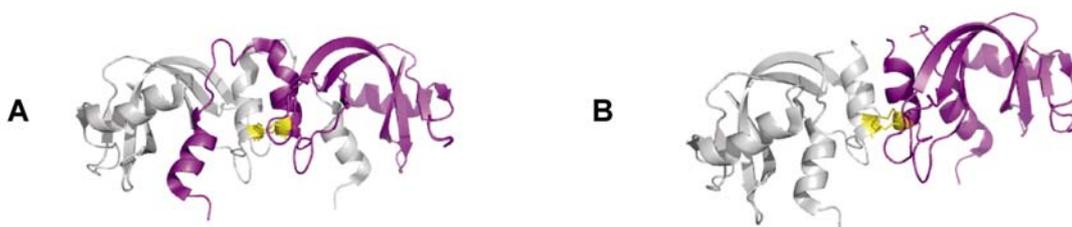


Abb. 4: Kristallstrukturen der BS-RNase

Die Modelle wurden der Brookhaven Proteindatenbank entnommen und mit dem Programm Pymol (DeLano, 2002) erstellt: **A:** *M* × *M*-*domain-swapped*-RNase-Dimer (PDB-Eintrag 1R5D), **B:** *M*=*M*-*unswapped*-RNase-Dimer (PDB-Eintrag 1R3M). Die Disulfidbrücken sind gelb hervorgehoben.

Unter physiologischen Bedingungen führt die Spaltung der Disulfidbrücken zur Entstehung von Monomeren (aus der M=M-Form) und von nichtkovalent gebundenen Dimeren (aus der M×M-Form; Cafaro et al., 1995; Kim et al., 1995a). Während die Monomere vom RI gebunden werden (Murthy und Sirdeshmukh, 1992; Kim et al., 1995a) und damit keine zytotoxische Wirkung vermitteln können, wirken die von der M×M-Form abgeleiteten RI-evasiven Dimere zytotoxisch (Vescia et al., 1980; Kim et al., 1995b; 1995c), dissoziieren jedoch aufgrund des erwähnten Gleichgewichts mit einer Halbwertszeit von 3,3 h (Antignani et al. 2001). BS-RNase schädigt jedoch nicht nur Tumorzellen, sondern zeigt zusätzlich embryotoxische, aspermatogene und immunosuppressive Aktivitäten (D'Alessio et al., 1997; Matoušek et al., 2003b). Die aspermatogene Eigenschaft beruht ausschließlich auf der Zerstörung der aus den Spermatogonien durch die Spermatogenese gebildeten Keimzellen (D'Alessio et al., 1991).

Die Internalisierung der BS-RNase beginnt mit der Bindung an die extrazelluläre Matrix der Zellen (Mastronicola et al., 1995) und die sich anschließende Endozytose führt zunächst zu einer Lokalisation in den Endosomen (Bracale et al., 2002). Durch Immunfluoreszenzstudien konnte BS-RNase auch im Trans-Golgi-Netzwerk detektiert werden. Die dimere BS-RNase destabilisiert künstlich hergestellte negativ geladene Membranen und hat damit Einfluss auf die Membranaggregation, die Fluidität und Fusionsprozesse (Mancheno et al., 1994; Notomista et al., 2006). Da das Ausmaß dieser Destabilisierung mit der zytotoxischen Potenz korreliert (Notomista et al., 2006), gilt die Permeation aus dem Trans-Golgi-Netzwerk ins Zytosol als wahrscheinlich (Bracale et al., 2002). Interessanterweise konnte BS-RNase auch ohne Kernlokalisationssequenz im Nukleolus maligner Zellen nachgewiesen werden (Bracale et al., 2002; Viola et al., 2005). Da BS-RNase auf normale und maligne Telomerase-positive Zellen toxisch wirkt und dabei sowohl die Telomeraseaktivität als auch den RNA-Gehalt der Telomeraseuntereinheit verringert, gilt die Induktion von proapoptischen Prozessen durch die Spaltung von telomeraler RNA als erwiesen (Viola et al., 2005).

2.3.2.2 RNase A-Multimere

Durch die Lyophilisierung von RNase A aus 50%iger Essigsäure entstehen verschiedene Formen nichtkovalent verbundener, instabiler RNase A-Oligomere (Crestfield et al., 1962; Fruchter und Crestfield, 1965). Dabei werden zwei verschiedene Dimer-Spezies gebildet. Die seltener auftretende Form (*minor domain-swapped*-RNase A-Dimer; Abb. 5A) entsteht durch die Interaktion der N-terminalen Helices zweier RNase A-Moleküle analog zur M×M-Form der BS-RNase (Liu et al., 1998). Die vorherrschende Form der *domain-swapped*-RNase A-Dimere entsteht jedoch durch die Interaktion der C-terminalen β -Stränge zweier RNase A-Moleküle (*major domain-swapped*-RNase A-Dimer, Abb. 5B; Liu et al., 2001). Das *domain-swapping* kann sogar gleichzeitig an beiden Termini eines RNase A-Moleküls erfolgen, was die Bildung höher geordneter, linearer oder zyklischer Oligomere gestattet (Abb. 5C), die im Gegensatz zu RNase A sowohl aspermatogene als auch zytotoxische Aktivität besitzen (Libonati, 2004). Im Gegensatz zur BS-RNase wirken die RNase A-Oligomere jedoch nicht embryotoxisch (Libonati, 2004).

Die dimere oder höher geordnete Struktur der RNase A-Oligomere ist in Analogie zur BS-RNase essentiell für die zytotoxische Wirkung. Die Dissoziation der Oligomere in monomere RNase A zieht den Verlust der Zytotoxizität nach sich (Libonati und Gotte, 2004). Während BS-RNase aufgrund einer sterischer Abschirmung nicht vom RI gebunden werden kann (Murthy et al., 1996), dadurch katalytisch aktiv bleibt und intrazellulär eine zytotoxische Wirkung vermittelt, werden die *domain-swapped*-RNase A-Dimere überraschenderweise in einem ähnlichen Ausmaß vom RI gebunden wie monomere RNase A (Naddeo et al., 2005). Die trotz der RI-Bindung auftretende zytotoxische Aktivität der RNase A-Oligomere wurde auf eine intensivere Interaktion der kationischen Oligomere mit der polyanionischen Zelloberfläche und einer damit verbundenen effizienteren Endozytose zurückgeführt (Libonati, 2004). Durch eine verbesserte Internalisierung kann die inaktivierende Wirkung des intrazellulären RI nivelliert werden, so dass nach Sättigung des RI nachfolgend aufgenommene RNase A-Oligomere RNA spalten und damit den Zelltod verursachen.

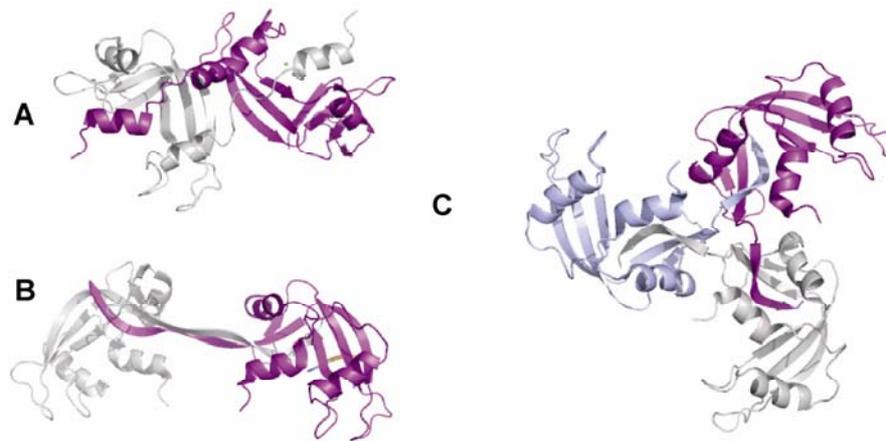


Abb. 5: Kristallstrukturen verschiedener RNase A-Multimere

Die Modelle wurden der Brookhaven Proteindatenbank entnommen und mit dem Programm Pymol (DeLano, 2002) erstellt: **A:** *minor domain-swapped*-RNase A-Dimer (PDB-Eintrag 1JS0), **B:** *major domain-swapped*-RNase A-Dimer (PDB-Eintrag 1FOV), **C:** *minor domain-swapped*-RNase A-Trimer (PDB-Eintrag 1A2W).

2.3.2.3 Onconase

Die Aminosäuresequenzen von ONC (104 AS) und RNase A (124 AS) stimmen zu 30% überein, wobei sich die Tertiärstrukturen beider Enzyme stark ähneln (Abb. 6A, B) (Ardelt et al., 1991; Mosimann et al., 1994). Wie RNase A besitzt auch ONC vier Disulfidbrücken (Abb. 6B). Die Positionen dreier dieser Bindungen stimmen mit den entsprechenden Positionen innerhalb des RNase A-Moleküls überein (Abb. 6A). Die zur RNase A nicht homologe Disulfidbrücke am C-Terminus der ONC (Abb. 6B, rot dargestellt) trägt erheblich zu deren thermodynamischer Stabilität bei (T_m ONC = 90°C, T_m RNase A = 60°C; Leland et al., 2000; Notomista et al., 2001). Die Entfernung dieser Bindung führt zu einer Erniedrigung der Übergangstemperatur um nahezu 30 K (Arnold et al., 2006) und zur Verringerung der Zytotoxizität auf das RNase A-Niveau (Leland et al., 2000; Schulenburg et al., 2007). ONC enthält im Gegensatz zu RNase A am

N-Terminus einen für die Aktivität und Zytotoxizität essentiellen Pyroglutamyl-Rest (Abb. 6B; Boix et al., 1996).

Während RNase A eine 10^4 -fach höhere katalytische Aktivität im Vergleich zur ONC zeigt (Boix et al., 1996), ist die Inhibitorkonstante K_i für ONC mit $\geq 10^{-6}$ M (Boix et al. 1996) jedoch 10^7 -mal größer als die Dissoziationskonstante K_d des hRI•RNase A-Komplexes ($4,4 \times 10^{-14}$ M)*. Die stärkere zytotoxische Wirkung der ONC (IC_{50} gegenüber K562-Zellen: $0,5 \mu\text{M}$; RNase A ohne Auswirkung) wird aufgrund ihrer geringen ribonukleolytischen Aktivität daher vor allem dem Umstand zugeschrieben, dass ONC nicht vom intrazellulären RI der Säugetiere gebunden werden kann.

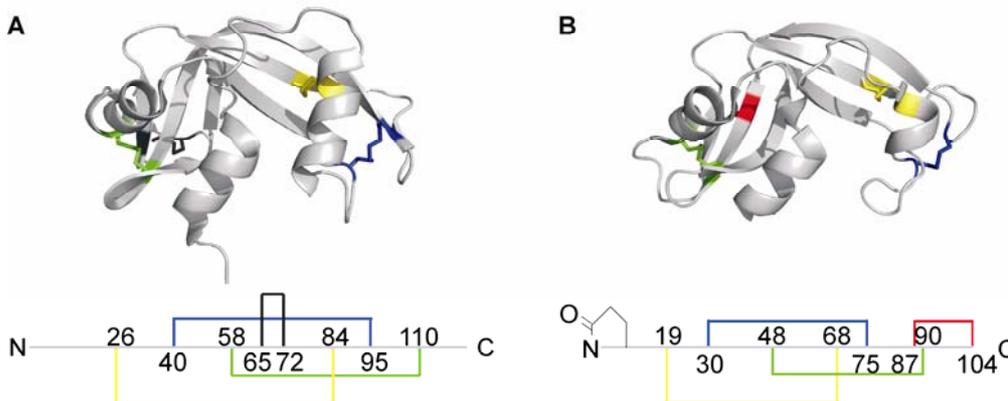


Abb. 6: Kristallstrukturen und schematische Darstellung der Disulfidbrücken von RNase A und ONC

Die Modelle wurden der Brookhaven Proteindatenbank entnommen und mit dem Programm Pymol (DeLano, 2002) erstellt: **A:** RNase A (PDB-Eintrag 7RSA), **B:** ONC (PDB-Eintrag 1ONC).

Die Positionen dreier Disulfidbrücken der ONC stimmen mit den entsprechenden Positionen innerhalb des RNase A-Moleküls überein (gelb, blau und grün gekennzeichnet).

 : Pyroglutamyl-Rest.

ONC wird unter Verbrauch von Energie in die Zellen internalisiert (Wu et al., 1993; Haigis und Raines, 2003). Nach der Akkumulation an der Zellmembran in sogenannten *coated pits* erfolgt die Endozytose (Clathrin/AP-2; Rodriguez et al., 2007). Die Existenz eines spezifischen ONC-Rezeptors wird jedoch kontrovers diskutiert. Die Analyse der Bindung von ^{125}I -ONC an 9L-Glioma-Zellen zeigte die Existenz zweier verschiedener Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität ($K_{d1} = 6,2 \times 10^{-8}$ M, $K_{d2} = 2,5 \times 10^{-7}$ M; Wu et al., 1993). Dies steht jedoch im Widerspruch zu dem an HeLa-Zellen nicht sättigbaren Internalisierungsprozess (Haigis und Raines, 2003). Die parallel zum Transferrin verlaufende Internalisierung lässt jedoch die Anwesenheit eines zellulären Membranrezeptors vermuten.

***Anmerkung:** Durch die Ausbildung eines vollständig inaktiven 1:1-Komplexes mit dem hochaffinen RI gilt für monomere RNase $K_i = K_d$; die Inhibitorkonstante K_i entspricht somit der Dissoziationskonstante K_d des RI•RNase A-Komplexes (Lee et al., 1989b).

Durch Kolokalisationsexperimente unter Verwendung von fluoreszenzmarkierter ONC und Markerproteinen der verschiedenen Zellorganellen konnte gezeigt werden, dass ONC nur mit den Markerproteinen Transferrin und Rab11 des Recycling-Endosoms kolokalisiert (Rodriguez et al., 2007). Die Anwendung von Substanzen, die den intrazellulären Transport zwischen den verschiedenen Organellen blockieren, bestätigt dieses Ergebnis, da ONC direkt und ohne eine Translokation ins Golgi-Netzwerk oder in das endoplasmatische Retikulum (ER) aus den frühen Endosomen in das Zytosol gelangt (Rodriguez et al., 2007).

Im Zytosol vermittelt ONC ihre zytotoxischen Effekte durch die Spaltung zellulärer RNA. Ursprünglich wurde die unspezifische Hemmung der Proteintranslation durch die Spaltung von 28S- bzw. 18S-rRNA vermutet (Wu et al., 1993), während später tRNA als präferiertes ONC-Substrat angenommen wurde (Saxena et al., 2002). Die verstärkte Transkription verschiedener zellzyklusregulierender Gene in ONC-behandelten Zellen spricht jedoch gegen eine unspezifische Translationsinhibierung durch den Abbau von rRNA oder tRNA (Juan et al., 1998). Vielmehr wurden zusätzlich mikroRNAs als ONC-Substrate postuliert (Ardelt et al., 2003), die eine wichtige Rolle im komplexen Netzwerk der Genregulation, insbesondere bei der Stilllegung von Genen durch RNA-Interferenz spielen. ONC-behandelte U937-Zellen weisen unter anderem sowohl eine deutlich herabgesetzte Expression der Gene des Zellzyklusproteins Cyclin D als auch eine deutlich erhöhte Genexpression von Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinase auf. Die dadurch verringerte Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinase arretiert die ONC-behandelten Zellen in der Zellzyklusphase G₁, bevor mit einer Verzögerung von 24-48 h Apoptose stattfindet (Juan et al., 1998).

Die zytostatische bzw. zytotoxische Wirkung von ONC konnte *in vitro* gegenüber 9L-Zellen (Gliomzellen der Ratte; Wu et al., 1993), K562-Zellen (humane Mesotheliomzellen; Leland et al., 2000), Colo 320 CM-Zellen (humane Dickdarmkarzinomzellen; Darzynkiewicz et al., 1988), HL-60-Zellen (humane Leukämiezellen; Halicka et al., 2000), LNCaP- und JCA-1-Zellen (humane Prostatakrebszellen; Halicka et al., 2000), HT-29-Zellen (humane kolorektale Krebszellen; Rybak et al., 1996) und U937-Zellen (humane Lymphomzellen; Juan et al., 1998) nachgewiesen werden. Die zytotoxische Wirkung von ONC konnte durch gleichzeitige Zugabe von Tamoxifen (Mikulski et al., 1990b; Mikulski et al., 1992), Cisplatin (Mikulski et al., 1992) oder Vincristin (Rybak et al., 1996) weiter gesteigert werden.

In vivo verlängert ONC das Überleben tumortransplantierter Mäuse (Mikulski et al., 1990a; Rybak et al., 1996; Lee et al., 2003) und wurde dadurch zum klinischen Test zugelassen. In den klinischen Studien der Phase I konnte sowohl die optimale Dosis als auch das Terminraster der ONC-Applikation bestimmt werden. Die maximale Toleranzdosis lag bei 960 µg m² und für die sich anschließenden Phase II-Studien wurde eine wöchentliche Dosis von 480 µg m² empfohlen (Costanzi et al., 2005; Lee und Raines, 2008).

In den verschiedenen Studien der Phase II wurde ONC als Monopräparat gegen Lungenkrebs (nicht kleinzellig; Lee und Raines, 2008), Brustkrebs (Lee und Raines,

2008), Nierenzellkrebs (Vogelzang et al., 2001) und maligne Mesotheliome (Mikulski et al., 2002) eingesetzt.

Im klinischen Test der Phase III gegen maligne Mesotheliome wurden die Patienten entweder mit ONC oder mit dem herkömmlichen Chemotherapeutikum Doxorubicin behandelt, wobei die Überlebensdauer der ONC-behandelten Patienten deutlich erhöht wurde (Medikation der Vergleichsgruppe: Doxorubicin; Costanzi et al., 2005; Pavlakis und Vogelzang, 2006). In der momentan stattfindenden Studie der Phase IIIb wird untersucht, inwiefern Synergieeffekte durch kombinierte Applikation von ONC und Doxorubicin die Überlebensrate weiter steigern können (Costanzi et al., 2005; Pavlakis und Vogelzang, 2006).

2.3.2.4 Mikrobielle RNasen

Die zytotoxische Wirkung einzelner mikrobieller RNasen auf verschiedene Säuger-Zelllinien wird hauptsächlich dem Umstand zugeschrieben, dass RNasen aus Mikroorganismen nicht vom RI der Säugetiere inaktiviert werden (Makarov und Ilinskaya, 2003).

Die hochspezifischen RNasen aus Pilzen (Ribotoxine) inaktivieren die Ribosomen durch Spaltung der 28S-rRNA im sogenannten Sarcin-Ricin-*loop* (2.2.1; Wool et al., 1992; Kao und Davies, 1999; Olmo et al., 2001), wodurch die vom Elongationsfaktor 1 abhängige Bindung der Aminoacyl-tRNA und die guanosintriphosphatabhängige Bindung vom Elongationsfaktor 2 blockiert werden. Durch diese Translationsinhibierung hemmen u.a. die Ribotoxine α -Sarcin und Restrictocin (aus *Aspergillus restrictus*) sowie Mitogillin (aus *Aspergillus fumigatus*) die Proteinsynthese und verursachen den Zelltod. Neben dieser spezifischen Aktivität interagieren die Ribotoxine durch ihren hohen Gehalt an basischen Aminosäureresten (Sacco et al., 1983) sehr fest mit negativ geladenen Phospholipidvesikeln und können auch ohne Rezeptor die Lipidmembran der Zielzellen durchqueren (Onaderra et al., 1993; Martinez-Ruiz et al., 2001). Diese starke Interaktion vermittelt den Ribotoxinen eine leicht erhöhte Spezifität gegenüber Tumorzellen (Gasset et al., 1989; Gasset et al., 1990).

Neben den Ribotoxinen weisen auch einige andere Vertreter der RNase T1-Familie wie Binase (aus *Bacillus intermedius*) oder RNase Sa3 (aus *Streptomyces aureofaciens*) zytotoxische Aktivitäten auf. Im Gegensatz dazu vermitteln die RNasen Sa (aus *Streptomyces aureofaciens*) und T1 (aus *Aspergillus oryzae*) jedoch keine zytotoxischen Effekte und das obwohl die Mitglieder der RNase T1-Familie generell nicht vom RI gebunden werden können.

Mit der Erhöhung der Nettoladung durch gentechnische Modifizierungen gelang die Umwandlung von RNase Sa (isoelektrischer Punkt (pI) = 3,5) in ein basisches Molekül mit zytotoxischen Eigenschaften (pI = 10,2; Ilinskaya et al., 2002).

Die geringe Spezifität und die damit verbundene systemische Toxizität, sowie das hohe immunogene Potential verhindern jedoch den Einsatz der mikrobiellen RNasen als Therapeutika (Thrush et al., 1996; Youle und D'Alessio, 1997).

2.3.3 Gentechnisch veränderte und chemisch modifizierte RNasen mit Antitumorwirkung

Da die zytotoxische Wirkung der RNasen in außerordentlichem Maße davon abhängt, nicht vom intrazellulären RI gebunden zu werden (2.3), wurde versucht, die für die Bindung verantwortliche Region der RNasen durch Mutation oder durch chemische Modifizierung so zu verändern, dass durch elektrostatische oder sterische Abschirmung eine Bindung nicht mehr erfolgen kann. Des Weiteren wurden RNasen an Liganden oder Antikörper gekoppelt, die ein zellspezifisches *targeting* von Tumorzellen erlauben, um eine selektive Zytotoxizität von RNasen in der Krebstherapie zu erzielen.

2.3.3.1 Varianten

Der Umstand, dass die zytotoxische ONC und die ebenfalls zytotoxisch wirkende dimere BS-RNase in Anwesenheit des RI nicht inaktiviert werden, führte zur Herstellung von zahlreichen mutierten Formen ursprünglich nicht zytotoxischer RNasen. Die Einführung der für die dimere Struktur der BS-RNase verantwortlichen Aminosäurereste (Pro19, Leu28, Cys31 und Cys32) in RNase A (A19P/Q28L/K30C/S31C-RNase A; Di Donato et al., 1994) und HPR (Q28L/R31C/R32C/N34K-HPR; Piccoli et al., 1999) an adäquaten Positionen führte zur Dimerisierung analog zur BS-RNase und neben der dadurch verursachten verminderten RI-Bindung zu einer zytotoxischen Wirkung.

Auch die starken Protein-Protein-Wechselwirkungen innerhalb des RI•RNase-Komplexes können durch den Austausch bestimmter Aminosäurereste im RNase-Molekül gestört werden. Anhand der Kristallstruktur des RI•RNase-Komplexes wurden verschiedene Mutanten der RNase A und der HPR entwickelt, die aufgrund sterischer oder elektrostatischer Behinderungen keine starken Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem RI ausbilden können. Die Aminosäurereste Asp38, Gly88 und Ala109 der RNase A bilden im RI•RNase A-Komplex feste Kontakte mit dem RI aus. Beim Austausch von Asp38 und Ala109 gegen Arginin zeigten sich jedoch keine Auswirkungen auf die RNase A-Inhibierung durch den RI, wohingegen G88R-RNase A auch in Gegenwart von RI katalytisch aktiv ist (Leland et al., 1998b). Der K_d -Wert ($K_d = 0,4$ nM; Leland et al., 1998b) liegt 10^4 -fach höher als der K_d -Wert der Wildtyp-RNase A und die zytotoxische Wirkung ($IC_{50} = 7$ μ M) ist nur geringfügig schwächer als die der ONC ($IC_{50} = 0,5$ μ M; Leland et al., 1998b). Ähnliche Effekte konnten beim Austausch von Gly88 mit Aspartat erreicht werden ($K_d = 0,052$ nM; $IC_{50} = 30$ μ M; Leland et al., 1998b). Die Einführung analoger Mutationen in HPR führte ebenfalls zu RI-evasiven Varianten mit vergleichbarer Zytotoxizität, wie beispielsweise L86E/N88R/G89D/R91D-HPR ($K_d = 0,2$ nM; $IC_{50} = 7$ μ M; Leland et al., 2001) oder K7A/N71A/E111A-HPR ($K_d = 0,5$ nM; $IC_{50} = 5,5$ μ M; Gaur et al., 2001).

Die intensivere Analyse der Interaktionen im RI•RNase A-Komplexes unter Verwendung des *fast atomic density evaluation* (FADE) - Algorithmus führte zur Herstellung einer weiteren RNase A-Variante. Der K_d -Wert für D38R/R39D/N67R/G88R-RNase A liegt mit 510 nM $1,2 \times 10^7$ -fach höher als der K_d -Wert von RNase A. Die dadurch

vermittelte zytotoxische Wirkung ist sogar stärker als die der ONC ($IC_{50} = 0,22 \mu\text{M}$; Rutkoski et al., 2005). Neben RNase A und HPR konnten auch die nicht zytotoxischen Monomere der BS-RNase so modifiziert werden (C31A/C32A/G38K/K39G/G88R), dass sie stärker zytotoxisch wirken als die dimere BS-RNase ($IC_{50} = 0,05 \mu\text{M}$; Lee und Raines, 2005).

Im Vergleich zur ONC ($K_d > 1 \mu\text{M}$; Boix et al., 1996) weisen die meisten mutierten RNase-Varianten niedrigere K_d -Werte auf. Da sie gleichzeitig auch eine geringere zytotoxische Wirkung vermitteln, galt eine geringe Affinität gegenüber RI als entscheidendes Kriterium für die zytotoxische Wirkung einer RNase (Hofsteenge, 1997; Haigis et al., 2003). Bei Varianten mit stark erniedrigter RI-Affinität (höhere K_d -Werte) wurde dementsprechend auch meist eine stark erhöhte zytotoxische Potenz (kleinere IC_{50} -Werte) detektiert.

Bosch et al. (2004) lieferten hierzu jedoch einen widersprüchlichen Befund. Die Einführung eines Arginin-Triplets in einen oberflächenexponierten *loop* führt nach der Internalisierung zur Translokation dieser HPR-Variante in den Zellkern. Der dort stattfindende Kontakt mit rRNA vor deren Verpackung in die Ribosomen verleiht dieser Variante trotz unverminderter Affinität zu RI eine zytotoxische Wirkung ($IC_{50} = 3 \mu\text{M}$; Bosch et al., 2004).

Alternativ wurde auf gentechnischem Weg durch die Erhöhung der Nettoladung versucht, die Interaktion der RNasen mit der polyanionischen Zelloberfläche zu verbessern, um die Internalisierungseffizienz zu steigern. Beispiele hierfür sind die Einführung von Polyarginin, das mit hoher Effizienz in die Zellen internalisiert wird (Mitchell et al., 2000; Fuchs und Raines, 2004), wie die C-terminale Verlängerung durch einen Polyargininschwanz (in Anlehnung an die Proteintranslokationsdomänen; Fuchs und Raines, 2005), oder das sogenannte *arginine grafting*, einer Methode, bei der saure Aminosäurereste in einem bestimmten Oberflächenbereich eines Proteins durch Arginin ersetzt werden (Fuchs et al., 2007). So kann bereits die Einführung eines Argininrests die Internalisierungseffizienz signifikant steigern, wie am Beispiel der G88R RNase A gezeigt werden konnte (Leich et al., 2007).

2.3.3.2 Chemisch modifizierte RNasen

Eine weitere Möglichkeit, die Internalisierung der RNasen zu verbessern und/oder ihre RI-Affinität zu verringern besteht in der chemischen Modifizierung dieser Moleküle. Moleküle mit hoher positiver Nettoladung adsorbieren durch elektrostatische Wechselwirkungen an die negativ geladenen Zelloberflächen und reichern sich so extrazellulär an. Dadurch können kationische Polymere mit hoher Effizienz rezeptor- und transporterunabhängig, aber energieabhängig in die Zellen eindringen (Mitchell et al., 2000; Futami et al., 2001; Ilinskaya et al., 2002). Somit ergibt sich durch chemische Molekülpositivierung eine weitere Möglichkeit, die Internalisierungseffizienz der RNasen zu verbessern (Futami et al., 2001; Futami et al., 2002).

Beispielsweise wurden RNase A und HPR chemisch mit Ethylendiamin (Futami et al., 2001) oder Polyethylenimin (Futami et al., 2005) modifiziert. Die daraus resultierende Kationisierung der Carboxylgruppen erniedrigte zwar die katalytische Aktivität der Konstrukte, verlieh ihnen aber gleichzeitig eine bemerkenswerte Zytotoxizität.

Die Kopplung von BS-RNase oder RNase A an Poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid] und die Kopplung von RNase A bzw. RNase A-Oligomeren an Polyethylenglykol führt zu Konstrukten mit deutlicher Antitumoraktivität (Poučkova et al., 2006). Dies ist sowohl auf die penetrationsfördernde Wirkung der Wirkstoffträger als auch auf die sterische Behinderung der RI-Bindung als Folge der chemischen Kopplung zurückzuführen (Matoušek et al., 2002).

Die ersten RNasen, die durch chemische Modifizierung an einen Antikörper gekoppelt wurden, um selektiv Zellen abzutöten, waren Restrictocin und α -Sarcin aus dem Schimmelpilz *Aspergillus restrictus* (Conde et al., 1989). Die hohe Immunogenität der Konstrukte verhinderte jedoch die therapeutische Anwendung. Die Kopplung an monoklonale Antikörper erfolgte unter Verwendung von *N*-Succinimidyl-3-(2-Pyridyldithio)propionat (SPDP) als Kopplungsreagens, wodurch die zellspezifische Internalisierung und damit auch die zytotoxische Wirkung deutlich gesteigert werden konnte (Conde et al., 1989). In ähnlicher Art und Weise wurde eine Vielzahl von zellspezifischen Konstrukten hergestellt, bei denen RNasen chemisch an verschiedene zelloberflächenbindende und schnell in die Zielzellen internalisierende Liganden gekoppelt wurden (Rybak und Newton, 1999). Beispielsweise wurde RNase A an Transferrin oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente gegen den Transferrinrezeptor gekoppelt, was zu einer Steigerung der zytotoxischen Potenz der Konstrukte um 10^4 führte (Rybak et al., 1991; Newton et al., 1992).

Tumorzellen weisen aufgrund ihres gesteigerten Eisenbedarfs mehr Transferrinrezeptoren auf der Zelloberfläche auf als normale Zellen (Recht et al., 1990). Die Fähigkeit des Transferrins, an luminale Membranrezeptoren zu binden, löst jedoch einen endozytotischen Aufnahmeprozess über die Blut-Hirn-Schranke aus, so dass die damit verbundene Anreicherung im Gehirn den Einsatz dieser Konstrukte als Therapeutika limitiert (Broadwell et al., 1996).

Dagegen ist die Kopplung der RNasen an Antikörper gegen CD22 (Rybak und Newton, 1999), einem B-Lymphozyten-spezifischen, membranintegralen Oberflächenglykoprotein, aufgrund der schnellen Internalisierung ein erfolversprechender Testansatz für die Behandlung von Lymphomen.

Eine weitere Möglichkeit der chemischen Modifizierung von RNasen besteht in der Einführung von Cysteinresten (G89C-HPR, G87C-EDN; Suzuki et al., 1999), durch die die Verknüpfung mit größeren Molekülen über Thioetherbindungen möglich wird. Neben der Kopplung mit Liganden, die die Internalisierung beschleunigen, kann durch die ortsspezifische Modifizierung zusätzlich die Affinität zum RI herabgesetzt werden, was eine starke zytotoxische Wirkung ($IC_{50} = 1-150$ nM) zur Folge hat.

Insgesamt erscheinen aber alle diese Konstrukte aufgrund der chemischen Modifizierungen für therapeutische Applikationen ungeeignet.

2.3.3.3 RNase-Chimären und RNase-Fusionsproteine

Mit der Herstellung von RNase-Chimären sollten Konstrukte entwickelt werden, die günstige katalytische und RI-evasive Eigenschaften verschiedener RNasen in sich vereinen. Eine Chimäre aus den 21 N-terminalen Aminosäureresten des EDN und den 89 C-terminalen Aminosäureresten der ONC wies zwar eine EDN-ähnliche Substratspezifität und Aktivität auf, war jedoch weniger zytotoxisch als ONC (Newton et al., 1997). Ähnliche Chimären aus HPR und ONC besitzen Eigenschaften wie Aktivität, Substratspezifität, Affinität zum RI und zytotoxische Effizienz, die zwischen den für HPR und ONC angegebenen Werten liegen (Boix et al., 1996).

Wesentlich bessere Effekte hinsichtlich der vermittelten Zytotoxizität wurden durch die Fusion der RNasen an schnell internalisierende Liganden, sogenannte *cell targeting*-Einheiten erreicht (Rybak und Newton, 1999). Alle Fusionsproteine, bestehend aus Angiogenin, EDN, BS-RNase, RNase A, HPR oder ONC und der entsprechenden *cell targeting*-Einheit, vermitteln deutlich stärkere zytotoxische Effekte als unfusionierte RNasen. Beispiele hierfür sind das Fusionsprotein aus ONC und einem humanisierten Anti-CD22-*diabody* ($IC_{50} = 3\text{-}20\text{ nM}$; Krauss et al., 2005) und das erste vollständig humane Fusionsprotein aus HPR und einem gegen den ErbB2-Rezeptor gerichteten Antikörperfragment (IC_{50} -Werte im unteren nM-Bereich; De Lorenzo et al., 2004).

Durch die Fusion von ONC und LL2, einem humanisierten monoklonalen Anti-CD22-Antikörper, konnte die zytotoxische Potenz von ONC gegenüber Daudi-Zellen (humane Burkitt-Lymphomzellen) *in vitro* um einen Faktor von 10000 gesteigert werden ($IC_{50} = 20\text{ pM}$; Newton et al., 2001). Das Leben tumortransplantierter Mäuse konnte unter Verwendung von LL2-ONC deutlich verlängert werden. In Anbetracht der Tatsache, dass sich sowohl LL2 als auch ONC als Tumortheraeutika im klinischen Test befinden, sollte LL2-ONC zukünftig für die Behandlung von Non-Hodkin-Lymphomen große Bedeutung erlangen.

Tada et al. (2004) lieferten einen weiteren interessanten Ansatz, in dem der Wachstumsfaktor basischer Fibroblasten direkt in die HPR inseriert wurde. Das inserierte Protein dient einerseits als *cell targeting*-Einheit, andererseits wird durch die Insertion die Komplexbildung zwischen HPR und RI verhindert. Die IC_{50} -Werte dieses Konstrukts liegen im μM -Bereich und darunter.

2.4 Zusammenfassung

Trotz des vielversprechenden therapeutischen Potentials der vorgestellten RNasen und RNase-Antikörperkonjugate wird bislang nur ONC klinisch getestet. Alle chemisch modifizierten Konstrukte erscheinen für den therapeutischen Einsatz ungeeignet und auch die klinischen Erfolge der Immunotoxin-Anwendung sind weit hinter den Erwartungen zurückgeblieben. Trotz der ersten, möglicherweise bahnbrechenden Erfolge in der Therapie mit Immunotoxinen gilt es noch immer, eine Reihe von kritischen Faktoren zu überwinden, die eine ausgedehntere Anwendung dieser Substanzen bislang einschränken (Bildung neutralisierender Antikörper, Schädigung von normal differenzierten Zellen). Aufgrund der

zunehmenden Zahl der Krebsneuerkrankungen und der Limitierungen bereits zugelassener Wirkstoffe stellt die Entwicklung neuer Therapeutika zur Bekämpfung von Krebs auch weiterhin eine wichtige Herausforderung der modernen Medizin dar. Die klinischen Erfolge der ONC-Behandlung und die Vielfalt der therapeutischen Ansätze unterstreichen das immense Potential, das in der Anwendung und Weiterentwicklung von RNasen und RNase-basierenden Toxinen zur Therapie von Tumorerkrankungen steckt.

Wirksame RNase-basierende Präparate müssen für einen möglichen therapeutischen Einsatz vor allem ihre katalytische Aktivität (Spaltung von RNA) unter physiologischen Bedingungen beibehalten. Das bedeutet, dass sie durch den zelleigenen RI nicht inaktiviert werden dürfen und unter physiologischen Bedingungen eine ausreichend hohe Stabilität besitzen müssen. Ausgehend von den hier betrachteten Befunden zur Zytotoxizität von RNasen sollen unter Verwendung des Modellproteins RNase A (2.5) evasive Tandemenzyme einen alternativen Ansatz liefern. Da die Monomere im Tandemenzym über einen Peptidlinker kovalent verbunden sind, ist die Dissoziation der RNase A-Einheiten ausgeschlossen, was einen erheblicher Vorteil gegenüber BS-RNase und den analogen, künstlich hergestellten Dimeren von RNase A und HPR darstellt. Dem Design des Peptidlinkers gilt besondere Aufmerksamkeit, da dieser die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften der Tandemenzyme entscheidend prägen sollte.

Neben der Gewinnung neuer Therapeutika sind Erkenntnisse über die Konstruktion und Gewinnung von RNase A-Tandemenzymen sowie über deren Struktur und Wechselwirkung mit dem Inhibitor zu erwarten.

2.5 RNase A

RNase A aus Rinderpankreas (EC 3.1.27.5) ist ein kleines (124 Aminosäurereste, 13,7 kDa), in der Bauchspeicheldrüse von Rindern reichlich vorhandenes und stabiles Protein ($T_m = 60^\circ\text{C}$; Raines, 1998). Daher wurde es zu einem der am besten untersuchten Modellproteine. RNase A war das erste Enzym und das dritte Protein (nach Insulin und Hämoglobin), für das die korrekte Aminosäuresequenz bestimmt wurde (Smyth et al., 1963) und das dritte Enzym bzw. fünfte Protein (nach Myoglobin, Hämoglobin, Lysozym und Carboxypeptidase A), dessen dreidimensionale Struktur mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden konnte (Kantha et al., 1967). Abb. 6A zeigt die Tertiärstruktur der RNase A. Die dominanten Sekundärstrukturelemente sind ein viersträngiges antiparalleles β -Faltblatt und drei α -Helices (Wlodawer et al., 1982). Das Molekül enthält keine Tryptophanreste, jedoch vier für die Stabilität essentielle Disulfidbrücken (Abb. 6A und Abb. 7) und vier Prolinreste, von denen im nativen Zustand zwei in *cis*- (Pro93 und Pro114) und zwei in *trans*-Konfiguration (Pro42 und Pro117) vorliegen.

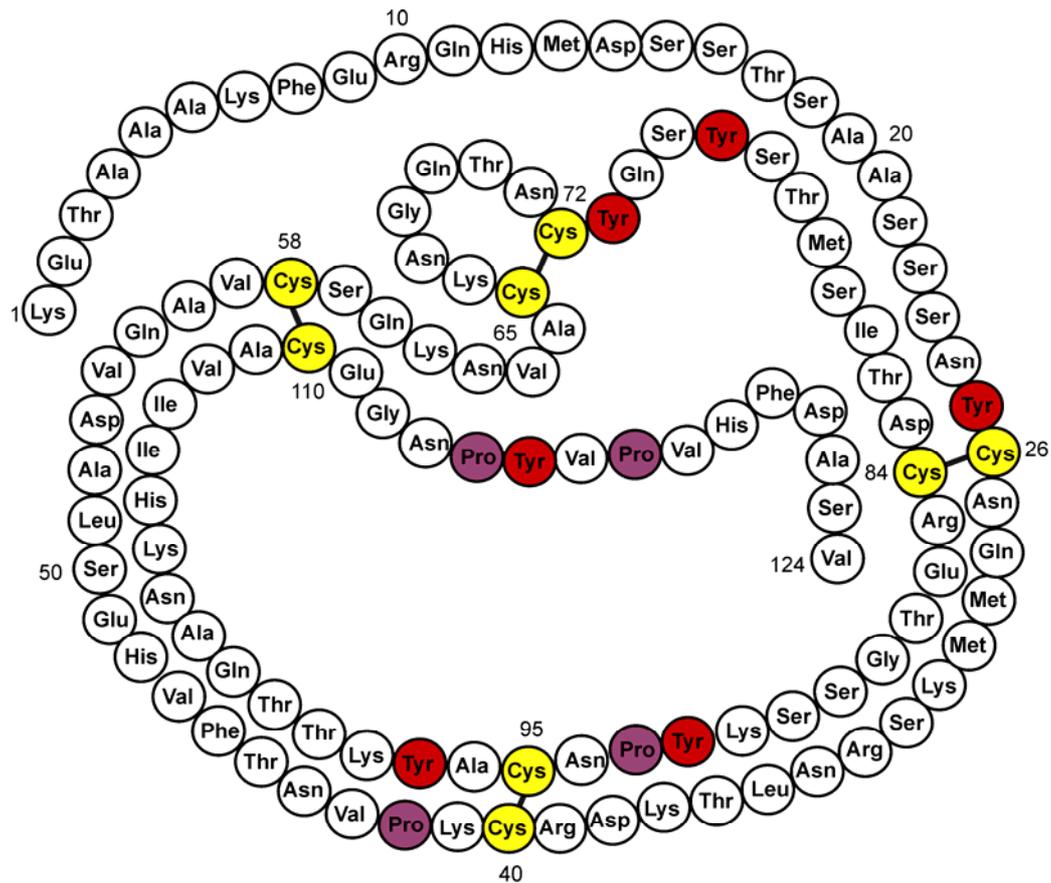


Abb. 7: Aminosäuresequenz von RNase A nach Smyth et al. (1963).

RNase A gehört zur Gruppe der Endonukleasen und bevorzugt die Spaltung einzelsträngiger RNA mit Pyrimidinbasen in P₁-Position, wobei die Affinität zu Cytidin 30-mal größer ist als zu Uridin (delCardayré und Raines, 1995). Der Katalysemechanismus von RNase A ist gut untersucht (Cuchillo et al., 1993; delCardayré und Raines, 1995; Raines, 1998). Bei der Phosphodiester-spaltung entstehen im ersten Schritt, der Transphosphorylierung, ein Oligonukleotid mit einem freien 5'-Ende und ein Oligonukleotid mit einem 2',3'-zyklischen Phosphat am 3'-Ende (Abb. 8; Cuchillo et al., 1993; Raines, 1998). Der 2',3'-zyklische Phosphodiester wird unter Spaltung der 2'-Phosphatbindung in einem separaten zweiten Schritt hydrolysiert (Cuchillo et al., 1993; Raines, 1998). Der Hydrolyseschritt erfolgt aufgrund der geringen Affinität des 2',3'-zyklischen Phosphodiesters zur RNase A deutlich langsamer, wodurch dieses Zwischenprodukt während der Spaltung von RNA angereichert wird (Cuchillo et al., 1993; Cuchillo et al., 2002). Das aktive Zentrum wird von den Aminosäuren Gln11, His12, Lys41, His119 und Asp121 gebildet (Raines, 1998), wobei His12 und His119 eine katalytische Diade bilden. Abb. 8 zeigt das Zusammenspiel dieser Aminosäuren während der Katalyse.

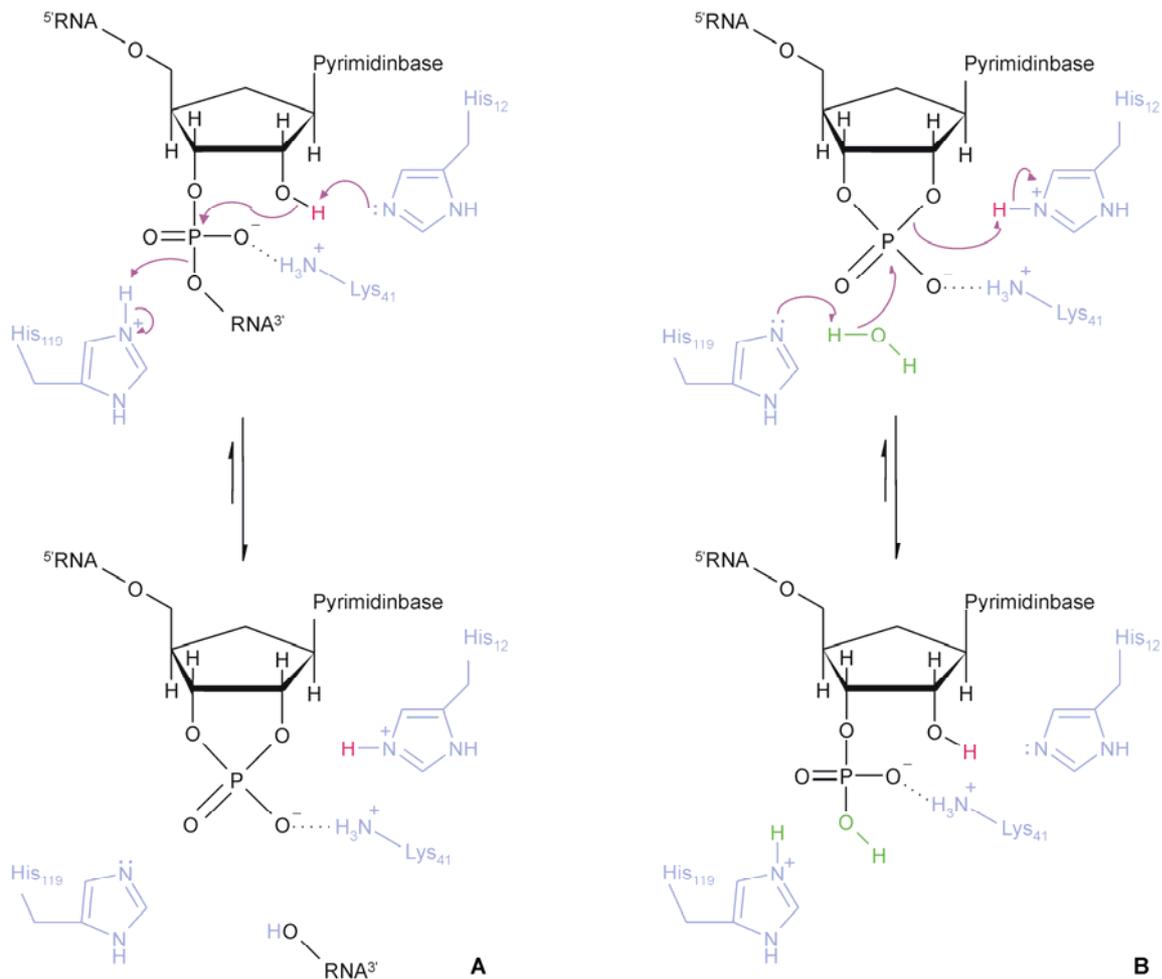


Abb. 8: Mechanismus der RNase A katalysierten Transphosphorylierung (A) und der Hydrolysereaktion (B)

His₁₂ abstrahiert als Base ein Proton von der 2'-OH-Gruppe der RNA und initiiert damit den nukleophilen Angriff auf das benachbarte Phosphoratom. His₁₁₉ fungiert simultan als Säure und unterstützt den Bruch der Bindung durch Protonierung der Abgangsgruppe (A). Das 2',3'-zyklische-Zwischenprodukt wird hydrolysiert (B). Dies ist im Wesentlichen eine Umkehrung des ersten Schritts, bei der Wasser die Abgangsgruppe ersetzt. So wirken hier His₁₂ als Säure und His₁₁₉ als Base.

Neben der hohen katalytischen Aktivität der RNase A hat die Verwendung dieses Modellproteins für die Generierung der RNase A-Tandemenzyme einen weiteren entscheidenden Vorteil. Die Ausbeuten der Herstellung rekombinanter RNase A liegen bei 50 mg pro Liter Kultivierungsmedium (delCardayré und Raines, 1995). Zudem könnte sich die Proteasestabilität der RNase A für die Herstellung RNase A-basierender Antitumortheraeutika als günstig erweisen. Beispielsweise können die Proteasen Thermolysin (EC 3.4.24.27) und Trypsin (EC 3.4.21.4) RNase A nur unter denaturierenden Bedingungen abbauen (Arnold et al., 1996).

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Applichem, Darmstadt
Agar	Applichem, Darmstadt
Agarose	Eurogentec, Groningen, NL
Ampicillin, Natriumsalz	Serva, Heidelberg
7-Amino-4-methylcoumarin (AMC)	Sigma, Steinheim
6-Carboxyfluoreszein-dArUdAdA- 6-Carboxytetramethylrhodamin (AUAA)	Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA
Coomassie Brilliant Blau G250, R250	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Steinheim
Epoxysuccinyl-Leucin-4-guanidinobutylamid (E-64)	Sigma, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Applichem, Darmstadt
Glutathion, reduziert (GSH)	Applichem, Darmstadt
Glutathion, oxidiert (GSSG)	Applichem, Darmstadt
Glycin	Applichem, Darmstadt
Guanidin-Hydrochlorid (GdnHCl, ultra pure)	Sigma, Steinheim
Hefeextrakt	Difco, Detroit, MI, USA
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)	Fermentas, St. Leon-Rot
Kanamycinsulfat	Serva, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Ferak, Berlin
4-Methylumbelliferon (MU)	Sigma, Steinheim
4-Methylumbelliferon-N-Acetyl- β -D- Glucosaminid (MU-NAG)	Sigma, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka, Taufkirchen
Ribonukleinsäure (Gesamt-RNA aus Hefe)	Sigma, Steinheim
Saccharose	Serva, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton [®] X-100)	Serva, Heidelberg
Trypton	Difco, Detroit, MI, USA
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe
Benzyloxycarbonyl-Phenylalanyl-Arginin- 7-Amino-4-methylcoumarin (Z-Phe-Arg-AMC)	Sigma, Steinheim

Alle weiteren Chemikalien waren von höchster Reinheit. Es wurde ausschließlich deionisiertes Wasser verwendet.

3.1.2 Proteine

DNase I (Rinderpankreas)	Applichem, Darmstadt
Lysozym (Hühnereiweiß)	Serva, Heidelberg
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA)	Pierce, Bonn
Restriktionsendonukleasen (<i>DpnI</i> , <i>HindIII</i> , <i>NotI</i> , <i>NdeI</i>)	New England Biolabs, Frankfurt (Main)
RNase A	Sigma, Steinheim
Shrimp Alkalische Phosphatase	Amersham Biosciences, Freiburg
T4 DNA Ligase	Invitogen, Karlsruhe
Trypsin	Sigma, Steinheim

Markerproteine

LMW-SDS Marker Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Phosphorylase b (Kaninchenmuskel)	97,0 kDa
BSA	66,0 kDa
Ovalbumin (Hühnereiweiß)	45,0 kDa
Carboanhydrase (Rindererythrozyten)	30,0 kDa
Trypsin Inhibitor (Sojabohne)	20,1 kDa
α -Lactalbumin (Kuhmilch)	14,4 kDa

Antikörper

Anti-RNase A-Antikörper aus Kaninchen	Dr. H. Younus, Aligarh Muslim Universität, Indien
Anti-Kathepsin B-Antikörper aus Kaninchen	Biomol, Hamburg
Anti- β -Aktin-Antikörper aus Maus	Sigma, Steinheim
Anti-Maus-IgG-Antikörper aus Ziege	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziege	Dianova, Hamburg

3.1.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (Tabelle 1, 3.2.2; Tabelle 4, 3.2.3) wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) bzw. Metabion (Planegg-Martinsried) hergestellt. Die Sequenzierprimer waren am 5'-Ende mit IRD 800 modifiziert.

3.1.4 Plasmide

Das Plasmid pET22b(+) (Amp^r; Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach), welches das *ri*-Gen enthält, wurde freundlicherweise von Ronald T. Raines (WI, USA) zur Verfügung gestellt (Johnson et al., 2007). Das Plasmid pET26b(+) (Kan^r; Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach), welches das Gen für RNase A enthält, wurde freundlicherweise von Dr. Jens Köditz bereitgestellt.

3.1.5 *E. coli*-Stämme

<u>XL1-Blue</u> :	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F ⁺ proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)] Stratagene, Heidelberg
<u>BL21 (DE3)</u> :	B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal (DE3)</i> Stratagene, Heidelberg

3.1.6 Medien für die Kultivierung von Mikroorganismen

<u>LB-Medium</u> (<i>Lysogenic Broth</i>):	10 g l ⁻¹ NaCl 10 g l ⁻¹ Trypton 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt
<u>LB-Agar</u> :	LB-Medium + 20 g l ⁻¹ Agar-Agar
<u>TB-Medium</u> (<i>Terrific Broth</i>):	12 g l ⁻¹ Trypton 24 g l ⁻¹ Hefeextrakt 4% (v/v) Glycerin 2,13 g l ⁻¹ KH ₂ PO ₄ + 12,54 g l ⁻¹ K ₂ HPO ₄ (separat autoklaviert)
<u>SOC-Medium</u> : (<i>Super Optimal Catabolite Repression Broth</i>)	0,5 g l ⁻¹ NaCl 20 g l ⁻¹ Trypton 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt 10 ml l ⁻¹ 1 M MgSO ₄ (separat autoklaviert) 10 ml l ⁻¹ 1 M MgCl ₂ (separat autoklaviert) 20 ml l ⁻¹ 20% (w/v) Glucose (separat autoklaviert)

Nach der Herstellung wurden die Medien bzw. der Agar autoklaviert und kurz vor der Benutzung mit Kanamycin (50 µg ml⁻¹ Endkonzentration) oder mit Ampicilin (200 µg ml⁻¹ Endkonzentration) versetzt.

3.1.7 Materialien für die Zellkultur

Verwendete Zelllinie

K562

Beschreibung:	humane Leukämiezellen (chronische myeloische Leukämie)
ATCC-Nr.:	CCL-243
Kultiviert in:	RPMI 1640 (<i>dutch modification</i>) 10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS) 1% (v/v) GlutaMAX I 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin

Geräte

accu-jet® Pipettierhelfer	Brand GmbH, Wertheim
Behälter mit flüssigem Stickstoff (Typ GT35)	AIR LIQUIDE, Frankreich
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Inkubator HERAcell	Heraeus, Hanau
Sicherheitswerkbank HERAsafe (Klasse 2 TypH)	Heraeus, Hanau
Varioklav Dampfsterilisator Typ 250T	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Wasserbad Typ 1092	GFLmbH, Burgwedel

Zellkulturmaterial

Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Gestopfte Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Ilona Schubert Laborbedarf, Leipzig
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	TPP, Schweiz
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	TPP, Schweiz
Zellkulturtestplatten (96-well)	TPP, Schweiz
Fötales Kälberserum (FCS) (hitzeinaktiviert)	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium ohne Glutamin (<i>dutch modification</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Dulbecco's)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin (10000 U ml ⁻¹ / 10000 µg ml ⁻¹)	Invitrogen, Karlsruhe
GlutaMAX I-Supplement, 200 mM (gelöst in 0,85% NaCl)	Invitrogen, Karlsruhe
[Methyl- ³ H]-Thymidin (6,7 Ci mmol ⁻¹)	DuPont, Johnston, IA, USA

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Klonierung und Sequenzierung

3.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde aus dem *E. coli* Stamm XL1-Blue mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration der reinen Plasmid-DNA betrug ca. 100 ng μl^{-1} .

3.2.1.2 Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers (*1 kb-DNA Ladder*, Invitrogen, Karlsruhe) im Agarosegel (3.2.1.3). Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm ($A_{260} = 1$ entspricht ca. 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ doppelsträngiger DNA) unter Verwendung eines Ultrospec 3000 Spektrophotometers (Amersham Biosciences, Freiburg) bestimmt.

3.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in 1%igen (w/v) Agarosegelen bei 80 V in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) horizontal in einer *EASY-CAST™*-Gelelektrophoreseapparatur (OWL Separation Systems, Portsmouth, NH, USA). Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in H_2O) inkubiert. Die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden ließen sich im Transilluminator unter UV-Licht (302 nm) identifizieren.

3.2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden wurden unter langwelligem UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

3.2.1.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden zur Spaltung von Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten nach einer Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Diese schneiden an spezifischen, meist 4 – 8 Basenpaaren langen Erkennungssequenzen. Der Verdau mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Angaben des Herstellers in den mitgelieferten Restriktionspuffern. Die Spaltung von DNA diente sowohl analytischen als auch präparativen Zwecken.

Üblicherweise wurden folgende Ansätze für eine Doppelrestriktionsspaltung pipettiert:

Für analytische Zwecke:

- 6 µl H₂O
- 2 µl DNA aus Plasmidisolierung bzw. PCR (ca. 100 ng µl⁻¹)
- 1 µl 10×Restriktionspuffer
- je 1 µl Restriktionsendonuklease (10 U µl⁻¹)
- Inkubation bei 37°C für 3 h

Für präparative Zwecke:

- 50 µl DNA aus Plasmidisolierung bzw. PCR (ca. 100 ng µl⁻¹)
- 6 µl 10×Restriktionspuffer
- je 3 µl Restriktionsendonuklease (10 U µl⁻¹)
- Inkubation bei 37°C für 12 h

Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Restriktionsenzyme durch 20-minütige Inkubation bei 65°C. Die Spaltprodukte wurden durch Agarosegelelektrophorese (3.2.1.3) aufgetrennt, analysiert und bei präparativen Ansätzen aus dem Gel extrahiert (3.2.1.4).

3.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten in das pET26b(+)-Plasmid

Nach Verdau des pET26b(+)-Plasmids mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Nde*I erfolgte die Dephosphorylierung des 5'-Endes der Plasmid-DNA unter Nutzung der Alkalischen Phosphatase aus Shrimp (1 U) bei 37°C für 1 h. Anschließend wurde eine Ethanol-fällung nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Das linearisierte, dephosphorylierte Plasmid konnte nun für die Ligation eingesetzt werden. Die Ligation der verschiedenen DNA-Fragmente (3.2.2) in das pET26b(+)-Plasmid erfolgte durch Inkubation beider DNA-Stücke für 4 h bei 16°C in Gegenwart von T4-Ligase (1 U). Fragment und Plasmid wurden in einem Stoffmengenverhältnis von ca. 3:1 eingesetzt. Anschließend wurden 5 µl Ligationsansatz in einer Suspension chemokompetenter *E. coli* XL1-Blue aufgenommen und mittels Hitzeschock (3.2.4.2.2) transformiert.

3.2.1.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der verwendeten Plasmide erfolgte mit dem *CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit* (Fermentas GmbH, Leon-Rot) nach der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977) unter Verwendung eines LiCor 4000 DNA-Sequenziergeräts (MWG Biotech, Ebersberg) und der *BaseImagIR-Software* (Version 4, 1997) zur Auswertung. Für die Sequenzierung wurden die unten aufgeführten Oligonukleotide (IRD 800 markiert) und 200 fmol Plasmid-DNA eingesetzt.

T7 Promotor-Primer:	5´-CGA AAT TAA TAC GAC TCA-3´
T7 Terminator-Primer:	5´-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G-3´

3.2.2 PCR-Reaktionen zur Genverdopplung

Die Herstellung der RNase A-Tandemenzym-Varianten SGRSGRSG, SGSGSG und GP₆G (4.1.2) erfolgte mit Hilfe dreier aufeinanderfolgender PCR-Reaktionen (4.1.3; Abb. 9). Die Sequenzen der verwendeten Mutageneseprimer sind in Tabelle 1 dargestellt.

<u>Reaktionsansatz 1:</u> (PCR-Produkt 1a)	10×Puffer (5 µl) 50 ng DNA (pET26b(+)) mit <i>rnase A</i> Gen) 10 pmol T7-Promotor-Primer 10 pmol <i>rev</i> -Linker-Primer dNTP-Mix (1 µl; 10 mM) <i>Pfu</i> -Turbo-Polymerase (1 µl; 2,5 U µl ⁻¹) ad 50 µl H ₂ O
<u>Reaktionsansatz 2:</u> (PCR-Produkt 1b)	10xPuffer (5 µl) 50 ng DNA (pET26b(+)) mit <i>rnase A</i> Gen) 10 pmol T7 Terminator-Primer 10 pmol <i>fw</i> - Linker-Primer dNTP-Mix (1 µl; 10 mM) <i>Pfu</i> -Turbo-Polymerase (1 µl; 2,5 U µl ⁻¹) ad 50 µl H ₂ O

Die PCR-Reaktionen wurde mit dem in Tabelle 2 angegebenen Programm im Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Tabelle 1: Oligonukleotide zur Erzeugung der *rnase A*-Gene mit den entsprechenden 5'- bzw. 3'-Linkersequenzen.

Die gekennzeichneten und nummerierten Abschnitte der Oligonukleotide entsprechen den korrespondierenden Genabschnitten innerhalb des *rnase A*-Gens.

Linker	Oligonukleotide
GP ₆ G	<i>fw</i> 5'-GGT CCT CCA CCG CCT CCA CCA GGT ¹ <u>AAG-GAA ACT GCA GCA GCC</u> ^{18-3'} <i>rev</i> 5'-ACC TGG TGG AGG CGG TGG AGG ACC ³⁷² <u>CAC TGA AGC ATC AAA GTG</u> ^{355-3'}
SGRSGRSG	<i>fw</i> 5'-CT TCA GTG TCT GGT CGT AGC GGC CGC TCT GGT ¹ <u>AAG GAA AC</u> ^{8-3'} <i>rev</i> 5'-GT TTC CTT ACC AGA GCG GCC GCT ACG ACC AGA ³⁷² <u>CAC TGA AG</u> ^{365-3'}
SGSGSG	<i>fw</i> 5'-TCT GGT TCT GGT TCT GGT ¹ <u>AAG GAA ACT GCA GCA GCC</u> ^{18-3'} <i>rev</i> 5'-ACC AGA ACC AGA ACC AGA ³⁷² <u>CAC TGA AGC ATC AAA GTG G</u> ^{354-3'}
T7prom	<i>fw</i> 5'-CGA AAT TAA TAC GAC TCA C-3'
T7term	<i>rev</i> 5'-CTA GTT ATT GCT CAG CGG TGG-3'

Tabelle 2: Thermocyclerprogramm der ersten beiden PCR-Reaktionen

Programmschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	1:00 min
2	30	95°C	0:30 min
		45°C	1:00 min
		68°C	1:30 min

Anschließend wurden die PCR-Produkte 1a und 1b durch ein präparatives Agarosegel (3.2.1.3) und nachfolgender Gelextraktion (3.2.1.4) mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* gereinigt. Die erhaltenen Produkte dienen in einer weiteren PCR-Reaktion als DNA-Ausgangsmaterial (*template*).

Reaktionsansatz 3:
 (PCR-Produkt 2) 10×Puffer (5 µl)
 Produkt 1a (1 µl)
 Produkt 1b (1 µl)
 10 pmol T7 Promotor-Primer
 10 pmol T7 Terminator-Primer
 dNTP-Mix (1 µl, 10 mM)
 Pfu-Turbo-Polymerase (1 µl; 2,5 U µl⁻¹)
 ad 50 µl H₂O

Die PCR wurde mit dem in Tabelle 3 angegebenen Programm im Thermocycler durchgeführt.

Tabelle 3: Thermocyclerprogramm der 3. PCR-Reaktion

Programmschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	0:30 min
2	30	95°C	0:30 min
		55°C	0:30 min
		68°C	2:30 min

Das im 3. Schritt erhaltene PCR-Produkt wurde durch Agarosegelelektrophorese (3.2.1.3) und Gelextraktion (3.2.1.4) gereinigt. Anschließend erfolgte der Restriktionsverdau unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Hind*III und *Nde*I (3.2.1.5) und die Ligation in den pET26b(+)-Vektor (3.2.1.6).

3.2.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerechte Mutagenese erfolgte mit Hilfe des *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, Heidelberg) entsprechend der Anleitung des Herstellers. Die verwendeten Mutageneseprimer sind unter Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Oligonukleotide zur schrittweisen Modifizierung der Linkersequenzen der *rnase A-tandemzym*-Gene.

Ausgehend von den Genen der GP₆G-, SGRSGRSG-, und SGSGSG-RNase A-Tandemzym-Varianten wurden die Linkersequenzen schrittweise modifiziert. Das amplifizierte Produkt aus der entsprechenden Modifizierungsreaktion (z.B. GP₅G) diente in der nachfolgenden *QuikChange*-Reaktion als genetisches Ausgangsmaterial (*template*) zur Herstellung der in der Linkerregion um eine Aminosäure verkürzten Variante (z.B. GP₄G). Die Oligonukleotide für G88R wurden zur Herstellung der RI-evasiven monomeren Kontrollvariante G88R-RNase A und zur Herstellung von zwei teilevasiven SGRSGRSG-RNase A-Tandemzym-Varianten (G88R-SGR und G220R-SGR; 4.3.2.5) ausgehend vom *rnase A*-Gen (3.2.2) verwendet. Zur Herstellung der teilevasiven SGRSGRSG-RNase A-Tandemzym-Varianten wurde die G88R-Mutation einmal in die N-terminale RNase A-Einheit (G88R-SGR) oder in die C-terminale RNase A-Einheit (G220R-SGR) eingeführt.

Linker	Oligonukleotide
GP ₅ G	<i>fw</i> 5'-CTT TGA TGC TTC AGT CGG TCC TCC TCC ACC AGG TA-3' <i>rev</i> 5'-TAC CTG GTG GAG GAG GAG GAC CGA CTG AAG CAT CAA AG-3'
GP ₄ G	<i>fw</i> 5'-CTT TGA TGC TTC AGT AGG TCC TCC TCC ACC AGG TAA GG-3' <i>rev</i> 5'-CCT TAC CTG GTG GAG GAG GAC CTA CTG AAG CAT CAA AG-3'
GP ₃ G	<i>fw</i> 5'-CTT TGA TGC TTC AGT AGG TCC TCC ACC AGG TAA GG-3' <i>rev</i> 5'-CCT TAC CTG GTG GAG GAC CTA CTG AAG CAT CAA AG-3'
GP ₂ G	<i>fw</i> 5'-CTT TGA TGC TTC AGT AGG TCC ACC AGG TAA GG-3' <i>rev</i> 5'-CCT TAC CTG GTG GAC CTA CTG AAG CAT CAA AG-3'
SGSGRSG	<i>fw</i> 5'-CTT CAG TGT CTG GTA GCG GCC GCT CTG-3' <i>rev</i> 5'-CAG AGC GGC CGC TAC CAG ACA CTG AAG-3'
SGSRSG	<i>fw</i> 5'-CAG TGT CTG GTA GCC GCT CTG GTA AGG-3' <i>rev</i> 5'-CCT TAC CAG AGC GGC TAC CAG ACA CTG-3'
SGRSG	<i>fw</i> 5'-CTT CAG TGT CTG GTC GCT CTG GTA AGG-3' <i>rev</i> 5'-CCT TAC CAG AGC GAC CAG ACA CTG AAG-3'
(SG) ₃ S	<i>fw</i> 5'-GTT CTG GTT CTG GTT CTA AGG AAA CTG CAG C-3' <i>rev</i> 5'-GCT GCA GTT TCC TTA GAA CCA GAA CCA GAA C-3'
G88R	<i>fw</i> 5'-CTG CCG TGA GAC CCG TTC TTC GAA GTA CCC CAA CTG-3' <i>rev</i> 5'-CAG TTG GGG TAC TTC GAA GAA CGG GTC TCA CGG CAG-3'

3.2.4 Stammhaltung und Kultivierung von Mikroorganismen

3.2.4.1 Stammhaltung und Anzucht von Mikroorganismen

Die Stammhaltung von Mikroorganismen erfolgte auf LB-Agarplatten bei 4°C bis zu ca. vier Wochen. Für langfristige Lagerung wurden die Mikroorganismen als Glycerinkulturen bei -80°C aufbewahrt. Hierzu wurden 900 µl einer Übernachtskultur mit 100 µl sterilem 99,5%igen Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Anzucht von Mikroorganismen erfolgte in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums auf einem Horizontalschüttler bei 190 rpm und 37°C über Nacht. Die Flüssigkulturen wurden entweder mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte oder direkt aus einer Glycerinkultur angeimpft.

3.2.4.2 Transformation von Mikroorganismen

3.2.4.2.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen für die Transformation mittels Hitzeschock

125 ml SOB-Medium wurden mit 1,25 ml sterilem MgCl₂ und 1,25 ml MgSO₄ versetzt, mit einer Einzelkolonie einer LB-Platte angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Anschließend wurde die Kultur auf Eis inkubiert (10 min). Jeder der folgenden Arbeitsschritte erfolgte auf Eis oder bei 4°C in der Zentrifuge. Danach wurden die Zellen in einer Hettich Zentrifuge Rotofix 32 (Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen) zentrifugiert (1000×g, 10 min) und das Zellpellet in sterilem TFB-Puffer (10 mM PIPES pH 6,7, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl und 55 mM MnCl₂) resuspendiert (16 ml pro 50 ml Ausgangsmedium). Nach einer weiteren Inkubation auf Eis (10 min) wurde erneut zentrifugiert (1000×g, 10 min). Dieser Arbeitsschritt wurde wiederholt, wobei das Volumen auf 4 ml TFB-Puffer pro 50 ml Ausgangsmedium reduziert wurde. Anschließend wurden 0,3 ml DMSO zu dieser resuspendierten Zelllösung gegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Diese Zellsuspension wurde in Aliquots á 100 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C bis zur Verwendung gelagert.

3.2.4.2.2 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Hitzeschock

Ein Aliquot chemokompetenter *E. coli*-Zellen (XL1-Blue) wurde auf Eis aufgetaut mit 1 µl Plasmid-DNA (100 ng µl⁻¹) oder 5 µl Ligationsansatz gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Diese Bakteriensuspensionen wurden für 45 s auf 42°C erhitzt und anschließend abermals für 5 min auf Eis inkubiert. Nach diesem Schritt wurden die *E. coli*-Zellen in 500 µl 37°C warmem SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C und 900 rpm geschüttelt. Danach erfolgte das Ausplattieren der Bakteriensuspension auf LB-Kan- oder LB-Amp-Agarplatten, um auf transformierte *E. coli*-Zellen zu selektieren. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurden selbstgefertigte Gele mit unterschiedlichem Acrylamidgehalt verwendet. Das Trenngel (12,0-17,5%) wurde mit einem Sammelgel (10%) überschichtet. Die Elektrophorese wurde unter Verwendung einer *Mighty-Small II Elektrophoresis unit* (Hoefer, San Francisco, CA, USA) nach der Methode von Laemmli (1970) unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurden die Proben mit $\frac{1}{4}$ Volumen 5×SDS-Probenauftragungspuffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5% (w/v) SDS, 50% (v/v) Glycerin, 0,005% (w/v) Bromphenolblau, 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol) gemischt und 10 min bei 95°C inkubiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im elektrischen Feld bei 20 mA. Die Visualisierung der Proteinbanden im Gel erfolgte durch Coomassie-Färbung nach einer Methode von Fairbanks et al. (1971) mit Coomassie Brilliant R250 oder durch Silberfärbung (Nesterenko et al., 1994). Als Molekularmassenstandard diente der LMW *Calibration Kit for SDS electrophoresis* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

3.3.1.1 Natriumdesoxycholat (NaDoc)-Fällung

Proben geringer Proteinkonzentration wurden für die SDS-PAGE mit H₂O auf 2 ml aufgefüllt und durch Zugabe von 10 µl einer 10%igen (w/v) NaDoc-Lösung und 50 µl einer 50%igen (v/v) Trichloressigsäure-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach Zentrifugation (20000×g, 4°C, 20 min) wurde der Überstand verworfen und das NaDoc-Protein-Pellet in eiskaltem Ethanol resuspendiert und anschließend 30 min bei -20°C inkubiert. Diese Suspension wurde erneut zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstands wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Für die Fällung Guanidin-Hydrochlorid (GdnHCl)-haltiger Proben wurden maximal 500 µl Probe mit 1,5 ml H₂O verdünnt. Außerdem wurde zusätzlich vor dem Ethanolwaschschritt mit eiskaltem Aceton gewaschen.

3.3.2 Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese (Nativ-PAGE)

Die Proben wurden mit $\frac{1}{4}$ Vol. SDS-freiem 5×Probenauftragungspuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 15% (v/v) Glycerin und 0,02% (w/v) Bromphenolblau) gemischt und sofort auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde wie unter 3.3.1 beschrieben unter Verwendung von Nativ-PAGE-Laufpuffer (40 mM Tris-Acetat, pH 8,0, 1 mM EDTA) durchgeführt. Nach der Visualisierung der Banden mittels Coomassie R250 wurde das Elektropherogramm densitometrisch (3.3.3) ausgewertet.

3.3.3 Densitometrische Evaluierung

Zur densitometrischen Evaluierung der Bandenintensität wurden die PAGE-Gele mit Coomassie Brilliant Blau R250 gefärbt und bei 595 nm unter Verwendung eines CD 60-Densitometers (Desaga, Heidelberg) vermessen.

3.3.4 Herstellung der RNase A-Varianten

3.3.4.1 Expression

Die Herstellung der RNase A-Tandemenzym-Varianten und der G88R-RNase A erfolgte in Form von *inclusion bodies*. Für die Expression der jeweiligen *mase A-tandemenzym*-Gene sowie für die Expression des *g88r-mase A*-Gens wurde das Plasmid pET26b(+) mit dem entsprechenden Gen in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) transformiert (3.2.4.2.2). Die transformierten Zellen wurden auf einer LB-Kan-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zum Animpfen der Vorkultur (100 ml TB-Medium, 50 µg ml⁻¹ Kan) wurde eine einzelne Kolonie dieser Agarplatte verwendet. Ein Liter TB-Medium (50 µg ml⁻¹ Kan) wurde mit 10 ml dieser Übernachtsvorkultur inokuliert und bei 37°C und 190 rpm geschüttelt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,8 wurde die Expression des Gens durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert. Die Zellen wurden 4 h nach der Induktion durch Zentrifugation (6000×g, 4°C, 12 min) geerntet. Das Zellpellet wurde bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

3.3.4.2 Isolierung der *inclusion bodies*

Die Isolierung der *inclusion bodies* erfolgte nach Rudolph et al. (1997). 20 g Biofeuchtmasse (BL21(DE3)) wurden in 100 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, mit Hilfe des Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen) resuspendiert, mit 3 mg Lysozym pro Gramm Zellen versetzt und bei 4°C für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss durch Hochdruckdispersion mittels einer Gaulin-Apparatur Lab 40 (APV, Lübeck) bei einem Druck von 1200 bar. Es wurden drei Passagen durchgeführt. Danach erfolgte durch Zugabe von MgCl₂ (3 mM Endkonzentration) und Benzonase (50 µl, 250 U µl⁻¹, Merck, Darmstadt) der Verdau der DNA bei Raumtemperatur (1 h). Im nachfolgenden Schritt wurde die Suspension mit ½ Volumen 1,5 M NaCl, 60 mM EDTA, 6% (v/v) Triton[®]X-100, pH 7,0, gemischt und für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte durch Zentrifugation (48000×g, 4°C, 15 min) die Trennung der löslichen Fraktion der Suspension von den sedimentierten *inclusion bodies*. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet dreimal mit Puffer gewaschen. Dazu wurde die unlösliche Fraktion in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,0, 20 mM EDTA mittels Ultra-Turrax T25 resuspendiert und anschließend zentrifugiert (48000×g, 4°C, 15 min). Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet (*inclusion bodies*) bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.4.3 Solubilisierung der *inclusion bodies*

Die Solubilisierung erfolgte nach Rudolph et al. (1997). 1 g *inclusion bodies* (3.3.4.2) wurden mittels Ultra-Turrax T25 in 150 ml 6 M GdnHCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 250 mM DTT gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte das Absenken des pH-Werts auf 3,5 durch tropfenweise Zugabe von 1 N HCl-Lösung. Durch Zentrifugation (48000×g, 20°C, 30 min) wurden alle unlöslichen Bestandteile von den solubilisierten *inclusion bodies* abgetrennt. Im Anschluss wurden die gelösten *inclusion bodies* gegen 10 l einer 20 mM Essigsäurelösung dialysiert (über Nacht, 4°C). Nach der Dialyse wurden die solubilisierten *inclusion bodies* nochmals zentrifugiert (48000×g, 20°C, 30 min), um präzipitierte Proteine abzutrennen. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration am Spektrophotometer (Ultrospec 3000). Die solubilisierten *inclusion bodies* wurden aliquotiert und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.4.4 Renaturierung

Die solubilisierten *inclusion bodies* (3.3.4.3) wurden dem Renaturierungspuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM GSH, 0,2 mM GSSG) unter Rühren bei 4°C in 5 ml-Schritten bis zu einer maximalen Proteinkonzentration von 50 µg ml⁻¹ zugegeben. Die Renaturierung erfolgte bei 4°C im Kühlraum für ca. 72 h. Präzipitate wurden nach anschließender erfolgreicher Konzentrierung (3.3.4.5) durch Zentrifugation (48000×g, 4°C, 30 min) abgetrennt.

3.3.4.5 Konzentrierung

Die Konzentrierung der renaturierten Proteine erfolgte zunächst mit Hilfe einer Filtrationsanlage (Verder, Haan) mittels einer 3K-Membran (Pall-Filtron GmbH, Karlstein) nach Angaben des Herstellers. Nach der Reduzierung auf ein Volumen von ca. 0,4 l erfolgte die weitere Konzentrierung in einer AMICON®-Rührzelle (Typ 8400 für 400 ml Lösung; Millipore GmbH, Eschborn) nach Angaben des Herstellers. Es wurden Ultrafiltrationsmembranen mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa und einem Durchmesser von 76 mm (Typ OMEGA; Pall-Filtron GmbH, Karlstein) verwendet.

3.3.4.6 Reinigung

Die verschiedenen RNase A-Varianten wurden mittels Kationenaustauschchromatographie gereinigt. Dafür wurden die Proteinlösungen während der Konzentrierung (3.3.4.5) mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,0, gewaschen und auf eine FPLC-Säule SOURCE S (Amersham Biosciences), die mit einer inerten HPLC-Anlage (Detektor L-4250, Niederdruckgradientenpumpe L-6210, Merck Hitachi, Tokio, Japan) verbunden war, aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem steigenden NaCl-Gradienten in der mobilen Phase (Laufmittel A: 50 mM Tris-HCl, pH 7,0; Laufmittel B: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 M NaCl). Die Flussrate betrug 1 ml min⁻¹ und die Detektion erfolgte bei

278 nm. Die Reinheit der manuell gesammelten Fraktionen wurde anschließend durch Rechromatographie und SDS-PAGE (3.3.1) überprüft.

3.3.5 Herstellung des RI

3.3.5.1 Expression

Die Herstellung des RI erfolgte in löslicher Form nach Johnson et al. (2007). Für die Expression des *ri*-Gens wurde das Plasmid pET22b(+) mit dem entsprechenden Gen in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) transformiert (3.2.4.2.2). Die transformierten Zellen wurden auf einer LB-Amp-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zum Animpfen der Vorkultur wurde eine einzelne Kolonie dieser Agarplatte verwendet. 200 ml TB-Medium (200 µg ml⁻¹ Amp) wurden mit 2 ml einer Übernachtsvorkultur inokuliert und bei 37°C und 190 rpm geschüttelt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 2,8 wurde die Temperatur auf 15°C gesenkt und die Expression des Gens durch Zugabe von IPTG (0,5 mM Endkonzentration) induziert. Die Zellen wurden 24 h nach der Induktion durch Zentrifugation (6000×g, 4°C, 12 min) geerntet und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

3.3.5.2 Zellaufschluss nach der löslichen Expression

Das Zellpellet aus 1,2 l Kulturmedium wurde in 100 ml Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,8, 0,1 M NaCl, 10 mM DTT, 10 mM EDTA, 0,04 mM PMSF) resuspendiert (Ultra Turrax T25) und anschließend durch einen Homogenisator (Gaulin Lab40) in drei Passagen bei 1200 bar aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (48000×g, 4°C, 20 min) entfernt. Der im Überstand enthaltene RI wurde umgehend einer Affinitätschromatographischen Reinigung unterzogen (3.3.5.3).

3.3.5.3 Reinigung

Der hRI wurde zunächst durch Affinitätschromatographie gereinigt. Hierfür wurde gereinigte RNase A (30 mg in 50 mM NaPhosphat-Puffer, pH 7,0) nach den Angaben des Herstellers an NHS-aktivierte Sepharose (3 ml; Amersham Biosciences) gekoppelt. Die RNase A-Sepharose-Gravitationschromatographiesäule wurde mit 50 ml Puffer (50 mM KH₂PO₄, pH 6,4, 10 mM DTT, 1 mM EDTA) äquilibriert, bevor das zentrifugierte Zellhomogenat (3.3.5.2) aufgetragen und anschließend mit 50 ml Waschpuffer (50 mM KH₂PO₄, pH 6,4, 1 M NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA) gewaschen wurde. Die Elution erfolgte mit 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,0, der 3 M NaCl, 10 mM DTT und 1 mM EDTA enthielt. Nach einer Dialyse gegen 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM DTT, 1 mM EDTA erfolgte eine Anionenaustauschchromatographie. Hierfür wurde die Proteinlösung auf eine FPLC-Säule (Mono Q, Amersham Biosciences), die ebenfalls mit einer inerten HPLC-Anlage verbunden war, aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem steigenden NaCl-Gradienten in der mobilen Phase (Laufmittel A: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM DTT, 1 mM EDTA; Laufmittel B: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 M NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA) bei einer Flussrate von 1 ml min⁻¹. Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Die Reinheit der

manuell gesammelten Fraktionen wurde durch Rechromatographie und SDS-PAGE (3.3.1) überprüft.

3.3.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

3.3.6.1 Spektroskopische Konzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Stammlösung wurde ein UV-Spektrum von 240 bis 340 nm aufgenommen (Ultrospec 3000 Spektrophotometer) und die Extinktion bei 278 nm für die RNase A-Varianten bzw. bei 280 nm für den RI unter Berücksichtigung der Grundabsorption bestimmt. Die entsprechende Proteinkonzentration der RNase A-Lösungen wurde anschließend unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = 9800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Sela und Anfinsen, 1957) nach Gleichung 1 berechnet.

$$c = \frac{E_{278} \cdot M}{\varepsilon_{278} \cdot d} \quad (1)$$

E_{278} : Extinktion bei 278 nm

ε : molarer Extinktionskoeffizient der RNase A
($9800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

d: Schichtdicke der Küvette (1 cm)

M: molare Masse der RNase A (13683 g mol^{-1})

Die so ermittelte Proteinkonzentration bezieht sich jeweils auf die „monomeren“ RNase A-Einheiten.

Die Proteinkonzentration der RI-Lösungen wurde unter Verwendung des theoretischen molaren Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon = 39470 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>) und der molaren Masse von 49973 g mol^{-1} (<http://www.expasy.org/uniprot/P13489>) bei 280 nm bestimmt.

3.3.6.2 Bradford-Test

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in 96-well-Mikrotiterplatten (10 μl Probe, 100 μl Bradfordreagens). Als Proteinstandard für die Kalibrierkurve im Konzentrationsbereich von 0 bis 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ diente BSA. Die Detektion erfolgte bei 590 nm unter Verwendung eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts MR 7000 (Dynatech, Denkendorf). Jede Proteinkonzentration stellt das Mittel einer Dreifachbestimmung dar.

Bradfordreagens: 10 mg Coomassie Brillant Blau G 250
 5 ml Ethanol (96% v/v)
 10 ml H_3PO_4 (85% v/v)
 ad 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

3.3.6.3 Konzentrationsbestimmung mittels Nativ-PAGE

Die Oxidationsanfälligkeit des RI und der damit verbundene Verlust der Fähigkeit RNase A zu binden (Fominaya und Hofsteenge, 1992), erfordert die Bestimmung des intakten RI-Anteils. Hierfür wurden jeweils 40 pmol RI (spektroskopische Konzentrationsbestimmung) mit 0-100 pmol RNase A inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einem Volumen von 20 μl für 15 min in 100 mM NaPhosphat-Puffer (pH 6,55) in Anwesenheit von 2 mM DTT. Nach der Zugabe von 5 μl Nativ-PAGE-Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 15% (v/v) Glycerin und 0,02% (w/v) Bromphenolblau) erfolgte die Auftragung der Proben auf ein 10%iges Nativ-PAGE-Gel. Die Gelelektrophorese wurde wie unter 3.3.2 beschrieben durchgeführt. Nach der Visualisierung der Banden mittels Coomassie R250 wurde das Elektropherogramm densitometrisch (3.3.3) ausgewertet. Als Kalibrierkurve diente der lineare Abschnitt der RI•RNase A-Komplexbildungskurve.

3.3.7 Bestimmung der RNase-Aktivität

Die verwendeten Puffer wurden ausschließlich mit DEPC-behandeltem H_2O hergestellt. Hierzu wurde dem H_2O 0,1% (v/v) DEPC zugesetzt, über Nacht unter Rühren inkubiert (irreversible Inhibierung eventuell vorhandener RNasen durch Alkylierung der Histidin-Seitenketten im aktiven Zentrum) und die Lösung anschließend autoklaviert. Das DEPC zerfällt dabei in die beiden flüchtigen Produkte CO_2 und Ethanol.

Für die Bestimmung der Aktivität der RNase A-Tandemenzyme gegenüber Hefe-RNA als Substrat wurden 8 mg RNA zunächst in 500 μl 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, gelöst. Die intakte RNA präzipitiert durch die Zugabe von drei Volumeneinheiten eiskaltem Ethanol. Die im Überstand verbleibenden Ribonukleotide wurden durch Zentrifugation (20000 $\times g$, 4°C, 20 min) von der unversehrten RNA abgetrennt. Das Pellet wurde mit eiskaltem Ethanol gewaschen und unter Stickstoffatmosphäre getrocknet. Anschließend wurde die intakte RNA erneut in 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, gelöst. Die Konzentration dieser Stammlösung wurde durch Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt, wobei eine Absorption von 1 einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ entspricht (Sambrook et al., 1989). Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, der 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ BSA enthielt, bei einer RNA-Konzentration von 3,3 mg ml^{-1} und einer RNase-Konzentration von 0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ bei 37°C. Dazu wurden 30 μl Puffer (0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5) mit 20 μl RNase-Lösung (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ BSA) gemischt und bei 37°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 μl Substratlösung (4,4 mg ml^{-1} Hefe-RNA in 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5) gestartet und nach 15 min durch Zugabe von 200 μl einer eiskalten Stopplösung (22 mM $\text{LaCl}_3 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 1,2 M Perchlorsäure) abgestoppt (Corbishley et al., 1984). Für die Referenzreaktionen wurde statt der RNase-Lösung Puffer mit BSA (0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ BSA) verwendet. Die abgestoppten Reaktionsansätze wurden zunächst für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (20000 $\times g$, 4°C, 20 min). Die Konzentration an löslichen Ribonukleotiden im Überstand wurde durch

Absorptionsmessungen bei 260 nm unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von $10600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt (Corbishley et al., 1984).

Die Bestimmung der Aktivität gegenüber AUAA als Substrat erfolgte in Mikrotiterplatten (Fluotrac™, Greiner-Bio-One, Frickenhausen) bei 25°C. Dazu wurden 40 µl Puffer (200 mM Mes-NaOH, pH 6,0, 200 mM NaCl) mit 10 µl RNase-Lösung (25-100 pM RNase A bzw. 5-20 nM RNase A-Tandemenzym-Variante in 200 mM Mes-NaOH, pH 6,0, 200 mM NaCl, 200 µg ml⁻¹ BSA) gemischt und bei 25°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Substratlösung (100 nM AUAA in H₂O) gestartet und nach 5 min durch Zugabe von 20 µl SDS-Lösung (12%; w/v) abgestoppt. Für die Referenzreaktionen wurde statt RNase-Lösung Puffer mit BSA zugegeben. Für die Bestimmung des Signals nach vollständigem Umsatz des Substrats wurden 49 µl Puffer-Lösung mit 1 µl einer 1 µM RNase-Lösung und 50 µl Substratlösung gemischt und ebenfalls nach 5 min durch Zugabe von 20 µl SDS-Lösung (12%; w/v) abgestoppt. Anschließend wurde die Fluoreszenz unter Verwendung eines POLARstar Galaxy Mikrotiterplatten-Lesegeräts (BMG Labtech, Offenburg) bestimmt. Dazu wurde bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Emission bei 520 nm gemessen. Die Bestimmung des $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werts erfolgte nach Gleichung 2.

$$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = \frac{m}{(\Delta F) \cdot [\text{RNase}]} \quad (2)$$

m:	Anstieg des Fluoreszenzsignals pro Sekunde
ΔF:	Änderung des Fluoreszenzsignals bei vollständigem Substratumsatz
[RNase]:	RNase-Konzentration in mol l ⁻¹

3.3.8 Bestimmung der RNase-Aktivität in Anwesenheit des RI

Die verwendeten Puffer wurden ausschließlich mit DEPC-behandeltem H₂O (3.3.7) hergestellt.

Für den Aktivitätstest der RNase A-Tandemenzyme gegenüber Hefe-RNA als Substrat in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an RI wurde die RNA wie unter 3.3.7 beschrieben vorbereitet. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, 10 mM DTT, 50 µg ml⁻¹ BSA bei einer RNA-Konzentration von 1,9 mg ml⁻¹ sowie einer RNase-Konzentration von 0,1 µg ml⁻¹ bei 37°C. Dazu wurden zunächst 30 µl RI-Lösung (0-1400 nM in 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, 16,7 mM DTT, 200 µg ml⁻¹ BSA) mit 20 µl RNase-Lösung (73 nM bezogen auf RNase A-Einheiten in 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, 200 µg ml⁻¹ BSA) gemischt und bei 37°C für 15 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µl Substratlösung (2,5 mg ml⁻¹ Hefe-RNA in 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, 10 mM DTT) gestartet und nach 15 min wie unter 3.3.7 beschrieben gestoppt und analysiert.

Die Bestimmung der Aktivität in Anwesenheit des RI gegenüber AUAA als Substrat erfolgte wie unter 3.3.7 beschrieben in Mikrotiterplatten bei 25°C in 100 mM Mes-NaOH, pH 6,0, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 50 µg ml⁻¹ BSA. Dazu wurden 40 µl RI-Lösung (0-250 nM in 200 mM Mes-NaOH, pH 6,0, 200 mM NaCl, 25 mM DTT und 100 µg ml⁻¹

BSA) mit 10 μl RNase-Lösung (25-100 pM RNase A bzw. 5-20 nM RNase A-Tandemenzym-Variante in 200 mM Mes-NaOH, pH 6,0, 200 mM NaCl, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ BSA) gemischt und bei 25°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μl Substratlösung (100 nM AUAA in H_2O) gestartet und nach 5 min wie unter 3.3.7 beschrieben abgestoppt und evaluiert.

3.3.9 Analyse der RI-Bindungsstöchiometrie mittels Nativ-PAGE

Die Stöchiometrie des RI•RNase A-Tandemenzym-Komplexes wurde durch den Vergleich zur Komplexbildung von RNase A und RI ermittelt. Hierfür wurden jeweils 40 pmol RI mit 20 pmol RNase A sowie 10 bzw. 20 pmol SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einem Volumen von 15 μl für 15 min in 100 mM NaPhosphat-Puffer, pH 6,55, in Anwesenheit von 2 mM DTT. Nach der Zugabe von 5 μl Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 15% (v/v) Glycerin und 0,02% (w/v) Bromphenolblau) erfolgte die Auftragung der Proben auf ein 10%iges Nativ-PAGE-Gel (3.3.2). Nach der Visualisierung der Banden mittels Coomassie R250 erfolgte die densitometrische Evaluierung des Bandenmusters im Elektropherogramm (3.3.3).

3.3.10 Limitierte Proteolyse

Die limitierte Proteolyse der RNase A-Tandemenzym-Varianten wurde in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 bei 25°C durchgeführt (Gesamtvolumen 200 μl). Dem bei 25°C vorinkubierten Puffer wurde das SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym (0,1 mg ml^{-1} Endkonzentration) zugesetzt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Proteaselösung (Trypsin, 3×10^{-4} mg ml^{-1} im Ansatz) gestartet. Nach definierten Zeitintervallen wurden 15 μl Probe entnommen und mit 5 μl Stoppreagens (50 mM PMSF in Isopropanol) gemischt. Die Proben wurden im Vakuumkonzentrator (SpeedVac®, Modell SC110A; Savant, NY, USA) getrocknet, in Probenpuffer aufgenommen und für die SDS-PAGE (3.3.1) eingesetzt. Nach der Visualisierung der Banden mittels Coomassie R250 erfolgte die densitometrische Evaluierung des Bandenmusters im Elektropherogramm wie unter 3.3.3 beschrieben.

Für den proteolytischen Verdau des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms und dessen Varianten G88R-SGR und G220R-SGR (4.3.2.5) in Anwesenheit des RI wurde das entsprechende Tandemenzym (0,1 mg ml^{-1} bzw. 3,6 μM Endkonzentration) mit 2-fachem molaren Überschuss an RI (0,36 mg ml^{-1} bzw. 7,2 μM Endkonzentration) in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 und 5 mM DTT in einem Volumen von 180 μl für 15 min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von 20 μl Trypsin (1×10^{-3} mg ml^{-1} Endkonzentration). Der tryptische Verdau wurde wie oben beschrieben abgestoppt und analysiert.

Der proteolytische Verdau des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms und dessen Varianten G88R-SGR bzw. G220R-SGR in Anwesenheit des RI wurde ferner durch die Nativ-PAGE (3.3.2) untersucht. Hierfür wurden 40 pmol RI mit 40 pmol der SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym-Variante in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 und 5 mM DTT in einem Volumen von 15 μl für 15 min bei 25°C vorinkubiert und

durch Zugabe von Trypsin (3×10^{-4} mg ml⁻¹ im Ansatz) für 60 min proteolysiert. Die Proben wurden nach Zusatz von 5 µl Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 15% (v/v) Glycerin und 0,02% (w/v) Bromphenolblau) direkt auf ein 10%iges Nativ-PAGE-Gel (3.3.2) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde wie unter 3.3.2 beschrieben durchgeführt. Nach der Visualisierung der Banden mittels Coomassie R250 erfolgte die densitometrische Evaluierung des Bandenmusters im Elektropherogramm (3.3.3).

3.3.10.1 Bestimmung der Proteolysekonstanten

Die Proteolysekonstante k_p wurde aus der zeitabhängigen Abnahme der Peakfläche der Bande des intakten RNase A-Tandemenzyms in den gescannten SDS-PAGE-Gelen, welche einer Reaktion 1. Ordnung folgt, nach Gleichung 3 ermittelt.

$$A_t = A_0 \cdot \exp(-k_p \cdot t) \quad (3)$$

A_0 :	Messsignal zum Zeitpunkt $t = 0$ s
A_t :	Messsignal zum Zeitpunkt t
k_p :	Geschwindigkeitskonstante der Proteolyse

3.3.11 Kristallisation

Die Proteinkristallisation wurde zunächst nach der Methode der Gasphasendiffusion mit sitzendem Tropfen in 96-*well*-Kristallisationsplatten (*Crystalquick*-Platten, Greiner Bio-One, Frickenhausen) unter Verwendung des Pipettierroboters PixSys 4200 SynQuad (Genomic Solutions®, Huntingdon, UK) durchgeführt. Für einen ersten *screen* wurde der *JBScreen* (Jena Bioscience, Jena) mit insgesamt 240 verschiedenen Kristallisationsbedingungen verwendet. Dafür wurden pro *well* 110 µl Kristallisationspuffer in das Reservoir pipettiert und anschließend je 0,2 µl der Proteinlösung mit je 0,2 µl der Reservoirlösung durch den Pipettierroboter vermischt. Nach dem Befüllen wurden die Platten mit Klebefolie *CrystallClear* (Jena Bioscience) luftdicht verschlossen und bei 13°C inkubiert. Die RNase A-Tandemenzym-Konzentration wurde zwischen 10 und 40 mg ml⁻¹ (in 10 mM Tris-HCl, pH 7,0) variiert. Die fotografische Dokumentation erfolgte automatisch unter Verwendung des Oasis LS3 *Protein Crystal Imaging System* (Veeco, Mannheim). Für die Reservoirlösungen 30% (w/v) PEG-8000/200 mM (NH₄)₂SO₄, 20% (w/v) PEG-8000/200 mM (NH₄)₂SO₄ und 20% (w/v) PEG-4000/200 mM (NH₄)₂SO₄ konnte die Bildung streuender Kristalle beobachtet werden (4.4).

Für die Optimierung der Streueigenschaften der Kristalle wurde für die entsprechenden Kristallisationspuffer ein pH-Fein-*screening* (pH 5,0-6,0) durchgeführt. Die Kristallisation erfolgte nun nach der Methode der Gasphasendiffusion mit hängendem Tropfen in 24-*well*-Kristallisationsplatten (*Crychem*TM-Platten, Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) mit einer RNase A-Tandemenzym-Konzentration von 10 mg ml⁻¹ (in 10 mM Tris-HCl, pH 7,0). Dafür wurde 1 ml Kristallisationspuffer in das Reservoir pipettiert, der Tropfen aus gleichen Volumina (je 2 µl) Proteinlösung und Kristallisationspuffer gebildet und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt.

Die Platten wurden nach dem Befüllen mit Klebefolie *CrystallClear* luftdicht verschlossen und wiederum bei 13°C inkubiert. Die Kristallisation wurde mit dem Mikroskop beobachtet und zur Dokumentation fotografisch aufgenommen.

3.3.11.1 Datensammlung

Die Datensammlung erfolgte in der Abteilung „Physikalische Biotechnologie“ der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und wurde freundlicherweise von Dr. Piotr Neumann betreut. Die schockgefrorenen Kristalle wurden zunächst mit einer Gefrierschutzlösung (20% (v/v) Glycerin in der Reservoirlösung 30% (w/v) PEG-8000/200 mM (NH₄)₂SO₄) für ca. 15 s auf Eis inkubiert und dann direkt mittels eines *loops* (0,05–0,1 mm Ø; Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) auf dem Goniometerkopf angebracht. Der Kristall befand sich für die Messung in einem kontinuierlichen Stickstoffstrom (110 K). Die Analyse der schockgefrorenen Proteinkristalle erfolgte an einem Drehanodengenerator (MicroMax 007; RigakuMCS, Kent, UK) bei einer Wellenlänge von 1.5418 Å (Cu-K α -Strahlung) unter Verwendung eines R-Axis IV++-Detektors (RigakuMSC, Kent, UK). Raumgruppe und Zelldimension der Kristalle wurden mit dem Programm XDS bestimmt (Kabsch, 1993). Alle erhaltenen Daten wurden mit den Programmen MOSFLM und SCALA aus dem CCP4-Paket (*Collaborative Computational Project no. 4*; CCP4, 1994) integriert bzw. skaliert.

3.3.11.2 Modellierung und kristallographische Verfeinerung

Die Strukturen der kristallisierten RNase A-Tandemenzym-Varianten wurden mit der Methode des Molekularen Ersatzes (*molecular replacement*; MR) gelöst. Dabei diente die Struktur der RNase A (PDB-Zugangscode 7RSA; Wlodawer et al., 1988) als Suchmodell. Die Verfeinerungen wurden freundlicherweise von Dr. Piotr Neumann mit dem Programm *PHASER* durchgeführt (McCoy et al., 2005). Die Lage der Aminosäuren wurde anschließend durch *eine simulated annealing composite omit map* validiert. Hierbei wird in einer Simulation die Energie (Temperatur) der Atome zuerst erhöht und dann langsam minimiert, so dass Energiebarrieren und somit lokale Energieminima, die nicht der realen Struktur entsprechen, überwunden werden. Auf jeden Verfeinerungszyklus folgten die Berechnung von Elektronendichtekarten und die manuelle Inspektion und Korrektur des Modells unter Nutzung der Programme *O* und *Coot* (Jones et al., 1991; Emsley und Cowtan, 2004). Danach wurden die Modelle mit dem Programm CNS weiter verfeinert (Brunger et al., 1998). Als Zielfunktion wurde der kristallographische R-Faktor minimiert, wobei geometrische Parameter berücksichtigt wurden. Nach mehreren aufeinanderfolgenden Modellbau- und Verfeinerungszyklen wurden die individuellen B-Faktoren verfeinert. Um ein objektives Kriterium über den Erfolg der Verfeinerung zu haben, wurden 5% zufällig ausgewählte Reflexe von der Verfeinerung ausgeschlossen. Der aus diesem Testsatz berechnete freie R-Faktor (R_{free}), der im Allgemeinen 5% höher ist als der kristallographische R-Faktor (R), verhindert dabei eine Überfeinerung des Modells.

Nach dem automatischen Einbau von Wassermolekülen und deren manueller Überprüfung wurden finale R- und R_{free} -Faktoren von 0,1722 und 0,2155 erreicht. Die finale Verfeinerung erfolgte mit Hilfe des *REFMAC*-Programms aus dem CCP4-Paket (1994). Die Modelle wurden abschließend in Hinblick auf ihre Geometrie und zur Erstellung der Ramachandran-Diagramme mit dem Programm *PROCHECK* analysiert (Laskowski et al., 1993).

R-Faktor: allgemeiner kristallographischer R-Faktor (*residual-factor*), Maß für die Korrektheit der Struktur eines Modells:

$$R = \frac{\sum_{hkl} \| |F_{\text{obs}}| - k |F_{\text{calc}}| \|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|}$$

R_{free} : freier R-Faktor, ist von der Verfeinerung unbeeinflusst, da die zur Berechnung dieses R-Faktors verwendeten Einzelreflexionen ($hkl \subset T$) von der Verfeinerung ausgeschlossen sind:

$$R_{\text{free}} = \frac{\sum_{hkl \subset T} \| |F_{\text{obs}}| - k |F_{\text{calc}}| \|}{\sum_{hkl \subset T} |F_{\text{obs}}|}$$

$|F_{\text{obs}}|$: beobachtete Strukturfaktoramplitude

$|F_{\text{calc}}|$: berechnete Strukturfaktoramplitude des Modells

k : Skalierungsfaktor

$hkl \subset T$: Einzelreflexe, die zum Testset T gehören

B-Faktor: Temperatur-Faktor oder Debye-Waller-Faktor, beschreibt das Maß der Abweichung der Elektronendichte und reflektiert somit die Mobilität eines Atoms; kann Fehler beim Modellieren aufzeigen (hohe B-Faktoren).

$$B_i = 8\pi^2 U_i^2$$

U_i^2 : Durchschnittsabweichung der Atomschwingung des i -ten Atoms (*mean square displacement*)

3.4 Biophysikalische Methoden

3.4.1 Analytische Ultrazentrifugation

Die Untersuchungen wurden an einer analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-A (Beckman Instruments, Fullerton, USA) mit Doppelsektorzellen (für Probe und Puffer) bei 20°C durchgeführt (4.3.2.3). Die Bestimmung der Sedimentationskonstanten erfolgte mittels Sedimentationslauf über 4 h. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte mittels Gleichgewichtslauf über 36 h. Die Messungen wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. H. Lilie (Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg) durchgeführt.

3.4.2 CD-Spektroskopie

3.4.2.1 CD-Spektren

Die Messungen wurden an einem Jasco J-810 Spektropolarimeter (Jasco Labor- und Datentechnik, Groß-Umstadt) bei 20°C in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, durchgeführt. Die CD-Spektren wurden mit einer Bandweite von 1 nm, einer Integrationszeit von 1 s und einer Schrittweite von 0,1 nm aufgenommen. Bei einer Messgeschwindigkeit von 20 nm min⁻¹ wurden 10 Einzelspektren akkumuliert. Für den Nah-UV Bereich (340-250 nm) wurden volumenreduzierte geschwärzte Quarzküvetten mit 1 cm Weglänge und für den Fern-UV Bereich (260-180 nm) Quarzküvetten mit 0,01 cm Weglänge verwendet. Die Proteinkonzentration wurde spektroskopisch bestimmt (3.3.6.1). Die Molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\Theta]_{\text{MRW}}$ wurde nach Gleichung 4 berechnet.

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \cdot M}{10 \cdot c \cdot d \cdot N_A} \quad (4)$$

$[\Theta]_{\text{MRW}}$:	molare Elliptizität pro Aminosäurerest (deg cm ² dmol ⁻¹)
Θ :	Elliptizität (mdeg)
M :	molare Masse des Proteins (g mol ⁻¹)
c :	Proteinkonzentration (mg ml ⁻¹)
d :	Schichtdicke der Küvette (cm)
N_A :	Anzahl der Aminosäurereste im Protein

3.4.2.2 Thermische Entfaltung

Die temperaturinduzierten Übergangskurven der RNase A-Tandemenzym-Varianten und der RNase A wurden durch die Änderungen im CD-Signals an einem Jasco J-810 Spektropolarimeter detektiert. Hierfür wurde das CD-Signal in Abhängigkeit von der Temperatur bei 278 nm in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, bei einer Heizrate von 1 K min⁻¹ und einer Äquilibrierungszeit von 1 min bestimmt. Die Proteinkonzentration betrug 0,5 mg ml⁻¹. Für die Auswertung wurde die Elliptizität gegen die Temperatur aufgetragen. Die Auswertung erfolgte durch nicht-lineare Regression nach der für das reversible Zweizustandsmodell gültigen Gleichung (Pace et al., 1998; Gleichung 5) und wurde ausschließlich zur Bestimmung der Temperatur im Übergangsmittelpunkt (T_m) genutzt.

$$y = \frac{(y_N^0 + m_N \cdot T) - (y_D^0 + m_D \cdot T) \cdot \exp\left(\frac{\Delta H_m}{R \cdot T} \cdot \frac{T - T_m}{T_m}\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta H_m}{R \cdot T} \cdot \frac{T - T_m}{T_m}\right)} \quad (5)$$

y :	Signal des Proteins (Elliptizität)
y_N^0, y_D^0 :	Signal des nativen bzw. denaturierten Zustands des Proteins, extrapoliert auf 0 K
m_N, m_D :	Anstieg des Signals des nativen bzw. denaturierten Zustands des Proteins in Abhängigkeit von der Temperatur
T :	Temperatur (K)
T_m :	Temperatur im Übergangsmittelpunkt (K)
ΔH_m :	Enthalpie bei T_m
R :	universelle Gaskonstante

3.4.3 Fluoreszenzspektroskopie zur Bestimmung der GdnHCl-induzierten Übergangskurven

Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem Fluoro-Max-2® (Jobin Yvon, Grasbrunn) in 1,0 cm × 0,4 cm-Fluoreszenzquarzglasküvetten bei 25°C aufgenommen. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch filtriert und entgast (0,45 µm Filter, Roth, Karlsruhe). Die RNase A-Tandemenzyme (50 µg ml⁻¹) wurden in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, in Gegenwart von 0-6 M GdnHCl für 4 h bei 25°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Fluoreszenzspektren zwischen 290 und 350 nm. Die Anregung der Proben erfolgte bei 278 nm. Es wurden zunächst jeweils 10 Einzelspektren für den nativen (0 M GdnHCl) und den denaturierten Zustand (6 M GdnHCl) akkumuliert. Für die Anregung wurde eine Spaltbreite von 1 nm, für die Emission eine Spaltbreite von 10 nm verwendet. Zur Bestimmung der Übergangskurven wurde das Maximum des Differenzspektrums zwischen nativem und denaturiertem Protein bei 303 nm herangezogen, indem nach Einstellung der Gleichgewichtsbedingung das Fluoreszenzsignal (303 nm) über 40 s gemittelt wurde.

Nach Messung der Fluoreszenzsignale in Gegenwart von 0-6 M GdnHCl wurde die genaue Denaturationskonzentration refraktometrisch nach Gleichung 6 bestimmt (Shirley, 1995). ΔN entspricht der Differenz des Brechungsindex mit und ohne Denaturans.

$$[\text{GdnHCl}] \text{ (M)} = 57,147 \times (\Delta N) + 38,68 \times (\Delta N)^2 - 91,6 \times (\Delta N)^3 \quad (6)$$

Für die Bestimmung der denaturationsinduzierten Übergangskurven wurde die Intensität des Fluoreszenzsignals aufgetragen und der betreffende Konzentrationsbereich nach einem Zweizustandsmodell (Santoro und Bolen, 1988) unter Verwendung von Gleichung 7 (Fersht, 1999) mittels nicht-linearer Regression angepasst. Die Fraktion des nativen Proteins (f_N) wurde nach Gleichung 8 berechnet.

$$y = \frac{(y_N^0 + m_N[D]) + (y_D^0 + m_D[D]) \cdot \exp\left(-\frac{m_{\Delta G}([D]_{50\%} - [D])}{R \cdot T}\right)}{1 + \exp\left(-\frac{m_{\Delta G}([D]_{50\%} - [D])}{R \cdot T}\right)} \quad (7)$$

$$f_N = \frac{y_D - y}{y_D - y_N} \quad \text{mit} \quad y_D = y_D^0 + m_D \cdot [D] \quad \text{und} \quad y_N = y_N^0 + m_N \cdot [D] \quad (8)$$

y :	Signal des Proteins (Fluoreszenzintensität bei 303 nm)
y_N^0, y_D^0 :	Signal des Proteins im nativen bzw. denaturierten Zustand, extrapoliert auf den Wert in Abwesenheit von Denaturans
m_N, m_D :	Anstieg des Signals des Proteins im nativen bzw. denaturierten Zustand in Abhängigkeit von der Denaturationskonzentration
$[D]$:	Denaturationskonzentration (M)
$[D]_{50\%}$:	Denaturationskonzentration im Übergangsmittelpunkt (M)
$m_{\Delta G}$:	Anstieg der freien Enthalpie in Abhängigkeit von der Denaturationskonzentration (Kooperativität)
R :	Allgemeine Gaskonstante
T :	Temperatur (K)
f_N :	Anteil an nativem Protein im Gleichgewicht

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Kultivierung eukaryotischer K562-Zellen

Für die kontinuierliche Kultivierung der humanen Suspensionszelllinie K562 wurden T75-Zellkulturflaschen verwendet. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator (HERAcell; Heraeus, Hanau) bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ in einer gesättigten Wasserdampfatmosfera. Als Kultivierungsmedium diente RPMI 1640, das zusätzlich fötales Kälberserum (10%, v/v), Glutamax I (1%, v/v), sowie Penicillin (100 Units ml⁻¹) und Streptomycin (100 µg ml⁻¹) als Antibiotika enthielt. Die Zellen wurden in Volumeneinheiten von 25-100 ml zu Zelldichten von 0,5-1×10⁶ Zellen ml⁻¹ aufgezogen. Die Subkultivierung der K562-Suspensionszelllinie erfolgte mittels Verdünnung der Zellsuspension mit Kultivierungsmedium. Dafür wurden 5 ml der gut gemischten Zellsuspension in 20 ml vorgewärmtem, frischen Medium inokuliert.

3.5.1.1 Präparation von Kryokulturen

Die dauerhafte Lagerung eukaryotischer K562-Zellen erfolgte bei -196°C in flüssigem Stickstoff. Hierfür wurden die Zellen einer 25 ml Zellsuspension mit einer Zelldichte von 0,5-1×10⁶ Zellen ml⁻¹ geerntet (2000×g, 4°C, 5 min) und in 10 ml Gefriermedium (Kultivierungsmedium mit 5% (v/v) DMSO) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in Aliquots zu 1 ml in Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -80°C in Isopropanol inkubiert, um den Zellen eine langsame Temperaturerniedrigung zu ermöglichen. Im Anschluss wurden die Kryoröhrchen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt und darin gelagert.

3.5.1.2 Reaktivierung von Kryokulturen

Zur Reaktivierung einer Kryokultur wurde ein Röhrchen mit Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend erfolgte mit dem kompletten Inhalt des Röhrchens die Inokulation einer T75-Zellkulturflasche mit frischem Medium. Nach 24 h im CO₂-Inkubator bei 37°C wurde das Medium gewechselt, um restliches DMSO aus der Kultur zu entfernen.

3.5.2 Zytotoxizitätstest

Die zytotoxische Wirkung der RNase A-Tandemenzym-Varianten wurde durch die Messung des Einbaus von [*Methyl*-³H]-Thymidin in neu synthetisierte DNA nachgewiesen (Kim et al., 1995a; Leland et al., 1998a). Dazu wurden zunächst 96-*well*-Zellkulturplatten mit 90 µl Zellsuspension einer Dichte von 5×10⁴ Zellen ml⁻¹ pro *well* inokuliert. Nachdem sich die Zellen im CO₂-Inkubator bei 37°C für 2 h an die veränderten Kultivierungsbedingungen adaptieren konnten, erfolgte die Zugabe steriler Lösungen (10 µl) der RNase A-Tandemenzym-Varianten in PBS zu den Aliquots. Der Zusatz der RNase A-Tandemenzyme erfolgte in Konzentrationen von 1 nM-200 µM (Endkonzentration im

Medium). Nach 44 h bei 37°C im CO₂-Inkubator erfolgte ein 4 h-Puls mit [*Methyl*-³H]-Thymidin (0,2 µCi pro *well*). Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des PHD *cell harvester* (Cambridge Technology; Watertown, MA, USA) auf Glasfaserfilter gepresst. Die Lyse der so geernteten Zellen erfolgte durch den Durchgang mehrerer Milliliter bidestillierten Wassers durch den Glasfaserfilter. DNA und andere zelluläre Makromoleküle werden durch den Glasfaserfilter zurückgehalten, während kleinere Moleküle wie das nicht eingebaute [*Methyl*-³H]-Thymidin beim Waschen des Filters entfernt wurden. Nach mehreren Waschschritten wurde der Filter mit Methanol getrocknet und anschließend im Flüssigscintillationszähler (MicroBeta[®] TriLux; Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) vermessen. Aus den Ergebnissen der Scintillationsmessung wurde die prozentuale Proliferationsrate (S) berechnet. Dafür wurde der Scintillationswert für den [*Methyl*-³H]-Thymidin-Einbau in die DNA der PBS-behandelten Kontrollzellen als Wert für einen 100%igen ³H-Einbau (S = 100%) definiert. Die relative Proliferationsrate (S) ergibt sich aus dem Verhältnis des ³H-Einbaus in die DNA der mit RNase A-Tandemenzymen behandelten Zellen zum ³H-Einbau in die DNA der Kontrollzellen. Die prozentualen Proliferationsraten wurden gegen die entsprechenden RNase A-Tandemenzym-Konzentrationen (logarithmische Skalierung) aufgetragen. Aus dem Kurvenverlauf dieser Auftragung wurde der IC₅₀-Wert der jeweiligen RNase A-Tandemenzym-Variante unter Verwendung von Gleichung 9 ermittelt (Haigis et al., 2002).

$$S = \frac{100\% \cdot IC_{50}}{(IC_{50} + [RNase])} \quad (9)$$

S:	prozentuale Proliferationsrate
IC ₅₀ :	Konzentration an RNase A-Tandemenzym im Zellkulturmedium bei der 50% der Zellen überleben
[RNase]:	RNase-Konzentration (µM)

3.5.3 Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Ultrazentrifugation

3.5.3.1 Zentrifugation

Die subzelluläre Fraktionierung erfolgte mit kleineren Modifizierungen nach einem Protokoll von Schröter et al. (1999; Abb. 34). Die nachfolgend beschriebene Vorgehensweise erfolgte ausschließlich bei einer Temperatur von 4°C oder auf Eis. Als Fraktionierungspuffer wurde 10 mM Tris-Acetat-Puffer, pH 7,0, der 250 mM Saccharose enthielt, verwendet. Nach der Ernte von rund 1×10⁹ Zellen durch Zentrifugation (2000×g, 10 min) wurden die erhaltenen Zellpellets dreimal mit dem Fraktionierungspuffer gewaschen. Die gewaschenen Zellpellets wurden in 0,3 ml eiskaltem Fraktionierungspuffer aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (5 × 5 J; Vibra Cell, Bioblock Scientific, Lyon, Frankreich). Anschließend wurde das Zellhomogenat zentrifugiert (8000×g, 10 min), um intakte Zellen, Zellfragmente, Plasmamembranen und Zellkerne abzutrennen (Schröter et

al., 1999). Eine Probe dieses Überstands diente zur Visualisierung der totalen Internalisierung der RNase A-Varianten (Fraktion T). Der restliche Überstand wurde anschließend erneut zentrifugiert ($100000\times g$, 6 min), um Mitochondrien, Endosomen und Lysosomen im Pellet zu isolieren (Fraktionen E and L). Der so erhaltene Überstand wurde nochmals zentrifugiert ($130000\times g$, 60 min), um die Mikrosomen ins Pellet abzutrennen (Fraktion M). Mit diesem letzten Zentrifugationsschritt erhält man reines Zytosol im Überstand (Fraktion Z). Die während dieser Arbeitsschritte erhaltenen Pellets wurden mit Fraktionierungspuffer gewaschen und nochmals zentrifugiert. Die Überstände dieser Waschschrte wurden verworfen.

3.5.3.2 Trennung von endosomaler und lysosomaler Fraktion

Lysosomen sind sensitiv gegenüber hypotoner Lyse und lassen sich somit leicht von den Endosomen abtrennen (Bohley et al., 1969). Nach einem Protokoll von Bohley et al. (1969) konnte die lysosomale Fraktion durch eine 20-minütige hypotone Lyse vom Pelletverband aus Fraktion E und L getrennt werden (Zugabe des 18-fachen Pelletgewichts an bidestilliertem Wasser). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt ($100000\times g$, 4°C , 8 min) konnten die aufgeschlossenen Lysosomen (Fraktion L) als Überstand abgenommen werden, während die Mitochondrien und die Endosomen im Pellet isoliert blieben (Fraktion E). Die erhaltenen Pellets wurden wiederum mit Fraktionierungspuffer gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der Überstand des Waschschrts wurde verworfen und das Pellet in ca. 100 μl Fraktionierungspuffer resuspendiert (Fraktion E).

3.5.3.3 Charakterisierung der subzellulären Fraktionen

Die Qualität der Trennung wurde durch die Bestimmung der Aktivitäten sogenannter Markerenzyme verfolgt. Diese Markerenzyme sind die N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (β -AGA, EC 3.2.1.30) sowie die Kathepsine B (EC 3.4.22.1), L (EC 3.4.22.15) und S (EC 3.4.22.27) (kat BLS) für die Lysosomen (Casciola-Rosen und Hubbard, 1991; Schmid et al., 1997) und die Laktatdehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) für das Zytosol (Storrie und Madden, 1990; Schröter et al., 1999). Die spezifische Aktivität der entsprechenden Markerenzyme in den Fraktionen L, E, Z und M werden in μmol umgesetzten Substrats pro Minute und g Protein (U g^{-1}) angegeben. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der subzellulären Fraktionen erfolgte nach 3.3.6.2.

3.5.3.3.1 Bestimmung der N-Acetyl- β -D-Glucosaminidaseaktivität

Zur Bestimmung der β -AGA-Aktivität wurde ein fluorometrischer Test in Anlehnung an Schmid et al. (1993) verwendet. 95 μl Reaktionspuffer (0,1 M NaZitrat-Puffer, pH 5,0, 1% (v/v) NP40, 0,8 mM MU-NAG als Substrat) wurden bei 25°C mit 5 μl der subzellulären Fraktionen in Mikrotiterplatten (Fluotrac™) inkubiert. Die Produktbildung wurde durch Fluoreszenzspektroskopie an einem POLARstar Galaxy Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm kontinuierlich über 60 min verfolgt.

Zur Quantifizierung der Menge an gebildetem Endprodukt wurde aus einer MU-Stammlösung (10 mM MU in 0,5 M Glycin, pH 10,4, 0,5 M NaCl) durch Verdünnung in den Reaktionspuffer (0,1 M NaZitrat-Puffer, pH 5,0, 0,02% (w/v) BSA) eine Eichreihe im Konzentrationsbereich von 10-400 μM MU erstellt.

3.5.3.3.2 Bestimmung der Kathepsinaktivität

Die Bestimmung der kat BLS-Aktivität erfolgte mittels eines fluorometrischen Tests nach Schmid et al. (1997) in 0,1 M NaZitrat-Puffer, pH 5,0, der 4 mM DTT, 0,1% (w/v) BSA, 4 mM EDTA, und 6 μM Aprotinin enthielt, gegenüber dem unspezifischen Substrat 0,5 mM Z-Phe-Arg-AMC (Olbricht et al., 1986). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μl subzellulärer Fraktion zu 95 μl Substratlösung gestartet und nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C durch die Zugabe von E-64 (10 μM im Reaktionsansatz) abgestoppt (Schmid et al., 2002). Vor der Fluoreszenzmessung wurden die Ansätze mit 0,1 M NaZitrat-Puffer, pH 5,0, 200-fach verdünnt. Die Fluoreszenzemission des gebildeten Produkts AMC wurde anschließend an einem POLARstar Galaxy Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 460 nm detektiert (Anregung bei 360 nm). Zur Quantifizierung der Menge an gebildetem Endprodukt wurde aus einer 10 mM AMC-Stammlösung durch Verdünnung in den Reaktionspuffer eine Eichreihe im Konzentrationsbereich 2-20 μM AMC erstellt. Die Herstellung der Stammlösungen von Z-Phe-Arg-AMC (6,25 mM), AMC (10 mM) und E-64 (10 mM) erfolgte in 100% (v/v) DMSO als Lösungsmittel. Die Aktivität der Kathepsine wird bis zu einem Anteil von 25% (v/v) DMSO nicht beeinflusst (Olbricht et al., 1986).

3.5.3.3.3 Bestimmung der Laktatdehydrogenaseaktivität

Die Bestimmung der Aktivität der LDH erfolgte in Anlehnung an Storrie und Madden (1990). Die Aktivität der LDH wurde in einer Mischung aus 150 μl 50 mM KH_2PO_4 , pH 7,5, 0,31 mM NaPyruvat und 5 μl einer 8 mM NADH-Lösung ermittelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μl der jeweiligen subzellulären Fraktion gestartet. Die durch den NADH-Verbrauch verursachte Extinktionsänderung bei 340 nm (Abnahme) wurde an einem UV/VIS-Spektrophotometer (Ultrospec 3000) in einer 1 cm \times 0,2 cm Küvette kontinuierlich über 60 s verfolgt. Die Berechnung der LDH-Aktivität erfolgte unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten für NADH von 6300 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Sponholz und Wunsch, 1980).

3.5.4 Proteolyse in Gegenwart subzellulärer Fraktionen

Die Proteolyseempfindlichkeit der RNase A-Tandemenzym-Varianten wurde sowohl in Fraktion Z als auch in Fraktion L bei 37°C analysiert. Hierfür wurden die subzellulären Fraktionen wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben gewonnen und charakterisiert. Der proteolytische Verdau durch Fraktion Z erfolgte in 10 mM Tris-Acetat-Puffer, pH 7,0, in Gegenwart von 250 mM Saccharose und 2 mM DTT. Die Proteolyse in Gegenwart von Fraktion L wurde in 0,1 M NaZitrat-Puffer, pH 5,0, in Gegenwart von 2 mM DTT durchgeführt. Die identische Zusammensetzung der Proteolyseansätze wurde durch die Verwendung einer spezifischen katalytischen Aktivität der Leitenzyme LDH (2,67 U ml^{-1}) für Fraktion Z bzw. kat BLS (0,03 U ml^{-1}) für Fraktion L im Reaktionsansatz gewährleistet. Dem

bei 37°C vorinkubierten Puffer wurde die entsprechende RNase A-Variante bzw. BSA als Kontrollprotein (0,1 mg ml⁻¹ Endkonzentration) zugesetzt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des entsprechenden Volumens an subzellulärer Fraktion gestartet. Nach definierten Zeitintervallen wurden 15 µl Probe entnommen und mit 5 µl Proteaseinhibitorcocktail (Complete™, Roche Diagnostics, Mannheim) gemischt. Die Proben wurden im Vakuumkonzentrator (SpeedVac®) getrocknet, in Probenpuffer aufgenommen und für die SDS-PAGE (3.3.1) eingesetzt. Nach der Visualisierung der Banden mittels Coomassie R250 erfolgte die densitometrische Evaluierung des Bandenmusters im Elektropherogramm wie unter 3.3.3 beschrieben.

3.5.5 Immunoblotting

3.5.5.1 Immunoblotting zur Quantifizierung der Internalisierung

Jeweils 10 ml einer K562-Zellsuspension mit 0,5-1×10⁶ Zellen ml⁻¹ wurden für 36 h mit 100 µM der monomeren RNase A-Variante (RNase A bzw. G88R-RNase A) oder 50 µM der RNase A-Tandemzym-Variante (SGRSGRSG; SGSGSG, GP₅G, GP₄G bzw. GP₃G) inkubiert. Ein PBS-behandeltes Aliquot dieser Zellen diente als Kontrolle, um mögliche Kreuzreaktivitäten des RNase A-Antikörpers mit intrazellulären RNasen zu detektieren. Nach der Ernte der Aliquots wurde die subzelluläre Fraktionierung wie unter 3.5.3 beschrieben durchgeführt. Für jede subzelluläre Fraktion wurde jeweils die gleiche Menge an Protein (300 ng für Fraktion T, 60 ng für Fraktion E, 25 ng für Fraktion L und 250 ng für Fraktion C) auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (3.3.1).

Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine (60 min bei 1 mA cm⁻²) auf eine Amersham Hybond™-ECL™ Nitrocellulose-Membran (GE Healthcare Europe GmbH, München) mit einer *semi-dry*-Blotapparatur (VWR, Darmstadt) unter Verwendung des Drei-Puffer-Systems. Der Proteintransfer wurde durch Ponceau S-Färbung überprüft. Nach dem Entfärben der Membran durch mehrmaliges Waschen mit PBS erfolgt die Absättigung von unspezifischen Bindestellen für mindestens 1 h in einer Lösung aus 5% (w/v) Magermilchpulver (Oxoid, Wesel) in PBS. Die Bindung der primären Antikörper (polyklonale Anti-RNase A-Antikörper [34 µg ml⁻¹], monoklonale Anti-β-Aktin-Antikörper [2 µg ml⁻¹] bzw. polyklonale Anti-Kathepsin B-Antikörper [10 µg ml⁻¹]) erfolgte in Gegenwart von 2,5% (w/v) Magermilchpulver in PBS für 1 bis 2 h. Vor der Zugabe der Sekundärantikörper wurde mehrmals mit PBS gewaschen. Die Sekundärantikörper waren mit einer Peroxidase (*horse raddish peroxidase*, HRP) gekoppelt und wurden in einer Verdünnung von 1:2500 verwendet. Die Bindung der sekundären Antikörper Anti-*rabbit*-IgG-Peroxidase (Bindungspartner für polyklonale Antikörper) und Anti-*mouse*-IgG-Peroxidase (Bindungspartner für monoklonale Antikörper) erfolgte ebenfalls in Gegenwart von 2,5% (w/v) Magermilchpulver in PBS für 1 h.

Nach mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte die chemiluminometrische Detektion der sekundären Antikörper über die gekoppelte Peroxidase unter Verwendung des ECL-Systems (GE Healthcare, Freiburg) in einem Syngene-Detektionsgerät (Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK) nach Angaben des Herstellers. Die Blots wurden durch Quantifizierung der

Bandenintensitäten unter Verwendung der *Gene-Tools-Software* (Syngene Bio Imaging) semiquantitativ ausgewertet. Als interner Standard für den exakten Abgleich der detektierten Banden wurde β -Aktin (43 kDa) für die subzellulären Fraktionen T und C bzw. Kathepsin B (25 kDa) für die subzellulären Fraktionen E and L verwendet.

3.5.5.2 Immunoblotting zur Analyse der intrazellulären Stabilität

Jeweils 5 ml einer K562-Zellsuspension mit $0.5-1 \times 10^6$ Zellen ml^{-1} wurden für 12-54 h mit $50 \mu\text{M}$ GP₃G-RNase A-Tandemenzym inkubiert. Nach der Ernte der Aliquots wurden die Zellen homogenisiert und zentrifugiert (3.5.3.1), um Fraktion T zu erhalten. Für jeden Zeitpunkt wurde jeweils die gleiche Menge an Protein (100 ng) auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen (3.3.1) und elektrophoretisch getrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Amersham Hybond™-ECL™ Nitrocellulose-Membran transferiert und wie unter 3.5.5.1 beschrieben visualisiert und quantifiziert.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Design der RNase A-Tandemenzyme

4.1.1 Rationales Design

Während *in vitro*-Studien mit kultivierten Tumorzellen klar zeigen, dass RNase A keine nachweisbare zytotoxische Wirkung vermittelt (Leland et al., 1998b), zeigt die dimere BS-RNase (2.3.2.1) eine deutliche Antitumoraktivität (Lee und Raines, 2005). Dies wurde vornehmlich dem Umstand zugeschrieben, dass das Dimer aufgrund sterischer Abschirmung nicht vom RI gebunden werden kann (Murthy et al., 1996). Unter physiologischen Bedingungen dissoziieren diese Dimere jedoch mit einer Halbwertszeit von 3,3 h (Antignani et al., 2001) in RI-sensitive Monomere.

Durch die Fusion zweier RNase A-Moleküle über einen proteinogenen Linker sollte es möglich sein, ein der dimeren Struktur der BS-RNase ähnliches Konstrukt zu generieren, bei dem maximal eine RNase A-Einheit durch RI gebunden wird, die andere jedoch aus sterischen Gründen nicht gebunden werden kann und damit ribonukleolytisch aktiv bleibt. Das auf diese Weise erzeugte, sogenannte Tandemenzym sollte daher intrazellulär in Gegenwart von RI aktiv sein, durch die Hydrolyse von RNA zytotoxisch wirken und somit ein potentiell Antitumortherapeutikum darstellen.

4.1.2 Linkersequenzen

Durch die Untersuchung der Eigenschaften von natürlich vorkommenden *inter-domain-linker*-Sequenzen konnte eine Linkerdatenbank erstellt werden (George und Heringa, 2002). Dies ermöglicht ein rationales Linkerdesign. Grundsätzlich gibt es zwei Arten von Linkern: helikale und nicht-helikale Linker. Als Distanzstücke (*spacer*) trennen Linker Proteindomänen voneinander, sie fungieren als Gerüst, um unvorteilhaften Interaktionen zwischen mehreren Faltungsdomänen vorzubeugen. Die bevorzugte Aminosäure in diesen Linkersequenzen ist Prolin (George und Heringa, 2002) neben Threonin, Serin, Aspartat und Glycin (Argos, 1990). Sind die *inter-domain-linker* in natürlich vorkommenden Proteinen an der äußeren Oberfläche exponiert, so enthalten sie viele hydrophile Aminosäurereste.

Die Auswahl der Linkersequenzen für die Generierung der RNase A-Tandemenzyme erfolgte nach zwei Kriterien: einerseits sollte der Linker kurz genug sein, um die Bindung eines zweiten RI-Moleküls an das Tandemenzym sterisch zu unterbinden, andererseits war eine ausreichende Länge erforderlich, um bei beiden RNase A-Einheiten des Konstrukts eine korrekte Faltung zu ermöglichen. Nur durch die korrekte Faltung beider RNase A-Einheiten ist deren Stabilität und Aktivität gesichert, so dass nach Bindung einer RNase A-Einheit an den RI die andere Einheit weiterhin katalytische Aktivität besitzen und dadurch zytotoxische Effekte vermitteln kann.

Aus den Daten von 638 *multidomain*-Proteinketten wurden 1280 mögliche Linkersequenzen abgeleitet (George und Heringa, 2002). Diese Linker haben eine

durchschnittliche Länge von $10 \pm 5,8$ Aminosäureresten. Für die Herstellung der RNase A-Tandemenzyme wurde zunächst eine Linkerlänge von 6 bzw. 8 Aminosäureresten gewählt: **(I)** SGSGSG, **(II)** SGRSGRSG bzw. **(III)** GP₆G, die nachfolgend schrittweise modifiziert wurde. Die Aminosäuresequenz von Linker **(I)** wird häufig verwendet (Newton et al., 1996) und sollte aufgrund ihrer Flexibilität die Faltung beider RNase A-Einheiten ermöglichen. Durch die Einführung zweier Argininreste in diese Sequenz (Linker **(II)**) wurde zum einen die Linkerlänge variiert und zum anderen sollte durch die beiden zusätzlichen positiven Ladungen die elektrostatische Abstoßung der beiden kationischen RNase A-Einheiten gefördert und demzufolge die autonome Faltung derselben begünstigt werden. Linker **(III)** enthält neben den zwei als „Gelenk“ fungierenden Glycinresten 6 Proline. Im Gegensatz zu allen anderen natürlichen Aminosäuren liegt die Aminogruppe hier als Iminogruppe vor. Somit steht kein Amid-Wasserstoff als Donor einer Wasserstoffbrückenbindung zur Verfügung und Prolin kann nicht in die reguläre Sekundärstruktur von α -Helix oder β -Faltblatt eingebaut werden. Polyprolin kann jedoch in zwei verschiedenen Helixstrukturen vorkommen. Die Polyprolin-Typ I-Helix (PPI) ist eine rechtsgängige Helix, bei der alle Prolinreste die *cis*-Konfiguration aufweisen (Creamer und Campbell, 2002). Solche helikalen Segmente konnten jedoch noch nicht in Proteinen nachgewiesen werden, da Poly-L-Prolinreste meist nur in unpolaren Lösungsmitteln in dieser Konformation vorliegen können. Die Polyprolin-Typ II-Helix (PPII) ist dagegen eine linksgängige Helix, deren Konformation der eines Kollagen-Einzelstrangs ähnelt (Creamer und Campbell, 2002). PPII-Helices wurden in einer Vielzahl von Proteinen nachgewiesen. PPII-Segmente sind kürzer und flexibler als α -helikale Segmente, da stabilisierende Effekte durch intramolekulare Wasserstoffbrücken fehlen. Diese helikalen Segmente sind häufig an der Proteinoberfläche exponiert. Der GP₆G-Linker liegt somit vermutlich in der PPII-Konformation vor; seine „Stabform“ sollte dem Tandemenzym eine „hantelförmige“ Struktur verleihen und so die beiden RNase A-Einheiten räumlich voneinander trennen.

4.1.3 Klonierungsstrategie

Für die Herstellung der Plasmide zur Expression der RNase A-Tandemenzym-Varianten SGRSGRSG, SGSGSG und GP₆G fand eine mehrstufige PCR zur Genverdopplung Anwendung (Abb. 9). Als Ausgangsmaterial dieser PCR diente das im pET26b(+)-Vektor enthaltene *mase A*-Gen, das freundlicherweise von Dr. Jens Köditz zur Verfügung gestellt wurde. Das Primerdesign (3.2.2, Tabelle 1) erfolgte auf Grundlage der bekannten Sequenz des *mase A*-Gens mit dem Programm GENE RUNNER (Spruyt und Buquicchio, 1994) unter Berücksichtigung der *codon usage* des Empfängerorganismus (*E. coli*). Durch einen ersten PCR-Ansatz wurde unter Verwendung des T7-Promotor-Primers und des entsprechenden Linker-Primers ein Produkt amplifiziert, das die Linkersequenz am 3'-Ende des *mase A*-Gens trägt. Der Einsatz des T7-Terminator-Primers und des komplementären Linker-Primers führte in einer weiteren PCR zu einem Produkt, das die entsprechende Linkersequenz vor dem 5'-Ende des *mase A*-Gens enthält. Die Produkte dieser beiden PCR-Reaktionen wurden nach einer

Agarosegelelektrophorese (3.2.1.3) isoliert (3.2.1.4) und als Ausgangsmaterial für eine dritte PCR (Auffüllreaktion; 3.2.2) eingesetzt. Das eingesetzte Ausgangsmaterial ist im Bereich der Linkersequenz zueinander komplementär. Durch Einsatz von T7-Promotor- und T7-Terminator-Primer konnte dieses aus zwei *rnase A*-Genen bestehende Produkt amplifiziert und nach Agarosegelelektrophorese (3.2.1.3) isoliert (3.2.1.4) werden. Dieses finale PCR-Produkt wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Nde*I verdaut (3.2.1.5) und in einen gleichermaßen verdauten und dephosphorylierten pET26b(+)-Vektor ligiert (3.2.1.6). Der Nachweis der korrekten Gensequenz positiver Klone erfolgte mittels DNA-Sequenzierung der Plasmid-DNA (3.2.1.7).

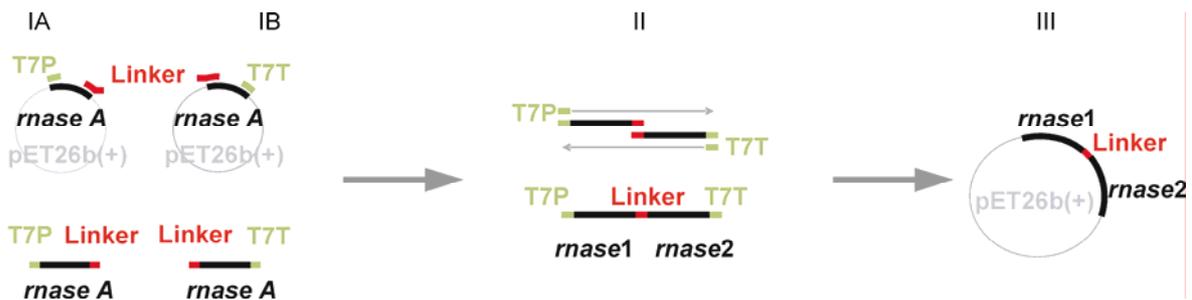


Abb. 9: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der RNase A-Tandemzym-Varianten

Ausgehend vom *rnase A*-Gen (■) im pET26b(+)-Vektor wurde in einem ersten PCR-Ansatz unter Verwendung des T7-Promotor-Primers (T7P, ■) und des entsprechenden Linker-Primers (■) ein Produkt amplifiziert (IA), das die entsprechende Linkersequenz am 3'-Ende des *rnase A*-Gens trägt. Der Einsatz des T7-Terminator-Primers (T7T, ■) und des komplementären Linker-Primers (■) führte in einer zweiten PCR zu einem Produkt, das die entsprechende Linkersequenz vor dem 5'-Ende des *rnase A*-Gens enthält (IB). Durch die Kombination dieser beiden PCR-Produkte konnte in einer abschließenden PCR unter Verwendung von T7-Terminator- und T7-Promotor-Primer ein aus zwei *rnase A*-Genen bestehende Produkt amplifiziert (II) und in den pET26b(+)-Vektor inseriert (III) werden (3.2.2).

Ausgehend von den Genen der SGSGSG-, SGRSGRSG- und GP₆G-RNase A-Tandemzym-Varianten wurde deren Linkersequenz schrittweise modifiziert (3.2.3; Tabelle 4). Dabei diente das amplifizierte Produkt aus der entsprechenden Modifizierungsreaktion in der nachfolgenden *QuikChange*-Reaktion als genetisches Ausgangsmaterial. Tabelle 5 zeigt die Linkersequenzen der hergestellten RNase A-Tandemzyme.

Tabelle 5: Linkersequenzen der RNase A-Tandemzyme

SG-Linkervarianten	SGR-Linkervarianten	P-Linkervarianten
(SG) ₃ S	SGRSGRSG	GP ₆ G
(SG) ₃	SGSGRSG	GP ₅ G
	SGSRSG	GP ₄ G
	SGRSG	GP ₃ G
		GP ₂ G

4.2 Herstellung und Charakterisierung der RNase A-Tandemenzyme

4.2.1 Expression, Renaturierung und Reinigung

4.2.1.1 Expression

Für die Expression der Gene der RNase A-Tandemenzyme wurde die jeweils entsprechende, in das pET26b(+)-Plasmid insertierte Sequenz in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21 (DE3) transformiert (3.2.4.2.2). Die Expression wurde wie unter 3.3.4.1 beschrieben durchgeführt. Das Auftreten der Bande zwischen den 30 und 45 kDa-Markerproteinen in Bahn 2 der Abb. 10 zeigt deutlich die Überexpression des *rnase A-tandemenzym*-Gens nach der Induktion durch IPTG. Der hohe Anteil an polaren Aminosäuren in der RNase A bedingt die geringe SDS-Beladung des Enzyms (Arnold et al., 1998). Daraus folgt ein etwas verändertes Laufverhalten der RNase A-Tandemenzyme in der SDS-PAGE. Die RNase A-Tandemenzyme erscheinen im Gel größer (> 30 kDa), als ihr Molekulargewicht (27,7-28,2 kDa) erwarten lässt (Abb. 10).

4.2.1.2 Isolierung der *inclusion bodies* und Renaturierung

Trotz der Signalsequenz pelB (Pektatlyase aus *Erwinia carotovora*) am N-Terminus der RNase A-Tandemenzyme werden die Proteine nicht in löslicher Form ins Periplasma sezerniert. Der Hauptteil des Proteins befindet sich nicht in der periplasmatischen Fraktion, sondern wie bei RNase A in der unlöslichen Fraktion des Gesamtzellaufschlusses (Ribo et al., 1996). Die starke Basizität der RNase A erschwert ihren Durchtritt durch die Zytoplasmamembran (Yamane und Mizushima 1988). Die starke Expression der Gene (hervorgerufen durch den T7-Promotor) führt zur Entstehung von *inclusion bodies* im Zytoplasma. Die Isolierung der *inclusion bodies* wurde entsprechend Abschnitt 3.3.4.2 durchgeführt. Abb. 10 zeigt die Präparation der *inclusion bodies* am Beispiel des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms. Aus Abb. 10 ist ersichtlich, dass sich in der löslichen Proteinfraction (Bahn 4) kein RNase A-Tandemenzym befindet. Die isolierten *inclusion bodies* (Bahn 5) weisen nicht die in der Literatur allgemein beschriebene Reinheit von 80-90% auf (Lilie et al., 1998). Bei der Dialyse der solubilisierten *inclusion bodies* (3.3.4.3) gegen Essigsäure trat eine starke Präzipitatbildung auf. Bei RNase A handelt es sich dabei ausschließlich um Wirtsproteine und nicht um das Zielprotein. Im Falle der RNase A-Tandemenzyme präzipitiert allerdings neben den Wirtsproteinen auch eine große Menge an Zielprotein. Jedoch befindet sich noch eine ausreichende Menge an Zielprotein im Überstand, so dass die Dialyse gegen Essigsäure angewendet und als erster effektiver Reinigungsschritt genutzt werden kann. Die anschließende Renaturierung wurde wie unter 3.3.4.4 beschrieben durchgeführt.

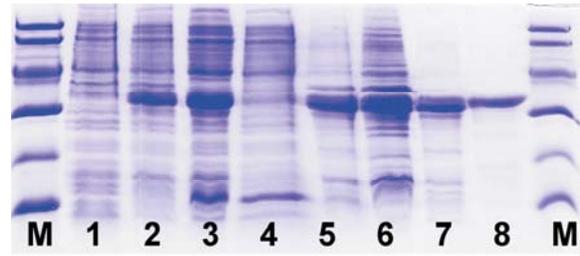


Abb. 10: SDS-PAGE-Gel über den Verlauf der Expression, der Präparation der *inclusion bodies* und der Renaturierung am Beispiel des SGRSGRSG-RNase A-Tandemzyms.

M: LMW-Proteinmarker, **1:** Zellen vor der Induktion mit IPTG, **2:** Zellen 3 h nach der Induktion mittels IPTG, **3:** Probe nach Zellaufschluss, **4:** lösliche Proteinfraction, **5:** *inclusion bodies*, **6:** Proteinpellet nach der Dialyse gegen 20 mM Essigsäure, **7:** Überstand (lösliches Protein) nach der Dialyse gegen 20 mM Essigsäure, **8:** renaturiertes SGRSGRSG-RNase A-Tandemzym.

4.2.1.3 Reinigung

Zur Reinigung der renaturierten (3.3.4.4) und konzentrierten (3.3.4.5) Proteine wurde eine Kationenaustauschchromatographie wie unter 3.3.4.6 beschrieben durchgeführt. Der isoelektrische Punkt (pI) der RNase A liegt bei pH 9,2 (Raines, 1998) und auch nach der Fusion zweier Moleküle war eine Reinigung durch Kationenaustauschchromatographie möglich (Abb. 11). Nach 2-facher Reinigung mittels Kationenaustauschchromatographie waren die RNase A-Tandemenzyme sowohl chromatographisch (Abb. 11B) als auch elektrophoretisch (Abb. 12) rein, wodurch auf weitere Reinigungsschritte verzichtet werden konnte.

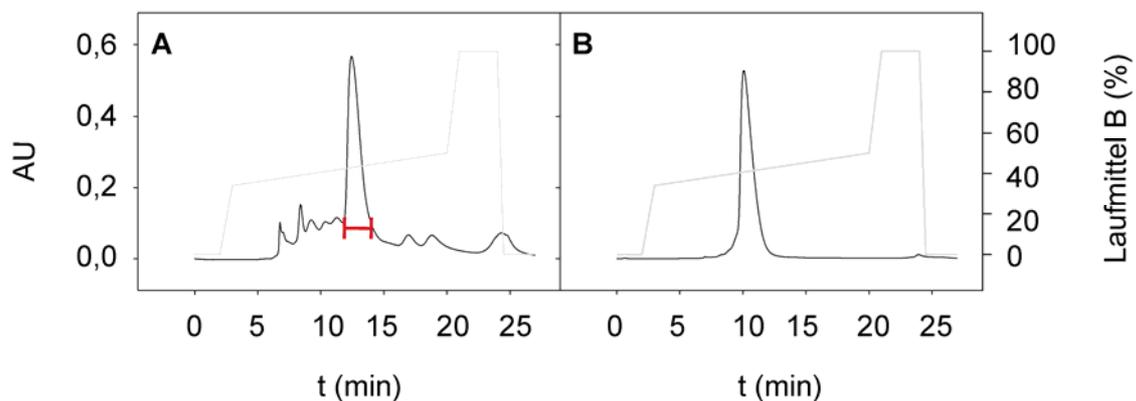


Abb. 11: Kationenaustauschchromatogramme des SGRSGRSG-RNase A-Tandemzyms

Die Reinigung der RNase A-Tandemenzyme erfolgte wie unter 3.3.4.6 beschrieben. **A:** Chromatogramm des renaturierten SGRSGRSG-RNase A-Tandemzyms, **B:** Chromatogramm der manuell gesammelten Fraktion (—) nach Rechromatographie, (—): prozentualer Anteil von Laufmittel B im Elutionspuffer.

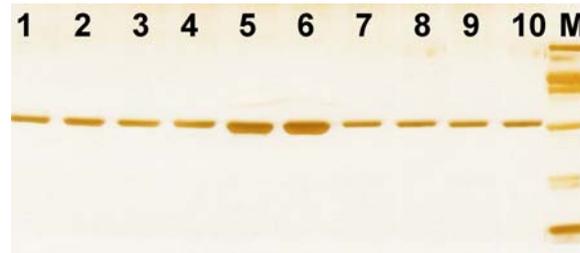


Abb. 12: SDS-PAGE der mittels Kationenaustauschchromatographie gereinigten RNase A-Tandemenzym-Varianten

1: GP₆G, **2:** GP₅G, **3:** GP₄G, **4:** GP₃G, **5:** GP₂G, **6:** SGSGSG, **7:** SGRSGRSG, **8:** SGSGRSG, **9:** SGSRSG, **10:** SGRSG, **M:** LMW-Proteinmarker.

Die derart gereinigten Enzyme konnten somit für die folgenden proteinchemischen Untersuchungen eingesetzt werden. Die Gesamtausbeute pro Liter Kultivierungsmedium lag für alle RNase A-Tandemenzym-Varianten bei mindestens 10 mg. Diese Werte liegen deutlich unter dem in der Literatur angegebenen Wert (45-50 mg pro Liter Kultur) für RNase A (deCardayré et al., 1995), waren aber für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ausreichend.

4.2.2 Struktur- und Stabilitätsuntersuchungen

4.2.2.1 CD-Spektroskopie

Für die verschiedenen RNase A-Tandemzym-Varianten und für RNase A wurden CD-Spektren im Nah- und Fern-UV-Bereich (3.4.2) aufgenommen. Damit sollte der Einfluss der Aminosäuresequenz und der Linkerlänge auf die Struktur der RNase A-Einheiten untersucht werden. Alle RNase A-Tandemzym-Varianten zeigten eine von der Linkersequenz unabhängige RNase A-ähnliche Tertiär- und Sekundärstruktur (Abb. 13).

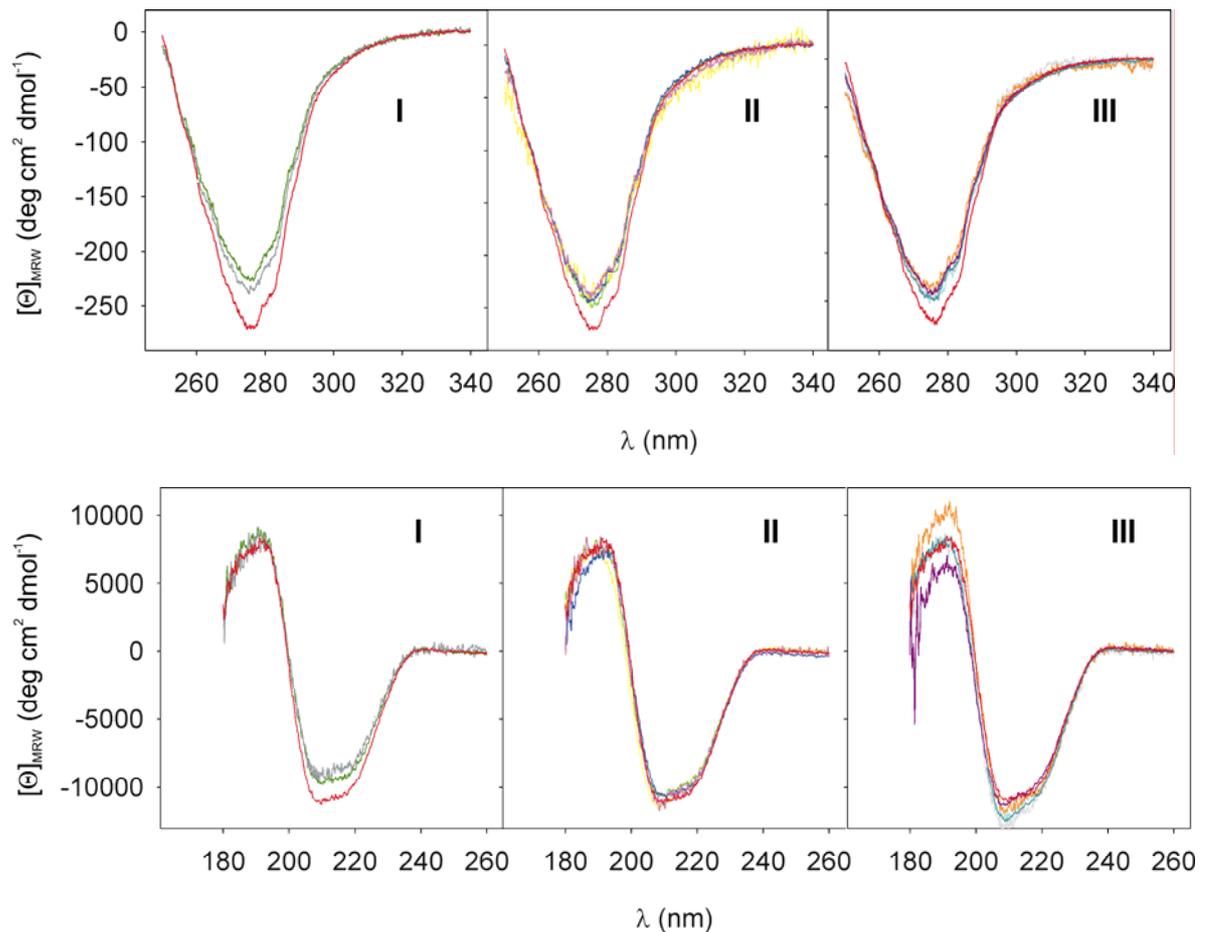


Abb. 13: Nah- und Fern-UV-CD-Spektren von RNase A und ihren Tandemzym-Varianten

Die CD-Spektren von RNase A (—) und ihren Tandemzym-Varianten im Nah-UV-Bereich (**oben**) und im Fern-UV-Bereich (**unten**) wurden bei 20°C in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, bei einer Proteinkonzentration von 1,0 mg ml⁻¹ wie unter 3.4.2.1 beschrieben aufgenommen.

I: SG-Linkervarianten: (SG)₃S (—) und (SG)₃ (—); **II:** SGR-Linkervarianten: SGRSGRSG (—), SGSGRSG (—), SGRSRSG (—) und SGRSG (—); **III:** P-Linkervarianten: GP₆G (—), GP₅G (—), GP₄G (—), GP₃G (—) und GP₂G (—).

4.2.2.2 Aktivität

Neben der CD-Spektroskopie ist die Aktivitätsmessung eine sehr sensitive Methode, um Störungen in der nativen Struktur zu identifizieren. Während die CD-Spektroskopie eher globale Strukturänderungen detektiert, kann die Aktivität bereits durch kleinste lokale Veränderungen beeinflusst werden. Daher wurde die Aktivität der erzeugten RNase A-Tandemenzym-Varianten gegenüber AUAA (Kelemen et al., 1999) und Hefe-RNA (3.3.7) als Substrate bestimmt. Die unter Verwendung des niedermolekularen Substrats AUAA ermittelten $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte sind in Tabelle 6 aufgelistet. Der für die RNase A bestimmte $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $(5,3 \pm 0,4) \times 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ liegt etwas höher als der von Kelemen et al. (1999) ermittelte Wert von $(3,6 \pm 0,4) \times 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Es zeigte sich, dass alle RNase A-Tandemenzym-Varianten katalytische Aktivität besitzen, jedoch reduzierte die Tandemisierung die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte der RNase A-Tandemenzym-Moleküle für das verwendete niedermolekulare Substrat im Vergleich zur RNase A um ein bis zwei Größenordnungen (Tabelle 6). Die RNase A-Tandemenzyme mit den SGR-Linkern und dabei besonders das SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym zeigen dabei eine deutlich geringere Aktivität als die Varianten mit den P-Linkern (Tabelle 6). Ursache für diese geringe Aktivität ist offenbar eine sterische Behinderung der katalytischen Zentren, da nach der vollständigen proteolytischen Spaltung (Trypsin) der SGRSGRSG-Linkersequenz (3.3.10) im Tandemenzym die Aktivität für monomere RNase A detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Neben dem Aktivitätstest mit dem niedermolekularen AUAA als Substrat wurde die Aktivität der verschiedenen RNase A-Varianten auch gegenüber Hefe-RNA als Substrat ermittelt (Tabelle 6). Die RNase A-Tandemenzyme besitzen dabei im Vergleich mit monomerer RNase A eine relative Aktivität von 50-90% (bezogen auf die RNase A-Einheiten). Wiederum weist auch hier das SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym die niedrigste katalytische Aktivität auf.

4.2.2.3 Thermodynamische Stabilität

4.2.2.3.1 Temperaturinduzierte Entfaltung

Um den Einfluss der Kopplung der beiden RNase A-Einheiten, der Linkerlänge und der Aminosäuresequenz des Linkers auf die thermodynamische Stabilität zu untersuchen, wurden temperaturinduzierte Übergangskurven der RNase A-Tandemenzym-Varianten mittels CD-Spektroskopie wie unter 3.4.2.2 beschrieben aufgenommen. Die erhaltenen Übergangskurven wurden zur Bestimmung von T_{m} (Tabelle 6) sowie zur Berechnung des Anteils an nativem Protein (f_{N}) genutzt (Abb. 14).

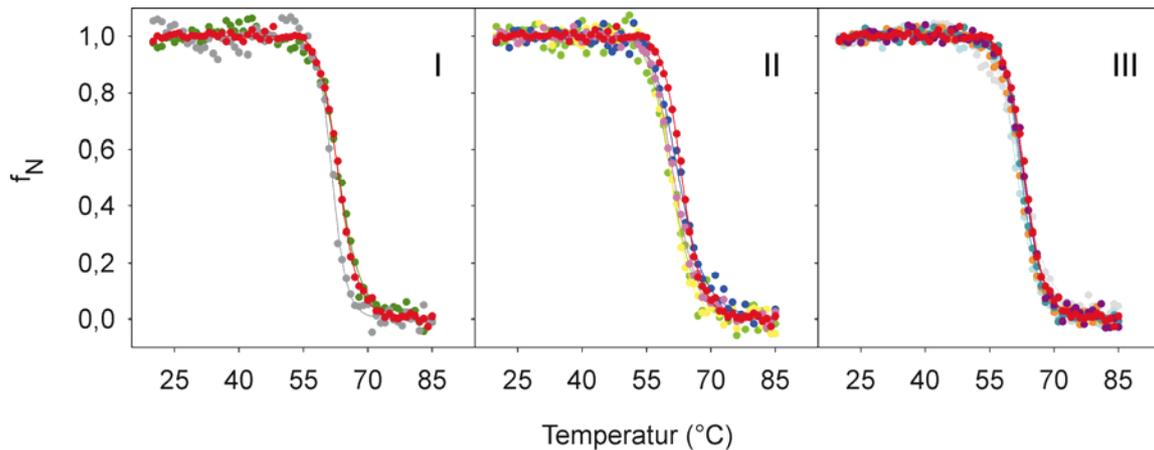


Abb. 14: Temperaturinduzierte Übergangskurven von RNase A und ihren Tandemenzym-Varianten

Die temperaturinduzierten Übergangskurven von RNase A (—) und ihren Tandemenzym-Varianten wurden in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, wie unter 3.4.2.2 beschrieben mittels CD-Spektroskopie bei einer Proteinkonzentration von $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ aufgenommen. Der Anteil an nativem Protein (f_N) wurde aus der Änderung des CD-Signals bei 278 nm in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt.

I: SG-Linkervarianten: $(\text{SG})_3\text{S}$ (—) und $(\text{SG})_3$ (—); **II:** SGR-Linkervarianten: SGRSGRSG (—), SGSGRSG (—), SGRSG (—) und SGRSG (—); **III:** P-Linkervarianten: GP_6G (—), GP_5G (—), GP_4G (—), GP_3G (—) und GP_2G (—).

Die Temperatur des Übergangsmittelpunktes T_m liegt für alle RNase A-Tandemenzym-Varianten und für monomere RNase A in einem Bereich von $(62,1 \pm 1,3)^\circ\text{C}$ (Tabelle 6). Somit wird die temperaturinduzierte Entfaltung der RNase A-Moleküle weder durch die Kopplung noch durch die Aminosäurekomposition oder Länge des Linkers wesentlich beeinflusst.

4.2.2.3.2 Denaturansinduzierte Entfaltung

Neben den temperaturinduzierten Übergangskurven wurden GdnHCl-induzierte Übergangskurven der RNase A-Tandemenzym-Varianten wie unter 3.4.3 beschrieben aufgenommen. Zur Aufnahme der Übergangskurven wurde die Wellenlänge des Maximums des Fluoreszenzemissionsdifferenzspektrums zwischen nativem und denaturiertem Protein (303 nm) verwendet. Aus diesen Übergangskurven wurden die GdnHCl-Konzentrationen am Übergangsmittelpunkt $[\text{D}]_{50\%}$ sowie der Anteil an nativem Protein (f_N) bestimmt (Abb. 15).

Analog zur temperaturinduzierten Entfaltung liegen die $[\text{D}]_{50\%}$ -Werte für RNase A und alle RNase A-Tandemenzym-Varianten in einem sehr engen Bereich von $(2,9 \pm 0,1) \text{ M}$ (Tabelle 6). Die thermodynamische Stabilität der RNase A-Tandemenzym-Varianten entspricht der von RNase A. Somit wird durch die Kopplung und die Art des Linkers die thermodynamische Stabilität der RNase A-Tandemenzyme nicht beeinträchtigt.

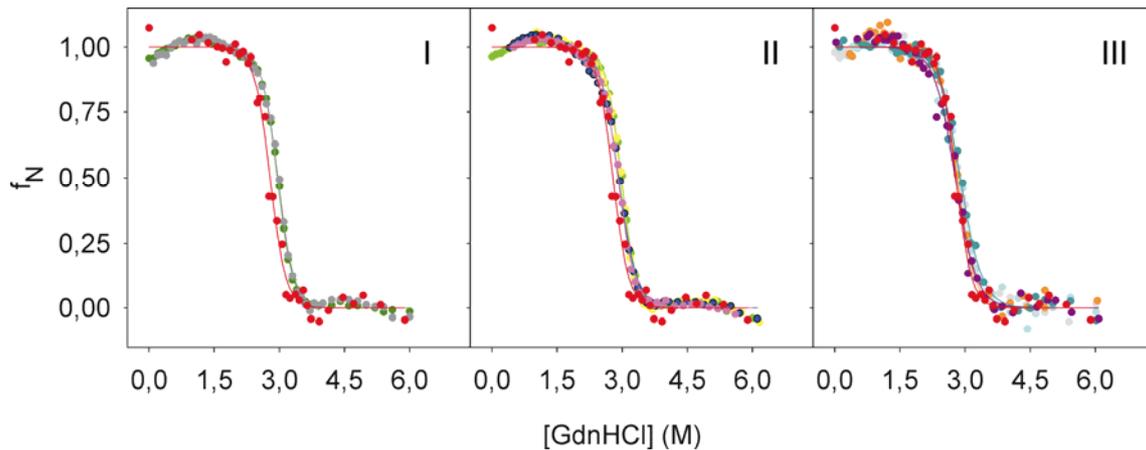


Abb. 15: GdnHCl-induzierte Übergangskurven von RNase A und ihren Tandemenzym-Varianten

Die GdnHCl-induzierten Übergangskurven von RNase A (—) und ihren Tandemenzym-Varianten wurden bei einer Proteinkonzentration von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ bei 25°C in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, wie unter 3.4.3 beschrieben mittels Fluoreszenzspektroskopie aufgenommen. Der Anteil an nativem Protein (f_N) wurde aus der Änderung des Fluoreszenzsignals bei 303 nm (Anregung bei 278 nm) in Abhängigkeit von der GdnHCl-Konzentration bestimmt.

I: SG-Linkervarianten: $(\text{SG})_3\text{S}$ (—) und $(\text{SG})_3$ (—); **II:** SGR-Linkervarianten: SGRSGRSG (—), SGSGRSG (—), SGRSRSG (—) und SGRSG (—); **III:** P-Linkervarianten: GP_6G (—), GP_5G (—), GP_4G (—), GP_3G (—) und GP_2G (—).

4.2.2.4 Zytotoxizität

RNase A vermittelt *in vitro* keine zytotoxischen Effekte (Matoušek et al., 2003a). Dagegen weisen die bisher untersuchten Antitumor-RNasen wie ONC, G88R-RNase und BS-RNase IC_{50} -Werte von $0,5 \mu\text{M}$, $7 \mu\text{M}$ bzw. $1,3 \mu\text{M}$ auf (Leland et al., 1998b; Lee und Raines, 2005). Die Fähigkeit der RNase A-Tandemenzym-Varianten, Krebszellen zu töten, wurde ebenfalls durch Zellkulturexperimente untersucht. Dabei wurden die Zellen, wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben, mit der jeweiligen RNase A-Tandemenzym-Variante in Konzentrationen von $0,01 \mu\text{M}$ bis $200 \mu\text{M}$ für 44 h bei 37°C inkubiert, bevor der Einbau von [*Methyl*- ^3H]-Thymidin in neu synthetisierte DNA untersucht wurde. Aus den gewonnenen Daten (Abb. 16) wurden die IC_{50} -Werte der einzelnen Varianten bestimmt (Tabelle 6). Abb. 16 macht deutlich, dass alle RNase A-Tandemenzym-Varianten die Proliferation der K562-Zellen unterbinden. Die IC_{50} -Werte liegen in einem Bereich von $12,9 \mu\text{M}$ für das SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym bis $70,3 \mu\text{M}$ für das GP_3G -Tandemenzym. Das SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym konnte somit trotz der verminderten katalytischen Aktivität die Proliferation der K562-Zellen mit einem IC_{50} -Wert von $12,9 \mu\text{M}$ am effizientesten unterdrücken. Vermutlich wird die zytotoxische Potenz dieser RNase A-Tandemenzym-Variante durch die zusätzlichen Arginine im Linker erhöht, da diese eine verbesserte Interaktion mit den negativ geladenen Zelloberflächen bewirken können (Fuchs und Raines, 2004; 2005; Fuchs et al., 2007).

Tabelle 6: Stabilitätsparameter, katalytische Aktivität und Zytotoxizität der RNase A und ihrer Tandemenzym-Varianten

RNase A- Variante*	$[D]_{50\%}$ (M)	T_m (°C)	k_{cat}/K_M ($\times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) (gegenüber AUAA als Substrat)	relative Aktivität (%) (gegenüber Hefe-RNA als Substrat)	IC ₅₀ (μM)
RNase A	$2,8 \pm 0,1$	$63,3 \pm 0,1$	$53,0 \pm 3,9$	$100,0^{**} \pm 12,8$	n.d.
GP ₆ G	$2,9 \pm 0,1$	$61,5 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,5$	$75,7 \pm 8,1$	$37,9 \pm 2,0$
GP ₅ G	$2,8 \pm 0,1$	$62,5 \pm 0,5$	$3,7 \pm 0,5$	$73,9 \pm 6,4$	$21,9 \pm 1,3$
GP ₄ G	$2,8 \pm 0,1$	$62,0 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,5$	$90,5 \pm 10,3$	$20,3 \pm 1,2$
GP ₃ G	$2,9 \pm 0,1$	$62,5 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,5$	$81,6 \pm 4,9$	$70,3 \pm 5,0$
GP ₂ G	$2,8 \pm 0,1$	$63,0 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,3$	$69,1 \pm 6,7$	$28,0 \pm 1,0$
SGRSGRSG	$2,9 \pm 0,1$	$60,8 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,1$	$47,8 \pm 9,9$	$12,9 \pm 0,5$
SGSGRSG	$3,0 \pm 0,1$	$60,8 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$	$76,9 \pm 8,4$	$31,6 \pm 3,1$
SGSRSG	$2,9 \pm 0,1$	$62,5 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,1$	$82,5 \pm 2,7$	$31,7 \pm 2,5$
SGRSG	$2,9 \pm 0,1$	$61,4 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$	$66,5 \pm 5,6$	$27,7 \pm 2,0$
(SG) ₃	$3,0 \pm 0,1$	$61,8 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,3$	$62,3 \pm 8,1$	$40,0 \pm 1,1$
(SG) ₃ S	$3,0 \pm 0,1$	$63,4 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,1$	$58,8 \pm 9,8$	n.d.

Die Stabilitätsparameter wurden aus den temperatur- und GdnHCl-induzierten Übergangskurven ermittelt. Die Aktivitätsmessungen wurden sowohl mit AUAA (k_{cat}/K_M) als auch mit Hefe-RNA (relative Aktivität) als Substrat durchgeführt. Da jedes RNase A-Tandemenzym aus zwei RNase A-Einheiten besteht, wurde die Aktivität zum besseren Vergleich mit monomerer RNase A auf die einzelnen RNase A-Einheiten bezogen angegeben. Die Zytotoxizität wurde an K562-Zellen getestet.

* Es handelt sich außer bei RNase A um RNase A-Tandemenzym-Varianten.

** entspricht $63,6 \pm 8,2 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$

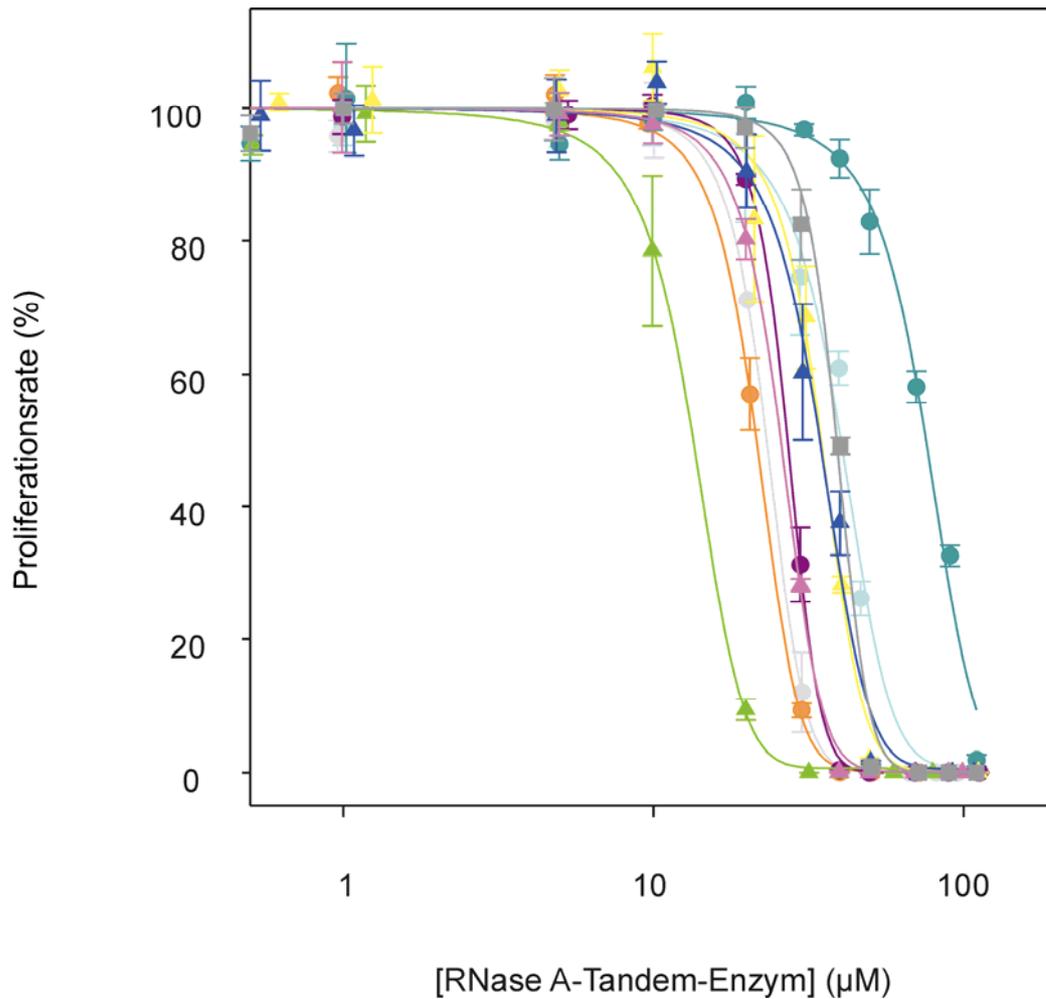


Abb. 16: Zytotoxische Aktivität der RNase A-Tandemenzym-Varianten

Die Zelllinie K562 wurde für 44 h mit verschiedenen Konzentrationen der RNase A-Tandemenzym-Varianten inkubiert. Nach einem sich anschließenden 4 h-Puls mit [*Methyl*-³H]-Thymidin, wurde dessen Einbau in neu synthetisierte DNA unter Verwendung eines Flüssigscintillationszählers bestimmt (3.5.2).

SG-Linkervarianten: (SG)₃ (—), **SGR-Linkervarianten:** SGRSGRSG (—), SGSGRSG (—), SGRSG (—) und SGRSG (—) und **P-Linkervarianten:** GP₆G (—), GP₅G (—), GP₄G (—), GP₃G (—) und GP₂G (—).

4.2.2.5 Zusammenfassung

Bereits in früheren Publikationen wurden vier essentiellen Eigenschaften als Grundvoraussetzung für die zytotoxische Wirkung einer RNase herausgearbeitet (Leland et al., 1998b; Haigis und Raines, 2003; Bosch et al., 2004; Libonati und Gotte, 2004; Leich et al., 2006). Die RNasen müssen bei physiologischen Temperaturen stabil sein, um Inaktivierung, Entfaltung und proteolytischem Verdau zu widerstehen (**I**). Da die zytotoxischen Effekte innerhalb der Zelle ausgelöst werden, müssen die RNasen das Zytosol der Zielzelle erreichen, das heißt sie müssen internalisiert und ins Zytosol freigesetzt werden (**II**). Die RNasen vermitteln ihre zytotoxischen Eigenschaften durch den Abbau zellulärer RNA und müssen demnach katalytisch aktiv sein (**III**). Die intrazelluläre

katalytische Aktivität ist zudem nur dann gewährleistet, wenn die RNasen der Bindung an und damit der Inaktivierung durch den zytosolischen RI entgehen (**IV**).

Zur Aufklärung der Frage, ob die RNase A-Tandemenzyme diese vier für eine zytotoxische Wirkung essentiellen Voraussetzungen in ausreichendem Maß erfüllen, wurde zunächst die Struktur und die Stabilität der RNase A-Tandemenzym-Varianten untersucht. Sowohl die temperaturinduzierten Übergangskurven (Abb. 14, Tabelle 6) mit T_m -Werten von $(62,1 \pm 1,3)^\circ\text{C}$ als auch die Ergebnisse der Aktivitätstests (Tabelle 6) beweisen den Erhalt der nativen Struktur bei physiologischen Temperaturen. Die Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Aktivitätstests beruhen vermutlich auf den spezifischen Eigenschaften der beiden verwendeten Substrate. Offensichtlich verschlechtert die Tandemisierung die Bindung des kleineren Fluoreszenzsubstrats an die RNase A-Einheiten durch sterische Effekte. Hingegen wird die Spaltung des großen RNA-Substrats, das durch mehrere Bindungsstellen gebunden wird (Raines, 1998), durch die Tandemisierung kaum beeinflusst. Ein ähnliches Verhalten konnte auch für die *domain-swapped* RNase A-Dimere festgestellt werden, die ebenfalls RNase A-ähnliche Aktivität gegenüber hochmolekularen Substraten besitzen (Sorrentino et al., 2000), aber nur 30% der RNase A-Aktivität gegenüber Cytidylyl-3',5'-Adenosin (CpA) als Substrat aufweisen (Naddeo et al., 2005). Trotz der im Vergleich zur ONC (IC_{50} -Wert = $0,5 \mu\text{M}$) um vier bis fünf Größenordnungen höheren katalytischen Aktivität (Boix et al., 1996) sind die RNase A-Tandemenzyme weniger zytotoxisch (Tabelle 6) als ONC. Dennoch offenbart der Zytotoxizitätstest im Vergleich zur nicht zytotoxischen RNase A für die RNase A-Tandemenzyme eine ausgeprägte biologische Aktivität. Interessanterweise zeigte das SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym, das in beiden Aktivitätstests die niedrigste Aktivität besitzt, die höchste zytotoxische Wirkung (Tabelle 6). Augenscheinlich wird in diesem Fall die herabgesetzte Aktivität durch die Verbesserung einer der anderen für die Zytotoxizität essentiellen Eigenschaften überkompensiert. Somit ist die Kopplung zweier RNase A-Moleküle über einen proteinogenen Linker eine erfolgreiche Methode, um zytotoxische Proteine zu generieren.

Die zytosolische Konzentration des RI wurde auf ca. $4 \mu\text{M}$ geschätzt (0,08% der zytosolischen Proteine; Haigis et al., 2003). Das bedeutet, dass alle RNasen mit K_i -Werten $< 10^{-6} \text{ M}$ vom RI gebunden und inaktiviert werden sollten, sobald sie das Zytosol erreichen. Infolgedessen erscheint die beeinträchtigte RI•RNase-Interaktion als entscheidendes Charakteristikum für eine zytotoxische RNase (Leland et al., 1998b). Daher soll im folgenden Kapitel die Bindung zwischen RI und den RNase A-Tandemenzymen näher untersucht werden.

4.3 Herstellung des RI und Charakterisierung der RI-Bindung

4.3.1 Expression und Reinigung

Für die Expression des *ri*-Gens wurde die im pET22b(+)-Plasmid insertierte *ri*-Sequenz in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21 (DE3) transformiert (3.2.4.2.2). Die Expression erfolgte in löslicher Form (3.3.5.1). Aufgrund der damit verbundenen geringen Proteinausbeute konnte die Überexpression des *ri*-Gens nach der Induktion durch IPTG im Elektropherogramm nur schlecht visualisiert werden (Bahn 1, Abb. 17A). Nach dem Zellaufschluss (3.3.5.2) und anschließender Zentrifugation wurde die lösliche Fraktion direkt auf eine RNase A-Affinitätsgravitationssäule aufgetragen (3.3.5.3), gewaschen und eluiert. Bahn 3 der Abb. 17 zeigt die deutliche Anreicherung des RI in der Elutionsfraktion im Vergleich zur löslichen Fraktion nach dem Zellaufschluss (Bahn 1). Zur weiteren Abtrennung der noch enthaltenen Verunreinigungen erfolgte als zweiter Reinigungsschritt eine Anionenaustauschchromatographie ($pI_{RI} = 4,71$; Blackburn und Jaikhan, 1979; 3.3.5.3; Abb. 18).

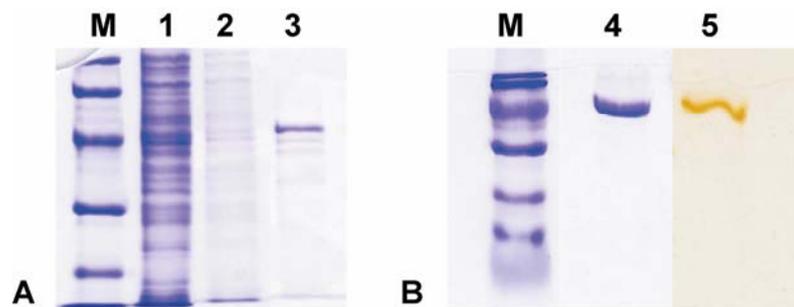


Abb. 17: SDS-PAGE-Gel des mittels Affinitäts- (A) und Anionenaustauschchromatographie (B) gereinigten RI

Die Reinigung des RI erfolgte wie unter 3.3.5.3 beschrieben. **M**: LMW-Proteinmarker, **1**: Rohextrakt (lösliche Fraktion), **2**: Waschfraktion, **3**: Elutionsfraktion nach Affinitätschromatographie, **4**: Elutionsfraktion nach Anionenaustauschchromatographie, Coomassie R250-Färbung, **5**: Elutionsfraktion (4) nach Silberfärbung.

Nach diesem Reinigungsschritt war der RI sowohl elektrophoretisch (Abb. 17B) als auch chromatographisch (Abb. 18) rein. Die Gesamtausbeute lag bei rund 2 mg gereinigtem Protein pro Liter Kultivierungsmedium.

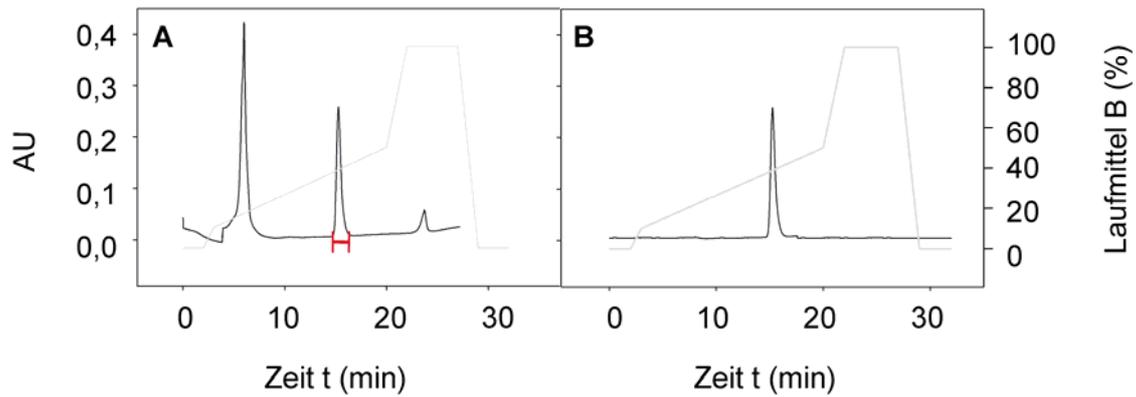


Abb. 18: Anionenaustauschchromatogramm des RI

Die Reinigung des RI erfolgte wie unter 3.3.5.3 beschrieben. **A:** Chromatogramm des RI, **B:** Chromatogramm der manuell gesammelten Fraktion (—) nach Rechromatographie, (—): prozentualer Anteil von Laufmittel B im Elutionspuffer.

4.3.2 Studien zur RI-Bindung

RI bildet mit RNasen der RNase A-Superfamilie einen nichtkovalenten 1:1-Komplex (Lee et al., 1989b; Kobe und Deisenhofer, 1996) und bewirkt dadurch deren Inaktivierung. Die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den RNase A-Tandemenzym-Varianten und RI erfolgte wie unter 3.3.8 beschrieben durch die Messung der Enzymaktivität in Abwesenheit und in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an RI. Zusätzlich wurde die RI-Bindung mittels Nativ-PAGE (4.3.2.2), Ultrazentrifugation (4.3.2.3) und Proteolyse (4.3.2.4) analysiert.

4.3.2.1 Ribonukleolytische Aktivität in Anwesenheit des RI

Während der RI RNase A inaktiviert, wird die katalytische Spaltung von Hefe-RNA durch G88R-RNase A durch einen Überschuss an RI nicht beeinflusst (Abb. 19). Somit konnte die Einführung dieser Substitution (G88R) die gegenüber RI hochaffine RNase A in ein RI-evasives Molekül umwandeln (Leland et al., 1998a). Da die K_d -Werte im RI•RNase A-Komplex im fM Bereich liegen (2.3.1), die für den Aktivitätstest mit Hefe-RNA als Substrat verwendete Konzentration an RNase A-Einheiten mit 7 nM jedoch deutlich oberhalb der K_d -Werte liegt, liefern die Untersuchungen nur Obergrenzen für K_d (Leland et al., 2001). Nur für RNasen, deren K_d -Werte oberhalb der einzusetzenden RNase-Konzentration liegen, ist eine direkte Bestimmung und ein Vergleich der K_d -Werte möglich. Die gleichen Probleme traten bei der Bestimmung der K_d -Werte für den hRI•HPR-Komplex auf, wobei die beschriebenen Werte beträchtlich schwanken (Boix et al., 1996; Suzuki et al., 1999; Gaur et al., 2001).

Unter den gewählten Testbedingungen stimmt das Inaktivierungsverhalten des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms überraschenderweise nahezu mit dem der RNase A überein; der apparente K_d -Wert liegt wie für RNase A bei 2,1 nM (Abb. 19). Entgegen der Vorstellung, dass die RI-Bindung an eine RNase A-Einheit die Bindung eines zweiten RI-Moleküls an die zweite RNase A-Einheit der Tandemenzyme sterisch verhindert (4.1.1),

werden die Tandemenzyme in Anwesenheit des RI offenbar vollständig inaktiviert. Die aufgrund der Limitierung des Testsystems vorhandene Möglichkeit, dass die Affinität der RNase A-Tandemenzyme im Vergleich zur RNase A auf $44 \text{ fM} \leq K_d \leq 2,5 \text{ nM}$ herabgesetzt wurde, kann jedoch weder bestätigt noch widerlegt werden. Die vollständige Inhibierung der RNase A-Tandemenzyme kann sowohl durch eine 2:1-Bindungsstöchiometrie ($2\text{RI} \cdot \text{RNase A-Tandemenzym}$) als auch durch eine 1:1-Bindungsstöchiometrie ($1\text{RI} \cdot \text{RNase A-Tandemenzym}$) bei gleichzeitiger sterischer Behinderung beider aktiver Zentren begründet werden.

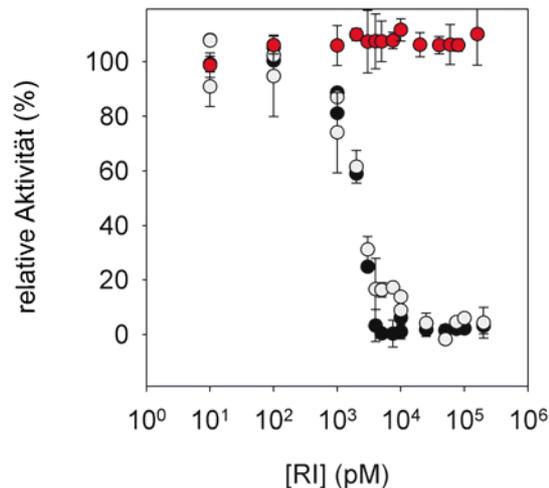


Abb. 19: Aktivität verschiedener RNase A-Varianten in Abhängigkeit von der RI-Konzentration

Die Aktivität von RNase A (●), G88R-RNase A (●) und vom SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym (○) wurde bei einer Proteinkonzentration von $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ (7 nM RNase A-Einheiten) in 100 mM NaAcetat-Puffer, $\text{pH } 5,5$, in Gegenwart von 10 mM DTT, $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ BSA und $1,9 \text{ mg ml}^{-1}$ Hefe-RNA in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an RI bei 37°C bestimmt (3.3.8).

4.3.2.2 Bestimmung der RI-Bindungsstöchiometrie durch Nativ-PAGE

Zur Analyse der Bindungsstöchiometrie zwischen RI und den RNase A-Tandemenzymen wurde sowohl RNase A als auch das SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym wie unter 3.3.2 beschrieben mit einem Überschuss an RI inkubiert und mittels Nativ-PAGE analysiert (Abb. 20). Sowohl ungebundene RNase A als auch ungebundene RNase A-Tandemenzyme können im Gegensatz zum RI aufgrund ihrer positiven Nettoladung unter den verwendeten experimentellen Bedingungen ($\text{pH } 6,55$) nicht in das Gel einwandern. Im Vergleich zum freien RI verringert die Komplexbildung die elektrophoretische Mobilität der resultierenden $\text{RI} \cdot \text{RNase}$ -Komplexe (Naddeo et al., 2005) und ermöglicht dadurch die quantitative Auswertung des entstandenen Bandenmusters. Aus den Bandenmustern der Bahnen 3 und 4 der Abb. 20 wird deutlich, dass unter den verwendeten experimentellen Bedingungen nur eine Spezies des $\text{RI} \cdot \text{RNase A-Tandemenzym-Komplexes}$ existiert und kein Gemisch aus 1:1- und 2:1-Komplexen. Die densitometrische Auswertung dieses Bandenmusters (3.3.3) lässt jedoch eine 1:1-Bindungsstöchiometrie (RI:Tandemenzym) vermuten, da 20 pmol des

SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms (Bahn 4, Abb. 20) die gleiche Menge an RI binden wie 20 pmol RNase A (Bahn 2, Abb. 20).

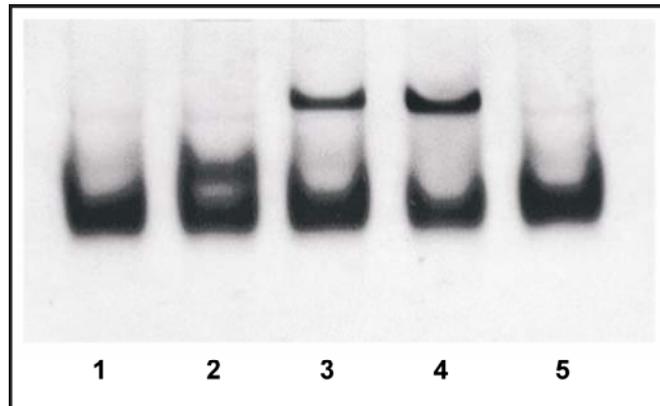


Abb. 20: Komplexbildung zwischen RI und dem SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym im Vergleich zum RI•RNase A-Komplex

Nativ-PAGE-Gel von RI (40 pmol, Bahn **1** und **5**), von RI (40 pmol) im Komplex mit RNase A (20 pmol, Bahn **2**) und von RI (40 pmol) im Komplex mit dem SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym (10 pmol, Bahn **3**; 20 pmol, Bahn **4**). Die Komplexbildung erfolgte in 0,1 M NaPhosphat-Puffer, pH 6,55, in Gegenwart von 2 mM DTT bei 25°C für 15 min (4.3.2.2).

Da die elektrophoretische Mobilität des Komplexes aus RI und RNase A nur geringfügig verringert wird und der freie Inhibitor in der Nativ-PAGE eine recht breite Bande ergibt, wurde das oben beschriebene Experiment noch einmal mit einem Unterschuss an RI und mit erhöhter SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym-Konzentration durchgeführt (Abb. 21). Dabei zeigte sich, dass 40 pmol des RNase A-Tandemenzyms 40 pmol RI vollständig binden (Bahn 3, Abb. 21). Durch die Abwesenheit der Bande für den freien RI wurde eine zweite, deutlich schwächere Bande auf Höhe des RI•RNase A-Komplexes sichtbar, die auf die Existenz zweier verschiedener Formen des RI•RNase A-Tandemenzym-Komplexes (1:1 + 2:1) hindeutet. Die verringerte elektrophoretische Mobilität des 1:1-Komplexes (1RI•RNase A-Tandemenzym; Bande 1, Bahn 3, Abb. 21) würde dabei durch die Bindung eines zweiten negativ geladenen RI-Moleküls (2:1-Komplex, 2RI•RNase A-Tandemenzym; Bande 2, Bahn 3, Abb. 21) teilweise wieder aufgehoben. Das Auftreten dieser beiden Komplexformen deutet entgegen den Experimenten mit RI-Überschuss auf eine Bindungsstöchiometrie geringfügig größer 1:1 hin. Dabei ist jedoch die geringe Reproduzierbarkeit des Experiments hinsichtlich des Auftretens von Bande 2 als problematisch zu bewerten.

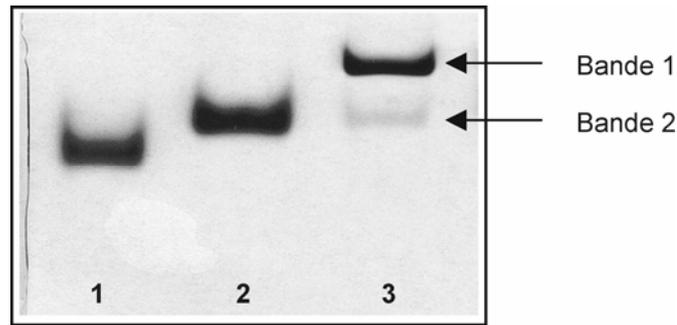


Abb. 21 RI•SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym-Komplexe

Nativ-PAGE-Gel von RI (40 pmol, Bahn **1**), von RI (40 pmol) im Komplex mit RNase A (50 pmol, Bahn **2**) und von RI (40 pmol) im Komplex mit dem SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym (40 pmol, Bahn **3**). Die Komplexbildung erfolgte in 0,1 M NaPhosphat-Puffer, pH 6,55, in Gegenwart von 2 mM DTT bei 25°C für 15 min.

Zur Verifizierung der 1:1-Bindungsstöchiometrie der vorherrschenden Komplexform (Bande 1, Bahn 3, Abb. 21) wurde sowohl RNase A (100 pmol) als auch das SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym (100 pmol) erneut mit RI (100-200 pmol) inkubiert und mittels Nativ-PAGE (3.3.2) analysiert (Abb. 22A). Der RI-Gehalt der Banden der RI•RNase A- und der mutmaßlichen 1RI•RNase A-Tandemenzym-Komplexe wurde durch SDS-PAGE (3.3.1) weitergehend untersucht und densitometrisch evaluiert (3.3.3, Abb. 22B).

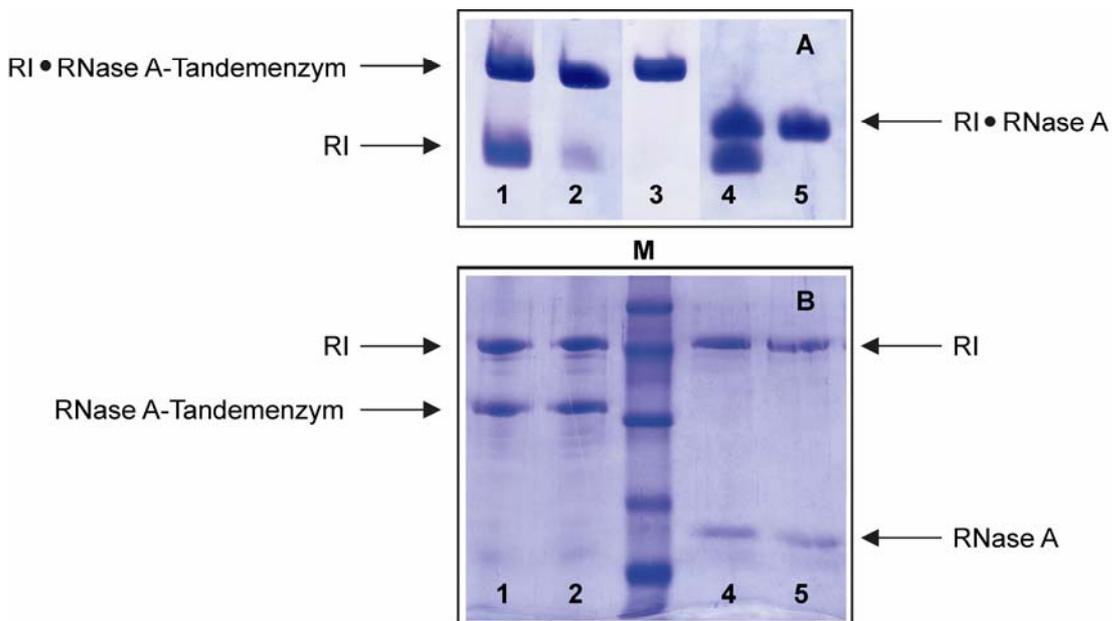


Abb. 22: Nativ-PAGE- und SDS-PAGE-Gel zur Bestimmung des RI-Gehalts des RI•SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym-Komplexes im Vergleich zum RI•RNase A-Komplex

A: Nativ-PAGE-Gel vom SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym (100 pmol) im Komplex mit RI (200 pmol, Bahn **1**; 150 pmol, Bahn **2** und 100 pmol, Bahn **3**) und von RNase A (100 pmol) im Komplex mit RI (200 pmol, Bahn **4** und 100 pmol, Bahn **5**). Die Komplexbildung erfolgte in 0,1 M NaPhosphat-Puffer, pH 6,55, in Gegenwart von 2 mM DTT bei 25°C für 15 min.

B: SDS-PAGE-Gel der RI•RNase-Komplexe. Die RI•RNase-Komplexe der Bahnen **1**, **2**, **4** und **5** (obere Banden, Gel A) wurden aus dem Nativ-PAGE-Gel ausgeschnitten, in SDS-Probenpuffer inkubiert (10 min, 95°C) und durch SDS-PAGE weitergehend analysiert.

M: LMW-Proteinmarker.

Aus Abb. 22B (Bahn 4 und 5) wird deutlich, dass die Bandenintensität von RI um einen Faktor von $2,9 \pm 0,5$ gegenüber der Intensität der RNase A-Banden erhöht ist. Dieser Faktor liegt bei den aufgetrennten mutmaßlichen 1RI•RNase A-Tandemenzym-Komplexen nur bei $1,3 \pm 0,2$ (Bahn 1 und 2, Abb. 22B). Dieses um die Hälfte verringerte Verhältnis der Bandenintensitäten (RI:Tandemenzym) kann nur durch eine 1:1-Bindungstöchiometrie (RI:Tandemenzym) erklärt werden, da das Verhältnis der molaren Massen von RI (49973 g mol^{-1}) und RNase A (13683 g mol^{-1}) bei elektrophoretischer Auftrennung des RI•RNase A-Komplexes mittels SDS-PAGE für die RI-Bande im Vergleich zur RNase A-Bande eine 3,6-fach höhere Bandenintensität erwarten lässt.

4.3.2.3 Analytische Ultrazentrifugation

Die Charakterisierung der RI-Bindung an die RNase A-Tandemenzyme wurde zusätzlich mittels analytischer Ultrazentrifugation (3.4.1) vorgenommen. Sowohl für das SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym ($15 \mu\text{M}$) als auch für RI ($3 \mu\text{M}$) entsprachen die erhaltenen apparenten molekularen Massen mit $(28,0 \pm 0,3) \text{ kDa}$ für das Tandemenzym und $(49,6 \pm 0,4) \text{ kDa}$ für den RI den theoretischen Massen von $28,09 \text{ kDa}$ und $49,97 \text{ kDa}$. Für den RI•RNase A-Komplex wurde eine apparente molekulare Masse von $63,8 \text{ kDa}$ (Gleichgewichtslauf) bestimmt, wodurch die vollständige RI-Bindung ($3 \mu\text{M}$) an die monomere RNase A ($3 \mu\text{M}$, $13,68 \text{ kDa}$) und damit die Funktionalität von RI nachgewiesen werden konnte. Nachfolgende Titrationsexperimente bei einer RI-Konzentration von $1,5 \mu\text{M}$ mit verschiedenen SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym-Konzentrationen ($0\text{-}6 \mu\text{M}$) führten bei einer Konzentration von $1,5 \mu\text{M}$ SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym zu einem maximalen Sedimentationskoeffizienten (s_{app}) von $5,22$ Svedberg-Einheiten (Abb. 23). Die Lage des maximalen Sedimentationskoeffizienten bei einem molekularen Verhältnis RI:RNase A-Tandemenzym von 1:1 bestätigt die durch Nativ-PAGE (4.3.2.2) bestimmte RI-Bindungstöchiometrie an die RNase A-Tandemenzyme von 1:1. Der in den Nativ-PAGE-Experimenten nur teilweise nachweisbare 2:1-Komplex (2RI•SGRSGRSGR-RNase A-Tandemenzym) konnte durch analytische Ultrazentrifugation nicht detektiert werden.

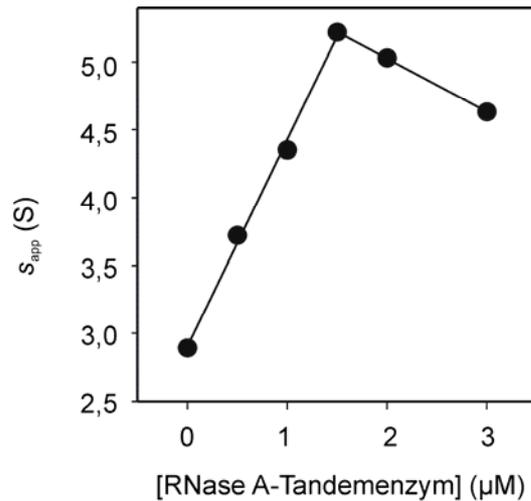


Abb. 23: Analytische Ultrazentrifugation des SGRSGRSG-RNase A-Tandemzyms in Anwesenheit des RI

Die Abhängigkeit der apparenten s -Werte von der RI•SGRSGRSG-RNase A-Tandemzym-Komplexbildung wurde durch Sedimentationsläufe in 0,1 M NaPhosphat-Puffer, pH 6,55, in Gegenwart von 0,5 mM EDTA, 2 mM DTT, 1,5 µM RI und verschiedenen Konzentrationen an RNase A-Tandemzym (0-3 µM) bei 20°C und 40000 rpm untersucht (3.4.1).

4.3.2.4 Identifizierung der bevorzugten RI-Bindungsstelle am RNase A-Tandemzym mittels Proteolyse

Sowohl der RI als auch monomere RNase A besitzen bei 25°C eine Resistenz gegenüber dem proteolytischen Verdau bei Verwendung von Trypsin als Protease. Das SGRSGRSG-RNase A-Tandemzym wird jedoch durch Trypsin (3×10^{-4} mg ml⁻¹ Endkonzentration) mit einer Proteolysekonstante k_p von $(3,2 \pm 0,2) \times 10^{-4}$ s⁻¹ (Abb. 24A) in der Linkersequenz gespalten. Die Spaltprodukte konnten durch Massenspektrometrie als RNase A-SGR- und SG-RNase A-Fragmente identifiziert werden (Rietz, 2006). Die bestimmten Massen der Fragmente von 13983 Da und 13826 Da stimmten sehr gut mit den theoretischen Massen von 13986 Da und 13829 Da überein. Diese proteolytische Angreifbarkeit des Linkers des SGRSGRSG-RNase A-Tandemzyms ermöglicht die Quantifizierung der RI-Bindung an die C-terminale RNase A-Einheit des Tandemzyms, da in Anlehnung an die Kristallstruktur (4.4) nur durch diese Bindung der Linker abgeschirmt und somit die Spaltung des Linkers sterisch verhindert oder verzögert werden sollte. Der proteolytische Verdau des SGRSGRSG-RNase A-Tandemzyms ist in Gegenwart eines 2-fachen molaren Überschusses an RI unvollständig (Abb. 24B) und die Bandenintensität des nicht gespaltenen Tandemzyms erreicht ein Plateau bei rund 30% der Ausgangsmenge an intaktem Tandemzym. Dieser Effekt kann nur durch ungleiche RI-Affinitäten der beiden RNase A-Einheiten erklärt werden, d.h. 70% aller gebundenen RI-Moleküle binden an der demnach höher affinen N-terminalen RNase A-Einheit und nur 30% an der schwächer affinen C-terminalen RNase A-Einheit, wobei die Existenz von 2RI•SGRSGRSG-RNase A-Tandemzym-Komplexen durch dieses Experiment nicht widerlegbar ist.

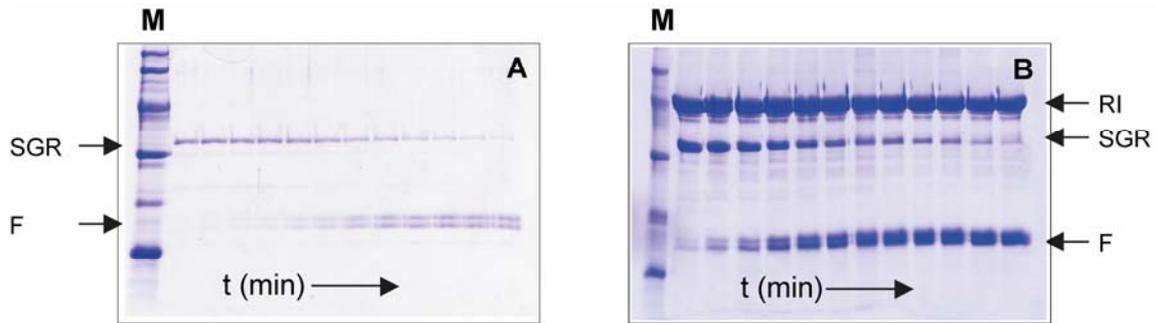


Abb. 24: SDS-PAGE-Gele des proteolytischen Abbaus des SGRSGRSG-RNase A-Tandemzymen durch Trypsin in Ab- und Anwesenheit des RI

Das SGRSGRSG-RNase A-Tandemzym (SGR; $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) wurde in Ab- (**A**) und Anwesenheit des RI ($0,36 \text{ mg ml}^{-1}$, molares Verhältnis RI:Tandemzym = 2:1; **B**) in Gegenwart von Trypsin ($3 \times 10^{-4} \text{ mg ml}^{-1}$ in Abwesenheit bzw. $1 \times 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1}$ in Gegenwart von RI) bei 25°C inkubiert (3.3.10). **M**: LMW-Proteinmarker, **F**: RNase A-SGR- und SG-RNase A-Fragmente. Die Inkubationszeiten in Abwesenheit von RI waren 0, 1, 2, 4, 8, 15, 30, 45, 60, 75, 90 und 180 min, die Inkubationszeiten in Gegenwart von RI betragen 0, 4, 8, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 und 180 min.

Ähnliche Ergebnisse wurden beim tryptischen Verdau des RI•SGRSGRSG-RNase A-Tandemzym-Komplexes (molares Verhältnis RI:Tandemzym = 1:1) mit nachfolgender Nativ-PAGE erhalten (Abb. 25; 3.3.10). Der Verdau des SGRSGRSG-RNase A-Tandemzymen in Abwesenheit des RI liefert nach anschließender Zugabe von RI einen Komplex (Bahn 4, Abb. 25) mit identischem Laufverhalten zum RI•RNase A-Komplex (Bahn 2, Abb. 25) und bestätigt die vollständige Spaltung der Linkersequenz durch Trypsin. Im Gegensatz dazu liegen nach dem tryptischen Verdau des RI•SGRSGRSG-RNase A-Tandemzym-Komplexes zwei verschiedene Komplexformen vor (Bahn 5, Abb. 25).

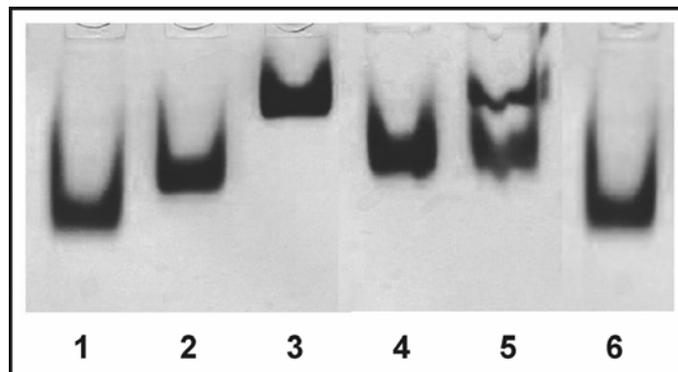


Abb. 25: Nativ-PAGE-Gel des proteolytischen Abbaus des SGRSGRSG-RNase A-Tandemzymen durch Trypsin in Gegenwart des RI

Nativ-PAGE-Gel von RI (40 pmol; Bahn 1 und 6) und den Komplexen RI•RNase A (Bahn 2), RI•SGRSGRSG-RNase A-Tandemzym (Bahn 3) bzw. RI•SGRSGRSG-RNase A-Tandemzym (**tryptisch verdaut**, Bahn 5). Bahn 4 zeigt RI im Komplex mit Trypsin-verdautem SGRSGRSG-RNase A-Tandemzym.

Die Komplexbildung zwischen RI (40 pmol) und der RNase A-Variante (40 pmol) erfolgte jeweils in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 in Gegenwart von 2 mM DTT bei 25°C für 15 min. Der sich anschließende tryptische Verdau (Proteasekonzentration von $3 \times 10^{-4} \text{ mg ml}^{-1}$) erfolgte für 60 min bei 25°C (3.3.10).

Die eine Komplexspezies zeigt im Nativ-PAGE-Gel ein Laufverhalten identisch zum RI•RNase A-Komplex, die andere Form dagegen das des 1 RI•SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym-Komplexes. Dabei spiegelt die untere Bande die abbaubare Spezies wieder, die nur ein RI-Molekül an der N-terminalen RNase A-Einheit gebunden hatte und die damit proteolytisch in der Linkerregion angreifbar war. Die obere Bande repräsentiert die proteolyseresistente Komplexform, die 1 RI-Molekül an der C-terminalen RNase A-Einheit gebunden hat. Die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten der beschriebenen Spezies ergab, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen nur etwa ein Drittel des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms in Anwesenheit des RI proteolyseresistent sind. Bei diesem Experiment wurde ein molares Verhältnis von 1:1 (RI:Tandemenzym) gewählt, da die vollständige Bindung aller RI-Moleküle sichergestellt sein muss. Freie RI-Moleküle könnten sonst die ungebundenen Spaltprodukte im Nachhinein binden und damit das Ergebnis der densitometrischen Auswertung verfälschen.

4.3.2.5 Design teilevasiver SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyme

Der Austausch der Aminosäure Gly88 durch Arginin erhöht den K_d -Wert der RNase A von 44 fM auf 0,4 nM (Leland et al., 1998b). Der gleiche Effekt sollte auch für die RNase A-Einheiten der RNase A-Tandemenzyme beobachtet werden. Durch die damit verbundene Verschiebung der K_d -Werte beider RNase A-Einheiten in den messbaren Bereich könnten eventuelle Unterschiede in den Affinitäten gegenüber RI detektiert werden. Die beiden generierten teilevasiven Varianten des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms tragen die Gly→Arg-Substitution in der N-terminalen (G88R-SGR) oder in der C-terminalen RNase A-Einheit (G220R-SGR). Für die Herstellung der Plasmide zur Expression der beiden Varianten fand wiederum eine mehrstufige PCR zur Genverdopplung Anwendung, wobei das *mase A*-Gen mit dem *g88r-mase A*-Gen über den SGRSGRSG-Linker fusioniert wurde bzw. umgekehrt (3.2.2). Beide Varianten besitzen eine übereinstimmende katalytische Aktivität ($k_{cat}/K_M = (0,82 \pm 0,15) \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ gegenüber AUAA und $(69,8 \pm 3,3)\%$ RNase A-Aktivität gegenüber Hefe-RNA als Substrat, bezogen auf die RNase A-Einheiten) und Stabilität ($T_m = 61,0 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$), die annähernd mit den Parametern des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms (Tabelle 6, 4.2.2.2, 4.2.2.3) übereinstimmen. Während die Zugabe von RI die ribonukleolytische Aktivität der RNase A und der RNase A-Tandemenzyme gegenüber Hefe-RNA als Substrat vollständig inhibiert, bleibt G88R-RNase A unter den selben Bedingungen vollständig aktiv (Abb. 19, 4.3.2.1). Sollten die beiden RNase A-Einheiten der RNase A-Tandemenzyme unterschiedliche Affinitäten gegenüber RI aufweisen, würden sich die durch die Gly→Arg-Substitution hervorgerufenen Effekte auf die RI-Bindung beider Varianten des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms (G88R-SGR und G220R-SGR) unterscheiden. Dabei wäre bei der höher affinen RNase A-Einheit durch diesen Aminosäureaustausch eine stärkere Störung der RI-Bindung zu erwarten als bei der bereits geringer affinen Einheit. Wie aus Abb. 26A ersichtlich, sinkt die relative Aktivität der G88R-SGR-Variante bei maximaler RI-Konzentration nur um 15%, wohingegen die relative Aktivität der G220R-SGR-Variante bei maximaler RI-

Konzentration um 35% verringert wurde. Demnach stellt die N-terminale RNase A-Einheit die höher affine Einheit dar, was sich in einer erhöhten RI-Resistenz der G88R-SGR-Variante äußert. Noch deutlicher wird dieser Effekt bei der Betrachtung der mit AUAA als Substrat bestimmten apparenten K_i -Werte. Der K_i -Wert der G88R-SGR-Variante liegt mit $(5,3 \pm 0,7)$ nM (Abb. 26B) nahezu doppelt so hoch wie der K_i -Wert der G220R-SGR-Variante ($(2,8 \pm 0,6)$ nM; Abb. 26B).

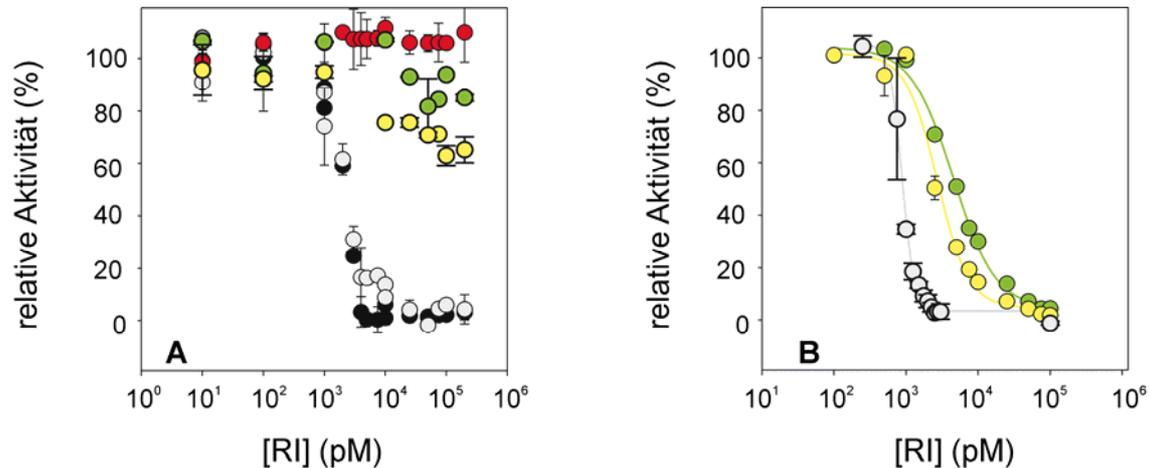


Abb. 26: Vergleich der Aktivität verschiedener RNase A-Varianten in Abhängigkeit von der RI-Konzentration

A: Die Aktivität gegenüber **Hefe-RNA** als Substrat wurde bei einer Proteinkonzentration von $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ (7 nM RNase A-Einheiten) in 100 mM NaAcetat-Puffer, $\text{pH } 5,5$, in Gegenwart von 10 mM DTT, $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ BSA und $1,9 \text{ mg ml}^{-1}$ Hefe-RNA in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an RI (0 – 200 nM) bei 37°C bestimmt (3.3.8).

B: Die Aktivität wurde bei einer Proteinkonzentration von 1 nM (2 nM RNase A-Einheiten) gegenüber **AUAA** (50 nM) in 100 mM Mes-NaOH, $\text{pH } 6,0$, in Gegenwart von 100 mM NaCl, $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ BSA und 10 mM DTT in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an RI (0 – 100 nM) bei 25°C bestimmt (3.3.8).

● : RNase A, ● : G88R-RNase A, ○ : SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym, ● : G88R-SGR, ● : G220R-SGR.

Die durch die Gly→Arg-Substitution hervorgerufenen Effekte auf die RI-Bindung beider Varianten des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms (G88R-SGR und G220R-SGR) sollten sich auch in deren tryptischen Verdau (4.3.2.4) in Gegenwart von RI widerspiegeln. Der proteolytische Verdau (3.3.10) der RI•G88R-SGR- und RI•G220R-SGR-Komplexe ist unvollständig (Abb. 27) und die Bandenintensität des nicht gespaltenen Tandemenzyms erreicht ein Plateau bei rund 40% der Ausgangsmenge an intaktem Tandemenzym für G88R-SGR und bei 15% für G220R-SGR (Abb. 28). Die Verringerung der Affinität der N-terminalen RNase A-Einheit gegenüber RI (G88R-SGR) führt nur zu einer geringfügigen Verstärkung der RI-Bindung an die C-terminale RNase A-Einheit und damit zu einer unwesentlichen Steigerung der proteolytischen Resistenz (Abb. 27A; Abb. 28). Die N-terminale RNase A-Einheit bindet den RI trotz der Erhöhung des K_d -Werts von 44 fM (Lee et al., 1989b) auf 410 pM (Leland et al., 1998b) weiterhin bevorzugt. Die C-terminale unmodifizierte RNase A-Einheit des Tandemenzyms weist damit offensichtlich eine Inhibitor konstante von $K_d > 410 \text{ pM}$ auf. Die Einführung der Gly→Arg-Substitution in die C-terminale RNase A-Einheit (G220R-SGR) verringert

deren RI-Affinität zusätzlich und verstärkt damit die proteolytische Anfälligkeit dieser Variante (Abb. 27B; Abb. 28) erwartungsgemäß.

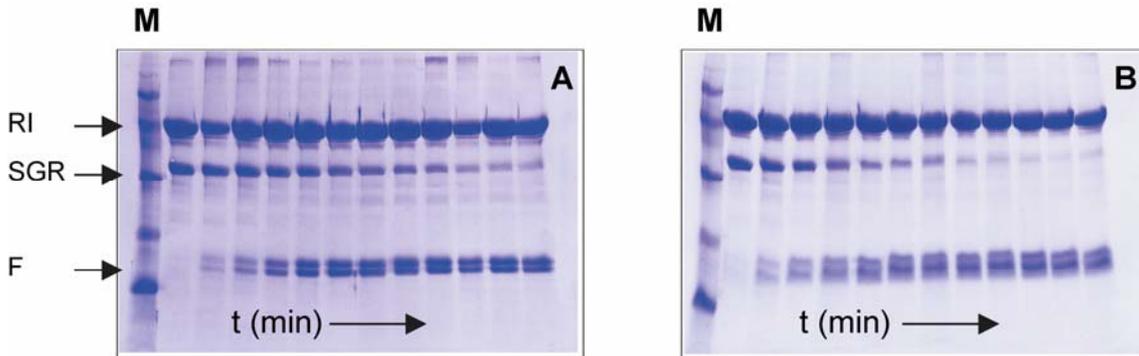


Abb. 27: SDS-PAGE-Gele des proteolytischen Abbaus der G88R- und G220R-SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym-Varianten durch Trypsin in Gegenwart des RI

Die SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym-Varianten (**SGR**; $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) wurden in Anwesenheit des RI ($0,36 \text{ mg ml}^{-1}$, molares Verhältnis RI:Tandemenzym = 2:1) in Gegenwart von Trypsin ($1 \times 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1}$) bei 25°C inkubiert (3.3.10). **A**: G88R-SGR, **B**: G220R-SGR, **M**: LMW-Proteinmarker, **F**: RNase A-SGR- und SG-RNase A-Fragmente. Die Inkubationszeiten betragen 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150 und 180 min.

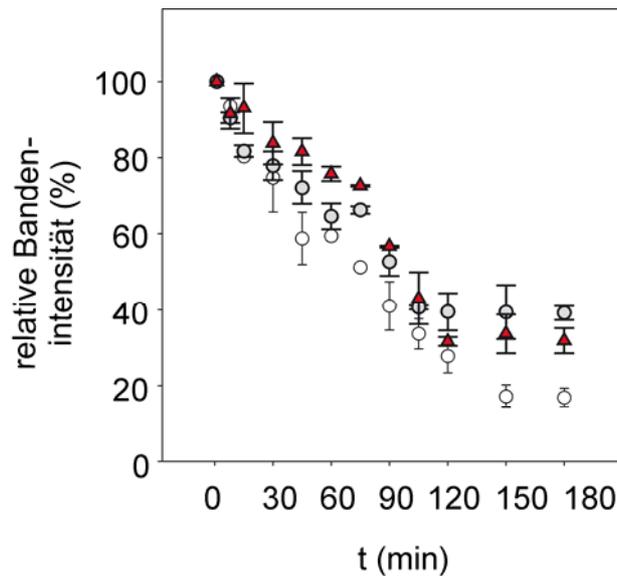


Abb. 28: Tryptischer Verdau des G88R-, G220R- und SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms in Gegenwart des RI

Das SGRSGRSG-RNase Tandemenzym (\blacktriangle) und seine Varianten G88R-SGR (\circ) und G220R-SGR (\circ) wurden bei einer Konzentration von $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ in Anwesenheit des RI ($0,36 \text{ mg ml}^{-1}$) in Gegenwart von Trypsin ($1 \times 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1}$) bei 25°C inkubiert (3.3.10). Die nach SDS-PAGE (3.3.1) erhaltenen Elektropherogramme wurden nach Coomassie-Färbung densitometrisch evaluiert (3.3.3) und graphisch dargestellt. Die Inkubationszeiten betragen 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150 und 180 min.

Ähnliche Ergebnisse wurden beim tryptischen Verdau der RI•G88R- und RI•G220R-SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym-Komplexe mit nachfolgender Nativ-PAGE erhalten. Dieses Experiment erfolgte bei einem molaren Verhältnis RI:RNase A-Tandemenzym von 1:1, um die vollständige Bindung des RI sicherzustellen (Bahn 3, Abb. 29). Die nach dem tryptischen Verdau von G88R-SGR in Gegenwart von RI (Bahn 5, Abb. 29) im nativen Elektropherogramm sichtbaren Komplexe zeigten eine gleichartige Verteilung und Bandenintensität wie die entsprechenden Komplexe aus dem ursprünglichen SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym (Bahn 4, Abb. 29). Die Einführung der G220R-Mutation verringert die RI-Affinität der vor tryptischen Verdau schützenden Einheit und verstärkt damit die proteolytische Anfälligkeit dieser Variante in Gegenwart von RI (Bahn 6, Abb. 29).

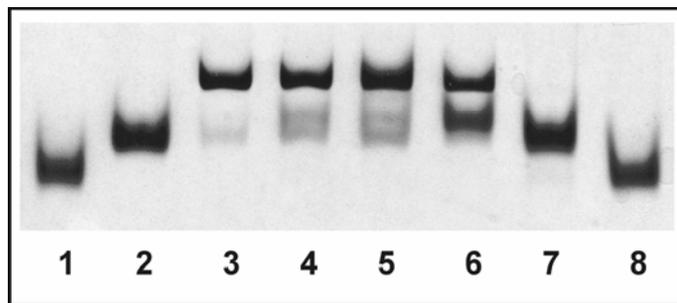


Abb. 29: Einfluss der Gly→Arg-Substitution auf die RI-Affinität

Nativ-PAGE-Gel von RI (40 pmol; Bahn **1** und **8**) und den Komplexen RI•RNase A (Bahn **2**), RI•SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym (Bahn **3**), RI•SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym (**tryptisch verdaut**, Bahn **4**), RI•G88R-SGR (**tryptisch verdaut**, Bahn **5**) bzw. RI•G220R-SGR (**tryptisch verdaut**, Bahn **6**). Bahn **7** zeigt RI im Komplex mit Trypsin-verdautem SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym.

Die Komplexbildung zwischen RI (40 mol) und der RNase A-Variante (40 mol) erfolgte in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 in Gegenwart von 2 mM DTT bei 25°C für 15 min. Der sich anschließende tryptische Verdau (Proteasekonzentration von 3×10^{-4} mg ml⁻¹) erfolgte für 60 min bei 25°C (3.3.10).

4.4 Kristallisation der RNase A-Tandemenzyme

Zur Aufklärung der Anordnung der RNase A-Einheiten innerhalb eines Tandemenzym-Moleküls und zur Ableitung von Aussagen über mögliche Interaktionen der RNase A-Einheiten mit dem RI wurden die RNase A-Tandemenzym-Varianten mit den Linkersequenzen GP₅G, GP₄G, GP₃G, SGSGSG und SGRSGRSG erfolgreich mit Hilfe der Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen kristallisiert. Die Kristallisation aller Varianten war erfolgreich und die erhaltenen Kristalle waren von guter Qualität, stabil und in ausreichenden Mengen herstellbar. Abb. 30 veranschaulicht die verschiedenen Kristallformen.

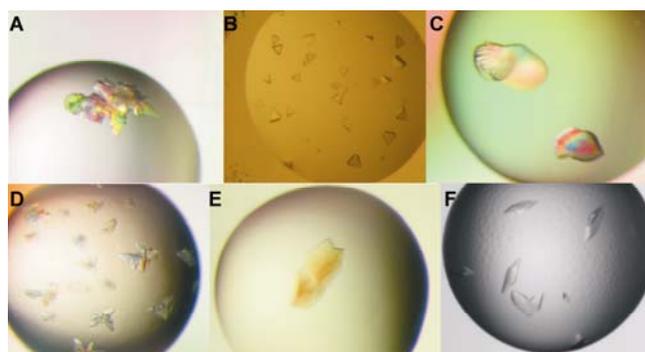


Abb. 30: Proteinkristalle des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms

Die Kristalle wurden durch Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen in 30% (w/v) PEG-8000/200 mM (NH₄)₂SO₄, pH 5,5 (**A**)-5,9 (**F**), bei einer Proteinkonzentration von 10 mg ml⁻¹ und einer Temperatur von 13°C erhalten. Die Kristalle haben nach 6 Tagen eine Ausdehnung von etwa 0,1 × 0,1 × 0,1 mm. Die Kristalle gehören zur orthorhombischen Raumgruppe C2.

Es zeigte sich, dass die Kristalle im Kristallisationspuffer 30% (w/v) PEG-8000/200 mM (NH₄)₂SO₄, pH 5,9, die besten Streueigenschaften besaßen. Die RNase A-Tandemenzym-Kristalle gehören ebenso wie RNase A zur orthorhombischen Raumgruppe C2 und streuten Röntgenstrahlung bis zu einer limitierenden Auflösung von 1,68 Å (Tabelle 7). Die Orientierung der RNase A-Einheiten der Tandemenzyme innerhalb der asymmetrischen Einheit eines Kristalls stimmt erstaunlicherweise mit der von monomerer RNase A überein (Wlodawer et al., 1988). Die nachfolgende Strukturverfeinerung wurde nur für das SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym durchgeführt, da dessen Kristalle die höchste Auflösung lieferten. Die Datenaufnahme erfolgte bei 277 K und die ermittelten Zelldimensionen der entsprechenden Kristalle betragen: $a = 101,632 \text{ \AA}$, $b = 32,915 \text{ \AA}$ bzw. $c = 73,391 \text{ \AA}$ ($\beta = 91,03^\circ$). Die kristallographischen Daten sowie die statistischen Angaben der Datensammlung und der Verfeinerung sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Statistik der Datensammlung und Verfeinerung der Struktur des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms

Die Werte in den Klammern entsprechen denen für die höchste Auflösung (1.72–1.68 Å).

Parameter	Wert
Datensammlung	
Wellenlänge (Cu-K α) (Å)	1,5418
Raumgruppe	C2
maximale Auflösung (Å)	1,68
Einheitszelle a, b, c (Å); β -Winkel (°)	101,632, 32,915, 73,391; 91,03
R _{merge}	5,4 (24,1)
Vollständigkeit (%)	95,1 (68,3)
gemessene Reflexe	116085
Einzelreflexe	26799
I/ σ	17,5 (4,0)
Verfeinerung	
Auflösung (Å)	2,45-1,68 (1,72-1,68)
Vollständigkeit (%)	95,1 (61,0)
Reflexe (F>0)	25445 (1235)
B-Faktor (Å ²)	23,5
R-Faktor (%)	17,22 (20,00)
R _{free} (%)	21,55 (26,60)
Anzahl der Atome (ohne H)	2361
Anzahl der Atome im Protein (ohne H)	2054
Anzahl der Atome im Wassermolekül (ohne H)	275
Anzahl der Atome im Sulfatmoleküle (ohne H)	20
Anzahl der Atome im Glycerinmoleküle (ohne H)	12
Standardabweichung vom Idealwert	
Bindungslängen (Å)	0,014
Bindungswinkel (°)	1,491
Reste in der bevorzugten Region des Ramachandran-Plots	90,7%
Reste in der erlaubten Region des Ramachandran-Plots	9,3%

Die finale Struktur des SGRSGRSG-RNase A-Tandenzym besteht aus den Aminosäureresten 1 bis 256, 275 Wassermolekülen, vier Sulfationen und zwei Glycerinmolekülen (Abb. 31; R-Faktor: 0,1722, R_{free} : 0,2155). Die übereinstimmende Orientierung der RNase A-Einheiten aller kristallisierten RNase A-Tandenzym-Varianten beweist, dass weder die Länge noch die Aminosäurekomposition der verwendeten Linker Auswirkungen auf die Anordnung der RNase A-Einheiten haben.

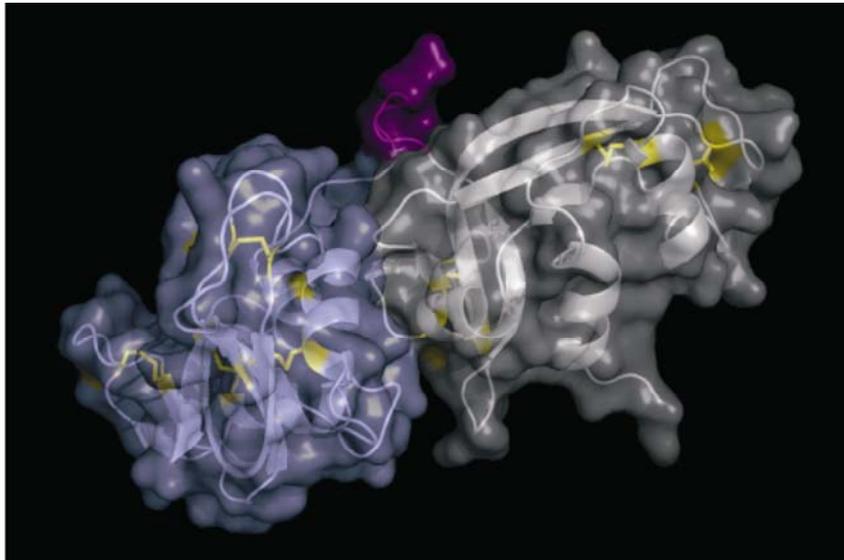


Abb. 31: Kristallstruktur des SGRSGRSG-RNase A-Tandenzym

Das Modell wurde mit dem Programm Pymol (DeLano, 2002) erstellt. Die N-terminale RNase A-Einheit ist grau, die C-terminale RNase A-Einheit ist hellblau und der Linker ist purpur dargestellt. Die Disulfidbrücken sind gelb hervorgehoben.

Die Kristallstruktur des SGRSGRSG-RNase A-Tandenzym ermöglicht das *alignment* mit der Struktur des RI•RNase A-Komplexes (Kobe und Deisenhofer, 1996), um die möglichen Interaktionen der RNase A-Tandenzyme mit dem RI zu simulieren. Während die RI-Bindung an die N-terminale RNase A-Einheit entsprechend der Struktur des RI•RNase A-Komplexes ungehindert möglich ist, behindern sterische Kollisionen die RI-Bindung an die C-terminale Einheit. Die dabei innerhalb der Kristallstruktur auftretenden sterischen Behinderungen werden verstärkt, wenn die N-terminale RNase A-Einheit bereits ein RI-Molekül gebunden hat (Abb. 32).

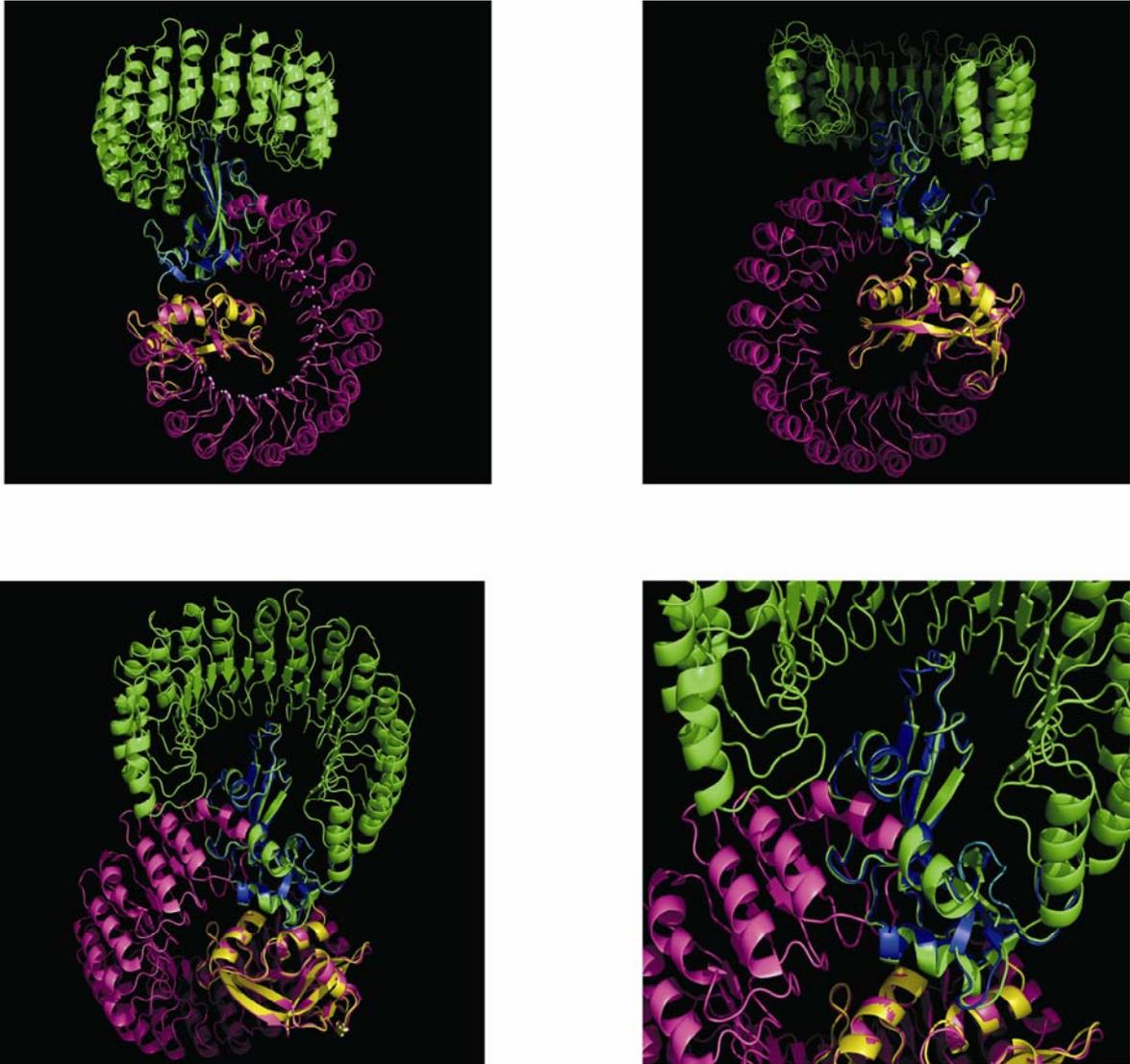


Abb. 32: Alignment des SGRSGRSG-RNase A-Tandemzyms mit dem RI•RNase A-Komplex

Die ausgerichteten Strukturen wurden aus verschiedenen Blickwinkeln dargestellt. Die Strukturen des RI•RNase A-Komplexes sind grün und pink, die N-bzw. die C-terminalen RNase A-Einheiten des SGRSGRSG-RNase A-Tandemzyms sind blau bzw. gelb dargestellt. Das Alignment der Struktur des RI•RNase A-Komplexes auf die C-terminale RNase A-Einheit des SGRSGRSG-RNase A-Tandemzyms zeigt bereits ohne die Berücksichtigung von Seitenketten und Hydrathülle eine deutliche sterische Kollision mit dem Peptidrückgrat (unten rechts).

Die Orientierung der RNase A-Einheiten der RNase A-Tandemzyme in der asymmetrischen Einheit des Kristalls stimmt vollständig mit der für monomere RNase A überein. Die dichte Packung der monomeren RNase A-Moleküle geht jedoch in Lösung vollständig verloren, so dass ausschließlich Monomere vorliegen. Es wäre vorstellbar, dass die in der Kristallstruktur vorliegende räumliche Anordnung der beiden RNase A-Einheiten des Tandemzyms ebenfalls in Lösung verloren geht, was gegebenenfalls zur Bindung eines zweiten RI-Moleküls führen könnte (Abb. 33).

Der Abstand zwischen dem C-Terminus der ersten RNase A-Einheit und dem N-Terminus der zweiten RNase A-Einheit würde bei einem langgestreckten SGRSGRSGR-Linker 17,85 Å betragen (Abb. 33A, B, C). Eine langgestreckte Linkerkonformation nach Aufheben der Packungsdichte der RNase A-Einheiten würde die Bindung von zwei RI-Molekülen an ein RNase A-Tandemenzym-Molekül ermöglichen. Abb. 33D zeigt zwei RI•RNase A-Komplexe im engstmöglichen Abstand voneinander.

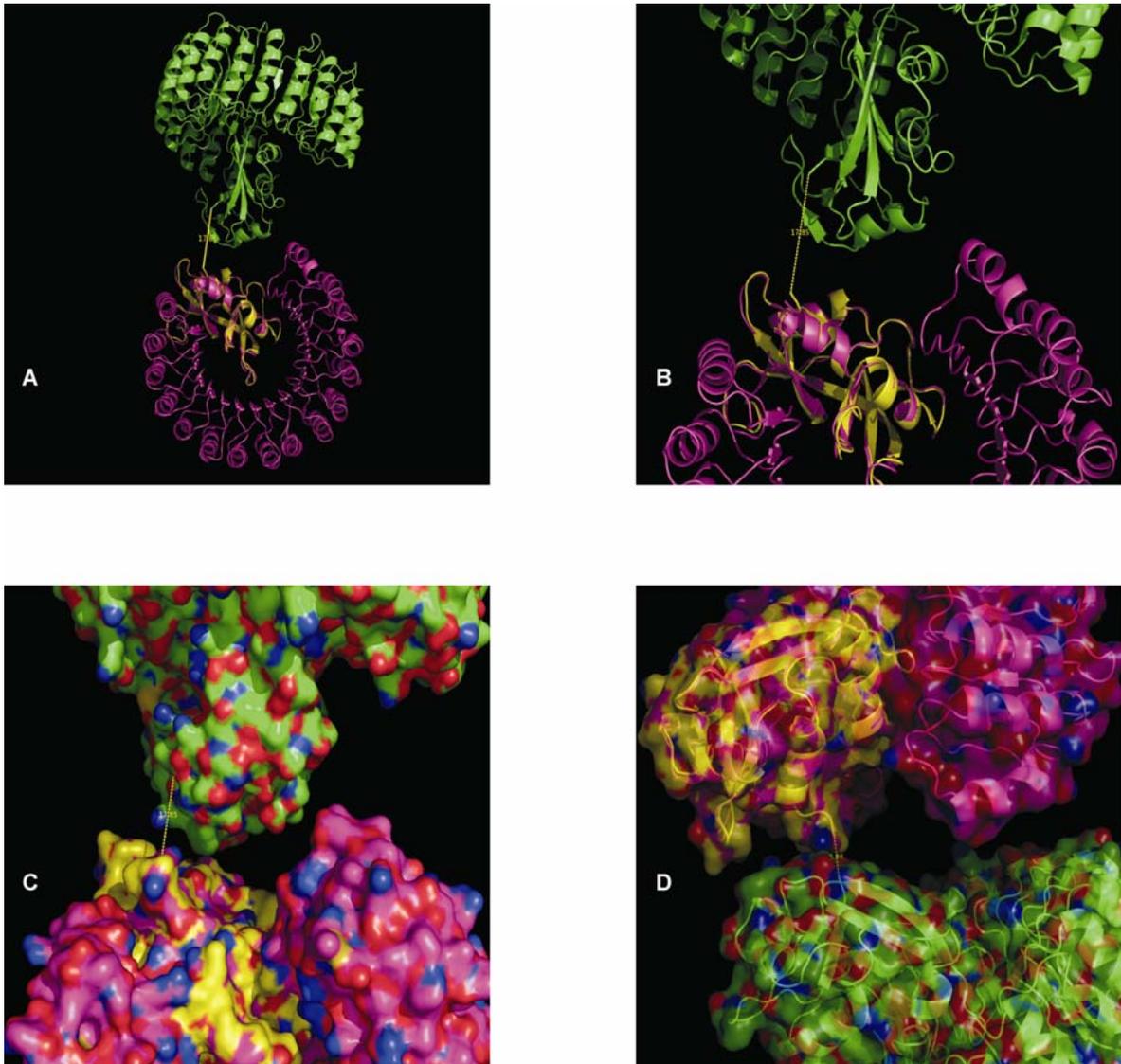


Abb. 33: Modellierung des RI•SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym-Komplexes bei gestreckter Linkerkonformation

A, B, C: gestreckter SGRSGRSG-Linker (entspricht 17,85 Å), **D:** Mindestabstand zwischen dem C-Terminus der RNase A des ersten RI•RNase A-Komplexes und dem N-Terminus der RNase A des zweiten Komplexes (5,86 Å).

Der minimale Abstand zweier RNase A-Moleküle, der bei einer möglicherweise langgestreckten Linkerkonformation die Bindung je eines RI-Moleküls ohne sterische Behinderung zulassen würde, beträgt 5,86 Å, das heißt weniger als die Länge von drei Aminosäuren. Erst bei einem kleineren Abstand zwischen dem N-Terminus der ersten RNase A-Einheit und dem C-Terminus der zweiten Einheit wird die Bindung von zwei RI-Molekülen aufgrund von sterischen Kollisionen unterbunden. Für die untersuchten RNase A-Tandemenzym-Varianten wurden jedoch Linkersequenzen von 4 (GP₂G) bis 8 (SGRSGRSG) Aminosäureresten gewählt, um eine möglichst störungsfreie Faltung der RNase A-Einheiten zu gewährleisten. Damit erscheint also eine RI-Bindungsstöchiometrie größer 1:1 (RI:RNase A-Tandemenzym) theoretisch möglich. Entsprechende 2:1-Komplexe konnten jedoch durch Untersuchungen mittels analytischer Ultrazentrifugation (4.3.2.3) nicht nachgewiesen werden.

4.5 Quantifizierung der Internalisierung der RNase A-Tandemenzym-Varianten

Trotz übereinstimmender thermodynamischer Stabilität und identisch verlaufender Inaktivierung in Gegenwart von RI zeigen die RNase A-Tandemenzyme Unterschiede in ihrer zytotoxischen Potenz (4.2.2.4). Diese Differenzen korrelieren jedoch nicht mit den Abweichungen der katalytischen Aktivität. Daher sollten die Unterschiede in der zytotoxischen Potenz auf abweichende Endozytoseeffizienzen oder *in vivo*-Stabilitäten (4.6) der RNase A-Tandemenzyme zurückzuführen sein. Nach der Internalisierung durchlaufen RNasen unterschiedliche Zellkompartimente, bevor sie letztendlich das Zytosol erreichen oder den abbauenden Kompartimenten zugeführt werden (2.2.3). Zur Identifizierung der an der Internalisierung der RNase A-Tandemenzyme beteiligten Zellkompartimente und zur Quantifizierung der jeweils enthaltenen RNase-Menge wurde eine subzelluläre Fraktionierung (4.5.1) der verwendeten Zelllinie mit anschließender Detektion der eingesetzten RNase A-Varianten durch Immunoblotting durchgeführt (4.5.2).

4.5.1 Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Ultrazentrifugation

Die subzelluläre Fraktionierung wurde wie unter 3.5.3 beschrieben durchgeführt (Abb. 34). Der Erfolg der einzelnen Fraktionierungsstufen wurde durch die Aktivität der Leitenzyme β -AGA (Casciola-Rosen und Hubbard, 1991), kat BLS (Schmid et al., 1997) und LDH (Storrie und Madden, 1990) überprüft (3.5.3.3). Der entscheidende Schritt einer jeden Zellfraktionierung ist das Homogenisierungsverfahren. Die Schwierigkeit besteht darin, die Plasmamembran der Zellen vollständig zu zerstören, die einzelnen Organellen hingegen intakt zu lassen. Eine unvollständige Homogenisierung führt zu Ausbeuteverlusten, während zerstörte Organellen eine effektive Fraktionierung unmöglich machen. Die optimale Homogenisierung der K562-Zellen erfolgte durch 5-fache Wiederholung einer Ultraschallbehandlung mit 5 J, wie anhand der Aktivitäten der entsprechenden Leitenzyme

nachgewiesen werden konnte (Abb. 35). Die Trennung der Fraktionen L (lysosomale Fraktion) und E (bestehend aus endosomaler und mitochondrialer Fraktion) aus dem Endosomen-Lysosomen-Mitochondrien-Pellet erfolgte durch hypotone Lyse der Lysosomen (3.5.3.2) durch Zugabe des x-fachen Pelletgewichts an destilliertem Wasser (Schröter et al., 1999). Dabei erwies sich die Zugabe des 18-fachen Pelletgewichts an H₂O als optimal, da anschließend nahezu die gesamte kat BLS-Aktivität (96%) und 78% der β -AGA-Aktivität im Überstand (Fraktion L) nachgewiesen werden konnte (Abb. 35).

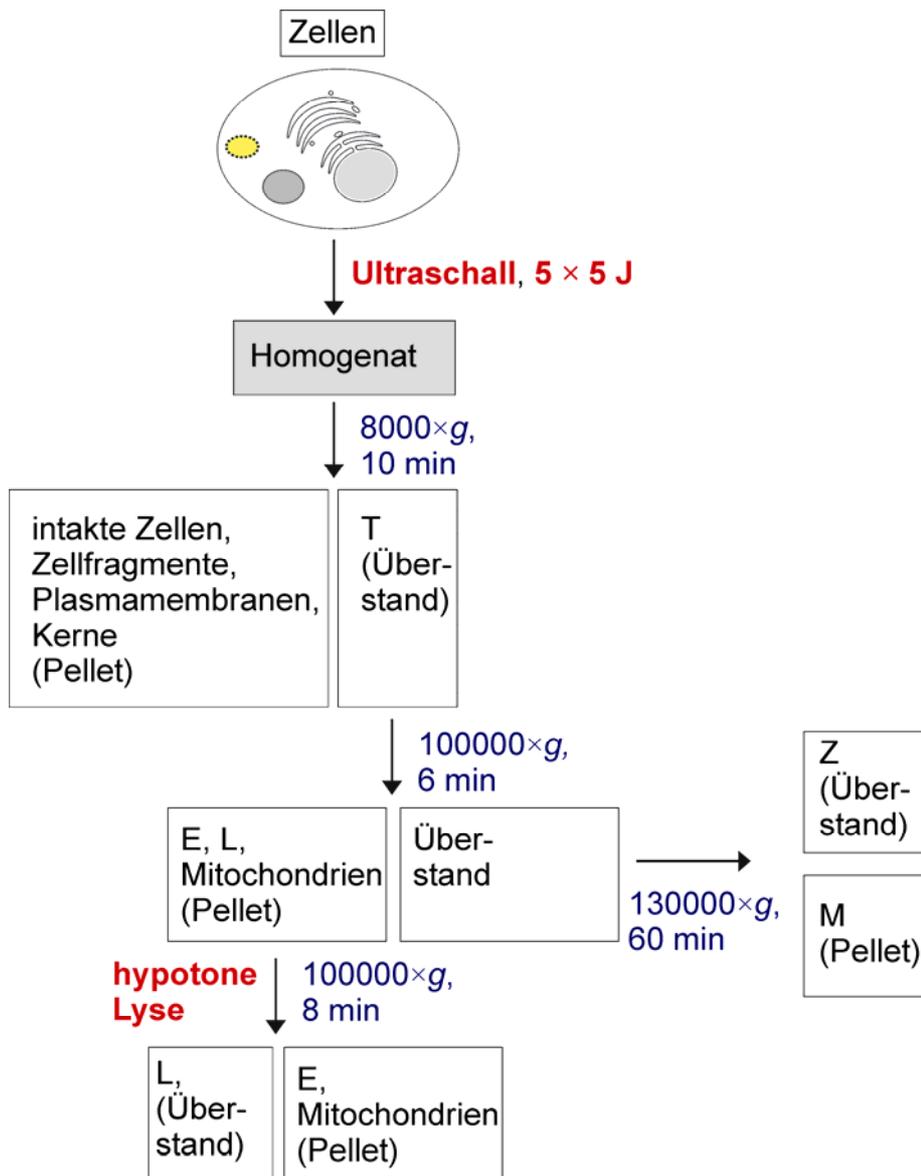


Abb. 34: Schematische Darstellung der subzellulären Fraktionierung

Die subzelluläre Fraktionierung erfolgte wie unter 3.5.3 beschrieben. **T**: aufgeschlossene Zellen ohne Plasmamembran und Zellkerne (zentrifugiertes Zellhomogenat), **E**: endosomale Fraktion, **L**: lysosomale Fraktion, **Z**: zytosolische Fraktion, **M**: mikrosomale Fraktion.

Abb. 35 zeigt deutlich, dass die Anwendung des beschriebenen Protokolls (Abb. 34) für die Homogenisierung und die differentielle Zentrifugation eine effektive Trennung der subzellulären Fraktionen (T, Z, E, L und M) der K562-Zellen ermöglichte. Die höchste Aktivität des lysosomalen Leitenzyms β -AGA ($10,9 \pm 2,1 \text{ U mg}^{-1}$; 78% der Gesamtaktivität) konnte in Fraktion L nachgewiesen werden. Die geringe β -AGA-Aktivität in Fraktion Z ($0,5 \pm 0,2 \text{ U mg}^{-1}$) belegt, dass durch die gewählten Homogenisierungsbedingungen kaum Organellen zerstört wurden. Die höchste kat BLS-Aktivität ($20,2 \pm 3,9 \text{ U mg}^{-1}$) konnte ebenso in Fraktion L nachgewiesen werden. Die Aktivität des zytosolischen Leitenzyms LDH wurde ausschließlich im Zytosol detektiert.

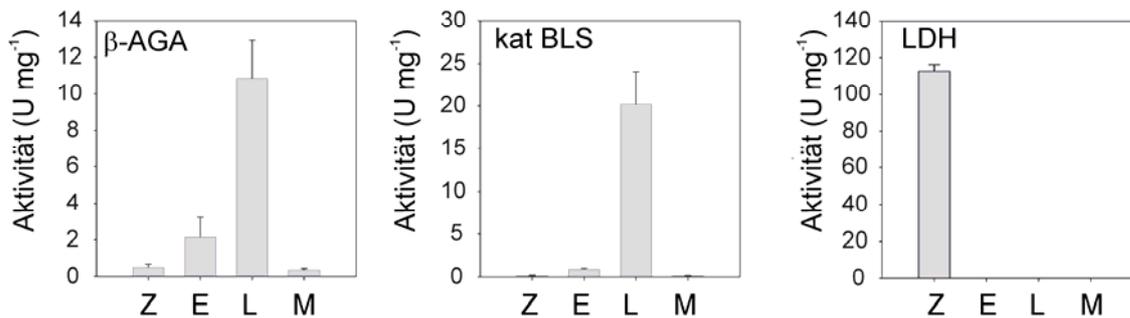


Abb. 35: Spezifische Aktivitäten der subzellulären Leitenzyme

Die subzellulären Fraktionen der K562-Zellen wurden durch differentielle Zentrifugation und hypotone Lyse erzeugt. Die katalytischen Aktivitäten von β -AGA, kat BLS und LDH wurden in der zytosolischen (**Z**), endosomalen (**E**), lysosomalen (**L**) und mikrosomalen Fraktion (**M**) wie unter 3.5.3.3 beschrieben bestimmt. Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung an, $n = 10$.

4.5.2 Detektion der RNase A-Varianten in den subzellulären Fraktionen

Für die Quantifizierung der Internalisierung der RNase A-Varianten in die verwendete Zelllinie und zur Analyse ihrer subzellulären Lokalisation wurden Aliquots der K562-Zellen für 36 h in Gegenwart der verschiedenen RNase A-Varianten inkubiert. Nach der Zellernte erfolgte der Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung und im Anschluss wurde die subzelluläre Fraktionierung wie unter 3.5.3 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden verschiedene RI-sensitive, aber zytotoxische RNase A-Tandemenzym-Varianten, die sich hinsichtlich der Länge und Aminosäurekomposition des Linkers unterscheiden, mit der RI-sensitiven, nicht zytotoxischen RNase A und der RI-evasiven, zytotoxischen G88R-RNase A verglichen. Die Internalisierung der RNase A-Varianten wurde durch semiquantitatives Immunoblotting analysiert (3.5.5.1). Als interne Standards für den exakten Abgleich der Bandenintensitäten dienten β -Aktin (Fraktion T und Z) und Kathepsin B (Fraktion E und L). Dabei konnte RNase A nur in Fraktion T (totale Internalisierung, zentrifugiertes Zellhomogenat) detektiert werden (Abb. 36), nicht jedoch in den Fraktion Z, E oder L. Dagegen konnten die RNase A-Tandemenzyme in jeder dieser Fraktionen detektiert werden. Die im Vergleich zur RNase A stark erhöhte Anreicherung der RNase A-Tandemenzyme in

den verschiedenen subzellulären Fraktionen weist auf eine beträchtlich gesteigerte Internalisierungseffizienz hin. Die RNase A-Tandemenzyme GP₃G, GP₄G, GP₅G und SGS₃GS₃G sind im Vergleich zu RNase A in Fraktion T um einen Faktor von 5 angereichert (Abb. 36). Das SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym, das Konstrukt mit der höchsten Zytotoxizität (IC₅₀ = 13 µM), wird sogar 14-mal besser in die K562-Zellen internalisiert als RNase A. Der IC₅₀-Wert der G88R-RNase A liegt mit 7 µM in einem ähnlichen Bereich (Leland et al., 1998a) und auch G88R-RNase A wird in Fraktion T 10-mal stärker angereichert als RNase A. Im Gegensatz zu den RNase A-Tandemenzymen wird nachfolgend jedoch in Fraktion E und Z vergleichsweise wenig G88R-RNase A akkumuliert, dafür jedoch umso mehr (3-fach höhere Akkumulation) in Fraktion L (Abb. 36). Die G88R-RNase A wird offensichtlich effizienter in das lysosomale Kompartiment transportiert als die RNase A-Tandemenzyme, die augenscheinlich im Endosom verbleiben bzw. ins Zytosol geleitet werden. Die schlechte Internalisierungsrate der RNase A steht im Einklang mit der fehlenden zytotoxischen Wirkung. Zudem konnten Haigis und Raines (2003) durch Verwendung von Fluorescein-markierter RNase A zeigen, dass diese nach der Endozytose direkt in saure intrazelluläre Kompartimente wie Endosomen oder Lysosomen geleitet wird. Nur nach einer Freisetzung der RNasen ins Zytosol können diese zytotoxische Effekte bewirken. Die *in vitro*-Sensitivität der RNase A gegenüber RI (Leland et al., 1998a; Leland und Raines, 2001) und die daraus vermutete Inaktivierung im Zytosol galt als Ursache für das Ausbleiben zytotoxischer Effekte, was durch die G88R-RNase A (RI-evasiv, zytotoxisch) bestätigt wurde. Neben der Quantifizierung der Internalisierung durch Immunoblotting weisen jedoch auch andere Studien auf eine Limitierung der Zytotoxizität durch die Internalisierungseffizienz hin (Saxena et al., 1991; Wu et al., 1995; Smith et al., 1999; Futami et al., 2001; Fuchs und Raines, 2005). Die zytotoxischen RNasen G88R-RNase A und ONC reichern sich im Vergleich zu RNase A verstärkt an der Zelloberfläche an (Haigis und Raines, 2003). Eine intensivere Interaktion mit der Zelloberfläche wurde auch als Ursache für die zytotoxische Wirkung der RI-sensitiven *domain-swapped* RNase A-Multimere (Naddeo et al., 2005) und der ebenfalls RI-sensitiven RNase A-Tandemenzyme (Leich et al., 2006) angenommen. Die in dieser Arbeit beschriebene Analyse der RNase-Internalisierung zeigt eindeutig, dass die zytotoxische G88R-RNase A im Gegensatz zur RNase A endozytiert und im Zytosol akkumuliert wird (Abb. 36). Das SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym wird in den Fraktionen Z und E sogar noch stärker angereichert als G88R-RNase A, jedoch führt die RI-Sensitivität der RNase A-Tandemenzyme zur Verringerung der zytotoxischen Potenz dieser RNase A-Tandemenzym-Variante im Vergleich zur RI-evasiven G88R-RNase A. Bei dieser wird die verminderte Freisetzung aus den Endosomen ins Zytosol durch die RI-Evasion (Leland et al., 1998a) kompensiert.

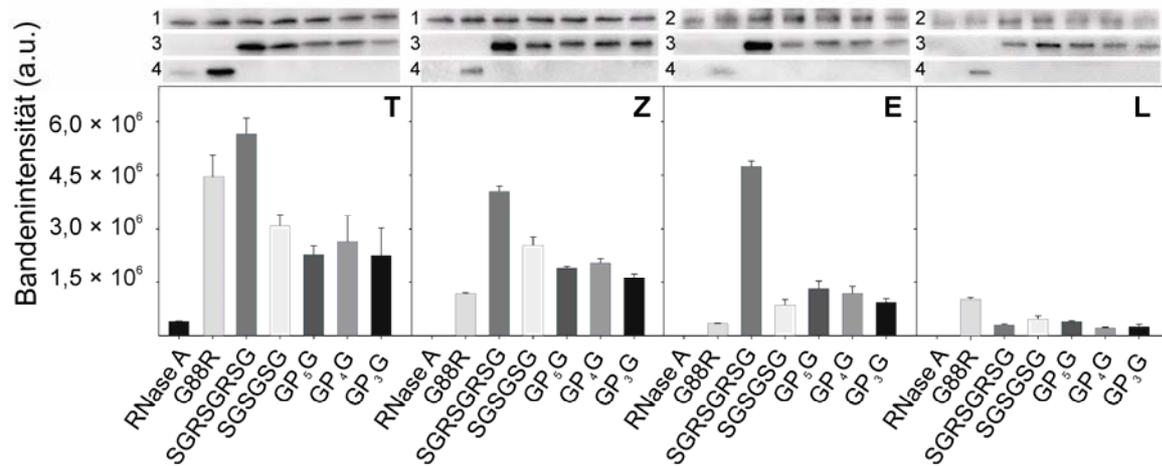


Abb. 36: Nachweis und Quantifizierung der internalisierten RNase A-Varianten in den subzellulären Fraktionen

Aliquots der Zelllinie K562 wurden jeweils für 36 h mit 100 μ M RNase A, 100 μ M G88R-RNase A bzw. 50 μ M verschiedener RNase A-Tandemenzym-Varianten (SGRSGRSG-, SGSGSG-, GP₅G-, GP₄G- und GP₃G-RNase A-Tandemenzym) inkubiert. Die Isolierung der subzellulären Fraktionen erfolgte durch differentielle Zentrifugation. Die Detektion der RNase A-Varianten in den entsprechenden Fraktionen erfolgte wie in 3.5.5.1 beschrieben durch Immunoblotting. Für die vollständige Internalisierung (**T**; zentrifugiertes Zellhomogenat) und für die zytosolische Fraktion (**Z**) wurde β -Aktin (**1**, 43 kDa) als interner Standard verwendet, für die endosomale (**E**) und die lysosomale (**L**) Fraktion diente Kathepsin B (**2**, 25 kDa) als interner Standard. Die Immunoblots der RNase A-Tandemenzym-Varianten (**3**) und die der monomeren RNase A-Varianten (RNase A und G88R-RNase) (**4**) wurden hinsichtlich der Bandenintensitäten quantifiziert. Der Graph zeigt die Intensität der detektierten Banden nach dem Abgleich mit dem entsprechenden internen Standard. Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung an, n = 4.

4.6 Proteolytische Stabilität der RNase A-Tandemenzym-Varianten

Nach der Internalisierung treffen die RNasen auf verschiedene intrazelluläre Proteasen. Nur RNasen, die sich neben der RI-Bindung auch dem proteolytischen Verdau und der damit verbundenen Inaktivierung entziehen können, spalten zelluläre RNA und verursachen dadurch den Zelltod. Die Untersuchung der proteolytischen Stabilität der RI-sensitiven, zytotoxischen RNase A-Tandemenzym-Varianten erfolgte wiederum im Vergleich zur ebenfalls RI-sensitiven, jedoch nicht zytotoxischen RNase A und zur RI-evasiven, zytotoxischen G88R-RNase A. Dabei wurde die Proteolyseempfindlichkeit der RNase A-Varianten sowohl in den isolierten subzellulären Fraktionen Z und L als auch nach Internalisierung in intakte K562-Zellen untersucht.

4.6.1 Proteolyse der RNase A-Tandemenzym-Varianten in Gegenwart verschiedener subzellulärer Fraktionen

Die Analyse der proteolytischen Anfälligkeit der RNase A-Tandemenzym-Varianten in den Fraktionen Z und L erfolgte wie unter 3.5.4 beschrieben. Abb. 37 zeigt exemplarisch die SDS-PAGE-Gele des zeitlichen Verlaufs der Inkubation (99 h) der G88R-RNase A und des GP₃G-RNase A-Tandemenzyms in den entsprechenden subzellulären Fraktionen. Wie für diese beiden Beispiele gezeigt, wurde auch für keine andere verwendete RNase A-Variante ein proteolytischer Abbau detektiert.

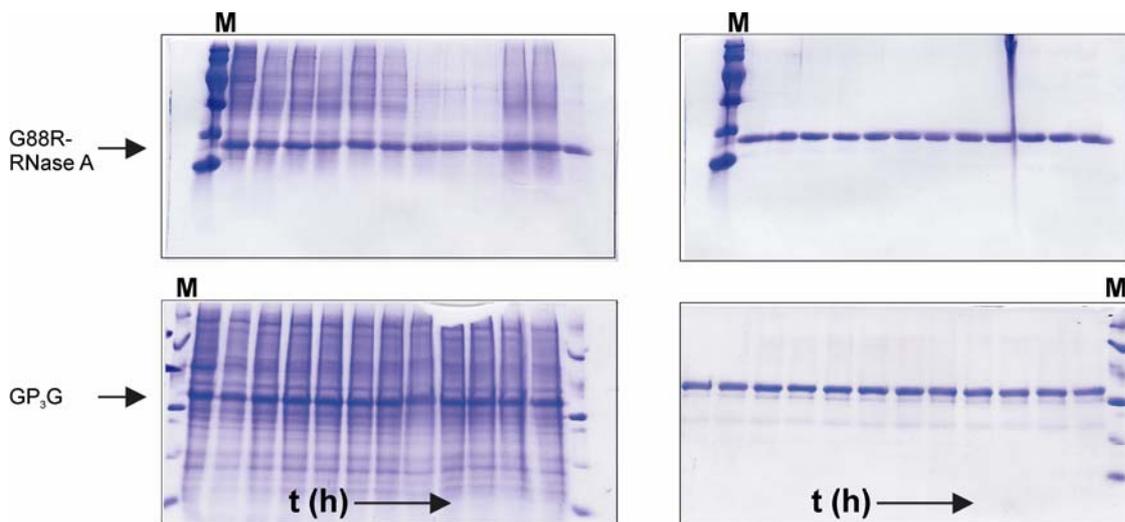


Abb. 37: SDS-PAGE-Gele des zeitlichen Verlaufs der Inkubation verschiedener RNase A-Varianten in den subzellulären Fraktionen Z und L

G88R-RNase A und das GP₃G-RNase A-Tandemenzym ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) wurden in Gegenwart der subzellulären Fraktionen Z (**links**) und L (**rechts**) bei 37°C für 99 h (Probennahme alle 9 h) inkubiert (3.5.4). Die nach SDS-PAGE (3.3.1) erhaltenen Elektropherogramme wurden nach Coomassie-Färbung densitometrisch evaluiert (3.3.3). **M**: LMW-Proteinmarker.

Zur Kontrolle der Funktionalität dieses Proteolyseansatzes wurden die Experimente mit BSA als Kontrollprotein wiederholt. Die Halbwertszeit von mikroinjiziertem ^{125}I -markierten BSA liegt im Zytosol von Fibroblasten in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen zwischen 10 und 40 h (Neff et al., 1981). In Anlehnung dazu wurde BSA im Gegensatz zu den proteolytisch stabilen RNase A-Varianten in den subzellulären Fraktionen Z und L (K562-Zellen) mit hoher Reproduzierbarkeit proteolytisch abgebaut (Abb. 38). Die Geschwindigkeitskonstante der Proteolyse (k_p) liegt für Fraktion Z bei $(4,0 \pm 0,2) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ und für Fraktion L bei $(3,5 \pm 0,3) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ (Abb. 38).

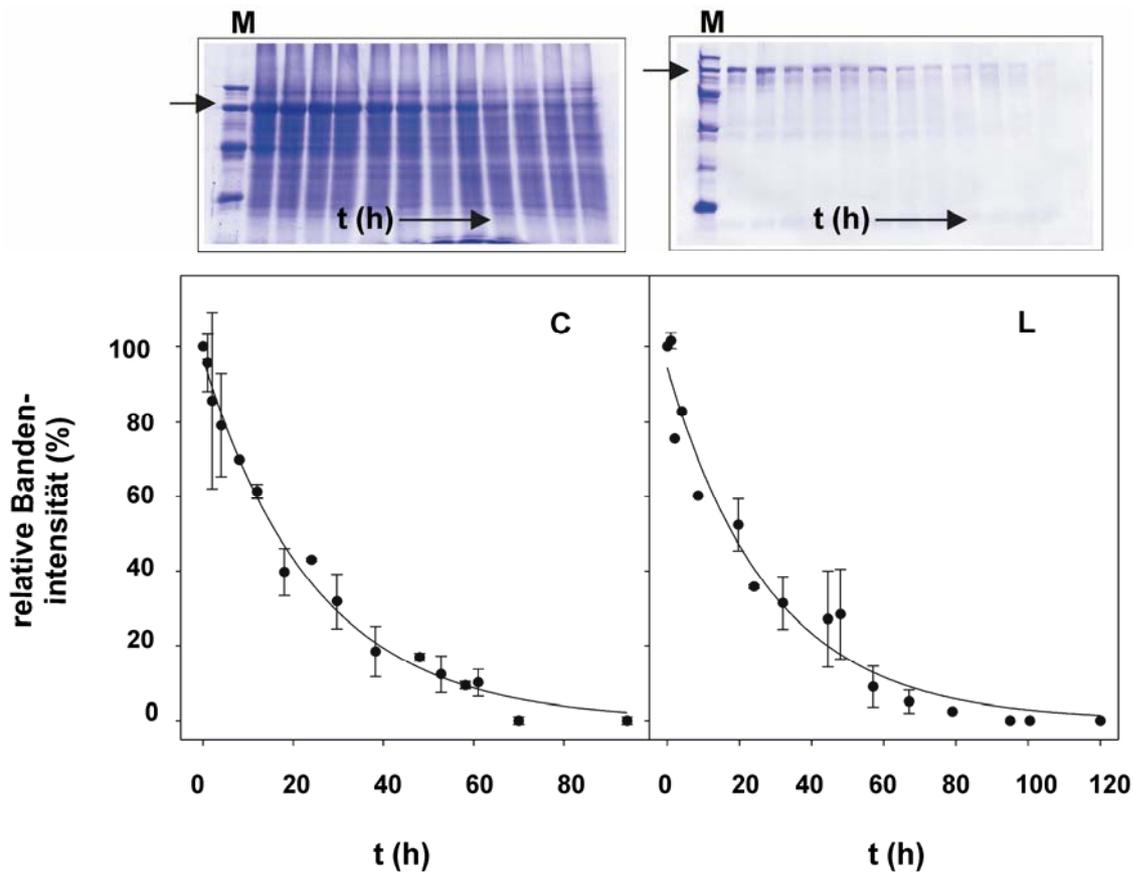


Abb. 38: Abbau von BSA durch die subzellulären Fraktionen Z und L

BSA ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) wurde in Gegenwart der subzellulären Fraktionen Z (**links**) und L (**rechts**) bei 37°C bis zu 94 h (L) bzw. 120 h (Z) inkubiert (3.5.4). Die nach SDS-PAGE (3.3.1) erhaltenen Elektropherogramme wurden nach Coomassie-Färbung densitometrisch evaluiert (3.3.3). Die nach Gleichung 3 (3.3.10.1) aus dem abgebildeten Graphen ermittelten Geschwindigkeitskonstanten des BSA-Abbaus betragen $(4,0 \pm 0,2) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ für Fraktion Z und $(3,5 \pm 0,3) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ für Fraktion L. Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung an, $n = 3$.

Für mikroinjizierte ^{125}I -markierte RNase A konnten Neff et al. (1981) in Fibroblasten in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen eine Halbwertszeit von 55–95 h extrapolieren. Dabei wurde sowohl die mikroinjizierte als auch die endozytotisch internalisierte RNase A hauptsächlich im lysosomalen Kompartiment abgebaut (McElligott et al., 1985), womit sich die hier beobachtete Proteolyseresistenz der ausgewählten RNase A-Varianten in Fraktion Z erklären lassen könnte. Die Proteolyseresistenz der RNase A-Varianten in Fraktion L kann dagegen nur durch die starke Verdünnung der lysosomalen Proteasen während der hypotonen Lyse erklärt werden. Ein Verlust der proteolytischen Aktivität in der lysosomalen Fraktion kann aufgrund des konstanten Verdaus von BSA über die untersuchte Zeitspanne ausgeschlossen werden (Abb. 38) und auch der Transport der RNasen vom Zytosol in die Lysosomen stellt aufgrund der Verwendung der bereits aufgeschlossenen Lysosomen keinesfalls eine Limitierung dar. Die Konzentration an Makromolekülen in lebenden Zellen liegt bei ungefähr $200\text{--}300 \text{ g l}^{-1}$ (Ellis und Minton, 2006). Während der subzellulären Fraktionierung verringert sich diese Konzentration jedoch sehr stark (Waschschritte, hypotone Lyse), wodurch die ohnehin nur extrapolierte

intrazelluläre Halbwertszeit von 80 h für RNase A (McElligott et al., 1985) unter den hier beschriebenen Testbedingungen nicht detektiert werden konnte. In verschiedenen Testsystemen konnte jedoch gezeigt werden, dass die intrazelluläre Halbwertszeit verschiedener RNase A-Varianten für zytotoxische Effekte völlig ausreicht (Leland et al., 1998b; Leich et al., 2006).

4.6.2 Intrazelluläre proteolytische Stabilität der RNase A-Tandemenzym-Varianten

Die proteolytische Stabilität des GP₃G-RNase A-Tandemenzyms wurde zusätzlich zu den oben beschriebenen Experimenten an intakten K562-Zellen untersucht (3.5.5.2). Die maximale Konzentration an internalisiertem Protein wird spätestens nach einer Inkubationszeit von 12 h erreicht. Die Zeitspanne zum Erreichen der maximalen intrazellulären Konzentration des internalisierten Proteins trägt stark zur Verzögerung der Manifestation zytotoxischer Effekte bei (Darzynkiewicz et al., 1988). In der untersuchten Zeitspanne von 12 bis 54 h konnte intrazellulär durch Immunoblotting stets eine konstante RNase A-Tandemenzym-Konzentration detektiert werden (Abb. 39). Durch fortlaufende Internalisierung könnte ein proteolytischer Abbau ausgeglichen werden, jedoch waren mittels Immunoblot keine Abbauprodukte (Fragmente) nachweisbar. Das GP₃G-RNase A-Tandemenzym ist mit einem IC₅₀-Wert von 70 µM die RNase A-Tandemenzym-Variante mit der geringsten zytotoxischen Wirkung. Gleichwohl ist die intrazelluläre Stabilität dieser Variante erwiesen, wodurch die unterschiedlich starken zytotoxischen Effekte der Tandemenzyme nicht auf Abweichungen ihrer physiologischen Stabilität beruhen.

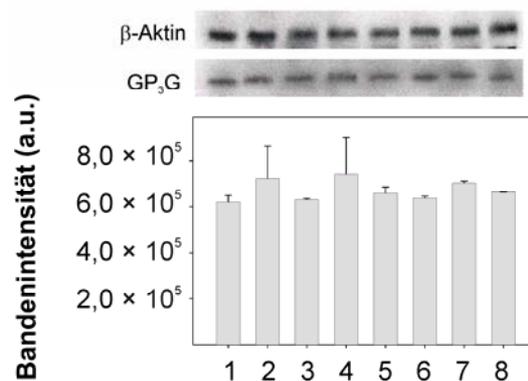


Abb. 39.: Zeitlicher Verlauf der GP₃G-RNase A-Tandemenzym-Konzentration nach Endozytose in K562-Zellen

Aliquots der Zelllinie K562 wurden für 12-54 h mit dem GP₃G-RNase A-Tandemenzym inkubiert (50 µM). Das internalisierte und somit einem proteolytischen Angriff ausgesetzte Protein wurde wie unter 3.5.5.2 beschrieben im zentrifugierten Zellhomogenat mittels Immunoblot detektiert. β-Aktin (43 kDa) diente als interner Standard.

1: 12 h, **2:** 18 h, **3:** 24 h, **4:** 30 h, **5:** 36 h, **6:** 42 h, **7:** 48 h, **8:** 54 h.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Bekämpfung von Tumorerkrankungen ist eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin. Die Vielfalt der Krebsleiden und die Nebenwirkungen vieler angewandeter Therapeutika erfordern die ständige Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze. Ziel dieser Arbeit war es, durch Tandemisierung pseudo-dimere, zytotoxische, auf RNase A-basierende Konstrukte zu generieren. Dazu wurden auf gentechnischem Weg zwei RNase A-Moleküle mittels eines Peptidlinkers fusioniert. Die sogenannten RNase A-Tandemenzyme sollten aus sterischen Gründen eine verminderte Affinität zum intrazellulären Ribonuklease-Inhibitor (RI) aufweisen, so dass ihre enzymatische Aktivität intrazellulär aufrechterhalten wird. Dabei sollte nur eine RNase A-Einheit des Gesamtmoleküls vom RI gebunden und inaktiviert werden können, während die andere RNase A-Einheit ungebunden und enzymatisch aktiv bleibt und dadurch die zytotoxischen Effekte des Konstrukts vermittelt.

Im Sinne der Aufgabenstellung war zunächst eine effiziente Klonierungsstrategie zur Herstellung der Genkonstrukte entwickelt worden, wobei deren Erzeugung durch Genduplikation mittels mehrstufiger PCR gelang. Die weitere Modifizierung der Linkersequenz erfolgte durch ortsgerichtete Mutagenese. Auf diese Weise wurden zunächst 11 verschiedene Tandemenzyme hergestellt, die sich hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung bzw. Länge der Linkersequenz unterscheiden (Tabelle 5). Zusätzlich wurde eine RI-evasive Kontrollvariante der monomeren RNase A (G88R-RNase A) und zwei teilevasive Referenzvarianten eines Tandemenzyms (G88R- bzw. G220R-SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym) erzeugt, um vergleichende Rückschlüsse auf das RI-Bindungs- bzw. Inaktivierungsverhalten zu erhalten. Die Expression der RNase A-Tandemenzyme gelang in Analogie zur bereits etablierten Expression von RNase A, wobei die RNase A-Tandemenzyme eine im Vergleich zur RNase A deutlich höhere Aggregationsneigung zeigten. Es war jedoch dennoch möglich, für alle Varianten hinreichende Mengen an Protein zu gewinnen, um Untersuchungen zur Konformation bzw. Kristallisation, Stabilität, Aktivität und Zytotoxizität durchführen zu können.

Die mittels CD-Spektroskopie angestellten Untersuchungen verdeutlichten, dass weder die Tandemisierung der RNase A noch die Linkerkomposition oder die Linkerlänge größeren Einfluss auf die Tertiär- und Sekundärstruktur der RNase A-Tandemenzyme im Vergleich zur monomeren RNase A haben. Gleiches gilt auch für die thermodynamische Stabilität dieser Konstrukte. Die Experimente zur thermodynamischen Stabilität (GdnHCl- und temperaturinduzierte Denaturierung) zeigten, dass alle Konstrukte eine im Vergleich zur monomeren RNase A unveränderte Stabilität aufweisen. Die $[D]_{50\%}$ -Werte von $(2,9 \pm 0,1)$ M und die T_m -Werte von $(62,1 \pm 1,3)^\circ\text{C}$ stimmen mit den Werten der RNase A ($2,8$ M und $63,3^\circ\text{C}$) sehr gut übereinstimmen. Dies bedeutet, dass wie bei den Untersuchungen zur Raumstruktur weder die Tandemisierung noch die Sequenz oder die Länge des Linkers einen größeren Einfluss auf die Stabilität der Konstrukte haben.

Aktivitätsuntersuchungen zeigten, dass die Aktivität aller Konstrukte zwar leicht herabgesetzt ist, jedoch für eine zytotoxische Wirkung völlig ausreichend sein sollte, da die

bisher potenteste zytotoxische RNase (ONC aus *Rana pipiens*) sogar eine um drei bis vier Größenordnungen geringere Aktivität als RNase A aufweist.

Im Gegensatz zur nicht zytotoxischen RNase A vermitteln die RNase A-Tandemenzyme eine deutliche Toxizität gegenüber Tumorzellen. Durch den Zytotoxizitätstest (Vitalitätstest) mit K562-Zellen wurden IC_{50} -Werte ermittelt, die im Bereich der bisher bekannten zytotoxischen RNase A-Varianten liegen. Der IC_{50} -Wert des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms ($13 \mu\text{M}$) ist mit dem IC_{50} -Wert der RI-evasiven G88R-RNase A ($7 \mu\text{M}$) vergleichbar, was für die Tandemenzyme ebenfalls RI-evasive Eigenschaften erwarten ließ.

Die Untersuchungen zur Inhibierung der Tandemkonstrukte durch den RI ergaben jedoch überraschenderweise ein RNase A-ähnliches Inaktivierungsverhalten, wohingegen das entsprechende Referenzprotein (G88R-RNase A) erwartungsgemäß nicht inhibiert wurde. Diese vollständige Inhibierbarkeit ließ zunächst die Bindung von zwei RI-Molekülen an ein Tandemenzym-Molekül vermuten (2:1-Bindungsstöchiometrie). Da jedoch die untere Nachweisgrenze im verwendeten Testsystem um mehr als vier Größenordnungen über dem K_d -Wert für RNase A liegt, ist es möglich, dass die K_d -Werte für die RNase A-Tandemenzyme dennoch um mehrere Größenordnungen gesteigert werden konnten, ohne dass dies im verwendeten Testsystem nachweisbar war.

Trotz der erwarteten Flexibilität der Peptidlinker gelang die Kristallisation und Strukturaufklärung der RNase A-Tandemenzyme. Die Analyse der Kristallstruktur lässt die Bindung von zwei RI-Molekülen an ein Tandemenzym-Molekül trotz vollständiger Inaktivierung in Gegenwart von RI nur bedingt möglich erscheinen. Sollte die räumliche Anordnung der beiden RNase A-Einheiten innerhalb des Kristalls in Lösung jedoch verloren gehen, wäre theoretisch eine 2:1-Bindungsstöchiometrie möglich.

Die Versuche zur RI-Bindung mittels Nativ-PAGE lieferten jedoch einen widersprüchlichen Befund. Augenscheinlich führt bereits die Bindung eines RI-Moleküls (1:1-Bindungsstöchiometrie) zur vollständigen Inaktivierung der RNase A-Tandemenzyme. Die Komplexbildung wurde deshalb zusätzlich durch Ultrazentrifugationsexperimente weitergehend analysiert, wobei die 1:1-Bindungsstöchiometrie im inaktiven RI-Tandemenzym-Komplex bestätigt werden konnte.

Durch die Herstellung der teilevasiven G88R- und G220R-Varianten des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms konnte durch Aktivitätsmessungen und Proteolysestudien in Gegenwart von RI gezeigt werden, dass beide RNase A-Einheiten unterschiedliche Affinitäten zum RI aufweisen, wobei die C-terminale RNase A-Einheit des RNase A-Tandemenzyms eine im Vergleich zur N-terminalen RNase A-Einheit schwächere Affinität zum RI besitzt.

Abschließende Untersuchungen zur Aufnahme in die Zellen durch subzelluläre Fraktionierung und quantitativer Analyse mittels Immunoblotting ergaben, dass die Aufnahme in die Zellen offenbar der limitierende Schritt ist, der die zytotoxische Potenz RNase-basierender Konstrukte determiniert. Durch die Verbesserung der Endozytoseeffizienz kann offenbar sogar eine Überkompensation der Inhibierung durch den RI erreicht werden. Der intrazelluläre proteolytische Abbau scheint hingegen nur von untergeordneter Bedeutung zu sein, da sich die untersuchten RNase A-Varianten als proteolyseresistent erwiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Strategie zur Herstellung zytotoxischer, auf Säuger-RNasen-basierender, potenzieller Antitumortheraeutika entwickelt werden. Diese Ergebnisse bilden somit eine hervorragende Grundlage für die Entwicklung weiterer Antitumortheraeutika auf der Grundlage von humaner pankreatischer RNase, die aufgrund ihres humanen Ursprungs immunologisch unbedenklich sein sollten.

Darüber hinaus liefert die vorliegende Arbeit einen entscheidenden neuen Aspekt für die Entfaltung der zytotoxischen Wirkung von RNasen *in vivo*. Im Gegensatz zur herkömmlichen Anschauung stellt offenbar nicht die RI-Evasion sondern die Endozytoseeffizienz das entscheidende Kriterium für RNase-basierende Antitumoreffekte dar.

Da der in der Literatur beschriebene und bisher verwendete Test zur Untersuchung der RI-Bindung über die Aktivität der RNase A-Konstrukte relativ insensitiv ist, könnte in weiterführenden Arbeiten versucht werden, einen alternativen, sensitiveren Test zu etablieren, der auf der Verwendung einer Fluorescein-markierten RNase A-Variante beruht. Die auf diese Weise erhaltenen K_d -Werte sollten Aufschluss darüber geben, ob die RI-Affinität der Konstrukte durch die Tandemisierung herabgesetzt werden konnte. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zytotoxische Potenz der RNase A-Tandemenzyme mit der Endozytoseeffizienz korreliert. Identische K_d -Werte bei unterschiedlicher Aminosäurekomposition und Länge der verwendeten Linker würden den untergeordneten Stellenwert der RI-Evasion als hauptsächliches Zytotoxizitätskriterium weiter untermauern.

Ferner ist die zytotoxische Potenz der teilevasiven SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyme (G88R bzw. G220R) zu analysieren. Die durch weitere Molekülpositivierung vermutlich stark erhöhte Endozytoseeffizienz dieser Konstrukte sollte die zytotoxische Wirkung weiter steigern.

Parallel dazu könnten Kokristallisationsstudien der RI•RNase A-Tandemenzym-Komplexe weitere interessante Aussagen über die intermolekularen Interaktionen und die damit verbundene sterische Behinderung des katalytischen Zentrums der ungebundenen RNase A-Einheit liefern und somit die vollständige Inaktivierung bei einer 1:1-Bindungsstöchiometrie erklären.

6 Literaturverzeichnis

- Adams GP & Weiner LM.** (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* **23**: 1147-1157.
- Amlot PL, Stone MJ, Cunningham D, Fay J, Newman J, Collins R, May R, McCarthy M, Richardson J, Ghetie V & et al.** (1993). A phase I study of an anti-CD22-deglycosylated ricin A chain immunotoxin in the treatment of B-cell lymphomas resistant to conventional therapy. *Blood* **82**: 2624-2633.
- Antignani A, Naddeo M, Cubellis MV, Russo A & D'Alessio G.** (2001). Antitumor action of seminal ribonuclease, its dimeric structure, and its resistance to the cytosolic ribonuclease inhibitor. *Biochemistry* **40**: 3492-3496.
- Ardelt B, Ardel W & Darzynkiewicz Z.** (2003). Cytotoxic ribonucleases and RNA interference (RNAi). *Cell Cycle* **2**: 22-24.
- Ardelt W, Mikulski SM & Shogen K.** (1991). Amino acid sequence of an anti-tumor protein from *Rana pipiens* oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases. *J Biol Chem* **266**: 245-251.
- Argos P.** (1990). An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *J Mol Biol* **211**: 943-958.
- Arnold U, Rücknagel KP, Schierhorn A & Ulbrich-Hofmann R.** (1996). Thermal unfolding and proteolytic susceptibility of ribonuclease A. *Eur J Biochem* **237**: 862-869.
- Arnold U, Schierhorn A & Ulbrich-Hofmann R.** (1998). Influence of the carbohydrate moiety on the proteolytic cleavage sites in ribonuclease B. *J. Protein Chem.* **17**: 397-405.
- Arnold U, Schulenburg C, Schmidt D & Ulbrich-Hofmann R.** (2006). Contribution of structural peculiarities of onconase to its high stability and folding kinetics. *Biochemistry* **45**: 3580-3587.
- Arnold U & Ulbrich-Hofmann R.** (2006). Natural and engineered ribonucleases as potential cancer therapeutics. *Biotechnol Lett* **28**: 1615-1622.
- Barth S, Winkler U, Diehl V & Engert A.** (1997). Immunotoxins. Mechanism of action and applications in malignant diseases. *Internist (Berl)* **38**: 1063-1069.
- Beintema JJ.** (1998). Introduction: the ribonuclease A superfamily. *Cell Mol Life Sci* **54**: 763-765.
- Benito A, Vilanova M & Ribó M.** (2008). Intracellular Routing of Cytotoxic Pancreatic-Type Ribonucleases. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **9**: 169-179.
- Blackburn P, Wilson G & Moore S.** (1977). Ribonuclease inhibitor from human placenta. Purification and properties. *J Biol Chem* **252**: 5904-5910.
- Blackburn P & Jailkhani BL.** (1979). Ribonuclease inhibitor from human placenta: interaction with derivatives of ribonuclease A. *J Biol Chem* **254**: 12488-12493.
- Blazquez M, Fominaya JM & Hofsteenge J.** (1996). Oxidation of sulfhydryl groups of ribonuclease inhibitor in epithelial cells is sufficient for its intracellular degradation. *J Biol Chem* **271**: 18638-18642.
- Bohley P, Kirschke H, Langner J & Ansorge S.** (1969). *FEBS Lett* **5**: 233-236.

- Boix E, Wu Y, Vasandani VM, Saxena SK, Ardelt W, Ladner J & Youle RJ.** (1996). Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity. *J Mol Biol* **257**: 992-1007.
- Bokemeyer C & Panse J.** (2005). Passive immunotherapy with monoclonal antibodies. *Onkologie* **28 Suppl 4**: 9-13.
- Bosch M, Benito A, Ribo M, Puig T, Beaumelle B & Vilanova M.** (2004). A nuclear localization sequence endows human pancreatic ribonuclease with cytotoxic activity. *Biochemistry* **43**: 2167-2177.
- Bosslet K, Straub R, Blumrich M, Czech J, Gerken M, Sperker B, Kroemer HK, Gesson JP, Koch M & Monneret C.** (1998). Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy. *Cancer Res* **58**: 1195-1201.
- Bracale A, Spalletti-Cernia D, Mastronicola M, Castaldi F, Mannucci R, Nitsch L & D'Alessio G.** (2002). Essential stations in the intracellular pathway of cytotoxic bovine seminal ribonuclease. *Biochem J* **362**: 553-560.
- Broadwell RD, Baker-Cairns BJ, Friden PM, Oliver C & Villegas JC.** (1996). Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. III. Receptor-mediated transcytosis through the blood-brain barrier of blood-borne transferrin and antibody against the transferrin receptor. *Exp Neurol* **142**: 47-65.
- Brunger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T & Warren GL.** (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**: 905-921.
- Burton LE & Fucci NP.** (1982). Ribonuclease inhibitors from the livers of five mammalian species. *Int J Pept Protein Res* **19**: 372-379.
- Cafaro V, De Lorenzo C, Piccoli R, Bracale A, Mastronicola MR, Di Donato A & D'Alessio G.** (1995). The antitumor action of seminal ribonuclease and its quaternary conformations. *FEBS Lett* **359**: 31-34.
- Casciola-Rosen LA & Hubbard AL.** (1991). Hydrolases in intracellular compartments of rat liver cells. Evidence for selective activation and/or delivery. *J Biol Chem* **266**: 4341-4347.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM & Deeley RG.** (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**: 1650-1654.
- Collaborative Computational Project Number4.** (1994). The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst* **D50**: 760-763.
- Conde FP, Orlandi R, Canevari S, Mezzanzanica D, Ripamonti M, Munoz SM, Jorge P & Colnaghi MI.** (1989). The Aspergillus toxin restriction is a suitable cytotoxic agent for generation of immunoconjugates with monoclonal antibodies directed against human carcinoma cells. *Eur J Biochem* **178**: 795-802.
- Corbishley TP, Johnson PJ & Williams R.** (1984). Serum ribonucleases. In *Methods of enzymatic catalysis*, 3rd ed. (ed. Bergmeyer HU), pp. 134-143. VCH, Weinheim.
- Costanzi J, Sidransky D, Navon A & Goldsweig H.** (2005). Ribonucleases as a novel pro-apoptotic anticancer strategy: review of the preclinical and clinical data for ranpirnase. *Cancer Invest* **23**: 643-650.

- Creamer TP & Campbell MN.** (2002). Determinants of the polyproline II helix from modeling studies. *Adv Protein Chem* **62**: 263-282.
- Crestfield AM, Stein WH & Moore S.** (1962). On the aggregation of bovine pancreatic ribonuclease. *Arch Biochem Biophys* **Suppl 1**: 217-222.
- Cuchillo CM, Pares X, Guasch A, Barman T, Travers F & Nogues MV.** (1993). The role of 2',3'-cyclic phosphodiesterases in the bovine pancreatic ribonuclease A catalysed cleavage of RNA: intermediates or products? *FEBS Lett* **333**: 207-210.
- Cuchillo CM, Moussaoui M, Barman T, Travers F & Nogues MV.** (2002). The exo- or endonucleolytic preference of bovine pancreatic ribonuclease A depends on its subsites structure and on the substrate size. *Protein Sci* **11**: 117-128.
- Cui XY, Fu PF, Pan DN, Zhao Y, Zhao J & Zhao BC.** (2003). The antioxidant effects of ribonuclease inhibitor. *Free Radic Res* **37**: 1079-1085.
- D'Alessio G, Di Donato A, Parente A & Piccoli R.** (1991). Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily. *Trends Biochem Sci* **16**: 104-106.
- D'Alessio G, Di Donato A, Mazzarella L & Piccoli R.** (1997). Seminal ribonuclease: The importance of diversity. In *Ribonucleases: Structures and Functions*. (eds. D'Alessio G, and Riordan JF), pp. 383-423. Academic Press, New York.
- Darzynkiewicz Z, Carter SP, Mikulski SM, Ardelt WJ & Shogen K.** (1988). Cytostatic and cytotoxic effects of Pannon (P-30 Protein), a novel anticancer agent. *Cell Tissue Kinet* **21**: 169-182.
- De Lorenzo C, Arciello A, Cozzolino R, Palmer DB, Laccetti P, Piccoli R & D'Alessio G.** (2004). A fully human antitumor immunoRNase selective for ErbB-2-positive carcinomas. *Cancer Res* **64**: 4870-4874.
- De Lorenzo C, Di Malta C, Cali G, Troise F, Nitsch L & D'Alessio G.** (2007). Intracellular route and mechanism of action of ERB-hRNase, a human anti-ErbB2 anticancer immunoagent. *FEBS Lett* **581**: 296-300.
- DeLano WL.** (2002). The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA. <http://www.pymol.org>.
- delCardayré SB & Raines RT.** (1995). A residue to residue hydrogen bond mediates the nucleotide specificity of ribonuclease A. *J Mol Biol* **252**: 328-336.
- delCardayré SB, Ribo M, Yokel EM, Quirk DJ, Rutter WJ & Raines RT.** (1995). Engineering ribonuclease A: production, purification and characterization of wild-type enzyme and mutants at Gln11. *Protein Eng* **8**: 261-273.
- Di Donato A, Cafaro V & D'Alessio G.** (1994). Ribonuclease A can be transformed into a dimeric ribonuclease with antitumor activity. *J Biol Chem* **269**: 17394-17396.
- Dickson KA, Haigis MC & Raines RT.** (2005). Ribonuclease inhibitor: structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **80**: 349-374.
- Edelman GM, Gall WE, Waxdal MJ & Konigsberg WH.** (1968). The covalent structure of a human gamma G-immunoglobulin. I. Isolation and characterization of the whole molecule, the polypeptide chains, and the tryptic fragments. *Biochemistry* **7**: 1950-1958.
- Ehrlich P.** (1956). The relations existing between chemical constitution, distribution and pharmacological action. In *The Collected Papers of Paul Ehrlich*. (eds. Himmelweite IF, Marquardt M, and Dale H), pp. 596-618. Pergamon Press, London-New York.

-
- Ellis RJ & Minton AP.** (2006). Protein aggregation in crowded environments. *Biol Chem* **387**: 485-497.
- Emsley P & Cowtan K.** (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 2126-2132.
- Fairbanks G, Steck TL & Wallach DF.** (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**: 2606-2617.
- Fersht A.** (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Firket H, Chevremont-Comhaire S & Chevremont M.** (1955). Action of ribonuclease on living cells in vitro and synthesis of deoxyribonucleic acid. *Nature* **176**: 1075-1076.
- Fominaya JM & Hofsteenge J.** (1992). Inactivation of ribonuclease inhibitor by thiol-disulfide exchange. *J Biol Chem* **267**: 24655-24660.
- Frankel AE, Kreitman RJ & Sausville EA.** (2000). Targeted toxins. *Clin Cancer Res* **6**: 326-334.
- Fruchter RG & Crestfield AM.** (1965). Preparation and properties of two active forms of ribonuclease dimer. *J Biol Chem* **240**: 3868-3874.
- Fuchs SM & Raines RT.** (2004). Pathway for polyarginine entry into mammalian cells. *Biochemistry* **43**: 2438-2444.
- Fuchs SM & Raines RT.** (2005). Polyarginine as a multifunctional fusion tag. *Protein Sci* **14**: 1538-1544.
- Fuchs SM, Rutkoski TJ, Kung VM, Groeschl RT & Raines RT.** (2007). Increasing the potency of a cytotoxin with an arginine graft. *Protein Eng Des Sel* **20**: 505-509.
- Futami J, Maeda T, Kitazoe M, Nukui E, Tada H, Seno M, Kosaka M & Yamada H.** (2001). Preparation of potent cytotoxic ribonucleases by cationization: enhanced cellular uptake and decreased interaction with ribonuclease inhibitor by chemical modification of carboxyl groups. *Biochemistry* **40**: 7518-7524.
- Futami J, Nukui E, Maeda T, Kosaka M, Tada H, Seno M & Yamada H.** (2002). Optimum modification for the highest cytotoxicity of cationized ribonuclease. *J Biochem (Tokyo)* **132**: 223-228.
- Futami J, Kitazoe M, Maeda T, Nukui E, Sakaguchi M, Kosaka J, Miyazaki M, Kosaka M, Tada H, Seno M, Sasaki J, Huh NH, Namba M & Yamada H.** (2005). Intracellular delivery of proteins into mammalian living cells by polyethylenimine-cationization. *J Biosci Bioeng* **99**: 95-103.
- Gasset M, Martinez del Pozo A, Onaderra M & Gavilanes JG.** (1989). Study of the interaction between the antitumour protein alpha-sarcin and phospholipid vesicles. *Biochem J* **258**: 569-575.
- Gasset M, Onaderra M, Thomas PG & Gavilanes JG.** (1990). Fusion of phospholipid vesicles produced by the anti-tumour protein alpha-sarcin. *Biochem J* **265**: 815-822.
- Gaur D, Swaminathan S & Batra JK.** (2001). Interaction of human pancreatic ribonuclease with human ribonuclease inhibitor. Generation of inhibitor-resistant cytotoxic variants. *J Biol Chem* **276**: 24978-24984.
- George RA & Heringa J.** (2002). An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. *Protein Eng* **15**: 871-879.

- Ghetie MA, Bright H & Vitetta ES.** (2001). Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood* **97**: 1392-1398.
- Gleich GJ, Loegering DA, Bell MP, Checkel JL, Ackerman SJ & McKean DJ.** (1986). Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 3146-3150.
- Govindan SV, Griffiths GL, Hansen HJ, Horak ID & Goldenberg DM.** (2005). Cancer therapy with radiolabeled and drug/toxin-conjugated antibodies. *Technol Cancer Res Treat* **4**: 375-391.
- Green NM.** (1975). Avidin. *Adv Protein Chem* **29**: 85-133.
- Grossbard ML, Multani PS, Freedman AS, O'Day S, Gribben JG, Rhuda C, Neuberg D & Nadler LM.** (1999). A Phase II study of adjuvant therapy with anti-B4-blocked ricin after autologous bone marrow transplantation for patients with relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* **5**: 2392-2398.
- Gullberg U, Widegren B, Arnason U, Egesten A & Olsson I.** (1986). The cytotoxic eosinophil cationic protein (ECP) has ribonuclease activity. *Biochem Biophys Res Commun* **139**: 1239-1242.
- Haigis MC, Kurten EL, Abel RL & Raines RT.** (2002). KFERQ sequence in ribonuclease A-mediated cytotoxicity. *J Biol Chem* **277**: 11576-11581.
- Haigis MC, Kurten EL & Raines RT.** (2003). Ribonuclease inhibitor as an intracellular sentry. *Nucleic Acids Res* **31**: 1024-1032.
- Haigis MC & Raines RT.** (2003). Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway. *J Cell Sci* **116**: 313-324.
- Halicka HD, Murakami T, Papageorgio CN, Mittelman A, Mikulski SM, Shogen K & Darzynkiewicz Z.** (2000). Induction of differentiation of leukaemic (HL-60) or prostate cancer (LNCaP, JCA-1) cells potentiates apoptosis triggered by onconase. *Cell Prolif* **33**: 407-417.
- Harries M & Smith I.** (2002). The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocr Relat Cancer* **9**: 75-85.
- Hartley RW.** (1980). Homology between prokaryotic and eukaryotic ribonucleases. *J Mol Evol* **15**: 355-358.
- Hinman LM, Hamann PR, Wallace R, Menendez AT, Durr FE & Upeslakis J.** (1993). Preparation and characterization of monoclonal antibody conjugates of the calicheamicins: a novel and potent family of antitumor antibiotics. *Cancer Res* **53**: 3336-3342.
- Hofsteenge J, Kieffer B, Matthies R, Hemmings BA & Stone SR.** (1988). Amino acid sequence of the ribonuclease inhibitor from porcine liver reveals the presence of leucine-rich repeats. *Biochemistry* **27**: 8537-8544.
- Hofsteenge J.** (1997). Ribonuclease inhibitor. In *Ribonucleases: Structures and Functions*. (eds. D'Alessio G, and Riordan JF), pp. 621-658. Academic Press, New York.
- Ilinskaya ON, Dreyer F, Mitkevich VA, Shaw KL, Pace CN & Makarov AA.** (2002). Changing the net charge from negative to positive makes ribonuclease Sa cytotoxic. *Protein Sci* **11**: 2522-2525.

- Irie M, Nitta K & Nonaka T.** (1998). Biochemistry of frog ribonucleases. *Cell Mol Life Sci* **54**: 775-784.
- Iyer S, Holloway DE, Kumar K, Shapiro R & Acharya KR.** (2005). Molecular recognition of human eosinophil-derived neurotoxin (RNase 2) by placental ribonuclease inhibitor. *J Mol Biol* **347**: 637-655.
- Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Giaccone G, Broxterman HJ, Meijer CJ, van der Valk P & Scheper RJ.** (1996). Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *Am J Pathol* **148**: 877-887.
- James AM, Ambrose EJ & Lowick JH.** (1956). Differences between the electrical charge carried by normal and homologous tumour cells. *Nature* **177**: 576-577.
- James R, Kleanthous C & Moore GR.** (1996). The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. *Microbiology* **142 (Pt 7)**: 1569-1580.
- Joensuu H.** (2008). Systemic chemotherapy for cancer: from weapon to treatment. *Lancet Oncol* **9**: 304.
- Johannes L & Decaudin D.** (2005). Protein toxins: intracellular trafficking for targeted therapy. *Gene Ther* **12**: 1360-1368.
- Johnson P & Glennie M.** (2003). The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells. *Semin Oncol* **30**: 3-8.
- Johnson RJ, McCoy JG, Bingman CA, Phillips GN, Jr. & Raines RT.** (2007). Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein. *J Mol Biol* **368**: 434-449.
- Jones TA, Zou JY, Cowan SW & Kjeldgaard M.** (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A* **47 (Pt 2)**: 110-119.
- Juan G, Ardelt B, Li X, Mikulski SM, Shogen K, Ardelt W, Mittelman A & Darzynkiewicz Z.** (1998). G1 arrest of U937 cells by onconase is associated with suppression of cyclin D3 expression, induction of p16INK4A, p21WAF1/CIP1 and p27KIP and decreased pRb phosphorylation. *Leukemia* **12**: 1241-1248.
- Juliano RL & Ling V.** (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **455**: 152-162.
- Kabsch W.** (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Cryst* **26**: 795-800.
- Kamiya Y, Oyama F, Oyama R, Sakakibara F, Nitta K, Kawauchi H, Takayanagi Y & Titani K.** (1990). Amino acid sequence of a lectin from Japanese frog (*Rana japonica*) eggs. *J Biochem* **108**: 139-143.
- Kao R & Davies J.** (1999). Molecular dissection of mitogillin reveals that the fungal ribotoxins are a family of natural genetically engineered ribonucleases. *J Biol Chem* **274**: 12576-12582.
- Kartha G, Bello J & Harker D.** (1967). Tertiary structure of ribonuclease. *Nature* **213**: 862-865.
- Kelemen BR, Klink TA, Behlke MA, Eubanks SR, Leland PA & Raines RT.** (1999). Hypersensitive substrate for ribonucleases. *Nucleic Acids Res* **27**: 3696-3701.

-
- Kim JS, Souček J, Matoušek J & Raines RT.** (1995a). Structural basis for the biological activities of bovine seminal ribonuclease. *J Biol Chem* **270**: 10525-10530.
- Kim JS, Souček J, Matoušek J & Raines RT.** (1995b). Mechanism of ribonuclease cytotoxicity. *J Biol Chem* **270**: 31097-31102.
- Kim JS, Souček J, Matoušek J & Raines RT.** (1995c). Catalytic activity of bovine seminal ribonuclease is essential for its immunosuppressive and other biological activities. *Biochem J* **308 (Pt 2)**: 547-550.
- Kobe B & Deisenhofer J.** (1993). Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature* **366**: 751-756.
- Kobe B & Deisenhofer J.** (1995). A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature* **374**: 183-186.
- Kobe B & Deisenhofer J.** (1996). Mechanism of ribonuclease inhibition by ribonuclease inhibitor protein based on the crystal structure of its complex with ribonuclease A. *J Mol Biol* **264**: 1028-1043.
- Köhler G & Milstein C.** (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497.
- Kojima K.** (1993). Molecular aspects of the plasma membrane in tumor cells. *Nagoya J Med Sci* **56**: 1-18.
- Krauss J, Arndt MA, Vu BK, Newton DL, Seeber S & Rybak SM.** (2005). Efficient killing of CD22+ tumor cells by a humanized diabody-RNase fusion protein. *Biochem Biophys Res Commun* **331**: 595-602.
- Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS & Thornton JM.** (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst* **26**: 283-291.
- Ledoux L & Baltus E.** (1954). The effects of ribonuclease on cells of Ehrlich carcinoma. *Experientia* **10**: 500-501.
- Ledoux L, Le Clerc J & Vander-Haeghe F.** (1954). Influence of ribonuclease on the division of amphibian eggs. *Nature* **174**: 793-794.
- Ledoux L.** (1955a). Action of ribonuclease on two solid tumours in vivo. *Nature* **176**: 36-37.
- Ledoux L.** (1955b). Action of ribonuclease on certain ascites tumours. *Nature* **175**: 258-259.
- Ledoux L & Revell SH.** (1955). Action of ribonuclease on neoplastic growth. I. Chemical aspects of normal tumour growth: the Landschutz ascites tumour. *Biochim Biophys Acta* **18**: 416-426.
- Ledoux L.** (1956). Action of ribonuclease on neoplastic growth. II. Action on Landschutz ascites cells in vitro. *Biochim Biophys Acta* **20**: 369-377.
- Lee FS, Fox EA, Zhou HM, Strydom DJ & Vallee BL.** (1988). Primary structure of human placental ribonuclease inhibitor. *Biochemistry* **27**: 8545-8553.
- Lee FS, Auld DS & Vallee BL.** (1989a). Tryptophan fluorescence as a probe of placental ribonuclease inhibitor binding to angiogenin. *Biochemistry* **28**: 219-224.

-
- Lee FS, Shapiro R & Vallee BL.** (1989b). Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor. *Biochemistry* **28**: 225-230.
- Lee I, Lee YH, Mikulski SM & Shogen K.** (2003). Effect of ONCONASE +/- tamoxifen on ASPC-1 human pancreatic tumors in nude mice. *Adv Exp Med Biol* **530**: 187-196.
- Lee I & Shogen K.** (2008). Mechanisms of enhanced tumoricidal efficacy of multiple small dosages of ranpirnase, the novel cytotoxic ribonuclease, on lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **62**: 337-346.
- Lee JE & Raines RT.** (2005). Cytotoxicity of bovine seminal ribonuclease: monomer versus dimer. *Biochemistry* **44**: 15760-15767.
- Lee JE & Raines RT.** (2008). Ribonucleases as novel chemotherapeutics : the ranpirnase example. *BioDrugs* **22**: 53-58.
- Leenders RG, Damen EW, Bijsterveld EJ, Scheeren HW, Houba PH, van der Meulen-Muileman IH, Boven E & Haisma HJ.** (1999). Novel anthracycline-spacer-beta-glucuronide,-beta-glucoside, and -beta-galactoside prodrugs for application in selective chemotherapy. *Bioorg Med Chem* **7**: 1597-1610.
- Leich F, Köditz J, Ulbrich-Hofmann R & Arnold U.** (2006). Tandemization endows bovine pancreatic ribonuclease with cytotoxic activity. *J Mol Biol* **358**: 1305-1313.
- Leich F, Stöhr N, Rietz A, Ulbrich-Hofmann R & Arnold U.** (2007). Endocytotic internalization as a crucial factor for the cytotoxicity of ribonucleases. *J Biol Chem* **282**: 27640-27646.
- Leland PA, Schultz LW, Kim BM & Raines RT.** (1998a). Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10407-10412.
- Leland PA, Schultz LW, Kim BM & Raines RT.** (1998b). Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10407-10412.
- Leland PA, Staniszewski KE, Kim B & Raines RT.** (2000). A synapomorphic disulfide bond is critical for the conformational stability and cytotoxicity of an amphibian ribonuclease. *FEBS Lett* **477**: 203-207.
- Leland PA & Raines RT.** (2001). Cancer chemotherapy - ribonucleases to the rescue. *Chem Biol* **8**: 405-413.
- Leland PA, Staniszewski KE, Kim BM & Raines RT.** (2001). Endowing human pancreatic ribonuclease with toxicity for cancer cells. *J Biol Chem* **276**: 43095-43102.
- Libonati M.** (2004). Biological actions of the oligomers of ribonuclease A. *Cell Mol Life Sci* **61**: 2431-2436.
- Libonati M & Gotte G.** (2004). Oligomerization of bovine ribonuclease A: structural and functional features of its multimers. *Biochem J* **380**: 311-327.
- Lilie H, Schwarz E & Rudolph R.** (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol* **9**: 497-501.
- Liu Y, Hart PJ, Schlunegger MP & Eisenberg D.** (1998). The crystal structure of a 3D domain-swapped dimer of RNase A at a 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3437-3442.
- Liu Y, Gotte G, Libonati M & Eisenberg D.** (2001). A domain-swapped RNase A dimer with implications for amyloid formation. *Nat Struct Biol* **8**: 211-214.

-
- Makarov AA & Ilinskaya ON.** (2003). Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. *FEBS Lett* **540**: 15-20.
- Mancheno JM, Gasset M, Onaderra M, Gavilanes JG & D'Alessio G.** (1994). Bovine seminal ribonuclease destabilizes negatively charged membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **199**: 119-124.
- Martinez-Ruiz A, Garcia-Ortega L, Kao R, Lacadena J, Onaderra M, Mancheno JM, Davies J, Martinez del Pozo A & Gavilanes JG.** (2001). RNase U2 and alpha-sarcin: a study of relationships. *Methods Enzymol* **341**: 335-351.
- Mastronicola MR, Piccoli R & D'Alessio G.** (1995). Key extracellular and intracellular steps in the antitumor action of seminal ribonuclease. *Eur J Biochem* **230**: 242-249.
- Matoušek J.** (1973). The effect of bovine seminal ribonuclease (AS RNase) on cells of Crocker tumour in mice. *Experientia* **29**: 858-859.
- Matoušek J, Poučkova P, Souček J & Skvor J.** (2002). PEG chains increase aspermatogenic and antitumor activity of RNase A and BS-RNase enzymes. *J Control Release* **82**: 29-37.
- Matoušek J, Gotte G, Poučkova P, Souček J, Slavík T, Vottariello F & Libonati M.** (2003a). Antitumor activity and other biological actions of oligomers of ribonuclease A. *J Biol Chem* **278**: 23817-23822.
- Matoušek J, Souček J, Slavík T, Tománek M, Lee JE & Raines RT.** (2003b). Comprehensive comparison of the cytotoxic activities of onconase and bovine seminal ribonuclease. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **136**: 343-356.
- Mazzarella L, Capasso S, Demasi D, Di Lorenzo G, Mattia CA & Zagari A.** (1993). Bovine seminal ribonuclease: structure at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **49**: 389-402.
- McClure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F & Clarke AE.** (1989). Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* **342**: 955-957.
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Storoni LC & Read RJ.** (2005). Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**: 458-464.
- McElligott MA, Miao P & Dice JF.** (1985). Lysosomal degradation of ribonuclease A and ribonuclease S-protein microinjected into the cytosol of human fibroblasts. *J Biol Chem* **260**: 11986-11993.
- McLaren DJ, McKean JR, Olsson I, Venges P & Kay AB.** (1981). Morphological studies on the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by human eosinophil and neutrophil cationic proteins in vitro. *Parasite Immunol* **3**: 359-373.
- Messmann RA, Vitetta ES, Headlee D, Senderowicz AM, Figg WD, Schindler J, Michiel DF, Creekmore S, Steinberg SM, Kohler D, Jaffe ES, Stetler-Stevenson M, Chen H, Ghetie V & Sausville EA.** (2000). A phase I study of combination therapy with immunotoxins IgG-HD37-deglycosylated ricin A chain (dgA) and IgG-RFB4-dgA (Combotox) in patients with refractory CD19(+), CD22(+) B cell lymphoma. *Clin Cancer Res* **6**: 1302-1313.
- Mikulski SM, Ardelt W, Shogen K, Bernstein EH & Menduke H.** (1990a). Striking increase of survival of mice bearing M109 Madison carcinoma treated with a novel protein from amphibian embryos. *J Natl Cancer Inst* **82**: 151-153.

- Mikulski SM, Viera A, Ardelt W, Menduke H & Shogen K.** (1990b). Tamoxifen and trifluoroperazine (Stelazine) potentiate cytostatic/cytotoxic effects of P-30 protein, a novel protein possessing anti-tumor activity. *Cell Tissue Kinet* **23**: 237-246.
- Mikulski SM, Viera A, Darzynkiewicz Z & Shogen K.** (1992). Synergism between a novel amphibian oocyte ribonuclease and lovastatin in inducing cytostatic and cytotoxic effects in human lung and pancreatic carcinoma cell lines. *Br J Cancer* **66**: 304-310.
- Mikulski SM, Costanzi JJ, Vogelzang NJ, McCachren S, Taub RN, Chun H, Mittelman A, Panella T, Puccio C, Fine R & Shogen K.** (2002). Phase II trial of a single weekly intravenous dose of ranpirnase in patients with unresectable malignant mesothelioma. *J Clin Oncol* **20**: 274-281.
- Mitchell DJ, Kim DT, Steinman L, Fathman CG & Rothbard JB.** (2000). Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept Res* **56**: 318-325.
- Moenner M, Vosoghi M, Ryazantsev S & Glitz DG.** (1998). Ribonuclease inhibitor protein of human erythrocytes: characterization, loss of activity in response to oxidative stress, and association with Heinz bodies. *Blood Cells Mol Dis* **24**: 149-164.
- Mosimann SC, Ardelt W & James MN.** (1994). Refined 1.7 Å X-ray crystallographic structure of P-30 protein, an amphibian ribonuclease with anti-tumor activity. *J Mol Biol* **236**: 1141-1153.
- Murthy BS & Sirdeshmukh R.** (1992). Sensitivity of monomeric and dimeric forms of bovine seminal ribonuclease to human placental ribonuclease inhibitor. *Biochem J* **281 (Pt 2)**: 343-348.
- Murthy BS, De Lorenzo C, Piccoli R, D'Alessio G & Sirdeshmukh R.** (1996). Effects of protein RNase inhibitor and substrate on the quaternary structures of bovine seminal RNase. *Biochemistry* **35**: 3880-3885.
- Nadano D, Yasuda T, Takeshita H, Uchide K & Kishi K.** (1994). Purification and characterization of human brain ribonuclease inhibitor. *Arch Biochem Biophys* **312**: 421-428.
- Naddeo M, Vitagliano L, Russo A, Gotte G, D'Alessio G & Sorrentino S.** (2005). Interactions of the cytotoxic RNase A dimers with the cytosolic ribonuclease inhibitor. *FEBS Lett* **579**: 2663-2668.
- Neff NT, Bourret L, Miao P & Dice JF.** (1981). Degradation of proteins microinjected into IMR-90 human diploid fibroblasts. *J Cell Biol* **91**: 184-194.
- Nesterenko MV, Tilley M & Upton SJ.** (1994). A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* **28**: 239-242.
- Newton DL, Ilercil O, Laske DW, Oldfield E, Rybak SM & Youle RJ.** (1992). Cytotoxic ribonuclease chimeras. Targeted tumoricidal activity *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* **267**: 19572-19578.
- Newton DL, Xue Y, Olson KA, Fett JW & Rybak SM.** (1996). Angiogenin single-chain immunofusions: influence of peptide linkers and spacers between fusion protein domains. *Biochemistry* **35**: 545-553.
- Newton DL, Xue Y, Boque L, Wlodawer A, Kung HF & Rybak SM.** (1997). Expression and characterization of a cytotoxic human-frog chimeric ribonuclease: potential for cancer therapy. *Protein Eng* **10**: 463-470.

- Newton DL, Hansen HJ, Mikulski SM, Goldenberg DM & Rybak SM.** (2001). Potent and specific antitumor effects of an anti-CD22-targeted cytotoxic ribonuclease: potential for the treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **97**: 528-535.
- Niculescu-Duvaz I, Friedlos F, Niculescu-Duvaz D, Davies L & Springer CJ.** (1999). Prodrugs for antibody- and gene-directed enzyme prodrug therapies (ADEPT and GDEPT). *Anticancer Drug Des* **14**: 517-538.
- Nitta K, Takayanagi G, Kawauchi H & Hakomori S.** (1987). Isolation and characterization of *Rana catesbeiana* lectin and demonstration of the lectin-binding glycoprotein of rodent and human tumor cell membranes. *Cancer Res* **47**: 4877-4883.
- Nitta K, Ozaki K, Ishikawa M, Furusawa S, Hosono M, Kawauchi H, Sasaki K, Takayanagi Y, Tsuiki S & Hakomori S.** (1994a). Inhibition of cell proliferation by *Rana catesbeiana* and *Rana japonica* lectins belonging to the ribonuclease superfamily. *Cancer Res* **54**: 920-927.
- Nitta K, Ozaki K, Tsukamoto Y, Furusawa S, Ohkubo Y, Takimoto H, Murata R, Hosono M, Hikichi N, Sasaki K & et al.** (1994b). Characterization of a *Rana catesbeiana* lectin-resistant mutant of leukemia P388 cells. *Cancer Res* **54**: 928-934.
- Notomista E, Catanzano F, Graziano G, Di Gaetano S, Barone G & Di Donato A.** (2001). Contribution of chain termini to the conformational stability and biological activity of onconase. *Biochemistry* **40**: 9097-9103.
- Notomista E, Mancheno JM, Crescenzi O, Di Donato A, Gavilanes J & D'Alessio G.** (2006). The role of electrostatic interactions in the antitumor activity of dimeric RNases. *Febs J* **273**: 3687-3697.
- Ogawa T, Tomita K, Ueda T, Watanabe K, Uozumi T & Masaki H.** (1999). A cytotoxic ribonuclease targeting specific transfer RNA anticodons. *Science* **283**: 2097-2100.
- Okabe Y, Katayama N, Iwama M, Watanabe H, Ohgi K, Irie M, Nitta K, Kawauchi H, Takayanagi Y, Oyama F & et al.** (1991). Comparative base specificity, stability, and lectin activity of two lectins from eggs of *Rana catesbeiana* and *R. japonica* and liver ribonuclease from *R. catesbeiana*. *J Biochem* **109**: 786-790.
- Olbricht CJ, Cannon JK, Garg LC & Tisher CC.** (1986). Activities of cathepsins B and L in isolated nephron segments from proteinuric and nonproteinuric rats. *Am J Physiol* **250**: F1055-1062.
- Olmo N, Turnay J, Gonzalez de Buitrago G, Lopez de Silanes I, Gavilanes JG & Lizarbe MA.** (2001). Cytotoxic mechanism of the ribotoxin alpha-sarcin. Induction of cell death via apoptosis. *Eur J Biochem* **268**: 2113-2123.
- Onaderra M, Mancheno JM, Gasset M, Lacadena J, Schiavo G, Martinez del Pozo A & Gavilanes JG.** (1993). Translocation of alpha-sarcin across the lipid bilayer of asolectin vesicles. *Biochem J* **295 (Pt 1)**: 221-225.
- Pace CN, Hebert EJ, Shaw KL, Schell D, Both V, Krajcikova D, Sevcik J, Wilson KS, Dauter Z, Hartley RW & Grimsley GR.** (1998). Conformational stability and thermodynamics of folding of ribonucleases Sa, Sa2 and Sa3. *J Mol Biol* **279**: 271-286.
- Papageorgiou AC, Shapiro R & Acharya KR.** (1997). Molecular recognition of human angiogenin by placental ribonuclease inhibitor - an X-ray crystallographic study at 2.0 Å resolution. *Embo J* **16**: 5162-5177.
- Pavlakakis N & Vogelzang NJ.** (2006). Ranpirnase - an antitumour ribonuclease: its potential role in malignant mesothelioma. *Expert Opin Biol Ther* **6**: 391-399.

- Piccoli R, Tamburrini M, Piccialli G, Di Donato A, Parente A & D'Alessio G.** (1992). The dual-mode quaternary structure of seminal RNase. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1870-1874.
- Piccoli R, Di Gaetano S, De Lorenzo C, Grauso M, Monaco C, Spalletti-Cernia D, Laccetti P, Cinatl J, Matoušek J & D'Alessio G.** (1999). A dimeric mutant of human pancreatic ribonuclease with selective cytotoxicity toward malignant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7768-7773.
- Poučkova P, Skvor J, Gotte G, Vottariello F, Slavik JT, Matoušek J, Laurents DV, Libonati M & Souček J.** (2006). Some biological actions of PEG-conjugated RNase A oligomers. *Neoplasma* **53**: 79-85.
- Raines RT.** (1998). Ribonuclease A. *Chem Rev* **98**: 1045-1066.
- Recht L, Torres CO, Smith TW, Raso V & Griffin TW.** (1990). Transferrin receptor in normal and neoplastic brain tissue: implications for brain-tumor immunotherapy. *J Neurosurg* **72**: 941-945.
- Ribo M, delCardayre SB, Raines RT, de Llorens R & Cuchillo CM.** (1996). Production of human pancreatic ribonuclease in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **7**: 253-261.
- Rietz A.** (2006). Untersuchung der Proteolysestabilität der Ribonuklease A-Tandemenzyme. In *Diplomarbeit*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.
- Riordan JF.** (1997). Structure and function of angiogenin. In *Ribonucleases: Structures and Functions*. (eds. D'Alessio G, and Riordan JF), pp. 445-489. Academic Press, New York.
- Rodriguez M, Torrent G, Bosch M, Rayne F, Dubremetz JF, Ribo M, Benito A, Vilanova M & Beaumelle B.** (2007). Intracellular pathway of Onconase that enables its delivery to the cytosol. *J Cell Sci* **120**: 1405-1411.
- Roth JS.** (1963). Ribonuclease activity and cancer: a review. *Cancer Res* **23**: 657-666.
- Rudolph R, Böhm G, Lilie H & Jaenicke R.** (1997). Folding Proteins. In *Protein Function: A Practical Approach*. (ed. Creighton TE), pp. 57-99. IRL press, Oxford.
- Rutkoski TJ, Kurten EL, Mitchell JC & Raines RT.** (2005). Disruption of shape-complementarity markers to create cytotoxic variants of ribonuclease A. *J Mol Biol* **354**: 41-54.
- Rybak SM, Saxena SK, Ackerman EJ & Youle RJ.** (1991). Cytotoxic potential of ribonuclease and ribonuclease hybrid proteins. *J Biol Chem* **266**: 21202-21207.
- Rybak SM, Pearson JW, Fogler WE, Volker K, Spence SE, Newton DL, Mikulski SM, Ardelt W, Riggs CW, Kung HF & Longo DL.** (1996). Enhancement of vincristine cytotoxicity in drug-resistant cells by simultaneous treatment with onconase, an antitumor ribonuclease. *J Natl Cancer Inst* **88**: 747-753.
- Rybak SM & Newton DL.** (1999). Natural and engineered cytotoxic ribonucleases: therapeutic potential. *Exp Cell Res* **253**: 325-335.
- Sacco G, Drickamer K & Wool IG.** (1983). The primary structure of the cytotoxin alpha-sarcin. *J Biol Chem* **258**: 5811-5818.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T.** (1989). *Molecular Cloning - a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

-
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Santoro MM & Bolen DW.** (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* **27**: 8063-8068.
- Saxena SK, Rybak SM, Winkler G, Meade HM, McGray P, Youle RJ & Ackerman EJ.** (1991). Comparison of RNases and toxins upon injection into *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **266**: 21208-21214.
- Saxena SK, Sirdeshmukh R, Ardelt W, Mikulski SM, Shogen K & Youle RJ.** (2002). Entry into cells and selective degradation of tRNAs by a cytotoxic member of the RNase A family. *J Biol Chem* **277**: 15142-15146.
- Scheffer GL, Wijngaard PL, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, Meijer CJ, Clevers HC & Scheper RJ.** (1995). The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med* **1**: 578-582.
- Schmid H, Lindmeier I, Schmitt H, Eissele R, Neuhaus G & Wehrmann M.** (1993). Nephrotoxicity of cyclosporine A in the rat. II. Reversible changes in intranephronal and urinary catalytic activities of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *Ren Physiol Biochem* **16**: 222-232.
- Schmid H, Koop M, Utermann S, Lambacher L, Mayer P & Schaefer L.** (1997). Specific catalytic activity of cathepsin S in comparison to cathepsins B and L along the rat nephron. *Biol Chem* **378**: 61-69.
- Schmid H, Sauerbrei R, Schwarz G, Weber E, Kalbacher H & Driessen C.** (2002). Modulation of the endosomal and lysosomal distribution of cathepsins B, L and S in human monocytes/macrophages. *Biol Chem* **383**: 1277-1283.
- Schröter CJ, Braun M, Englert J, Beck H, Schmid H & Kalbacher H.** (1999). A rapid method to separate endosomes from lysosomal contents using differential centrifugation and hypotonic lysis of lysosomes. *J Immunol Methods* **227**: 161-168.
- Schulenburg C, Ardelt B, Ardelt W, Arnold U, Shogen K, Ulbrich-Hofmann R & Darzynkiewicz Z.** (2007). The interdependence between catalytic activity, conformational stability, and cytotoxicity of onconase. *Cancer Biol Ther* **6**: 1233-1239.
- Sela M & Anfinsen CB.** (1957). Some spectrophotometric and polarimetric experiments with ribonuclease. *Biochim Biophys Acta* **24**: 229-235.
- Shan D, Ledbetter JA & Press OW.** (1998). Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood* **91**: 1644-1652.
- Sharkey RM & Goldenberg DM.** (2006). Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA Cancer J Clin* **56**: 226-243.
- Shirley BA.** (1995). Urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. In *Protein Stability and Folding: Theory and Practice*. (ed. Shirley BA), pp. 177-190. Humana Press, Totowa.
- Shogen K & Yoan WK.** (1973). Antitumor activity in extracts of Leopard frog (*Rana pipiens*) embryos. In *27th Annual Eastern Colleges Science Conference*, State College, PA, USA.

- Shtil AA.** (2002). Emergence of multidrug resistance in leukemia cells during chemotherapy: mechanisms and prevention. *J Hematother Stem Cell Res* **11**: 231-241.
- Slivinsky GG, Hymer WC, Bauer J & Morrison DR.** (1997). Cellular electrophoretic mobility data: a first approach to a database. *Electrophoresis* **18**: 1109-1119.
- Smith MR, Newton DL, Mikulski SM & Rybak SM.** (1999). Cell cycle-related differences in susceptibility of NIH/3T3 cells to ribonucleases. *Exp Cell Res* **247**: 220-232.
- Smyth DG, Stein WH & Moore S.** (1963). The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease: revisions and confirmations. *J Biol Chem* **238**: 227-234.
- Sonneveld P.** (2000). Multidrug resistance in haematological malignancies. *J Intern Med* **247**: 521-534.
- Sorrentino S, Barone R, Bucci E, Gotte G, Russo N, Libonati M & D'Alessio G.** (2000). The two dimeric forms of RNase A. *FEBS Lett* **466**: 35-39.
- Sponholz WR & Wunsch B.** (1980). Enzymatic determination of dihydroxyacetone in the presence of glycerol. *Z Lebensm Unters Forsch* **171**: 178-197.
- Spruyt M & Buquicchio F.** (1994). Gene Runner. Hastings Software, Inc., NY, USA.
- Stone MJ, Sausville EA, Fay JW, Headlee D, Collins RH, Figg WD, Stetler-Stevenson M, Jain V, Jaffe ES, Solomon D, Lush RM, Senderowicz A, Ghetie V, Schindler J, Uhr JW & Vitetta ES.** (1996). A phase I study of bolus versus continuous infusion of the anti-CD19 immunotoxin, IgG-HD37-dgA, in patients with B-cell lymphoma. *Blood* **88**: 1188-1197.
- Storrie B & Madden EA.** (1990). Isolation of subcellular organelles. *Methods Enzymol* **182**: 203-225.
- Suzuki M, Saxena SK, Boix E, Prill RJ, Vasandani VM, Ladner JE, Sung C & Youle RJ.** (1999). Engineering receptor-mediated cytotoxicity into human ribonucleases by steric blockade of inhibitor interaction. *Nat Biotechnol* **17**: 265-270.
- Swerts K, De Moerloose B, Dhooge C, Laureys G, Benoit Y & Philippe J.** (2006). Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* **42**: 295-309.
- Syrigos KN & Epenetos AA.** (1999). Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review of the experimental and clinical considerations. *Anticancer Res* **19**: 605-613.
- Tada H, Onizuka M, Muraki K, Masuzawa W, Futami J, Kosaka M, Seno M & Yamada H.** (2004). Insertional-fusion of basic fibroblast growth factor endowed ribonuclease 1 with enhanced cytotoxicity by steric blockade of inhibitor interaction. *FEBS Lett* **568**: 39-43.
- Thomas JA, Rostand J & Gregoire J.** (1946). Inhibitory action of minimal doses of ribonuclease on the segmentation of the egg of the russet frog. *C.R. Acad. Sci., Paris* **222**: 1139-1141.
- Thrush GR, Lark LR, Clinchy BC & Vitetta ES.** (1996). Immunotoxins: an update. *Annu Rev Immunol* **14**: 49-71.
- Tomita K, Ogawa T, Uozumi T, Watanabe K & Masaki H.** (2000). A cytotoxic ribonuclease which specifically cleaves four isoaccepting arginine tRNAs at their anticodon loops. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8278-8283.

- Vallee BL & Riordan JF.** (1997). Organogenesis and angiogenin. *Cell Mol Life Sci* **53**: 803-815.
- van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, Hagenbeek A & Ebeling SB.** (2006). Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res* **12**: 4027-4035.
- Vasandani VM, Burris JA & Sung C.** (1999). Reversible nephrotoxicity of onconase and effect of lysine pH on renal onconase uptake. *Cancer Chemother Pharmacol* **44**: 164-169.
- Vescia S, Tramontano D, Augusti-Tocco G & D'Alessio G.** (1980). In vitro studies on selective inhibition of tumor cell growth by seminal ribonuclease. *Cancer Res* **40**: 3740-3744.
- Vicentini AM, Kieffer B, Matthies R, Meyhack B, Hemmings BA, Stone SR & Hofsteenge J.** (1990). Protein chemical and kinetic characterization of recombinant porcine ribonuclease inhibitor expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **29**: 8827-8834.
- Viola M, Libra M, Callari D, Sinatra F, Spada D, Noto D, Emmanuele G, Romano F, Averna M, Pezzino FM, Stivala F & Travali S.** (2005). Bovine seminal ribonuclease is cytotoxic for both malignant and normal telomerase-positive cells. *Int J Oncol* **27**: 1071-1077.
- Vogelzang NJ, Aklilu M, Stadler WM, Dumas MC & Mikulski SM.** (2001). A phase II trial of weekly intravenous ranpirnase (Onconase), a novel ribonuclease in patients with metastatic kidney cancer. *Invest New Drugs* **19**: 255-260.
- Wlodawer A, Bott R & Sjolín L.** (1982). The refined crystal structure of ribonuclease A at 2.0 Å resolution. *J Biol Chem* **257**: 1325-1332.
- Wlodawer A, Svensson LA, Sjolín L & Gilliland GL.** (1988). Structure of phosphate-free ribonuclease A refined at 1.26 Å. *Biochemistry* **27**: 2705-2717.
- Wool IG, Gluck A & Endo Y.** (1992). Ribotoxin recognition of ribosomal RNA and a proposal for the mechanism of translocation. *Trends Biochem Sci* **17**: 266-269.
- Wu Y, Mikulski SM, Ardelt W, Rybak SM & Youle RJ.** (1993). A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity. *J Biol Chem* **268**: 10686-10693.
- Wu Y, Saxena SK, Ardelt W, Gadina M, Mikulski SM, De Lorenzo C, D'Alessio G & Youle RJ.** (1995). A study of the intracellular routing of cytotoxic ribonucleases. *J Biol Chem* **270**: 17476-17481.
- Yoshida H.** (2001). The ribonuclease T1 family. *Methods Enzymol* **341**: 28-41.
- Youle RJ & D'Alessio G.** (1997). Antitumor RNases. In *Ribonucleases: Structures and Functions*. (eds. D'Alessio G, and Riordan JF), pp. 491-514. Academic Press, New York.
- Zafir-Lavie I, Michaeli Y & Reiter Y.** (2007). Novel antibodies as anticancer agents. *Oncogene* **26**: 3714-3733.
- Zewe M, Rybak SM, Dubel S, Coy JF, Welschhof M, Newton DL & Little M.** (1997). Cloning and cytotoxicity of a human pancreatic RNase immunofusion. *Immunotechnology* **3**: 127-136.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2003	3
Abb. 2:	Mutmaßliche intrazelluläre Route von RNase A	14
Abb. 3:	Kristallstruktur des pRI•RNase A-Komplexes	15
Abb. 4:	Kristallstrukturen der BS-RNase	16
Abb. 5:	Kristallstrukturen verschiedener RNase A-Multimere	18
Abb. 6:	Kristallstrukturen und schematische Darstellung der Disulfidbrücken von RNase A und ONC	19
Abb. 7:	Aminosäuresequenz von RNase A nach Smyth et al. (1963).	27
Abb. 8:	Mechanismus der RNase A katalysierten Transphosphorylierung (A) und der Hydrolysereaktion (B)	28
Abb. 9:	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der RNase A-Tandemenzym-Varianten	61
Abb. 10:	SDS-PAGE-Gel über den Verlauf der Expression, der Präparation der <i>inclusion bodies</i> und der Renaturierung am Beispiel des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms.	63
Abb. 11:	Kationenaustauschchromatogramme des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms	63
Abb. 12:	SDS-PAGE der mittels Kationenaustauschchromatographie gereinigten RNase A-Tandemenzym-Varianten.....	64
Abb. 13:	Nah- und Fern-UV-CD-Spektren von RNase A und ihren Tandemenzym-Varianten	65
Abb. 14:	Temperaturinduzierte Übergangskurven von RNase A und ihren Tandemenzym-Varianten	67
Abb. 15:	GdnHCl-induzierte Übergangskurven von RNase A und ihren Tandemenzym-Varianten	68
Abb. 16:	Zytotoxische Aktivität der RNase A-Tandemenzym-Varianten	70
Abb. 17:	SDS-PAGE-Gel des mittels Affinitäts- (A) und Anionenaustauschchromatographie (B) gereinigten RI.....	72
Abb. 18:	Anionenaustauschchromatogramm des RI.....	73
Abb. 19:	Aktivität verschiedener RNase A-Varianten in Abhängigkeit von der RI-Konzentration.....	74
Abb. 20:	Komplexbildung zwischen RI und dem SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym im Vergleich zum RI•RNase A-Komplex	75
Abb. 21:	RI•SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym-Komplexe.....	76
Abb. 22:	Nativ-PAGE- und SDS-PAGE-Gel zur Bestimmung des RI-Gehalts des RI•SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym-Komplexes im Vergleich zum RI•RNase A-Komplex	76
Abb. 23:	Analytische Ultrazentrifugation des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms in Anwesenheit des RI	78
Abb. 24:	SDS-PAGE-Gele des proteolytischen Abbaus des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms durch Trypsin in Ab- und Anwesenheit des RI.....	79
Abb. 25:	Nativ-PAGE-Gel des proteolytischen Abbaus des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms durch Trypsin in Gegenwart des RI.....	79
Abb. 26:	Vergleich der Aktivität verschiedener RNase A-Varianten in Abhängigkeit von der RI-Konzentration	81
Abb. 27:	SDS-PAGE-Gele des proteolytischen Abbaus der G88R- und G220R-SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym-Varianten durch Trypsin in Gegenwart des RI.....	82

Abb. 28:	Tryptischer Verdau des G88R-, G220R- und SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms in Gegenwart des RI	82
Abb. 29:	Einfluss der Gly→Arg-Substitution auf die RI-Affinität	83
Abb. 30:	Proteinkristalle des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms	84
Abb. 31:	Kristallstruktur des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms	86
Abb. 32:	Alignment des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms mit dem RI•RNase A-Komplex	87
Abb. 33:	Modellierung des RI•SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym-Komplexes bei gestreckter Linkerkonformation	88
Abb. 34:	Schematische Darstellung der subzellulären Fraktionierung	90
Abb. 35:	Spezifische Aktivitäten der subzellulären Leitenzyme	91
Abb. 36:	Nachweis und Quantifizierung der internalisierten RNase A-Varianten in den subzellulären Fraktionen	93
Abb. 37:	SDS-PAGE-Gele des zeitlichen Verlaufs der Inkubation verschiedener RNase A-Varianten in den subzellulären Fraktionen Z und L	94
Abb. 38:	Abbau von BSA durch die subzellulären Fraktionen Z und L	95
Abb. 39.:	Zeitlicher Verlauf der GP ₃ G-RNase A-Tandemenzym-Konzentration nach Endozytose in K562-Zellen	96

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Oligonukleotide zur Erzeugung der <i>rnase A</i> -Gene mit den entsprechenden 5'- bzw. 3'-Linkersequenzen.	35
Tabelle 2: Thermocyclerprogramm der ersten beiden PCR-Reaktionen	36
Tabelle 3: Thermocyclerprogramm der 3. PCR-Reaktion	36
Tabelle 4: Oligonukleotide zur schrittweisen Modifizierung der Linkersequenzen der <i>rnase A-tandemenzym</i> -Gene.	37
Tabelle 5: Linkersequenzen der RNase A-Tandemenzyme	61
Tabelle 6: Stabilitätsparameter, katalytische Aktivität und Zytotoxizität der RNase A und ihrer Tandemenzym-Varianten	69
Tabelle 7: Statistik der Datensammlung und Verfeinerung der Struktur des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms	85

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und diese Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen angefertigt habe.

Halle/Saale, den 05.08.2008

CURRICULUM VITAE

Name: Leich
Vorname: Franziska
Geburtsdatum: 12.10.1979
Geburtsort: Karl-Marx-Stadt (heute Chemnitz)
Wohnanschrift: Lunzbergring 14, 06120 Halle (Saale)
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/1986 – 02/1989 Besuch der Polytechnischen Oberschule Artur-Becker in Chemnitz
03/1989 – 07/1992 Besuch der Polytechnischen Oberschule Juri-Gagarin in Chemnitz
09/1992 – 07/1998 Besuch des Carl-Friedrich-Gauß-Gymnasiums in Chemnitz mit
Abschluss der allgemeinen Hochschulreife
(Durchschnittsnote: 1,9)

Studium

10/1998 – 09/2003 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diplomarbeit zum Thema „Design eines potentiell zytotoxischen Ribonuklease A-Tandemenzyms“ in der Abteilung „Technische Enzymologie“ des Instituts für Biotechnologie bei Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann, Naturwissenschaftliche Fakultät 1, Abschluss: Diplom (Durchschnittsnote: 1,7)

10/2003 – 12/2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für „Physiologische Chemie“, Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

seit 01/2004 Promotion in der Abteilung „Technische Enzymologie“ des Instituts für Biotechnologie bei Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann, Naturwissenschaftliche Fakultät 1, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

09/2004 Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. T. Raines (Department of Biochemistry, University of Wisconsin, Madison, WI, USA)

Halle/Saale, August 2008

Franziska Leich

Publikationsliste

Leich F, Köditz J, Ulbrich-Hofmann R & Arnold U. (2006). Tandemization endows bovine pancreatic ribonuclease with cytotoxic activity. *J Mol Biol* **358**: 1305-1313.

Leich F, Stöhr N, Rietz A, Ulbrich-Hofmann R & Arnold U. (2007). Endocytotic internalization as a crucial factor for the cytotoxicity of ribonucleases. *J Biol Chem* **282**: 27640-27646.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2004 bis August 2008 am Institut für Biotechnologie unter Anleitung von Herrn PD Dr. Ulrich Arnold angefertigt. Für das Zustandekommen dieser Arbeit habe ich vielfältige Unterstützung erhalten, für die ich hier danken möchte.

Ich danke Frau Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann für die Vergabe des interessanten Themas, für ihr Interesse, ihre Diskussionsbereitschaft und besonders für die Toleranz meiner mitunter ungewöhnlichen Arbeitszeiten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Ulrich Arnold, für das stetige Interesse am Voranschreiten der Arbeit, die Diskussionsbereitschaft, das entgegengebrachte Vertrauen in mich und meine Arbeit, die Hilfsbereitschaft bei kleineren und größeren Problemchen und nicht zuletzt für das fleißige Korrekturlesen.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Dr. Jens Köditz bedanken, der mir den Wiedereinstieg in die Arbeitsgruppe erleichterte und mir besonders während der Diplomzeit und im ersten Jahr meiner Promotion mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn PD Dr. Hauke Lilie aus der Abteilung „Technische Biochemie“ danke ich für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugation und für wichtige oder anregende Hinweise und Diskussionen.

Herrn Dr. Piotr Neumann aus der Abteilung „Physikalische Biotechnologie“ danke ich für die Unterstützung bei der Kristallisation und für die Durchführung der Röntgenstrukturanalyse.

Frau Dr. Angelika Schierhorn von der Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft in Halle danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Herrn PD Dr. Thomas Brüser aus der Abteilung „Allgemeine Mikrobiologie“ danke ich für die hilfreichen Hinweise bezüglich der subzellulären Fraktionierung und für die Bereitstellung der Ultrazentrifuge.

Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeitern der Abteilung „Technische Enzymologie“ für das angenehme und produktive Arbeitsklima. Die nicht immer fachbezogenen Diskussionen mit Dr. Jens Köditz, Dr. Susanne (Susi) Haufe, Dr. Hagen Hofmann, Dr. Knut Kölbl, Martin Dippe, Pascal Pecher, Anne Rietz und PD Dr. Ulrich (Uli) Arnold in den Kaffee- oder Weinpausen haben so manche Durststrecke erträglicher gemacht, Fragen geklärt oder aufgeworfen.

Ich danke meiner Freundin Katja Müller für all ihre Unterstützung, Ehrlichkeit und Freundschaft und meinen Freunden (besonders Felix Stehle, Martin Dippe, Pascal Pecher und Dr. Roman Dallüge) für viele offene Ohren und den Spaß nach Feierabend.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern Heike und Holger Leich und bei meinen Großeltern Traudel und Wolfgang Görner für ihr Verständnis, ihre Liebe und bedingungslose Unterstützung in jeder Lebenslage bedanken.

Außerdem sei an dieser Stelle noch dem fleißigsten und konzentriertesten Korrekturleser Felix Stehle gedankt.

Für finanzielle Unterstützung danke ich dem Land Sachsen-Anhalt, dem Deutschen Akademischen Austauschdienst, dem Verbundprojekt Wachstumskern Halle und der Frauenförderung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Meinem Freund Hagen danke ich für alles.

Und zum Schluss Dank an meine beiden Hunde und treuen Schreibtischgefährten Eddi und Lea, dafür dass sie den Schreibtisch bewachten und die Nachtfalter in Schach hielten.