

Biotechnologische Anwendungen polyionischer Fusionspeptide

Dissertation

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

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Susanne A. Richter
geb. am 07.10.1970 in Neuwied

Gutachter:

1. Prof. Dr. Rainer Rudolph
2. PD Dr. Ursula Rinas
3. Prof. Dr. Johannes Buchner

Promotionsgesuch eingereicht am: 02.07.01

Tag der öffentlichen Verteidigung: 30.11.01

2001

urn:nbn:de:gbv:3-000002701

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000002701>]

Nur der Mensch, der sich innerlich dem Unheil aussetzt,
kann erfahren, was ist, und den Antrieb gewinnen, es zu ändern.

Karl Jaspers

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen..... IV

1 Einleitung1

1.1 Bispezifische Antikörper und bifunktionelle Antikörper(fragment)-Enzym-Konjugate..	2
1.2 Möglichkeiten zur Matrix-unterstützten Renaturierung von Proteinen.....	8
1.3 Elektrostatische Wechselwirkungen.....	14
1.4 Kovalente Chromatographie und Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen.....	16
1.5 Vorstellung der Modellproteine	18
1.5.1 α -Glucosidase PI aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
1.5.2 MAK33	19
1.6 Problemstellung.....	22

2 Material und Methoden.....23

2.1 Materialien	23
2.1.1 Geräte.....	23
2.1.2 Chemikalien, Molekulargewichtsstandards und Referenzproteine, Kits, Reagenzien und Enzyme, Peptide, sonstiges Material	24
2.1.3 Plasmide und Vektoren.....	29
2.1.3.1 Ausgangskonstrukte.....	29
2.1.3.2 Selbsterstellte Konstrukte	30
2.1.4 Oligonukleotide	31
2.1.5 Mikroorganismen.....	33
2.1.6 Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer und Lösungen.....	33
2.1.7 Verwendete Chromatographiematerialien und -säulen.....	36
2.2 Methoden	37
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	37
2.2.1.1 Klonierung und Sequenzierung	37
2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion	37
2.2.2 Konstruktion der Expressionsvektoren.....	37
2.2.2.1 Vektoren zur Expression der cDNA des Fd-Fragmentes von MAK33 mit unterschiedlichen Fusionspeptiden.....	37
2.2.2.2 Vektoren zur Expression der α -Glucosidase-cDNA mit N-terminalen Fusionspeptiden.....	38

2.2.2.3 Vektoren zur Expression der α -Glucosidase-cDNA mit C-terminalen Fusionspeptiden	39
2.2.3 Stammhaltung und Kultivierung von Mikroorganismen	40
2.2.3.1 Stammhaltung und Anzucht von Mikroorganismen	40
2.2.3.2 Kultivierungen zur Gewinnung von löslichem Protein	40
2.2.3.3 Bioreaktorkultivierungen	41
2.2.4 Proteinchemische Methoden	41
2.2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	41
2.2.4.2 Western Blot	42
2.2.4.3 Proteinbestimmung	43
2.2.4.4 Bestimmung freier SH-Gruppen	44
2.2.4.5 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von α -Glucosidase	45
2.2.4.6 ELISA zum Nachweis von funktionellem Fab-Fragment	46
2.2.4.7 Creatinkinase-Hemmtest	47
2.2.4.8 Herstellung des Rohextraktes zur Isolierung von löslichem Protein	48
2.2.4.9 Isolierung von <i>inclusion bodies</i>	49
2.2.4.10 Solubilisierung von <i>inclusion bodies</i>	50
2.2.4.12 Matrix-unterstützte Reaktivierung	52
2.2.4.13 Konzentrierung von Proteinlösungen	53
2.2.4.14 Assoziation von Proteinen	54
2.2.4.15 K_d -Wert-Bestimmung der Assoziationsreaktion	54
2.2.4.16 Bifunktionalitätsassay	55
2.2.5 Chromatographische Methoden	55
2.2.5.1 Ionenaustauschchromatographie	55
2.2.5.2 Gelfiltrationschromatographie	59
2.2.5.3 Reversed Phase-HPLC	59
2.2.5.4 Kovalente Affinitätschromatographie an Sepharose-ACK8A	60
2.2.6 Kooperativität der Bindung polyionischer Fusionspeptide an Ionenaustauschermaterialien	61
2.2.7 Massenspektrometrie von Peptiden mit MALDI	62
2.2.8 N-terminale Sequenzierung	62
2.2.9 Kopplung von Peptiden an CNBr-aktivierte Sepharose	63
2.2.10 Analytische Ultrazentrifugation	63
2.2.11 CD-Spektroskopie	64

2.2.12 Lyophilisation von Proteinproben	64
3 Ergebnisse.....	65
3.1 Herstellung und Reinigung von Proteinen mit polyionischen Fusionspeptiden	65
3.1.1 Herstellung und Reinigung von Varianten des Fab-Fragmentes mit polyionischem Fusionspeptid	66
3.1.2 Herstellung und Reinigung von Varianten der α -Glucosidase mit polyionischem Fusionspeptid	75
3.2 Matrix-unterstützte Reaktivierung von α -GlucosidaseE10C.....	81
3.3 Entwicklung einer Strategie zur Charakterisierung und Feinreinigung von Proteinen mit C-terminalen Fusionspeptiden - kovalente Affinitätschromatographie ...	90
3.3.1 Herstellung und Charakterisierung des Chromatographiemateriales	90
3.3.2 Entwicklung der Methode der kovalenten Affinitätschromatographie.....	93
3.4 Bildung eines Antikörperfragment-Enzym-Konjugates durch gerichtete Assoziation und kovalente Verknüpfung mittels polyionischer Fusionspeptide	101
3.4.1 Optimierung der Assoziationsreaktion	102
3.4.2 Spezifität der Reaktion.....	106
3.4.3 Stabilität des Assoziationsproduktes	106
3.4.4 Charakterisierung des Fab-Fragment-Enzym-Konjugates.....	108
4 Diskussion.....	114
4. 1 Einfluß polyionischer Fusionspeptide auf die rekombinante Herstellung und Reinigung heterologer Proteine	114
4.2 Matrix-unterstützte Reaktivierung eines Proteins mit polyionischem Fusionspeptid an einem Anionenaustauscher.....	120
4.3 Entwicklung einer chromatographischen Methode zur Charakterisierung und Feinreinigung von Proteinen mit C-terminalen polyanionischen Fusionspeptiden – kovalente Affinitätschromatographie.....	124
4.4 Bildung eines Antikörperfragment-Enzym-Konjugates durch gerichtete Assoziation mittels polyionischer Fusionspeptide.....	128
5 Zusammenfassung	134
6 Literaturverzeichnis	137

Abkürzungen

Å	Ångström; $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino- <i>di</i> [3-ethylbenzthiazolin]sulfonat
ACE10	anionisches synthetisches Peptid der Sequenz AlaCysGluGluGluGluGluGluGluGluGluGlu
ACK8A	kationisches synthetisches Peptid der Sequenz AlaCysLysLysLysLysLysLysLysLysAla
ADEPT	<i>antibody directed enzyme prodrug therapy</i>
ADP	Adenosindiphosphat
α -Gluc	α -Glucosidase
α -GlucE10C	Proteinvariante der α -Glucosidase mit C-terminalem Fusionspeptid der Sequenz GlyGluGluGluGluGluGluGluGluGluGluCysGlyPro
α -GlucR10C	Proteinvariante der α -Glucosidase mit C-terminalem Fusionspeptid der Sequenz GlyArgArgArgArgArgArgArgArgArgCysGlyPro
α -Gluc-WT	Wildtypprotein der α -Glucosidase PI
AK	Antikörper
Amp ^r	Marker, der Resistenz gegenüber Ampicillin vermittelt
ATP	Adenosintriphosphat
ATTEMPTS	<i>antibody targeted triggered electrically modified prodrug type strategy</i>
B3	monoklonaler Antikörper, der gegen das Oligosaccharid Lewis Y gerichtet ist, das auf vielen humanen Tumorzellen präsentiert wird
bp	Basenpaare
BPTI	<i>bovine pancreatic trypsin inhibitor</i>
CD	Circulardichroismus
CDX	<i>clustered differentiation</i> ; antigene Determinante auf der Oberfläche von Zellen, z. B. CD20

CDR	<i>complement determining region</i> ; Bereiche in den variablen Domänen eines Antikörpers, die für die Antigenerkennung verantwortlich sind
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
CNBr-	Bromcyan-
C-Terminus	Carboxylende einer Peptidkette
$dE_{365 \text{ nm}}/dt$	zeitliche Änderung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 365 nm
DEAE	Diethylaminoethyl-
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithio- <i>bis</i> (2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiotreitol
$E_{280 \text{ nm}}$	Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm
EA	enzymatische Aktivität in [U/mg] bzw. [U/nmol]
E.C.	<i>Enzyme Commission</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	antigenbindendes Fragment, bestehend aus der leichten Kette sowie der variablen und ersten konstanten Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
FabE10C	Antikörperfragment mit dem Fusionspeptid GluGluGluGluGluGluGluGluGluGluSerCysPro am C-Terminus des Fd-Fragmentes
FabR10C	Antikörperfragment mit dem Fusionspeptid ArgArgArgArgArgArgArgArgArgSerCysPro am C-Terminus des Fd-Fragmentes
Fc	zweite und dritte konstante Domäne eines Antikörpers
Fd	variable und erste konstante Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
FdX	Fd-Fragment mit einem C-terminalen polyionischen Fusionspeptid

Fv	antigenbindendes Fragment, bestehend aus den variablen Domänen der schweren und leichten Kette
g	Erdbeschleunigung
Gdn-HCl	Guanidiniumhydrochlorid
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	Geschwindigkeitskonstante
κ	Typ der leichten Kette eines Immunglobulins
kD	Kilodalton
K_d	Dissoziationskonstante
K_M	Michaelis-Konstante, ist ein Maß für die Substrataffinität eines Enzyms
K_n^r	Marker, der Resistenz gegenüber Kanamycin vermittelt
MAK33	monoklonaler Antikörper aus Maus, gerichtet gegen die humane Creatinkinase vom Muskeltyp
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization - time of flight</i>
MWCO	<i>molecular weight cutoff</i> ; Trenngrenze
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
NK	<i>natural killer</i>
N-Terminus	Aminoende einer Peptidkette
OD	Optische Dichte
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDI	Proteindisulfidisomerase
p-NpG	<i>para</i> -Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PPI	Peptidylprolylisomerase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	quartäres Ammoniumion
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	<i>rounds per minute</i>
scFv	<i>single chain Fv</i> ; Antikörperfragment, bestehend aus der variablen Domäne der leichten und schweren Kette, die durch einen Peptidlinker miteinander verbunden sind
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH-	Sulfhydryl-
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TGF- β	<i>transforming growth factor</i> b
TIMP-3	<i>tissue inhibitor of matrix metalloproteinases</i>
TMAE	Trimethylaminoethyl-
tPA	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
tRNA	<i>transfer</i> Ribonukleinsäure
Θ_{molar}	molare Elliptizität
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Triton-X 100	<i>t</i> -Octylphenoxypolyethoxyethanol
U	<i>units</i> ; Einheit der enzymatischen Aktivität, entspricht dem Umsatz von 1 μmol Substrat pro min unter Standardbedingungen
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
V _H	variable Domäne der schweren Kette
V _L	variable Domäne der leichten Kette
w/v	Masse/Volumen
WW	Wechselwirkungen

1 Einleitung

Am 26. Juni 2000 wurde bekanntgegeben, daß das menschliche Genom erstmals vollständig durchsequenziert ist (Nature (2001) Vol. 409 (Issue 6822); Science (2001) Vol. 291 (Issue 5507)). Voraussetzung für diese Arbeiten war die Entwicklung neuer biotechnologischer Methoden und Technologien in den vergangenen 30 Jahren.

Durch die Kenntnis der Sequenz des menschlichen Genoms soll es leichter werden, die molekulare Grundlage der Entstehung von Krankheiten aufzuklären und neue Ansatzpunkte für eine Therapie zu finden (Baba, 2001).

Zu den Therapieformen der Zukunft werden neben gentherapeutischen Strategien und dem *tissue engineering*, auch mittlerweile „klassische“ Pharmazeutika wie niedermolekulare Substanzen und rekombinante Proteine gehören. Diese werden gegen neue Ziele – sogenannte *targets* – wie beispielsweise Rezeptormoleküle gerichtet und in ihrer Funktionalität und Stabilität modifiziert sein. Durch die bereits zur Verfügung stehenden und noch zu entwickelnden Methoden befindet sich die klassische Medizin in einem Wandel hin zur molekularen Medizin mit individualisierten Therapiestrategien.

Für einen zielgerichteten Transport eines Biopharmazeutikums ist die Kombination eines therapeutisch relevanten Proteins mit einem sogenannten *targeting*-Modul erforderlich. Das kann beispielsweise ein Antikörper oder Antikörperfragment sein, das gegen ein spezifisches Oberflächenantigen auf einer zu behandelnden Zielzelle gerichtet ist. Für die Therapeutika bedeutet dies, daß es sich meist um Mehrkomponenten-Systeme handelt, bei denen eine *Targeting*-Funktion mit einer Effektorfunktion gekoppelt ist. In Abschnitt 1.1 dieser Einleitung wird daher auf die Möglichkeiten zur Herstellung bifunktioneller und bispezifischer Antikörper-Konjugate eingegangen.

Um rekombinante Proteine als Therapeutika einsetzen zu können, müssen sie zum einen in ausreichender Menge hergestellt werden können und eine möglichst hohe Reinheit (Homogenität) aufweisen. Letzteres ist ebenfalls eine Voraussetzung für die Charakterisierung von Proteinen mit Hilfe spektroskopischer Methoden. Die Herstellung heterologer Proteine in rekombinanten *Escherichia coli* ist Stand der Technik und führt häufig zur Akkumulation des Zielproteins in Form von unlöslichen Proteinaggregaten im Cytosol (Marston, 1986). Möglichkeiten zur Renaturierung von Proteinen mit dem Schwerpunkt auf den Matrix-unterstützten Verfahren werden in Abschnitt 1.2 der Einleitung vorgestellt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wird ein spezifisches Assoziations- und Kopplungsverfahren angewendet und eine neuartige chromatographische Analyseverfahren vorgestellt, basierend auf der Wechselwirkung komplementär geladener polyionischer Fusionspeptide. Die theoretischen Grundlagen dieser Strategie sind zum einen die elektrostatische Wechselwirkung, auf die in Abschnitt 1.3 eingegangen wird, und zum anderen die kovalente Chromatographie unter Berücksichtigung der Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen, die in Abschnitt 1.4 erläutert wird. Nachfolgend werden die Proteine, die im Rahmen dieser Dissertation mit Hilfe gentechnologischer Methoden modifiziert wurden, vorgestellt (Abschnitt 1.5), um dann auf die Problemstellung der vorliegenden Arbeit einzugehen (Abschnitt 1.6).

Vor der Verwendung rekombinant hergestellter Proteine als Diagnostika und Therapeutika muß eine Vielzahl von Anforderungen erfüllt werden. In der vorliegenden Doktorarbeit wird eine Strategie vorgestellt werden, die eine effiziente Herstellung, Reinigung und gerichtete Assoziation von Proteinen ermöglicht und somit eine Grundlage für die Entwicklung neuer Therapeutika liefert.

1.1 Bispezifische Antikörper und bifunktionelle Antikörper(fragment) - Enzym-Konjugate

Die technologischen Fortschritte der vergangenen 10 Jahre haben Antikörper zu einer bedeutenden Substanzklasse der sogenannten Biotherapeutika werden lassen. Insbesondere seit die Produktion humanisierter Antikörper möglich ist (Steplewski *et al.*, 1988; Jolliffe, 1993; Hurle und Gross, 1994; Sandhu, 1994; Velders *et al.*, 1994), finden sich Anwendungsgebiete in der Onkologie (Weiner, 1999; Segal *et al.*, 1999) sowie in der Behandlung von Infektionskrankheiten und Autoimmunerkrankungen (Deo *et al.*, 1997).

Jedes Immunglobulin der Klasse G ist *per se* bifunktionell: Über die variablen Domänen Fv wird spezifisch das jeweilige Antigen erkannt und über die konstanten Domänen CH2 und CH3, die den Fc-Teil bilden, erfolgt die Aktivierung des Immunsystems. Durch Kopplung zweier Antikörper(fragmente), die gegen zwei verschiedenen Antigene gerichtet sind, entstehen bispezifische Antikörper. Konstrukte aus einem Antikörper(fragment) und einem heterologen Fusionsanteil werden als bifunktionelle Antikörper bezeichnet. Fusionspartner sind dabei beispielsweise Enzyme, Toxine, ein radioaktiv markiertes Molekül oder eine Multimerisierungsdomäne. Durch Konjugation mit viralen oder nicht-viralen Vektorsystemen

soll ein Zelltyp-spezifisches *targeting* in der Gentherapie ermöglicht werden (Dachs *et al.*, 1997).

Das potentielle Hauptanwendungsgebiet bispezifischer Antikörper ist die Tumordiagnose und -therapie. Der eine Teil des bispezifischen Konstruktes erkennt dabei ein Antigen (TAA = Tumor assoziiertes Antigen), das überproportional häufig auf der Oberfläche von Tumorzellen präsentiert wird, während der andere Teil zur Vermittlung einer Effektorfunktion dient. Diese ist häufig die Aktivierung cytotoxischer T-Zellen über die Bindung an das CD3 und/oder CD28 Antigen. Desweiteren existieren Ansätze, über bifunktionelle Konstrukte radioaktive Substanzen (Goldenberg *et al.*, 1995; Wilder *et al.*, 1996) oder Enzyme, die Vorstufen von cytotoxischen Substanzen in ihre aktive Form überführen - sogenannter *Prodrug Approach* oder ADEPT (*antibody directed enzyme prodrug therapy*) (Han und Amidon, 2000) - , zu Tumorzellen zu dirigieren. Eine weitere Möglichkeit, gezielt Tumorzellen zu zerstören, sind die Immuntoxine. Hierbei handelt es sich meist um die direkte Fusion eines tumorspezifischen Antikörperfragmentes mit dem die Zelltötung vermittelnden Teil eines Toxins, wie beispielsweise das Diphtherie-Toxin oder das *Pseudomonas*-Exotoxin (Gottstein *et al.*, 1994; Reiter und Pastan, 1996; Brinkmann, 1996; 2000).

Die Übersichtsartikel von Gaviolondo und Larrick (2000) sowie von Hudson (1999) und Koelemij *et al.* (1999) enthalten Beispiele für bispezifische Antikörper, die bereits in klinischen Studien eingesetzt werden. Einige der vorgestellten Antikörper-Konjugate sind in Tabelle 1.1 unter Berücksichtigung des jeweiligen *targeting*-Moduls und der Effektorfunktion zusammengestellt.

Neben dem Einsatz bispezifischer bzw. bifunktionaler Konjugate gelangen zunehmend auch trispezifische Konstrukte ins Blickfeld der Forschung. Diese Konstrukte ermöglichen entweder eine genauere Adressierung oder steigern die Effektorfunktion z. B. durch gleichzeitige Bindung an CD3 und CD28 auf T-Zellen. Vor kurzem wurde ein trifunktionaler bispezifischer Antikörper von der Firma *Trion Pharma* entwickelt. Er enthält die beiden Antikörper removab® (anti-EpCAM × anti-CD3) und rexomab® (anti-Her2/*neu* × anti-CD3) und dient zur *ex vivo* Reinigung von Stammzellpräparaten begleitend zur Hochdosis-Chemotherapie bei Brustkrebs und anderen epithelialen Tumoren. Das Konjugat besteht zur einen Hälfte aus Maus- und zur anderen Hälfte aus Ratten-Immunglobulin. Über den Fc-Teil der Immunglobuline erfolgt die Aktivierung von Makrophagen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen. Makrophagen stimulieren ihrerseits T-Zellen (Zeidler *et al.*, 2000; <http://trionpharma.de>).

Tab. 1.1: Beispiele für bispezifische/bifunktionelle Antikörper-Konjugate in vorklinischen und klinischen Phasen der Stufe I bis III

Antikörper-Konstrukt	Effektormodul	<i>targeting</i> Modul z. B. TAA*	Anwendungsgebiet(e)	klinische Phase	Referenz
MOv18-Konjugat	T-Zellen über CD3** bzw. Radionuklide (¹³¹ J, ¹²⁵ J oder ¹²³ J)	MOv18	Ovarialtumore	II bzw. I	Canevari <i>et al.</i> , 1995; 1997; van Zanten-Przybysz <i>et al.</i> , 2001
90Y-Lympho- Cide™	Rhenium-188 oder chemotherapeutische Agentien	keine Angabe	Non-Hodgkin-Lymphome	III	Immunomedics/USA (http://www.immunomedics.com)
MDX-210	Monozyten/Makrophagen über CD64 (FcγRI)	HER-2/ <i>neu</i>	Brust-, Ovarial-, Prostata-, Nieren-, Darm-, Hirntumore	II	Medarex/ Novartis Valone <i>et al.</i> , 1995a,b; Keler <i>et al.</i> , 1997
Pentacea™	Radionuklide	CEA†	kleinzelliges Bronchialkarzinom	I/II	IBC Pharmaceuticals, 2001 (http://www.pslgroup.com/dg/18D452.htm)
anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2)	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin	anti-Tac (=anti-CD25)	Haarzell-Leukämie, Lymphome	I	Robins <i>et al.</i> , 2000
anti-CD64 oder anti-CD16 × anti- CD20 oder anti- HER-2/ <i>neu</i>	polymorphkernige Zellen über CD64 (FcγRI) oder NK‡-Zellen über CD16 (FcγRIII)	CD20 oder HER-2/ <i>neu</i>	CD20: Lymphome HER-2/ <i>neu</i> : Brustkrebs, Ovarial- tumore, Darmkrebs, Prostata-, Nieren-, Magenkrebs, Tumore der Bauchspeicheldrüse	I/II und III	Segal <i>et al.</i> , 1999; van Ojik und Valerius, 2001
anti-CD3 × anti- CD19	T-Zellen über CD3; zusätzliche Aktivierung über CD28	CD19	Non-Hodgkin-Lymphome	Mausmodell	Cochlovius <i>et al.</i> , 2000a,b
anti-CD64 × anti- CD19	polymorphkernige Zellen über CD64 (FcγRI)	CD19	Non-Hodgkin-Lymphome	Mausmodell	Honeychurch <i>et al.</i> , 2000

* Tumor assoziiertes Antigen, ** *clustered differentiation*, † *carcinoembryonic antigen*, ‡ *natural killer*

Die zur Zeit in klinischen Studien eingesetzten Antikörper werden in der Regel in eukaryontischen Zellkulturen produziert. Da für den späteren therapeutischen Einsatz größere Mengen der rekombinanten Proteine benötigt werden, sollten diese mit möglichst einfachen, kostengünstigen Verfahren produziert werden.

Methoden zur Herstellung bispezifischer Antikörper sind (vgl. Reviews von Fanger *et al.*, 1992; Cao und Suresh, 1998; Segal *et al.*, 2001):

- die chemische Quervernetzung durch bifunktionelle Reagentien (Brennan *et al.*, 1985; Glennie *et al.*, 1987; Stevenson *et al.*, 1989);
- die Isolierung aus Hybrid-Hybridoma (Quadroma)-Zellkulturüberständen (Milstein und Cuello, 1983; Suresh *et al.*, 1986);
- die gentechnologische Herstellung von Fusionsproteinen durch direkte Fusion zweier Antikörperfragmente zu sogenannten Diabodies (Winter und Milstein, 1991; Holliger *et al.*, 1993; Kranz *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1996; Thirion *et al.*, 1996);
- die gentechnologische Herstellung von Konjugaten durch Anfügen von Heterodimerisierungs-/Oligomerisierungsmodulen (Plückthun und Pack, 1997).

Die chemische Quervernetzung kann zu einem Funktionsverlust der beteiligten Proteine führen. Die Isolierung bestimmter bispezifischer Antikörperfragmente aus Quadromazellkulturüberständen ist sehr aufwendig, da ein Gemisch aller möglichen Kombinationen der beiden Varianten der leichten und schweren Ketten vorliegt.

Moderne gentechnologische Methoden hingegen ermöglichen die gezielte Modifizierung von Antikörpern, so daß bispezifische Konstrukte sowohl in eukaryontischen als auch prokaryontischen Zellen produziert werden können. Aktuelle Übersichtsartikel zur Herstellung von bispezifischen Antikörpern und bifunktionellen Konstrukten durch gentechnische Methoden wurden von Tomlinson und Holliger (2000) sowie von Carter (2001) veröffentlicht.

Neben der direkten Fusion von zwei scFv-Fragmenten zu *diabodies* oder von einem Antikörperfragment und einem Enzym oder Toxin wurde das Anfügen spezifischer Assoziationsmodule als alternative Strategie untersucht.

In *diabodies* ist die variable Domäne der leichten Kette eines Antikörperfragmentes A (V_{LA}) mit der variablen Domäne der schweren Kette eines anderen Antikörperfragmentes B (V_{HB}) fusioniert und umgekehrt ist V_{LB} mit V_{HA} fusioniert. Beide Konstrukte werden simultan in

Escherichia coli exprimiert und lagern sich in spezifischer Weise zusammen. Durch geeignete Wahl des Linkerpeptides zwischen den variablen Domänen ist die Bildung von *triabodies* und *tetrabodies* möglich (Holliger *et al.*, 1993; Gruber *et al.*, 1994; Mallender *et al.*, 1994; Raag und Whitlow, 1995; Holliger und Winter, 1997). Einen anderen Ansatz wählten Kranz *et al.* (1995) und Carter *et al.* (1995), in dem sie zwei *scFv*-Fragmente direkt miteinander zu einem Tandem-Antikörper fusionierten.

Allerdings sind der Herstellung von größeren heterologen Fusionsproteinen in rekombinanten *Escherichia coli* Grenzen gesetzt. Häufig sinkt die Ausbeute an heterologem Protein mit zunehmender Zahl der Untereinheiten oder Domänen (Skerra und Plückthun, 1991), insbesondere dann, wenn die Ausbildung von Disulfidbrücken für die native Struktur und Funktionalität des Proteins erforderlich ist. Die Sekretion rekombinanter Proteine ins Periplasma ist häufig bei Mehr-Domänen-Proteinen ineffizient (Skerra und Plückthun, 1991). Stattdessen erfolgt die Gewinnung des funktionellen Proteins nach *in vitro* Faltung, die für einzelne Antikörperfragmente gut dokumentiert ist (Buchner und Rudolph, 1991; Glockshuber *et al.*, 1992).

Durch Anfügen eines zusätzlichen Cystein-Restes an den C-Terminus von *scFv*-Fragmenten können diese nach separater Expression über eine Disulfidbrücke *in vitro* kovalent miteinander verbunden werden (Cumber *et al.*, 1992; Kipriyanov, 1994). Die Spezifität der Kopplung kann dadurch erreicht werden, daß das C-terminale Cystein mit einer Heterodimerisierungsdomäne kombiniert wird (de Kruif und Logtenberg, 1996).

Das über Heterodimerisierungsdomänen gebildete Assoziat sollte ausreichend stabil sein. Dabei sollte weder die Funktionalität noch die Struktur der Fusionspartner beeinträchtigt werden. Desweiteren sollte die Heterodimerisierungsdomäne mit der Sekretion bzw. Renaturierung der Fragmente kompatibel sein. Für eine effiziente Expression und gute Löslichkeit der Konstrukte sind eher kurze, hydrophile Fusionspeptide geeignet, die gleichzeitig stabil gegenüber proteolytischem Abbau sind.

Eine Dimerisierung von *scFv*-Fragmenten kann durch Fusionierung mit konstanten Domänen der Immunglobuline erreicht werden (Müller *et al.*, 1998; Schoonjans *et al.*, 2000). Eine Spezialfall ist die "Druckknopf-Methode" (*knobs-into-holes*), die von Ridgway *et al.* (1996) verwendet wurde: Durch Einfügen gezielter Mutationen in der Kontaktfläche der beiden zu assoziierenden CH3-Domänen wird die Heterodimerisierung begünstigt (AK1-*knob-hole*-AK2). Merchant *et al.* (1998) verwendeten die Methode, um vollständiges bispezifisches humanes IgG herzustellen.

Neben den von Immunglobulinen abgeleiteten Assoziationsdomänen wurden amphiphile Helices oder Vier-Helix-Bündel (Pack und Plückthun, 1992; Kostelny *et al.*, 1992; O'Shea *et al.*, 1989; 1992; 1993) zur bevorzugten Heterodimerisierung von Antikörperfragmenten eingesetzt. Vorbild für die verwendeten Heterodimerisierungsdomänen sind Assoziationsdomänen von Transkriptionsfaktoren. In diesem Zusammenhang wurden insbesondere amphiphile Helices, die durch Expression der Gene *fos* und *jun* und davon abgeleiteter Sequenzen hergestellt werden, untersucht. Amphiphile Helices bestehen meist aus 28 bis 40 Aminosäureresten und enthalten die regelmäßige Wiederholung hydrophiler und hydrophober Reste von 7 Aminosäuren der Form (a-b-c-d-e-f-g)_n. Die Positionen a und d werden meist von hydrophoben Aminosäureresten besetzt, die in der Sekundärstruktur eine hydrophobe Kontaktfläche bilden.

O'Shea *et al.* (1989) verwendeten synthetische *coiled coils*, die von Jun und Fos bzw. vom GCN4-Leucin-Zipper abgeleitet wurden und bei einer Konzentration von 10 µM im Ansatz Dimere bildeten. Durch *de novo*-Design wurden geladene Aminosäurereste in die Heptaden eingefügt, die durch elektrostatische Abstoßung eine Homodimerisierung verhinderten (O'Shea *et al.*, 1993). Problematisch bei der Verwendung von *coiled coil*-Heterodimerisierungsdomänen ist die Anfälligkeit der sie codierenden cDNA-Sequenzen für Mutationen (Pack, 1994) und die Empfindlichkeit gegenüber proteolytischem Abbau (Arndt *et al.*, 2000). Zudem neigen die vom Jun-Zipper abgeleiteten Domänen zur Homodimerisierung (Smeal *et al.*, 1989; O'Shea *et al.*, 1989; Schuermann *et al.*, 1991). Von Pack und Plückthun (1995) wurden antiparallel assoziierende Vier-Helix-Bündel-Motive zur gezielten Tetramerisierung geplant. Anstelle der Tetramerisierung wurde eine bevorzugte Dimerisierung der Konstrukte festgestellt. Es wird vermutet, daß dieses sterische und/oder energetische Gründe hat. Untersuchungen zur Stabilität dieser im Periplasma von *Escherichia coli* assoziierten scFv-Fragmente wurden nicht durchgeführt. Allerdings wurde eine gesteigerte funktionelle Affinität der Mini-Antikörper gefunden (Pack, 1994). Durch gezieltes *library-versus-library screening* wurden die von *coiled coil*-Motiven abgeleiteten Dimerisierungsmodule als Fusionsproteine mit DHFR-Fragmenten *in vivo* optimiert (Arndt *et al.*, 2000). Dadurch liegen Angaben zur Stabilität der über *coiled coils* gebildeten Assoziate vor. Diese haben eine Dissoziationskonstante von 24 nM.

Neben den von konstanten Antikörperdomänen oder von *coiled coils* abgeleiteten Heterodimerisierungsdomänen werden im folgenden noch weitere Beispiele für Assoziationsdomänen kurz vorgestellt:

Sonderfälle sind die Tetramerisierungsdomäne des p53-Moleküls (Rheinnecker *et al.*, 1996; Willuda *et al.*, 2001), das Calmodulin und Calmodulin-Bindepeptid, z. B. Mastoparan (Neri *et al.*, 1995) sowie die Fusion von Antikörperfragmenten mit Protein A aus *Staphylococcus aureus* (Sanna *et al.*, 1995; Andrade *et al.*, 2000). Bei größeren Assoziationsdomänen besteht die Gefahr der Interaktion mit dem Fusionspartner. Darüber hinaus ist die Expression erschwert oder der Fusionspartner kann eine Immunreaktion hervorrufen. Im Fall von Protein A ist die Bindung spezifischer Antikörperfragmente nicht stabil, da eine Konkurrenz durch Antikörper im Serum erfolgen kann.

Die Fusion mit zwei komplementären Bruchstücken eines Enzyms z. B. mit dem S-Protein und S-Peptid der humanen Ribonuklease A (Dübel, 1999) oder die Verwendung der Streptavidin/Biotin-Wechselwirkung führt ebenfalls zu Heterodimeren bzw. Oligomeren. Die Biotinylierung kann dabei entweder chemisch oder durch Fusion mit dem *E. coli*-Protein BCCP, das *in vivo* biotinyliert wird (Weiss *et al.*, 1994; Dübel *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1998; Koumariou *et al.*, 1999), erfolgen. Desweiteren kann die gerichtete Assoziation von zwei Antikörperfragmenten durch Hybridisierung komplementärer Oligonukleotidstränge erreicht werden (Chaudri *et al.*, 1999). Die Oligonukleotide wurden zuvor chemisch an die jeweiligen Proteine gekoppelt.

1.2 Möglichkeiten zur Matrix-unterstützten Renaturierung von Proteinen

Die Herstellung heterologer Proteine in *Escherichia coli* kann unter standardisierten Kultivierungsbedingungen erfolgen und stellt eine kostengünstige Alternative zur Produktion beispielsweise in tierischen Zellkulturen dar. Bei Verwendung tierischer Zellkulturen ist häufig fötales Kälberserum im Kultivierungsmedium enthalten, so daß Probleme mit viralen oder nicht-viralen Kontaminationen auftreten können.

Die Überexpression heterologer Gene in *Escherichia coli* führt häufig zur Akkumulation der Proteine in Form von Aggregaten (Marston, 1986). Die Bildung dieser sogenannten *inclusion bodies* ist häufig erwünscht, insbesondere wenn das Genprodukt toxisch für den Wirtstamm ist oder sehr große Mengen des rekombinanten Proteins benötigt werden. In der aggregierten Form ist das Protein weitgehend vor proteolytischem Abbau geschützt (Enfors *et al.*, 1990). Die Isolierung der *inclusion bodies* aus den Zellen ist ein erster effizienter Reinigungsschritt (Marston, 1986). Diese bestehen zu 95 % aus Protein (De Bernardez Clark und Georgiou, 1991), wobei das rekombinante oder überexprimierte Protein den größten Anteil hat. Im weiteren folgen die Solubilisierung des aggregierten Materials durch chaotrope Agentien, meist in Kombination mit Reduktionsmitteln. Die Überführung des entfalteten Proteins in

seine native bzw. funktionelle Konformation, die Renaturierung bzw. Reaktivierung, wurde in den vergangenen zwei Dekaden an zahlreichen Proteinen intensiv untersucht (Reviews: Jaenicke, 1995; De Bernardez Clark *et al.*, 1999; Misawa und Kumagai, 1999). Für das Entfernen des Denaturierungsmittels und das Überführen des Proteins in eine für seine native Konformation geeignete Umgebung wurden verschiedene Strategien entwickelt. Die mit Abstand am häufigsten verwendete Methode ist die Renaturierung durch Verdünnung. Hierbei wird das denaturierte Protein in einen für die Faltung geeigneten Renaturierungspuffer überführt. Da als Konkurrenzreaktion zur Faltung die Aggregation von partiell gefalteten oder entfaltenen Molekülen auftritt (Zettlmeißl *et al.*, 1979; Kiefhaber *et al.*, 1991), kann die Renaturierung durch Verdünnen nur bei sehr niedrigen Proteinkonzentrationen im Bereich von 10 µg/ml bis 100 µg/ml angewendet werden. Das führt zum Arbeiten mit sehr großen Volumina.

Alternativen, wie beispielsweise die Renaturierung durch Dialyse (Maeda *et al.*, 1996; Han *et al.*, 1997; Grauschopf, 2000), Gelfiltration (Werner *et al.*, 1994; Chaudhuri *et al.*, 1996; Müller und Rinas, 1999; Fahey *et al.*, 2000) oder hydrophobe Interaktionschromatographie (Geng und Chang, 1992) sind bisher nur an wenigen Proteinen untersucht worden und erfordern in der Regel eine spezielle Faltungscharakteristik.

In den letzten Jahren wurden in zunehmendem Maße Methoden zur Matrix-unterstützten Renaturierung von Proteinen angewendet. Wurden in den Anfängen die zu faltenden Proteine noch durch kovalente Verknüpfung mit einer Gelmatrix immobilisiert (Sinha und Light, 1975; Mozhaev, 1979; Horowitz und Bowman, 1987; Hayashi *et al.*, 1994), so werden nun in erster Linie Fusionspeptide, die bisher lediglich als Reinigungstags verwendet wurden, eingesetzt. Beispiele sind der Histidintag, die Cellulosebindedomäne und polyionische Fusionspeptide, auf letztere wird auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher eingegangen.

Für die weitere Verwendung des renaturierten Proteins ist es häufig erforderlich, daß die Affinitätsdomäne bzw. das Fusionspeptid entfernt werden. Das kann durch Einfügen geeigneter Proteaseschnittstellen wie beispielsweise für Enterokinase (Prickett *et al.*, 1989), Thrombin (Hummel *et al.*, 1989) oder Factor Xa (Nagai und Thogersen, 1984) erfolgen, durch Säurekatalyse (Negro *et al.*, 1997) oder Metallionen (Humphreys *et al.*, 1999) oder durch selbstspaltende Aminosäuresequenzen (Xu *et al.*, 2000).

Im folgenden werden nun die Möglichkeiten und Grenzen der Matrix-unterstützten Renaturierung an einigen Beispielen erläutert:

Matrix-unterstützte Renaturierung durch kovalente Immobilisierung

Durch kovalente Immobilisierung bei geringer Beladungsdichte der Matrix konnten insbesondere einige Proteasen erfolgreich mit hohen Ausbeuten renaturiert werden (Sinha und Light, 1975; Hayashi *et al.*, 1994). Die räumliche Trennung der zu faltenden Proteinmoleküle verhindert zum einen die Aggregation und zum anderen die Autoproteolyse. Hayashi *et al.* (1994) beschrieben die Renaturierung von prozessiertem Subtilisin, das an Agarose-Partikeln kovalent immobilisiert wurde. Nachteil dieser Renaturierungsmethode ist die schwierige und bisweilen unmögliche Ablösung des renaturierten Proteins vom Gelmaterial und damit verbunden die fehlende Regenerierbarkeit des Gelmaterials.

Matrix-unterstützte Renaturierung durch Immobilisierung über einen Histidintag

Eine im Zusammenhang mit der Matrix-unterstützten Renaturierung häufig eingesetzte Methode ist die nicht-kovalente Immobilisierung durch Wechselwirkung eines Histidintags mit einem Metallionen-Chelat-Komplex des Gelmaterials (Sinha, 1994; Holzinger *et al.*, 1996; Negro *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1997; Glansbeek *et al.*, 1998; Rogl, 1998; Zahn *et al.*, 1999; Zouhar *et al.*, 1999). Der Histidintag (häufig bestehend aus sechs Histidinresten) ist dabei entweder mit dem Amino- oder Carboxyl-Terminus des zu faltenden Proteins fusioniert. Eine Vielzahl von Proteinen - sowohl monomere als auch oligomere mit oder ohne Disulfidbrücken - wurden durch Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metallionen renaturiert. Beispiele sind das monomere humane Prionprotein mit einer Disulfidbrücke (Zahn *et al.*, 1997), die extrazelluläre Domäne des TGF- β -Rezeptors vom Typ II mit 6 Disulfidbrücken (Glansbeek *et al.*, 1998), rekombinantes humanes TIMP-3 mit 6 Disulfidbrücken (Negro *et al.*, 1997), Membranproteine aus Chloroplasten (Rogl *et al.*, 1998), die ATP:tRNA Nukleotidyltransferase (Shi *et al.*, 1997) sowie eine homodimere β -Glucosidase aus Mais (Zouhar *et al.*, 1999). Das Denaturierungsmittel wird in vielen Fällen durch Dialyse des Gelmaterials gegen Renaturierungspuffer entfernt. Angaben zur Renaturierungsausbeute fehlen häufig. Ein Nachteil der Renaturierung an einer Affinitätsmatrix mit immobilisierten Metallionen könnte die unspezifische Bildung von Disulfidbrücken durch Oxidation freier Cystein-Reste in Gegenwart von Sauerstoff sein.

Matrix-unterstützte Renaturierung durch Immobilisierung über eine Cellulosebindedomäne

Affinitätstags, die häufig für die Reinigung rekombinanter Proteine verwendet werden, wie beispielsweise Glutathion-S-transferase, β -Galactosidase, Thioredoxin, Maltose-Bindeprotein,

Protein A aus *Staphylococcus* und die meisten Cellulose- oder Chitinbindungsdomänen, sind im denaturierten Zustand nicht funktionell und stehen damit für eine Immobilisierung des Fusionsproteins nicht zur Verfügung. Eine Ausnahme stellt die Cellulose-Bindedomäne aus *Clostridium thermocellum* dar. Diese interagiert noch in Gegenwart von 6 M Harnstoff mit einer Cellulose-Matrix. Berdichevsky *et al.* (1999) beschrieben die Rückfaltung von scFv-Antikörpern, die mit dieser Cellulose-Bindedomäne fusioniert wurden, an einer kristallinen und einer amorphen Cellulose-Matrix. Problematisch bei diesem Verfahren ist die unspezifische Bindung weiterer Fremdproteine an den Rückfaltungsträger, so daß zunächst keine simultane Reinigung möglich war, sowie die harschen Bedingungen, die für die Ablösung des funktionellen Proteins verwendet wurden (100 mM NaOH). Daher wurde das Fusionsprotein mit einer Thrombinspaltsequenz versehen, die es ermöglicht, das funktionelle Antikörperfragment im Matrix-gebundenen Zustand von der Cellulose-Bindedomäne abzuspalten und nachfolgend die Matrix zu regenerieren.

Matrix-unterstützte Renaturierung durch Immobilisierung über ionische Wechselwirkungen

Die Rückfaltung von Proteinen an einem Ionenaustauscher wurde erstmals 1986 von Creighton beschrieben. Hierbei erfolgte die reversible Immobilisierung des entfalteten Proteins über geladene Aminosäuren der Primärsequenz. In Abhängigkeit vom Ladungszustand der entfalteten Proteinkette wurde die Rückfaltung an Anionen- bzw. Kationenaustauschern durchgeführt. Es wurden überwiegend Trägermaterialien auf Cellulosebasis verwendet, meist mit funktionellen Gruppen schwacher Ionenaustauscher wie Carboxymethyl-(CM) bzw. Diethylaminoethyl (DEAE)-Gruppen. Während Cytochrom c und Ovalbumin mit hohen Ausbeuten am Ionenaustauscher renaturiert werden konnten, waren die Ausbeuten an funktionellem α -Lactalbumin und Lysozym sehr gering und blieben weit hinter denen, die bei Renaturierung in Lösung erreicht werden können, zurück. Desweiteren konnte der Trypsin-Inhibitor aus Rinderpankreas (BPTI), der in der nativen Konformation drei Disulfidbrücken enthält, erfolgreich in Gegenwart eines *oxido-shuffling*-Systems am Träger reaktiviert werden. Aus den Ergebnissen von Creighton (1986) kann gefolgert werden, daß das Ionenaustauschermaterial einen signifikanten Einfluß auf die Renaturierungsausbeute hat. Hierbei spielen sowohl das Trägermaterial, das möglichst hydrophil sein sollte, um hydrophobe Interaktionen mit der partiell gefalteten Polypeptidkette zu vermeiden, als auch die funktionelle Gruppe eine entscheidende Rolle. Eine Optimierung muß für das jeweilige Protein empirisch erfolgen. Die Immobilisierung des entfalteten Proteins wurde in nichtionischen Denaturierungsmitteln wie beispielsweise Harnstoff durchgeführt. Für die Renaturierung können ausschließlich Lösungen

mit geringer Ionenstärke verwendet werden. Creighton ging davon aus, daß bei der Faltung einiger Proteine die Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen nicht entscheidend ist. Im Gegenteil, durch die Immobilisierung über ionische Wechselwirkungen würde vielfach eine Stabilisierung erreicht. In ähnlicher Weise renaturierten Suttner *et al.* (1994) ein Fusionsprotein bestehend aus einem Protein des humanen Papillomavirus und einer Polymerase des Bacteriophagen MS2. In diesem Zusammenhang wird auf die simultane Reinigungswirkung des dargestellten Renaturierungsverfahrens hingewiesen.

Einen anderen Ansatz verfolgten Stempfer *et al.* (1996a), der auch im Rahmen dieser Doktorarbeit in modifizierter Form verwendet wurde. Durch Fusion des zu faltenden Proteins mit einem Peptid aus 6 positiv geladenen Aminosäuren erfolgte eine gezielte Immobilisierung der entfalteten Proteinkette. Die Renaturierung wurde in Lösungen mit einer Ionenstärke durchgeführt, bei der ausschließlich die ionische Interaktion des polyionischen Fusionspeptides mit den funktionellen Gruppen des Trägers möglich ist. Dadurch sollten Wechselwirkungen geladener Aminosäuren des Proteins mit dem Ionenaustauscher verhindert werden. Aus der Salzabhängigkeit der Reaktivierung von α -Glucosidase mit Hexaarginin-fusionspeptid leiteten Stempfer *et al.* (1996a) das in Abbildung 1.1 dargestellte Schema ab.

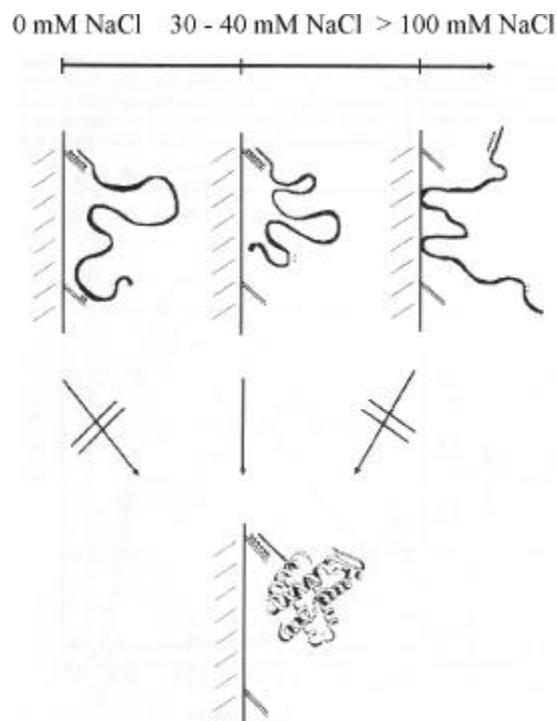


Abb. 1.1: Schema der Matrix-unterstützten Renaturierung nach Stempfer *et al.* (1996a)

Als Modellprotein wurde neben α -Glucosidase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Stempfer *et al.*, 1996a) auch ein 106 kD-Fragment der IgA-Protease aus *Neisseria gonorrhoeae* (Stempfer *et al.*, 1995; Bachmann, 1997) untersucht. Es wurde gezeigt, daß die Reaktivierungsausbeute empfindlich von der Wahl des Ionenaustauschermaterials, der Ionenstärke im Renaturierungsansatz und der Beladung des Gelmaterials abhängt. Während Heparin-Sepharose und Heparin-Agarose für die Reaktivierung der α -Glucosidase geeignet waren, wurden mit Fractogel EMD SO_3^- 650 M nur geringe Reaktivierungsausbeuten erzielt. Dieses wurde auf die Hydrophobizität des Trägermaterials zurückgeführt, das mit der partiell gefalteten Polypeptidkette über hydrophobe Wechselwirkungen interagiert und somit einer Reaktivierung entgegenwirkt.

Weitere Varianten der Rückfaltungschromatographie

Neben den bereits vorgestellten Möglichkeiten der Matrix-unterstützten Renaturierung wurden weitere Verfahren unter dem Oberbegriff „Rückfaltungschromatographie“ (*refolding chromatography*) beschrieben, bei denen nicht das zu faltende Zielprotein an einem Träger immobilisiert wird, sondern sogenannte Faltungshelferproteine (Altamirano *et al.*, 1997) oder Faltungskompartimente (*refolding cages*, wie beispielsweise Liposomen) (Yoshimoto und Kuboi, 1999). Erste Ansätze in dieser Richtung wurden 1997 von Altamirano *et al.* beschrieben. Hierbei wurden Fragmente von GroEL - sogenannte Minichaperone - an einem Trägermaterial kovalent immobilisiert und hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Reaktivierung bzw. Renaturierung verschiedener Proteine untersucht. In Gegenwart des Minichaperones konnte die Aggregation verschiedener Proteine verhindert und somit die Renaturierungsausbeute, verglichen zur Renaturierung in Lösung, gesteigert werden. Dieses Verfahren der Rückfaltungschromatographie ist allerdings nur für Proteine, die als Substrate für GroEL fungieren, geeignet. Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens wurde dadurch erreicht, daß neben dem Minichaperon noch weitere Faltungshelferproteine („Foldasen“) immobilisiert wurden. In Gegenwart eines Minichaperones abgeleitet von GroEL, der Thiol-Oxidase DsbA und einer Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase konnte ein Scorpion-Toxin, das 4 Disulfidbrücken enthält und in Lösung nur mit sehr geringen Ausbeuten renaturierbar ist, erfolgreich in eine funktionelle Struktur überführt werden (Altamirano *et al.*, 1999). Dong *et al.* (2000) immobilisierten das gesamte GroEL-Tetradecamer und untersuchten die Rückfaltung von Lysozym in Gegenwart und Abwesenheit von ATP im Renaturierungspuffer. Das gleiche Modellprotein verwendeten Yoshimoto und Kuboi (1999), um die oxidative Faltung mit Hilfe immobilisierter Liposomen zu untersuchen. Hierbei wird die Chaperon-ähnliche Eigenschaft der Liposomen ausgenutzt, reduziertes, partiell gefaltetes Lysozym zu binden. Dabei erreicht das reduzierte Protein-

molekül eine nativ-ähnliche Konformation, ohne mit benachbarten Polypeptidketten zu aggregieren. Nach Elution findet die Ausbildung der Disulfidbrücken statt.

1.3 Elektrostatische Wechselwirkungen

Im Falle der Matrix-unterstützten Renaturierung von Proteinen mittels polyionischer Fusionspeptide erfolgte die Immobilisierung durch die ionische Wechselwirkung mit einer geladenen Matrix. Ionische Wechselwirkungen gehören zur Gruppe der elektrostatischen Wechselwirkungen.

Elektromagnetische Wechselwirkungen sind im molekularen Bereich von größter Bedeutung. Sie sind die Grundlage aller kovalenten und nicht-kovalenten Wechselwirkungen. Im Falle der elektrostatischen Wechselwirkungen wird das deutlich. Hierbei interagieren die positiven Ladungen des Kerns mit Elektronen gemäß dem Coulomb'schen Gesetz (Atkins, 1987), dabei wird die zwischen ihnen wirkende elektrostatische Kraft F mit Gleichung (1) beschrieben:

$$F = \frac{q_1 \cdot q_2}{4\pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot r^2} \quad (1)$$

Hierbei sind q_1 und q_2 die Ladungen, r der Abstand, ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante des Vakuums und ϵ_r die relative Dielektrizitätskonstante der Umgebung, in der sich die Ladungen befinden.

Strenggenommen müßten diesem Gesetz zufolge jeder Kern und jedes Elektron einzeln betrachtet werden. In die Schrödinger Gleichung eingesetzt, ergibt sich unter Anwendung der Methoden der Quantenmechanik eine Lösung für die Konfiguration des interessierenden Kerns. Diese Methode ist für Proteine nicht anwendbar. Stattdessen wird in den verwendeten Modellen die Wechselwirkungen zwischen Atomen betrachtet, ohne explizit auf die Elektronen des Systems einzugehen. Hierbei wird üblicherweise die formale Ladung von Proteinen oder Aminosäureresten betrachtet (Gilson, 1995). Formale Ladungen geben darüber Auskunft, ob eine chemische Gruppe in ionisierter Form vorliegt, z.B. ob ein Atom oder eine Gruppierung von Atomen ein Elektron erhalten oder abgegeben hat.

Elektrostatische Wechselwirkungen in Proteinen können nicht direkt gemessen werden. Häufig werden sie theoretisch vorausberechnet mit Hilfe der Gleichgewichtsdissoziations-

konstanten (pK-Werte) der einzelnen ionisierbaren Gruppen des Proteins (Bashford *et al.*, 1993; Antosiewicz *et al.*, 1994; Juffer, 1998; Perez-Canadillas *et al.*, 1998). Sehr häufig unterscheiden sich die pK-Werte der titrierbaren Gruppen in Proteinen beträchtlich von denen der freien Aminosäuren oder Modellverbindungen in Lösung (Kao *et al.*, 2000). Darüber hinaus, unterliegen die Protonierungs-/Deprotonierungsgleichgewichte von zwei oder mehr titrierbaren Gruppen nicht den klassischen Henderson-Hasselbalch- oder Linderstroem-Lang-Gleichungen.

Eine Möglichkeit zur theoretischen Beschreibung der Ionisationsgleichgewichte in Proteinen basiert auf dem makroskopischen (di-elektrischen) Modell (Karshikov *et al.*, 1992). Das native Proteinmolekül wird dabei als Mikrophase mit geringer Dielektrizitätskonstante in einem Medium mit hoher Dielektrizitätskonstante betrachtet. Durch bestimmte Differenzierung kann für dieses System die Poisson-Boltzmann-Gleichung numerisch gelöst werden (Karshikoff, 1995). Der Ladungszustand der einzelnen titrierbaren Gruppen kann dabei durch statistische mechanische Berechnungen und/oder Monte-Carlo-Simulation bestimmt werden (Fushiki *et al.*, 1991).

Salzbrücken

Positiv geladene Seitenketten von Lysin oder Arginin können eine Wechselwirkung mit negativen Ladungen von Asparagin- oder Glutaminsäure eingehen. Diese Wechselwirkung wird als Salzbrücke bezeichnet. Salzbrücken kommen vorwiegend an der Proteinoberfläche vor. Eine Ausnahme stellt eine interne Salzbrücke da, die für den katalytischen Mechanismus eines Enzyms eine Rolle spielt, beispielsweise die katalytische Triade der Serinproteasen (bestehend aus Asp-His-Ser) (Stryer, 1990).

Wasserstoffbrücken

Zu den elektrostatischen Wechselwirkungen gehören neben den ionischen Wechselwirkungen (Salzbrücken) die Wasserstoffbrückenbindungen

Wassermoleküle bilden ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen aus. Diese Bindung ist normalerweise etwa 2.8 Å lang (von Sauerstoffatom zu Sauerstoffatom) (Stryer, 1990). Diese Länge ist das Ergebnis des Entgegenwirkens stabilisierender Faktoren und der Abstoßung zwischen den Sauerstoffatomen, wenn diese näher zusammengebracht würden. Wasserstoffbrückenbindungen sind weitaus schwächer als kovalente Bindungen. Ein typischer

Wert für die Stabilisierung einer Wasserstoffbrückenbindung ist etwa 6 kcal/mol im Vergleich zu mehreren hundert kcal/mol für kovalente Bindungen. Wasserstoffbrückenbindungen können daher leicht gebildet und wieder gelöst werden.

1.4 Kovalente Chromatographie und Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen

Der Begriff kovalente Chromatographie unter Ausbildung einer Disulfidbrücke wurde von Brocklehurst *et al.* (1973) geprägt. Das Grundprinzip besteht darin, daß zunächst Thiolgruppen über einen aliphatischen Linker an eine Matrix gekoppelt werden. Die Thiolgruppen werden durch Reaktion mit 2, 2'-Dithiopyridin in gemischte Disulfide überführt. Mit dieser aktivierten Matrix reagieren Thiolgruppen des zu reinigenden Proteins unter Ausbildung einer kovalenten Bindung. Fremdproteine, die keine Thiolgruppen enthalten, interagieren nicht mit der Matrix. Die Elution des reversibel kovalent immobilisierten Proteins erfolgt in Gegenwart eines niedermolekularen Reduktionsmittels wie beispielsweise Dithiothreitol (DTT). Als Matrix wurde Sepharose verwendet. Die thiolhaltige funktionelle Gruppe wurde durch Kopplung von Glutathion über den Amino-Terminus an Bromcyan-aktivierte Sepharose erhalten. Das Verfahren wurde an der Reinigung von Papain aus Papaya Latex untersucht.

Eine modifizierte Variante der kovalenten Chromatographie beschrieben Carlsson *et al.* (1975). Als Matrix wurde Mercaptohydroxypropylether-Agarose verwendet. Die untersuchten Proteine (α -Amylase und α -Chymotrypsin) wurden mit Thiolgruppen versehen (Reaktion mit 2-Iminothiolan) und reagierten wiederum mit einer mit Dithiopyridin aktivierten Matrix. Immobilisierte α -Amylase wurde für die Stärkehydrolyse verwendet. Nach Aktivitätsverlust konnte das Gelmaterial regeneriert und erneut mit Enzym beladen werden.

Laurell *et al.* (1983) verwendeten die kovalente Chromatographie zur Isolierung von α -Antitrypsin und anderen Plasmaproteinen mit reaktiven Thiolgruppen. Als Matrix wurde eine Sepharose verwendet, an die nach Bromcyan-Aktivierung κ -Ketten von Antikörpern irreversibel gekoppelt wurden. Das freie Cystein der κ -Kette war an den Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen mit den zu reinigenden Proteinen beteiligt. Da die Geschwindigkeit der Thiol-Disulfid-Austauschreaktion von den pK_a-Werten der Cysteinreste und damit deren Microumgebung abhängt (Shaked *et al.*, 1980; Snyder *et al.*, 1981), ist es möglich, durch geeignete Wahl der Reduktionsmittel im Eluenten Proteine selektiv von der Matrix abzulösen. Im vorliegenden Fall konnten die thiolhaltigen Proteine α 1-Antitrypsin, Prealbumin und Albumin effektiv voneinander getrennt werden. Es wurde vermutet, daß die

Aminosäureseitenketten in unmittelbarer Nachbarschaft zum Cystein die Reaktivität signifikant beeinflussen. Während dem aktivierten Cystein-Rest der κ -Kette ein Glutaminsäure-Rest benachbart war, grenzten an die Cystein-Reste der gereinigten Proteine entweder zwei, ein oder keine Aminosäurereste mit positiven Ladungen. Aus den Ergebnissen wurde gefolgert, daß die elektrostatische Wechselwirkungen von Aminosäureseitenketten in unmittelbarer Nachbarschaft der reagierenden Cystein-Reste berücksichtigt werden sollten, um die Selektivität der kovalenten Chromatographie zu erhöhen.

Der Einfluß benachbarter Aminosäurereste auf den Thiol-Disulfid-Austausch wird im nachfolgenden erläutert.

Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen

Die Reaktivität von Cystein-Resten ist abhängig von ihrer Umgebung. Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen haben eine zentrale Bedeutung in der Proteinfaltung und sind an vielen Stoffwechselreaktionen beteiligt. Dazu gehören Elektronen-Transfer-Reaktionen und die Regelung der enzymatischen Aktivität (Gilbert, 1990). Beispielsweise unterscheidet sich der pK_a -Wert des reaktiven Cystein-Restes (N-terminales Cystein in der Sequenz C-X-X-C) unterschiedlicher Oxidoreduktasen der Thioredoxin-Familie beträchtlich (Mössner *et al.*, 2000). Insbesondere die beiden Aminosäuren zwischen den Cystein-Resten des aktiven Zentrums beeinflussen das Redoxpotential (Grauschopf *et al.*, 1995).

In Abbildung 1. 2 ist eine Thiol-Disulfid-Austausch-Reaktion schematisch dargestellt.

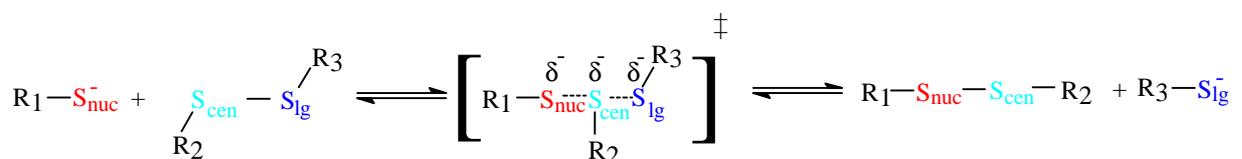


Abb. 1.2: Schema der Thiol-Disulfid-Austausch-Reaktion

An der Thiol-Disulfid-Austausch-Reaktion sind im wesentlichen drei Schwefelatome beteiligt. Zum einen das Thiolat-Anion, das als Nucleophil (S_{nuc}) fungiert. Es greift die Disulfidbrücke zwischen dem zentralen Schwefelatom (S_{cen}) und dem Schwefelatom (S_{lg}), das mit der Abgangsgruppe (R_3) verbunden ist, an. Im Übergangszustand ist die negative Ladung des Thiolat-Anions partiell auf die beiden anderen beteiligten Schwefelatome verteilt. Da an der Reaktion negativ geladene Spezies beteiligt sind, wird die Reaktivität durch elektrostatische

Einflußgrößen bestimmt. Das können zum einen benachbarte Ladungen sein und zum anderen induktive Effekte, die die Elektronenverteilung des Schwefelatoms verändern. Der pK_a -Wert der meisten in Proteinen vorkommenden Cystein-Reste liegt im Bereich zwischen 8 und 9 (Gilbert, 1990), so daß die Thiolgruppen der Cystein-Reste unter physiologischen Bedingungen nur zu einem geringen Anteil ionisiert sind. Mit zunehmendem pK_a -Wert nimmt die Geschwindigkeit der Thiol-Disulfid-Austauschreaktion ab. Negative Ladungen in der Nachbarschaft des Thiolat-Anions destabilisieren dieses, während positive Ladungen die Reaktionsgeschwindigkeit der Austauschreaktion erhöhen. Bulaj *et al.* (1998) untersuchten die Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen von 16 Modellpeptiden mit unterschiedlichen Oxidationsmitteln (Disulfid-Reagentien) wie Cystin, 2-Hydroxyethyl-disulfid und GSSG. Die Modellpeptide und Disulfid-Reagentien unterschieden sich in ihren elektrostatischen Eigenschaften. Die Reaktionsgeschwindigkeit von positiv geladenen Peptiden mit negativ geladenem GSSG nimmt mit zunehmender Ionenstärke im Ansatz ab. Das deutet darauf hin, daß elektrostatische Wechselwirkungen die Geschwindigkeit von Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen beeinflussen.

1.5 Vorstellung der Modellproteine

1.5.1 α -Glucosidase PI aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die α -Glucosidase PI (Maltase; E.C. 3.2.1.20) ist eine von zwei von Kopetzki *et al.* (1989a) aus dem industriell verwendeten *Saccharomyces-cerevisiae*-Stamm BY85 isolierte Isoform der α -Glucosidase. Beide Isoformen unterscheiden sich, bedingt durch drei Aminosäureaustausche, in ihrem isoelektrischen Punkt.

Die α -Glucosidasen sind Exoglycosidasen. Sie katalysieren die Hydrolyse von terminalen, 1,4-verknüpften α -D-Glucoseresten am nicht-reduzierenden Ende kurzkettiger Oligosaccharide. Dabei wird α -D-Glucose freigesetzt. Neben dem natürlichen Substrat Maltose hydrolysieren sie Saccharose und in geringem Maße Maltotriose. Daher wurde α -Glucosidase PI in einem klinischen Diagnoseverfahren zum Nachweis der humanen Amylase-Aktivität im Speichel bzw. in der Bauschspeicheldrüse eingesetzt. Hierbei entsteht als Zwischenstufe *p*-Nitrophenylmaltotriose, die von α -Glucosidase hydrolysiert wird (Hägele *et al.*, 1982). Die Spaltung β -glycosidischer Bindungen durch α -Glucosidasen ist bisher nicht bekannt. Verglichen mit der Affinität zu Maltose ist die Affinität der α -Glycosidasen zum synthetischen Substrat *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (*p*-NPG) etwa 300fach höher (Needleman *et al.*,

1978). Substanzen, die SH-Gruppen blockieren, inhibieren die Enzymaktivität der α -Glucosidase. Dieses läßt auf eine essentielle SH-Gruppe im aktiven Zentrum schließen (Halvorson und Ellias, 1958; Halvorson, 1966).

Die α -Glucosidase PI aus *Saccharomyces cerevisiae* ist ein monomeres, cytoplasmatisches Enzym mit einem Molekulargewicht von 68 kD und fünf freien Cystein-Resten. Es ist nicht glycosyliert. Das Aktivitätsoptimum liegt im Neutralbereich.

Die Struktur der im Rahmen dieser Dissertation verwendeten α -Glucosidase ist bislang nicht aufgeklärt. Sequenzhomologien zu α -Amylasen, die 1,4- α -D-glycosidische Bindungen hydrolysieren, lassen vermuten, daß ein $(\alpha/\beta)_8$ -barrel als Super-Sekundärstrukturelement vorhanden ist. Vermutlich ist in die katalytische N-terminale $(\alpha/\beta)_8$ -barrel-Domäne eine weitere kleinere Domäne zwischen dem dritten β -Faltblattstrang und der dritten α -Helix des $(\alpha/\beta)_8$ -barrels eingefügt (Svensson, 1988; McGregor und Svensson, 1989; Jerspersen *et al.*, 1991). In Abbildung 1.3 ist exemplarisch die Struktur der α -Amylase aus *Hordeum vulgare* (Gerste) dargestellt (Kadziola *et al.*, 1994; PDB-Eintrag: 1AMY). Erkennbar ist die charakteristische $(\alpha/\beta)_8$ -barrel-Supersekundärstruktur.

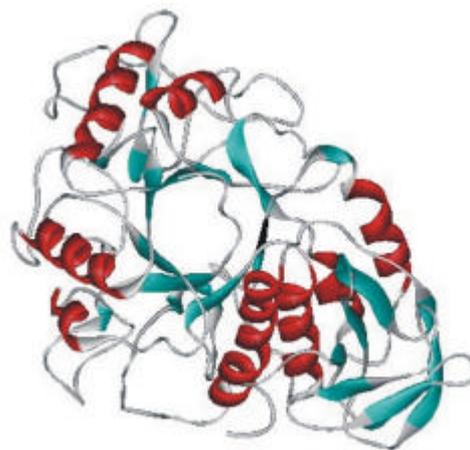


Abb. 1.3: Strukturmodell einer α -Amylase aus *Hordeum vulgare* (Gerste) mit der charakteristischen $(\alpha/\beta)_8$ -barrel-Supersekundärstruktur (Kadziola *et al.*, 1994)

1.5.2 MAK33

Der monoklonale Antikörper MAK33 aus Maus ist gegen humane dimere Creatinkinase (E.C. 2.7.3.2) des Skelettmuskelgewebes gerichtet. Bindet MAK33 an die dimere Form des muskelspezifischen Isoenzym (CK-MM), so wird die Creatinkinase-Aktivität um 80 % verringert (Buckel *et al.*, 1987).

Creatinkinase ist ein intrazelluläres dimeres Enzym, das die ATP-abhängige Phosphorylierung von Creatin katalysiert und aus zwei Untereinheiten besteht. Es existieren drei Isoenzyme, die sich aus den Untereinheiten M (*muscle*; Muskel) und B (*brain*; Gehirn) zusammensetzen: 1. CK-BB kommt vor allem im Gehirn vor. Die Konzentration von CK-BB ist im Serum nach einem Schlaganfall (Apoplexie), einem epileptischen Anfall und bei chronischer Niereninsuffizienz erhöht. 2. CK-MB kommt vor allem im Herzmuskel vor, und die Konzentration ist im Serum nach einem Herzinfarkt erhöht mit einem Anteil von >10 % an der Gesamt-Creatinkinasekonzentration. 3. CK-MM kommt hauptsächlich im Skelettmuskel vor. Die CK-MM-Konzentration ist bei Muskelerkrankungen (z. B. progressive Muskeldystrophie) und Muskelschädigungen (z. B. nach Injektionen) erhöht (Hildebrandt, 1998).

In der klinischen Diagnostik des Herzinfarktes wird bei der Bestimmung der CK-MB in der Regel eine Mischung von Antikörpern, die die CK-MM zu fast 100 % inhibieren, eingesetzt. Dabei wird allerdings die CK-MB ebenfalls zu 50 % inhibiert. MAK33 stellt in diesem Zusammenhang eine Ausnahme da, da er ausschließlich die Aktivität der CK-MM hemmt. Nachteil des monoklonalen Antikörpers ist allerdings die für klinische Anwendungen insgesamt zu geringe inhibierende Wirkung.

Nachdem Buckel *et al.* (1987) die Klonierung der cDNA von MAK33 beschrieben haben, wurde der Antikörper zu einem Modellprotein, an dem die rekombinante Expression und Rückfaltung eines Immunglobulins der Klasse κ /IgG1 untersucht wurde.

Neben Ansätzen, die cDNA der schweren und leichten Kette funktionell in tierischen Zellen (*COS*- und *CHO*-Zellen) zu exprimieren (Weidle *et al.*, 1987), wurde die heterologe Überexpression in rekombinanten *Escherichia coli* durchgeführt (Bücheler, 1989; Buchner und Rudolph, 1991). Das Fd-Fragment der schweren Kette von MAK33 (bestehend aus der variablen und der 1. konstanten Domäne) wurde als LacZ-Fusion unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors rekombinant in *Escherichia coli* mit einem Anteil von bis zu 27 % am Gesamtzellprotein produziert (Bücheler, 1989). Separat wurde die cDNA der leichten Kette in *Escherichia coli* exprimiert (Buchner und Rudolph, 1991). Beide Polypeptidketten akkumulieren im Cytosol in Form von *inclusion bodies* (IBs). Die Isolierung dieser IBs ist ein erster effizienter Reinigungsschritt. Nach Lösen der Aggregate des Fd-Fragments bzw. der leichten Kette unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen konnte das Fab-Fragment von MAK33 in Gegenwart eines *oxido-shuffling*-Systems mit Ausbeuten von 40 % renaturiert werden (Buchner und Rudolph, 1991). Die Reaktivierung des gesamten Antikörpers MAK33 gelang mit sehr geringen Ausbeuten (<1%).

Die Renaturierung des Fab-Fragmentes von MAK33 wurde hinsichtlich der Kinetik, möglicher Faltungsintermediate und des Einflusses von Faltungshelferproteinen wie PPI (Prolin-*cis/trans*-Isomerasen), PDI (Proteindisulfidisomerasen) oder GroEL eingehend charakterisiert (Lilie *et al.*, 1993; Lilie *et al.*, 1994; Lilie *et al.*, 1995a,b; Lilie und Buchner, 1995).

Die oxidative Faltung *in vitro* verläuft sehr langsam. Dabei erfolgt die Ausbildung korrekter Disulfidbrücken über den gesamten Zeitraum der Renaturierung. Die Rekonstitution des oxidierten Fab-Fragmentes wird durch Prolin-*cis-trans*-Isomerisierungen bestimmt (Lilie *et al.*, 1993).

Vor kurzem wurde die Kristallstruktur des Fab-Fragmentes von MAK33 mit einer Auflösung von 2.9 Å aufgeklärt (Augustine *et al.*, 2001). In Abbildung 1.4 ist ein Strukturmodell des Antikörperfragmentes dargestellt.



Abbildung 1.4: MOLSCRIPT-Modell des Fab-Fragmentes von MAK33 (Augustine *et al.*, 2001). Die leichte Kette κ (links) ist in gelb dargestellt, das Fd-Fragment (rechts) in grün.

Erkennbar sind die leichte Kette κ und das Fd-Fragment, die vier charakteristische Immunglobulin-Domänen bilden. Jede Domäne ist durch eine *b-barrel* Struktur gekennzeichnet und besteht aus zwei β -Faltblättern, die durch eine interne Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die CDR-Loops der leichten und schweren Kette, die die Antigenerkennung vermitteln, sind mit L1-L3 bzw. H1-H3 bezeichnet.

1.6 Problemstellung

Ausgehend von den Arbeiten von Höll-Neugebauer (1992) sowie Stempfer *et al.* (1996a,b) sollte im Rahmen dieser Dissertation die Anwendung polyionischer Fusionspeptide für die Reinigung, Renaturierung und die gerichtete Assoziation von Proteinen untersucht werden.

Zunächst sollten sowohl Varianten der α -Glucosidase mit unterschiedlichen N- und C-terminalen Fusionspeptiden hergestellt werden, als auch ein Antikörperfragment von MAK33 mit polyionischen Fusionspeptiden versehen werden. Im Gegensatz zu vorangegangenen Arbeiten enthielten die Fusionspeptide neben der Abfolge geladener Aminosäuren zusätzlich einen Cystein-Rest. In diesem Zusammenhang sollte ein möglicher Einfluß dieses zusätzlichen Cysteins auf die Renaturierung eines Proteins, für dessen Funktionalität die Ausbildung der nativen Disulfidbrücken essentiell ist, untersucht werden. Das Fab-Fragment, dessen Renaturierungscharakteristik eingehend untersucht wurde (Buchner und Rudolph, 1991; Lilie *et al.*, 1994), wurde aus diesem Grunde als Modellsystem gewählt.

Für die Charakterisierung der Proteine mit polyionischen Fusionspeptiden, die im analytischen Maßstab durch N-terminale Sequenzierung bzw. proteolytische oder chemische Spaltung und anschließende HPLC/MS erfolgen kann, sollte eine präparative Affinitätschromatographie entwickelt werden. Hierbei sollte sowohl die Eigenschaft der geladenen Aminosäuren, über ionische Wechselwirkungen mit einer Matrix zu interagieren, ausgenutzt werden, als auch die Möglichkeit über das Cystein eine kovalente Bindung auszubilden.

Der Hauptteil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Anwendung entgegengesetzt geladener Fusionspeptide als neuartige Dimerisierungsmodule, die eine gerichtete Assoziation und kovalente Verbrückung von Proteinen ermöglichen. Ein mögliches Anwendungsgebiet ist die Herstellung bifunktionaler Konjugate, die für Diagnostik und Therapie von Bedeutung werden könnten. Vorliegende Strategien zur Bildung von bispezifischen Antikörpern oder Antikörper-Enzym-Konjugaten, wie beispielsweise durch chemische Kopplung, führen zu einem inhomogenen Material. Daher wurde versucht durch *de novo*-Design Dimerisierungsdomänen für eine gerichtete Assoziation zu entwickeln. Hierzu gehören *coiled coils* oder amphiphile Helices. Diese werden als Fusionen mit Proteinen häufig nicht stabil exprimiert oder neigen zur Trimerisierung und Tetramerisierung.

Polyionische Fusionspeptide könnten hier eine attraktive Alternative darstellen, zumal sie aufgrund ihrer Multifunktionalität ein weites Anwendungsspektrum eröffnen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

ÄKTApurifier 100 bzw. ÄKTAexplorer 100
mit Fraktionskollektor Frac-900

und Prozeßsteuerung mittels

UNICORN Control Software (V. 3)

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Analytische Ultrazentrifuge Optima XL-A

Beckman, München

BioCad Workstation

Perseptive Biosystems, Wiesbaden

Biofuge Fresco

Heraeus, Hanau

Certomat BS-T-Schüttelinkubator

B. Braun Biotech, Melsungen

Circulardichroismus Spectrometer Modell 62A DS

AVIV, Lakewood, USA

Digital pH-Meter pH 525

WTW, Weilheim

Elektroporationsgerät Gene Pulser II

mit Pulse Controller Plus

BioRad, München

ELISA-Pipettiergerät ES22 mit Photometer 4010

und Steuereinheit Interface 4010 (Epson HX20

Mikrocomputer, Software: Digimed)

Boehringer Mannheim

Gaulin-Hochdruckhomogenisator Lab 60

APV, Lübeck

Gaulin-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40

APV, Lübeck

Gefriertrocknungsanlage Modell Beta 1-16

Martin Christ, Osterode

Gelelektrophoreseapparatur GNA-100 *submarine*
unit mit *electrophoresis power supply* EPS 200

bzw. EPS 600

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Gelelektrophoreseapparatur SE 250 *mighty*

small II mini-vertical unit für zwei 10 cm ×

8 cm Gele

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Geltrocknungsanlage DrygelSr

slab gel dryer Modell SE 1160 und

Hoefer Scientific Instruments, San

Francisco, USA

mit Membranvakuumpumpe CVC2

Vaccuubrand, Wertheim

Horizontalschüttler Polymax 1040

Heidolph, Schwabach

HT Multitron Inkubationsschüttelmaschine

Infors, Bottmingen, Schweiz

Küvettenschleuder

ITS, Hattersheim

<i>Li-Cor</i> [®] -Sequenziergerät Modell 4000	<i>MWG BIOTECH, Ebersberg</i>
MinicoldLab2203	<i>Boehringer Mannheim, Mannheim</i>
Omn-E Thermocycler	<i>Hybaid-AGS, Heidelberg</i>
Semidry Blotapparatur Hoefer SemiPhor	<i>Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA</i>
Schwingmühle HM 2000	<i>Retsch, Haan</i>
Tangentialflußfiltrationssystem ProVario-3	<i>Pall-Gelman, Dreieich</i>
Thermomixer comfort	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Tischautoklav GTA50	<i>Medizin und Labortechnik Fritz Gössner, Hamburg</i>
TRIO-Thermoblock	<i>Biometra, Göttingen</i>
Trockenschrank Function Line	<i>Heraeus, Hanau</i>
Ultra-Turrax T25	<i>Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen</i>
UVIKON-Spectrophotometer 942 mit Thermostat E10 und Küvettenmagnetruhrer Variomag	<i>Bio-Tek Kontron Instruments, Neufahrn medingLab, Freital</i>
Telemodul 40 S	<i>H + P Labortechnik, Oberschleißheim</i>
Varioklav Dampfsterilisatoren	<i>H + P Labortechnik, Oberschleißheim</i>
Vertikalschüttler Typ 3025	<i>GFL, Burgwedel</i>
Vortex-Genie 2	<i>Scientific Industries, Bohemia, USA</i>
Waagen Sartorius MC1, MC210S und BP4100	<i>Sartorius, Göttingen</i>
Zentrifuge Avanti J-20, Avanti J-25 und Avanti J-30I	<i>Beckman, München</i>
Zentrifuge Sorvall RC 5C Plus	<i>DuPont, Newton, USA</i>

2.1.2 Chemikalien, Molekulargewichtsstandards und Referenzproteine, Kits, Reagenzien und Enzyme, Peptide, sonstiges Material

Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben waren alle Chemikalien vom Reinheitsgrad p.a.. Lösungen wurden in Wasser der Qualität MilliQ angesetzt.

ABTS-Tabletten	<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid-Lösung	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Acetonitril (HPLC-grade)	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>

Agar-Agar	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Agarose <i>electrophoresis grade</i>	<i>ICN, Meckenheim</i>
Ammoniak (25% ig)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ammoniumchlorid	<i>Riedel-de-Haën, Seelze</i>
Ammoniumperoxodisulfat	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Ampicillin	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
Arginin	<i>Ajinomoto C., Inc., Tokyo, Japan</i>
Borsäure	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Bradford-Reagenz	<i>BioRad, München</i>
Bromphenolblau	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
Calciumchlorid	<i>Riedel-de-Haën, Seelze</i>
Citronensäure	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Coomassie Brilliant Blau G250	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Cobaltchlorid	<i>Merck, Darmstadt</i>
Cystein	<i>ICN, Meckenheim</i>
Diammoniumcitrat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Diammoniumsulfat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Dikaliumhydrogenphosphat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Dinatriumhydrogenphosphat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Dinatriumsulfat	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
5, 5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
Dithiothreitol (DTT)	<i>ICN, Meckenheim</i>
ECL-Reagenz	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Eisenchlorid	<i>Merck, Darmstadt</i>
Essigsäure (96% ig)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ethanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ethidiumbromid (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenanthridiniumbromid)	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, freie Säure)	<i>ICN, Meckenheim</i>
Ethylenglykol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Gelatinehydrolysat (Blocking Reagenz)	<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>
Glucose	<i>Merck, Darmstadt</i>
Glutathion oxidiert, reduziert	<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>
Glycerin	<i>ICN, Meckenheim</i>

Glycin	<i>ICN, Meckenheim</i>
Guanidiniumhydrochlorid (C-grade)	<i>Nigu Chemie GmbH, Waldkraiburg</i>
Harnstoff	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Hefeextrakt	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	<i>Biomol GmbH, Hamburg</i>
Jodacetamid	<i>ICN, Meckenheim</i>
Kaliumdihydrogenphosphat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Kaliumhydroxid	<i>Merck, Darmstadt</i>
Kanamycin	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Kupfersulfat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Lactose für die Mikrobiologie	<i>Merck, Darmstadt</i>
Magermilchpulver	<i>Nestlé, Frankfurt/M.</i>
Magnesiumchlorid	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Magnesiumsulfat	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Methanol (HPLC-grade)	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
2-Morpholinoethansulfonsäure Monohydrat (MES)	<i>ICN, Meckenheim</i>
Natriumacetat	<i>ICN, Meckenheim</i>
Natriumazid	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
Natriumcarbonat, wasserfrei	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumchlorid	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Natriumdihydrogenphosphat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumethyldiamintetraacetat (Na-EDTA)	<i>ICN, Meckenheim</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumhydrogenphosphat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumhydroxid	<i>Riedel-de-Haën, Seelze</i>
Natriumthiosulfatpentahydrat	<i>Amresco, Solon, USA</i>
p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
Phosphorsäure (85%ig)	<i>Merck, Darmstadt</i>
PLURIOL [®] P2000	<i>BASF, Ludwigshafen/Rhein</i>
Polyethylenglykol 35 000	<i>Fluka, Neu-Ulm</i>
2-Propanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Salzsäure (37%ig)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Silbernitrat für Proteinfärbung	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>

Thiamin	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
<i>t</i> -Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100)	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
Trichloressigsäure	<i>Fluka-Chemica, Neu-Ulm</i>
Trifluoressigsäure	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	<i>ICN, Meckenheim</i>
Trypton-Pepton (pankreat. Verdau von Casein)	<i>Beckton-Dickinson, Heidelberg</i>
Tween 20	<i>Merck, Darmstadt</i>
Zinksulfat	<i>Fluka-Chemica, Neu-Ulm</i>

Molekulargewichtsstandards und Referenzproteine

1 kb-DNA-Leiter	<i>Gibco-BRL, Eggenstein</i>
10 kD-Protein-Marker	<i>Gibo-BRL, Eggenstein</i>
α -Glucosidase PI Wildtypprotein (gereinigt, überexprimiert in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ABYSMAL81)	<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>
Fab<MAK33>, authentisch aus Maus (Aszites)	<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>
Kaleidoscope Prestained Standard	<i>BioRad, München</i>
Low Molecular Weight Marker	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Lysozym aus Hühnereiweiß (E. C. 3.2.1.17; 47 000 units/mg Feststoff)	<i>Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen</i>
MAK33	<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>
Rinderserumalbumin (Fraktion V)	<i>Boehringer Mannheim</i>

Kits

CK NAC <i>in vitro</i> Diagnosticum	<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>
ECL-Detektionskit	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
GFX Gelband Purification Kit	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Qiagen Mini Prep (Plasmid Purification Kit)	<i>Qiagen, Hilden</i>
Qiagen Nucleotide Kit	<i>Qiagen, Hilden</i>
SequiTherm EXCEL TM II	
DNA-Sequenzier Kit LC (für 25-41 cm Gele)	<i>Epicentre Technologies, Madison, USA</i>

Reagenzien und Enzyme

Verwendete Polymerasen:

Expand TM High Fidelity PCR System	<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	<i>Promega, Mannheim</i>
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	<i>Promega, Mannheim</i>

Restriktionsendonukleasen:

	<i>New England BioLabs, Frankfurt/M.</i>
<i>NdeI, HindIII, BamHI, NcoI, EcoRI, EcoRV, AvrII</i> incl. entsprechende Puffer für Einzel- und Doppel- restriktionsspaltungen	

Weitere Enzyme und Proteine:

Anti-Maus-Ig-Peroxidase Hybridoma-Screening Reagenz (lyophilisiertes Immunglobulin, stabilisiert)	<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>
biotinylierte humane Creatinkinase (CK-MM)	
Skelettmuskel-Isoenzym	<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>
Blocking Reagenz (Gelatinehydrolysat)	<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>
Benzonase ^R purity grade II (>90%) (250 U/μl)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Desoxyribonuclease I (aus Rinderpankreas)	<i>Sigma-Aldrich, Deisenhofen</i>
Shrimps Alkalische Phosphatase	<i>USB, Cleveland OH., USA</i>
T4-DNA-Ligase (1 U/μl)	<i>New England BioLabs, Frankfurt/M.</i>
T4-DNA-Ligase (1 U/μl)	<i>Gibco-BRL, Eggenstein</i>

Peptide

AlaCysLysLysLysLysLysLysLysLysAla (ACK8A)

(Cystein mit *S-tert*-Butyl-Rest modifiziert) *Frau Dr. B. Hartrodt, Universität Halle*

AlaCysGluGluGluGluGluGluGluGluGluGlu

(ACE10)

Herr Dr. J. Faust, Universität Halle

Sonstiges Material

Autoradiographiefilm Retina XBD	<i>INTAS, Göttingen</i>
BioTrace™ Nitrocellulosemembran (0,45 µm)	<i>Pall-Gelman, Dreieich</i>
BioTrace™ PVDF Transfermembran (0,45 µm)	<i>Pall-Gelman, Dreieich</i>
Dialyseschläuche Spectropor MCWO 6000-8000	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Glasperlen, 0,25-0,50 mm	<i>Roth GmbH, Karlsruhe</i>
pH-Indikatorstäbchen	<i>Merck, Darmstadt</i>
Zentrifugalkonzentratoren (Macrosep; MCWO 30 kD)	<i>Pall-Gelman, Dreieich</i>

2.1.3 Plasmide und Vektoren

2.1.3.1 Ausgangskonstrukte

pBT111	Derivat des Plasmids pKK223-3 (Brosius <i>et al.</i> , 1981), das die cDNA der leichten Kette (κ) von MAK33 (Buckel <i>et al.</i> , 1987) enthält (Rudolph <i>et al.</i> , 1994) (<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>); Amp ^r ; <i>tac</i> -Promotor
pKK177-3/C-GlucPI_ARG6	Plasmid zur Expression der α -Glucosidase PI (Kopetzki <i>et al.</i> , 1989a) aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mit C-terminalem Fusionspeptid Gly-Arg ₆ (Stempfer <i>et al.</i> , 1996b) (<i>Roche Diagnostics, Penzberg</i>); Amp ^r ; <i>tac</i> -Promotor
pUC118/16/8 (p10169)	(pUC118; Vieira und Messing, 1987) Derivat des Plasmids pUC8, das der Expression der schweren Kette (γ 1-Typ) des Antikörpers MAK33 <CK-MM> mit einer N-terminalen Extension von acht Aminosäuren - entsprechend der Klonierung als LacZ-Fusion - (Sequenz: MTMITDSK- γ -Kette) dient; Amp ^r (Bücheler, 1989)

pET-11a (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden); Amp^r; T7lac-Promotor

pUBS520 codiert den I^q-Repressor und seltene *argU* tRNAs (Brinkmann *et al.*, 1989); Kn^r

2.1.3.2 Selbsterstellte Konstrukte

Plasmide (Amp^r; T7lac-Promotor) zur Expression der cDNA des Fd-Fragmentes von MAK33 mit C-terminalen polyionischen Fusionspeptiden der Sequenz X₁₀SerCysPro, wobei X entweder Arg, Asp oder Glu bedeutet:

pET-11a/FdR10C

pET-11a/FdD10C

pET-11a/FdE10C

Plasmid zur Expression der cDNA des Fd-Fragmentes von MAK33 unter der Kontrolle des T7lac-Promotors ohne C-terminales Fusionspeptid

pET-11a/Fd0

Plasmide (Amp^r; *tac*-Promotor) zur Expression der cDNA der α -Glucosidase PI aus *Saccharomyces cerevisiae* mit unterschiedlichen C- oder N-terminalen Fusionspeptiden:

pKK177-3/ α -Gluc_R10C

pKK177-3/ α -Gluc_E10C

pKK177-3/R10C- α -Gluc

pKK177-3/CR10- α -Gluc

Bei den Konstrukten mit C-terminalem Fusionspeptid wurde ein Glycin-Rest zwischen die letzte Aminosäure der α -Glucosidase-Sequenz und die Fusionspeptide eingefügt. Im Anschluß an die C-terminalen geladenen Aminosäuren folgten ein Cystein-, ein Glycin- und ein Prolin-Rest. Die N-terminalen Konstrukte enthielten zusätzlich die ersten fünf Aminosäuren der α -Glucosidase (Met-Thr-Ile-Ser-Asp) vor der polyionischen Sequenz.

Plasmid zur Expression der cDNA des Wildtypproteins der α -Glucosidase PI:

pKK177-3/ α -Gluc_0

2.1.4 Oligonukleotide

Sequenzierprimer (*MWG Biotech, Ebersberg*):

am 5' Ende mit Farbstoff IRD41* bzw. IRD800 markiert für Infrarot-Detektion

T7-Promotor: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

internfdFw* : 5'-CCG TAG TTA CCA TAG TAG GC-3'

internfdRv* : 5'- CAG TCT GAC CTC TAC ACT CTG-3'

kappaFwSq: 5'- GGT GCT GGG ACC AAG CTG G- 3'

kappaRvSq: 5'- CAC GAC TGA GGC ACC TCC AG- 3'

pKK177 BamHI: 5'- GGA TCC AGC TTA TCG ACT GC-3'

α GlucEcoRI-1600: 5'- GAG TAC GGA GAC AAG ACG CTG-3'

Sequenzen der verwendeten PCR-Primer

Primer zur Mutagenese des Fd-Fragmentes von Fab<MAK33>:

5'-Primer für das Umklonieren des Fd-Fragmentes in pET11a

NT_NdeI Fd

5'- GCG TTA GCC ATA TGA CCA TGA TTA CGA ATT CCC GG-3'

3'-Primer für C-terminal modifizierte Fd-Konstrukte

CT_FdR10SCP

5'-CAT AGT CCC AAG CTT TTA CGG GCA AGA ACG ACG GCG GCG GCG ACG GCG
ACG GCG GCG ACC ACA ATC CCT GGG CAC AAT-3'

CT_FdD10SCP

5'-CAT AGT CCC AAG CTT TTA CGG GCA AGA ATC ATC GTC ATC ATC ATC ATC
GTC GTC ATC ATC ACC ACA ATC CCT GGG CAC AAT-3'

CT_FdE10SCP

5'- CAT AGT CCC AAG CTT TTA CGG GCA AGA CTC TTC TTC CTC CTC CTC TTC
CTC CTC TTC ACC ACA ATC CCT GGG CAC AAT-3'

3'-Primer für Fd-Konstrukte ohne C-terminale Extension

CT_Fd0

5'-CAT AGT CCC AAG CTT TCA TTA ACC ACA ATC CCT GGG CAC AAT TTT C-3'

Primer zur Mutagenese der α -Glucosidase:

3'-Primer für N-terminal modifizierte Konstrukte

α -Gluc_HindIII_0

5'-AAA CAG AAG CTT ATT ACC CTT TGA CCA GGT AGA TTC TAC C-3'

5'-Primer für N-terminal modifizierte Konstrukte

MTISDR10C- α -Gluc

5'- AAA CGG ATA TCC GAT CGC CGA CGT CGC CGG CGT CGT CGA CGT CGA TGT
ACT ATT TCT GAT CAT CCA GAA ACA GAA CCA AAG TG-3'

MTISDCR10- α -Gluc

5'- AAA CGG ATA TCC GAT TGT CGC CGA CGT CGC CGG CGT CGT CGA CGT CGA
ACT ATT TCT GAT CAT CCA GAA ACA GAA CCA AAG TG-3'

5'-Primer für C-terminal modifizierte Konstrukte

AG5-Eco1600

5'-CTA AAG AGT ACG GAG ACA AGA CGC TGT TTG C-3'

3'-Primer für C-terminal modifizierte Konstrukte

AG3-R10CGP

5'- AAA CAG AAG CTT ATT ATG GTC CAC ATC GAC GTC GAC GAC GCC GGC GAC
GTC GGC GCC CTT TGA CCA GGT AGA T-3'

AG3-E10CGP

5'- AAC AGA AGC TTA TTA TGG TCC ACA CTC TTC CTC TTC CTC TTC CTC TTC
CTC TTC CCC TTT GAC CAG GTA GAT TCT-3'

2.1.5 Mikroorganismen

Die verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle 2.1 zusammengestellt.

Tabelle 2.1: Verwendete Mikroorganismen. Die Bedeutung der Abkürzungen des Genotyps kann Bachmann (1983) entnommen werden.

Stamm	Genotyp	Referenz	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Studier und Moffatt, 1986	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
<i>E. coli</i> C600 (BNN93)	F ⁻ <i>e14⁻ (McrA⁻) hsdR (r_k⁻ m_k⁺) supE44 thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 fhuA21 mcrB</i>	Huynh <i>et al.</i> , 1985	Stratagene, La Jolla, USA
EcoB	<i>lon</i>	Donch und Greenberg, 1968	Roche Diagnostics, Penzberg

2.1.6 Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie:

50fach TAE-Puffer	2 M Tris-Acetat, 50 mM EDTA, pH 8,0 (wurde als 1fach Puffer für die Herstellung und Elektrophorese der Agarosegele und für die Ethidiumbromid-Färbelösung verwendet)
DNA-Probenauftragspuffer	50 % (v/v) Glycerin in 1fach TAE-Puffer 0,0025 % (w/v) Bromphenolblau
10fach TBE-Puffer für die Sequenzierung	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA

Spurenelementlösung (2 ml/l wurde dem Medium nach separatem Autoklavieren zugefügt):

3,4 mM CaCl₂, 0,63 mM ZnSO₄, 0,59 mM MnSO₄, 54 mM EDTA, 61,8 mM FeCl₃,
0,63 mM CuSO₄, 0,8 mM CoCl₂

Feedinglösung:

Es wurde eine Lösung aus 330 g Glucose/400 ml hergestellt und autoklaviert. Diese Lösung wurde mit 50 ml einer separat autoklavierten Mineralsalzlösung (140 mM Na₂SO₄, 190 mM (NH₄)₂SO₄, 93 mM NH₄Cl, 840 mM K₂HPO₄, 260 mM NaH₂PO₄, 44 mM (NH₄)₂-H-Citrat) versetzt. Durch Sterilfiltration wurden 1 ml 1 M MgSO₄-Lösung und 5 ml Spurenelementlösung zugesetzt.

Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese:

5fach SDS-Probenauftragspuffer	250 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	10 mM	EDTA
	5 % (w/v)	SDS
	50 %	Glycerin
	0,005 %	Bromphenolblau

Für Gele unter reduzierenden Bedingungen wurde der SDS-Probenauftragspuffer mit 10 mM DTT versetzt.

5fach SDS-Gelelektrophoresepuffer	125 mM	Tris
	1,25 M	Glycin
	17,5 mM	SDS
	pH 8,3	

4fach Trenngelpuffer 1,5 M Tris-HCl, 0,8 % SDS, pH 8,8

4fach Sammelgelpuffer 0,5 M Tris-HCl, 0,8 % SDS, pH 6,8

Färbelösungen nach Fairbanks *et al.* (1971) für Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen:

Lösung A: 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,05 % (w/v) Coomassie Brillant Blau G250

Lösung B: 10 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,005 % (w/v) Coomassie Brillant Blau G250

Lösung C: 10 % (v/v) Essigsäure, 0,002 % (w/v) Coomassie Brillant Blau G250

Entfärbelösung: 10 % (v/v) Essigsäure

2.1.7 Verwendete Chromatographiematerialien und -säulen

Ionenaustauschchromatographie:

POROS[®] HS (*PerSeptive Biosystems, Wiesbaden*); Säulenvolumen: 1,7 ml

POROS[®] HQ (*PerSeptive Biosystems, Wiesbaden*); Säulenvolumen: 1,7 ml

Q-Sepharose *fast flow* (*Boehringer Mannheim*); Säulenvolumen: 35 ml

S-Sepharose *fast flow* (*Boehringer Mannheim*); Säulenvolumen: 23 ml

Resource Q (*Amersham Pharmacia, Freiburg*); Säulenvolumen: 6 ml

Resource S (*Amersham Pharmacia, Freiburg*); Säulenvolumen: 6 ml

Fractogel DEAE (M) (*Merck, Darmstadt*)

Fractogel TMAE (M) (*Merck, Darmstadt*)

Fractoprep DEAE B-789 (S) (*Merck, Darmstadt; Forschungsmuster*)

Gelfiltration:

Superdex 75 HR 10/30 und HiLoad 26/60 Superdex 75 pg (*Amersham Pharmacia, Freiburg*)

TSKgel G2000SWXL (*TosoHaas, Stuttgart*) Gelfiltrationssäule für Proteine im Bereich von 5 bis 100 kD

Reversed Phase:

Reversed Phase C18 (*Macherey-Nagel, Düren*)

Poros[®] H1 RP C4 (*PerSeptive Biosystems, Wiesbaden*)

Trägermaterial für kovalente Ionenaustauschchromatographie:

CNBr-aktivierte Sepharose *fast flow* (*Amersham Pharmacia, Freiburg*)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Klonierung und Sequenzierung

Restriktionsspaltungen, Plasmidisolierungen, Ligationen und gelelektrophoretische Trennung von DNA wurden nach den Methoden von Ausubel *et al.* (1997) durchgeführt. Plasmid-DNA für Klonierungen wurde mit dem *Qia Prep Spin Kit (Qiagen, Hilden)* isoliert. DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen mit dem *GFX gel band purification kit (Amersham Pharmacia, Freiburg)* eluiert. Transformationen wurden entweder durch Elektroporation mit einem "Gene Pulser" oder durch Transformation in chemisch-kompetente Zellen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die DNA-Sequenz aller zu exprimierenden Konstrukte wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) untersucht. Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde dabei unter Verwendung von IRD41 bzw. IRD800-markierten Oligonukleotiden mit dem *SequiTherm Excel II DNA sequencing kit LC (für 25-41 cm Gele)* an einem *Li-Cor-DNA-Sequencer 4000* durchgeführt.

2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.*, 1986) wurde bei Verwendung von Oligonukleotidsequenzen mit einer Länge über 60 Nukleotide mit der *Taq-* und mit der *ExpandTM High Fidelity-Polymerase* durchgeführt. Das Aufschmelzen der Template DNA erfolgte dabei für 5 min bei 95 °C. Nachfolgend wurde 30 mal folgende Reaktionsabfolge wiederholt: 1. Anlagerung der Primer bei 52-64°C, 2. Polymerase-Reaktion bei 72°C 2-3 min und 3. Denaturierung bei 95°C für 45 sec.

2.2.2 Konstruktion der Expressionsvektoren

2.2.2.1 Vektoren zur Expression der cDNA des Fd-Fragmentes von MAK33 mit unterschiedlichen Fusionspeptiden

Ausgehend von dem Plasmid pUC118/16/8, auf dem die schwere Kette γ des Antikörpers MAK33 codiert war, wurde die Gensequenz des Fd-Fragmentes (variable Domäne und erste konstante Domäne, 702 bp) mittels Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986)

amplifiziert. Mit Hilfe der für die Amplifikation verwendeten Primer wurde am 5'-Ende der codierenden Sequenz eine *NdeI*-Restriktionsschnittstelle unmittelbar vor dem Startcodon ATG des Gens eingefügt. An das 3'-Ende wurde die Sequenz, die die unterschiedlichen polyionischen Fusionspeptide codiert, ein Stopp-Codon (TAA) sowie eine *HindIII*-Restriktionsschnittstelle angefügt. Als 3'-Primer wurden 4 verschiedene Varianten verwendet, durch die Fusionspeptide X₁₀SCP codiert wurden. Hierbei bedeutet X entweder Arginin (R), Lysin (K), Glutaminsäure (E) oder Asparaginsäure (D).

Nach Restriktionsverdau der gereinigten amplifizierten Fragmente mit *NdeI* und *HindIII* erfolgte die Insertion in den ebenfalls mit *NdeI* und *HindIII* geschnittenen Vektor pET-11a. Dieser Vektor dient zur Expression des Fusionsgens unter der Kontrolle des T7*lac*-Promotors.

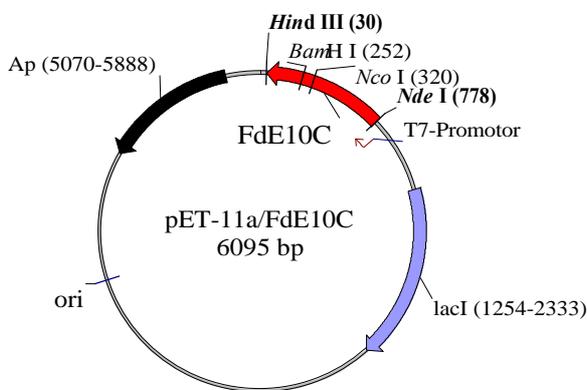


Abb. 2.1: Plasmidkarte des Expressionsvektors pET-11a/FdE10C. Die Klonierung des PCR-Fragmentes erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII*.

2.2.2.2 Vektoren zur Expression der α -Glucosidase-cDNA mit N-terminalen Fusionspeptiden

Ein 1752 bp-Fragment, das die α -Glucosidase PI codiert, wurde mit Hilfe der jeweiligen 5'-Primer (MTISDR10C- α -Gluc bzw. MTISDCR10- α -Gluc) und des 3'-Primers α -Gluc_HindIII_0 ausgehend von dem Plasmid pKK177-3/C-GlucPI_Arg6 amplifiziert. Die 5'-Primer waren dabei so konzipiert, daß sie eine *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle und eine Wiederholung der Aminosäurereste 2 bis 4 (Thr-Ile-Ser-Asp) der α -Glucosidase enthielten, sowie die polyionische Sequenz bestehend aus Argininresten und einem zusätzlichen Cystein-Rest codierten. Der 3'-Primer hybridisierte mit der cDNA-Sequenz unmittelbar vor der Sequenz, die für die C-terminale polyionische Extension Arg₆ codiert. Auf diese Weise wurden zwei Stopp-Codone, sowie eine *HindIII*-Restriktionsschnittstelle angefügt und die C-terminale Extension entfernt. Nach Restriktionsverdau des Fragmentes mit *EcoRV* und *HindIII* erfolgte die Religation in den ebenfalls mit *EcoRV* und *HindIII* behandelten Vektor pKK177-3/C-GlucPI_Arg6.

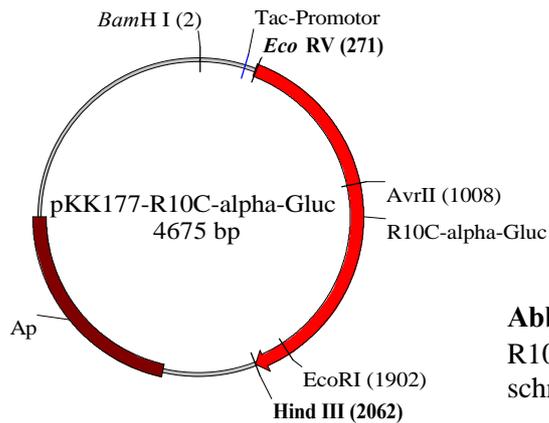


Abb. 2.2: Plasmidkarte des Expressionsvektors pKK177-R10C- α -Gluc. Die Klonierung erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *EcoRV* und *HindIII*.

2.2.2.3 Vektoren zur Expression der α -Glucosidase-cDNA mit C-terminalen Fusionspeptiden

Ausgehend von dem Plasmid pKK177-3/C-GlucPI_Arg6 wurde ein 121 bp-Fragment mit Hilfe der Oligonukleotide AG5-EcoRI1600 und der 3'-Primer (AG3_R10CGP und AG3_E10CGP) amplifiziert. Die 3'-Primer codierten dabei das polyionische Fusionspeptid Arg₁₀CGP bzw. Glu₁₀CGP und enthielten zwei Stopp-Codone (TAA und TAA) und eine *HindIII*-Restriktionsschnittstelle. Nach Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *HindIII* wurde das Fragment in den Vektor pKK177-3/C-GlucPI_Arg6 religiert.

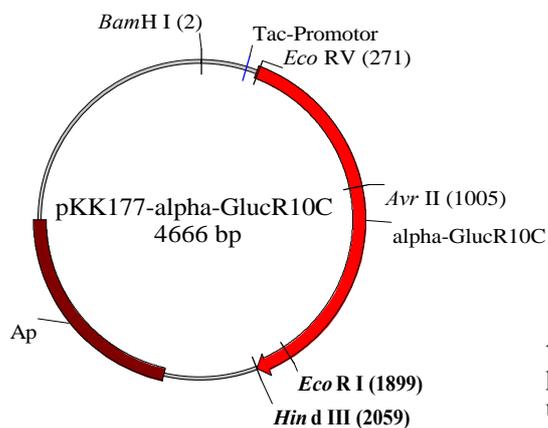


Abb. 2.3: Plasmidkarte des Expressionsvektors pKK177- α -GlucR10C. Die Klonierung erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *HindIII*.

2.2.3 Stammhaltung und Kultivierung von Mikroorganismen

2.2.3.1 Stammhaltung und Anzucht von Mikroorganismen

Die Stammhaltung von Mikroorganismen erfolgte als Glycerinkulturen bei -80°C . Hierzu wurden $600\ \mu\text{l}$ einer Übernachtskultur mit $400\ \mu\text{l}$ 40 % (v/v)iger Glycerinlösung vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Anzucht von Mikroorganismen wurde in 100 ml-Schüttelkolben mit 20 ml LB-Medium und den entsprechenden Antibiotika auf einem Horizontalschüttler bei 130 rpm und 37°C über Nacht durchgeführt. Das LB-Medium wurde entweder mit einer Kolonie von der Agarplatte einer Transformation oder ausgehend von einer Glycerinkultur angeimpft.

Expressionstests im 20 ml-Maßstab wurden auf LB-Medium, supplementiert mit den entsprechenden Antibiotika und 2 % Glucose, bei 37°C und 130 rpm durchgeführt. Hierzu wurde das Medium mit einer Übernachtskultur 1:100 angeimpft und bis zu einer optischen Dichte ($\text{OD}_{600\ \text{nm}}$) von 0,5 bis 0,8 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM.

2.2.3.2 Kultivierungen zur Gewinnung von löslichem Protein

Für die Produktion der α -Glucosidase-Varianten als lösliches Protein wurde die Methode von Kopetzki *et al.* (1989b) verwendet. Hierbei wird durch limitierte Induktion in Gegenwart von 0,5 % Lactose, bei abgesenktem pH-Wert (pH 5,0) und niedriger Temperaturen (24°C), die Bildung der α -Glucosidase in löslicher Form begünstigt.

Die Expression der α -Glucosidase-Genkonstrukte pKK177-3/ α -GlucE10C, R10C- α -Gluc und α -GlucR10C wurde nach Transformation in den Lactose-Permease-defizienten Stamm *E. coli* C600 pUBS520 folgendermaßen durchgeführt:

750 ml LB-Medium (mit den entsprechenden Antibiotika und 2 % Glycerin versetzt) wurden mit einer stationären Übernachtskultur 1:100 angeimpft und auf einem Horizontalschüttler bei 150 rpm und 37°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte ($\text{OD}_{600\ \text{nm}}$) von 1,0 bis 1,2 inkubiert. Nach Absenken der Kultivierungstemperatur auf 24°C erfolgte die Induktion durch Zugabe von 750 ml LB-Medium pH 5,0 (vor dem Autoklavieren mit 3 M Phosphorsäure eingestellt) mit 2 % Glycerin und von Lactose in einer Endkonzentration von 0,5 %. Es wurde weitere 6 h bei 150 rpm und 24°C inkubiert. Anschließend wurde die Biomasse durch Zentrifugation sedimentiert (5000 rpm, 15 min, 4°C , Rotor JLA 8.1000, Beckman), in 10 mM

K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 10 mM EDTA, pH 6,8 resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Lagerung der Zellpellets erfolgte bei -80°C .

2.2.3.3 Bioreaktorkultivierungen

Bioreaktorkultivierungen wurden in einem Biostat ED (Arbeitsvolumen: 10 l; *Braun, Melsungen*) mit digitalem Meß- und Regelsystem DCU und dem Prozeßleitsystem MCF5win durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte dabei nach dem Fedbatch-Verfahren auf Mineralsalzmedium nach Teich *et al.* (1998). Es wurden 8 l Medium folgender Zusammensetzung angesetzt: 14 mM Na_2SO_4 , 18,7 mM $(NH_4)_2SO_4$, 9,3 mM NH_4Cl , 84 mM K_2HPO_4 , 26 mM NaH_2PO_4 , 4,4 mM $(NH_4)_2$ -H-Citrat. Der pH-Wert wurde mit 10 M Natriumhydroxidlösung auf 7,0 eingestellt. Das Medium wurde im Bioreaktor 60 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Separat wurde eine Glucoselösung autoklaviert, mit der zu Beginn der Kultivierung eine Konzentration von 20 g Glucose/l eingestellt wurde. Zusätzlich wurde das Medium mit 0,1 g/l Thiamin, 2 ml/l 1 M $MgSO_4$ -Lösung sowie den jeweiligen gelösten Antibiotika und 2 ml/l Spurenelementlösung versetzt. Das Medium wurde mit einer Übernackkultur auf Mineralsalzmedium angeimpft, so daß eine optische Dichte $OD_{500\text{ nm}}$ von 0,1 zu Beginn der Kultivierung vorlag. Nach vollständigem Verbrauch der Glucose (Kontrolle mit Glucosestäbchen (*Merck, Darmstadt*), sowie schlagartiger Anstieg des pO_2) wurde die Kultivierung durch Zugabe einer Feedinglösung fortgesetzt. Dadurch wurde eine konstante Wachstumsrate von $0,11\text{ h}^{-1}$ vor der Induktion und von $0,08\text{ h}^{-1}$ nach Induktion eingestellt. Für die pH-Wert-Regelung wurde 25%ige Ammoniaklösung verwendet, als Antischaummittel eine 50%ige Polypropylenglykollösung (PLURIOL[®] P2000, *BASF, Ludwigshafen*). Bei Erreichen einer optischen Dichte von etwa 60 wurde durch Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert und weitere 3 h bei 37°C kultiviert. Unter diesen Bedingungen wurde eine $OD_{500\text{ nm}}$ von etwa 80 erreicht. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5000 rpm, 4°C , 15 min, Rotor JLA 8.1000, *Beckman*) sedimentiert. Die Biofeuchtmasse wurde bei -80°C gelagert.

2.2.4 Proteinchemische Methoden

2.2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970). Es wurden selbstgefertigte Gele mit einem Acrylamidgehalt von 10 %

(Trenngele für die α -Glucosidase-Varianten und Assoziationsansätze) und 12 % (Trenngele für die Fab-Fragment-Varianten) verwendet. Die Trenngele wurden jeweils mit einem 6%igen Sammelgel überschichtet.

Die Proben wurden je nach Konzentration mit 1fach bis 5fach SDS-Probenauftragspuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Proben, die unter denaturierenden, nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert wurden, wurden zuvor mit einem 10 bis 100fachen molaren Überschuß Iodacetamid (bezogen auf die Konzentration freier Cysteine) in 100 mM Tris-HCl, pH 8,5 für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Auf diese Weise werden freie Cystein-Reste, wie sie beispielsweise durch das Redoxsystem eingetragen werden, durch Carboxyamido-methylierung blockiert. Die aufgetrennten Proteine wurden entweder nach der Methode von Fairbanks *et al.* (1971) mit Coomassie Brilliant Blau G250 oder mittels Silberfärbung (Heukeshoven und Dernick, 1988) detektiert. Die densitometrische Auswertung der Gele wurde mit dem Programm Phoretix 1D Quantifier (Version 4.01; *NonLinear Dynamics Ltd.*) durchgeführt. Als Molekularmassenstandards diente zum einen eine 10 kD-Leiter (*Gibco-BRL*) und zum anderen das LMW *electrophoresis calibration kit* (*Amersham Pharmacia, Freiburg*).

2.2.4.2 Western Blot

Der Transfer von Proteinen auf eine Membran (Towbin, 1979) erfolgte im Anschluß an die gelelektrophoretische Auftrennung (vgl. 2.2.4.1) nach der Methode von Kyhse-Andersen (1984) in einer Semidry-Blotting-Apparatur (*Amersham Pharmacia, Freiburg*) für 1 h bei 100 V und 1 mA/cm² Membranfläche. Für die immunologische Detektion wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (BiotraceTM NC Transfermembran aus reiner Nitrocellulose, Poren-größe: 0,45 μ m, *Pall Gelman, Dreieich*) übertragen, für den Nachweis mittels N-terminaler Sequenzierung auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (BiotraceTM PVDF Transfermembran, Porengröße: 0,45 μ m, *Pall Gelman, Dreieich*).

Blot für Immunodetektion

Der Puffer für die Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran hatte folgende Zusammensetzung: 20 mM Tris, 150 mM Glycin, 0,7 mM SDS pH 8,5, 20 % Methanol. 3 Lagen Whatman 3 MM-Papier wurden mit Puffer getränkt, darauf wurde das SDS-Gel gelegt und mit der Nitrocellulosemembran bedeckt. Es folgten drei Lagen Whatman 3 MM-Papier.

Nach dem Proteintransfer wurden freie Bindungsstellen auf der Blotmembran durch Inkubation für 3 h bei 4°C in einer 5 % (w/v)igen Magermilchlösung in TBS-T-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) blockiert. Anschließend wurde die

Membran in einer Lösung des Hybridoma Screening-Reagenzes (*Roche Diagnostics*) für 3 h bei 4°C belassen. Das Peroxidase-Konjugat wurde dabei in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS-T-Puffer eingesetzt. Die Membran wurde 5mal mit TBS-T-Puffer (jeweils 5 min) gewaschen (20°C). Mit Hilfe einer chemilumineszierenden Reaktion mit dem ECL-Detektionssystem (*Amersham Pharmacia, Freiburg*) wurden die Fab-Fragmente nachgewiesen. Dabei wurde die Membran auf einem Retina XBD Röntgenfilm (*INTAS, Göttingen*) für 30 sec bis 5 min exponiert.

Blot für N-terminale Sequenzierung

Für die N-terminale Sequenzierung wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde zunächst 5 min in Methanol inkubiert. Als Transferpuffer wurde 50 mM Borsäure/NaOH, pH 9,0, 20 % (v/v) Methanol verwendet. Zum Färben der Proteinbanden wurde die Blotmembran 30 sec bis 1 min in 1 % (v/v) Essigsäure, 10 % (v/v) Methanol, 0,1 % Coomassie Brilliant Blau G250 inkubiert und anschließend mit 10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Methanol entfärbt.

2.2.4.3 Proteinbestimmung

Konzentrationsbestimmungen gereinigter Proteine in Lösung wurden mittels UV-Absorptionsspektroskopie an einem UVIKON-UV-Spektrophotometer 492 durchgeführt. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz kann aus der Extinktion $E_{280\text{ nm}}$ bei einer Wellenlänge von 280 nm, dem molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280\text{ nm}}$ in $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ und der Schichtdicke der verwendeten Küvette d in cm, die Konzentration der Proteinlösung ermittelt werden:

$$E_{280\text{ nm}} = \epsilon_{280\text{ nm}} \cdot c \cdot d \quad (2)$$

Der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280\text{ nm}}$ des Proteins ergibt sich dabei aus der Summe der mit den spezifischen molaren Extinktionskoeffizienten gewichteten Anzahl n an Tryptophan- und Tyrosin-Resten sowie an Disulfidbrücken (Wetlaufer, 1962):

$$\epsilon_{280\text{ nm}} = 5690 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot n_{\text{Tryptophan}} + 1280 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot n_{\text{Tyrosin}} + 610 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot n_{\text{Disulfidbrücken}} \quad (3)$$

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden folgende molare Extinktionskoeffizienten zu Grunde gelegt:

Fab-Fragment und Derivate

$$e_{280\text{ nm}} = 80\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

α -Glucosidase und Derivate

$$e_{280\text{ nm}} = 146\,880\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

Heterodimer aus FabE10C und α -GlucR10C

bzw. aus FabE10C und R10C- α -Gluc

$$e_{280\text{ nm}} = 104\,680\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

Die Proteinkonzentration von Rohextrakt-Lösungen und solubilisierten *inclusion bodies* wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Hierbei wurde das colorimetrische Nachweisverfahren der Fa. *BioRad* nach den Angaben des Herstellers verwendet. Als Referenzproteine wurden Rinderserumalbumin (für Rohextrakt), authentisches Fab-Fragment aus Maus (für solubilierte *inclusion bodies* der κ -Kette und der Fd-Derivate) sowie das Wildtypprotein der α -Glucosidase (für solubilierte *inclusion bodies* der α -Glucosidase-Derivate) in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Proteinlösung unter denaturierenden, reduzierenden oder nativen Bedingungen im Konzentrationsbereich zwischen 0,05 mg/ml bis 1 mg/ml eingesetzt.

2.2.4.4 Bestimmung freier SH-Gruppen

Die Bestimmung freier SH-Gruppen in Peptiden und Proteinen wurde nach der Methode von Ellman (1959) durchgeführt. DTNB (5,5'-Dithio**bis**(2-nitrobenzoesäure)) reagiert bei pH-Werten über 8 quantitativ mit den zugänglichen SH-Gruppen unter Freisetzung von 3-Carboxy-4-nitro-thiophenolat. Dieses wird bei einer Wellenlänge von 410 nm photometrisch bestimmt und mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 13600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ bei pH 8,0 quantifiziert.

Bestimmungen unter nativen Bedingungen wurden in 100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8,0 durchgeführt, unter denaturierenden Bedingungen wurde der Puffer mit Guanidiniumhydrochlorid in einer Endkonzentration von 4 M versetzt.

2.2.4.5 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von α -Glucosidase

Die Bestimmung der α -Glucosidase-Aktivität erfolgte nach der Methode von Halvorson (1966) mit *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (*p*-NpG) als Substrat. Hierbei katalysiert α -Glucosidase die Hydrolyse des Substrates unter Bildung von *p*-Nitrophenol und Glucose. Die zeitliche Änderung der *p*-Nitrophenolkonzentration ist dabei proportional zur zeitlichen Änderung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm. Diese wurde mit dem UVIKON-Spectrophotometer 492 bestimmt. Aus der Änderung der Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit wurde die volumenbezogene α -Glucosidase-Aktivität ermittelt:

$$\text{volumenbezogene } \alpha\text{-Glucosidase-Aktivität [U/ml]} = \frac{dE_{405\text{nm}}/dt \cdot V_{\text{Test}}}{e_{405\text{nm}} \cdot d \cdot V_{\text{Probe}}} \quad (4)$$

Hierin bedeuten $dE_{405\text{ nm}}/dt$ die zeitliche Änderung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm, V_{Test} das Volumen des Testansatzes in ml, $e_{405\text{ nm}}$ der Extinktionskoeffizient von *p*-Nitrophenol ($7,8\text{ cm}^2/\mu\text{mol}$), d die Schichtdicke in cm und V_{Probe} das Probevolumen der zu untersuchenden Proteinlösung in ml.

Unter Berücksichtigung der Proteinkonzentration c_{Protein} in mg/ml der untersuchten Proteinlösung wird die spezifische Aktivität erhalten als:

$$\text{spezifische Enzymaktivität [U/mg]} = \frac{\text{volumenbezogene Enzymaktivität [U/ml]}}{c_{\text{Protein}} [\text{mg/ml}]} \quad (5)$$

Die Einheit 1 Unit entspricht hierbei derjenigen Enzymmenge, die die Umsetzung von 1 μmol *p*-NpG pro Minute unter Standardreaktionsbedingungen (100 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 6,8, 30°C, in gerührten Küvetten) katalysiert.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, das seit 1972 anstelle der "unit" das "katal" (kat) als SI-Einheit empfohlen wird (Lottspeich und Zorbas, 1998). 1 katal ist diejenige Enzymmenge, die 1 mol Substrat pro Sekunde umsetzt. 1 Unit entspricht etwa 16,67 nkat. Im Rahmen dieser Arbeit wird durchweg die Einheit "unit" für die Enzymaktivität verwendet.

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde in einem Gesamtvolumen von 2 ml in Gegenwart von 2 mM *p*-NpG in 100 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 6,8 bei 30°C in rührbaren

Küvetten (optisches Glas, *Hellma*) durchgeführt. Die Substratlösung wurde täglich frisch angesetzt. Das Probenvolumen betrug in der Regel 50 µl.

K_M-Wertbestimmung

Der *K_M*-Wert einer enzymatischen Reaktion entspricht der Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist. Mit Hilfe des *K_M*-Wertes kann ein Enzym-Substrat-Paar charakterisiert werden. Die α-Glucosidase-Aktivität wurde in Abhängigkeit von der *p*-NpG-Konzentration bestimmt. Dazu wurde die Substratkonzentration im Bereich zwischen 10 µM und 5 mM variiert. Die Proteinkonzentration betrug in der Regel 10 µg/ml. Aus der Auftragung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration wurden mittels nicht-linearer Regression unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung der *K_M*-Wert und die maximale Enzymaktivität ermittelt:

$$EA [U/ml] = \frac{EA_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (6)$$

Unter Berücksichtigung der Proteinkonzentration wurde aus der maximalen volumenbezogenen Enzymaktivität die maximale spezifische Enzymaktivität berechnet.

Um einen direkten Vergleich mit der α-Glucosidase-Aktivität im Antikörper-Enzym-Konjugat zu ermöglichen, wurden die spezifischen Enzymaktivitäten nicht in der Einheit "U/mg", sondern in "U/nmol" angegeben.

2.2.4.6 ELISA zum Nachweis von funktionellem Fab-Fragment

Mittels ELISA nach der Methode von Buchner und Rudolph (1991) sowie nach Schmidt und Buchner (1992) wurden das funktionelle Fab-Fragment von MAK33 und die Derivate quantifiziert. Bei diesem immunologischen Nachweisverfahren wurden Lösungen des rekonstituierten Antikörperfragmentes in Gegenwart von biotinylierter Creatinkinase-MM (dimeres Isoenzym aus menschlichem Skelettmuskel) in mit Streptavidin beschichteten Reaktionsgefäßen inkubiert. Funktionelles Antikörperfragment wurde über die Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung des Antigens an den Gefäßwänden immobilisiert. Nach Auswaschen des nicht gebundenen Materials wurde das Hybridoma-Screening-Reagenz (*Roche Diagnostics, Mannheim*) zugegeben. Die photometrische Detektion erfolgte mit dem

chromogenen Peroxidase-Substrat ABTS bei einer Wellenlänge von 405 nm. Parallel zu den Testansätzen wurden Referenzproben des authentischen Fab-Fragmentes im Konzentrationsbereich zwischen 10 und 170 ng/ml mitgeführt. Sämtliche Ansätze wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

In Streptavidin beschichteten Gefäßen (Enzymun-Test Streptavidin Tubes, Bindungskapazität 14-15 ng Biotin/Röhrchen, *Roche Diagnostics, Mannheim*) wurden 100 µl der Antikörperfragmentlösung bzw. der Referenzlösung vorgelegt und zusammen mit 1 ml der Antigenlösung (50 µg biotinylierte Creatinkinase-MM/100 ml H₂O MilliQ versetzt mit 5 % Blocking-Reagenz) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten dreimal mit je 1 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 gespült und mit 1 ml Peroxidase-Konjugatlösung (100 µl Hybridoma-Screening-Reagenz/100 ml POD-Konjugat-Puffer; der POD-Konjugat-Puffer enthält: 100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,1 % Tween 20, 1 % Blocking Reagenz) gefüllt. Nach 1-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte erneut 3maliges Waschen mit je 1 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 und anschließend die Zugabe von 1 ml ABTS-Lösung (2 Tabletten à 50 mg ABTS auf 100 ml Puffer der Zusammensetzung: 3,25 mM Natriumperborat, 39,8 mM Citronensäure, 60 mM Na₂HPO₄, pH 4,4 - 4,5). Nach 3 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm in einer Durchflußküvette (d = 0,5 cm) bestimmt. Sämtliche Waschschritte und die Bestimmung der Extinktion wurden vollautomatisch mit dem ELISA-Pipettiergerät ES 22 (*Boehringer Mannheim*) durchgeführt.

2.2.4.7 Creatinkinase-Hemmtest

Die Antigenbindungsstelle von MAK33 erkennt ein Epitop der skelettmuskelspezifischen dimeren humanen Creatinkinase. Durch Bindung an das Epitop wird die enzymatische Aktivität um 80 % gehemmt (Buckel *et al.*, 1987). Die Aktivität der Creatinkinase wurde mit Hilfe des gekoppelten enzymatischen Tests CK NAC *in vitro* Diagnosticum (*Roche Diagnostics, Mannheim*) bestimmt (Bergmeyer, 1983). Dabei setzt die Creatinkinase Creatinphosphat und ADP zu Creatin und ATP um. Um eine spektroskopisch nachweisbare Reaktion zu erhalten, wird das entstandene ATP von der Hexokinase zur Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat verbraucht. Glucose-6-Phosphat wird von der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase unter Bildung von NADPH + H⁺ aus NADP⁺ zu Gluconat-6-Phosphat oxidiert. Aus der zeitlichen Änderung der Extinktion bei 365 nm kann die Aktivität der Creatinkinase ermittelt werden.

Dazu wurden 5 µl einer Creatinkinase-Stammlösung (25 µg/ml) mit Antikörperfragment-Lösung versetzt und auf ein Endvolumen von 50 µl mit POD-Konjugat-Puffer (vgl. Abschnitt 2.2.4.6) aufgefüllt. Die Konzentration des Antikörperfragmentes im Testansatz wurde dabei zwischen 6 nM und 200 nM variiert. Der Ansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. 20 µl des Ansatzes wurden zu 320 µl des CK NAC-Monotestsystems gegeben. Die Änderung der Extinktion bei 365 nm wurde in einem Spectrophotometer (*Amersham Pharmacia, Freiburg*) mit auf 30°C temperiertem Küvettenhalter über einen Zeitraum von 6 min erfaßt.

Aus der Auftragung der zeitlichen Extinktionsänderung dE/dt in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration c wurde die Dissoziationskonstante K_d für den Antikörper-Antigen-Komplex durch nicht-lineare Anpassung von Gleichung (7) an die experimentellen Daten ermittelt.

$$\frac{dE}{dt} = \left(\frac{dE}{dt} \right)_0 - \left(\left(\frac{dE}{dt} \right)_0 - \left(\frac{dE}{dt} \right)_{\min} \right) \cdot \frac{(c + Ag_0 + K_d) - \sqrt{(c + Ag_0 + K_d)^2 - 4 \cdot c \cdot Ag_0}}{2 \cdot Ag_0} \quad (7)$$

Hierin bedeuten dE/dt die enzymatische Aktivität der Creatinkinase. $(dE/dt)_0$ entspricht der enzymatischen Aktivität ohne Zusatz von Antikörperfragment, $(dE/dt)_{\min}$ der Restaktivität bei Wechselwirkung sämtlicher Antigenmoleküle mit Antikörperfragmenten. Ag_0 ist die Creatinkinasekonzentration im Testansatz während der Komplexbildung (31.25 nM) und c die molare Konzentration des eingesetzten Antikörperfragmentes.

2.2.4.8 Herstellung des Rohextraktes zur Isolierung von löslichem Protein

20 g Biofeuchtmasse (*E. coli* C600 pUBS520 pKK177-3/ α -Gluc-Varianten) wurden in 100 ml 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 10 mM EDTA, pH 6,8 resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels Hochdruckhomogenisation mit dem MicronLab 40 (*APV, Lübeck*) bei einem Druck von 800 bar. Es wurden zwei Passagen durchgeführt. Anschließend wurde die Suspension mit 1 M $MgCl_2$ -Lösung versetzt, so daß eine Endkonzentration von 15 mM vorlag. Es folgte eine Benzonase-Behandlung (5 U/ml Suspension) bei 4°C für 30 min. Nachfolgend wurden unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation (75 000 g, 4°C, 1,5 h) abgetrennt. Der Überstand - der sogenannte Rohextrakt - wurde nach Filtration durch einen Spritzenvorsatzfilter mit 0,2 µm Membran auf eine Ionenaustauschchromatographiesäule aufgetragen (vgl. Abschnitt 2.2.5.1).

Im analytischen Maßstab erfolgte der Zellaufschluß mit einer Schwingmühle (*Retsch, Haan*) nach Zusatz von Glasperlen. Dazu wurde 1 ml Kultursuspension bei 5000 rpm, 4°C, 3 min zentrifugiert und anschließend in 500 µl 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 10 mM EDTA, pH 6,8 resuspendiert. Nach Zusatz von 0,5 g Glasperlen (Korngröße: 0,25-0,50 mm) wurde die Suspension bei 4°C 10 min in einer Schwingmühle bei 80 % der maximalen Amplitude behandelt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden bei 13000 rpm und 4°C 20 min sedimentiert. Der Überstand wurde auf enzymatische Aktivität untersucht und einer Proteinbestimmung zugeführt. Ein Aliquot des Überstandes wurde in SDS-Probenauftragspuffer verdünnt, so daß die Proteinkonzentration bei 2 mg/ml lag. Die unlösliche Fraktion nach Zellaufschluß wurde ebenfalls in SDS-Probenpuffer aufgenommen, so daß bezogen auf die eingesetzte Biomasse eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml vorlag.

2.2.4.9 Isolierung von *inclusion bodies*

Die Isolierung der *inclusion bodies* erfolgte nach Rudolph *et al.* (1997). 100 g Biofeuchtmasse (modifiziertes Fd-Fragment von MAK33 und α-GlucosidaseE10C) bzw. 200 g Biofeuchtmasse (κ-Kette) wurden in 500 ml bzw. 1000 ml 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,0 resuspendiert und mittels Ultraturrax (10000 rpm) auf Eis homogenisiert. Es folgte eine Behandlung mit 1,5 mg Lysozym/g Biofeuchtmasse für 30 min bei 4°C. Der Zellaufschluß erfolgte durch Hochdruckhomogenisation. Bei Volumina kleiner als 600 ml wurde der Zellaufschluß am Hochdruckhomogenisator MicronLab 40 (*APV, Lübeck*) mit einem Druck von 1200 bar und 2 Passagen durchgeführt. Größere Volumina der Zellsuspension wurden im semikontinuierlichen Betrieb mit dem Hochdruckhomogenisator Lab 60 (*APV, Lübeck*) bei einem Druck von 600 bar mit 3 Passagen behandelt. Im Anschluß an den Zellaufschluß wurde die Suspension mit einer 1 M MgCl₂-Lösung versetzt, so daß eine Endkonzentration von 3 mM vorlag. Es folgte eine Behandlung mit Desoxyribonuklease I (10 µg/ml) für 30 min bei Raumtemperatur bzw. 60 min bei 4°C. Nachfolgend wurde die Suspension mit dem 0,5fachen Volumen einer Lösung bestehend aus 60 mM EDTA, 6% Triton-X-100 und 1,5 M NaCl in 100 mM Tris-HCl, pH 7,0 versetzt und 30 - 60 min bei 4°C inkubiert. Durch Zentrifugation (34 000 g, 30 min, 4°C) wurden die lösliche Fraktion der Suspension von der unlöslichen, die *inclusion bodies* enthaltenden Fraktion getrennt. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde 3 mal mit Puffer gewaschen. Dazu wurde die unlösliche Fraktion mittels Ultraturrax in 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7,0 resuspendiert und anschließend zentrifugiert

(75 000 g, 10 min, 4°C). Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet entweder sofort solubilisiert (vgl. Abschnitt 2.2.4.10) oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4.10 Solubilisierung von *inclusion bodies*

Solubilisierung der inclusion bodies der Ketten des Fab-Fragmentes

Die Solubilisierung der *inclusion bodies* der Ketten des Antikörperfragmentes erfolgte mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid in 100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 100 mM DTT, pH 8,5 für 2-3 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Dazu wurden jeweils 5 bis 20 mg IB-Material in 5 ml Solubilisierungspuffer resuspendiert und mittels Ultraturax homogenisiert.

Nach der Solubilisierung wurde der pH-Wert der Suspension mit 0,5 M HCl-Lösung auf 3,5 eingestellt und die Suspension 10 min bei 75 000 g und 4°C zentrifugiert. Zum Entfernen des DTT wurde der Überstand der solubilisierten IBs gegen 4 M Guanidiniumhydrochlorid pH 3,5 bei 4°C dialysiert.

Nach der Dialyse wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford (vgl. Abschnitt 2.2.4.3) durchgeführt. Dabei diente reduziertes, denaturiertes Fab-Fragment als Referenzprotein. Die Zahl freier Cystein-Reste wurde nach der Methode von Ellman (vgl. Abschnitt 2.2.4.4) ermittelt. Die solubilisierten *inclusion bodies* wurden unmittelbar in Renaturierungsversuchen verwendet.

Solubilisierung der inclusion bodies der α -Glucosidase-Variante α -GlucE10C

Die *inclusion bodies* der α -Glucosidase-Variante α -GlucE10C wurden mit 8 M Harnstoff in 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7,0 für 1 h bei Raumtemperatur solubilisiert. Nach Zentrifugation (75 000 g; 10 min; 4°C) wurde die Proteinkonzentration im Überstand nach Bradford (1976) bestimmt. Hierbei wurde das Wildtypprotein der α -Glucosidase als Referenzprotein eingesetzt. Die Proteinlösung wurde entweder für Renaturierungsansätze verwendet oder auf eine Anionenaustauschchromatographiesäule (vgl. Abschnitt 2.2.5.1) aufgetragen.

2.2.4.11 Renaturierung durch Verdünnung

Die Renaturierung durch Verdünnung erfolgte ausgehend von einer Stammlösung der solubilisierten *inclusion bodies*, die in einem Verhältnis von 1:100 zum vortemperierten Renaturierungspuffer unter starkem Rühren hinzugegeben wurde. Die Untersuchungen zur Optimierung der Renaturierungsausbeute der Fab-Derivate wurden in 2 ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt. In sämtlichen Puffern, in denen ein Redoxsystem verwendet wurde, wurde vor Zugabe der Redoxkomponenten der Sauerstoff durch Einleiten von N₂-Gas verdrängt. Glutathion in reduzierter und oxidierte Form wurden dem Renaturierungspuffer, ausgehend von jeweils frisch angesetzten Stammlösungen, in denen der pH-Wert mittels pH-Stäbchen kontrolliert wurde, zugesetzt.

Zur Optimierung des Verhältnisses von leichter Kette und Fd-Fragment im Renaturierungsansatz wurden, ausgehend von höher konzentrierten Stammlösungen der solubilisierten *inclusion bodies*, Verdünnungen in 4 M Guanidiniumhydrochlorid, pH 3,5 angelegt. Nach 1:100-Verdünnung dieser Solubilisate mit unterschiedlichem Gehalt an beiden Ketten war somit die Guanidiniumhydrochloridkonzentration in allen Ansätzen identisch.

Funktionelles Fab-Fragment wurde mittels ELISA (vgl. Abschnitt 2.2.4.6) bestimmt. Dazu wurde dem Renaturierungsansatz 100 µl Probe entnommen und entweder mit Trypsin behandelt, oder freie Cystein-Reste wurden durch Carboxyamidomethylierung mit Iodacetamid modifiziert.

Vorbehandlung von Proben für die immunologische Detektion mittels ELISA

Für die Trypsinbehandlung wurden 100 µl des Renaturierungsansatzes mit 50 µl einer Trypsinlösung der Konzentration 1 mg/ml versetzt und bis zur Analyse mittels ELISA auf Eis inkubiert. Vor der Verwendung im ELISA wurde der Ansatz durch Zugabe von 850 µl 100 mM Tris-HCl pH 7,0 verdünnt.

Für die Bestimmung der Renaturierungskinetik wurden zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt freie Cystein-Reste durch Behandlung mit Iodacetamid blockiert. Hierzu wurde 100 µl Renaturierungsansatz mit 50 µl einer 200 mM Iodacetamidstammlösung in 1 M Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8,5 versetzt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 850 µl 100 mM Tris-HCl pH 7,0 versetzt und bis zur Analyse auf Eis gelagert.

Für präparative Zwecke wurde die Renaturierung des Antikörperfragmentes im 5 l-Maßstab unter optimierten Bedingungen (1 M Tris-HCl pH 8,0, 2 mM EDTA, GSSG/GSH = 5:1 (2,4 mM GSSG, 0,6 mM GSH), 10°C, 250 h) durchgeführt. Das Fd-Fragment wurde im Falle von FabR10C im 5fachen, im Falle von FabE10C bzw. FabD10C im 8fachen molaren Überschuß zur κ -Kette eingesetzt. Die Konzentration der κ -Kette war zu Beginn 5 $\mu\text{g/ml}$ und wurde im Abstand von 24 h sukzessive um 5 $\mu\text{g/ml}$ gesteigert auf eine Endkonzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$.

Die Renaturierung des Wildtypproteins der α -Glucosidase und der Variante α -GlucE10C erfolgte durch 1:100-Verdünnung der Solubilisate in Renaturierungspuffer (10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 1 mM EDTA, pH 7,6) bei 10°C. Soweit nicht anders angegeben wurde eine Proteinkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ im Renaturierungsansatz verwendet.

2.2.4.12 Matrix-unterstützte Reaktivierung

Untersuchungen zur Matrix-unterstützten Reaktivierung wurden in modifizierten 1 ml Microspin-Gefäßen, die üblicherweise zur Plasmidisolierung verwendet werden, durchgeführt. Dazu wurde das Anionenaustauschermaterial des Herstellers (DEAE-Gruppen an Silica-Partikeln) entfernt, um lediglich das Gefäß mit Fritte verwenden zu können. Dieses Hilfsmittel für die Matrix-unterstützte Renaturierung wurde von Stephan Wawra im Rahmen seines Forschungsgruppenpraktikums am Institut für Biotechnologie entwickelt. Es ermöglicht das effiziente Entfernen der Harnstofflösung vom denaturierten Matrix-gebundenen Protein durch Zentrifugation (3000 rpm; 2 min) und die Reaktivierung der α -GlucosidaseE10C durch Waschen des Gelmaterials mit Renaturierungspuffer.

Es wurden unterschiedliche Anionenaustauschermaterialien verwendet: Q-Sepharose und Fractogel TMAE als starke Anionenaustauschermaterialien sowie Fractogel DEAE und Fractoprep DEAE (letzteres freundlicherweise von der Fa. Merck zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt) als schwache Anionenaustauschermaterialien. Soweit nicht anders angegeben wurde das Gelmaterial (5 μl) in einem Volumen von 500 μl resuspendiert und mit 1 mg Protein/ml beladen. Für die Denaturierung wurde eine Lösung aus 8 M Harnstoff in 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7,0 verwendet, für die Reaktivierung 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 1 mM EDTA, pH 7,6 versetzt mit Natriumchlorid, so daß sich Endkonzentrationen im Bereich von 0 bis 2 M ergaben.

Zur Denaturierung wurden die Ansätze 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, zur Reaktivierung wurden die Ansätze bei 10°C für 24 bis 48 h inkubiert.

Zur Ablösung des reaktivierten Proteins wurde soweit nicht anders angegeben 1 M NaCl in 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7,6 verwendet. Dazu wurden die Ansätze 24 h bei 10°C inkubiert.

Bestimmung der Reaktivierungskinetik

Die Kinetik der Reaktivierung von α-GlucE10C im immobilisierten und freien Zustand wurde bei 10°C in 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7,6 untersucht. Als Referenz wurde eine Probe, die unter gleichen Bedingungen inkubiert, jedoch nicht denaturiert wurde, verwendet.

Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Reaktivierung von α-Glucosidase erfolgte unter der Annahme einer Reaktionsordnung von 1 nach folgender Gleichung:

$$Ausbeute[\%] = Ausbeute_{max}[\%] \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) \quad (8)$$

Hierin ist k die Konstante der geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion, t die Zeit in sec, $Ausbeute[\%]$ die Ausbeute zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt und $Ausbeute_{max}[\%]$ die maximal erreichbare prozentuale Ausbeute.

2.2.4.13 Konzentrierung von Proteinlösungen

Proteinlösungen mit einem Volumen größer als 1000 ml wurden mittels Querstromfiltration an dem MinisetteTM-Tangentialflußsystem ProVario3 (Pall-Gelman, Dreieich) nach der Anleitung des Herstellers aufkonzentriert und gegebenenfalls umgepuffert. Es wurde eine Omega-Membrankassette (modifizierte Polyethersulfon-Membran für geringe Proteinbindung, *open channel*-Konfiguration) mit einer Trenngrenze von 30 kD verwendet. Die effektive Filterfläche betrug dabei 0,07 m².

Für das Konzentrieren von Proteinlösungen mit einem Volumen zwischen 3 und 15 ml wurden Macrosep-Zentrifugenkonzentratoren (Pall-Gelman, Dreieich) mit einer Trenngrenze von 30 kD nach Anleitung des Herstellers verwendet.

Proteinlösungen mit einem geringeren Volumen wurden in einem Dialyseschlauch in PEG 35000 bei 4°C für 2 - 3 h gelagert.

2.2.4.14 Assoziation von Proteinen

Die Assoziation von Proteinen mit entgegengesetzt geladenen polyionischen Fusionspeptiden erfolgte soweit nicht anders angegeben in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0,6 mM GSH, 2,4 mM GSSG, pH 7,5 bei 20°C für 16 h. Dabei lagen die Proteine in äquimolaren Konzentrationen von jeweils 1-3 μ M im Ansatz vor. Vor Zugabe der Redox-Komponenten zum Assoziationspuffer wurde dieser mit N₂-Gas behandelt.

2.2.4.15 K_d-Wert-Bestimmung der Assoziationsreaktion

In Gegenwart eines Redoxsystems ist die Assoziation zweier Proteine über komplementär geladene Fusionspeptide mit zusätzlichem Cystein-Rest reversibel:



Nach dem Gesetz von der Erhaltung der Masse gilt für die Konzentration der Ausgangskomponenten P1_E10C bzw. P2_R10C:

$$[P1_E10C] = [P1_E10C]_0 - [Chimäre] \quad (10)$$

und

$$[P2_R10C] = [P2_R10C]_0 - [Chimäre] \quad (11)$$

Die Dissoziationskonstante K_d der Reaktion ist definiert als:

$$K_d = \frac{([P1_E10C]_0 - [Chimäre]) \cdot ([P2_R10C]_0 - [Chimäre])}{[Chimäre]} \quad (12)$$

Der Anteil der Chimäre wurde in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis x der beiden Ausgangskomponenten bestimmt. Im vorliegenden Fall wurde $[P1_E10C]_0$ variiert und $[P2_R10C]_0$ konstant gehalten:

$$x = \frac{[P1_E10C]_0}{[P2_R10C]_0} \quad (13)$$

Aus den Gleichungen (12) und (13) kann die Abhängigkeit der Chimärenkonzentration vom molaren Verhältnis der Ausgangskomponenten durch folgenden Zusammenhang beschrieben werden:

$$[Chimäre] = \frac{[P2_R10C]_0 \cdot (1+x) + K_d}{2} - \sqrt{\frac{([P2_R10C]_0 \cdot (1+x) + K_d)^2}{4} - x \cdot [P2_R10C]_0^2} \quad (14)$$

Im vorliegenden Fall war die Konzentration der R10C- α -Gluc konstant, so daß $[P2_R10C]_0 = 1 \mu\text{M}$.

2.2.4.16 Bifunktionalitätsassay

Der simultane Nachweis der antigen-bindenden Eigenschaften des Antikörperfragmentes FabE10C und der enzymatischen Aktivität der α -Glucosidase mit Decaargininfusionspeptid im konjugierten Zustand erfolgte in einem modifizierten ELISA, der im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde. Dazu wurde das Konjugat bzw. die Einzelkomponenten zunächst mit dem biotinylierten Antigen Creatinkinase (CK-MM) in mit Streptavidin beschichteten Reaktionsgefäßen 1 h bei 20°C inkubiert. Das Antigen wurde dabei in der in Abschnitt 2.2.4.6 beschriebenen Konzentration eingesetzt. Nachfolgend wurden die Ansätze in den Reaktionsgefäßen dreimal alternierend mit Niedrigsalz- (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,5) und Hochsalzpuffern (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7,5) und anschließend zweimal mit 100 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 6,8 gewaschen. Die Detektion erfolgte mit *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid, das artifizielle Substrat der α -Glucosidase. Dazu wurde der immobilisierte Komplex 1 h bei 30°C in Gegenwart von 1 ml 2 mM *p*-NpG in 100 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 6,8 inkubiert und nachfolgend die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

2.2.5 Chromatographische Methoden

Sämtliche chromatographischen Reinigungen wurden bei 4°C durchgeführt.

2.2.5.1 Ionenaustauschchromatographie

Mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie können Proteine aufgrund unterschiedlicher elektrostatischer Wechselwirkungen mit einer entgegengesetzt geladenen Matrix voneinander getrennt werden. Die Stärke der Bindung eines Proteins an einen Ionenaustauscher hängt dabei von pH-Wert und Ionenstärke des Puffers, dem isoelektrischen Punkt des Proteins und der

Dichte der Ladungen auf der Matrix ab. Die Elution kann entweder durch die Erhöhung der Ionenstärke oder durch Änderung des pH-Wertes der mobilen Phase erreicht werden.

*Reinigung von löslicher α -Glucosidase aus dem *E. coli*-Rohextrakt*

Die Reinigung der α -Glucosidase-Varianten mit N- bzw. C-terminalem geladenem Fusionspeptid aus dem *E. coli*-Rohextrakt erfolgte mittels Ionenaustauschchromatographie unter reduzierenden Bedingungen (Zusatz von 2 mM DTT in allen Puffern).

Für die Reinigung der Varianten mit positiv geladenem Fusionspeptid wurde ein starker Kationenaustauscher verwendet (Resource S, *Amersham Pharmacia, Freiburg*; Säulenvolumen: 6 ml), der in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 6,8 äquilibriert wurde. Das Gelmaterial wurde mit maximal 160 mg Gesamtprotein/ml beladen. Die Elution erfolgte bei einer Flußrate von 6 ml/min in einem linearen Gradienten von 100 auf 500 mM NaCl in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 10 mM EDTA, pH 6,8 über 20 Säulenvolumen. Die C-terminal modifizierte α -Glucosidase-Variante eluierte bei einer Salzkonzentration von 460 mM NaCl, die N-terminal modifizierte Variante bei 410 mM NaCl.

Zum Entfernen von DNA, die mit den positiv geladenen Fusionspeptiden interagiert, wurden die Fraktionen, in denen α -Glucosidase-Aktivität nachgewiesen wurde, mit Benzonase versetzt. Dazu wurde die Natriumchloridkonzentration der Proteinlösungen mit einer 2 M NaCl-Stammlösung in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 6,8 auf etwa 1 M NaCl eingestellt. Die Benzonasebehandlung wurde in Gegenwart von 15 mM $MgCl_2$ bei 4°C für 16 h durchgeführt. Für die Behandlung von 1 mg Protein wurden 250 U Benzonase verwendet. Nachfolgend wurden die Proteinlösungen mittels Macrosep-Zentrifugenkonzentratoren mit einer Membran der Trenngrenze 30 kD konzentriert und entweder gegen 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 10 mM EDTA, pH 6,8 dialysiert oder mittels Gelfiltration von niedermolekularen Verunreinigungen separiert.

Die Reinigung der α -GlucosidaseE10C erfolgte an einem starken Anionenaustauscher (Resource Q, *Amersham Pharmacia, Freiburg*; Säulenvolumen: 6 ml). Die Säule wurde in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 10 mM EDTA, pH 6,8 äquilibriert und bei einer Flußrate von 1 ml/min mit maximal 50 mg Gesamtzellprotein/ml Gelmaterial beladen. Nachfolgend wurde mit 20 Säulenvolumen 20 mM MES, 20 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 5,6 bei einer Flußrate von 6 ml/min gewaschen. Die Elution erfolgte in einem linearen Gradienten über 20 Säulenvolumen von 0 auf 300 mM NaCl in 20 mM MES, 10 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 5,6. Unter diesen Bedingungen eluierte die α -GlucosidaseE10C bei 180 mM NaCl. Es

wurden 1,8 ml Fraktionen in Gefäßen gesammelt, in denen jeweils 200 µl 100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 6,8 vorgelegt wurde.

Fraktionen mit α -Glucosidase-Aktivität wurden vereinigt, gegen 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 10 mM EDTA, pH 6,8 dialysiert, gegebenenfalls mittels Macrosep-Zentrifugenkonzentratoren aufkonzentriert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Reinigung von solubilisierten inclusion bodies der α -Glucosidase unter denaturierenden Bedingungen

Solubilisierte *inclusion bodies* der α -Glucosidase-Variante E10C wurden unter denaturierenden Bedingungen an Q-Sepharose *fast flow* (Boehringer Mannheim) vorgereinigt und nachfolgend für Renaturierungsexperimente verwendet (vgl. Abschnitte 2.2.4.10 und 2.2.4.11). Die selbstgepackte Säule (Säulenvolumen: ca. 25 ml) wurde in 7,5 M Harnstoff, 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 10 mM EDTA pH 6,8 bei einer Flußrate von 5 ml/min an einer HiLoad-Chromatographieanlage (Amersham Pharmacia, Freiburg) äquilibriert. Das Gelmaterial wurde mit maximal 20 mg Gesamtprotein/ml beladen. Die Elution erfolgte in einem linearen Gradienten über 15 Säulenvolumen von 0 mM NaCl auf 1 M NaCl in 7,5 M Harnstoff, 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 10 mM EDTA, pH 6,8.

Das Eluat wurde unmittelbar in Renaturierungsversuchen verwendet.

Reinigung reaktivierter α -Glucosidase E10C und renaturierter Fab-Derivate

Reaktivierte α -Glucosidase E10C wurde an einer Resource Q-Säule (Amersham Pharmacia, Freiburg) aufkonzentriert. Die Säule wurde in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 10 mM EDTA, pH 6,8 äquilibriert. Die Elution erfolgte in einem linearen Salzgradienten von 0 auf 500 mM NaCl in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 10 mM EDTA, pH 6,8 über 10 Säulenvolumen. Unter diesen Bedingungen eluiert das C-terminal modifizierte Enzym bei 270 mM NaCl.

Renaturiertes FabE10C und FabD10C wurde entweder an einer Resource Q- (Amersham Pharmacia, Freiburg; Säulenvolumen: 6 ml) oder an einer POROS[®] HQ-Säule (Perseptive Biosystems, Wiesbaden; Säulenvolumen: 1,7 ml) aufgereinigt. Das Gelmaterial wurde in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,5 äquilibriert. Die Elution erfolgte in einem linearen Salzgradienten von 0 auf 1 M NaCl in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,5 über

20 Säulenvolumen. Unter diesen Bedingungen eluierten die Fab-Derivate in Gegenwart von 240 mM-260 mM NaCl.

Peptidanalytik nach Kopplung an CNBr-Sepharose

Die Ermittlung der Kopplungsausbeute der synthetischen Peptide ACK8A und ACE10A an CNBr-aktivierte Sepharose *fast flow* erfolgte mittels Ionenaustauschchromatographie an POROS[®] HS bzw. POROS[®] HQ in 20 mM Borat/NaOH, pH 8,0. Es wurden Proben der eingesetzten Peptidlösung vor und nach Inkubation in Gegenwart des Gelmaterials analysiert. Die Elution erfolgte in einem linearen Gradienten von 0 auf 1 M NaCl in 20 mM Borat/NaOH, pH 8,0 über 20 Säulenvolumen (Säulenvolumen: 1,7 ml). Die Peptidkonzentration wurde über die Zahl der freien Cystein-Reste (vgl. Abschnitt 2.2.4.4.) bestimmt. Im Fall von ACK8A wurde die Probe vor Analyse mittels Ionenaustauschchromatographie mit 100 mM DTT behandelt, um die *S-tert*-Butylschutzgruppe abzuspalten.

Trennung der Chimären von den Ausgangskomponenten zur Gewinnung der Edukte für eine Reassoziaton

Neben der Analyse und präparativen Reinigung der Chimäre mittels Gelfiltrationschromatographie (vgl. Abschnitt 2.2.5.2) wurden Assoziationsansätze ebenfalls durch Ionenaustauschchromatographie an POROS[®] HS und POROS[®] HQ untersucht. Ziel dieser Experimente war es, die nicht-assoziierten Komponenten des Ansatzes hinsichtlich ihrer Interaktionen mit dem Ionenaustauschermaterial zu charakterisieren und für eine Reassoziaton zu isolieren.

Trennungen der Chimären von den Einzelkomponenten wurden an POROS[®] HS und POROS[®] HQ-Säulen durchgeführt. Die Säulen wurden an einer BioCad Workstation (*Perseptive Biosystems*) in Serie geschaltet, so daß eine Bindung der Einzelkomponenten ausgehend von einem Assoziationsansatz an die entsprechenden Ionenaustauschermaterialien möglich war. Die Säulen wurden in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,5 äquilibriert. Während der Elution im linearen Salzgradienten wurden die Säulen separat mit einer Flußrate von 3 ml/min betrieben.

Für die POROS[®] HQ-Säule wurde ein linearer Salzgradient von 0 auf 500 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 über 20 Säulenvolumen verwendet. Von der POROS[®] HS-Säule erfolgte die Elution mit einem linearen Salzgradienten von 0 auf 1 M NaCl über 20 Säulenvolumen. Die Fraktionsgröße war 500 µl.

2.2.5.2 Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltrationschromatographie wurde zu analytischen Zwecken mit einer TSKgel 2000-Säule (*Toso Haas*) und zu präparativen Zwecken mit der Superdex 75 pg prep grade-Säule (*Amersham Pharmacia, Freiburg*) äquibriert in 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 150 mM NaCl, pH 7,0 durchgeführt.

Analytische Gelfiltrationschromatographie

Die Charakterisierung der Assoziationsreaktion von Proteinen mit komplementär geladenen Fusionspeptiden erfolgte sowohl mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese als auch mittels analytischer Gelfiltration an TSKgel 2000 SW_{XL} (Säulenvolumen: 14,6 ml). Die Gelfiltrationssäule wurde mit einer Flußrate von 0,75 ml/min an einer BioCad Workstation (*Perseptive Biosystems*) betrieben.

Präparative Gelfiltrationschromatographie

Für die präparative Gelfiltrationschromatographie wurde eine Superdex 75 pg prep-Säule (Säulenvolumen: 120 ml) verwendet. Die Säule wurde mit einer Flußrate von 1 ml/min betrieben. Das maximale Auftragsvolumen war 2 ml.

Sowohl die analytische als auch die präparative Gelfiltrationssäule wurden mit MAK33 (150 kD), dem Fab-Fragment von MAK33 (50 kD) und α -Glucosidase-WT (68 kD) kalibriert. Dabei eluiert MAK33 im Ausschlußvolumen mit einem Elutionsvolumen von 52 ml von der Superdex 75 pg prep-Säule bzw. mit 6,7 ml von der TSKgel G2000-Säule. Das Antikörperfragment und die α -Glucosidase haben sehr ähnliche Retentionszeiten und eluieren bei 63,9 bzw. 63,7 ml von der Superdex 75 pg prep-Säule bzw. bei 8,3 ml und 8,2 ml von der TSKgel G2000-Säule.

2.2.5.3 Reversed Phase-HPLC

Die Reinheit von Proben der α -Glucosidase-Varianten wurde mittels Reversed Phase-HPLC an einer POROS[®] HR1-Säule (C4) analysiert. Die Säule wurde in H_2O mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) äquibriert. Es wurden 10 bis 25 μg Protein injiziert. Die Elution

erfolgte in einem linearen Gradienten von 10 % auf 80 % Acetonitril in H₂O mit 0,1 % TFA über 30 min bei einer Flußrate von 1 ml/min.

Das Peptid ACK8A, das für die Herstellung der kovalenten Affinitätschromatographiematerialien verwendet wurde, wurde mittels Reversed Phase-HPLC an einer C18-Säule (*Macherey und Nagel, Düren*) gereinigt und für die massenspektrometrische Charakterisierung fraktioniert. Elutionsbedingungen: Flußrate: 0,5 ml/min, linearer Gradient von 0 % Acetonitril auf 50 % Acetonitril in H₂O mit 0,1 % TFA über 30 min.

2.2.5.4 Kovalente Affinitätschromatographie an Sepharose-ACK8A

Für die präparative Charakterisierung von Proteinen mit C-terminalem polyionischen Fusionspeptid wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Form der kovalenten Affinitätschromatographie entwickelt. Über die Wechselwirkung entgegengesetzt geladener polyionischer Peptide und die Ausbildung einer Disulfidbrücke sollten dabei gezielt Proteine mit vollständigem Fusionspeptid gereinigt werden.

Durch Kopplung des Lysinpeptides ACK8A (vgl. Abschnitt 2.2.8) an Bromcyan-aktivierte Sepharose *fast flow* (*Amersham Pharmacia, Freiburg*) wurde das Säulenmaterial für die Affinitätschromatographie hergestellt. 2 ml Matrixmaterial wurden in eine C10-Säule mit Adapter nach Angaben des Herstellers (*Amersham Pharmacia, Freiburg*) gepackt. Das obere Drucklimit dieser Säule betrug 0,4 MPa, die maximale Flußrate 1 ml/min.

Zur Vorbereitung der Affinitätschromatographie wurden die Cysteinreste der Peptidsäule zunächst mit DTT reduziert und anschließend durch Inkubation in Gegenwart von GSSG in gemischte Disulfide überführt. Hierzu wurde die Säule in Puffer A0 (6 M Guanidiniumhydrochlorid, 100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8,5) äquilibriert (max. Flußrate: 0,5 ml/min), anschließend wurden 10 ml 100 mM DTT in Puffer A0 aufgetragen (Flußrate: 0,2 ml/min) und nachfolgend 10 ml 100 mM GSSG in Puffer A0 (Flußrate: 0,2 ml/min).

Die präparative Feinreinigung bzw. Charakterisierung der Proteine mit C-terminalem Polyglutamtag wurde in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,5 (Puffer A1) durchgeführt. Hierzu wurden maximal 500 µg Protein/ml Gelmaterial bei einer Flußrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Anschließend wurde die Säule weitere 16 h mit einer Flußrate von 0,3 ml/min mit Puffer A1 betrieben.

Proteine, die lediglich über ionische Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial interagieren, wurden in einem linearen Gradienten von 0 auf 500 mM NaCl über 10 Säulenvolumen und nachfolgend mit 5 Säulenvolumen 2 M NaCl eluiert (Puffer A2: 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 7,5, Flußrate: 1 ml/min). Im Anschluß an die Elution unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde die Säule in Puffer A1 reäquilibriert.

Die Elution des Zielproteins erfolgte unter reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von 25 mM L-Cystein in Puffer A1 und Puffer A2. Für das FabE10C-Fragment wurde L-Cystein in einer Konzentration von 10 mM verwendet. Zusätzlich wurden unter Niedrigsalzbedingungen 2 ml 50 mM DTT in Puffer A1 (bzw. 10 mM DTT in A1 beim FabE10C-Fragment) bei einer Flußrate von 1 ml/min aufgetragen. Mit diesem DTT-Puls sollten zum einen verbleibende gemischte Disulfide reduziert und somit GSH entfernt werden und zum anderen Fremdproteine, die ausschließlich über Disulfidbrücken mit der Matrix interagieren, abgelöst werden. Die Elution der Proteine mit vollständigem polyionischen Fusionspeptid erfolgte in einem linearen Gradienten von 0 auf 500 mM NaCl über 10 Säulenvolumen bei einer Konzentration von 140 mM NaCl.

Die Peptidsäule wurde in 20 % Ethanol bei 4°C gelagert. Dabei lagen die Cystein-Reste als gemischte Disulfide vor.

2.2.6 Kooperativität der Bindung polyionischer Fusionspeptide an Ionenaustauschermaterialien

Ausgehend vom sigmoidalen Verlauf der Sauerstoffbindungskurve des Hämoglobins entwickelte Hill (1910) ein empirisches Anpassungsverfahren (zitiert in: Levitzki, 1997). Mit Hilfe dieses Verfahrens kann die kooperative Wechselwirkung zwischen zwei Bindungspartnern beschrieben werden. Positive Kooperativität bedeutet dabei, daß die Ausbildung einer Wechselwirkung die Tendenz zur Ausbildung weiterer Wechselwirkungen steigert. D.h. die Affinität der beiden Bindungspartner bzw. die Affinität zur Bindung weiterer Liganden wird erhöht. Die experimentellen Daten werden dabei mit folgender Gleichung beschrieben:

$$y = 1 - \frac{(x_{\max} \cdot x^n)}{a + x^n} \quad (15)$$

Im vorliegenden Fall der Wechselwirkung zwischen polyionischen Fusionspeptiden und einer Ionenaustauschermatrix sind dabei verschiedene Gleichgewichte zu berücksichtigen. Die anionischen Fusionspeptide gehen Wechselwirkungen mit der positiv geladenen Matrix und mit Na⁺-Ionen ein. In Abwesenheit überschüssiger monovalenter Gegenionen ist die

Interaktion von Peptid und Polyanion die stabilste. Nur durch diese Bindung ist eine Kooperativität zu erwarten. Der Exponent n ist eine Konstante, mit der die Kooperativität charakterisiert werden kann. Die kooperative Elution ist auf die Konkurrenz der überschüssigen Gegenionen Na^+ und Cl^- um Bindungsstellen am Fusionspeptid und an der Matrix zurückzuführen. Mit Hilfe des Exponenten n sollten Rückschlüsse auf die Anzahl monovalenter Ionen möglich sein, die für die Elution erforderlich sind. Die Konstante a ist in dem ursprünglichen Anpassungsverfahren nach Hill die Dissoziationskonstante für den betrachteten Komplex. Dabei wird die Bindung in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration analysiert. Im vorliegenden Fall wird die Bindung des Liganden in Abhängigkeit von der Konzentration der Kompetitoren untersucht. Als Kompetitoren sind sowohl Na^+ - als auch Cl^- -Ionen zu betrachten. Diese können in unterschiedlichem Maße für die Elution verantwortlich sein. Daher kann die Konstante a nicht als einfache Dissoziationskonstante betrachtet werden, sondern vielmehr als zusammengesetzte Konstante, die die Gleichgewichte aller monovalenten Ionen berücksichtigt. Da die monovalenten Ionen als Kompetitoren wirken, kann a als Kompetitionskonstante bezeichnet werden (Bachmann, 1997). In Abhängigkeit von der Kompetitorkonzentration wird das normierte Meßsignal y erfaßt. Hierbei bedeutet $y = 100\%$ die vollständige Bindung des Fusionsproteins $\alpha\text{-GlucE10C}$ an die Matrix und $y = 0\%$ die vollständige Ablösung des Proteins von der Matrix.

2.2.7 Massenspektrometrie von Peptiden mit MALDI

Die polyionischen Peptide ACK8A bzw. ACE10A die für die Herstellung der Affinitätschromatographiesäulen verwendet wurden, wurden mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie an einem REFLEX Spektrometer (*Bruker-Franzen Analytik, Bremen*) charakterisiert.

Die massenspektrometrische Analyse wurde freundlicherweise von Frau Dr. A. Schierhorn (Forschungsstelle "Enzymologie der Proteinfaltung" der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

2.2.8 N-terminale Sequenzierung

Die Identität der gereinigten Proteine und die Vollständigkeit der N-terminal modifizierten Konstrukte wurde nach Proteintransfer auf PVDF-Membran mittels N-terminaler Sequenzierung untersucht. Durch automatischen Edman-Abbau mit einem Applied Biosystems 476A Gasphasen-Sequencer (*Applied Biosystems, Forster City, USA*) wurden jeweils die ersten 6 bis 7 Aminosäuren identifiziert.

Die Sequenzanalyse wurde freundlicherweise von Herrn Dr. K. P. Rücknagel (Forschungsstelle "Enzymologie der Proteinfaltung" der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

2.2.9 Kopplung von Peptiden an CNBr-aktivierte Sepharose

1 g lyophilisierte CNBr-aktivierte Sepharose *fast flow* (Amersham Pharmacia, Freiburg) wurde 30 min in 10 ml 1 mM HCl-Lösung bei 4°C inkubiert. Das gequollene Gelmaterial (ca. 3 ml) wurde zunächst mit 15 Gelvolumen (ca. 50 ml) eisgekühlter 1 mM HCl-Lösung gewaschen und nachfolgend mit 50 ml 20 mM Borat-Puffer, pH 8,3 äquilibriert. Für die Kopplung der ACK8A-Peptide wurden 5 mg Lyophilisat in 1 ml 20 mM Borat/NaOH, pH 8,3 gelöst. Der pH-Wert wurde kontrolliert und gegebenenfalls mit 0,1 M NaOH eingestellt. Es wurden 10 ml einer Suspension aus ca. 3 ml gequollenem Gelmaterial und 660 nmol gelöstem Peptid in 20 mM Borat/NaOH, pH 8,3 für 16 h auf einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Gelmaterial mittels Zentrifugation (1000 g; 5 min; 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde für die Bestimmung der Kopplungsausbeute aufbewahrt. Restliche aktivierte Gruppen des Gelmaterials wurden durch Inkubation in 10 ml 1 M Ethanolamin in 100 mM Borat/NaOH, pH 8,0 für 4 h bei Raumtemperatur inaktiviert (Überkopfschüttler). Die ACK8A-Sepharose wurde 9mal abwechselnd mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8,0 und 50 mM Tris-Glycin, 1 M NaCl, pH 4,0 gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in 20 % Ethanol bei 4°C gelagert.

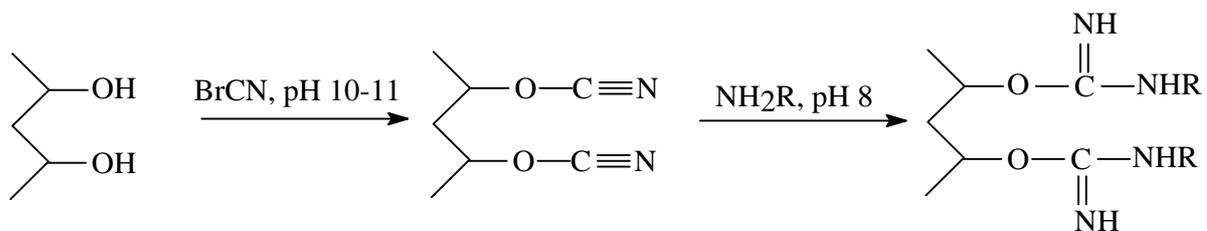


Abb. 2.4: Schema der Kopplung von Peptiden über primäre Aminogruppen an CNBr-aktivierte Sepharose

2.2.10 Analytische Ultrazentrifugation

Messungen des Sedimentationsgleichgewichts wurden in der analytische Ultrazentrifuge Optima XL-A (Beckman Instruments, Palo Alto) durchgeführt. Hierzu wurden Doppelsektorzellen in einem An60Ti-Rotor bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 8000 rpm bei 20°C verwendet. Es wurden Proteinlösungen mit Konzentrationen im Bereich von 0,04 bis 0,1 mg/ml in 50 mM NaH₂PO₄/N₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7,0 untersucht. Die experimentellen Daten wurden mit Hilfe der Software des Herstellers analysiert.

2.2.11 CD-Spektroskopie

Fern-UV-CD-Spektren wurden bei 22°C in einem AVIV 62A DS Spectropolarimeter (*AVIV, Lakewood, N. J.*) aufgenommen. Es wurde eine Quartzküvette (*Hellma*) mit einer Schichtdicke von 0,1 cm verwendet. Die Spektren wurden 10 mal akkumuliert, dabei betrug die durchschnittliche Meßzeit pro Meßpunkt 5 s bei einer Spaltbreite von 1 nm. Die Spektren wurden in einem Bereich von 200 bis 250 nm bei einer Proteinkonzentration von 120 µg/ml in 50 mM NaH₂PO₄/N₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7,0 ermittelt und um den Puffer-Anteil korrigiert. Die molare Elliptizität Θ_{molar} wurde nach Schmid (1997) berechnet:

$$\dot{E}_{\text{molar}} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M_r}{c \cdot d \cdot 1000} \quad (16)$$

Hierin bedeuten Θ die gemessene Elliptizität in mdegree korrigiert um die Elliptizität des Puffers, M_r die molare Masse des Proteins, c die Proteinkonzentration in mg/ml und d die Schichtdicke der Küvette in cm. Der Faktor 100 resultiert aus der Umrechnung der Konzentration von mol/l in dmol/cm³. Der Faktor 1000 ergibt sich aus der Umrechnung der Einheit der gemessenen Elliptizität von mdegree in degree. Die Einheit der molaren Elliptizität ist degree · cm² · dmol⁻¹.

Berechnungsgrundlage waren folgende molare Massen der verwendeten Proteine:

M_r (FabE10C) = 52 372, M_r (R10C- α -Gluc) = 70 228 und M_r (α -GlucR10C) = 69965. Die molare Massen der Chimären ergaben sich additiv aus den Einzelkomponenten.

2.2.12 Lyophilisation von Proteinproben

Für die Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der Reaktivierungsausbeute der α -GlucosidaseE10C in Lösung war es erforderlich eine 2,5 mg/ml Lösung mittels Lyophilisation zu konzentrieren. Hierzu wurden 2 ml Proteinlösung gegen 50 mM Acetat-Puffer, pH 5,8 dialysiert und anschließend in der Gefriertrocknungsanlage Christ Beta 1-16 (*Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode*) bei einer Arbeitstemperatur von 25°C lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in Solubilisierungspuffer (8 M Harnstoff in 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7,0) aufgenommen.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden polyionische Fusionspeptide hinsichtlich möglicher biotechnologischer Anwendungen untersucht. Als polyionisches Fusionspeptid wird im folgenden eine Sequenz von 10 gleichartig geladenen Aminosäureresten und einem zusätzlichen Cystein-Rest bezeichnet, die gentechnisch mit einem Protein verbunden wurde. Als Fusionspartner wurde zum einen α -Glucosidase PI aus *Saccharomyces cerevisiae* und zum anderen das Fab-Fragment des monoklonalen Antikörpers MAK33 verwendet.

Sowohl der Einfluß der Fusionspeptide auf die Herstellung und Funktionalität der rekombinanten Proteine wird beschrieben als auch ihre Bedeutung für eine effiziente Reinigung, Renaturierung und gerichtete Assoziation.

3.1 Herstellung und Reinigung von Proteinen mit polyionischen Fusionspeptiden

Zur Analyse der verschiedenen Fragestellungen werden vorwiegend vier Konstrukte näher charakterisiert. Diese sind in Abbildung 3.1.1 schematisch dargestellt und mit der entsprechenden Nomenklatur versehen.

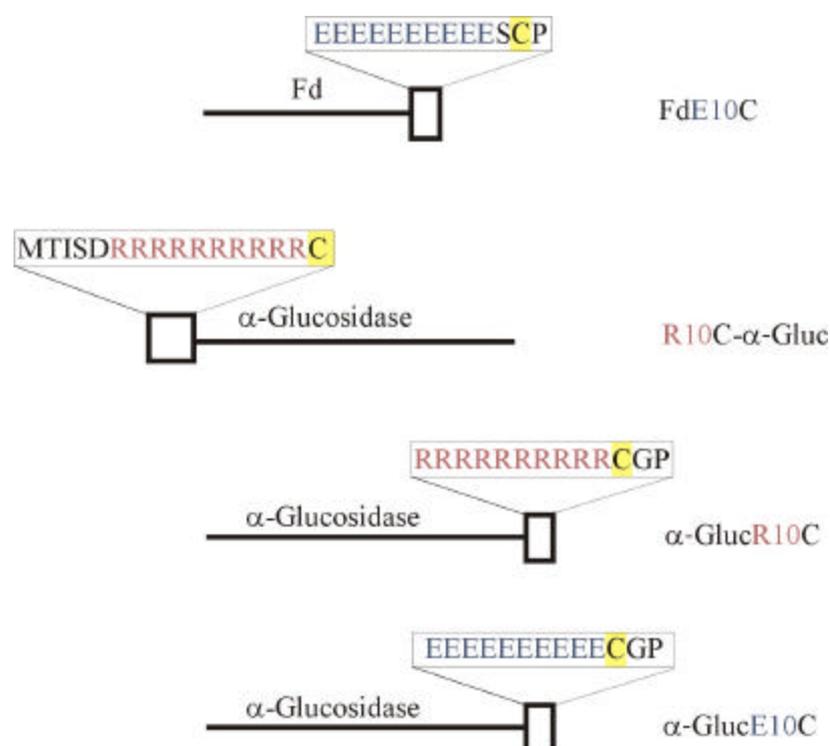


Abb. 3.1.1: Schematische Darstellung der Proteine mit polyionischen Fusionspeptiden

Das Antikörperfragment FabE10C wurde durch eine C-terminale Extension des Fd-Fragmentes von 10 Glutaminsäure-Resten und einem Cystein-Rest erstellt. Das Fd-Fragment besteht aus der variablen und der ersten konstanten Domäne der schweren Kette von MAK33. Desweiteren wurden drei Varianten der α -Glucosidase untersucht. Davon enthielt eine ein N-terminales und eine ein C-terminales Fusionspeptid bestehend aus 10 Arginin-Resten und einem zusätzlichen Cystein-Rest bezeichnet als R10C- α -Gluc bzw. α -GlucR10C. Die dritte Variante der α -Glucosidase wurde am C-Terminus durch Anfügen eines Decaglutaminsäuretags mit zusätzlichem Cystein modifiziert und wird im folgenden als α -GlucE10C bezeichnet. Zum Schutz vor Abbau durch Exoproteasen wurden alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten C-terminalen Fusionspeptide mit einem Prolin-Rest als terminale Aminosäure versehen (Skerra *et al.*, 1991).

3.1.1 Herstellung und Reinigung von Varianten des Fab-Fragmentes mit polyionischem Fusionspeptid

Das Fab-Fragment von MAK33 wurde durch Anfügen eines polyionischen Fusionspeptides an den C-Terminus des Fd-Fragmentes modifiziert. Aus Arbeiten von Bücheler (1989) war bekannt, daß das Fd-Fragment als LacZ-Fusion (ersten 8 Aminosäuren der β -Galactosidase) in rekombinanten *Escherichia coli* mit hohen Ausbeuten in unlöslicher Form hergestellt werden kann. Zur weiteren Steigerung der Ausbeute an heterologem Protein wurde eine Umklonierung in ein pET-System durchgeführt. Dadurch wurde das Gen, das das Fd-Fragment kodiert, unter der Kontrolle eines T7lac-Promoters exprimiert. Gleichzeitig wurden Sequenzen an das 3'-Ende des Gens angefügt, die für unterschiedliche polyionische Fusionspeptide kodieren. Als geladene Aminosäuren wurden entweder 10 Glutaminsäure-, Asparaginsäure- oder Arginin-Reste verwendet. Zusätzlich enthielt jedes Fusionspeptid einen Cystein-Rest. Exemplarisch ist in Abbildung 3.1.2 das Fd-Fragment mit Decaglutaminsäurefusion schematisch dargestellt.

Die Expression der modifizierten Gensequenzen erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) pUBS520 nach Induktion mit 1 mM IPTG. Der Anteil des Fd-Fragmentes am Gesamtzellprotein wurde densitometrisch an Coomassie-gefärbten SDS-Gelen bestimmt und betrug für die einzelnen Varianten: nicht-modifiziertes Fd-Fragment 29 % , FdR10C 47 % und FdE10C 24 % (vgl. Abbildung 3.1.2 A) bei Kultivierung auf LB-Medium supplementiert mit 2 % Glucose. Aus Abbildung 3.1.2 B-C kann die Bildung von FdR10C bzw. FdE10C bei Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) pUBS520 auf Mineralsalzmedium supplementiert mit 2 % Glucose entnommen werden. Dabei wurde FdR10C mit einem Anteil von 42 % und FdE10C mit

einem Anteil von 34 % am Gesamtzellprotein gebildet. Separat wurde die leichte Kette κ von MAK33 in EcoB pUBS520 hergestellt (Abbildung 3.1.2 D). Die Expression der cDNA erfolgte hier unter der Kontrolle des *tac*-Promotors und führte zu einem Anteil der κ -Kette am Gesamtzellprotein von ca. 9 %. Dieses entspricht dem in der Literatur beschriebenen Expressionsniveau (Bücheler, 1989). Die Identität der Banden wurde mittels Western Blot und immunologischer Detektion mit einem Anti-Maus-IgG-spezifischen Antikörper-Peroxidase-Konjugat nachgewiesen.

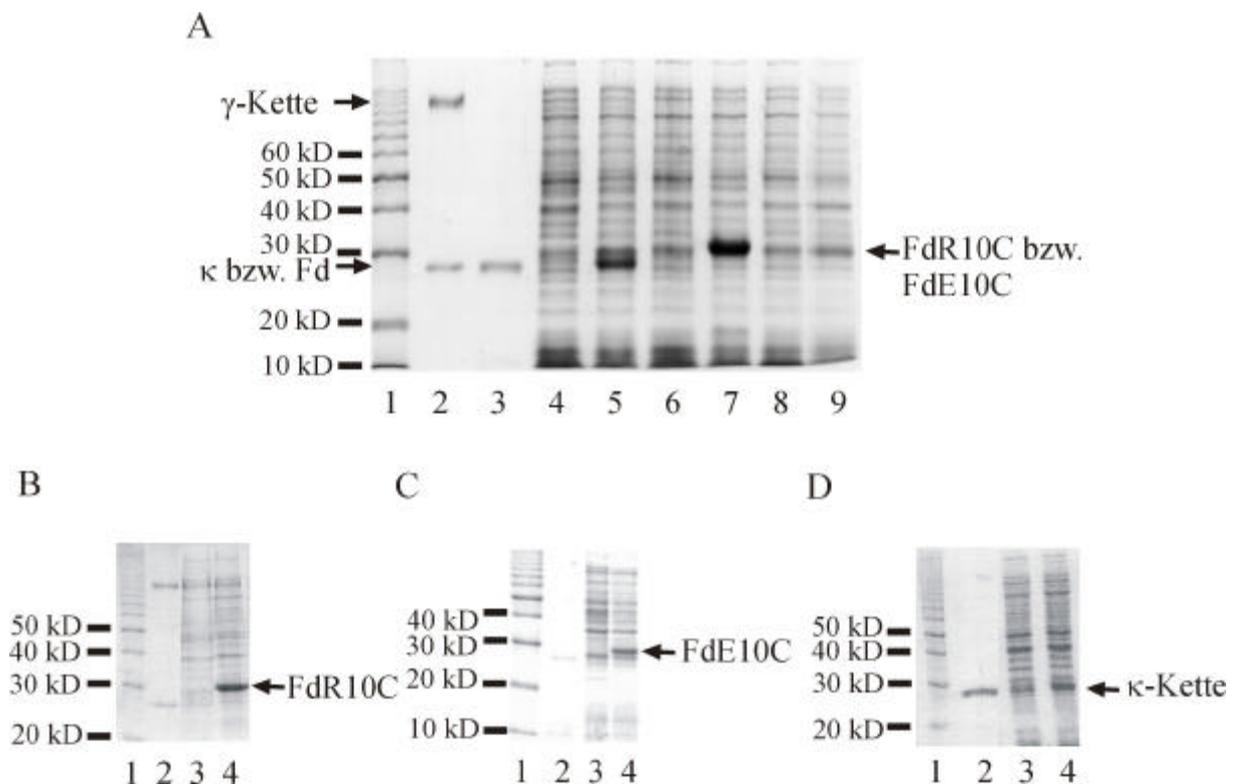


Abb. 3.1.2: Expression der cDNA, die die Derivate des Fd-Fragmentes von MAK33 und die κ -Kette codiert, in *Escherichia coli* BL21(DE3) pUBS520 bzw. in EcoB pUBS520. 12%iges Gel nach SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen und Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden jeweils 20 μ g Gesamtzellprotein vor und nach Induktion. **A.** Expressionstest der Fd-Konstrukte von MAK33 in *E. coli* BL21(DE3) pUBS520 auf LB-Medium supplementiert mit 2 % Glucose bei 37°C: (1) Proteinmarker, (2) MAK33, (3) Fab-Standard, (4) nicht modifiziertes Fd-Fragment vor Induktion und (5) 3 h nach Induktion, (6) FdR10C vor und (7) 3 h nach Induktion, (8) FdE10C vor und (9) 3 h nach Induktion. **B.** Expression von FdR10C auf Mineralsalzmedium mit Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle während der Bioreaktorkultivierung von BL21(DE3) pUBS520: (1) Proteinmarker, (2) MAK33-Standard, (3) Gesamtzellprotein vor Induktion, (4) Gesamtzellprotein 3 h nach Induktion. **C.** Expression von FdE10C auf Mineralsalzmedium: (1) Proteinmarker, (2) Fab-Standard, (3) Gesamtzellprotein vor und (4) 3 h nach Induktion. **D.** Expression von pBT111 (κ -Kette) in EcoB pUBS520 auf LB-Medium: (1) Proteinmarker, (2) Fab-Standard, (3) Gesamtzellprotein vor und (4) 3 h nach Induktion.

Auffallend ist das hohe apparente Molekulargewicht der modifizierten Fd-Fragmente im Vergleich zur κ -Kette und zum reduzierten authentischen Fab-Fragment, das aus den SDS-

Gelen ermittelt werden kann. Der Laufunterschied kann nicht allein mit der Zunahme des Molekulargewichts durch das Anfügen des polyionischen Fusionspeptides erklärt werden. Vermutlich ist die veränderte Interaktion mit den SDS-Molekülen ebenso in Betracht zu ziehen.

Beide Ketten des Fab-Fragmentes fielen als unlösliches Protein im Cytosol an. Die Isolierung dieser *inclusion bodies* nach der Methode von Rudolph *et al.* (1997) stellt einen ersten effizienten Reinigungsschritt dar. Abbildung 3.1.3 zeigt die *inclusion body*-Präparationen der leichten Kette κ und der Fd-Fragmente nach Solubilisierung in 6 M Guanidiniumhydrochlorid.

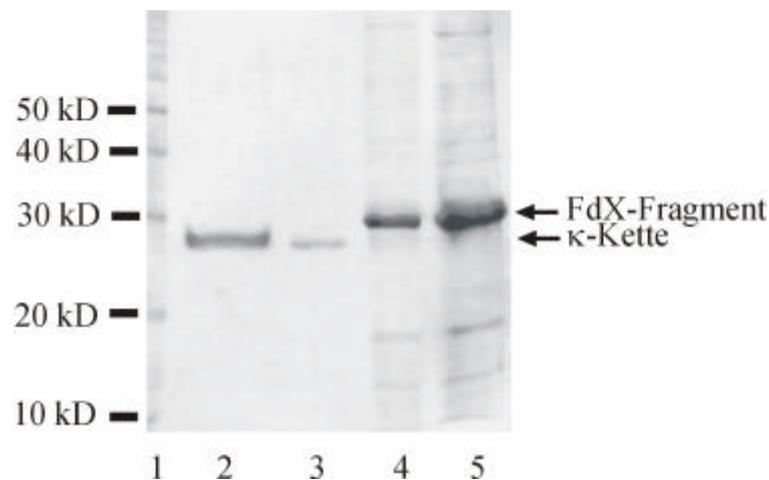


Abb. 3.1.3: 12%iges Gel nach SDS-PAGE der solubilisierten *inclusion bodies* der κ -Kette und der FdX-Fragmente unter reduzierenden Bedingungen; Coomassie-Färbung. (1) Proteinmarker, (2) Fab-Fragment von MAK33, (3) Solubilisat der κ -Kette, (4) Solubilisat des FdR10C-Fragmentes, (5) Solubilisat des FdE10C-Fragmentes.

Die Renaturierung erfolgte durch Verdünnung. Zur Optimierung der Renaturierungsausbeute wurden folgende Parameter variiert:

- Verhältnis von leichter Kette und FdX-Fragment (Abb. 3.1.4)
- Redoxsystem (GSH:GSSG; Gesamtglutathionkonzentration) (Abb. 3.1.5)
- Proteingesamtkonzentration im Ansatz (Pulsexperimente) (Abb. 3.1.6)
- Renaturierungszeit (Abb. 3.1.7)

Buchner und Rudolph (1991) sowie Lilie *et al.* (1994) untersuchten den Einfluß unterschiedlicher Parameter auf die oxidative Renaturierung von authentischem und rekombinant in *Escherichia coli* hergestelltem Fab-Fragment. Die Renaturierung der modifizierten Fab-Fragmente erfolgte in Anlehnung an die aus vorliegenden Arbeiten entnommenen Renaturierungsparameter und wurde für die einzelnen Derivate optimiert.

Einfluß des Verhältnisses von leichter Kette und Fd-Fragment

Die *inclusion body*-Präparationen der Fd-Fragmente enthielten noch Fremdprotein. Der Anteil der schweren Kette am Gesamtprotein wurde densitometrisch bestimmt und umfaßt für die FdR10C-Variante 85 % und für die FdE10C-Variante 50 %. Unter Berücksichtigung dieser Werte und der Gesamtproteinkonzentration des Solubilisates wurde die Konzentration der Fd-Fragmente ermittelt.

Bei der Renaturierung von Antikörperfragmenten kann die Aggregation einer der beiden Ketten die Ausbeute erheblich mindern. Bekannt ist, daß die κ -Kette in Lösung in isolierter Form renaturiert werden kann, wohingegen häufig die schwere Kette bzw. das Fd-Fragment zur Aggregation neigen (Buchner, 1987). Daher wurde die Renaturierungsausbeute des FabE10C und des FabR10C in Abhängigkeit vom Verhältnis des Fd-Fragmentes und der leichten Kette untersucht. Die Renaturierung erfolgte in 1 M Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0,6 mM GSH und 2,4 mM GSSG, pH 8,0 bei 10°C für 70 h. Die Konzentration der κ -Kette im Ansatz war 5 $\mu\text{g/ml}$. Das molare Verhältnis von Fd-Fragment und κ -Kette wurde zwischen 0,5 und 20 variiert. In Abbildung 3.1.4 ist die relative Renaturierungsausbeute nach 70 h bei 10°C in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis (FdX/ κ) für beide Varianten dargestellt.

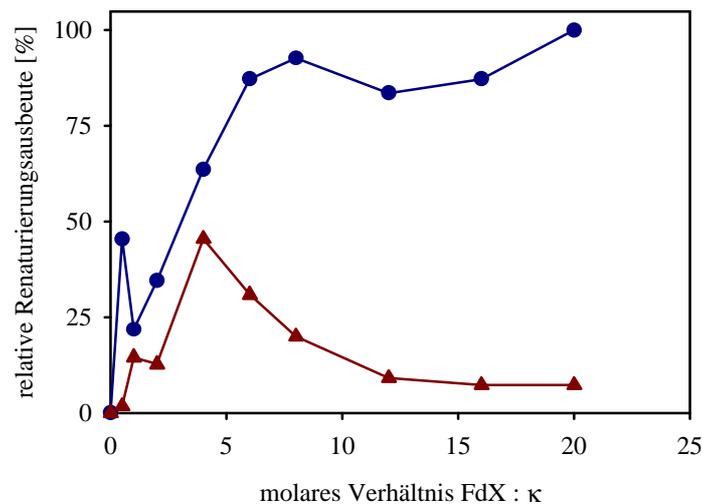


Abb. 3.1.4: Relative Renaturierungsausbeute von FabE10C (●) und FabR10C (▲) in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis von Fd-Fragment und κ -Kette. Die Renaturierung erfolgte in 1 M Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2,4 mM GSSG, 0,6 mM GSH, pH 8,0 für 70 h bei 10°C. Die Konzentration der κ -Kette war 5 $\mu\text{g/ml}$ (200 nM). Die Konzentration des funktionellen Fab-Fragmentes wurde mittels ELISA (vgl. Abschnitt 2.2.4.6) bestimmt. Die Renaturierungsausbeute wurde auf den höchsten Wert der Renaturierungsausbeute von FabE10C bei 20fachem molarem Überschuß des Fd-Fragmentes normiert. Dieser lag nach 70 h Renaturierungszeit bei 10 %.

Aus Abbildung 3.1.4 geht hervor, daß höchste Renaturierungsausbeuten bei einem 4fachen molaren Überschuß von FdR10C bzw. 8fachen molaren Überschuß von FdE10C erzielt wurden. Dieses Verhältnis wurde für weitere Renaturierungsexperimente verwendet. Auffallend ist die geringe Renaturierungsausbeute von FabR10C und die Abnahme der Renaturierungsausbeute mit zunehmender Konzentration des FdR10C-Fragmentes im Ansatz.

Diese kann möglicherweise auf die bevorzugte Aggregation des Fd-Fragmentes nach Interaktion des positiv geladenen Fusionspeptides mit DNA im Renaturierungsansatz zurückgeführt werden. Nach Bindung an DNA erfolgt eine lokale Konzentrationserhöhung. Ähnliches wurde für das negativ geladene FdE10C-Fragment nicht beobachtet.

Einfluß des Redoxsystems

Für die Ausbildung der nativen Struktur des Fab-Fragmentes ist die Bildung der richtigen intramolekularen und intermolekularen Disulfidbrücken entscheidend. Da mit dem polyionischen Fusionspeptid ein weiterer Cystein-Rest an die Primärsequenz des Fd-Fragmentes angefügt wurde, sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob dieser einen Einfluß auf die Ausbeute an funktionellem Fab-Fragment hat.

Dazu wurden nicht modifiziertes Fab-Fragment, FabE10C und FabR10C in Gegenwart unterschiedlicher Verhältnisse an reduziertem zu oxidiertem Glutathion renaturiert. Die Glutathiongesamtconzentration war dabei konstant 3 mM.

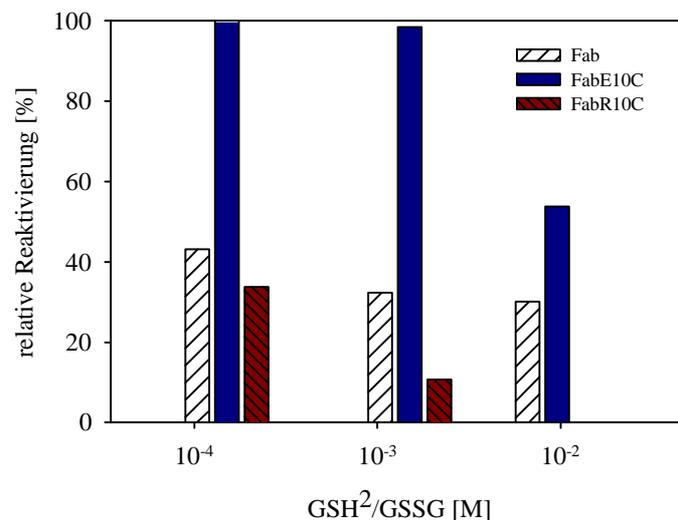


Abb. 3.1.5: Relative Renaturierungsausbeute von unterschiedlichen Fab-Varianten in Abhängigkeit vom Verhältnis des oxidierten zu reduziertem Glutathions. Die Glutathiongesamtconzentration war dabei konstant 3 mM. Die Renaturierung wurde wie in Abb. 3.1.4 mit optimalem κ /FdX-Verhältnis durchgeführt. Nach 50 h wurde die Ausbeute mittels ELISA bestimmt. Die Werte wurden auf die höchste Ausbeute (FabE10C: 7,4 % nach 50 h bei 10°C) normiert.

Aus Abbildung 3.1.5 geht hervor, daß die Renaturierung unter leicht oxidierenden Bedingungen $\text{GSH}^2/\text{GSSG} = 10^{-4}$ M (2,4 mM GSSG/0,6 mM GSH) zu bevorzugen ist. Hierbei ist die Renaturierungsausbeute des mit Glutamatfusionspeptid versehenen Fab-Fragmentes doppelt so hoch wie die des nicht modifizierten Antikörperfragmentes. Auffallend ist die geringe Renaturierungsausbeute des FabR10C im Vergleich zu den anderen Fab-Fragmenten. Die Variation der Gesamtglutathionkonzentration zwischen 2 und 5 mM bei konstantem GSH^2/GSSG -Verhältnis hatte keinen Einfluß auf die Reaktivierungsausbeute (Daten nicht gezeigt).

Erhöhung der volumenbezogenen Renaturierungsausbeute durch Pulsen

Nachteile der Renaturierung durch Verdünnen sind das Arbeiten mit großen Volumina und die geringe Proteinkonzentration. Im Fall des Fab-Fragmentes liegt diese bei 10 $\mu\text{g/ml}$ bezogen auf das zu renaturierende Fab-Fragment. Eine Möglichkeit, die volumenbezogene Ausbeute zu erhöhen, ist die Pulsrenaturierung. Hierbei wird dem Renaturierungsansatz in einem zuvor ermittelten zeitlichen Abstand mehrfach denaturierte Proteinlösung zugesetzt. Bereits gefaltete Proteinmoleküle bzw. stabile Faltungsintermediate aggregieren dabei nicht mit dem hinzugefügten Protein. Die Zugabe von denaturiertem Protein wird dadurch begrenzt, daß entweder bei hohen Proteinkonzentrationen Aggregation einsetzt bzw. daß die Restkonzentration an Denaturierungsmittel im Ansatz eine weitere Renaturierung verhindert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für das nicht modifizierte Fab-Fragment sowie für die beiden Derivate FabE10C und FabR10C Untersuchungen zur Renaturierung durch Pulsen durchgeführt. Im zeitlichen Abstand von 50 h wurde die Konzentration an zu renaturierendem Fab-Fragment jeweils um 10 $\mu\text{g/ml}$ erhöht. Vor jeder Zugabe wurde die Renaturierungsausbeute mittels ELISA bestimmt. In Abbildung 3.1.6 sind die relativen Renaturierungsausbeuten bezogen auf den Maximalwert der Ausbeute von FabE10C von 24,3 % bei 40 $\mu\text{g/ml}$ im Ansatz dargestellt. Die gesamte Versuchsreihe wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt.

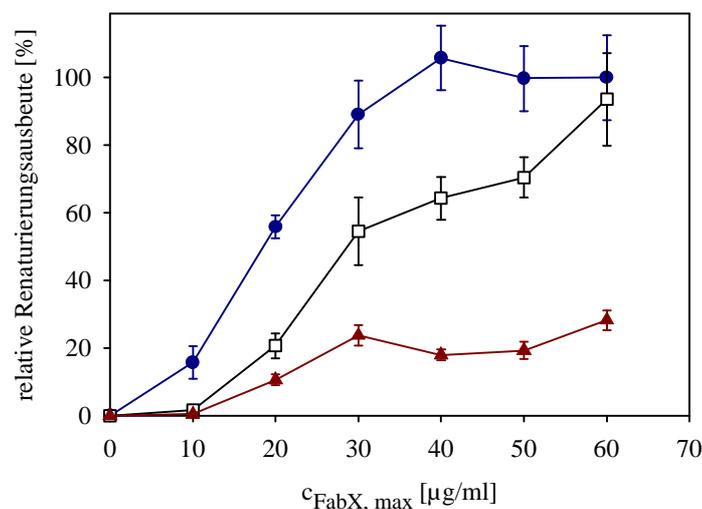


Abb. 3.1.6: Pulsexperimente: Relative Renaturierungsausbeute von FabE10C (●), nicht-modifiziertem Fab (□) und FabR10C (▲) in Abhängigkeit von der maximalen Konzentration an FabX im Ansatz. Im zeitlichen Abstand von 50 h wurde zum Renaturierungsansatz Solubilisat des FdX-Fragmentes und der κ -Kette hinzugegeben, so daß die Konzentration an maximal renaturierbarem Fab-Fragment jeweils um 10 $\mu\text{g/ml}$ gesteigert wurde. FdE10C und FdR10C wurden in entsprechend optimiertem Überschuß eingesetzt. Die Renaturierung wurde in 1 M Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2,4 mM GSSG, 0,6 mM GSH, pH 8,0 bei 10°C durchgeführt. Funktionelles Fab-Fragment wurde mittels ELISA bestimmt. Angegeben ist die Standardabweichung vom Mittelwert von drei parallelen Renaturierungsansätzen unter Annahme einer Gaußschen Normalverteilung der Fehler.

Aus Abbildung 3.1.6 geht hervor, daß die Fab-Variante mit Polyglutaminsäurefusionspeptid mit ähnlichen Ausbeuten renaturiert werden kann wie das nicht-modifizierte Fab-Fragment.

Auffallend ist wiederum die relativ geringe Renaturierungsausbeute des FabR10C-Fragmentes.

Zur Steigerung der Renaturierungsausbeute des FabR10C-Fragmentes wurden Untersuchungen durchgeführt, in denen das modifizierte Fd-Fragment an einer entgegengesetzt geladenen Matrix (Heparin-Sepharose) immobilisiert wurde. Dazu wurden sowohl die leichte Kette als auch das Fd-Fragment gegen 8 M Harnstoff, pH 4,0 dialysiert. Die Rückfaltung sollte durch Zusatz von 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2,4 mM GSSG, 0,6 mM GSH, pH 8,0 und der denaturierten leichten Kette initiiert werden. Die Matrix-unterstützte Renaturierung wurde in Gegenwart unterschiedlicher Zusätze zum Renaturierungspuffer wie Ethylenglykol und Glycerin durchgeführt. Nach Ablösen des Fab-Fragmentes mit 1 M NaCl in 1 M Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8,0 konnte jedoch kein funktionelles FabR10C-Fragment nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Renaturierungskinetik

Die oxidative Renaturierung des Fab-Fragmentes wurde eingehend von Buchner und Rudolph (1991) sowie Lilie *et al.* (1994) charakterisiert. Die Renaturierung erfolgt sehr langsam über einen Zeitraum von 200-250 h. Während der gesamten Zeit findet die Bildung korrekter Disulfidbrücken statt.

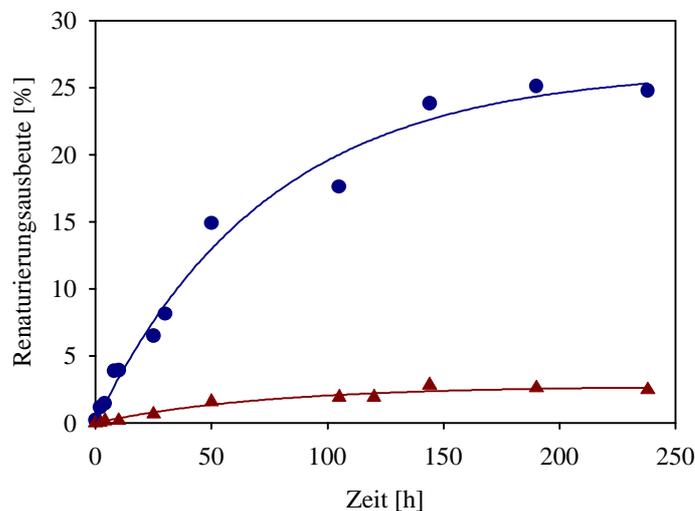


Abb. 3.1.7: Zeitlicher Verlauf der oxidativen Renaturierung von FabE10C (●) und FabR10C (▲) in 1 M Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2,4 mM GSSG, 0,6 mM GSH, pH 8,0, 10°C, $c_K = 5 \mu\text{g/ml}$, optimierter Anteil an FdX-Fragment.

Aus Abbildung 3.1.7 ist ersichtlich, daß auch die Renaturierung von FabE10C einer sehr langsamen Kinetik unterliegt. Maximale Renaturierungsausbeuten von etwa 25 % werden erst nach einer Renaturierungszeit von 200 - 250 h erreicht. Somit ist die Renaturierungskinetik von FabE10C ähnlich der des nicht-modifizierten Antikörperfragmentes.

Da das FabR10C-Fragment nur in sehr geringen Ausbeuten in funktioneller Form gewonnen werden konnte, wurde es in weiteren Experimenten nicht verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls eine Variante des Fab-Fragmentes mit Polyaspartatfusionspeptid (FabD10C) erstellt. Diese Variante wies ähnliche Eigenschaften bezüglich Expression und Renaturierungsausbeute wie FabE10C auf.

Für präparative Zwecke wurde FabE10C im 5 l-Maßstab bei 8fachem molarem Überschuß des FdE10C-Fragmentes gegenüber der κ -Kette in 1 M Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0,6 mM GSH, 2,4 mM GSSG, pH 8,0 bei 10°C über 250 h renaturiert. Die maximale Konzentration an renaturierbarem FabE10C wurde dabei im zeitlichen Abstand von 50 h von anfangs 10 μ g/ml stufenweise (vgl. Renaturierung durch Pulsen) auf 40 μ g/ml erhöht. Unter diesen Bedingungen wurden Renaturierungsausbeuten von 25 % erreicht. Nach Zentrifugation (2 h, 4°C, 6000 rpm, Rotor JLA 8.1000, *Beckman*) wurde der Renaturierungsansatz mittels Querstromfiltration von 5 l auf 100 ml aufkonzentriert und gegen 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8,0 dialysiert. Die konzentrierte Proteinlösung wurde zentrifugiert (75 000 g, 20 min, 4°C) und auf einen Anionenaustauscher aufgetragen. Die Chromatographie wurde an einer Resource Q-Säule (Säulenvolumen: 6 ml) durchgeführt. Das Säulenmaterial wurde mit 10 mg Gesamtprotein beladen. Die Elution erfolgte in einem linearen Gradienten über 20 Säulenvolumen von 0 auf 500 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8,0 bei einer Flußrate von 6 ml/min. In Abbildung 3.1.8 A ist das Elutionsprofil von FabE10C an Resource Q dargestellt.

Aus Abbildung 3.1.8 geht hervor, daß das funktionelle FabE10C-Fragment bei einer Leitfähigkeit des Eluenten von 23,5 mS/cm eluiert. Das entspricht einer Konzentration von etwa 260 mM NaCl. Durch die Chromatographie kann das disulfidverbrückte FabE10C-Fragment effizient von höhermolekularen disulfidverbrückten Aggregaten der FdE10C-Kette getrennt und zur Homogenität gereinigt werden (Abb. 3.1.8 C). Die SDS-PAGE zeigt, daß die interchenare Disulfidbrücke von FabE10C quantitativ ausgebildet wurde. Anhand des UV-Spektrums ist ersichtlich, daß FabE10C weder durch Proteinaggregate noch durch andere Verunreinigungen wie Nukleinsäuren kontaminiert ist. Darüber hinaus besteht Übereinstimmung zwischen der durch UV-Absorption und mittels ELISA bestimmten Proteinkonzentration. Daraus ergibt sich, daß das gereinigte FabE10C keinen Anteil an löslichem, aber nicht-funktionellem Protein enthält.

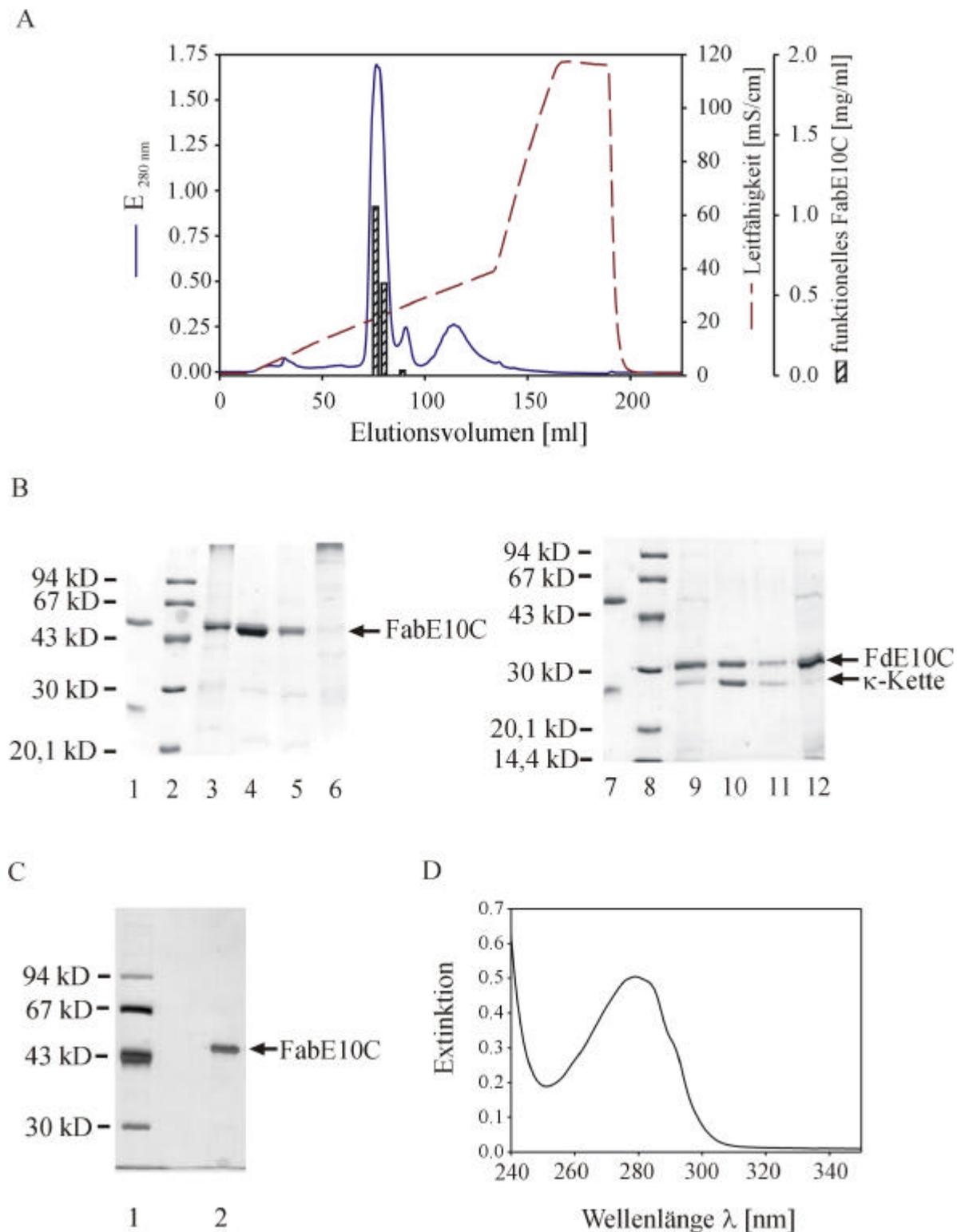


Abb. 3.1.8: Reinigung des renaturierten FabE10C mittels Ionenaustauschchromatographie. **A.** Elutionsprofil von FabE10C an Resource Q (Elutionsbedingungen vgl. Text.). **B.** 12%iges SDS-Gel nach Coomassie-Färbung. Bahn 3-6 unter nicht-reduzierenden Bedingungen, Bahn 1, 2, 7-12 unter reduzierenden Bedingungen. (1) und (7) MAK33-Standard, (2) und (8) Proteinmarker, (3) und (9) konzentrierter Renaturierungsansatz vor Resource Q, (4) und (10) sowie (5) und (11) Fraktionen mit funktionellem Fab-Fragment, (6) und (12) höhermolekulare disulfidverbrückte Aggregate des FdE10C-Fragmentes, Elution bei ca. 400 mM NaCl. **C.** 10%iges Gel nach SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen und Silberfärbung. (1) Proteinmarker, (2) 1 µg FabE10C. **D.** UV-Absorptions-spektrum von 310 µg/ml FabE10C.

Aus 100 g Biofeuchtmasse von *E. coli* BL21(DE3) pUBS520 pET-11a_FdE10C und aus 100 g Biofeuchtmasse von EcoB pUBS520 pBT111 (κ -Kette) konnten 30-45 mg natives, gereinigtes FabE10C gewonnen werden. Die Renaturierungsausbeute lag bei 25 %. Die Verluste bei der Aufkonzentrierung mittels Querstromfiltration und der Dialyse waren mit 2 % sehr gering. Der Verlust bei der chromatographischen Reinigung mittels Resource Q lag zwischen 20 und 35 %. Durch diesen Chromatographieschritt wurde das FabE10C-Fragment zur Homogenität gereinigt.

3.1.2 Herstellung und Reinigung von Varianten der α -Glucosidase mit polyionischem Fusionspeptid

Ausgehend von der cDNA einer Variante der α -Glucosidase mit C-terminalem Hexaarginin-tag (Stempfer *et al.*, 1996b) wurden unterschiedliche Expressionskonstrukte erstellt. Als Expressionsvektor wurde pKK177-3 verwendet, so daß die Expression des α -Glucosidase-Gens unter der Kontrolle eines *tac*-Promotors erfolgte. Die Klonierungsstrategie kann dem Kapitel Material und Methoden entnommen werden. Aus Arbeiten von Höll-Neugebauer (1992) war bekannt, daß das Anfügen eines C-terminalen positiv- oder negativ-geladenen Fusionspeptids keinen Einfluß auf die enzymatische Aktivität der α -Glucosidase hat. Die dabei verwendeten Fusionspeptide bestanden aus maximal 10 Arginin-Resten bzw. 7 Glutaminsäure-Resten und enthielten keinen zusätzlichen Cystein-Rest.

In Anlehnung an Stempfer *et al.* (1996b) wurde eine N-terminal modifizierte Variante der α -Glucosidase mit einem Decaarginin-tag entwickelt. Dabei wurde der N-Terminus der α -Glucosidase um die Sequenz MTISDR10C verlängert. Die ersten fünf Aminosäuren entsprechen dem Anfang der α -Glucosidase-Primärsequenz und sollten die Expression des Gens in *Escherichia coli* gewährleisten.

Herstellung der α -Glucosidase-Varianten als lösliches Protein

Die Expression sämtlicher Genkonstrukte der α -Glucosidase erfolgte zunächst in *Escherichia coli* C600 pUBS520 nach Kopetzki *et al.* (1989b). Durch limitierte Induktion in Gegenwart von 0,5 % Lactose bei niedrigem pH-Wert (pH 5,0) und niedriger Temperatur (24°C) fallen dabei etwa 90 % des gebildeten Enzyms in löslicher Form im Cytosol an. Der Anteil des rekombinanten Proteins am Gesamtzellprotein beträgt etwa 5 %. In Abbildung 3.1.9 A und B ist die Auswertung der Expressionstests mittels 10%iger SDS-PAGE dargestellt. Zum Vergleich ist die Bildung des Wildtypproteins der α -Glucosidase in *E. coli* C600 pUBS520 pKK177_ α -Gluc0 abgebildet.

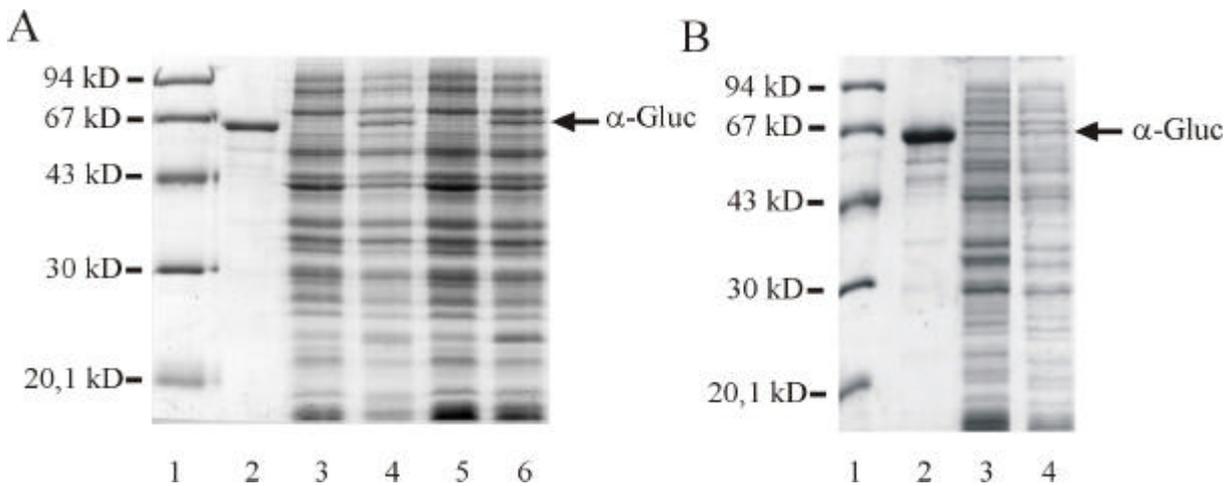


Abb. 3.1.9: 10%iges SDS-Gel nach Coomassie-Färbung zur Auswertung der Expressionstests von *E. coli* C600 pUBS520 pKK177_α-Gluc. Die Kultivierung erfolgte nach Kopetzki *et al.* (1989b). **A.** Aufgetragen sind jeweils 20 µg Gesamtzellprotein vor und nach Induktion der Genexpression. (1) Proteinmarker; (2) α-Glucosidase-Wildtypprotein, gereinigter Standard; (3) C600 pUBS520 pKK177_α-Gluc0 vor Induktion und (4) 3 h nach Induktion; (5) C600 pUBS520 pKK177_α-GlucR10C vor Induktion bzw. (6) 3 h nach Induktion. **B.** Präparation von löslichem Protein. (1) Proteinmarker; (2) α-Gluc-WT; (3) 20 µg Gesamtzellprotein C600 pUBS520 pKK177_α-GlucR10C 6 h nach Induktion; (4) lösliche Fraktion nach Zellaufschluß. Die unlösliche Fraktion, die lediglich *E.coli*-Membranproteine enthielt, ist nicht abgebildet.

In Abbildung 3.1.9 A ist jeweils das Gesamtzellprotein vor und nach Induktion der Expression des heterologen Gens dargestellt. In Abbildung 3.1.9 B ist exemplarisch für α-GlucR10C der Anteil der α-Glucosidase im Gesamtzellprotein und in der löslichen Fraktion dargestellt. Erkennbar ist, daß die α-Glucosidase überwiegend in löslicher Form vorliegt. In Tabelle 3.1.1 ist die spezifische α-Glucosidase-Aktivität der untersuchten Varianten in der löslichen Fraktion nach Expression in *E. coli* C600 pUBS520 zusammengestellt.

Tabelle 3.1.1: Spezifische α-Glucosidase-Aktivität in der löslichen Fraktion nach Expression der verschiedenen α-Glucosidase-Konstrukte in *E. coli* C600 pUBS520 auf LB-Medium supplementiert mit 2 % Glycerin. (Induktion mit 0,5 % Lactose, Kultivierung bei 24°C, pH 5,0, 6 h); Aktivitätstest unter Standardbedingungen mit *p*-NpG (vgl. Abschnitt 2.2.4.5); Proteinbestimmung nach Bradford (1979)

α-Glucosidase-Variante	spezifische enzymatische Aktivität im Rohextrakt [U/mg]
α-Glucosidase-WT	8,6
R10C-α-Gluc	0,3
α-GlucR10C	5,2
α-GlucE10C	8,9

Aus Tabelle 3.1.1 ist ersichtlich, daß die Bildung der α -Glucosidase mit C-terminalem Decaglutamatfusionspeptid der des nicht-modifizierten Enzyms entspricht. Im Vergleich dazu erreicht die spezifische Aktivität im Rohextrakt der Variante mit C-terminalem Decaargininfusionspeptid etwa 60 % der spezifischen Aktivität, die im Rohextrakt nach Bildung des Wildtypproteins bestimmt wurde. Das Expressionsniveau der N-terminal modifizierten α -Glucosidase R10C- α -Gluc ist signifikant geringer. Die spezifische Aktivität im Rohextrakt dieser Variante unterscheidet sich um den Faktor 20 bis 30 von der in den Rohextrakten der übrigen Konstrukte. Zusätzlich wurde eine Variante der α -Glucosidase mit N-terminalem Decaargininfusionspeptid untersucht, bei der der Cystein-Rest vor der polyionischen Sequenz eingefügt wurde (CR10- α -Gluc). Die spezifische Aktivität im Rohextrakt dieser Variante war nochmals um den Faktor 10 geringer als die von R10C- α -Gluc.

Reinigung der α -Glucosidase-Varianten aus dem Rohextrakt

Die Reinigung der α -Glucosidase-Varianten aus dem Rohextrakt erfolgte an den zum jeweiligen Fusionspeptid komplementär geladenen Ionenaustauschern. Die α -Glucosidase-Varianten mit positiv geladenen N- oder C-terminalen Fusionspeptiden lagen nach dem ersten Reinigungsschritt an einer Resource S-Säule zu 80-88 % rein vor. In Abbildung 3.1.10 A ist ein entsprechendes Reinigungsgel der α -GlucR10C dargestellt.

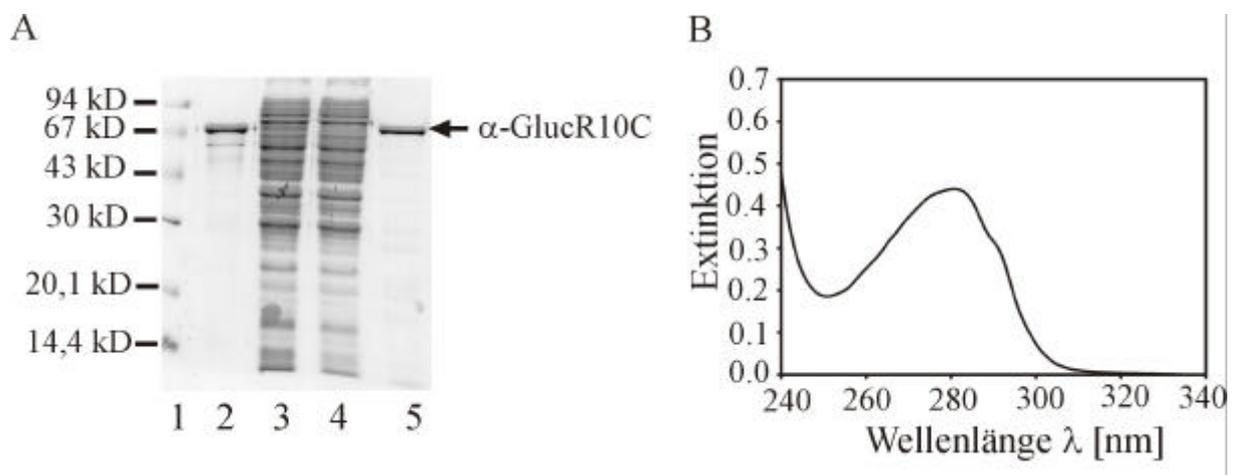


Abb. 3.1.10: **A.** 10%iges SDS-Gel von Proben der Aufarbeitung des Rohextraktes von α -GlucR10C an Resource S. (1) Proteinmarker; (2) α -Glucosidase-WT; (3) Rohextrakt; (4) Durchlauf von Resource S; (5) Eluat von Resource S. **B.** UV-Spektrum der α -GlucR10C nach Benzonasebehandlung und Dialyse gegen 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 10 mM EDTA, pH 6,8; $c_{\text{Protein}} = 0,2$ mg/ml.

Die Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie mit höchster spezifischer α -Glucosidase-Aktivität wurden vereinigt. Um DNA, die mit dem positiv geladenen Fusionspeptid interagiert, zu entfernen, wurde die Proteinlösung mit Benzonase in Gegenwart von 15 mM $MgCl_2$ behandelt (16 h bei 4°C). Zur Abtrennung niedermolekularer Bestandteile wurde eine Gelfiltration an Superdex 75 bzw. eine Ultrafiltration unter reduzierenden Bedingungen mit

einer Membran der Trenngrenze 30 kD durchgeführt. Das UV-Spektrum der gereinigten α -GlucR10C ist Abbildung 3.1.10 B zu entnehmen. Bei dieser Reinigungsstrategie wurden aus 10 g Biofeuchtmasse 3,6 mg gereinigtes Enzym mit einer spezifischen Aktivität von 135 U/mg erhalten.

Die Reinigung der α -GlucosidaseE10C mittels Anionenaustauscher wurde an einer Resource Q-Säule durchgeführt. Dabei wurde der Rohextrakt bei einem pH-Wert von 6,8 auf die Säule aufgetragen. Eine pH-Wert-Änderung von pH 6,8 auf pH 5,6 führte zur Elution von Fremdproteinen. Da starke pH-Wert-Änderungen zu einem Aktivitätsverlust der α -Glucosidase führen, erfolgte die Elution des Zielproteins nicht durch weitere pH-Wert-Absenkung, sondern in einem linearen Salzgradienten von 0 auf 500 mM NaCl bei pH 5,6 (Daten nicht gezeigt). Bei dieser Reinigungsstrategie wurden aus 10 g Biofeuchtmasse 1,1 mg aktives Enzym mit einer spezifischen Aktivität von 100 U/mg erhalten.

Herstellung der α -GlucE10C in Form von inclusion bodies und Renaturierung durch Verdünnung

Als Alternative zur löslichen Expression wurde die Herstellung der α -Glucosidase Variante α -GlucE10C in Form von *inclusion bodies* in *Escherichia coli* EcoB untersucht. Hierbei erfolgte die Kultivierung auf Mineralsalzmedium mit 2 % Glucose bei 37°C und die Induktion in Gegenwart von 1 mM IPTG (Abb. 3.1.11 A). Nach Isolierung der *inclusion bodies* und Solubilisierung in 8 M Harnstoff wurde die α -GlucosidaseE10C an Q-Sepharose unter denaturierenden Bedingungen vorgereinigt (Abb. 3.1.11 B). Hierdurch konnten DNA und Fremdproteine effektiv aus dem Solubilisat entfernt werden. Mittels Renaturierung durch Verdünnung in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 1mM EDTA, pH 7,6 bei einer Proteinkonzentration von 10 μ g/ml wurde die α -GlucosidaseE10C mit Ausbeuten von 60 % reaktiviert. Der Renaturierungsansatz wurde mittels Querstromfiltration aufkonzentriert und erneut auf einen Anionenaustauscher aufgetragen (Resource Q). Hierdurch wurde das Vorhandensein eines negativ geladenen polyionischen Fusionspeptides nach der Renaturierung bestätigt und durch geeignete Wahl des Gradienten eine zusätzliche Aufkonzentrierung erreicht. In Abbildung 3.1.11 C ist ein 10%iges SDS-Gel nach Silberfärbung dargestellt, das die Homogenität der Präparation dokumentiert. Mit dieser Reinigungsstrategie wurden aus 100 g Biofeuchtmasse 45 mg aktives Enzym mit einer spezifischen Aktivität von 145 U/mg erhalten.

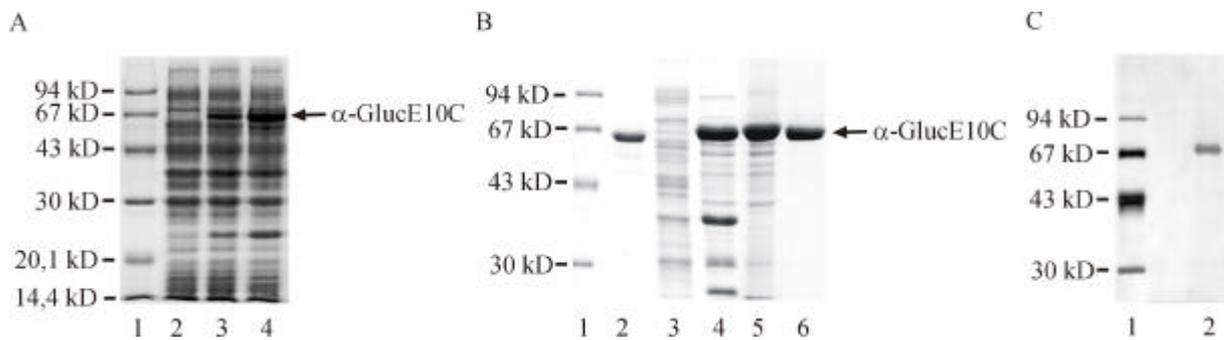


Abb. 3.1.11: Expression und Reinigung von α -GlucE10C. **A.** 12%iges SDS-Gel nach Coomassie-Färbung. Expression der α -GlucE10C in *E. coli* EcoB pUBS520 durch Kultivierung auf Mineralsalzmedium supplementiert mit 2 % Glucose bei 37°C. Die Induktion erfolgte in Gegenwart von 1 mM IPTG. (1) Proteinmarker, 20 μ g Gesamtzellprotein (2) vor Induktion sowie (3) 3 h und (4) 6 h nach Induktion. **B.** 10%iges SDS-Gel nach Coomassie-Färbung. Präparation der *inclusion bodies* und Vorreinigung unter denaturierenden Bedingungen. (1) Proteinmarker, (2) 3 μ g α -Gluc-WT, (3) lösliche Fraktion nach Zellaufschluß, (4) unlösliche Fraktion nach Zellaufschluß, (5) solubilisierte *inclusion bodies*, (6) Eluat bei Vorreinigung der *inclusion bodies* an Q-Sepharose unter denaturierenden Bedingungen in 7,5 M Harnstoff. **C.** Homogenität der Proteinpräparation. 10%iges SDS-Gel nach Silberfärbung. (1) Proteinmarker, (2) 1 μ g α -GlucE10C nach Renaturierung und Aufkonzentrierung mittels Querstromfiltration und Resource Q.

Charakterisierung der α -Glucosidase-Varianten mit Fusionspeptid

Die Reinigung der α -Glucosidase-Varianten mittels Ionenaustauschchromatographie war ein erster Hinweis auf das Vorhandensein eines geladenen Fusionspeptides. In Tabelle 3.1.2 sind die Leitfähigkeit im Eluat und die entsprechende Natriumchloridkonzentration für die untersuchten Konstrukte und verwendeten Ionenaustauschermaterialien zusammengestellt. Darüber hinaus werden die Elutionscharakteristika der α -Glucosidase-WT an beiden Säulenmaterialien aufgeführt.

Tabelle 3.1.2: Wechselwirkungen der α -Glucosidase-Varianten mit den entsprechenden Ionenaustauschermaterialien: Leitfähigkeit des Eluates und entsprechende Natriumchloridkonzentration. Die Säulen wurden jeweils in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 10 mM EDTA, pH 6,8 äquilibriert. Die Flußrate war 6 ml/min. Die Elution erfolgte in einem linearen Salzgradienten von 0 auf 500 mM NaCl über 20 Säulenvolumen.

Variante	Ionenaustauscher	Leitfähigkeit im Eluat [mS/cm]	NaCl-Konzentration im Eluat [mM]
α -Gluc-WT	Resource S	keine Interaktion	0
R10C- α -Gluc	Resource S	38	410
α -GlucR10C	Resource S	41	460
α -Gluc-WT	Resource Q	6	10
α -GlucE10C	Resource Q	24,5	260

Für einen Nachweis der Identität der Fusionspeptide wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Die N-terminal modifizierte Variante der α -Glucosidase konnte durch N-terminale Sequenzierung identifiziert werden. Mehr als 90 % des eingesetzten Proteins hatten einen vollständigen N-Terminus. Dieser war bei Lagerung des gereinigten Proteins bei 4°C über einen Zeitraum von mindestens drei Wochen stabil. Für die Charakterisierung der C-terminal modifizierten Varianten wurde eine modifizierte Form der kovalenten Chromatographie entwickelt, auf die in Abschnitt 3.3 näher eingegangen wird.

Neben der Identität und der Stabilität der Fusionspeptide war ihr Einfluß auf die Funktionalität der Fusionspartner von Interesse. Daher wurde die enzymatische Aktivität der α -Glucosidase-Varianten untersucht und mittels K_M -Wert und spezifischer Aktivität charakterisiert. In Tabelle 3.1.3 sind die Ergebnisse für die einzelnen Varianten zusammengestellt.

Tabelle 3.1.3: Charakterisierung der enzymatischen Aktivität der α -Glucosidase-Varianten mit Hilfe der K_M -Werte und der spezifischen Aktivität für das artifizielle Substrat p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid unter Standardbedingungen (100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 6,8; 30°C). Die Proteinbestimmung erfolgte durch UV-Spektroskopie. Alle enzymkinetischen Messungen wurden als 4fach Bestimmung durchgeführt.

Variante	K_M -Wert [μ M]	spezifische Aktivität [U/mg]
α -Gluc-WT	190 \pm 15	140 \pm 10
R10C- α -Gluc	210 \pm 10	140 \pm 10
α -GlucR10C	200 \pm 10	135 \pm 15
α -GlucE10C	195 \pm 10	145 \pm 10

Aus Tabelle 3.1.3 geht hervor, daß die enzymatischen Eigenschaften der α -Glucosidase gegenüber dem artifiziellen Substrat p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid durch die Fusion mit einem polyionischen Fusionspeptid, das ein zusätzliches Cystein enthält, nicht verändert werden. Die spezifische Aktivität entspricht dabei im Rahmen der Meßgenauigkeit dem in der Literatur beschriebenen Wert von 150 U/mg (Halvorson *et al.*, 1966; Needleman *et al.*, 1978).

3.2 Matrix-unterstützte Reaktivierung von α -GlucosidaseE10C

Als Alternative zur Renaturierung in Lösung wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Renaturierung eines Proteins mit einem negativ geladenen Fusionspeptid an einer Anionenaustauschermatrix untersucht. In Analogie zu den Arbeiten von Stempfer *et al.* (1996a) wurde α -Glucosidase als Modellprotein verwendet. Bei diesem monomeren Protein, das fünf freie Cystein-Reste enthält, kann die Reaktivierung über die enzymatische Aktivität einfach und schnell bestimmt werden.

Stempfer *et al.* (1996a) beschrieben die Matrix-unterstützte Reaktivierung von α -Glucosidase-Varianten mit C- bzw. N-terminalem Hexaargininfusionspeptid an unterschiedlichen Kationenaustauschermaterialien. Dabei erwies sich Heparin-Sepharose als besonders geeignetes Material. Die Reaktivierungsausbeute war signifikant von der Ionenstärke im Ansatz abhängig und maximal in Gegenwart von etwa 30-40 mM NaCl im Reaktivierungspuffer.

Die Untersuchungen zur Matrix-unterstützten Renaturierung der α -GlucosidaseE10C berücksichtigten folgende Aspekte:

- Bindungsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion zwischen Gelmaterial und enzymatisch aktivem Enzym;
- Einfluß der Ionenstärke auf die Ausbeute der Matrix-unterstützten Reaktivierung und der Reaktivierung in Lösung;
- Einfluß der Matrixbeladung auf die Reaktivierungsausbeute;
- Reaktivierungskinetik im freien und immobilisierten Zustand.

Ziel dieser Untersuchungen sollte es sein, das für eine Reaktivierung der α -GlucE10C am besten geeignete Trägermaterial zu ermitteln und an diesem die Reaktivierungsausbeute insbesondere durch Variation der Beladung zu optimieren.

Parallel dazu wurden Untersuchungen zur Renaturierung der modifizierten α -Glucosidase-Variante α -GlucE10C in Lösung durchgeführt, sowie die Matrix-unterstützte Renaturierung der α -Glucosidase-WT an den Anionenaustauschermaterialien untersucht.

Faktoren, die die Renaturierung von Proteinen mittels Ionenaustauschern beeinflussen, sind das Trägermaterial sowie die Art der funktionellen Gruppen und deren Dichte auf der Matrix

(Creighton, 1986). Für die Matrix-unterstützte Renaturierung der α -GlucE10C wurden vier unterschiedliche Gelmaterialien verwendet: Q-Sepharose und Fractogel TMAE als starke Anionenaustauschermaterialien sowie Fractogel DEAE und Fractoprep DEAE als schwache Anionenaustauschermaterialien. Da die Renaturierung im pH-Bereich zwischen 7 und 8 durchgeführt wurde, in dem sämtliche funktionellen Gruppen des Gelmaterials geladen sind, ist die Unterscheidung zwischen starken und schwachen Ionenaustauschern vernachlässigbar. Allerdings kann die Art der funktionellen Gruppen und ihre Hydrophilie möglicherweise von Bedeutung sein. Desweiteren unterscheiden sich die Materialien in der Art des Trägermaterials und der Kapazität. Während das Trägermaterial Sepharose aus quervernetzten Polysaccharid-Ketten besteht, die alternierend D-Galactose- und 3,6-Anhydro-L-Galactose-Reste enthalten, ist das Trägermaterial des Tentakelgels Fractoprep ein Vinylpolymer mit amidischer Vernetzung (persönliche Mitteilung Herr Dr. Britsch, Fa. Merck) und das der Fractogel EMD-Gele ein Polymer auf Methacrylsäure-Basis. Typische ionische Kapazitäten für Q-Sepharose Fast Flow liegen im Bereich von 180-250 $\mu\text{mol (Cl)}/\text{ml}$. Für die Fractogel/Fractoprep-Materialien liegen Kapazitätsangaben nur bezogen auf BSA, jedoch keine Angaben zur ionischen Kapazität vor. Allerdings ist nach Mitteilung des Herstellers (persönliche Mitteilung Herr Dr. Britsch, Fa. Merck) eine, im Vergleich zu herkömmlichen Ionenaustauschern, wesentlich bessere effektive Ausnutzung der Ladungen dadurch gewährleistet, daß die Ladungen an flexiblen Tentakeln angebracht sind und somit die Proteine regelrecht „umschließen“ können.

Zunächst wurden Bindungsexperimente von α -GlucE10C und α -Gluc-WT durchgeführt, um die Interaktion zwischen Protein und Matrix unter Gleichgewichtsbedingungen in Gegenwart unterschiedlicher Natriumchloridkonzentrationen zu charakterisieren.

Ziel dieser Untersuchungen war es, einen Bereich für die Ionenstärke im Renaturierungspuffer zu ermitteln, bei dem das Protein noch mit der Matrix interagiert. Zum anderen sollte die Kooperativität der Bindung an die unterschiedlichen Ionenaustauschermaterialien untersucht werden.

In Abbildung 3.2.1 A und B sind die Ergebnisse der Bindungsexperimente von α -GlucE10C an die untersuchten Trägermaterialien zusammengestellt. Die α -Glucosidase-WT interagiert nur schwach mit den untersuchten Trägermaterialien und eluiert bereits vollständig bei einer Natriumchloridkonzentration zwischen 50 und 100 mM (Daten nicht gezeigt).

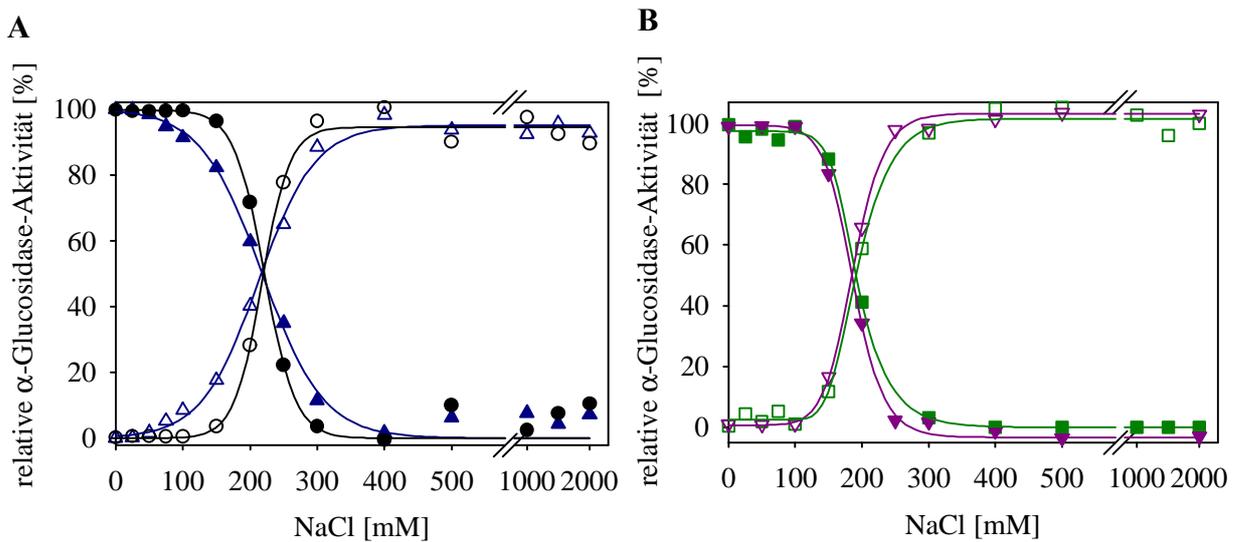


Abb. 3.2.1: Bindungsexperimente von α -GlucE10C an unterschiedliche Anionenaustauschermaterialien. **A.** (●) Q-Sepharose und (▲) Fractoprep DEAE. **B.** (■) Fractogel DEAE und (▼) Fractogel TMAE. Die Matrixbeladung betrug jeweils 1 mg/ml. Die Bindung erfolgte in 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 1 mM EDTA pH 7,6 für 16 h bei 4°C. Die Elution erfolgte durch Inkubation in Gegenwart unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen in 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 1 mM EDTA pH 7,6 für 16 h bei 4°C. Nachfolgend wurde die enzymatische Aktivität des Überstandes und der Matrixsuspension bestimmt. Daraus wurde der relative Anteil an freiem (offene Symbole) und immobilisiertem (geschlossene Symbole) Enzym ermittelt.

Die Wechselwirkung zwischen α -GlucE10C und Fractoprep DEAE unterscheidet sich signifikant vom kooperativen Bindungsverhalten der α -GlucE10C an die anderen Chromatographiematerialien. Formal kann die Kooperativität der Bindung mit Hilfe der empirischen Beziehung nach Hill (1910) analysiert werden. Dabei wird die Kooperativität durch eine spezifische Kooperativitätskonstante n beschrieben: Während für die Q-Sepharose eine Kooperativitätskonstante von $11,1 \pm 1,3$ ermittelt wurde, ist die von Fractogel DEAE und Fractogel TMAE sehr ähnlich und beträgt $8,0 \pm 1,1$ bzw. $8,0 \pm 0,6$. Von Fractoprep DEAE eluiert die α -GlucosidaseE10C über einen weiten Bereich zwischen 50 mM NaCl bis 400 mM NaCl. Die Beschreibung dieser Daten mit Hilfe der Hill-Gleichung (vgl. Abschnitt 2.2.6) resultiert in einer Kooperativitätskonstanten von $5,1 \pm 0,6$.

Reaktivierung von α -GlucE10C und α -Gluc-WT durch Verdünnung

Aus Arbeiten von Stempfer *et al.* (1996a) war der signifikante Einfluß der Ionenstärke auf die Ausbeute der Matrix-unterstützten Reaktivierung an Kationenaustauschermaterialien bekannt, daher war es von Interesse, ob ein ähnlicher Einfluß auch bei der Verwendung von Anionenaustauschermaterialien zu beobachten ist.

In Vorversuchen wurde zunächst der Einfluß der Ionenstärke auf die Ausbeute bei Renaturierung durch Verdünnen bestimmt. Parallel dazu wurden Untersuchungen mit dem nicht-modifizierten Enzym α -Gluc-WT durchgeführt.

In Abbildung 3.2.2 ist die Renaturierung der α -GlucE10C und der α -Glucosidase-WT durch Verdünnen in Renaturierungspuffer unterschiedlicher Ionenstärke dargestellt.

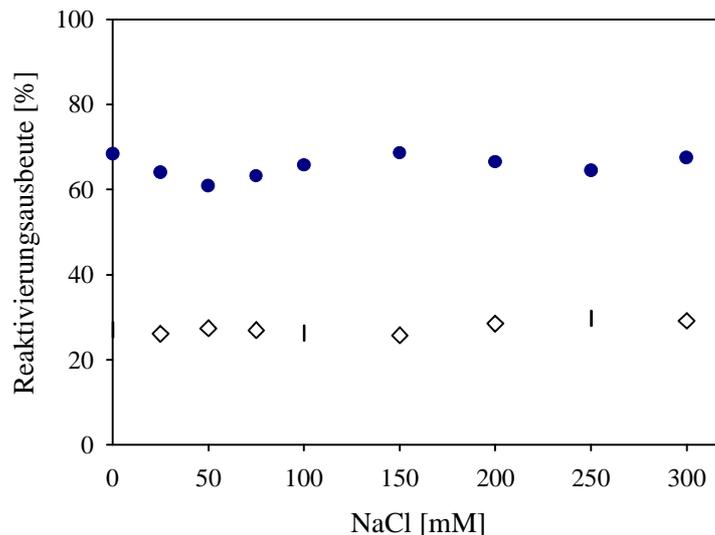


Abb. 3.2.2: Renaturierung von α -GlucE10C (●) und α -Gluc-WT (◇) in Lösung in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration. Die Denaturierung erfolgte in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7,6, 8 M Harnstoff, 2 mM DTT für 1 h bei Raumtemperatur. Die Renaturierung wurde durch 100fache Verdünnung der 1 mg/ml Stammlösung in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7,6 und 0 - 2 M NaCl initiiert. Die Ansätze wurden 24 h bei 10°C inkubiert.

Aus Abbildung 3.2.2. geht hervor, daß die Reaktivierung unabhängig von der Ionenstärke im Renaturierungspuffer ist. Während für α -GlucE10C Reaktivierungsausbeuten von ca. 60 % erreicht wurden, konnte α -Gluc-WT lediglich mit einer Ausbeute von etwa 30 % reaktiviert werden.

Matrix-unterstützte Reaktivierung von α -GlucE10C in Abhängigkeit von der Ionenstärke

Aus den Bindungsexperimenten war bekannt, daß die immobilisierte α -GlucE10C eine geringere enzymatische Aktivität hat als das freie Enzym. Ursache hierfür kann zum einen ein verändertes pH-Wert-Milieu in Matrixnähe sein oder die erschwerte Substratzugänglichkeit zum aktiven Zentrum. Für die Bestimmung der Renaturierungsausbeute im Matrix-gebundenen Zustand wurde daher die Aktivität in einem Ansatz des ebenfalls immobilisierten Enzyms, das unter identischen Bedingungen inkubiert, jedoch nicht denaturiert wurde, als Referenz verwendet.

Die Matrix-unterstützte Reaktivierung der α -GlucE10C wurde an allen vier zur Verfügung stehenden Gelmaterialien im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 250 mM NaCl untersucht. Dazu wurde das immobilisierte und mittels Harnstoff denaturierte Protein in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7,6 überführt und bei 10°C für 24 h - 48 h inkubiert.

In Abbildung 3.2.3 sind die Ausbeuten der Matrix-unterstützten Reaktivierung der α -GlucE10C in Abhängigkeit von der Natriumchloridkonzentration dargestellt. Da in Gegenwart von Fractogel TMAE keine signifikante Reaktivierung erfolgte, sind hier lediglich die Ergebnisse, die mit den drei anderen Gelmaterialien erzielt wurden, abgebildet.

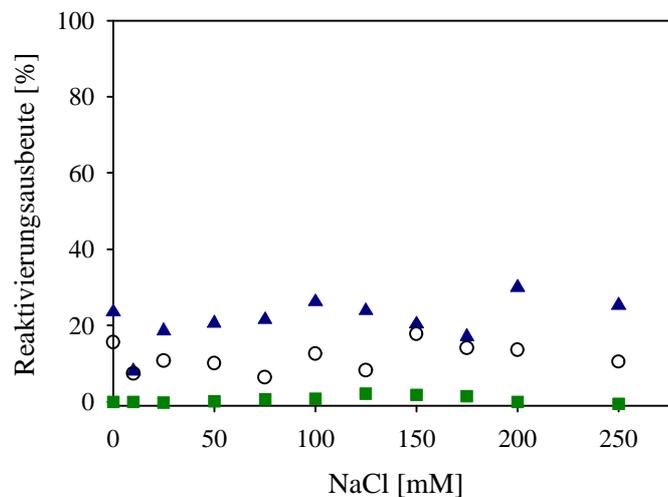


Abb. 3.2.3: Einfluß der Ionenstärke auf die Ausbeute der Matrix-unterstützten Reaktivierung von α -GlucE10C an drei unterschiedlichen Anionenaustauschermaterialien: (\blacktriangle) Fractoprep DEAE, (\circ) Q-Sepharose und (\blacksquare) Fractogel DEAE. Die Matrixbeladung lag bei 1 mg/ml. Zur Denaturierung wurden 8 M Harnstoff in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7,0 (1 h, Raumtemperatur) verwendet. Die Renaturierung erfolgte in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7,6 bei 10°C. Die enzymatische Aktivität wurde nach 24 h und 48 h bestimmt und wies keine signifikanten Unterschiede auf. Dargestellt sind die Reaktivierungsausbeuten nach 24 h.

Aus Abbildung 3.2.3 geht hervor, daß die Reaktivierung an den untersuchten Anionenaustauschern unabhängig von der Natriumchloridkonzentration im relevanten Konzentrationsbereich ist. Auffallend sind die hohen Reaktivierungsausbeuten von etwa 30 - 35 %, die mit Fractoprep DEAE erzielt wurden. Völlig ungeeignet für eine Matrix-unterstützte Reaktivierung von α -GlucE10C waren Fractogel DEAE (vgl. Abb. 3.2.3) und Fractogel TMAE (Daten nicht gezeigt).

Reaktivierungskinetik von immobilisierter α -GlucE10C an Fractoprep DEAE

Für die Reaktivierung des Wildtypproteins der α -Glucosidase und einiger C-terminal modifizierter Varianten lagen aus Arbeiten von Höll-Neugebauer (1992) Daten vor, nach denen die Reaktivierung der α -Glucosidase in Lösung bei Raumtemperatur nach etwa 3 h abgeschlossen ist. Unter Annahme einer Kinetik erster Ordnung der Faltung von α -Gluc-WT in Lösung liegt die Geschwindigkeitskonstante bei $6,33 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (25°C). Ähnliche Ergebnisse erzielte Stempfer (1995) mit einer α -Glucosidase Variante mit C-terminalem Hexaargininfusionspeptid. Dabei war die Reaktivierung in Gegenwart von Matrix (Heparin-Sepharose) um den Faktor 3 langsamer als die Reaktivierung des freien Enzyms.

Am Forschungsmuster Fractoprep DEAE wurde die Kinetik der Matrix-unterstützten Reaktivierung von α -GlucE10C untersucht. Dabei wurde eine Matrixbeladung von 1 mg/ml verwendet. Desweiteren wurde die Kinetik der Reaktivierung von α -GlucE10C in Lösung einer Proteinkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt. Die Bestimmung der Reaktivierungskinetik erfolgte in 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 1 mM EDTA, pH 7,6 bei 10°C . In Abb. 3.2.4 ist der zeitliche Verlauf der Reaktivierung von α -GlucE10C an Fractoprep DEAE bzw. in Lösung dargestellt. Unter Annahme einer Reaktion 1. Ordnung wurde die Geschwindigkeitskonstante k errechnet.

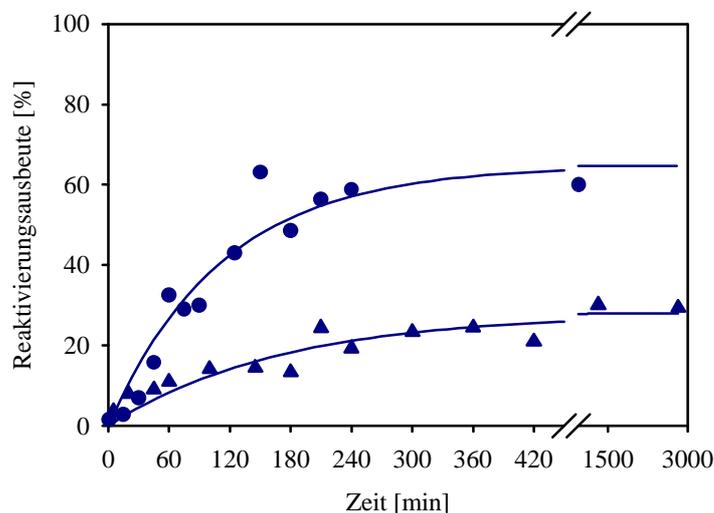


Abb. 3.2.4: Zeitlicher Verlauf der Reaktivierungsausbeute von α -GlucE10C in Lösung (●) bzw. immobilisiert an Fractoprep DEAE (▲) bei 10°C . Die Denaturierung erfolgte in 8 M Harnstoff, 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7,0 für 1 h bei Raumtemperatur. Zur Reaktivierung wurde das Protein in 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 1 mM EDTA, pH 7,6 überführt. Die Proteinkonzentration betrug 10 $\mu\text{g/ml}$, die Matrixbeladung 1 mg/ml. Unter Annahme einer Reaktion 1. Ordnung wurde für die Reaktivierung des freien Enzyms eine Geschwindigkeitskonstante k von $(1,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und für die des immobilisierten Enzyms von $(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ bestimmt.

Für die Reaktivierung der immobilisierten α -GlucE10C bei 10°C wurde eine Geschwindigkeitskonstante k von $(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und für die der freien α -GlucE10C eine Geschwindigkeitskonstante von $(1,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Unter gleichen Bedingungen wurde für die Reaktivierung der α -Gluc-WT in Lösung eine Geschwindigkeitskonstante von $(2,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ bestimmt (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, daß die Gegenwart der Matrix keinen Einfluß auf den Mechanismus der Reaktivierung von α -GlucE10C hat. Vermutlich erfolgt die Immobilisierung von α -GlucE10C an der Matrix ausschließlich über das Fusionspeptid. Neben dieser Ein-Punkt-Fixierung bestehen vermutlich keine signifikanten Wechselwirkungen zwischen der Matrix und dem Teil der Polypeptidkette, der das enzymatisch aktive Zentrum bildet. Diese würden die Reaktivierung beeinflussen.

Abhängigkeit der Reaktivierungsausbeute von der Proteinkonzentration bzw. der Matrixbeladung

Gemeinsames Ziel aller Matrix-unterstützten Verfahren zur Renaturierung von Proteinen ist die Vermeidung von Aggregation durch räumliche Trennung der zu faltenden Polypeptidketten. Die Ermittlung der optimalen Matrixbeladung ist daher von besonderem Interesse. Zu diesem Zweck wurde die Renaturierung von α -GlucE10C an den beiden Gelmaterialien Fractoprep DEAE und Q-Sepharose in Abhängigkeit von der Matrixbeladung analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.5 graphisch dargestellt. Ebenfalls abgebildet ist die Ausbeute von α -GlucE10C und α -Gluc-WT bei Reaktivierung in Lösung in Gegenwart unterschiedlicher Proteinkonzentrationen.

Erkennbar ist, daß die Reaktivierung durch Verdünnung bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ zu den höchsten Ausbeuten führt, während die Matrix-unterstützte Reaktivierung bei 100fach höheren Proteinkonzentrationen durchgeführt werden kann. Wiederum wird deutlich, daß die mit einem Decaglutaminsäurepeptid fusionierte α -Glucosidase in Lösung mit signifikant höheren Ausbeuten (ca. 2fach) reaktivierbar ist als das Wildtypprotein. Für eine Matrix-unterstützte Reaktivierung ist das Gelmaterial Fractoprep DEAE deutlich besser geeignet als Q-Sepharose. Verglichen mit der Reaktivierung in Lösung kann mit diesem Material etwa die 50fache Menge an aktivem Protein pro Volumeneinheit erhalten werden.

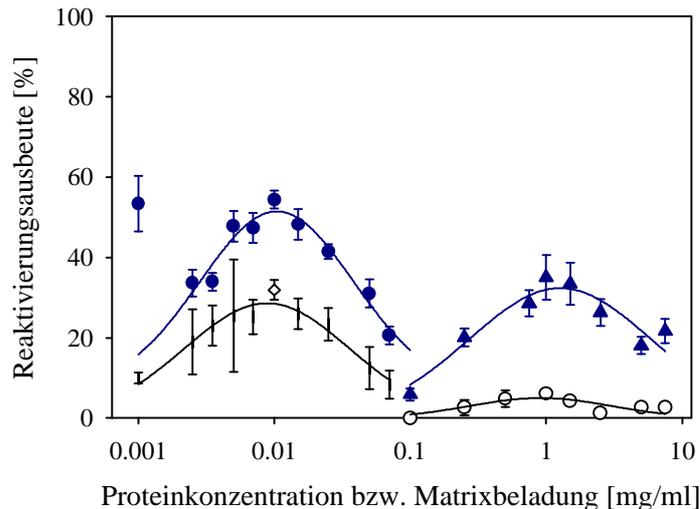


Abb. 3.2.5: Abhängigkeit der Reaktivierungsausbeute von der Matrixbeladung bzw. der Proteinkonzentration bei Renaturierung in Lösung. Die Denaturierung erfolgte in 8 M Harnstoff, 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7,0 für 1 h bei Raumtemperatur. Zur Reaktivierung wurde das Protein in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7,6 überführt. Dargestellt sind die Reaktivierungsausbeuten von α -GlucE10C (●) und α -Gluc-WT (◇) bei Reaktivierung in Lösung sowie von α -GlucE10C bei Reaktivierung an Fractoprep DEAE (▲) bzw. Q-Sepharose (○) nach 24 h bei 10°C. Alle Ansätze wurden als 4fach Bestimmungen durchgeführt und mit der Standardabweichung der experimentellen Daten vom Mittelwert versehen.

Die experimentellen Daten können mit einer Verteilungsfunktion beschrieben werden. Während für die Reaktivierung in Lösung die optimale Proteinkonzentration bei 10 μ g/ml liegt, ist die günstigste Matrixbeladung 1 mg/ml. Bei höheren Proteinkonzentrationen gewinnt die Aggregation als Konkurrenzreaktion zur Faltung an Bedeutung. Für die an der Matrix immobilisierten Proteine bedeutet dieses, daß benachbarte, sich faltende Polypeptidketten miteinander interagieren können.

Mit niedrigeren Proteinkonzentrationen sollten die Reaktivierungsausbeuten zunehmen oder zumindestens konstant bleiben, da die Wahrscheinlichkeit intermolekularer Wechselwirkungen abnimmt. Lediglich für die α -GlucE10C konnte während der Renaturierung in Lösung bei einer Proteinkonzentration von 1 μ g/ml eine dem Maximalwert entsprechende Ausbeute reproduzierbar ermittelt werden.

Vermutlich überwiegen bei geringeren Proteinkonzentrationen Adsorptionseffekte an die Gefäßoberflächen, so daß die effektive Proteinkonzentration deutlich vermindert ist. Diese unspezifischen Adsorptionseffekte können durch Absättigen der Oberflächen mit BSA verhindert werden (Stempfer, 1995). Im Fall der α -Gluc-Variante mit negativ geladenem Fusionspeptid wird möglicherweise die Adsorption durch elektrostatische Abstoßung verhindert.

Bei der Matrix-unterstützten Renaturierung ist bei niedrigen Beladungsdichten ein ähnlicher Effekt festzustellen. Möglicherweise wird Protein durch unspezifische Adsorption von Faltungsintermediaten an das Trägermaterial oder die Gefäßoberfläche der Reaktivierungsreaktion entzogen.

Die Matrix-unterstützte Renaturierung der α -GlucE10C wurde durch Bestimmung der Matrix-assoziierten Enzymaktivität quantifiziert. Es stellte sich allerdings heraus, daß das renaturierte, aktive Enzym nur partiell von der Matrix eluiert werden konnte. Durch Behandlung des Gelmaterials mit einer 1 M Natriumchloridlösung in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7,6 konnten von Fractoprep DEAE lediglich 20 % und von der Q-Sepharose 25 % der reaktivierten α -GlucE10C abgelöst werden. Unter gleichen Bedingungen konnte die Aktivität des nicht-denaturierten Proteins der jeweiligen Referenzansätze vollständig im Überstand nachgewiesen werden. Das legt die Vermutung nahe, daß während der Matrix-unterstützten Renaturierung Faltungsintermediate gebildet werden, die zwar enzymatisch aktiv sind, jedoch möglicherweise über hydrophobe Wechselwirkungen unspezifisch mit dem Trägermaterial interagieren. Daher wurden zur Elution des reaktivierten Proteins weitere Möglichkeiten analysiert. Die Kombination von 1 M Harnstoff und 1 M NaCl im Elutionspuffer bzw. die Behandlung mit einer 1 oder 2 M Arginin-Lösung führten zu keiner signifikanten Ablösung des Enzyms. Die Reaktivierung in Gegenwart von Ethylenglykol - eingesetzt im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 20 % - zur Verhinderung von unspezifischen, hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Trägermaterial hatte keinen Einfluß auf die Reaktivierungsausbeute. Die nachfolgende Elution in Gegenwart von 20 % Ethylenglykol und/oder 1 M NaCl führte zu keiner verbesserten Ablösung des reaktivierten Enzyms. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß die Matrix-unterstützte Renaturierung von α -GlucE10C zu einem signifikanten Anteil zu einer aktiven Struktur führt, die aber nicht identisch ist mit der nativen Konformation des Proteins.

3.3 Entwicklung einer Strategie zur Charakterisierung und Feinreinigung von Proteinen mit C-terminalen Fusionspeptiden - kovalente Affinitätschromatographie

Wie bereits beschrieben, konnten die geladenen Fusionspeptide erfolgreich für die Reinigung der jeweiligen Modellproteine mit Hilfe der entsprechenden Ionenaustauscher verwendet werden. Die Wechselwirkung mit einem entgegengesetzt geladenen Ionenaustauscher und der Nachweis der freien Cystein-Reste (incl. des endständigen Restes) waren erste Hinweise auf die Vollständigkeit des Fusionspeptides. Mit weiteren Methoden sollte die Identität von N- bzw. C-terminalem Fusionspeptid nachgewiesen werden.

Durch Untersuchungen von Stubenrauch *et al.* (1999) und Stubenrauch (2000) mit synthetischen Peptiden lagen Daten vor, die eine stabile ionische Wechselwirkung zwischen entgegengesetzt geladenen Peptiden der Sequenz ACK₈ und ACE₈ belegen und in einer kovalenten Verbrückung der beiden Peptide durch die angrenzenden Cystein-Reste resultiert. Dieses Prinzip der ionischen Wechselwirkung und kovalenten Verbrückung wurde im folgenden für die Entwicklung eines chromatographischen Nachweisverfahrens für Proteine mit polyionischen Fusionspeptiden verwendet.

Die Vorgehensweise berücksichtigt dabei folgende Teilaspekte:

- Herstellung und Charakterisierung des Chromatographiematerialies;
- Optimierung von Parametern zur effizienten kovalenten Verbrückung von Fusionsproteinen an den komplementär geladenen funktionellen Gruppen des Trägers über Thiol-Disulfid-Austausch und nachfolgende Elution;
- Anwendung auf die selektive Reinigung eines polyionischen Fusionsproteins aus einem Rohextrakt.

3.3.1 Herstellung und Charakterisierung des Chromatographiematerialies

Es wurden Lysinpeptide der Form AlaCysLys₈Ala an Bromcyan-aktivierte Sepharose *fast flow* gekoppelt. In Vorversuchen erwies sich dieses Trägermaterial als geeignet, da es keine Wechselwirkungen mit den zu reinigenden Proteinen und den zu koppelnden Peptiden aufwies. Zusätzlich wurden andere Trägermaterialien für eine mögliche Kopplung von polyionischen Peptiden untersucht. Insbesondere Matrices, die eine aktivierte Gruppe am Ende eines hydrophilen Linkers bestehend aus 6-Aminohexansäure (EAH-Sepharose) enthielten,

schieden für weitere Anwendungen aus. Dieses Matrixmaterial interagiert mit den zu charakterisierenden Modellproteinen, die negativ geladene Fusionspeptide enthielten.

Während der Kopplungsreaktion von ACK8A an CNBr-Sepharose war die Thiol-Gruppe des Cystein-Restes durch eine *S-tert*-Butylgruppe blockiert, die nachfolgend durch Behandlung mit DTT abgespalten wurde. Die eigentliche Kopplungsreaktion erfolgte zwischen einer primären Amino-Gruppe der Peptide und den Imidocarbonat-Gruppen der aktivierten Matrix. Zur Bestimmung der Kopplungseffizienz wurde die Menge an freiem Peptid nach der Reaktion mittels Ionenaustauschchromatographie quantifiziert. Die Kopplung erfolgte quantitativ. Damit ergibt sich eine Dichte der Lysinpeptide von 220 nmol/ml Gelmatrix. Bezogen auf die zu untersuchenden Proteine könnten demnach theoretisch 15,2 mg α -GlucE10C bzw. 11 mg FabE10C pro ml Gelmaterial immobilisiert werden.

Zunächst wurde das Matrixmaterial hinsichtlich des Bindungsverhaltens und der Kapazität für α -GlucE10C charakterisiert. Dabei wurde das Gelmaterial zunächst nur als Ionenaustauscher verwendet, so daß die Experimente unter reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von 10 mM DTT durchgeführt wurden.

Das Gelmaterial wurde in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 7,5 äquilibriert und mit 1 mg α -GlucE10C/ml beladen. Nach Inkubation für 16 h bei 4°C wurde der Überstand nach Bindung abgenommen und auf α -Glucosidase-Aktivität untersucht. Dabei befanden sich ca. 40 % der eingesetzten Aktivität im Überstand. Die immobilisierte α -GlucE10C wurde in Gegenwart von 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 7,5 und unterschiedlichen Konzentrationen von Natriumchlorid im Bereich zwischen 0 und 500 mM für 4 h bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurde die enzymatische Aktivität der Matrixsuspension und des Überstandes bestimmt. Daraus wurde die relative Aktivität des immobilisierten und freien Enzyms in Abhängigkeit von der Natriumchloridkonzentration ermittelt (Abb. 3.3.1).

Aus Abbildung 3.3.1 ist ersichtlich, daß die Ablösung des Enzyms zum Teil schon bei sehr geringen Salzkonzentrationen erfolgt. In Gegenwart von 150 mM NaCl ist unter den vorliegenden Versuchsbedingungen bereits eine vollständige Ablösung von α -GlucE10C festzustellen. Die Auswertung der experimentellen Daten mit Hilfe der Hill-Gleichung (vgl. Abschnitt 2.2.6) resultiert in einer Kooperativitätskonstante von $5,1 \pm 0,9$. Wenn man davon ausgeht, daß die Kooperativitätskonstante die Anzahl der monovalenten Gegenionen angibt, die für eine vollständige Ablösung des Peptides von der Matrix erforderlich ist, so sind an der Wechselwirkung zwischen den Fusionspeptiden und den Lysinpeptiden jeweils maximal 5-6 entgegengesetzte Ladungen beteiligt.

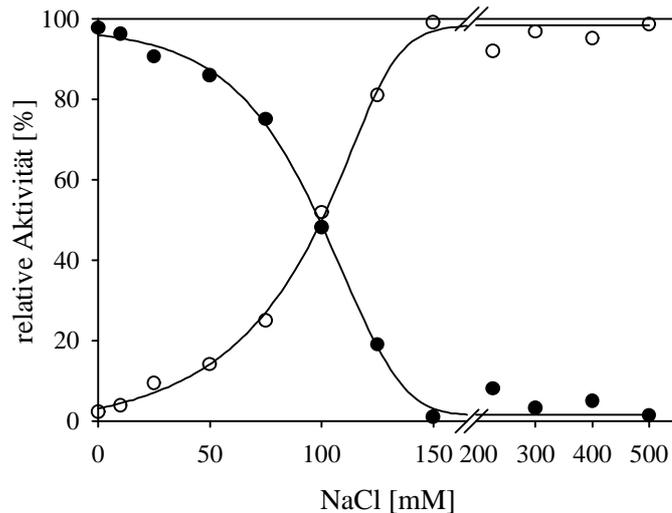


Abb. 3.3.1: Bindung von α -GlucE10C an Sepharose-ACK8A in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration. Zur Bindung wurde die Matrix in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,5 äquilibriert, mit 1 mg/ml beladen und 16 h bei 4°C inkubiert. Der Überstand nach Bindung wurde entfernt und auf enzymatische Aktivität untersucht. Die Elution erfolgte mit 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 7,5 und unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen. Nach 4 h bei 4°C wurde die Aktivität des freien (○) und immobilisierten (●) Enzyms bestimmt.

Neben der Bindung von α -GlucE10C an die Sepharose-ACK8A war die Kapazität des Gelmaterials von Interesse. Dazu wurden Untersuchungen zur Ermittlung der maximalen Beladungsdichte mit α -GlucE10C unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Zur Bindung wurden gleiche Volumina Gelmaterial mit unterschiedlichen Mengen α -GlucE10C (im gleichen Endvolumen) in Gegenwart von 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 7,5 bei 4°C für 16 h inkubiert. Nachfolgend wurde die α -Glucosidaseaktivität der Matrixsuspension und des Überstandes bestimmt. Im Gegensatz zum Anionenaustauschermaterial Fractoprep DEAE war die enzymatische Aktivität des an Sepharose-ACK8A immobilisierten Enzyms mit der des freien Enzyms identisch. Somit konnte aus der Differenz der enzymatischen Aktivität der Suspension und des Überstandes, unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität, die Menge an immobilisierter α -GlucE10C berechnet werden (Abb. 3.3.2).

Aus Abbildung 3.3.2 geht hervor, daß die maximale Kapazität der Sepharose-ACK8A für α -GlucE10C 0,75 mg/ml beträgt. Das entspricht etwa 12 nmol 10er Glutamatpeptid/ml Matrix. Die tatsächliche ionische Kapazität ist mit 120 nmol negativen Ladungen/ml Matrix somit um den Faktor 13 geringer als der theoretische Wert von 1540 nmol/ml Matrix. Dieser wurde unter der Annahme einer quantitativen Kopplung der 8er-Lysinpeptide über lediglich eine Aminofunktion ermittelt (220 nmol ACK8A mit effektiv maximal 7 positiven Ladungen/ml). Hierbei wurde berücksichtigt, daß die formale positive Ladung der 8er Lysinpeptide durch die

negative Ladung des Carboxylendes verringert wird. Zusätzlich wäre noch die negative Ladung durch partielle Deprotonierung des Cystein-Restes miteinzubeziehen.

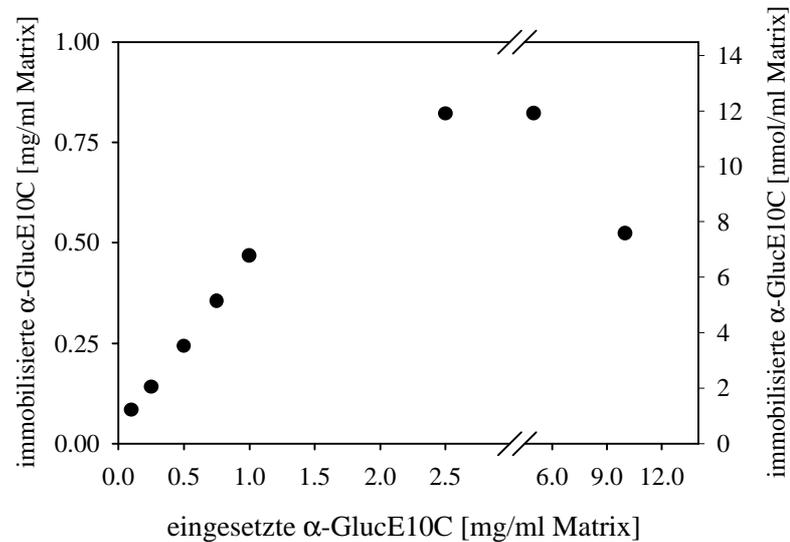


Abb. 3.3.2: Kapazität der Sepharose-ACK8A für α -GlucE10C. Die Bindung wurde in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 7,5 für 16 h bei 4°C durchgeführt. Nachfolgend wurde die enzymatische Aktivität des Überstandes und der Matrixsuspension bestimmt und der Anteil des immobilisierten Enzyms errechnet.

Erklärungsmöglichkeiten für die Diskrepanz zwischen der experimentell ermittelten ionischen Kapazität und dem theoretischen Wert sind zum einen die Fixierung der Peptide über mehr als eine primäre Aminogruppe, zum anderen aber auch die sterische Unzugänglichkeit der Peptide im Inneren des Gelmaterials, die unmittelbar an das Trägermaterial gekoppelt sind.

Neben den Eigenschaften des Gelmaterials als Ionenaustauscher war die zweite Funktion die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen immobilisiertem Peptid und Fusionsprotein von Interesse. Diese Untersuchungen zur ionischen Wechselwirkung und kovalenten Verbrückung wurden im kontinuierlichen Betrieb durchgeführt.

3.3.2 Entwicklung der Methode der kovalenten Affinitätschromatographie

Das Prinzip, durch einen Thiol-Disulfid-Austausch ein Protein an einem Trägermaterial reversibel kovalent zu immobilisieren, wurde erstmals 1973 von Brocklehurst *et al.* verwendet und als kovalente Chromatographie bezeichnet. Hierbei werden die Thiolgruppen des Trägermaterials zunächst aktiviert und reagieren nachfolgend mit freien Cystein-Resten der zu reinigenden Proteine. Die Aktivierung erfolgt in der Regel mit Dithiopyridin oder DTNB.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden die Cystein-Reste des Trägermaterials mit oxidiertem Glutathion umgesetzt. Dazu wurde das Gelmaterial zunächst mit DTT (100 mM in 100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 6 M Guanidiniumhydrochlorid, pH 8,5) behandelt. Nachfolgend wurden die Cystein-Reste durch Reaktion mit oxidiertem Glutathion (100 mM in 100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 6 M Guanidiniumhydrochlorid, pH 8,5) in gemischte Disulfide überführt. Die Vorbereitung des Säulenmaterials für die kovalente Kopplung wurde im kontinuierlichen Betrieb durchgeführt. Dazu wurde eine Chromatographiesäule mit 2 ml Gelmaterial gepackt.

Die in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,5 äquilibrierte Chromatographiesäule wurde bei einer linearen Flußgeschwindigkeit von 150 mm/h mit dem zu analysierenden Protein beladen. Die dabei verwendeten Proteinproben α -GlucE10C bzw. FabE10C waren von höchster Reinheit.

Nach Beladung der Säule mit dem jeweiligen Protein erfolgte die Inkubation bei 4°C bei einer Flußrate von 0,2 ml/min (150 mm/h) für 16 h unter Rezirkulation des Eluenten. In dieser Zeit erfolgte durch Thiol/Disulfid-Austausch die kovalente Kopplung des über ionische Wechselwirkungen am Träger immobilisierten Proteins. Zur Quantifizierung des Proteins, das ausschließlich über ionische Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial interagiert, und des Proteins, das kovalent gebunden war, wurden nacheinander zwei unterschiedliche Varianten der Elution durchgeführt. Zunächst erfolgte die Elution unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einem linearen Gradienten von 0 auf 500 mM Natriumchlorid in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,5 über 15 Säulenvolumen. Nach einem Waschschrift in Gegenwart von 1,5 M NaCl wurde die Säule in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,5 reäquilibriert. Anschließend wurde die Elution unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden der Äquilibrierungspuffer und der Hochsalzpuffer mit L-Cystein in einer Endkonzentration von 25 mM im Fall der α -GlucE10C bzw. 10 mM zur Elution des Fab-Fragmentes versetzt. Zusätzlich wurde im Fall der α -GlucE10C ein 50 mM DTT-Puls, bei FabE10C ein 10 mM DTT-Puls bei niedriger Ionenstärke verwendet. Dadurch sollte die Disulfidbrücke zwischen den Peptiden der Matrix und dem Fusionsprotein reduziert werden. Unter reduzierenden Bedingungen (25 mM bzw. 10 mM L-Cystein) erfolgte dann die Elution des kovalent immobilisierten Proteins in einem linearen Salzgradienten von 0 auf 500 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,5 über 15 Säulenvolumen. In Abbildung 3.3.3 sind die einzelnen Schritte zur Konditionierung der Chromatographiesäule und die nachfolgenden Elutionsschritte zusammengestellt.

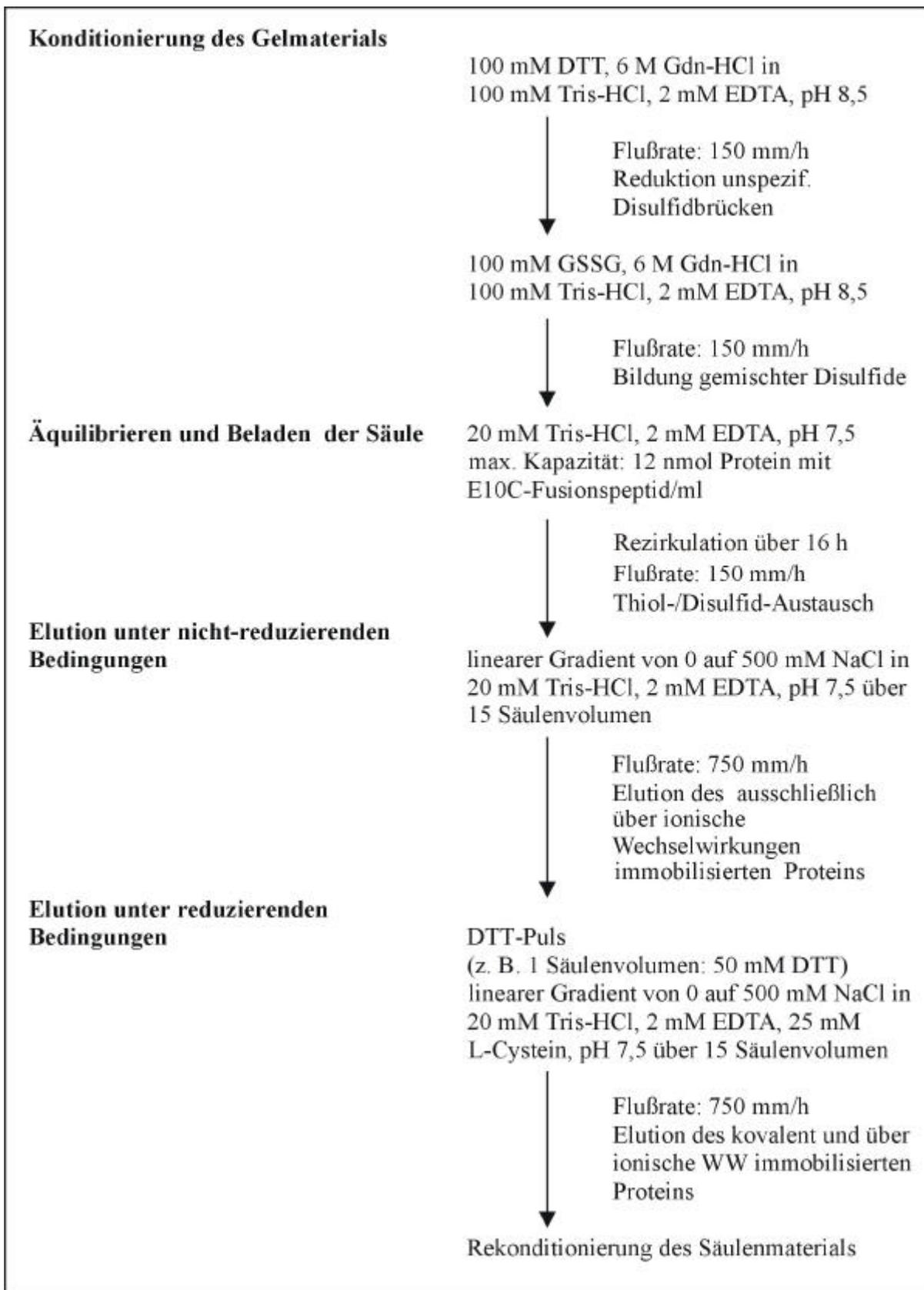


Abb. 3.3.3: Verfahrensschema der kovalenten Affinitätschromatographie an Sepharose-ACK8A

In Abbildung 3.3.4 ist exemplarisch die Analyse von gereinigter α -GlucE10C mittels kovalenter Affinitätschromatographie dargestellt.

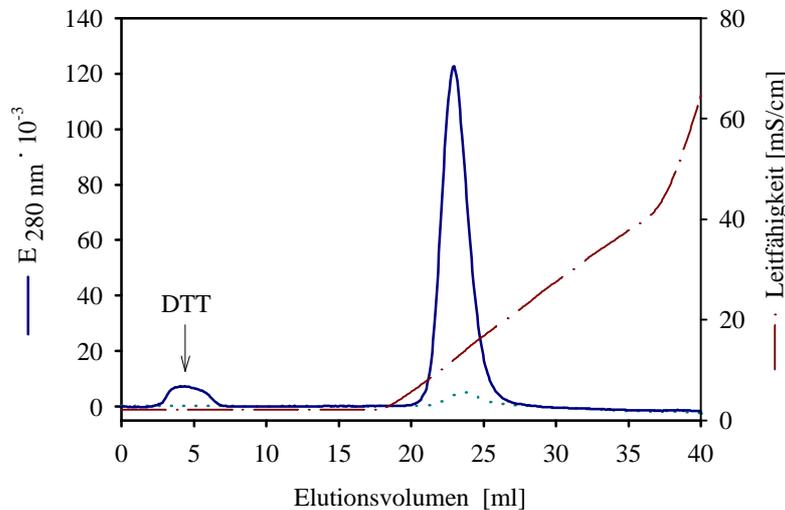


Abb. 3.3.4: Elutionsprofile der Analyse von α -GlucE10C mittels kovalenter Affinitätschromatographie an Sepharose-ACK8A unter nicht-reduzierenden (·····) bzw. unter reduzierenden Bedingungen (—) in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA +/- 25 mM L-Cystein, pH 7,5. Die Beladung der Säule war 0,5 mg/ml, die Flußrate 1 ml/min (750 mm/h). Erkennbar ist die geringe Absorption des DTT bei Elution unter reduzierenden Bedingungen (2 ml Puls mit 50 mM DTT in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,5).

Bei Beladung der Säule mit 0,5 mg Protein/ml erfolgte die quantitative Adsorption des Proteins an das Säulenmaterial über ionische Wechselwirkungen. Zur Ausbildung der kovalenten Verbrückung wurde das immobilisierte Protein 16 h bei 4°C unter geringer linearer Flußgeschwindigkeit (150 mm/h) mit Äquilibrierungspuffers inkubiert. Die Elution unter nicht-reduzierenden Bedingungen führte zur Ablösung des ausschließlich über ionische Wechselwirkungen immobilisierten Proteins bei einer Leitfähigkeit des Eluenten von 12,5 mS/cm. Das entspricht einer Natriumchloridkonzentration von ca. 140 mM. Unter diesen Bedingungen eluierten 4,5 % des aufgetragenen Proteins. Unter reduzierenden Bedingungen erfolgte die Elution des kovalent immobilisierten Proteins (95,1 % des aufgetragenen Proteins) ebenfalls bei einer Leitfähigkeit des Eluenten von 12,5 mS/cm. Das deutet darauf hin, daß unter den gewählten Bedingungen die ausgebildete Disulfidbrücke vollständig reduziert wurde, so daß die Wechselwirkung mit dem Chromatographiematerial ausschließlich über ionische Interaktion erfolgt.

Der Anteil des über ionische Wechselwirkungen immobilisierten und des kovalent immobilisierten Proteins wurde zum einen über Proteinbestimmung, zum anderen über Aktivitäts- bzw. Funktionalitätsbestimmung ermittelt. Die Ergebnisse sind für α -GlucE10C, FabE10C und α -Gluc-WT in Tabelle 3.3.1 zusammengestellt.

Tabelle 3.3.1: Analyse von α -GlucE10C, FabE10C und α -Gluc-Wildtypprotein mittels kovalenter Affinitätschromatographie an Sepharose-ACK8A. Die Chromatographiesäule (Säulenvolumen: 2 ml) wurde mit jeweils 1 mg α -GlucE10C, 500 μ g FabE10C oder 1 mg α -Gluc-WT beladen. Die Funktionalität der α -Glucosidase-Varianten und des Antikörperfragmentes wurde mittels enzymatischer Aktivität bzw. mittels ELISA bestimmt. Prozentuale Angaben beziehen sich auf die eingesetzte Proteinmenge bzw. -aktivität.

Chromatographie- schritt	α -GlucE10C		FabE10C		α -Gluc-WT (Negativ-Kontrolle)	
	Protein [%]	Aktivität [%]	Protein [%]	Aktivität [%]	Protein [%]	Aktivität [%]
Verlust bei Beladung	0	0	0	0	88,0	92
Elution unter nicht- reduzierenden Bedingungen [*]	4,5	4,5	1,9	2,2	5,2	0,5
DTT-Puls ^{**}	0	0	0	0	0	0
Elution unter reduzierenden Bedingungen ^{***}	95,1	96,5	64,1	61,3	0	0
Wiederfindungsrate						
insgesamt	99,6	101,0	66,0	63,5	93,2	92,5

* ausschließlich über ionische Wechselwirkungen immobilisiertes Protein

** kovalent immobilisiertes Protein ohne Beteiligung ionischer Wechselwirkungen

*** kovalent immobilisiertes Protein nach gerichteter Assoziation

Aus Tabelle 3.3.1 geht hervor, daß die kovalente Affinitätschromatographie zur Charakterisierung von Proteinen mit C-terminalem Fusionspeptid geeignet ist. Insbesondere ist ersichtlich, daß die α -Glucosidase-Variante α -GlucE10C zu etwa 95 % ein vollständiges Fusionspeptid enthält, daß zur gerichteten Assoziation und kovalenten Verbrückung verwendet werden kann. Die gute Korrelation zwischen Wiederfindungsrate für das Protein und die enzymatische Aktivität sind Belege dafür, daß die vorübergehende kovalente Immobilisierung des Proteins nicht zu Konformationsänderungen führt, die die enzymatische Aktivität beeinflussen. Analoges gilt für die Funktionalität des Antikörperfragmentes. Diese wird durch die kurzzeitige Inkubation in Gegenwart von 10 mM L-Cystein nur unwesentlich beeinträchtigt.

Mittels SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen konnte gezeigt werden, daß die interchenare Disulfidbrücke erhalten bleibt bzw. während der Dialyse zum Entfernen des Reduktionsmittels reoxidiert wird (Daten nicht gezeigt). Auffallend im Vergleich zur α -Glucosidase ist die geringe Wiederfindungsrate von Protein und Aktivität von 66 % bzw. 63,5 %. Dieses ist möglicherweise auf unspezifische Wechselwirkungen des Antikörperfragmentes mit dem Trägermaterial Sepharose zurückzuführen. Ähnliche Wiederfindungsraten wurden bei der Aufreinigung des Retentates von FabE10C an Resource Q beobachtet. Im Rahmen der Regenerierung des Säulenmaterials in Gegenwart von 6 M Guanidiniumhydrochlorid und 100 mM DTT wird dieses Protein entfernt.

In Kontrollexperimenten, in denen das Wildtypprotein der α -Glucosidase mittels kovalenter Affinitätschromatographie untersucht wurde, waren 92 % der aufgetragenen Aktivität (Beladung mit 0,5 mg/ml) bereits im Durchlauf enthalten. Nach Elution unter reduzierenden Bedingungen konnte kein unspezifisch kovalent immobilisiertes Enzym nachgewiesen werden.

Anwendung auf die spezifische Reinigung von α -GlucE10C aus dem Rohextrakt

Nachdem gezeigt wurde, daß die kovalente Affinitätschromatographie für die Charakterisierung und Feinreinigung von Proteinen mit C-terminalem polyanionischen Fusionspeptid geeignet ist, sollte ihr Potential für eine spezifische Reinigung der α -GlucE10C aus einem *E. coli*-Rohextrakt untersucht werden.

Dazu wurde ein Rohextrakt, wie im Abschnitt 2.2.4.8 beschrieben, hergestellt und mit Benzonase vorbehandelt. Die Säule wurde mit 40 mg Gesamtprotein, das 1,25 % (500 μ g) α -GlucE10C enthielt, in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 10 mM EDTA, pH 6,8 beladen. Die Beladung erfolgte bei pH 6,8, um zu vermeiden, daß Fremdproteine an das Säulenmaterial binden und somit die Kapazität verringern. Anschließend erfolgte ein Pufferwechsel und pH-Shift von 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 10 mM EDTA, pH 6,8 auf 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,5. Die kovalente Affinitätschromatographie wurde unter den oben dargestellten Bedingungen durchgeführt. In Abb. 3.3.5 sind die Elutionsprofile der Chromatographie unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen dargestellt.

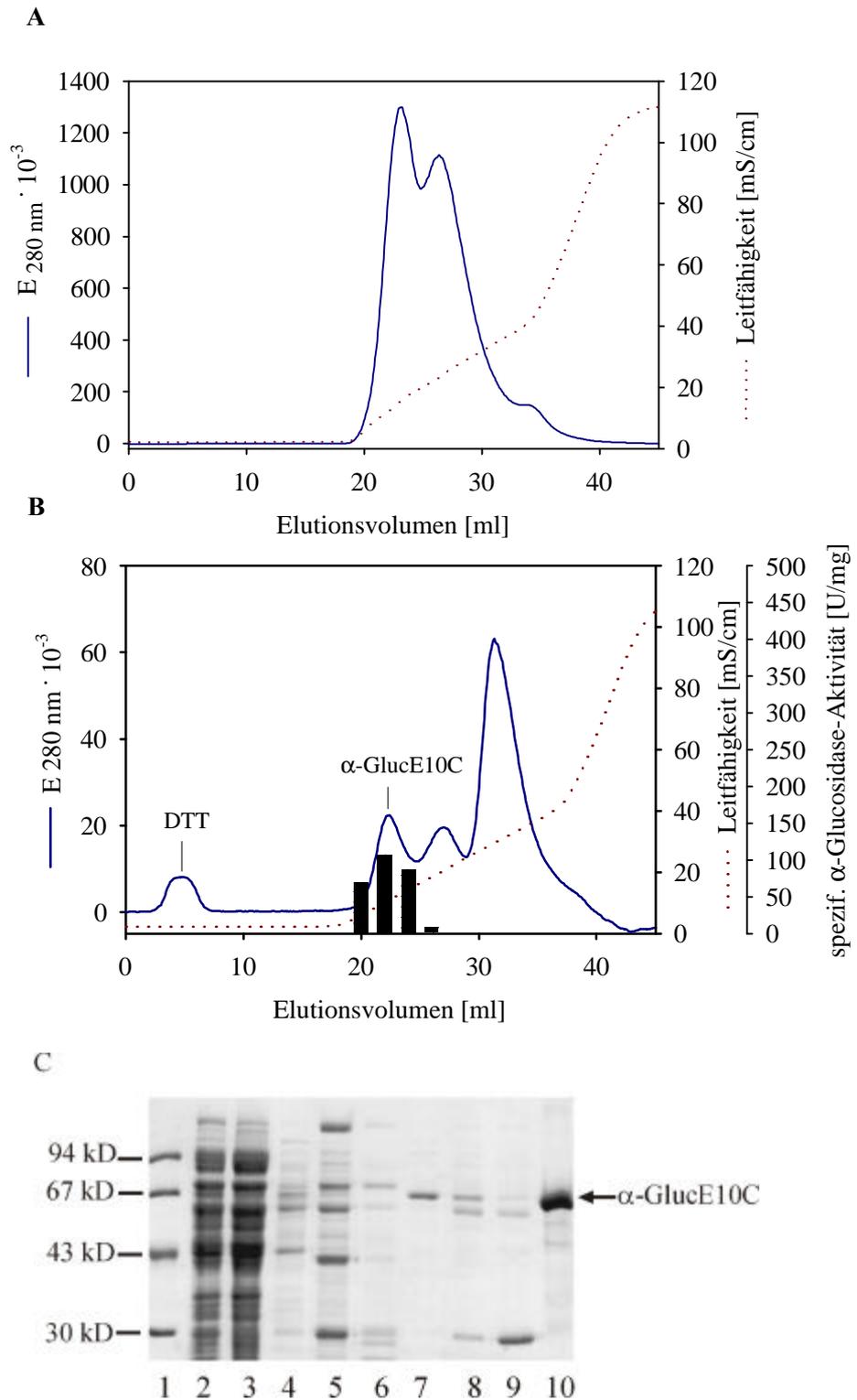


Abb. 3.3.5: Aufreinigung von α -GlucE10C aus einem *Escherichia coli* Rohextrakt an Sepharose-ACK8A. **A.** Chromatogramm der Elution unter nicht-reduzierenden Bedingungen. **B.** Chromatogramm der Elution unter reduzierenden Bedingungen. **C.** 10%iges Gel nach SDS-PAGE zur Analyse der eluierten Proteine (Coomassie-Färbung). (1) Proteinmarker, (2) aufgetragener Rohextrakt, (3) Durchlauf, (4) Eluat bei pH-Shift von pH 6,8 auf 7,5, (5) und (6) Eluat unter nicht-reduzierenden Bedingungen, (7) Eluat unter reduzierenden Bedingungen mit höchster spezifischer α -Glucosidase-Aktivität, (8) und (9) Eluat bei höherer Ionenstärke unter reduzierenden Bedingungen, (10) α -Glucosidase-Wildtypprotein, Marker

Aus Abbildung 3.3.5 A-C geht hervor, daß α -GlucE10C mittels kovalenter Affinitätschromatographie prinzipiell aus einem *E. coli*-Rohextrakt isoliert werden kann. Die Zunahme der spezifischen Aktivität von 1,47 U/mg im Rohextrakt auf 107 U/mg nach Elution unter reduzierenden Bedingungen entspricht einem Aufreinigungsfaktor von 73 nach einer Einzschritt-Reinigung. Allerdings ist die Kapazität der Chromatographiesäule vermutlich durch Belegung mit DNA-Fragmenten vermindert, so daß 73,6 % der aufgetragenen α -Glucosidase-Aktivität im Durchlauf zu finden sind, während lediglich 22,1 % des enzymatisch aktiven Proteins kovalent an das Gelmaterial gekoppelt wurden. Die Interaktion von DNA-Fragmenten mit den immobilisierten Lysinpeptiden ist stärker als die der Deca-glutamafusionspeptide. Desweiteren ist auffallend, daß neben der Kopplung von α -GlucE10C über das Fusionspeptid weitere Proteine kovalent an den Träger gebunden werden. Vermutlich handelt es sich hierbei um DNA-bindende Proteine mit freien Cystein-Resten. Diese eluieren aufgrund der stärkeren Interaktion der DNA mit dem Trägermaterial erst bei höheren Ionenstärken unter reduzierenden Bedingungen. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der hohen enzymatischen Aktivität des Durchlaufs neben der Überladung der Säule wäre der proteolytische Abbau des gesamten C-terminalen Fusionspeptides. Dieser ist jedoch auszuschließen, da nach Rechromatographie des im Durchlauf enthaltenen Proteins an einem konventionellen Anionenaustauscher (POROS[®] HQ) das Protein bei hoher Ionenstärke eluiert werden konnte.

Im Anschluß an die Auftrennung des *E. coli*-Rohextraktes an der kovalenten Affinitätschromatographiesäule wurde die Rekonditionierung durchgeführt und nochmals gereinigte α -GlucE10C analysiert. Bei einer Beladung von 0,5 mg/ml wurde die α -GlucE10C quantitativ am Träger immobilisiert. Das deutet darauf hin, daß die Lysinpeptide des Gelmaterials nicht durch Proteasen des Rohextraktes abgebaut wurden.

Die gleiche Strategie wurde zur Entwicklung einer kovalenten Affinitätsmatrix zur Reinigung von Proteinen mit polykationischem Fusionspeptid verwendet. Dazu wurden Peptide der Form ACE10A über primäre Aminogruppen an Bromcyan-aktivierte Sepharose gekoppelt. Eine Charakterisierung erfolgte mit polyionischen, synthetischen Lysinpeptiden mit 6, 8 und 10 Lysin-Resten, jedoch ohne zusätzlichen Cystein-Rest. Die Aufreinigung der N-terminal modifizierten α -Glucosidase R10C- α -Gluc war jedoch nicht möglich. Die gleiche Charge des Rohextraktes konnte an einem starken Kationenaustauscher unter den in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Bedingungen gereinigt werden. Es ist zu vermuten, daß die Interaktion des polykationischen Fusionspeptids mit dem Phosphatgruppen von DNA-Fragmenten stärker ist

als die mit den ACE10-Peptiden des Gelmaterials. Im vorangegangenen Abschnitt wurde bereits die stabile Interaktion zwischen DNA-Fragmenten und immobilisierten Lysinpeptiden mit 7 positiven Nettoladungen beschrieben. Die kommerziellen Kationenaustauschermaterialien mit einer ionischen Kapazität im Bereich von 140 $\mu\text{mol/ml}$ wirken als Kompetitoren der DNA-Decaarginin-Wechselwirkung und führen zur Verdrängung von DNA-Fragmenten (elektrostatische Abstoßung). Dadurch ist eine Immobilisierung von Proteinen mit positiv geladenen Fusionspeptiden und nachfolgende kontrollierte Elution möglich. Zusätzlich wurde mit gereinigter R10C- α -Gluc beobachtet, daß zwar eine Immobilisierung über ionische Wechselwirkungen möglich war, jedoch keine kovalente Verbrückung festgestellt werden konnte. Möglicherweise ist aufgrund sterischer Hinderung die Ausbildung der Disulfidbrücke erschwert oder die Reaktivität des Cysteins in unmittelbarer Nachbarschaft zur N-terminalen Sequenz der α -Glucosidase herabgesetzt.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelte Methode der kovalenten Affinitätschromatographie an Sepharose-ACK8A eignet sich für die Feinreinigung und Charakterisierung von Proteinen mit polyanionischen Fusionspeptiden. Eine spezifische Aufreinigung eines Proteins mit polyanionischem Fusionspeptid aus einem Rohextrakt konnte prinzipiell gezeigt werden. Die Anwendung im präparativen Maßstab ist zur Zeit aufgrund der geringen ionischen Kapazität des zu Verfügung stehenden Gelmaterials nicht möglich.

3.4 Bildung eines Antikörperfragment-Enzym-Konjugates durch gerichtete Assoziation und kovalente Verknüpfung mittels polyionischer Fusionspeptide

Ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Doktorarbeit war die Anwendung der polyionischen Fusionspeptide als neuartige Heterodimerisierungsmotive.

Stubenrauch (2000) untersuchte die gerichtete Assoziation und kovalente Verbrückung synthetischer, komplementär geladener, polyionischer Peptide der Sequenz ACK₈ und ACE₈, die einen zusätzlichen Cystein-Rest enthielten. Bei niedrigen Ionenstärken und in Gegenwart eines *oxidoshuffling*-Systems wurden diese quantitativ zu Heterodimeren umgesetzt. Selbst unter leicht reduzierenden Bedingungen konnte eine bevorzugte Heterodimerisierung der Peptide nachgewiesen werden. Aus den vorhandenen Daten konnte die Stabilität der ionischen Wechselwirkung der synthetischen Peptide in Gegenwart eines Redoxsystemes ermittelt

werden. Diese wird durch einem $\Delta G^{0'}$ -Wert von etwa 6 kcal./mol charakterisiert (Richter *et al.*, 2001).

Im folgenden sollte das von Stubenrauch *et al.* (1999) vorgestellte Prinzip auf die Heterodimerisierung von Proteinen übertragen werden. Bei der Untersuchung der gerichteten Assoziation und kovalenten Verbrückung von Proteinen mit Hilfe polyionischer Fusionspeptide waren folgende Aspekte von besonderem Interesse:

- Optimierung der Assoziationsreaktion (bezüglich Redoxbedingungen und Reaktionszeit);
- die Spezifität der Interaktion;
- die Stabilität der gebildeten Assoziate unter Redoxbedingungen;
- die biophysikalische Charakterisierung der Assoziationsprodukte;
- die Funktionalität der Einzelkomponenten im konjugierten Zustand.

3.4.1 Optimierung der Assoziationsreaktion

Zunächst wurden die Bedingungen für eine bevorzugte Heterodimerisierung und kovalente Verbrückung bezüglich Redoxsystem und Reaktionszeit optimiert.

Hierzu wurde die Assoziationsreaktion zweier Proteine mit komplementär geladenen Fusionspeptiden in Gegenwart unterschiedlicher Verhältnisse von reduziertem und oxidiertem Glutathion durchgeführt und die Ausbeute an disulfidverbrücktem Konjugat mittels SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen bestimmt. In diesen Versuchen wurden die Fab-Fragmente mit positiv geladenem (FabR10C) und negativ geladenem Fusionspeptid (FabE10C) verwendet. Der Nachweis erfolgte mittels immunologischer Detektion nach Western Blot (Daten nicht gezeigt). Während unter reduzierenden Bedingungen GSH : GSSG = 5 : 1 (2,4 mM : 0,6 mM) und in Gegenwart äquimolarer Konzentrationen an reduziertem und oxidiertem Glutathion (1,5 mM) keine kovalent verbrückten Fragmente nachweisbar waren, konnten in Gegenwart von 2,4 mM GSSG und 0,6 mM GSH disulfidverbrückte Fragmente detektiert werden. Die gebildete Disulfidbrücke konnte durch Zugabe von reduzierenden Agentien wie Dithiotreitol (DTT) reduziert werden. In weiteren Experimenten wurden für die kovalente Verknüpfung zweier Proteine mittels polyionischer Fusionspeptide 2,4 mM GSSG und 0,6 mM GSH verwendet. Diese Redoxbedingungen ($[GSH]^2/[GSSG] = 1,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) waren auch für die Renaturierung des Fab-Fragmentes geeignet (vgl. Abschnitt 3.1.1), so daß die intrachenaren und interchenaren Disulfidbrücken des Antikörperfragmentes unter den gewählten Bedingungen stabil sein sollten.

Um ein Konstrukt mit zwei unterschiedlichen, einfach nachzuweisenden Funktionen zu erhalten, wurden alle weiteren Untersuchungen der gerichteten Assoziation und kovalenten Verknüpfung von Proteinen mit Hilfe des FabE10C-Fragmentes und einer der beiden α -Glucosidase-Varianten mit N- bzw. C-terminalem Decaargininfusionspeptid R10C- α -Gluc bzw. α -GlucR10C durchgeführt.

Die Bildung von Fab-Fragment-Enzym-Konjugaten erfolgte in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2,4 mM GSSG, 0,6 mM GSH, pH 7,5. Für den Thiol-Disulfid-Austausch sind pH-Werte ab pH 7,5 geeignet. Kinetisch günstiger sind höhere pH-Werte im Bereich von pH 8,5 bis 9,5, da hier die Thiolgruppe des Nucleophils weitgehend deprotoniert ist. Bei diesen pH-Werten ist die α -Glucosidase allerdings nicht stabil. Die Ansätze wurden zunächst 16 h bei 20°C inkubiert. Die Analytik erfolgte entweder mittels SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen nach Blockierung der freien Cystein-Reste mit Iodacetamid oder mittels Gelfiltration. In Abb. 3.4.1 A ist ein 10%iges SDS-Gel des Assoziationsansatzes von FabE10C mit R10C- α -Gluc nach Coomassie-Färbung dargestellt. Das Antikörperfragment und das Enzym wurden im Assoziationsansatz in äquimolaren Konzentrationen von 1 μ M eingesetzt. Abb 3.4.1 B kann das Absorptionsprofil der densitometrischen Auswertung von Bahn 2 der SDS-PAGE entnommen werden.

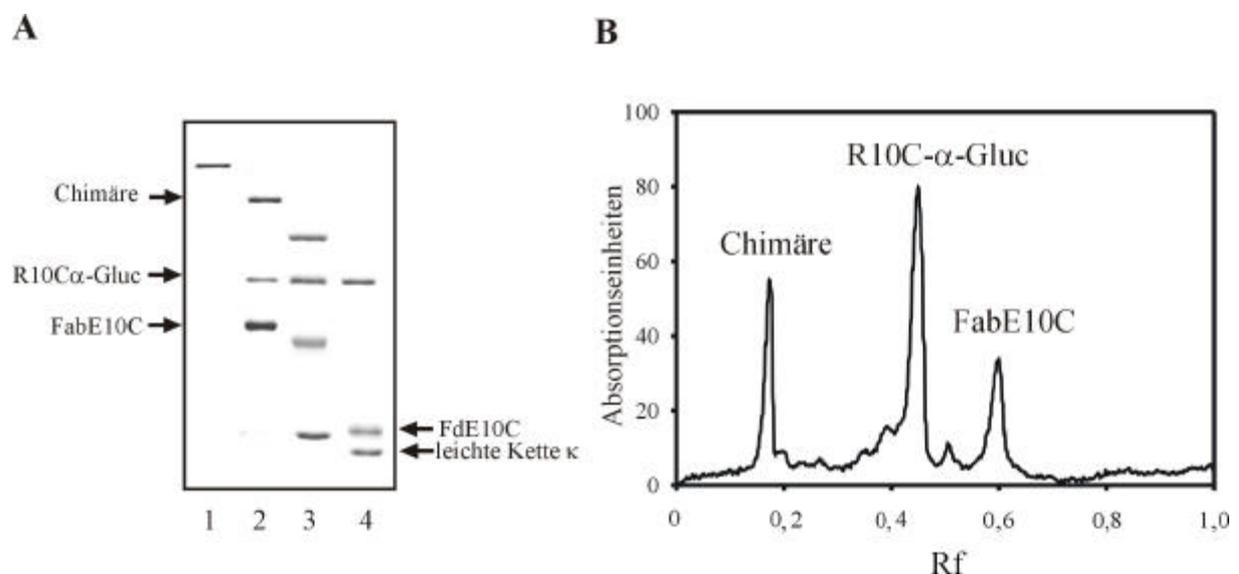


Abb. 3.4.1: Analyse der Assoziation von FabE10C mit R10C- α -Gluc. **A.** 10%iges SDS-Gel nach Coomassie-Färbung; Bahn 1 und 2 unter nicht-reduzierenden Bedingungen; Bahn 3 und 4 unter reduzierenden Bedingungen: (1) 1 μ g MAK33 (150 kD); (2) Assoziationsansatz von FabE10C (50 kD) mit R10C- α -Gluc (69 kD); aufgetragen wurden 3,5 μ g Gesamtprotein; (3) Proteinmarker (von oben: 94 kD, 67 kD, 43 kD und 30 kD) (4) 3,5 μ g des Assoziationsansatzes unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen **B.** Absorptionsprofil von Bahn 2 nach densitometrischer Auswertung mittels Phoretix 1D.

Aus Abb 3.4.1 A geht hervor, daß die Assoziationsansätze neben den Ausgangskomponenten FabE10C (50 kD) und R10C- α -Gluc (69 kD) eine weitere Spezies mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 120 kD enthielten. Die Heterodimerisierung erfolgte unter den gewählten Bedingungen mit einer Ausbeute von etwa 30 % (Abb. 3.4.1 B). Homodimere konnten nicht detektiert werden.

Das Heterodimer konnte mittels präparativer Gelfiltration von den Edukten getrennt werden. In Abbildung 3.4.2 A ist ein 10%iges SDS-Gel von Fraktionen der Aufreinigung des Assoziationsansatzes mittels Gelfiltration dargestellt. Durch Reduktion mit DTT dissoziiert das gereinigte Heterodimer in seine Ausgangskomponenten R10C- α -Gluc (69 kD), das FdE10C-Fragment (apparent 30 kD) und die κ -Kette (25 kD) (Abb. 3.4.2 A; Bahn 5). In Abb. 3.4.2 B wird ein Westernblot nach immunologischer Detektion mit einem Anti-Maus-Fab-Fragment-spezifischen Antikörper gezeigt. Dieser belegt zum einen, daß das Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 120 kD das Fab-Fragment FabE10C enthält. Zum anderen wird gezeigt, daß das Fab-Fragment alleine unter Assoziationsbedingungen inkubiert nicht zu einer höhermolekularen Spezies reagiert (Abb. 3.4.2 B; Bahn 5). Desweiteren bleibt die interchenare Disulfidbrücke des Fab-Fragmentes unter den gewählten Assoziationsbedingungen erhalten.

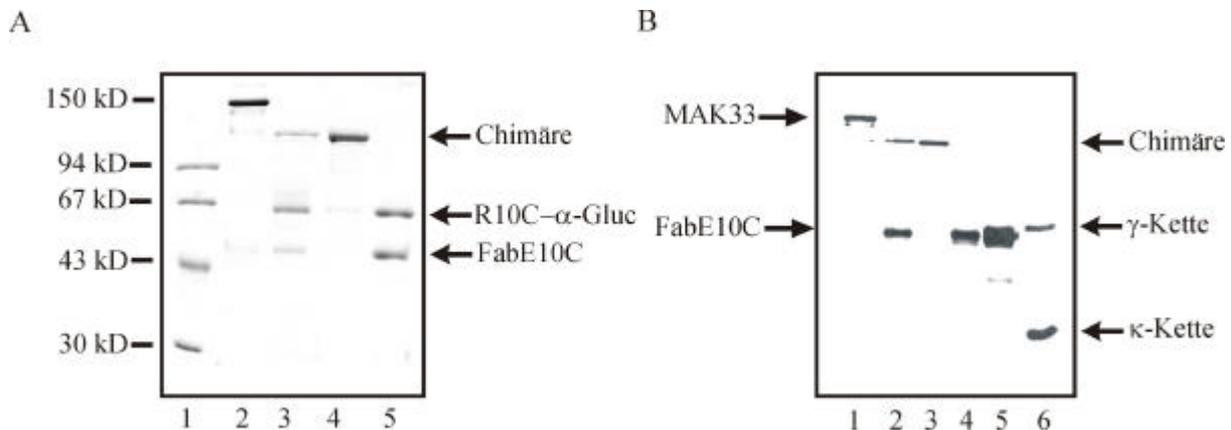


Abb. 3.4.2: Trennung der Chimären FabE10C-R10C- α -Gluc von den Edukten. **A.** 10%iges Gel von Proben vor und nach Gelfiltration an Superdex 75 pg; SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen; Coomassie-Färbung. (1) Proteinmarker, (2) MAK33 (150 kD), (3) Assoziationsansatz vor Gelfiltration, (4) Fraktion der Chimären; Elution bei 58 ml, (5) Elution bei 62 ml (FabE10C und R10C- α -Gluc wurden auf der verwendeten Säule nicht getrennt). **B.** Westernblot nach SDS-PAGE (10%iges Gel); Detektion mit POD-gekoppeltem Anti-Maus-Fab-Antikörper durch ECL-Reaktion. (1) MAK33 unter nicht-reduzierenden Bedingungen, (2) Assoziationsansatz, (3) Chimären-Fraktion nach Gelfiltration, (4) Eduktfraktion nach Gelfiltration, (5) Assoziationsansatz von FabE10C allein, (6) MAK33 unter reduzierenden Bedingungen.

Um auszuschließen, daß der unvollständige Umsatz zum Heterodimer auf einer sehr langsamen Assoziationskinetik beruht, wurde die Bildung der Chimären FabE10C- α -GlucR10C in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. In Abbildung 3.4.3 ist die Assoziationskinetik von FabE10C- α -Gluc für eine äquimolare Konzentration der Ausgangskomponenten von $1\mu\text{M}$ bei 20°C dargestellt. Der Anteil an gebildeter Chimäre wurde auf den Endwert nach 22 h normiert.

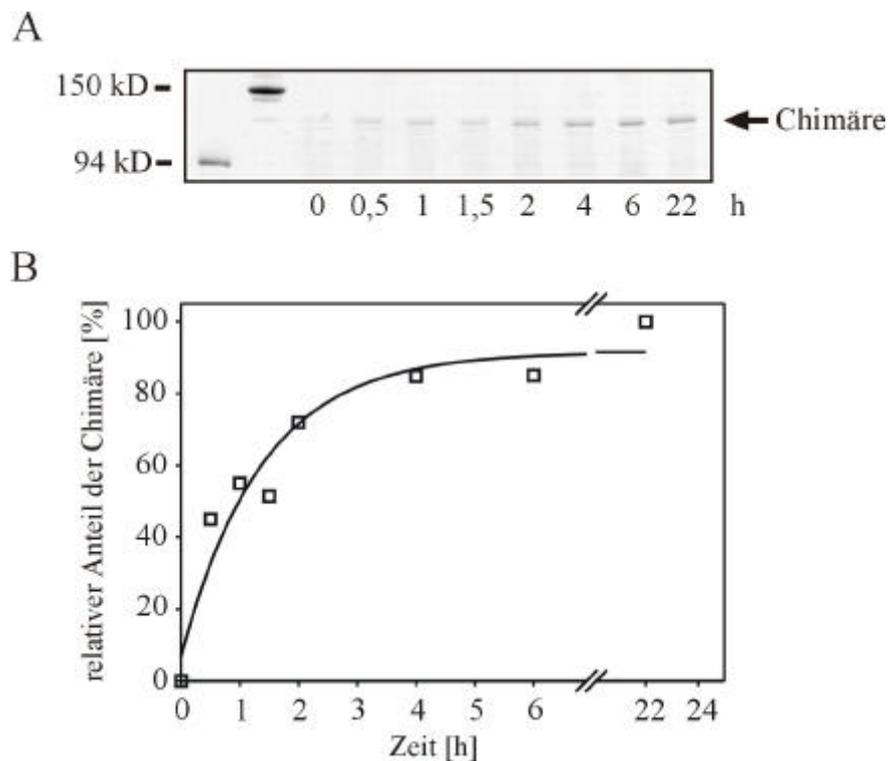


Abb. 3.4.3: Assoziationskinetik von FabE10C mit α -GlucR10C bei 20°C in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2,4 mM GSSG, 0,6 mM GSH, pH 7,5. Beide Komponenten lagen in äquimolarer Konzentration von $1\mu\text{M}$ im Ansatz vor. Zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt wurde ein Aliquot (45 μl) des Assoziationsansatzes entnommen und mit 5 μl 400 mM Iodacetamid in 100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,5 versetzt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Der Anteil der Chimäre wurde densitometrisch bestimmt und auf den Endwert nach 22 h normiert. **A.** 10%iges Gel nach Coomassie-Färbung. (1) Phosphorylase b (94 kD) Proteinmarker; (2) MAK 33 (150 kD); (3)-(10) Zunahme der Chimärenbande in Abhängigkeit von der Assoziationszeit. **B.** Auf den Endwert (22 h) normierter Anteil an gebildeter Chimäre. Der 100 %-Wert entspricht einem Umsatz von 15 %.

Abbildung 3.4.3 ist zu entnehmen, daß die Assoziationsreaktion unter den gewählten Bedingungen nach etwa 6 h abgeschlossen ist. Dieses entspricht der Assoziationskinetik, die unter ähnlichen Bedingungen mit den synthetischen Peptiden ACK₈ und ACE₈ gemessen wurde. In diesem System war das Heterodimer nach 5 h quantitativ gebildet (persönliche Mitteilung Kay Stubenrauch). Die Konzentrationsabhängigkeit der Assoziationsreaktion wurde nicht untersucht.

3.4.2 Spezifität der Reaktion

Um die Frage zu klären, ob die Wechselwirkung der entgegengesetzt geladenen Fusionspeptide eine Voraussetzung zur Ausbildung der Disulfidbrücke ist, wurde die Assoziation in Ab- und Anwesenheit von 1 M Natriumchlorid untersucht. Stubenrauch (2000) hatte mit Hilfe der synthetischen Peptide ACK₈ und ACE₈ bereits nachgewiesen, daß mit zunehmender Ionenstärke die Heterodimerisierung verhindert wird. Da unter diesen Bedingungen auch keine statistische Bildung von Hetero- und Homodimeren erfolgte, ist anzunehmen, daß die geladenen Aminosäuren in Nachbarschaft der Cystein-Reste deren Reaktivität beeinflussen. Auf diesen Aspekt wird im Rahmen der Diskussion näher eingegangen.

Desweiteren wurden Assoziationsreaktionen der Einzelkomponenten mit nicht-modifiziertem Fab-Fragment und dem Wildtypprotein der α -Glucosidase durchgeführt. Das Fab-Fragment war unter den gewählten Assoziationsbedingungen stabil, so daß die intermolekulare Disulfidbrücke zwischen Fd-Fragment und leichter Kette nicht an Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen beteiligt ist (vgl. Abb. 3.4.2 B). Bereits aus Konkurrenzexperimenten zur Assoziation der synthetischen Peptide in Gegenwart von Verbindungen mit freien Cystein-Resten war bekannt, daß keine unspezifische Disulfidbrücke gebildet wird (Stubenrauch, 2000). Die Inkubation des FabE10C-Fragmentes mit α -Glucosidase-WT führte ebenfalls zu keinen disulfidverbrückten Assoziationsprodukten (Analyse mittels SDS-PAGE und mittels Gelfiltration; Daten nicht gezeigt). Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß der mittels gentechnischer Methoden eingefügte zusätzliche Cystein-Rest im Kontext der polyionischen Aminosäuresequenz gezielt für eine spezifische kovalente Verbrückung verwendet werden kann.

3.4.3 Stabilität des Assoziationsproduktes

Sowohl die Assoziation des FabE10C-Fragmentes mit der N-terminal als auch mit der C-terminal modifizierten α -Glucosidase-Variante war möglich. Allerdings lag die Ausbeute an Heterodimer bei der Assoziation mit α -GlucR10C lediglich bei maximal 15 %, wenn beide Komponenten in äquimolaren Konzentrationen von 1 μ M eingesetzt wurden. Eine mögliche Erklärung ist der proteolytische Abbau des C-terminalen Fusionspeptides während der Aufarbeitung. Doch auch im Falle der N-terminalen α -Glucosidase-Variante wurde im Konzentrationsbereich von 1-5 μ M keine vollständige Heterodimerisierung erzielt, obwohl

die Identität der Variante durch N-terminale Sequenzierung bestätigt wurde. Durch Erhöhung der Konzentration von FabE10C bei konstanter R10C- α -Gluc-Konzentration von 1 μ M sollte der Konzentrationseinfluß auf die Dimerisierung der beiden Proteine näher untersucht werden. Das Ergebnis dieser Titrationsexperimente kann Abb. 3.4.4 entnommen werden.

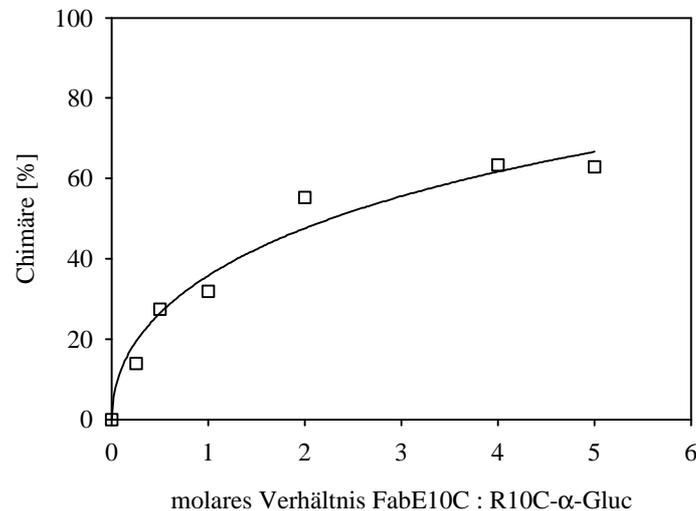


Abb. 3.4.4: Assoziation von FabE10C mit R10C- α -Gluc unter Variation des molaren Verhältnisses von FabE10C : R10C- α -Gluc. Die Konzentration von R10C- α -Gluc war konstant 1 μ M. Die Assoziation wurde in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0,6 mM GSH, 2,4 mM GSSG, pH 7,5 bei 20°C für 16 h durchgeführt. Die Analyse erfolgte durch densitometrische Auswertung von 10%igen SDS-Gelen nach Coomassie-Färbung. Der Fit der experimentellen Daten nach Gleichung (14) liefert eine Dissoziationskonstante der Chimären von $0,5 \pm 0,2$ μ M unter den vorliegenden Redoxbedingungen.

Aus Abb. 3.4.4 geht hervor, daß die Ausbeute an Heterodimer signifikant von der Konzentration der beiden Konjugationspartner im Ansatz abhängt. In Gegenwart äquimolarer Konzentrationen von 1 μ M beträgt die Ausbeute an Heterodimer 30 % und kann mit zunehmender Konzentration eines der beiden Konjugationspartners auf etwa 60 % gesteigert werden. In Gegenwart des Redoxsystems ist die Assoziation reversibel. Sie kann durch eine Dissoziationskonstante von $0,5 \pm 0,2$ μ M (20°C) beschrieben werden.

Ähnliches wurde bei der Assoziation von R10C- α -Gluc mit α -GlucE10C beobachtet. Auch in diesem Fall erfolgte die Assoziation mit einer Ausbeute von 30 %, wenn beide Assoziationspartner in äquimolaren Konzentrationen von 1 μ M im Ansatz vorlagen (Daten nicht gezeigt). Daher ist zu vermuten, daß dieses Assoziationsverhalten nicht spezifisch für die Reaktion zwischen R10C- α -Gluc und FabE10C ist, sondern die Interaktion der polyionischen Fusionspeptide charakterisiert.

3.4.4 Charakterisierung des Fab-Fragment-Enzym-Konjugates

Wie bereits erwähnt, wurden sowohl das Konjugat bestehend aus FabE10C und R10C- α -Gluc als auch das FabE10C-Konjugat mit α -GlucR10C gebildet. Mittels Gelfiltration gelang die Separierung der Chimären von den Edukten (Abb. 3.4.2 A), so daß es für weitere Charakterisierungen in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Neben der Bestimmung des Molekulargewichtes mittels SDS-PAGE und Gelfiltrationschromatographie wurden zusätzlich Gleichgewichtsläufe mittels analytischer Ultrazentrifugation durchgeführt (Abb. 3.4.5).

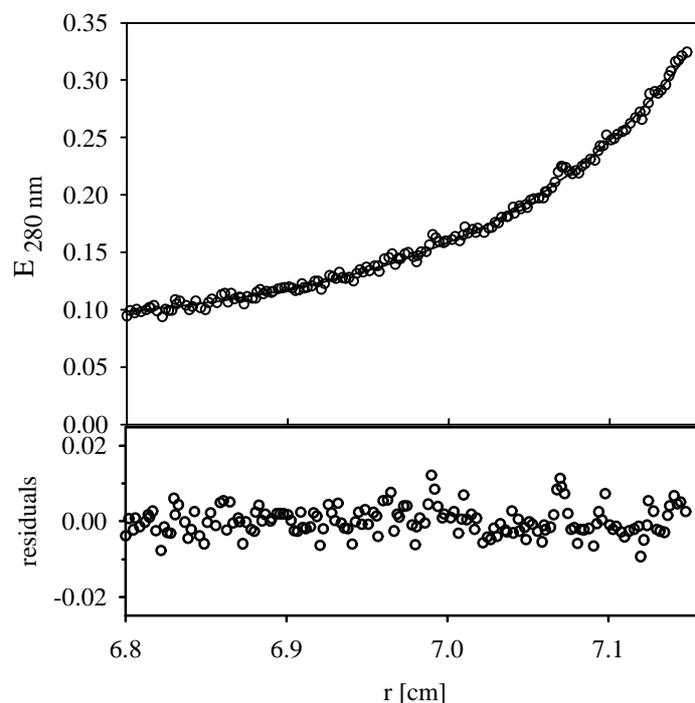


Abb. 3.4.5: Charakterisierung des FabE10C- α -GlucR10C-Konjugates mittels analytischer Ultrazentrifugation. Die Gleichgewichtssedimentation wurde bei 8000 rpm und 20°C für 24 h durchgeführt. Aus den Daten (\circ) wurde die apparente molare Masse einer homogenen Spezies zu 130000 ± 10000 errechnet. Die untere Abbildung gibt die Abweichung der Regressionsfunktion von den experimentellen Daten an.

Das Konjugat sedimentiert als eine homogene Spezies, für die ein Molekulargewicht von etwa 130 ± 10 kD ermittelt wurde. Zur Kontrolle wurden die Ausgangskomponenten ebenfalls analysiert, wiesen jedoch keine weiteren als die jeweils monomeren Spezies auf.

Desweiteren sollte die Frage geklärt werden, ob durch die gerichtete Assoziation und kovalente Verbrückung zusätzliche Interaktionen zwischen den konjugierten Proteinen auftreten. Diese könnten zum einen in einer veränderten Sekundärstruktur und zum anderen in einer modifizierten Funktionalität der Assoziationspartner resultieren.

In Abb. 3.4.6 sind die Fern-UV-Spektren der nicht konjugierten Einzelkomponenten FabE10C und R10C- α -Gluc und die des Konjugates dargestellt.

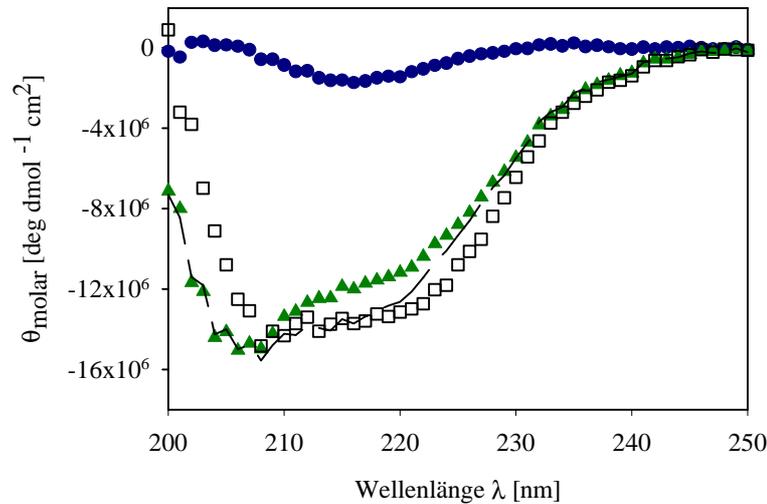


Abb. 3.4.6: Fern-UV-Spektren von Chimäre (□), FabE10C (●) und R10C- α -Gluc (▲) in 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 150 mM NaCl pH 7,0. Die Spektren wurden pufferkorrigiert. Ebenfalls dargestellt ist das nach Addition der molaren Elliptizitäten von FabE10C und R10C- α -Gluc erhaltene Spektrum (---). Die Proteinkonzentration war 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$, die Schichtdicke der Küvette 0,1 cm.

Aus dem aufgezeichneten Meßsignal wurde die molare Elliptizität nach Gleichung (16) berechnet. Deutlich erkennbar sind die unterschiedlichen Spektren der Einzelkomponenten. Das Antikörperfragment, dessen Kristallstruktur kürzlich aufgeklärt wurde (Augustine *et al.*, 2000), zeigt das für ein *all-b-sheet*-Protein charakteristische Fern-UV-Spektrum. β -Faltblattstrukturen sind wesentlicher Bestandteil des *immunglobulin fold*. Das Fern-UV-Spektrum des nativen FabE10C stimmt gut mit dem des nicht-modifizierten Fragmentes (Lilie *et al.*, 1995a) überein und weist ein Minimum des CD-Signals bei einer Wellenlänge von 218 nm auf. Das Fern-UV-Spektrum der α -Glucosidase-Variante R10C- α -Gluc hat ein Minimum der molaren Elliptizität bei 208 nm. Dieses deutet auf die Beteiligung von α -Helices als Sekundärstrukturelemente hin. Die Struktur der α -Glucosidase PI ist bisher nicht bekannt. Aus Sequenzhomologien mit anderen α -Amylasen ist zu vermuten, daß sie als Grundstruktur eine $(\alpha/\beta)_8$ -barrel-Topologie aufweist (Svensson *et al.*, 1988; McGregor und Svensson, 1989).

Das Fern-UV-Spektrum des Konjugates kann annähernd als additives Spektrum der beiden Einzelkomponenten erhalten werden. Aus diesem Ergebnis ist zu folgern, daß vermutlich die Sekundärstrukturelemente der beteiligten Komponenten durch die Assoziation und kovalente Verknüpfung mittels polyionischer Fusionspeptide nicht beeinflusst werden.

Im folgenden sollte die Frage geklärt werden, ob die funktionellen Eigenschaften der Assoziationspartner im konjugierten Zustand verändert sind.

Dazu wurde zunächst die Bifunktionalität des Konjugates nachgewiesen. Hierzu wurde ein modifizierter ELISA entwickelt, in dem die Immobilisierung des Konjugates über die Antigen-Antikörperfragment-Wechselwirkung erfolgt und die Detektion des Komplexes über die enzymatische Aktivität der α -Glucosidase. Der Aufbau des ELISA ist in Abb. 3.4.7 schematisch dargestellt.

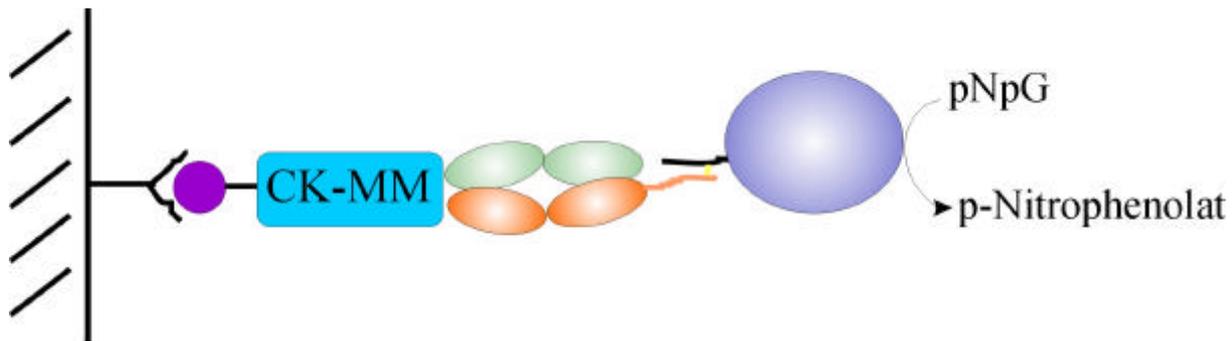


Abb. 3.4.7: Schematische Darstellung des ELISA-Aufbaus zum Nachweis des bifunktionellen Konjugates. Über Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung wurde das Antigen (humane Creatinkinase vom Skelettmuskeltyp CK-MM) immobilisiert. Nach Bindung des Fab-Fragmentes erfolgte die Detektion unmittelbar über den Nachweis der α -Glucosidase-Aktivität des Konjugationspartners mit *p*-NpG.

Als Kontrollen wurden die Einzelkomponenten untersucht. In Tabelle 3.4.1 sind die Ergebnisse des Bifunktionalitätsassays zusammengestellt.

Aus Tabelle 3.4.1 geht hervor, daß mit Hilfe des modifizierten ELISA die Bifunktionalität des gebildeten Konjugates aus FabE10C und R10C- α -Gluc nachgewiesen werden konnte. Während das isolierte Antikörperfragment erwartungsgemäß nicht mit dem Testsystem analysiert werden konnte, zeigte die α -Glucosidase geringfügig falsch positive Reaktionen, wenn sie in zu hohen Konzentrationen ($> 10 \mu\text{g/ml}$) im Reaktionsgefäß vorhanden war. Diese beruhen vermutlich auf unspezifischer Adsorption der α -Glucosidase an die Gefäßwände. Auch durch exzessives Waschen konnte diese α -Glucosidase nicht entfernt werden. Nicht-kovalent verknüpftes Assoziationsprodukt (Ansatz in Gegenwart von 5 mM DTT) dissoziiert während des Waschens mit Hochsalzpuffern, so daß unter den vorliegenden Bedingungen keine α -Glucosidase nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 3.4.1: ELISA zum Nachweis der Bifunktionalität des FabE10C-R10C- α -Gluc-Konjugates. Unterschiedliche Mengen des Konjugates und der Einzelkomponenten wurden in Gegenwart und Abwesenheit des biotinylierten Antigens Creatinkinase (CK) in Streptavidin-beschichteten Reaktionsgefäßen 1 h bei 20°C inkubiert. Nach mehrfachem Waschen erfolgte die Detektion mit p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid. Die gemessenen Extinktionswerte wurden auf den Wert des Konjugates mit 25 pmol im Ansatz normiert.

	Proteinmenge im Testansatz [pmol]	relative Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm [%]
<i>Experimente in Gegenwart des Antigens:</i>		
FabE10C-R10C- α -Gluc-Konjugat	5	26
	10	43
	25	100
FabE10C	20	0
R10C- α -Gluc	20	0
	70	3
	140	23
FabE10C/R10C- α -Gluc nicht- kovalent verknüpft*	20	0
<i>Experimente in Abwesenheit des Antigens:</i>		
FabE10C-R10C- α -Gluc-Konjugat	25	0
R10C- α -Gluc	20	0
	140	27
α -Gluc-Wildtypprotein	150	28

* Testansatz mit 5 mM DTT versetzt

Mit Hilfe des ELISA konnte die Bifunktionalität des Konjugates nachgewiesen werden. Für eine eingehendere Charakterisierung wurden die enzymatischen und antigen-bindenden Eigenschaften der konjugierten und nicht-konjugierten Proteine vergleichend untersucht.

Dazu wurde zunächst die Dissoziationskonstante des Antigen-Antikörperfragment-Komplexes bestimmt. Unterschiedliche Konzentrationen des konjugierten und freien Antikörperfragmentes FabE10C wurden in Gegenwart von dimerer humaner Creatinkinase des Skelettmuskeltyps inkubiert. Durch Bindung des Antikörperfragmentes an die Creatinkinase wird deren Aktivität inhibiert. Die Restaktivität wurde über einen gekoppelten

enzymatischen Test bestimmt, bei dem die Bildung von NADPH photometrisch detektiert wird. In Abbildung 3.4.8 ist die zeitliche Änderung der Absorption bei einer Wellenlänge von 365 nm in Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörperfragmentkonzentration dargestellt.

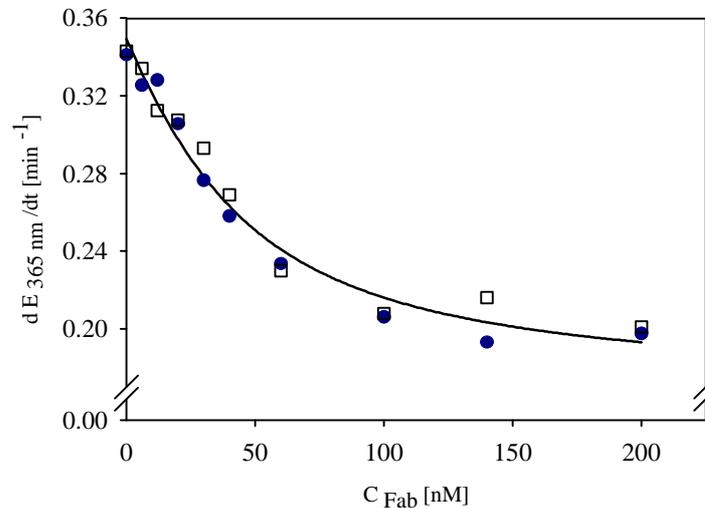


Abb. 3.4.8: Inhibition der Creatinkinase-Aktivität nach Bindung des freien (●) bzw. konjugierten FabE10C (◻). Durch Fit der experimentellen Daten nach Gleichung (7) wurde der K_d -Wert des freien FabE10C zu (28 ± 9) nM und der der Chimären zu (28 ± 11) nM bestimmt. Die Creatinkinase-Konzentration war 31,25 nM.

Durch nicht-lineare Regression der experimentellen Daten mit Hilfe von Gleichung (7), wurde die Dissoziationskonstante für den Antigen-FabE10C-Komplex mit $K_d = (28 \pm 9)$ nM, und die des Komplexes aus Antigen und konjugiertem Antikörperfragment mit (28 ± 11) nM bestimmt. Aus der guten Übereinstimmung der Dissoziationskonstanten ist zu folgern, daß durch die Konjugation von FabE10C und R10C- α -Gluc die Antigen-Bindungseigenschaften des Fab-Fragmentes nicht beeinflußt werden.

Um den Einfluß der Konjugation auf die enzymatische Aktivität der α -Glucosidase zu untersuchen, wurde der K_M -Wert des freien und konjugierten Enzyms bestimmt. In Abbildung 3.4.9 ist die spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration für das artifizielle Substrat *p*-NpG dargestellt.

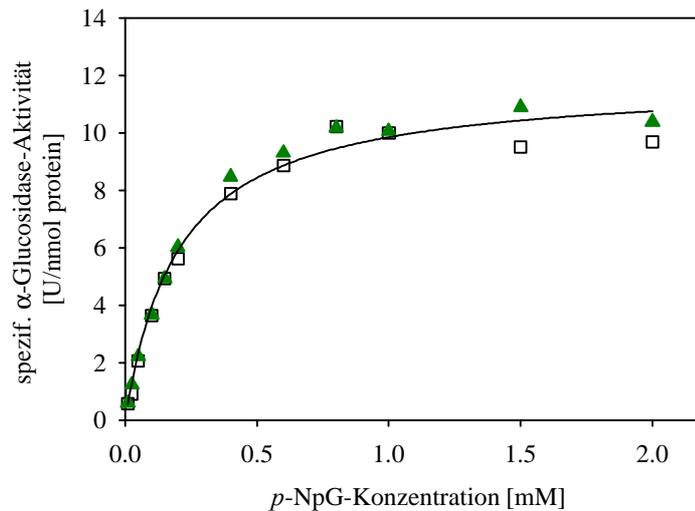


Abb. 3.4.9: Abhängigkeit der spezifischen enzymatischen Aktivität der Chimären (□) und der α -Glucosidasevariante R10C- α -Gluc (▲) von der Substratkonzentration. Die Hydrolyse des artifiziellen Substrates p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid wurde in 100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6,8 bei 30°C bestimmt. Chimäre und R10C- α -Gluc wurden in Konzentrationen von 70 pM bzw. 120 pM eingesetzt.

Um einen besseren Vergleich der Werte des freien und konjugierten Enzyms zu ermöglichen, wurde die spezifische Aktivität in der Einheit U/nmol angegeben.

Die spezifische Aktivität von 11 U/nmol bei Substratsättigung stimmt dabei gut mit dem für das Wildtypprotein der α -Glucosidase in der Literatur beschriebenen Wert von 150 U/mg überein (Stempfer *et al.*, 1996b). Durch nicht-lineare Regression wurde mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung (vgl. Abschnitt 2.2.4.5) der K_M -Wert der nicht-konjugierten α -Glucosidase mit 200 μ M bestimmt, der des Konjugates mit 195 μ M. Daraus kann gefolgert werden, daß die Kopplung keinen Einfluß auf die enzymatische Aktivität der α -Glucosidase hat.

Die hier verwendeten komplementär geladenen polyionischen Fusionspeptide ermöglichen somit eine spezifische, stabile, leicht zu kontrollierende Kopplung von Proteinen zur Gewinnung bifunktioneller Konstrukte. Die vorgestellte Kopplungsmethode sollte generell einsetzbar sein, sofern die Termini der zu koppelnden Proteine lösungsmittel exponiert vorliegen. Datenbankanalysen deuten darauf hin, daß mehr als 90 % der bekannten Proteinstrukturen entweder einen lösungsmittel exponierten N- oder C-Terminus haben (persönliche Mitteilung: Dr. Gerald Böhm, ACGT ProGenomics AG, Halle).

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden Anwendungsmöglichkeiten polyionischer Fusionspeptide in der Biotechnologie untersucht. Aspekte dabei waren die Bedeutung der Fusionspeptide für die Reinigung und Matrix-unterstützte Renaturierung heterologer Proteine sowie ihre Anwendung als ein neuartiges Dimerisierungsmodul für die gerichtete Assoziation und kovalente Verknüpfung von Proteinen.

Im folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse zusammengefaßt und ausführlich vor dem aktuellen Stand der Forschung diskutiert.

4.1 Einfluß polyionischer Fusionspeptide auf die rekombinante Herstellung und Reinigung heterologer Proteine

Die von α -Glucosidase aus *Saccharomyces cerevisiae* und dem Fab-Fragment von MAK33 abgeleiteten Fusionsproteine wurden mit polyionischen Extensionen, die entweder zehn positiv geladene oder zehn negativ geladene Aminosäurereste und jeweils einem zusätzlichen Cystein-Rest enthielten, versehen.

Die α -Glucosidase-Varianten α -GlucE10C, α -GlucR10C und R10C- α -Gluc konnten in rekombinanten *Escherichia coli* überexprimiert werden. In Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen und vom Expressionsstamm konnten die Varianten entweder in löslicher Form - Kultivierung nach Kopetzki *et al.* (1989b) - oder in Form von *inclusion bodies* hergestellt werden. Während bei löslicher Expression die spezifische enzymatische Aktivität der α -Glucosidase-Variante mit C-terminalem Polyglutamatpeptid im Rohextrakt mit der des Wildtypproteins nahezu identisch war, war die der Variante mit C-terminalem Decaargininfusionspeptid nur etwa halb so groß und die der N-terminalen Variante 30fach geringer. Bei der Herstellung des Proteins in Form von *inclusion bodies* zeigte sich, daß die Ausbeute an *inclusion bodies* von R10C- α -Gluc etwa um den Faktor 20 geringer war als die von α -GlucE10C.

Höll-Neugebauer (1992) untersuchte die Expression von α -Glucosidase-Varianten mit unterschiedlichen C-terminalen Fusionspeptiden (R6, R8, R8, R10, E7, P9), die jedoch keinen zusätzlichen Cystein-Rest enthielten. Als Maß für das Expressionsniveau wurde die

spezifische Enzymaktivität im Rohextrat verwendet. Diese ist mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werten konsistent. Demnach haben C-terminale Polyarginin- bzw. Polyglutamatfusionspeptide mit bis zu 10 geladenen Aminosäuren keinen signifikanten Einfluß auf das Expressionsniveau der α -Glucosidase. Eine Ausnahme ist das Decaarginin-Konstrukt, das ohne (Höll-Neugebauer, 1992) und mit zusätzlichem Cystein- und Prolin-Rest (diese Arbeit) nur etwa halb so stark exprimiert wird wie beispielsweise ein Polyglutamat-Konstrukt.

Auffallend ist die im Vergleich zu den C-terminal modifizierten Proteinvarianten deutlich geringere Ausbeute bei Expression der N-terminal modifizierten Variante R10C- α -Gluc. Mögliche Ursachen hierfür können eine herabgesetzte Initiation der Translation durch Ausbildung von Sekundärstrukturen auf mRNA-Ebene (Liebhaber *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1995; Malmgren *et al.*, 1996), eine erschwerte Translation durch die Häufung von in *E. coli* seltenen Arginin-Codons und/oder der bevorzugte proteolytische Abbau sein. Sekundärstrukturen in der mRNA sind häufig bei GC-reichen Sequenzen zu beobachten (Looman *et al.*, 1986), die auch zur Codierung des Fusionspeptides erforderlich sind. Sie können zum vorzeitigen Translationsstopp führen und begünstigen den Abbau der mRNA durch endogene Nukleasen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine α -Glucosidase-Variante mit N-terminalem Decaargininfusionspeptid CR10- α -Gluc konstruiert, die das Codon für den zusätzlichen Cystein-Rest im 5'-Bereich vor der die polyionische Sequenz codierenden Region enthielt. Im Vergleich zur Variante R10C- α -Gluc war hierbei das Niveau der Expression in löslicher Form nochmals um den Faktor 10 geringer (Daten nicht gezeigt). Untersuchungen der mRNA mittels Computersimulation (Programm Gene Runner) deuten auf die Ausbildung von sehr stabilen Haarnadelschleifen hin. Um weitere Hinweise auf die Bedeutung der mRNA für das im Vergleich zum Wildtypprotein herabgesetzte Expressionsniveau der Konstrukte mit N-terminalem Polyargininfusionspeptid zu erhalten, könnte der Gehalt an mRNA, die für die entsprechenden Konstrukte codiert, in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit bestimmt werden. Möglichkeiten zur Vermeidung der Ausbildung von Sekundärstrukturen auf mRNA-Ebene wären zum einen die Verwendung eines *two-cistron*-Systems (Schoner *et al.*, 1990; Schoner, 1997) oder aber das Einfügen weiterer Aminosäurereste in die polyionische Sequenz, deren Codons nicht die Bildung von Sekundärstrukturen begünstigen.

Eine Häufung der in *E. coli* selten vorkommenden Arginin-Codons sollte zum einen dadurch vermieden werden, daß die beiden Codons CGT und CGC verwendet wurden. Diese Codons sind in *E. coli* die beiden häufigsten der sechs für Arginin codierenden Triplets. Zum anderen

sollte durch Coexpression der in *E. coli* seltenen Arginin-tRNAs eine Limitation der Translation verhindert werden. Dazu wurden sämtliche verwendeten Expressionstämme mit dem Plasmid pUBS520 (Brinkmann *et al.*, 1989) cotransformiert. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei sehr starker Überexpression und einer Häufung von 10 für Arginin codierenden Triplets eine Limitation der Translation auftritt.

Neben der Limitation durch tRNAs könnte auch die Verfügbarkeit bestimmter Aminosäuren herabgesetzt sein oder aber die Beladung der tRNAs durch die Aminoacyl-tRNA-Synthasen und deren Verfügbarkeit einen „Flaschenhals“ der Proteinbiosynthese darstellen. Es wird vermutet, daß die Verfügbarkeit von Aminosäuren bei der Überexpression rekombinanter Proteine begrenzt ist (Ramirez und Bentley, 1999). Dieses als Ursache für die geringe Expression des N-terminal Arginin-haltigen α -Glucosidase-Konstruktes zu betrachten, scheint, angesichts der signifikant höheren Expression der C-terminal modifizierten Variante mit gleicher Aminosäurezusammensetzung, allerdings unwahrscheinlich.

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der geringeren spezifischen Aktivität im Rohextrakt nach Expression der α -Glucosidase-Konstrukte mit Arginininfusionspeptid ist der proteolytische Abbau. Für ein *single chain* Fv-Fragment wurde die Instabilität einer Polyarginin-Fusion beschrieben (Skerra *et al.*, 1991). Für die N- und C-terminale Hexaarginin-Variante der α -Glucosidase (Stempfer *et al.*, 1995; 1996a; 1996b) sowie für das grünfluoreszierende Protein (GFP) aus *Aequoria victoria*, das sowohl als N- als auch als C-terminales Hexaarginin-Konstrukt exprimiert wurde (Nock *et al.*, 1997), oder die schwere Kette des B3 Fv-Fragmentes mit Octaargininfusionspeptid (Stubenrauch *et al.*, 2001) liegen keine Angaben zum Expressionsniveau und zur Stabilität der Fusionsproteine vor.

Die *N-end rule* beschreibt den Zusammenhang zwischen der *in vivo*-Halbwertszeit (Maß für die Stabilität) eines Proteins in Abhängigkeit vom N-terminalen Aminosäurerest (Bachmair *et al.*, 1986; Tobias *et al.*, 1991; Varshavsky, A., 1997). Tobias *et al.* (1991) zeigten, daß diese Regel auch für den proteolytischen Abbau in *Escherichia coli* gilt. Dabei führen N-terminale Arginin- oder Lysin-Reste zu einer Halbwertszeit des Modellproteins β -Galactosidase von 2 Minuten. Aminosäurereste von Methionin, Threonin, Isoleucin, Serin oder Asparaginsäure haben hingegen einen stabilisierenden Einfluß auf das Modellprotein. Die N-terminal modifizierte Variante der α -Glucosidase wurde mit einer Extension von 5 Aminosäuren (MTISD) vor der eigentlichen polyionischen Sequenz exprimiert. Diese sollte zum einen die Translation erleichtern, die bekanntermaßen für das α -Gluc-WT-Gen, deren N-Terminus sie entspricht, sehr gut ist (Kopetzki *et al.*, 1989b) und zum anderen als Schutz vor proteolytischem Abbau des N-Terminus fungieren. Als Komponenten des N- und C-

terminalen Abbaus von Proteinen in *Escherichia coli* wurden die ATP-abhängigen Proteasen der Clp-Familie beschrieben (Tobias *et al.*, 1991; Gottesman *et al.*, 1998). Die Genprodukte von *lon* und *dnaK* scheinen keine Bedeutung für den Abbau von Substraten mit entsprechend destabilisierenden N-terminalen Aminosäuren zu haben.

Neben N-terminalen Aminosäuren haben die Proteinstruktur (Parsell und Sauer, 1989) und C-terminale Aminosäuresequenzen einen Einfluß auf die Sensitivität gegenüber proteolytischem Abbau. Parsell *et al.* (1990) untersuchten die Stabilität der amino-terminalen Domäne des λ -Repressors in Abhängigkeit von verschiedenen C-terminalen Fusionspeptiden. Während unpolare Aminosäurereste einen destabilisierenden Einfluß haben, erhöhen geladene oder polare Aminosäurereste die Proteinstabilität vor proteolytischem Abbau. Dieses wurde insbesondere dann festgestellt, wenn die geladenen Aminosäuren eine der letzten fünf C-terminalen Aminosäurepositionen besetzen. Smith *et al.* (1984) beschrieben den stabilisierenden Einfluß eines C-terminalen Hexaargininfusionspeptides auf Urogastron. Kürzlich wurde der Einfluß C-terminaler Aminosäuren auf die *in vivo* Stabilität eines Regulatorproteins des Arabinose-Operons, AraC, untersucht (Ghosh und Schleif, 2001). Dabei wurde gezeigt, das bereits das Anfügen einer geladenen Aminosäure wie Arginin oder Asparaginsäure die Stabilität des Regulatorproteins signifikant erhöhte.

Auch für neutrale und unpolare Aminosäuren als letzte C-terminale Aminosäurereste wurde *in vivo* ein stabilisierender Einfluß auf das Fusionsprotein festgestellt, wenn diese sich in unmittelbarer Nachbarschaft von geladenen Aminosäureresten befanden (Parsell und Sauer, 1989; Silber *et al.*, 1992).

Neben der *in vivo* Stabilität des Fusionspeptides, ist auch die *in vitro* Stabilität zu berücksichtigen. Während der Isolierung der Proteinvarianten aus dem Cytosol von *Escherichia coli* sind die Proteine nicht nur den intrazellulären Proteasen ausgesetzt, sondern auch Proteasen, die durch Desintegration der Zellmembran mit den Proteinen in Kontakt kommen (Sugimura und Higashi, 1988).

Eine zweifelsfreie Bestimmung der Identität des C-Terminus ist daher notwendig. Die Reinigung der polyionischen Fusionspeptide an den komplementär geladenen konventionellen Ionenaustauschern kann lediglich einen ersten Hinweis auf die Anwesenheit der geladenen Aminosäuren geben. Analytische Bestimmungsmethoden sind beispielsweise die C-terminale Sequenzierung, die sich im Laboralltag bisher noch nicht durchgesetzt hat, oder das *peptide-mapping* nach chemischer oder proteolytischer Spaltung des Fusionsproteins. Für die Charakterisierung und präparative Feinreinigung von Proteinen mit polyanionischen Fusionspeptiden wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine neuartige chromato-

graphische Methode entwickelt, die als kovalente Affinitätschromatographie bezeichnet wird. Auf diese wird in Abschnitt 4.3 der Diskussion näher eingegangen.

Datenbankanalysen von monomeren Proteinstrukturen belegen, daß bei 90 % der bekannten Strukturen zumindestens einer der beiden Termini zugänglich ist und somit für Modifikationen zur Verfügung steht (persönliche Mitteilung: Dr. Gerald Böhm, *ACGT ProGenomics* AG, Halle). Ist der N-Terminus nicht lösungsmittlexponiert oder ist er von funktioneller Bedeutung, so können polyionische Peptide mittels gentechnischer Methoden entweder wie im Falle des Virushüllproteins VP1 in einen exponierten Loop inseriert (Stubenrauch *et al.*, 1999) oder aber an den C-Terminus angehängen werden. Für das Fab-Fragment von MAK33 wurde letztere Möglichkeit gewählt. Auffallend sind das hohe Expressionsniveau der cDNA des modifizierten Fd-Fragmentes unter der Kontrolle des T7/*lac*-Promotors. Mit einem Anteil des rekombinanten Proteins am Gesamtzellprotein von 34 % (FdE10C) bzw. 47 % (FdR10C) 3 h nach Induktion bei Kultivierung auf Mineralsalz- bzw. LB-Medium ist die Expression signifikant höher als die in der Literatur beschriebenen Werte für die Expression von Fd-Fragmenten. Bücheler (1989) untersuchte die Expression des Fd-Fragmentes von MAK33 in *Escherichia coli*. Das höchste Expressionsniveau wurde bei Verwendung einer LacZ-Fusion unter der Kontrolle eines *tac*-Promotors erhalten und lag bei 27 % Fd-Fragment bezogen auf das Gesamtzellprotein.

Polyionische Fusionspeptide wurden insbesondere für die Reinigung von Proteinen verwendet (Brewer und Sassenfeld, 1985; Zhao, 1990; Ford *et al.*, 1991; Suominen *et al.*, 1992; 1993; Höll-Neugebauer, 1992; Stubenrauch *et al.*, 2000). Fusionsproteine mit 5 bis 16 C-terminalen Asparaginsäure-Resten wurden mittels Präzipitation in Gegenwart von Polyethylenimin gereinigt (Zhao *et al.*, 1990). Smith *et al.* (1984) verwendeten einen Kationenaustauscher zur Isolierung eines rekombinanten Proteins mit C-terminalem Hexaarginin-*tag*.

Auch im Rahmen dieser Dissertation wurden die geladenen polyionischen Aminosäuresequenzen erfolgreich zur Reinigung der Fusionsproteine eingesetzt. Mittels Kationenaustauschchromatographie konnten die α -Glucosidase-Varianten mit Arginin-Fusionspeptid aus dem *Escherichia coli* Rohextrakt mit einer Reinheit von 80 - 88 % isoliert werden. Die α -Glucosidase-Variante α -GlucE10C wurde nach Optimierung der Elutionsbedingungen in einer Reinheit von etwa 80 % erhalten. Durch Ionenaustauschchromatographie unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von 7,5 M Harnstoff konnten die *inclusion bodies* der α -GlucosidaseE10C vorgereinigt werden.

Insbesondere zur Reinigung des Antikörperfragmentes FabE10C konnte die Ionenaustauschchromatographie erfolgreich eingesetzt werden. Die chromatographische Reinigung von Antikörper(fragmente)n erfolgt häufig unter recht harschen Elutionsbedingungen, die in einem Funktionalitätsverlust des Proteins resultieren können (Jungbauer *et al.*, 1989; Savelkoul *et al.*, 1994; Bill *et al.*, 1995). Häufig werden kostenintensive Chromatographiematerialien mit begrenzter Stabilität und Regenerierbarkeit verwendet (Yan und Huang, 2000). Im Gegensatz dazu kann durch Fusion mit einem polyionischen Reinigungsmodul eine effiziente Reinigung und Konzentrierung des renaturierten Proteins in einem für die Proteinstabilität geeigneten Eluenten erreicht werden. Dabei wird ein einfach zu regenerierender Ionenaustauscher verwendet.

Ein weiterer wichtiger Aspekt im Zusammenhang mit der Verwendung polyionischer Fusionspeptide ist ihr Einfluß auf die Renaturierung des Fusionspartners. Für die α -Glucosidase mit Hexaargininfusionspeptid ist bereits bekannt, daß die Renaturierungsausbeuten in Lösung signifikant geringer sind als die des nicht-modifizierten Proteins (Stempfer *et al.*, 1996b). Dabei ist die Renaturierungsausbeute weitgehend unabhängig davon, ob es sich um eine N- oder C-terminale Fusion handelt. Die in dieser Doktorarbeit verwendeten Fusionspeptide waren zum einen länger und enthielten zum anderen einen zusätzlichen Cystein-Rest, der möglicherweise mit Cystein-Resten der Primärsequenz während der Faltung interagieren kann. Sowohl für die Variante der α -Glucosidase als auch für die des Fab-Fragmentes mit negativ geladenem Fusionspeptid wurde gezeigt, daß die Renaturierung in Lösung im Vergleich zum Wildtyp mit höheren (α -GlucE10C) bzw. ähnlichen Ausbeuten (FabE10C) erfolgt. Im Falle des Fab-Fragmentes gilt dies sowohl für ein E10C- als auch für ein D10C-Fusionspeptid. Der löslichkeitsvermittelnde Einfluß geladener Aminosäuren wurde bereits früher beobachtet (Ambrosius *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1998; Berggren *et al.*, 2000) und wird beispielsweise als FLAG-tag (Octapeptid der Sequenz: Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) zur gezielten Produktion von Proteinen in löslicher Form angewendet (Chen *et al.*, 1998).

Bezüglich Renaturierungskinetik und Abhängigkeit der Renaturierungsausbeute vom Redoxpotential hat das FabE10C-Fragment ähnliche Eigenschaften wie das nicht-modifizierte Fab-Fragment (Buchner und Rudolph, 1991; Lilie *et al.*, 1994). Abweichend davon erfolgte die Renaturierung des FabR10C-Fragmentes mit sehr geringer Ausbeute. Möglicherweise bewirkt hier die Gegenwart von DNA in den solubilisierten *inclusion bodies* eine bevorzugte Aggregation des mit positiven Ladungen versehenen Fd-Fragmentes.

Zusammenfassend kann aus den vorliegenden Ergebnissen gefolgert werden, daß die verwendeten polyionischen Peptide als C-terminale Fusion zu einem Expressionsniveau der rekombinanten Proteine führen, das dem der nicht-modifizierten Proteine entweder vergleichbar oder erhöht ist. Mit N-terminalen Fusionspeptiden wurde ein geringeres Expressionsniveau festgestellt. Negativ geladene Fusionspeptide bestehend aus Glutaminsäure- oder Asparaginsäure-Resten haben einen löslichkeitsvermittelnden Einfluß, die Renaturierung der entsprechenden Fusionsproteine ist begünstigt. Die Anwendung der polyionischen Peptide als effiziente Reinigungstags wurde gezeigt.

4.2 Matrix-unterstützte Reaktivierung eines Proteins mit polyionischem Fusionspeptid an einem Anionenaustauscher

Die Verwendung von Ionenaustauschermaterialien für eine Matrix-unterstützte Renaturierung ist bisher wenig untersucht. In der Einleitung wurde auf einige Aspekte der Arbeiten von Creighton (1986) und Stempfer *et al.* (1996a) eingegangen. Während Creighton (1986) lediglich geladene Aminosäuren der Primärsequenz der zu faltenden Proteine für die Immobilisierung verwendete, nutzten Stempfer *et al.* (1996a) ein Hexaargininfusionspeptid für die Protein-Matrix-Interaktion. Bei geeigneter Ionenstärke des Rückfaltungspuffers erfolgte dadurch die Wechselwirkung der entfalteten Polypeptidkette mit dem Gelmaterial vermutlich ausschließlich über das Fusionspeptid.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden erstmals Untersuchungen zur Matrix-unterstützten Reaktivierung einer α -Glucosidase mit polyanionischem Fusionspeptid vorgestellt. Die Renaturierung der α -GlucE10C hängt signifikant von der verwendeten Matrix und der Beladung des Gelmaterials ab. Während hydrophobe Trägermaterialien wie die der Fractogele TMAE und DEAE für eine Matrix-unterstützte Renaturierung ungeeignet waren, erwiesen sich Q-Sepharose und Fractoprep DEAE als geeigneter. Aufgrund der Wechselwirkung zwischen dem Trägermaterial und reaktivierten, lediglich partiell gefalteten α -Glucosidase-Molekülen ist eine weitere Verbesserung der Trägermaterialien notwendig. Die α -GlucosidaseE10C konnte zwar an Fractoprep DEAE mit Ausbeuten von etwa 30-35 % bei einer Matrixbeladung von 1 mg/ml reaktiviert werden, jedoch gelang eine Ablösung des Proteins vom Trägermaterial nur mit einer Ausbeute von 20 %. Zusätze zur Verringerung der hydrophoben Wechselwirkungen führten zu keiner signifikanten Ausbeutesteigerung bzw. verbesserten Ablösung.

Höll-Neugebauer (1992) beschreibt die Rückfaltung der α -Glucosidase-WT in Lösung mit einer langsamen biphasischen Reaktion. Fluoreszenzmessungen deuten darauf hin, daß in einer ersten sehr schnellen Phase ein partiell gefaltetes aber enzymatisch inaktives Intermediat I_1 gebildet wird. Dieses Intermediat I_1 wird nachfolgend in einer sehr langsamen Reaktion, die einer Kinetik 1. Ordnung unterliegt, reaktiviert. Diese Reaktion ist durch eine Geschwindigkeitskonstante von $k = 1,8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (bei 10°C) gekennzeichnet. Die Renaturierungscharakteristik der α -Glucosidase-WT ist der anderer monomerer Mehr-Domänen-Proteine sehr ähnlich (Zettlmeißl *et al.*, 1984; Chrnyk und Matthews, 1990).

Untersuchungen der Reaktivierungskinetik der freien bzw. der an Fractoprep DEAE immobilisierten α -GlucE10C resultieren in sehr ähnlichen Geschwindigkeitskonstanten von $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ bzw. $1,1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (bei 10°C). Sie liegen in der Größenordnung der von Höll-Neugebauer beschriebenen Werte für das Wildtypprotein (Höll-Neugebauer, 1992). Die ähnlichen Geschwindigkeitskonstanten der Reaktivierung von freiem und immobilisiertem Enzym deuten darauf hin, daß die Rekonstitution des enzymatisch aktiven Zentrums von α -GlucE10C vermutlich unabhängig von der Interaktion mit dem Matrixmaterial erfolgt. Im Gegensatz dazu belegen Daten von Stempfer (1995), daß die Matrix-unterstützte Reaktivierung der α -GlucR6 an einem Kationenaustauscher etwa 3mal langsamer erfolgt als im freien Zustand.

Während die Ausbeute der Matrix-unterstützten Reaktivierung der α -GlucR6 empfindlich von der Ionenstärke des Renaturierungspuffers beeinflusst wird (Stempfer *et al.*, 1996a), konnte für α -GlucE10C keine entsprechende Abhängigkeit festgestellt werden. Die geringe Interaktion der α -Glucosidase-WT mit den verwendeten Anionenaustauschermaterialien deutet bereits daraufhin, daß die Interaktion des nativen Proteins mit dem Gelmaterial vernachlässigbar gering ist und auch für das entfaltete Protein möglicherweise von untergeordneter Bedeutung ist.

Die Vorzüge der Matrix-unterstützten Renaturierung werden deutlich, wenn die Proteinkonzentration berücksichtigt wird, bei der die Reaktivierung erfolgt. Aufgrund der Aggregationsanfälligkeit der α -Glucosidase kann die Reaktivierung durch Verdünnung lediglich bei einer Proteinkonzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ erfolgen, während die Matrix-unterstützte Reaktivierung bei einer Gelbeladung von 1 mg/ml durchgeführt wird. Bezogen auf das Volumen werden somit für die Variante α -GlucE10C um den Faktor 50 gesteigerte Ausbeuten erreicht.

Durch Vergrößerung der inneren Oberfläche der Partikel (Porosität) des Gelmaterials kann die Beladungsdichte weiter gesteigert werden und somit auch die volumenbezogene Ausbeute.

Grenzen sind der Methode dadurch gesetzt, daß mit zunehmender Beladungsdichte der Abstand der immobilisierten Proteinmoleküle voneinander geringer wird und somit eine separate Faltung der einzelnen Polypeptidketten nicht mehr gewährleistet ist. Desweiteren kann mit abnehmender Porengröße (= zunehmende innere Partikeloberfläche) die effiziente Diffusion der Proteinmoleküle und des Denaturierungsmittels ins Partikelinnere limitiert sein.

Nachdem ein monomeres Protein, das zwar fünf (α -GlucR6) bzw. sechs (α -GlucE10C) freie Cysteine, jedoch keine Disulfidbrücken enthält, an einem Ionenaustauscher erfolgreich reaktiviert werden konnte, sollte das Verfahren auf komplexere Proteine übertragen werden. Untersuchungen zur Reaktivierung eines monomeren disulfidverbrückten Proteins mit Polyglutamatfusionspeptid werden zur Zeit am Institut für Biotechnologie durchgeführt. (Michael Volkmar, Diplomarbeit in Vorbereitung). Aus Daten von Creighton (1986) geht hervor, daß die Matrix-unterstützte Renaturierung in Gegenwart eines Redoxsystems signifikant vom verwendeten *oxido-shuffling*-System abhängt. Während das neutrale Redoxsystem β -Mercaptoethanol/Hydroxyethyl-disulfid im beschriebenen Fall geeignet war, ist bei geladenen Redoxkomponenten, wie dem positiv geladenen Cysteamin oder dem negativ geladenen Glutathion, eine mögliche Wechselwirkung mit der Matrix zu berücksichtigen. Diese kann in Abhängigkeit vom verwendeten Ionenaustauscher zu einer Adsorption von Komponenten des Redoxsystems an das Gelmaterial führen oder aber in einer elektrostatischen Abstoßung resultieren. Das Redoxsystem ist demnach fallspezifisch zu optimieren.

Bislang existieren nur wenige Beispiele für die Matrix-unterstützte Renaturierung disulfidverbrückter Proteine (Negro *et al.*, 1997; Glansbeek *et al.*, 1998; Kogl *et al.*, 1998). Als Matrix wurde in der Regel eine Nickel-NTA-Agarose verwendet. Allerdings kann hierbei nicht ausgeschlossen werden, daß die Gegenwart der Schwermetallionen zur Bildung nicht-nativer Disulfidbrücken durch Oxidation mit Sauerstoff führt.

In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse, vergleichende Untersuchungen zur Matrix-unterstützten Renaturierung von oligomeren Proteinen mit und ohne Disulfidbrücken durchzuführen. Die Wechselwirkung mit dem jeweiligen Gelmaterial könnte entweder über einen Hexa-Histidintag oder ein polyionisches Fusionspeptid erfolgen.

Eine Komponente eines dimeren Proteins könnte beispielsweise immobilisiert und durch dosierte Zugabe der zweiten Komponente in einem entsprechenden Puffermilieu renaturiert werden. Als mögliche Modellproteine kommen Proteasen sowie Fragmente von Membranrezeptoren oder vollständige Membranproteine in Betracht.

Darüber hinaus wäre es auch interessant, weitere vergleichende Untersuchungen zum Mechanismus der freien und Matrix-unterstützten Renaturierung durchzuführen.

Für die α -Glucosidase mit Hexaargininfusionspeptid wurden bereits vergleichende Untersuchungen zur Reaktivierungsausbeute und -kinetik der N- bzw. C-terminal immobilisierten Polypeptidkette sowie der freien Polypeptidkette durchgeführt (Stempfer, 1995). Die Kinetik der Matrix-unterstützten Reaktivierung war dabei um den Faktor 3 langsamer als die des frei in Lösung renaturierten Proteins. Während die Reaktivierungskinetik unabhängig davon war, ob die Immobilisierung über ein N- oder C-terminales Fusionspeptid erfolgte, war die Ausbeute der N-terminal immobilisierten Proteinvariante höher als die der C-terminal immobilisierten Variante.

Im Hinblick auf die Anwendung der Matrix-unterstützten Renaturierung im großtechnischen Maßstab wäre es sinnvoll, die bislang im Batchverfahren durchgeführten Reaktivierungsexperimente in den kontinuierlichen Betrieb zu übertragen.

Als Alternative zu klassischen Chromatographiematerialien könnte auch die Matrix-unterstützte Renaturierung an Membranmaterialien, die mit polyionischen Gruppen modifiziert wurden, untersucht werden.

4.3 Entwicklung einer chromatographischen Methode zur Charakterisierung und Feinreinigung von Proteinen mit C-terminalen polyanionischen Fusionspeptiden – kovalente Affinitätschromatographie

Die Isolierung und Reinigung eines pharmazeutisch relevanten Proteins kann bis zu zwei Drittel der Gesamtproduktionskosten verursachen (Evangelista Dyr und Suttner, 1997). Die Entwicklung neuer Chromatographiematerialien stellt in diesem Zusammenhang eine besondere Herausforderung dar. Neben den gängigen Chromatographiemethoden wie Ionenaustauschchromatographie (Stahlberg, 1999), Gelfiltration (Cutler, 1996), hydrophobe Interaktionschromatographie (Queiroz *et al.*, 2001) oder Affinitätschromatographie, wie beispielsweise die mit immobilisierten Metallionen (IMAC) (Porath *et al.*, 1992), wird auch deren Kombination in einem Reinigungsschritt untersucht. Diese sogenannten *mixed mode adsorbents* wurden bisher nur für die Kombination von hydrophober Interaktionschromatographie und Ionenaustauschchromatographie beschrieben (Yon, 1972; Hofstee, 1973; Sasaki, 1979; Finette *et al.*, 1997; Hansen *et al.*, 1999; Hamilton *et al.*, 2000). Hansen *et al.* (1999) untersuchten die Reinigung von Fab-Fragmenten aus *E. coli* Rohextrakten mit Hilfe eines *mixed mode adsorbents*. Hierbei wurden die Antikörperfragmente zunächst durch hydrophobe Interaktionen auf dem Trägermaterial immobilisiert. Der pH-Wert während der Bindung liegt zwischen pH 4,0 und pH 6,0, so daß die Carboxylgruppen des Trägermaterials protoniert sind. Durch Erhöhung des pH-Wertes (pH 7,0-9,0) erfolgt die Elution, aufgrund der elektrostatischen Abstoßung zwischen den nun geladenen funktionellen Gruppen des Gelmaterials und den Oberflächenladungen des zu reinigenden Antikörperfragmentes.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Gelmaterial entwickelt und charakterisiert, das die Eigenschaften eines Ionenaustauschers mit denen eines kovalenten Chromatographiematerialies verbindet. Die kovalente Chromatographie als Reinigungsmethode wurde bereits in der Einleitung vorgestellt. Sie beruht auf dem Thiol-Disulfid-Austausch zwischen den Cystein-Resten der zu reinigenden Proteinen und den aktivierten Sulfhydrylgruppen des Trägermaterials (Brocklehurst *et al.*, 1973; Carlsson *et al.*, 1975; Laurell, 1978, 1983; Oscarson und Porath, 1989). Als Standardreinigungsmethode hat sie sich vermutlich aufgrund der fehlenden Spezifität nicht durchgesetzt.

Durch Immobilisierung eines polyanionischen Fusionspeptides der Form ACK8A an CNBr-aktivierter Sepharose ist es gelungen, ein neuartiges Gelmaterial zu entwickeln, das die Spezifität der kovalenten Chromatographie erhöht.

In Abbildung 4.1 ist die Vorgehensweise bei der Reinigung mittels kovalenter Affinitätschromatographie schematisch dargestellt.

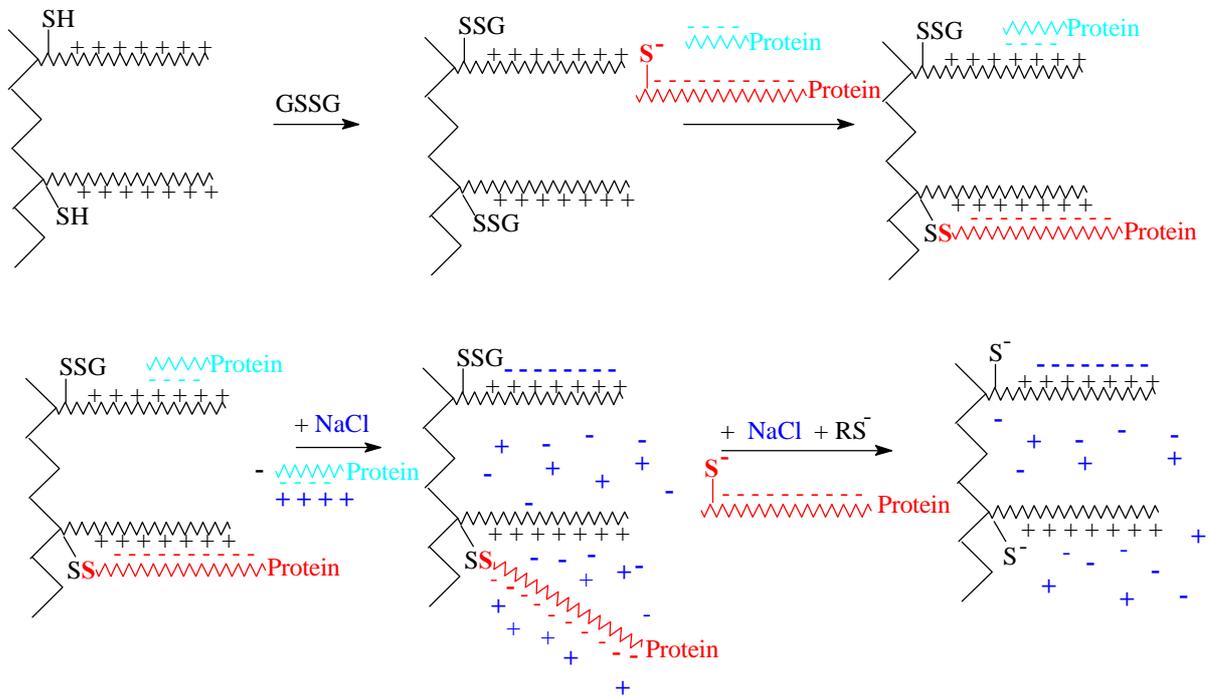


Abb. 4.1: Prinzip der kovalenten Affinitätschromatographie. Die Cystein-Reste der an den Träger gekoppelten polyionischen Peptide werden zunächst mit oxidiertem Glutathion in gemischte Disulfide überführt. Im nächsten Schritt werden Proteine mit komplementär geladenen Fusionspeptiden auf die Säule aufgetragen. Proteine mit unvollständigen Fusionspeptiden bzw. negativ geladene Fremdproteine interagieren ausschließlich über ionische Wechselwirkungen mit dem Gelmaterial. Proteine mit vollständigem Fusionspeptid bilden, vermittelt durch die ionische Wechselwirkung, gezielt eine Disulfidbrücke mit der Matrix aus. Während das ionic gebundene Protein durch Erhöhung der Ionenstärke des Eluenten abgelöst wird, erfordert die Elution des kovalent immobilisierten Proteins den Zusatz eines Reduktionsmittels RS^- , z. B. DTT oder L-Cystein.

Die Methode konnte erfolgreich für die Charakterisierung von FabE10C und α -GlucE10C eingesetzt werden. Beide Proteine wurden kovalent am Trägermaterial immobilisiert und konnten nach Reduktion der Disulfidbrücke unter Hochsalsbedingungen eluiert werden. Da sich in beiden Fällen der Cystein-Rest C-terminal hinter der polyionischen Sequenz befindet, ist daraus zu folgern, daß die C-terminalen Fusionspeptide der solchermaßen isolierten Proteine vollständig sind. Kontrollexperimente mit nicht-modifizierter α -Glucosidase belegen, daß keine unspezifische Ausbildung von Disulfidbrücken mit einem der fünf freien Cystein-Reste der Primärsequenz erfolgte. Während α -GlucE10C nach Elution unter reduzierenden Hochsalsbedingungen quantitativ zurückgewonnen wurde, lagen die Verluste des FabE10C-Fragmentes bei 34 %. In einer ähnlichen Größenordnung liegen die Verluste bei der Aufreinigung von Fab-Fragmenten an Resource Q (vgl. Abschnitt 3.1.1). Vermutlich interagieren die Antikörperfragmente zusätzlich unspezifisch mit dem Trägermaterial. Eine

Beeinträchtigung der Antikörperfunktionalität durch die kurzzeitige Exposition gegenüber reduzierenden Reagenzien konnte nicht festgestellt werden. Unter den gewählten Elutionsbedingungen 10 mM L-Cystein (Inkubationszeit: 1 h bei 4°C) wurden die für eine funktionelle Struktur entscheidenden intrachenen Disulfidbrücken der *immunglobulin fold*-Domänen nicht reduziert.

Für eine Charakterisierung von Proteinen mit polyanionischen Fusionspeptiden im präparativen Maßstab ist die entwickelte Methode geeignet. Begrenzt ist derzeit der Einsatz für eine selektive Reinigung von Proteinen aus einem Rohextrakt. Aufgrund der Konkurrenz durch Wechselwirkung der DNA mit den Lysinpeptiden des Trägermaterials ist die geringe ionische Kapazität sehr schnell erreicht, so daß nur geringe Mengen an Protein isoliert werden konnten. Der Aufreinigungsfaktor liegt dabei bei 73.

Daher ist es anzustreben, die Beladungsdichte des Trägermaterials weiter zu erhöhen. An der verwendeten CNBr-aktivierten Sepharose *fast flow* können nach Angaben des Herstellers pro ml Matrix maximal 13-26 mg α -Chymotrypsinogen immobilisiert werden. Daraus folgt für eine Ein-Punkt-Fixierung der α -Chymotrypsinogen-Moleküle (22 kD) eine Menge an aktivierten Gruppen von mindestens 0,6-1,2 $\mu\text{mol/ml}$. Diese wurden im vorliegenden Fall vermutlich nur zu etwa 30 % für die Kopplung der ACK8A-Peptide ausgenutzt (220 nmol gekoppeltes Lysinpeptid/ml Matrix). Die Kapazität der Säule für gereinigte α -GlucE10C wurde zu 12 nmol/ml Gelmaterial ermittelt. Mit Hilfe von Bindungsexperimenten wurde die Kooperativität der Interaktion zwischen den polyionischen Fusionspeptiden und den an der Matrix immobilisierten Peptiden untersucht. Die Auswertung der experimentellen Daten mit der empirisch ermittelten Beziehung nach Hill resultiert in einer Kooperativitätskonstanten von $5,1 \pm 0,9$. Die Kooperativität der Wechselwirkung ist somit ähnlich wie die Interaktion von α -GlucE10C mit dem Gelmaterial Fractoprep DEAE. Dieses wurde für die Matrix-unterstützte Renaturierung verwendet. Die Kooperativitätskonstante gibt unter den vorliegenden Versuchsbedingungen an, wie viele monovalente Gegenionen für eine vollständige Dissoziation der komplementär geladenen polyionischen Peptide erforderlich sind. Die an die Gelmatrix gekoppelten Lysinpeptide haben maximal 7 positive Nettoladungen. Berücksichtigt man zusätzlich die negative Ladung des partiell deprotonierten Cystein-Restes, so sind die vorhandenen positiven Ladungen nahezu vollständig an der Interaktion beteiligt.

Ebenso wie die Sepharose-ACK8A-Säule wurde eine Sepharose-ACE10 hergestellt und für die Reinigung eines Proteins mit komplementär geladenem Fusionspeptid verwendet. Im Fall

der α -Glucosidase-Variante R10C- α -Gluc wurde allerdings festgestellt, daß das mittels konventionellem Kationenaustauscher vorgereinigte Protein zwar über ionische Wechselwirkungen mit der Sepharose-ACE10 interagiert, jedoch nicht quantitativ gekoppelt werden konnte. Aufgrund der ionischen Interaktion von Gelmaterial und Fusionsprotein ist davon auszugehen, daß die geladenen Aminosäuren der polyionischen Peptide zumindestens partiell vorhanden sind. Das bedeutet implizit, daß die Cystein-Reste vorhanden sind, da sie sich zum einen in unmittelbarer Matrixnähe befinden und im Falle des Fusionsproteins zwischen der N-terminalen polyionischen Sequenz und dem Fusionsprotein eingefügt wurden. Für das Ausbleiben der kovalenten Verknüpfung mittels Disulfidbrücke kommen daher zwei Erklärungsmöglichkeiten in Betracht: zum einen die sterische Hinderung aufgrund der Position der Cystein-Reste und zum anderen eine herabgesetzte Reaktivität des Cystein-Restes der Matrix. Dieser Cystein-Rest befindet sich in direkter Nachbarschaft zu negativ geladenen Glutaminsäure-Resten, und wurde unter den vorliegenden Bedingungen möglicherweise nicht in ein gemischtes Disulfid mit dem ebenfalls negativ geladenen Glutathion überführt. Im Fall der Kopplung von α -GlucE10C an Sepharose-ACK8A wurde der den positiven Ladungen benachbarte Cystein-Rest in ein gemischtes Disulfid überführt. Der nachfolgende nucleophile Angriff des C-terminalen Cystein-Restes von α -GlucE10C erfolgte von Seiten des Thiolatanions, in dessen unmittelbarer Nachbarschaft weitere negative Ladungen vorhanden waren. Im vorliegenden Fall ist die Situation genau entgegengesetzt.

Das läßt vermuten, daß die Position des Cystein-Restes im polyionischen *tag* bzw. innerhalb der an die Matrix gekoppelten Peptide eine Rolle spielt.

Um zwischen der sterischen Hinderung und der veränderten Reaktivität des Cystein-Restes als mögliche Ursache für die ausbleibende kovalente Kopplung unterscheiden zu können, könnte die Position des Cystein-Restes in den synthetischen Peptiden variiert werden, so daß z. B. eine Sepharose-AE10C mit C-terminalem Cystein-Rest zur Verfügung steht. Desweiteren könnten die synthetischen Peptide durch Anfügen eines hydrophilen Linkers an den N-Terminus flexibler gestaltet werden. Dieser Linker könnte beispielsweise aus Glycin und/oder Serin-Resten bestehen. Möglicherweise ist die Reaktivität des Cystein-Restes der mit negativ geladenen Peptiden modifizierten Matrix herabgesetzt, so daß unter den gewählten Bedingungen kein gemischtes Disulfid mit dem ebenfalls negativ geladenen GSSG ausgebildet wird. Nach Immobilisierung der polykationischen Fusionsproteine über ionische Wechselwirkungen könnte die Ausbildung der Disulfidbrücke in Gegenwart eines *oxidoshuffling*-Systems durchgeführt werden.

Es wurde eine chromatographische Methode zur selektiven Reinigung und Charakterisierung von Proteinen mit polyanionischen Fusionspeptiden entwickelt. Diese Methode wurde als kovalente Affinitätschromatographie bezeichnet und beruht auf der Verwendung eines "mixed mode adsorbents". Für eine Charakterisierung und Feinreinigung von Proteinen im präparativen Maßstab ist das zur Zeit zur Verfügung stehende Gelmaterial geeignet. Für die präparative Reinigung von Proteinen aus einem Rohextrakt müßte die Dichte funktioneller Gruppen weiter erhöht werden.

4.4 Bildung eines Antikörperfragment-Enzym-Konjugates durch gerichtete Assoziation mittels polyionischer Fusionspeptide

Wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit war die Etablierung der polyionischen Fusionspeptide als neuartiges Heterodimerisierungsmodul. Aufbauend auf Ergebnissen mit synthetischen Peptiden (Stubenrauch *et al.*, 1999; Stubenrauch *et al.*, 2000; Stubenrauch, 2000; Richter *et al.*, 2001) wurden komplementär geladene polyionische Fusionspeptide, die einen zusätzlichen Cystein-Rest enthielten, für die gerichtete Assoziation und kovalente Verknüpfung eines Antikörperfragmentes mit einem Enzym verwendet. Dabei wurden zum einen die Bedingungen optimiert, unter denen ein stabiles Assoziationsprodukt gebildet wird. Zum anderen wurde das Assoziationsprodukt charakterisiert. Neben dem Nachweis der biophysikalischen Eigenschaften wie Molekulargewicht und Struktur wurde insbesondere die Bifunktionalität des Konstruktes eingehend untersucht.

In der Literatur ist eine Vielzahl von Heterodimerisierungsmodulen beschrieben, die in der Einleitung bereits vorgestellt wurden. Besonders intensiv untersucht wurde die Dimerisierung von α -helikalen *coiled coils*. Da die in der Natur vorkommenden *coiled coils* meist als Homodimere vorliegen, wurden durch *de novo*-Design Sequenzen entwickelt, die bevorzugt Heterodimere und -oligomere bilden (Graddis *et al.*, 1993; O'Shea *et al.*, 1993; Nautiyal *et al.*, 1995; Jelesarov und Bosshard, 1996). Problematisch bei diesen im isolierten Zustand als synthetische Peptide untersuchten und optimierten Modulen ist ihre Anwendung in Fusionsproteinen. Häufig werden die entsprechenden Fusionsproteine zum einen in nur geringen Mengen exprimiert und zum anderen proteolytisch abgebaut (Arndt *et al.*, 2000; Müller, 2000). Daher wurde dazu übergegangen, die Sequenzen *in vivo* zu optimieren (Arndt *et al.*, 2000).

Polyionische Fusionspeptide können eine vielversprechende Alternative zu bestehenden Dimerisierungsmodulen darstellen. Aus den vorangegangenen Abschnitten geht hervor, daß

polyionische Fusionspeptide weitgehend kompatibel mit einer hohen Expression der Proteine in *Escherichia coli* sind, die Funktionalität und Aktivität der untersuchten Proteine nicht beeinträchtigen und zusätzlich als spezifische Reinigungstags fungieren können. Dieses sind gute Voraussetzungen für eine Anwendung als Heterodimerisierungsmotiv.

Die Assoziation des Antikörperfragmentes FabE10C und der α -Glucosidase mit N- bzw. C-terminalem polykationischen Fusionspeptid war unter leicht oxidierenden Bedingungen begünstigt (2,4 mM GSSG, 0,6 mM GSH). Unter diesen Bedingungen war die Stabilität des disulfidverbrückten Fab-Fragmentes gewährleistet. Bei Assoziation von α -GlucR10C und FabE10C wurde nach etwa 6 h die maximal gebildete Menge an Chimäre erreicht. Bei diesen Versuchen wurden beide Komponenten in äquimolaren Konzentration von 1 μ M eingesetzt. Die Konzentrationsabhängigkeit der Assoziationskinetik wurde nicht untersucht.

Die Selektivität der Assoziationsmethode wurde gezeigt: Homodimere konnten selbst bei Assoziation der Komponenten in Gegenwart hoher Ionenstärke (1 M NaCl) nicht nachgewiesen werden. Unter diesen Bedingungen lag die Ausbeute der Chimäre ebenfalls unterhalb der Nachweisgrenze. Daraus kann gefolgert werden, daß die Assoziation über die komplementär geladenen Fusionspeptide eine Voraussetzung zur Bildung der spezifischen Disulfidbrücke ist. Desweiteren konnten ebenfalls keine Dimere detektiert werden, wenn nicht-modifizierte Wildtypproteine im Ansatz verwendet wurden. Die interchenare Disulfidbrücke des authentischen Fab-Fragmentes ist unter den gewählten Assoziationsbedingungen stabil, so daß kein unspezifisches Disulfidshuffling mit freien Cystein-Resten von α -GlucR10C, R10C- α -Gluc oder dem Wildtypprotein der α -Glucosidase festgestellt werden konnte. Daraus kann abgeleitet werden, daß die kovalente Verbrückung über die Cystein-Reste der angefügten polyionischen Peptidsequenzen erfolgt.

Im Falle des FdE10C-Fragmentes befindet sich N-terminal vom polyionischen Fusionspeptid ein weiterer Cystein-Rest. Dieser ist an der interchenaren Disulfidbrücke zwischen Fd-Fragment und leichter Kette κ beteiligt. Bei der Assoziation mit R10C- α -Gluc kann der Cystein-Rest des Fusionspeptides der α -Glucosidase ein Redoxshuffling nicht nur mit dem Cystein-Rest des Fab-tags, sondern auch mit dem Cystein-Rest, der N-terminal des tags liegt, eingehen. Dadurch wird die Disulfidbrücke zwischen Fd-Fragment und κ -Kette gespalten. Diese Nebenreaktion wurde bei der Assoziation von FabE10C mit R10C- α -Gluc in sehr geringem Maße beobachtet. Da die interchenare Disulfidbrücke zwischen Fd-Fragment und κ -Kette lediglich stabilisierende Bedeutung für das Antikörperfragment hat (Lilie *et al.*, 1995b), ist dadurch die Funktionalität des Konjugates nicht beeinträchtigt.

Auffallend war, daß die Heterodimerisierung von FabE10C und R10C- α -Gluc nur zu etwa 30 % erfolgte, wenn beide Komponenten in äquimolaren Konzentrationen von 1 μ M im Ansatz vorhanden waren. Im Gegensatz dazu war die gerichtete Assoziation und kovalente Verbrückung der synthetischen Peptide quantitativ. Allerdings wurden dabei Peptidkonzentrationen zwischen 30 μ M und 50 μ M verwendet. Auch im Falle der Dimerisierung über *coiled-coil*-Motive wurden diese in Konzentrationen von 10 μ M eingesetzt (O'Shea *et al.*, 1989; 1992). Durch Variation des Verhältnisses von FabE10C und R10C- α -Gluc konnte gezeigt werden, daß die Dissoziationskonstante der Chimäre unter Redoxbedingungen $0,5 \pm 0,2 \mu$ M (20°C) beträgt. Um einen höheren Umsatz zu erreichen, sind daher Konzentrationen erforderlich, die deutlich über dem K_d -Wert liegen. So konnte beispielsweise durch Assoziation in Gegenwart eines 5fachen molaren Überschusses des FabE10C-Fragmentes gegenüber R10C- α -Gluc eine Ausbeute der Chimäre von 60 % erzielt werden. Die Dissoziationskonstante isolierter *coiled coil*-Peptide, die über eine zusätzliche Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, liegt im Bereich von 24 nM (20°C) (O'Shea *et al.*, 1992). In der gleichen Größenordnung liegt die Dissoziationskonstante eines kürzlich durch *library versus library Screening* isolierten *coiled coil*-Motives, das mit DHFR-Fragmenten fusioniert war (Arndt *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu diesen optimierten *coiled coil*-Sequenzen liegt der K_d -Wert des Heterodimers c-Myc/Max im Bereich von 60 μ M (Muhle-Goll, 1995).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die unvollständige Assoziation ist der proteolytische Abbau des Fusionspeptides. Im vorliegenden Fall wurde die Identität des FabE10C-Fragmentes durch kovalente Chromatographie und die von R10C- α -Gluc durch N-terminale Sequenzierung nachgewiesen. Bei der Assoziation von FabE10C mit der C-terminal modifizierten α -Glucosidase-Variante α -Gluc-R10C wurde festgestellt, daß nach Separierung der nicht-reagierenden Edukte FabE10C weiterhin assoziationskompetent war, α -GlucR10C allerdings nicht. Da von diesem Protein eine Interaktion mit einem Kationenaustauscher nachgewiesen werden konnte, ist in diesem Fall der C-terminale Cystein-Rest, bedingt durch partielle Proteolyse oder chemische Modifikation für die Ausbildung einer Disulfidbrücke wahrscheinlich nicht mehr zugänglich.

Durch Gelfiltration konnte das Konjugat bestehend aus FabE10C und R10C- α -Gluc bzw. aus FabE10C und α -GlucR10C von den Edukten getrennt und näher charakterisiert werden.

Durch analytische Ultrazentrifugation wurde die Homogenität der Spezies, die mit einem apparenten Molekulargewicht von 130 ± 10 kD sedimentierte, bestätigt. Durch Fern-UV-Spektroskopie wurde nachgewiesen, daß die Sekundärstrukturelemente der Einzelkomponenten im konjugierten Zustand weitgehend erhalten bleiben. Die Bifunktionalität des Konjugates wurde zum einen in einem modifizierten ELISA untersucht. Zum anderen wurde die Funktionalität der Einzelkomponenten im isolierten und konjugierten Zustand analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Antigenbindungseigenschaften des Fab-Fragmentes durch die kovalente Verknüpfung mit α -Glucosidase nicht beeinträchtigt werden. Identische K_d -Werte von 28 ± 11 nM bzw. 28 ± 9 nM für das konjugierte bzw. freie Antikörperfragment wurden bestimmt. Darüber hinaus bleiben die enzymatischen Eigenschaften der α -Glucosidase erhalten. Die spezifische Aktivität bezogen auf molare Größen stimmt für die nicht-konjugierte und die mit FabE10C kovalent verknüpfte Variante überein. Die Substrataffinität, charakterisiert durch K_M -Werte von $200 \mu\text{M}$ und $195 \mu\text{M}$ für das freie bzw. konjugierte Enzym, entspricht dem in der Literatur beschriebenen Wert für das Wildtypprotein (Stempfer *et al.*, 1996b).

Daraus leitet sich ein großer Vorteil der vorgestellten Methode zu herkömmlichen Verfahren zur kovalenten Verknüpfung von Proteinen ab. Während sehr große Fusionsproteine häufig in *Escherichia coli* nicht exprimiert werden können, wurde hier eine Methode vorgestellt, die es ermöglicht, Proteine mit polyionischen Fusionspeptiden separat in ausreichenden Mengen in *Escherichia coli* zu produzieren. Nach Renaturierung und/oder Reinigung erfolgt die Assoziation zu höhermolekularen Komplexen. Die vorgestellte Kopplungsmethode wurde bereits erfolgreich für die Entwicklung eines Zelltyp-spezifischen nicht-viralen Vektorsystems eingesetzt. Dieses könnte beispielsweise in der Gentherapie Anwendung finden (Stubenrauch *et al.*, 2001). Insbesondere bei oligomeren Proteinkomplexen ist die separate Produktion der Einzelkomponenten unumgänglich. Im vorliegenden Fall (Stubenrauch *et al.*, 2001) wurde in einen exponierten Loop des Polyoma-Virushüllproteins VP1 die polyionische Sequenz E8C inseriert. Durch die spezifische Interaktion konnte ein Fv-Fragment mit dem C-terminalen Fusionspeptid R8C auf der Oberfläche der zu virusanalogen Partikeln assemblierten VP1-Variante verankert werden. Dieses System wurde in *in vitro*-Experimenten erfolgreich für ein zelltyp-spezifisches *targeting* eingesetzt (Stubenrauch *et al.*, 2001).

Ein weiteres Anwendungsgebiet für die spezifische Assoziation und kovalente Verknüpfung ist die Bildung bispezifischer und bifunktionaler Antikörperfragmente. Während Stubenrauch

et al. (2001) an die variable Domäne der schweren Kette eines Fv-Fragmentes ein polykationisches Fusionspeptid anfügten, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Modifizierung und Renaturierung eines Fab-Fragments mit einem polyanionischen Fusionspeptid vorgestellt. Prinzipiell ist somit die Modifikation spezifischer Antikörperfragmente möglich. Die Bedeutung bispezifischer und bifunktionaler Antikörperfragmente für die Diagnose und Therapie beispielsweise von Krebserkrankungen wurde bereits in der Einleitung vorgestellt. Neben der Kopplung zweier Antikörperfragmente ist auch die Kopplung eines Antikörperfragmentes mit einem Enzym oder einem Toxin denkbar.

In diesem Zusammenhang wurde vor kurzem ein sogenannter ATTEMPTS-*approach* (ATTEMPTS = *antibody targeted triggered electrically modified prodrug type strategy*) beschrieben (Liang *et al.*, 2000a). Hierbei wurde ein Anti-Fibrin-Antikörper mit dem Gewebeplasminogenaktivator (tPA) über ionische Wechselwirkungen gekoppelt (Liang *et al.*, 2000b). Während der Antikörper chemisch mit Heparin konjugiert wurde, wurde in die 1. Kringel-Domäne von tPA das Peptid R7 inseriert (Song *et al.*, 2000). Die chemische Kopplung synthetischer R7-Peptide an tPA gelang nur mit sehr geringen Ausbeuten und führte zu einem Aktivitätsverlust des Proteins (Liang *et al.*, 2000a). Durch Assoziation des modifizierten tPA mit Heparin wurde die tPA-Aktivität inhibiert. Der Komplex konnte *in vitro* zu Fibringerinnseln dirigiert werden. Nach Dissoziation des über elektrostatische Wechselwirkungen stabilisierten Komplexes in Gegenwart von Protamin, wurde aktives tPA freigesetzt. Das beschriebene Konstrukt wurde nicht durch eine zusätzliche Disulfidbrücke verbunden.

Für die Anwendung der bifunktionalen bzw. bispezifischen Konjugate *in vivo* lassen sich aufgrund der vorhandenen *in vitro*-Daten einige Prognosen treffen: Die intermolekulare Disulfidbrücke im Kontext der polyionischen Peptide sollte im Serum stabil sein. Das Redoxmilieu in humanem Plasma wird durch ein GSSG:GSH-Verhältnis von 1:20 charakterisiert (0,14 μM GSSG / 2,8 μM GSH) (Jones *et al.*, 2000). Das entspricht einem $[\text{GSH}]^2/[\text{GSSG}]$ -Term von 10^{-5} M. Nicht berücksichtigt bei diesen Untersuchungen wurden weitere Cystein-haltige Komponenten des Plasma. Im Vergleich dazu ist das intrazelluläre Redoxmilieu reduzierender. Das GSSG:GSH-Verhältnis liegt in der Zelle im Bereich zwischen 1:30 und 1:100, wobei für das Kompartiment des endoplasmatischen Retikulums ein Verhältnis von 1:1 bis 1:3 bestimmt wurde (Hwang *et al.*, 1992). Fraglich ist die intrazelluläre Stabilität des Konjugates, wenn dieses durch Endocytose aufgenommen wird. Da das Hauptanwendungsgebiet der Kopplungsmethode derzeit die Bildung von Konjugaten

für ein Zelltyp-spezifisches *targeting* ist, ist das Aufrechterhalten des konjugierten Zustandes nach Aufnahme in die Zelle jedoch nicht erforderlich.

Untersuchungen zur Immunogenität der polyionischen Sequenzen liegen derzeit nicht vor. Falls sich die Fusionspeptide als immunogen erweisen sollten, müßten sie so konstruiert werden, daß sie die Kopplung zweier Proteine über eine Disulfidbrücke gewährleisten, ohne daß sich diese kovalente Assoziation nach proteolytischer Abspaltung des polyionischen Anteils des Fusionspeptides löst.

Zusammenfassend kann aus den vorgestellten Ergebnissen eine Multifunktionalität polyionischer Fusionspeptide abgeleitet werden. Die dargestellten Ergebnisse liefern eine Grundlage für die Übertragung der Reinigungs- und Kopplungsstrategien auf praxisrelevantere Proteine. Hierbei wird sich zeigen, ob sich die vorgestellten Strategien allgemein bewähren oder fallspezifisch modifiziert werden müssen.

5 Zusammenfassung

Die moderne Biotechnologie ermöglicht es, Proteine mit unterschiedlichen Funktionen miteinander zu kombinieren. Dieses kann entweder durch direkte Fusion oder durch die Entwicklung spezifischer Dimerisierungs- bzw. Oligomerisierungsdomänen erreicht werden. Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, den Einsatz polyionischer Fusionspeptide für eine gerichtete Assoziation und kovalente Verbrückung von Proteinen zu untersuchen und darüber hinaus die vielfältigen Anwendungsgebiete der geladenen Aminosäuresequenzen darzustellen.

Als polyionische Fusionspeptide werden in diesem Zusammenhang Sequenzen bezeichnet, die eine Abfolge entweder positiv oder negativ geladener Aminosäurereste und einen zusätzlichen Cystein-Rest enthalten.

Es konnte gezeigt werden, daß polyionische Fusionspeptide (a) mit einer hohen Expression des Zielproteins in rekombinanten *Escherichia coli* kompatibel sind, effizient für die (b) Reinigung und (c) Matrix-unterstützte Renaturierung von Proteinen verwendet werden können, sowie (d) als Modul für eine gerichtete Assoziation und kovalente Verbrückung fungieren.

Als Fusionspartner wurde zum einen die α -Glucosidase PI aus *Saccharomyces cerevisiae* und zum anderen das Fab-Fragment des monoklonalen Antiköpers MAK33 verwendet.

Es konnte gezeigt werden, daß die Expression der modifizierten Proteine in *Escherichia coli* bei der Verwendung von C-terminalen Fusionspeptiden nicht beeinträchtigt wird. Im Gegensatz dazu führten N-terminale Fusionspeptide zu einem herabgesetzten Expressionsniveau.

Die Fusionsproteine konnten über die geladenen Reinigungstags effizient aus einem *Escherichia coli*-Rohextrakt isoliert werden. Ebenfalls wurde die Reinigung von in Form von *inclusion bodies* akkumuliertem Protein unter denaturierenden Bedingungen vorgestellt.

Sowohl für das Fab-Fragment als auch für die α -Glucosidase mit polyanionischem Fusionspeptid führt vermutlich der löslichkeitsvermittelnde Einfluß der Fusionspeptide zu einer signifikanten Steigerung der Renaturierungsausbeute im Vergleich zum nicht-modifizierten Protein.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde erstmals die Matrix-unterstützte Renaturierung eines Proteins mit einem polyanionischen Fusionspeptid beschrieben. Es wurde festgestellt, daß die Reaktivierungsausbeute der α -Glucosidase mit Decaglutamatfusionspeptid signifikant von der Art des verwendeten Trägermaterials und den funktionellen Gruppen abhängt sowie von der Beladungsdichte. Von den untersuchten Gelmaterialien führte ein Trägermaterial auf Vinylpolymerbasis mit amidischer Quervernetzung und der funktionellen Gruppe DEAE zu den höchsten Reaktivierungsausbeuten bei einer optimalen Beladung von 1 mg Protein/ml Matrix.

Problematisch bei der Verwendung C-terminaler polyionischer Fusionspeptide ist die zweifelsfreie Bestimmung der Identität des Carboxyl-Terminus. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit eine chromatographische Methode entwickelt, die auf der ionischen Wechselwirkung und kovalenten Verbrückung von komplementär geladenen Aminosäuresequenzen, die einen zusätzlichen Cystein-Rest enthalten, beruht. Die Methode wird als kovalente Affinitätschromatographie bezeichnet und konnte erfolgreich für die Feinreinigung und Charakterisierung von Proteinen mit polyanionischem Fusionspeptid verwendet werden.

Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit war die Anwendung polyionischer Fusionspeptide als neuartiges Heterodimerisierungsmodul für die gerichtete Assoziation und kovalente Verbrückung von Proteinen. Hierzu wurde ein bifunktionelles Konjugat bestehend aus α -Glucosidase mit polykationischem Fusionspeptid und dem Fab-Fragment mit polyanionischem Fusionspeptid gebildet. Die Assoziationsreaktion wurde untersucht. Unter den gewählten Redoxbedingungen (2,4 mM GSSG, 0,6 mM GSH) ist die Bildung des Konjugates reversibel und wird durch eine Dissoziationskonstante von $0,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$ charakterisiert.

Desweiteren konnte gezeigt werden, daß die biophysikalischen und funktionellen Eigenschaften der Einzelkomponenten durch die Konjugation und kovalente Verbrückung nicht beeinträchtigt werden. Hierzu wurde zum einen die Sekundärstruktur der Einzelkomponenten und des Konjugates mittels Fern-UV-CD analysiert und zum anderen die enzymatische Aktivität der α -Glucosidase und die Antigenbindungsfähigkeit des Antikörperfragmentes untersucht. Sowohl die spezifische Aktivität des Enzyms mit 11 U/nmol als auch die Substrataffinität für das artifizielle Substrat *p*-NpG blieben unverändert. Ähnliches wurde für die Antigenbindungseigenschaften des Fab-Fragmentes festgestellt, was

zu identischen Dissoziationskonstanten des Antigen-Antikörperfragment-Komplexes von 28 nM im konjugierten bzw. isolierten Zustand führt.

Zusammenfassend kann aus den vorliegenden Daten über die Anwendungsmöglichkeiten polyionischer Fusionspeptide eine Multifunktionalität für die Reinigung, Renaturierung und gerichtete Assoziation von Proteinen abgeleitet werden. Diese kann gezielt für die Entwicklung von Proteinen mit neuartigen Funktionen eingesetzt werden und hat somit ein interessantes Zukunftspotential.

6 Literaturverzeichnis

- Altamirano, M. M., Golbik, R., Zahn, R., Buckle, A. M., und Fersht, A. R.: Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. (1997) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 3576-3578.
- Altamirano, M. M., Garcia, C., Possani, L. D., und Fersht, A. R.: Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. (1999) *Nat. Biotechnol.* **17**, 187-191.
- Ambrosius, D., Dony, C., und Rudolph, R.: Verbesserte Aktivierung von rekombinanten Proteinen. (1992) Europäisches Patent Nr. 0500108 A2.
- Andrade, E. V., Albuquerque, F. C., Moraes, L. M., Brigido, M. M., und Santos-Silva, M. A.: Single-chain Fv with Fc fragment of the human IgG1 tag: construction, *Pichia pastoris* expression and antigen binding characterization. (2000) *J. Biochem. (Tokyo)* **128**, 891-895.
- Antosiewicz, J., McCammon, J. A., und Gilson, M. K.: Prediction of pH-dependent properties of proteins. (1994) *J. Mol. Biol.* **238**, 415-436.
- Arndt, K. M., Pelletier, J. N., Müller, K. M., Alber, T., Michnick, S. W., und Plückthun, A.: A heterodimeric coiled-coil peptide pair selected *in vivo* from a designed library-versus-library ensemble. (2000) *J. Mol. Biol.* **295**, 627-639.
- Atkins, P. W.: Physikalische Chemie. (1987) 1. Auflage, VCH-Verlag, Weinheim.
- Augustine, J.G., de La Calle, A., Knarr, G., Buchner und J. Frederick, C.A.: The crystal structure of the Fab fragment of the monoclonal antibody MAK33: Implications for folding and interaction with the chaperone BiP. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 3287-3294.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K.: (1997) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Baba, Y.: Development of novel biomedicine based on genome science. (2001) *Eur. J. Pharm. Sci.* **13**, 3-4.
- Bachmair, A., Finley, D., und Varshavsky, A.: *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. (1986) *Science* **234**, 179-186.
- Bachmann, A.: Renaturierung von matrixgebundenen Proteinen. (1996) Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Bachmann, B. J.: Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 7. (1983) *Microbiol. Rev.* **47**, 180-230.

- Bashford, D., Case, D. A., Dalvit, C., Tennant, L., und Wright, P. E.: Electrostatic calculations of side-chain pK(a) values in myoglobin and comparison with NMR data for histidines. (1993) *Biochemistry* **32**, 8045-8056.
- Berdichevsky, Y., Lamed, R., Frenkel, D., Gophna, U., Bayer, E. A., Yaron, S., Shoham, Y., und Benhar, I.: Matrix-assisted refolding of single-chain Fv-cellulose binding domain fusion proteins. (1999) *Protein Expr. Purif.* **17**, 249-259.
- Berggren, K., Nilsson, A., Johansson, G., Bandmann, N., Nygren, P. A., und Tjerneld, F.: Partitioning of peptides and recombinant protein-peptide fusions in thermoseparating aqueous two-phase systems: effect of peptide primary structure. (2000) *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **743**, 295-306.
- Bergmeyer, H. U.: (1983) *Methods of enzymatic analysis*. **3**, 510-540.
- Bill, E., Lutz, U., Karlsson, B. M., Sparrman, M., und Allgaier, H.: Optimization of protein G chromatography for biopharmaceutical monoclonal antibodies. (1995) *J. Mol. Recognit.* **8**, 90-94.
- Bradford, M. M.: A rapid und sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brennan, M., Davison, P. F., und Paulus, H.: Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. (1985) *Science* **229**, 81-83.
- Brewer, S. J. und Sassenfeld, H. M.: The purification of recombinant proteins using C-terminal polyarginine fusions. (1985) *Trends Biotechnol.* **3**, 119-122.
- Brinkmann, U., Mattes, R. E., und Buckel, P.: High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. (1989) *Gene* **85**, 109-114.
- Brinkmann, U.: Recombinant immunotoxins: protein engineering for cancer therapy. (1996) *Mol. Med. Today* **2**, 439-446.
- Brinkmann, U.: Recombinant antibody fragments and immunotoxin fusions for cancer therapy. (2000) *In vivo* **14**, 21-27.
- Brocklehurst, K., Carlsson, J., Kierstan, M. P., und Crook, E. M.: Covalent chromatography. Preparation of fully active papain from dried papaya latex. (1973) *Biochem. J.* **133**, 573-584.
- Brosius, J., Ullrich, A., Raker, M. A., Gray, A., Dull, T. J., Gutell, R. R., und Noller, H. F.: Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the rrnB ribosomal RNA operon of *E. coli*. (1981) *Plasmid* **6**, 112-118.

- Buchner, J.: Renaturierung eines monoklonalen Antikörpers (k/IgG1). (1987) Diplomarbeit an der Universität Regensburg.
- Buchner, J. und Rudolph, R.: Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*. (1991) *Biotechnology (N. Y.)* **9**, 157-162.
- Buckel, P., Hubner-Parajsz, C., Mattes, R., Lenz, H., Haug, H., und Beaucamp, K.: Cloning and nucleotide sequence of heavy- and light-chain cDNAs from a creatine-kinase-specific monoclonal antibody. (1987) *Gene* **51**, 13-19.
- Bulaj, G., Kortemme, T., und Goldenberg, D. P.: Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. (1998) *Biochemistry* **37**, 8965-8972.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., und Short, J. M.: XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. (1987) *Biotechniques* **5**, 376-379.
- Bücheler, U.: Expression von Fd-Fragment des monoklonalen Antikörpers MAK33 in *E. coli*. (1989) Diplomarbeit an der Universität Stuttgart.
- Canevari, S., Mezzanzanica, D., Mazzoni, A., Negri, D. R., Ramakrishna, V., Bolhuis, R. L., Colnaghi, M. I., und Bolis, G.: Bispecific antibody targeted T cell therapy of ovarian cancer: clinical results and future directions. (1995) *J. Hematother.* **4**, 423-427.
- Canevari, S., Mezzanzanica, D., Mazzoni, A., Negri, D. R., Figini, M., Ramakrishna, V., Bolis, G., und Colnaghi, M. I.: Approaches to implement bispecific antibody treatment of ovarian carcinoma. (1997) *Cancer Immunol. Immunother.* **45**, 187-189.
- Cao, Y. und Suresh, M. R.: Bispecific antibodies as novel bioconjugates. (1998) *Bioconjug. Chem.* **9**, 635-644.
- Carlsson, J., Axen, R., und Unge, T.: Reversible, covalent immobilization of enzymes by thiol-disulphide interchange. (1975) *Eur. J. Biochem.* **59**, 567-572.
- Carter, P., Ridgway, J., und Zhu, Z.: Toward the production of bispecific antibody fragments for clinical applications. (1995) *J. Hematother.* **4**, 463-470.
- Carter, P.: Bispecific human IgG by design. (2001) *J. Immunol. Methods* **248**, 7-15.
- Chang, J. T., Green, C. B., und Wolf, R. E., Jr.: Inhibition of translation initiation on *Escherichia coli* gnd mRNA by formation of a long-range secondary structure involving the ribosome binding site and the internal complementary sequence. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 6560-6567.
- Chaudhuri, J. B., Batas, B., und Guise, A. D.: Improving protein refolding yields by minimizing aggregation. (1996) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **782**, 495-505.

- Chaudri, Z. N., Bartlet-Jones, M., Panayotou, G., Klonisch, T., Roitt, I. M., Lund, T., und Delves, P. J.: Dual specificity antibodies using a double-stranded oligonucleotide bridge. (1999) *FEBS Lett.* **450**, 23-26.
- Chen, J., Skehel, J. J., und Wiley, D. C.: A polar octapeptide fused to the N-terminal fusion peptide solubilizes the influenza virus HA2 subunit ectodomain. (1998) *Biochemistry* **37**, 13643-13649.
- Chrnyk, B. A. und Matthews, C. R.: Role of diffusion in the folding of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*. (1990) *Biochemistry* **29**, 2149-2154.
- Cochlovius, B., Kipriyanov, S. M., Stassar, M. J., Christ, O., Schuhmacher, J., Strauss, G., Moldenhauer, G., und Little, M.: Treatment of human B cell lymphoma xenografts with a CD3 x CD19 diabody and T cells. (2000a) *J. Immunol.* **165**, 888-895.
- Cochlovius, B., Kipriyanov, S. M., Stassar, M. J., Schuhmacher, J., Benner, A., Moldenhauer, G., und Little, M.: Cure of Burkitt's lymphoma in severe combined immunodeficiency mice by T cells, tetravalent CD3 x CD19 tandem diabody, and CD28 costimulation. (2000b) *Cancer Res.* **60**, 4336-4341.
- Creighton, T. E.: Folding of proteins adsorbed reversibly to ion-exchange resins. in: Oxender, D. L. (Hrsg.) (1986) *UCLA Symposia on molecular and cellular biology*, 249-258.
- Cumber, A. J., Ward, E. S., Winter, G., Parnell, G. D., und Wawrzynczak, E. J.: Comparative stabilities *in vitro* and *in vivo* of a recombinant mouse antibody FvCys fragment and a bisFvCys conjugate. (1992) *J. Immunol.* **149**, 120-126.
- Cutler, P.: Size-exclusion chromatography. (1996) *Methods Mol. Biol.* **59**, 255-267.
- Dachs, G. U., Dougherty, G. J., Stratford, I. J., und Chaplin, D. J.: Targeting gene therapy to cancer: a review. (1997) *Oncol. Res.* **9**, 313-325.
- De Bernardez Clark, E., Schwarz, E., und Rudolph, R.: Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding. (1999) *Methods Enzymol.* **309**, 217-236.
- De Bernardez Clark, E., und Georgiou, G.(Hrsg.): Protein folding: developed from a symposium sponsored by the divisions of biochemical technology and biological chemistry at the 199th national meeting of the American Chemical Society, Boston, Massachusetts, april 22-27 1990. (1991) American Chemical Society, Washington, DC
- de Kruif, J., und Logtenberg, T.: Leucine zipper dimerized bivalent and bispecific scFv antibodies from a semi-synthetic antibody phage display library. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 7630-7634.
- Deo, Y. M., Graziano, R. F., Repp, R., und van de Winkel, J. G.: Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc gamma R-directed immunotherapies. (1997) *Immunol. Today* **18**, 127-135.

- Donch, J., und Greenberg, J.: Genetic analysis of *lon* mutants of strain K-12 of *Escherichia coli*. (1968) *Mol. Gen. Genet.* **103**, 105-115.
- Dong, X. Y., Yang, H., und Sun, Y.: Lysozyme refolding with immobilized GroEL column chromatography. (2000) *J. Chromatogr. A* **878**, 197-204.
- Dübel, S., Breitling, F., Kontermann, R., Schmidt, T., Skerra, A., und Little, M.: Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (scFv). (1995) *J. Immunol. Methods* **178**, 201-209.
- Dübel, S.: Reconstitution of human pancreatic Rnase from two separate fragments fused to different single chain antibody fragments: On the way to binary immunotoxins. (1999) *Tumor Targeting* **4**, 37-46.
- Ellman, G. L.: Tissue sulfhydryl groups. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77.
- Enfors, S. O., Hellebust, H., Kohler, K., Strandberg, L., und Veide, A.: Impact of genetic engineering on downstream processing of proteins produced in *E. coli*. (1990) *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **43**, 31-42.
- Evangelista Dyr, J., und Suttner, J.: Separation used for purification of recombinant proteins. (1997) *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **699**, 383-401.
- Fahey, E. M., Chaudhuri, J. B., und Binding, P.: Refolding and purification of a urokinase plasminogen activator fragment by chromatography. (2000) *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **737**, 225-235.
- Fairbanks, G., Steck, T. L., und Wallach, D. F.: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. (1971) *Biochemistry* **10**, 2606-2617.
- Fanger, M. W., Morganelli, P. M., und Guyre, P. M.: Bispecific antibodies. (1992) *Crit. Rev. Immunol.* **12**, 101-124.
- Finette, G. M., Mao, Q. M., und Hearn, M. T.: Comparative studies on the isothermal characteristics of proteins adsorbed under batch equilibrium conditions to ion-exchange, immobilised metal ion affinity and dye affinity matrices with different ionic strength and temperature conditions. (1997) *J. Chromatogr. A* **763**, 71-90.
- Ford, C. F., Suominen, I., und Glatz, C. E.: Fusion tails for the recovery and purification of recombinant proteins. (1991) *Protein Expr. Purif.* **2**, 95-107.
- Fushiki, M., Svensson, B., Jonsson, B. und Woodward, C. E.: Electrostatic interactions in protein solution - a comparison between Poisson-Boltzmann and Monte Carlo calculations. (1991) *Biopolymers* **31**, 1149-1158.

- Gavilondo, J. V. und Larrick, J. W.: Antibody engineering at the millennium. (2000) *Biotechniques* **29**, 128-6, 138.
- Geng, X. und Chang, X.: High-performance hydrophobic interaction chromatography as a tool for protein refolding. (1992) *J. Chromatogr.* **599**, 185-194.
- Ghosh, M. und Schleif, R. F.: Stabilizing C-terminal tails on AraC. (2001) *Proteins* **42**, 177-181.
- Gilbert, H. F.: Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. (1990) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **63**, 69-172.
- Gilson, M. K.: Theory of electrostatic interactions in macromolecules. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 216-223.
- Glansbeek, H. L., van Beuningen, H. M., Vitters, E. L., van der Kraan, P. M., und van den Berg, W. B.: Expression of recombinant human soluble type II transforming growth factor-beta receptor in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*: two powerful systems to express a potent inhibitor of transforming growth factor-beta. (1998) *Protein Expr. Purif.* **12**, 201-207.
- Glennie, M. J., McBride, H. M., Worth, A. T., und Stevenson, G. T.: Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. (1987) *J. Immunol.* **139**, 2367-2375.
- Glockshuber, R., Schmidt, T., und Plückthun, A.: The disulfide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding *in vitro*, and functional expression in *Escherichia coli*. (1992) *Biochemistry* **31**, 1270-1279.
- Goldenberg, D. M., Larson, S. M., Reisfeld, R. A., und Schlom, J.: Targeting cancer with radiolabeled antibodies. (1995) *Immunol. Today* **16**, 261-264.
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y., und Sauer, R. T.: The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. (1998) *Genes Dev.* **12**, 1338-1347.
- Gottstein, C., Winkler, U., Bohlen, H., Diehl, V., und Engert, A.: Immunotoxins: is there a clinical value? (1994) *Ann. Oncol.* **5**, 97-103.
- Graddis, T. J., Myszka, D. G., und Chaiken, I. M.: Controlled formation of model homo- and heterodimer coiled coil polypeptides. (1993) *Biochemistry* **32**, 12664-12671.
- Grauschopf, U., Winther, J. R., Korber, P., Zander, T., Dallinger, P., und Bardwell, J. C.: Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? (1995) *Cell* **83**, 947-955.
- Grauschopf, U.: Strukturelle und funktionelle Untersuchungen am humanen Parathormon-Rezeptor. (2000) Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Gruber, M., Schodin, B. A., Wilson, E. R., und Kranz, D. M.: Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in *Escherichia coli*. (1994) *J. Immunol.* **152**, 5368-5374.
- Hägele, E. O., Schaich, E., Rauscher, E., Lehmann, P., Burk, H., und Wahlefeld, A. W.: Mechanism of action of human pancreatic and salivary alpha-amylase on alpha-4-nitrophenyl maltoheptaoside substrate. (1982) *Clin. Chem.* **28**, 2201-2205.
- Halvorson, H.: α -glucosidase from yeast. (1966) *Methods Enzymol.* **8**, 559-562.
- Halvorson, H. und Ellias, L.: The purification and properties of an α -glucosidase of *Saccharomyces italicus* Y 1225. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 28-40.
- Hamilton, G. E., Luechau, F., Burton, S. C., und Lyddiatt, A.: Development of a mixed mode adsorption process for the direct product sequestration of an extracellular protease from microbial batch cultures. (2000) *J. Biotechnol.* **79**, 103-115.
- Han, H. K., und Amidon, G. L.: Targeted prodrug design to optimize drug delivery. (2000) *AAPS Pharmsci.* **2**, 1-11.
- Han, B., Hall, F. L., und Nimni, M. E.: Refolding of a recombinant collagen-targeted TGF-beta2 fusion protein expressed in *Escherichia coli*. (1997) *Protein Expr. Purif.* **11**, 169-178.
- Hansen, M. B., Lihme, A., Spitali, M., und King, D.: Capture of human Fab fragments by expanded bed adsorption with a mixed mode adsorbent. (1999) *Bioseparation* **8**, 189-193.
- Hayashi, T., Matsubara, M., Nohara, D., Kojima, S., Miura, K., und Sakai, T.: Renaturation of the mature subtilisin BPN' immobilized on agarose beads. (1994) *FEBS Lett.* **350**, 109-112.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R.: Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. (1988) *Electrophoresis* **9**, 28-32.
- Hildebrandt, H. (Hrsg.): Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch. (1998) 258. Auflage, de Gruyter Verlag, Berlin.
- Hill, A. V.: The possible effect of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. (1910) *J. Physiol.* **40**,
- Hofstee, B. H.: Protein binding by agarose carrying hydrophobic groups in conjunction with charges. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **50**, 751-757.
- Holliger, P., Prospero, T., und Winter, G.: "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. (1993) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 6444-6448.

- Holliger, P. und Winter, G.: Diabodies: small bispecific antibody fragments. (1997) *Cancer Immunol. Immunother.* **45**, 128-130.
- Holzinger, A., Phillips, K. S., und Weaver, T. E.: Single-step purification/solubilization of recombinant proteins: application to surfactant protein B. (1996) *Biotechniques* **20**, 804-808.
- Honeychurch, J., Tutt, A. L., Valerius, T., Heijnen, I. A., van de Winkel, J. G., und Glennie, M. J.: Therapeutic efficacy of FcγRI/CD64-directed bispecific antibodies in B-cell lymphoma. (2000) *Blood* **96**, 3544-3552.
- Horowitz, P. und Bowman, S.: Reversible thermal denaturation of immobilized rhodanese. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 5587-5591.
- Höll-Neugebauer, B.: Stabilität und Faltung von alpha-Glucosidase PI aus Bäckerhefe: Einfluß von Fusionspeptiden und molekularen Chaperones. (1992) Dissertation an der Universität Regensburg
- Hudson, P. J.: Recombinant antibody constructs in cancer therapy. (1999) *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 548-557.
- Hummel, M., Herbst, H., und Stein, H.: Gene synthesis, expression in *Escherichia coli* and purification of immunoreactive human insulin-like growth factors I and II. Application of a modified HPLC separation technique for hydrophobic proteins. (1989) *Eur. J. Biochem.* **180**, 555-561.
- Humphreys, D. P., Smith, B. J., King, L. M., West, S. M., Reeks, D. G., und Stephens, P. E.: Efficient site specific removal of a C-terminal FLAG fusion from a Fab' using copper(II) ion catalysed protein cleavage. (1999) *Protein Eng.* **12**, 179-184.
- Hurle, M. R. und Gross, M.: Protein engineering techniques for antibody humanization. (1994) *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 428-433.
- Huynh, T. V.: in: Glover, D. M. (Hrsg.) (1985) *DNA cloning - a practical approach*. (1985) IRL Press, Oxford, 56-110.
- Hwang, C., Sinskey, A. J., und Lodish, H. F.: Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. (1992) *Science* **257**, 1496-1502.
- Jaenicke, R.: Folding und association versus misfolding and aggregation of proteins. (1995) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **348**, 97-105.
- Jelesarov, I. und Bosshard, H. R.: Thermodynamic characterization of the coupled folding and association of heterodimeric coiled coils (leucine zippers). (1996) *J. Mol. Biol.* **263**, 344-358.

- Jespersen, H. M., MacGregor, E. A., Sierks, M. R., und Svensson, B.: Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. (1991) *Biochem. J.* **280**, 51-55.
- Jolliffe, L. K.: Humanized antibodies: enhancing therapeutic utility through antibody engineering. (1993) *Int. Rev. Immunol.* **10**, 241-250.
- Jones, D. P., Carlson, J. L., Mody, V. C., Cai, J., Lynn, M. J., und Sternberg, P.: Redox state of glutathione in human plasma. (2000) *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 625-635.
- Juffer, A. H.: Theoretical calculations of acid-dissociation constants of proteins. (1998) *Biochem. Cell Biol.* **76**, 198-200.
- Jungbauer, A., Tauer, C., Reiter, M., Purtscher, M., Wenisch, E., Steindl, F., Buchacher, A., und Katinger, H.: Comparison of protein A, protein G and copolymerized hydroxyapatite for the purification of human monoclonal antibodies. (1989) *J. Chromatogr.* **476**, 257-268.
- Kadziola, A., Abe, J., Svensson, B., und Haser, R.: Crystal and molecular structure of barley alpha-amylase. (1994) *J. Mol. Biol.* **239**, 104-121.
- Kao, Y.-H., Fitch, C. A., Bhattacharya, S., Sarkisian, C. J., Lecomte, J. T. J., und Garcia-Moreno E., B.: Salt effects on ionization equilibria of histidines in myoglobin. (2000) *Biophys. J.* **79**, 1637-1654.
- Karshikoff, A.: A simple algorithm for the calculation of multiple site titration curves. (1995) *Protein Eng.* **8**, 243-248.
- Karshikov, A., Bode, W., Tulinsky, A., und Stone, S. R.: Electrostatic interactions in the association of proteins: an analysis of the thrombin-hirudin complex. (1992) *Protein Sci.* **1**, 727-735.
- Keler, T., Graziano, R. F., Mandal, A., Wallace, P. K., Fisher, J., Guyre, P. M., Fanger, M. W., und Deo, Y. M.: Bispecific antibody-dependent cellular cytotoxicity of HER2/neu-overexpressing tumor cells by Fc gamma receptor type I-expressing effector cells. (1997) *Cancer Res.* **57**, 4008-4014.
- Kyhse-Andersen, J.: Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. (1984) *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209.
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H. H., und Buchner, J.: Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. (1991) *Biotechnology (N. Y.)* **9**, 825-829.
- Kipriyanov, S. M., Dübel, S., Breitling, F., Kontermann, R. E., und Little, M.: Recombinant single-chain Fv fragments carrying C-terminal cysteine residues: production of bivalent and biotinylated miniantibodies. (1994) *Mol. Immunol.* **31**, 1047-1058.

- Koelmeij, R., Kuppen, P. J., van de Velde, C. J., Fleuren, G. J., Hagenaars, M., und Eggermont, A. M.: Bispecific antibodies in cancer therapy, from the laboratory to the clinic. (1999) *J. Immunother.* **22**, 514-524.
- Kopetzki, E., Buckel, P., und Schumacher, G.: Cloning and characterization of baker's yeast alpha-glucosidase: over-expression in a yeast strain devoid of vacuolar proteinases. (1989a) *Yeast* **5**, 11-24.
- Kopetzki, E., Schumacher, G., und Buckel, P.: Control of formation of active soluble or inactive insoluble baker's yeast alpha-glucosidase PI in *Escherichia coli* by induction and growth conditions. (1989b) *Mol. Gen. Genet.* **216**, 149-155.
- Kostelny, S. A., Cole, M. S., und Tso, J. Y.: Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. (1992) *J. Immunol.* **148**, 1547-1553.
- Koumarianou, A. A., Hudson, M., Williams, R., Epenetos, A. A., und Stamp, G. W.: Development of a novel bi-specific monoclonal antibody approach for tumour targeting. (1999) *Br. J. Cancer* **81**, 431-439.
- Kranz, D. M., Gruber, M., und Wilson, E. R.: Properties of bispecific single chain antibodies expressed in *Escherichia coli*. (1995) *J. Hematother.* **4**, 403-408.
- Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
- Laurell, C. B.: Use of thiol-disulphide interchange reactions in preparative work on plasma proteins. (1978) *J. Chromatogr.* **159**, 25-31.
- Laurell, C. B., Dahlqvist, I., und Persson, U.: The use of thiol-disulphide exchange chromatography for the automated isolation of alpha 1-antitrypsin and other plasma proteins with reactive thiol groups. (1983) *J. Chromatogr.* **278**, 53-61.
- Levitzki, A.: Ligand binding. In: Creighton, T. E. (Hrsg.): *Protein function - a practical approach* (1997) IRL Press, Oxford, 101-129.
- Liang, J. F., Li, Y. T., und Yang, V. C.: A novel approach for delivery of enzyme drugs: preliminary demonstration of feasibility and utility *in vitro*. (2000a) *Int. J. Pharm.* **202**, 11-20.
- Liang, J. F., Song, H., Li, Y. T., und Yang, V. C.: A novel heparin/protamine-based pro-drug type delivery system for protease drugs. (2000b) *J. Pharm. Sci.* **89**, 664-673.
- Liebhaber, S. A., Cash, F., und Eshleman, S. S.: Translation inhibition by an mRNA coding region secondary structure is determined by its proximity to the AUG initiation codon. (1992) *J. Mol. Biol.* **226**, 609-621.

- Lilie, H., Lang, K., Rudolph, R., und Buchner, J.: Prolyl isomerases catalyze antibody folding *in vitro*. (1993) *Protein Sci.* **2**, 1490-1496.
- Lilie, H., McLaughlin, S., Freedman, R., und Buchner, J.: Influence of protein disulfide isomerase (PDI) on antibody folding *in vitro*. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14290-14296.
- Lilie, H.: Faltung und Assoziation des Fab-Fragmentes des monoklonalen Antikörpers MAK33. (1995) Dissertation an der Universität Regensburg
- Lilie, H. und Buchner, J.: Domain interactions stabilize the alternatively folded state of an antibody Fab fragment. (1995) *FEBS Lett.* **362**, 43-46.
- Lilie, H., Jaenicke, R., und Buchner, J.: Characterization of a quaternary-structured folding intermediate of an antibody Fab-fragment. (1995a) *Protein Sci.* **4**, 917-924.
- Lilie, H., Rudolph, R., und Buchner, J.: Association of antibody chains at different stages of folding: prolyl isomerization occurs after formation of quaternary structure. (1995b) *J. Mol. Biol.* **248**, 190-201.
- Looman, A. C., Bodlaender, J., de Gruyter, M., Vogelaar, A., und van Knippenberg, P. H.: Secondary structure as primary determinant of the efficiency of ribosomal binding sites in *Escherichia coli*. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**, 5481-5497.
- MacGregor, E. A. und Svensson, B.: A super-secondary structure predicted to be common to several alpha-1,4- D-glucan-cleaving enzymes. (1989) *Biochem. J.* **259**, 145-152.
- Maeda, Y., Ueda, T., und Imoto, T.: Effective renaturation of denatured and reduced immunoglobulin G *in vitro* without assistance of chaperone. (1996) *Protein Eng.* **9**, 95-100.
- Mallender, W. D. und Voss, E. W., Jr.: Construction, expression, and activity of a bivalent bispecific single- chain antibody. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 199-206.
- Malmgren, C., Engdahl, H. M., Romby, P., und Wagner, E. G.: An antisense/target RNA duplex or a strong intramolecular RNA structure 5' of a translation initiation signal blocks ribosome binding: the case of plasmid R1. (1996) *RNA* **2**, 1022-1032.
- Marston, F. A.: The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. (1986) *Biochem. J.* **240**, 1-12.
- Merchant, A. M., Zhu, Z., Yuan, J. Q., Goddard, A., Adams, C. W., Presta, L. G., und Carter, P.: An efficient route to human bispecific IgG. (1998) *Nat. Biotechnol.* **16**, 677-681.
- Milstein, C. und Cuello, A. C.: Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. (1983) *Nature* **305**, 537-540.

- Misawa, S. und Kumagai, I.: Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. (1999) *Biopolymers* **51**, 297-307.
- Mozhaev, V. V., Martinek, K., und Berezin, I. V.: Effect of immobilization on protein (trypsin) folding. (1979) *Mol. Biol. (Mosk)* **13**, 73-80.
- Mössner, E., Iwai, H., und Glockshuber, R.: Influence of the pK(a) value of the buried, active-site cysteine on the redox properties of thioredoxin-like oxidoreductases. (2000) *FEBS Lett.* **477**, 21-26.
- Muhle-Goll, C., Nilges, M., und Pastore, A.: The leucine zippers of the HLH-LZ proteins Max and c-Myc preferentially form heterodimers. (1995) *Biochemistry* **34**, 13554-13564.
- Müller, C., und Rinas, U.: Renaturation of heterodimeric platelet-derived growth factor from inclusion bodies of recombinant *Escherichia coli* using size-exclusion chromatography. (1999) *J. Chromatogr. A* **855**, 203-213
- Müller, K. M., Arndt, K. M., Strittmatter, W., und Plückthun, A.: The first constant domain (C(H)1 and C(L)) of an antibody used as heterodimerization domain for bispecific miniantibodies. (1998) *FEBS Lett.* **422**, 259-264.
- Müller, K. M., Arndt, K. M., und Alber, T.: Protein fusions to coiled-coil domains. (2000) *Methods Enzymol.* **328**, 261-282.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., und Erlich, H.: Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. (1986) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- Nagai, K. und Thogersen, H. C.: Generation of beta-globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. (1984) *Nature* **309**, 810-812.
- Nautiyal, S., Woolfson, D. N., King, D. S., und Alber, T.: A designed heterotrimeric coiled coil. (1995) *Biochemistry* **34**, 11645-11651.
- Needleman, R. B., Federoff, H. J., Eccleshall, T. R., Buchferer, B., und Marmur, J.: Purification and characterization of an alpha-glucosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. (1978) *Biochemistry* **17**, 4657-4661.
- Negro, A., Onisto, M., Grassato, L., Caenazzo, C., und Garbisa, S.: Recombinant human TIMP-3 from *Escherichia coli*: synthesis, refolding, physico-chemical and functional insights. (1997) *Protein Eng.* **10**, 593-599.
- Neri, D., de Lalla, C., Petrul, H., Neri, P., und Winter, G.: Calmodulin as a versatile tag for antibody fragments. (1995) *Biotechnology (N. Y.)* **13**, 373-377.

- Nock, S., Spudich, J. A., und Wagner, P.: Reversible, site-specific immobilization of polyarginine-tagged fusion proteins on mica surfaces. (1997) *FEBS Lett.* **414**, 233-238.
- O'Shea, E. K., Rutkowski, R., Stafford, W. F., III, und Kim, P. S.: Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from *fos* and *jun*. (1989) *Science* **245**, 646-648.
- O'Shea, E. K., Rutkowski, R., und Kim, P. S.: Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer. (1992) *Cell* **68**, 699-708.
- O'Shea, E. K., Lumb, K. J., und Kim, P. S.: Peptide 'Velcro*': design of a heterodimeric coiled coil. (1993) *Current Biology* **3**, 658-667.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., und Gray, T.: How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. (1995) *Protein Sci.* **4**, 2411-2423.
- Pack, P. und Plückthun, A.: Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in *Escherichia coli*. (1992) *Biochemistry* **31**, 1579-1584.
- Pack, P.: Mini-Antikörper: bivalente, tetravalente und bispezifische Immunglobuline aus *E. coli*. (1994) Dissertation an der Universität München.
- Parsell, D. A. und Sauer, R. T.: The structural stability of a protein is an important determinant of its proteolytic susceptibility in *Escherichia coli*. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 7590-7595.
- Parsell, D. A., Silber, K. R., und Sauer, R. T.: Carboxy-terminal determinants of intracellular protein degradation. (1990) *Genes Dev.* **4**, 277-286.
- Perez-Canadillas, J. M., Campos-Olivas, R., Lacadena, J., Martinez del Pozo, A., Gavilanes, J. G., Santoro, J., Rico, M., und Bruix, M.: Characterization of pKa values and titration shifts in the cytotoxic ribonuclease alpha-sarcin by NMR. Relationship between electrostatic interactions, structure, and catalytic function. (1998) *Biochemistry* **37**, 15865-15876.
- Plückthun, A. und Pack, P.: New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. (1997) *Immunotechnology*. **3**, 83-105.
- Porath, J.: Immobilized metal ion affinity chromatography. (1992) *Protein Expr. Purif.* **3**, 263-281.
- Prickett, K. S., Amberg, D. C., und Hopp, T. P.: A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins. (1989) *Biotechniques* **7**, 580-589.

- Queiroz, J. A., Tomaz, C. T., und Cabral, J. M.: Hydrophobic interaction chromatography of proteins. (2001) *J. Biotechnol.* **87**, 143-159.
- Raag, R. und Whitlow, M.: Single-chain Fvs. (1995) *FASEB J.* **9**, 73-80.
- Reiter, Y. und Pastan, I.: Antibody engineering of recombinant Fv immunotoxins for improved targeting of cancer: disulfide-stabilized Fv immunotoxins. (1996) *Clin. Cancer Res.* **2**, 245-252.
- Rheinnecker, M., Hardt, C., Ilag, L. L., Kufer, P., Gruber, R., Hoess, A., Lupas, A., Rottenberger, C., Plückthun, A., und Pack, P.: Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen. (1996) *J. Immunol.* **157**, 2989-2997.
- Richter, S. A., Stubenrauch, K., Lilie, H. und Rudolph, R.: Polyionic fusion peptides function as dimerization motifs. (2001) *Protein Eng.*, Manuskript eingereicht
- Ridgway, J. B., Presta, L. G., und Carter, P.: 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. (1996) *Protein Eng.* **9**, 617-621.
- Robbins, D. H., Margulies, I., Stetler-Stevenson, M., und Kreitman, R. J.: Hairy cell leukemia, a B-cell neoplasm that is particularly sensitive to the cytotoxic effect of anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2). (2000) *Clin. Cancer Res.* **6**, 693-700.
- Rogl, H., Kosemund, K., Kuhlbrandt, W., und Collinson, I.: Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. (1998) *FEBS Lett.* **432**, 21-26.
- Rudolph, R., Buchner, J., und Lenz, H.: Aktivierung von gentechnologisch hergestellten, in Prokaryonten exprimierten Antikörpern. (1994) EP 0 364 926 B1.
- Rudolph, R., Boehm, G., Lilie, H., und Jaenicke, R.: Folding Proteins. In: Creighton, T. E.(Hrsg.): (1997) *Protein function - a practical approach*, 57-99.
- Sandhu, J. S.: A rapid procedure for the humanization of monoclonal antibodies. (1994) *Gene* **150**, 409-410.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. (1977) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sanna, P. P., De Logu, A., Williamson, R. A., Samson, M. E., Altieri, D. C., Bloom, F. E., und Burton, D. R.: Rapid assay of phage-derived recombinant human Fabs as bispecific antibodies. (1995) *Biotechnology (N. Y.)* **13**, 1221-1224.
- Sasaki, I., Gotoh, H., Yamamoto, R., Hasegawa, H., Yamashita, J., und Horio, T.: Hydrophobic-ionic chromatography. Its application to purification of porcine pancreas enzymes. (1979) *J. Biochem. (Tokyo)* **86**, 1537-1548.

- Savelkoul, H. F., Vossen, A. C., Breedland, E. G., und Tibbe, G. J.: Semi-preparative purification and validation of monoclonal antibodies for immunotherapy in mice. (1994) *J. Immunol. Methods* **172**, 33-42.
- Schmidt, M. und Buchner, J.: Interaction of GroE with an all-beta-protein. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16829-16833.
- Schmidt, M., Hynes, N. E., Groner, B., und Wels, W.: A bivalent single-chain antibody-toxin specific for ErbB-2 and the EGF receptor. (1996) *Int. J. Cancer* **65**, 538-546.
- Schoner, B. E., Belagaje, R. M., und Schoner, R. G.: Enhanced translational efficiency with two-cistron expression system. (1990) *Methods Enzymol.* **185**, 94-103.
- Schoner, B. E.: Synthetic two-cistron expression system. (1997) *Methods Mol. Biol.* **62**, 89-97.
- Schoonjans, R., Willems, A., Schoonooghe, S., Fiers, W., Grooten, J., und Mertens, N.: Fab chains as an efficient heterodimerization scaffold for the production of recombinant bispecific and trispecific antibody derivatives. (2000) *J. Immunol.* **165**, 7050-7057.
- Segal, D. M., Weiner, G. J., und Weiner, L. M.: Bispecific antibodies in cancer therapy. (1999) *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 558-562.
- Segal, D. M., Weiner, G. J., und Weiner, L. M.: Introduction: bispecific antibodies. (2001) *J. Immunol. Methods* **248**, 1-6.
- Shaked, Z., Szajewski, R. P., und Whitesides, G. M.: Rates of thiol-disulfide interchange reactions involving proteins and kinetic measurements of thiol pKa values. (1980) *Biochemistry* **19**, 4156-4166.
- Shi, P. Y., Maizels, N., und Weiner, A. M.: Recovery of soluble, active recombinant protein from inclusion bodies. (1997) *Biotechniques* **23**, 1036-1038.
- Silber, K. R., Keiler, K. C., und Sauer, R. T.: Tsp: a tail-specific protease that selectively degrades proteins with nonpolar C termini. (1992) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 295-299.
- Sinha, D., Bakhshi, M., und Vora, R.: Ligand binding assays with recombinant proteins refolded on an affinity matrix. (1994) *Biotechniques* **17**, 509-12, 514.
- Sinha, N. K. und Light, A.: Refolding of reduced, denatured trypsinogen and trypsin immobilized on Agarose beads. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 8624-8629.
- Skerra, A., Pfitzinger, I., und Plückthun, A.: The functional expression of antibody Fv fragments in *Escherichia coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. (1991) *Biotechnology (N.Y.)* **9**, 273-278.

- Skerra, A. und Plückthun, A.: Secretion and *in vivo* folding of the Fab fragment of the antibody McPC603 in *Escherichia coli*: influence of disulphides and cis-prolines. (1991) *Protein Eng.* **4**, 971-979.
- Smith, J. C., Derbyshire, R. B., Cook, E., Dunthorne, L., Viney, J., Brewer, S. J., Sassenfeld, H. M., und Bell, L. D.: Chemical synthesis and cloning of a poly(arginine)-coding gene fragment designed to aid polypeptide purification. (1984) *Gene* **32**, 321-327.
- Snyder, G. H., Cennerazzo, M. J., Karalis, A. J., und Field, D.: Electrostatic influence of local cysteine environments on disulfide exchange kinetics. (1981) *Biochemistry* **20**, 6509-6519.
- Song, H., Liang, J. F., und Yang, V. C.: A prodrug approach for delivery of t-PA: construction of the cationic t- PA prodrug by a recombinant method and preliminary *in vitro* evaluation of the construct. (2000) *ASAIO J.* **46**, 663-668.
- Stahlberg, J.: Retention models for ions in chromatography. (1999) *J. Chromatogr. A* **855**, 3-55.
- Stempfer, G.: Aktivität, Stabilität und Faltung matrix-gebundener Enzyme. (1995) Dissertation an der Universität Regensburg
- Stempfer, G., Höll-Neugebauer, B., und Rudolph, R.: Improved refolding of an immobilized fusion protein. (1996a) *Nat. Biotechnol.* **14**, 329-334.
- Stempfer, G., Höll-Neugebauer, B., Kopetzki, E., und Rudolph, R.: A fusion protein designed for noncovalent immobilization: stability, enzymatic activity, and use in an enzyme reactor. (1996b) *Nat. Biotechnol.* **14**, 481-484.
- Steplewski, Z., Sun, L. K., Shearman, C. W., Ghrayeb, J., Daddona, P., und Koprowski, H.: Biological activity of human-mouse IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 chimeric monoclonal antibodies with antitumor specificity. (1988) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 4852-4856.
- Stevenson, G. T., Pindar, A., und Slade, C. J.: A chimeric antibody with dual Fc regions (bisFabFc) prepared by manipulations at the IgG hinge. (1989) *Anticancer Drug Des.* **3**, 219-230.
- Stryer, L.: Biochemie. (1990) Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg, 2. Auflage.
- Stubenrauch, K., Richter, S., Lilie, H., und Rudolph, R.: Methoden zur gerichteten Assoziation von Polypeptiden oder Proteinen. (1999) Europäische Patentanmeldung 99115022.8.
- Stubenrauch, K., Bachmann, A., Rudolph, R., und Lilie, H.: Purification of a viral coat protein by an engineered polyionic sequence. (2000) *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **737**, 77-84.

- Stubenrauch, K.: Virusanaloge Partikel als zelltypspezifisches Vektorsystem. (2000) Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Stubenrauch, K., Gleiter, S., Brinkmann, U., Rudolph, R. und Lilie, H.: Tumor cell specific targeting and gene transfer by recombinant polyoma virus like particle/antibody conjugates. (2001) *Biochem. J.* **356**, 867-873.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A.: Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. (1986) *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
- Sugimura, K. und Higashi, N.: A novel outer-membrane-associated protease in *Escherichia coli*. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 3650-3654.
- Suominen, I., Nurmela, H., Heimo, H., Ford, C., Stachon, D., und Glatz, C.: Use of charged tails in protein-purification fusions. Polyaspartic acid tails in *Aspergillus glucoamylase* expressed in yeast. (1992) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **672**, 106-113.
- Suominen, I., Ford, C., Stachon, D., Heimo, H., Niederauer, M., Nurmela, H., und Glatz, C.: Enhanced recovery and purification of *Aspergillus glucoamylase* from *Saccharomyces cerevisiae* by the addition of poly(aspartic acid) tails. (1993) *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 593-600.
- Suresh, M. R., Cuello, A. C., und Milstein, C.: Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas. (1986) *Methods Enzymol.* **121**, 210-228.
- Suttnar, J., Dyr, J. E., Hamsikova, E., Novak, J., und Vonka, V.: Procedure for refolding and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies using a strong anion exchanger. (1994) *J. Chromatogr.* **656**, 123-126.
- Svensson, B.: Regional distant sequence homology between amylases, alpha-glucosidases and transglucanoylases. (1988) *FEBS Lett.* **230**, 72-76.
- Teich, A., Lin, H. Y., Andersson, L., Meyer, S., und Neubauer, P.: Amplification of ColE1 related plasmids in recombinant cultures of *Escherichia coli* after IPTG induction. (1998) *J. Biotechnol.* **64**, 197-210.
- Thirion, S., Motmans, K., Heyligen, H., Janssens, J., Raus, J., und Vandevyver, C.: Mono- and bispecific single-chain antibody fragments for cancer therapy. (1996) *Eur. J. Cancer Prev.* **5**, 507-511.
- Tobias, J. W., Shrader, T. E., Rocap, G., und Varshavsky, A.: The N-end rule in bacteria. (1991) *Science* **254**, 1374-1377.
- Tomlinson, I. und Holliger, P.: Methods for generating multivalent and bispecific antibody fragments. (2000) *Methods Enzymol.* **326**, 461-479.

- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. (1992) *Biotechnology* **24**, 145-149.
- Valone, F. H., Kaufman, P. A., Guyre, P. M., Lewis, L. D., Memoli, V., Ernstoff, M. S., Wells, W., Barth, R., Deo, Y., und Fisher, J.: Clinical trials of bispecific antibody MDX-210 in women with advanced breast or ovarian cancer that overexpresses HER-2/neu. (1995a) *J. Hematother.* **4**, 471-475.
- Valone, F. H., Kaufman, P. A., Guyre, P. M., Lewis, L. D., Memoli, V., Deo, Y., Graziano, R., Fisher, J. L., Meyer, L., und Mrozek-Orlowski, M.: Phase Ia/Ib trial of bispecific antibody MDX-210 in patients with advanced breast or ovarian cancer that overexpresses the proto-oncogene HER-2/neu. (1995b) *J. Clin. Oncol.* **13**, 2281-2292.
- van Ojik, H. H. und Valerius, T.: Preclinical and clinical data with bispecific antibodies recruiting myeloid effector cells for tumor therapy. (2001) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **38**, 47-61.
- van Zanten-Przybysz, I., Molthoff, C. F., Roos, J. C., Verheijen, R. H., van Hof, A., Buist, M. R., Prinssen, H. M., den Hollander, W., Kenemans, P.: Influence of the route of administration on targeting of ovarian cancer with the chimeric monoclonal antibody Mov18: i. v. versus i. p. (2001) *Int. J. Cancer* **92**, 106-114.
- Varshavsky, A.: The N-end rule pathway of protein degradation. (1997) *Genes Cells* **2**, 13-28.
- Velders, M. P., Litvinov, S. V., Warnaar, S. O., Gorter, A., Fleuren, G. J., Zurawski, V. R., Jr., und Coney, L. R.: New chimeric anti-pancarcinoma monoclonal antibody with superior cytotoxicity-mediating potency. (1994) *Cancer Res.* **54**, 1753-1759.
- Vieira, J. und Messing, J.: Production of single-stranded plasmid DNA. (1987) *Methods Enzymol.* **153**, 3-11.
- Weidle, U. H., Borgya, A., Mattes, R., Lenz, H., und Buckel, P.: Reconstitution of functionally active antibody directed against creatine kinase from separately expressed heavy and light chains in non-lymphoid cells. (1987) *Gene* **51**, 21-29.
- Weiner, L. M.: Monoclonal antibody therapy of cancer. (1999) *Semin. Oncol.* **26**, 43-51.
- Weiss, E., Chatellier, J., und Orfanoudakis, G.: *In vivo* biotinylated recombinant antibodies: construction, characterization, and application of a bifunctional Fab-BCCP fusion protein produced in *Escherichia coli*. (1994) *Protein Expr. Purif.* **5**, 509-517.
- Werner, M. H., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Kondoh, A., und Fisher, R. J.: Refolding proteins by gel filtration chromatography. (1994) *FEBS Lett.* **345**, 125-130.
- Wetlaufer, D. B.: Ultraviolet spectra of proteins und amino acids. (1962) *Adv. Protein Chem.* **17**, 303-386.

- Wilder, R. B., DeNardo, G. L., und DeNardo, S. J.: Radioimmunotherapy: recent results and future directions. (1996) *J. Clin. Oncol.* **14**, 1383-1400.
- Willuda, J., Kubetzko, S., Waibel, R., Schubiger, P. A., Zangemeister-Wittke, U., und Plückthun, A.: Tumor targeting of mono-, di-, and tetravalent anti-p185(HER-2) miniantibodies multimerized by self-associating peptides. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 14385-14392.
- Winter, G. und Milstein, C.: Man-made antibodies. (1991) *Nature* **349**, 293-299.
- Xu, M. Q., Paulus, H., und Chong, S.: Fusions to self-splicing inteins for protein purification. (2000) *Methods Enzymol.* **326**, 376-418.
- Yan, Z. und Huang, J.: Cleaning procedure for protein G affinity columns. (2000) *J. Immunol. Methods* **237**, 203-205.
- Yon, R. J.: Chromatography of lipophilic proteins on adsorbents containing mixed hydrophobic and ionic groups. (1972) *Biochem. J.* **126**, 765-767.
- Yoshimoto, M. und Kuboi, R.: Oxidative refolding of Denatured/Reduced lysozyme utilizing the chaperone-like function of liposomes and immobilized liposome chromatography. (1999) *Biotechnol. Prog.* **15**, 480-487.
- Zahn, R., von Schroetter, C., und Wüthrich, K.: Human prion proteins expressed in *Escherichia coli* and purified by high-affinity column refolding. (1997) *FEBS Lett.* **417**, 400-404.
- Zeidler, R., Mysliwietz, J., Csanady, M., Walz, A., Ziegler, I., Schmitt, B., Wollenberg, B., und Lindhofer, H.: The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells. (2000) *Br. J. Cancer* **83**, 261-266.
- Zettlmeißl, G., Rudolph, R., und Jaenicke, R.: Reconstitution of lactic dehydrogenase. Noncovalent aggregation vs. reactivation. 1. Physical properties and kinetics of aggregation. (1979) *Biochemistry* **18**, 5567-5571.
- Zettlmeißl, G., Teschner, W., Rudolph, R., Jaenicke, R., und Gade, G.: Isolation, physicochemical properties, and folding of octopine dehydrogenase from *Pecten jacobaeus*. (1984) *Eur. J. Biochem.* **143**, 401-407.
- Zhao, J. Y., Ford, C. F., Glatz, C. E., Rougvie, M. A., und Gendel, S. M.: Polyelectrolyte precipitation of beta-galactosidase fusions containing poly-aspartic acid tails. (1990) *J. Biotechnol.* **14**, 273-283.
- Zhu, H., Jain, R. K., und Baxter, L. T.: Tumor pretargeting for radioimmunodetection and radioimmunotherapy. (1998) *J. Nucl. Med.* **39**, 65-76.

Zouhar, J., Nanak, E., und Brzobohaty, B.: Expression, single-step purification, and matrix-assisted refolding of a maize cytokinin glucoside-specific beta-glucosidase. (1999) *Protein Expr. Purif.* **17**, 153-162.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 1998 bis Juni 2001 am Institut für Biotechnologie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Rainer Rudolph angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Rainer Rudolph danke ich für die Vergabe des interessanten Themas, sein Interesse und seine Diskussionsbereitschaft.

Besonders danken möchte ich Dr. Hauke Lilie für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, seine Unterstützung und seine Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt auch Constanze und Kay Stubenrauch. Kay Stubenrauch danke ich für die Zusammenarbeit in Fragen der Wechselwirkung komplementär geladener polyionischer Fusionspeptide. Constanze Stubenrauch und Stefan Gleiter danke ich für die Tipps bei der Anwendung molekularbiologischer Methoden. Herrn Dr. Ulrich Brinkmann danke ich für die Zusammenarbeit bei der Planung der α -Glucosidase-Konstrukte.

Danken möchte ich nachfolgenden Studenten für ihr Interesse am Thema und für die Durchführung einer Vielzahl enzymkinetischer Messungen während ihrer Praktika: Agniesca Zylics, Cornelia Worm, Michaela Herzog, Matthias Rastetter, Michael Volkmar und Stephan Wawra. Michael Volkmar führte darüber hinaus seine Diplomarbeit auf Teilgebieten des Themas durch, die die vorliegende Arbeit ergänzen.

Frau Jeannette Winter und Herrn Dr. Frank Hoffmann danke ich für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Frau Dr. A. Schierhorn und Herrn Dr. K. P. Rücknagel von der Forschungsstelle "Enzymologie der Proteinfaltung" der Max-Planck-Gesellschaft in Halle danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen bzw. der N-terminalen Sequenzierung.

Frau Dr. B. Hartrodt und Herrn Dr. J. Faust vom Institut für Biochemie der Universität Halle danke ich für die Synthese der synthetischen Peptide ACK8A bzw. ACE10.

Herrn Dr. L. Jacob und Herrn Dr. L. Britsch von der Fa. Merck, Darmstadt danke ich für die Bereitstellung des Forschungsmusters Fractoprep DEAE.

Der Fa. Roche Diagnostics (Penzberg) danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Meinen Kollegen aus Labor „168“ Antje Reinisch, Constanze Stubenrauch, Cornelia Bläsing, Renate Nitsch, Björn Schott, Kay Stubenrauch, Martin Kleinschmidt, Michael Volkmar, Stefan Gleiter und Tobias May sowie allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Lebenslauf

Name: Susanne Richter
Geburtsdatum: 07.10.1970
Geburtsort: Neuwied

Bildungsweg

09/1977 - 06/1981 Grundschule Bad Breisig
08/1981 - 05/1990 Rhein-Gymnasium Sinzig
30/05/1990 Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

10/1990 -09/1991 Studentin der Volkswirtschaftslehre und Humanmedizin an der
 Universität Bonn

10/1991-11/1997 Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität
 Braunschweig

09/1995-03/1996 Studienarbeit am Institut für Bioverfahrenstechnik der Technischen
 Universität Braunschweig (Prof. Dr.-Ing. D.-C. Hempel)
 Thema: Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von Produkten der
 anaeroben Behandlung von Azofarbstoffen

02/1997-11/1997 Diplomarbeit in der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
 (GBF), Braunschweig im Bereich Bioverfahrenstechnik
 (Prof. Dr. W.-D. Deckwer) unter Anleitung von Frau PD Dr. U. Rinas
 Thema: Produktion und Aufreinigung des rekombinanten
 Wachstumsfaktors aus Blutplättchen (PDGF) sowie Untersuchungen
 zur Rückfaltung und Assoziation aus *inclusion bodies*

11/11/1997 Abschluß: Diplom-Biotechnologin
 “*Mit Auszeichnung*”

02/1998-06/2001 Doktorarbeit am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-
 Universität Halle-Wittenberg (Prof. Dr. R. Rudolph)

Halle/Saale, den 02.07.01

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfaßt habe. Die aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.
Die Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Halle/Saale, den 02.07.2001

