

**Proteinkonjugationen durch Kupfer-abhängige
Formylglycin-generierende Enzyme
zur Generierung von
Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten**

Dissertation

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

vorgelegt von

Mareile Boschanski

20. Oktober 2020

Biochemie I
Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld

Die beschriebenen Arbeiten wurden im Rahmen des Promotionsstudiums der *Graduate School of Chemistry and Biochemistry* in der Arbeitsgruppe Biochemie I unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Dierks durchgeführt und waren Teil des Schwerpunktprogramms SPP1623 – *chemoselective reactions for the synthesis and application of functional proteins*, welches in einer Kooperation der Arbeitsgruppen BCI, OCIII und ZMB der Universität Bielefeld bearbeitet wurde. Die Monografie wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Norbert Sewald (Arbeitsgruppe OCIII, Organische und Bioorganische Chemie) verfasst. Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier im Sinne von DIN-ISO 9706.

1. Gutachten Prof. Dr. Norbert Sewald
 Arbeitsgruppe OCIII, Organische und Bioorganische Chemie
 Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld

2. Gutachten Prof. Dr. Kristian M. Müller
 Arbeitsgruppe ZMB, Zelluläre und Molekulare Biotechnologie
 Technische Fakultät, Universität Bielefeld

Veröffentlichungen

1a) Tobias Krüger, Dr. Stefanie Weiland, Georg Falck, Dr. Marcus Gerlach, Mareile Boschanski, Dr. Sarfaraz Alam, Prof. Dr. Kristian M. Müller, Prof. Dr. Thomas Dierks, Prof. Dr. Norbert Sewald, Two-fold Bioorthogonal Derivatization by Different Formylglycine-Generating Enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 7245-7249.

1b) Tobias Krüger, Dr. Stefanie Weiland, Georg Falck, Dr. Marcus Gerlach, Mareile Boschanski, Dr. Sarfaraz Alam, Prof. Dr. Kristian M. Müller, Prof. Dr. Thomas Dierks, Prof. Dr. Norbert Sewald, Zweifach-bioorthogonale Derivatisierung durch verschiedene Formylglycine-generierende Enzyme. *Angew. Chem.* **2018**, 130, 7365-7369.

2) Tobias Krüger, Dr. Stefanie Weiland, Mareile Boschanski, Dr. Prem Kumar Sinha, Georg Falck, Prof. Dr. Kristian M. Müller, Prof. Dr. Thomas Dierks, Prof. Dr. Norbert Sewald, Conversion of Serine-Type Aldehyde Tags by the Radical SAM Protein AtsB from *Methanosarcina mazei*. *ChemBioChem* **2019**, 20, 2074-2078.

3) Nils Janson, Dr. Tobias Krüger, Lennard Karsten, Mareile Boschanski, Prof. Dr. Thomas Dierks, Prof. Dr. Kristian M. Müller, Prof. Dr. Norbert Sewald, Bifunctional Reagents for Formylglycine Conjugation: Pitfalls and Breakthroughs. *ChemBioChem* 2020, 10.1002/cbic.202000416.

4) Mareile Boschanski, Dr. Tobias Krüger, Lennard Karsten, Dr. Sarfaraz Alam, Georg Falck, Dr. Benjamin Müller, Prof. Dr. Kristian M. Müller, Prof. Dr. Norbert Sewald, Prof. Dr. Thomas Dierks, Site-Specific Conjugation Strategy for Dual Antibody Drug Conjugates Using Aerobic Formylglycine-Generating Enzymes. Unveröffentlichtes Manuskript.

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen.....	3
Inhaltsverzeichnis.....	4
1 Zusammenfassung.....	10
2 Einleitung.....	14
2.1 EGF-Rezeptor als therapeutisches Ziel.....	14
2.2 Antikörper-Wirkstoff-Konjugate.....	19
2.3 Proteinkonjugationstechniken.....	21
2.4 Mehrfachkonjugation mittels FGE.....	25
2.5 FGE und Kupfer.....	28
2.6 Zielsetzung.....	29
3 Materialien.....	32
3.1 Geräte und Laborausstattung.....	32
3.2 Laborverbrauchsmaterialien.....	35
3.3 Chemikalien und Reagenzien.....	36
3.4 Kits.....	38
3.5 Antikörper.....	38
3.6 Enzyme.....	39
3.7 Antibiotika und Nährmedienzusätze.....	39
3.8 Standards.....	40
3.9 Medien, Puffer und Lösungen.....	40
3.10 Bakterienstämme.....	43
3.11 Zelllinien.....	44
3.12 Plasmide.....	46
3.13 Primer.....	47
3.14 Software und Internetanwendungen.....	48
4 Methoden.....	52
4.1 Molekularbiologische Methoden.....	52

Inhaltsverzeichnis	V
4.1.1 Polymerasekettenreaktion	52
4.1.2 Mutagenese-PCR.....	54
4.1.3 Gibson Assembly-PCR	55
4.1.4 Colony-PCR	56
4.1.5 Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung.....	57
4.1.6 DNA-Aufreinigung und Gelextraktion	58
4.1.7 Bestimmung der DNA-Konzentration	59
4.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	59
4.1.9 Isolierung chromosomaler DNA aus Säugerzellen	60
4.1.10 DNA-Sequenzierung	61
4.1.11 Restriktionsverdau.....	61
4.1.12 Dephosphorylierung der 5'-Phosphatenden	62
4.1.13 Ligation	62
4.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	63
4.2.1 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i>	63
4.2.2 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	64
4.2.3 Transformation in <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	64
4.2.4 Transformation in <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock.....	65
4.2.5 Bestimmung der optischen Dichte einer Bakterienkultur	65
4.2.6 Rekombinante Proteinproduktion in <i>E. coli</i>	65
4.2.7 Ernte und Lyse von Bakterienkulturen.....	67
4.2.8 Kryokonservierung von Bakterienkulturen.....	68
4.3 Kultivierung von Säugerzellen.....	68
4.3.1 Auftauen, kultivieren und konservieren adhärenter Säugerzellen.....	68
4.3.2 Auftauen, kultivieren und einfrieren von Suspensionszellen.....	70
4.3.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer	70
4.3.4 Bestimmung von Zellzahl und Zellviabilität durch Trypanblau-Färbung.....	71
4.3.5 Säugerzell-Transfektion mit PEI.....	71

4.3.6 Säugerzell-Transfektion mit Lipofectamin	72
4.3.7 Säugerzell-Transfektion mittels Calciumphosphat-Methode.....	73
4.3.8 Rekombinante Proteinproduktion in Säugerzellen, ernten und lysieren	73
4.3.9 Isolierung von stabilen Säugerzell-Einzelklonen – Flp-In-System.....	74
4.3.10 β -Galactosidase-Assay	76
4.3.11 Fixieren und Färben von Säugerzellen zur Fluoreszenzmikroskopie	76
4.3.12 Bestimmung der Zellzytotoxizität mittels <i>alamarBlue</i> -Assay	77
4.4 Proteinbiochemische Methoden	78
4.4.1 Proteinfällung aus Zellkulturüberständen	78
4.4.2 HisTrap – Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie.....	79
4.4.3 HisBatch – Ni ²⁺ -NTA-Agarose	80
4.4.4 MBPTrap – MBP-Affinitätschromatographie.....	81
4.4.5 GSTrap – GST-Affinitätschromatographie	82
4.4.6 Protein A-Affinitätschromatographie.....	82
4.4.7 Protein A-Sepharose- <i>Batch</i>	83
4.4.8 Bradford-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration	84
4.4.9 SEC – Größenausschlusschromatographie.....	84
4.4.10 PD10 – Entsalzung und Umpufferung	85
4.4.11 Proteolytische Spaltung	86
4.4.12 Ultrakonzentration.....	87
4.4.13 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	87
4.4.14 Western Blot im <i>Semi-Dry</i> -Verfahren.....	90
4.4.15 Immundetektion von Western Blots und verstärkte Chemilumineszenz	91
4.4.16 Deglykosylierung mittels PNGase F	92
4.4.17 Tryptische Proteinfragmentierung.....	92
4.4.18 C18-Peptidanreicherung mittels ZipTip-Verfahren	94
4.4.19 Massenspektrometrie.....	94
4.4.20 Schmelzpunktbestimmung mittels DSF	96

4.5 Enzym- und Aldehydchemie	98
4.5.1 Kupfer-Rekonstitution.....	98
4.5.2 Lagerung von bakteriellen FGEs und DARPs	98
4.5.3 Umsetzung von Aldehyd- <i>tags in vitro</i>	99
4.5.4 indirekte FGE-Aktivitätsbestimmung mittels STS-Assay	100
4.5.5 indirekte FGE-Aktivitätsbestimmung mittels pNCS-Assay.....	101
4.5.6 Cystein-Derivatisierung mit Maleimiden.....	102
4.5.7 Cystein-Derivatisierung mittels Iodacetamid.....	103
4.5.8 Formylglycin-Derivatisierung mittels reduktiver Aminierung	103
4.5.9 HIPS-Konjugation.....	104
4.5.10 SPAAC Click-Reaktion.....	105
4.5.11 HIC – hydrophobe Interaktionschromatographie.....	105
5 Ergebnisse und Diskussion.....	108
5.1 Der duale Aldehyd- <i>tag</i>	108
5.1.1 Erstellung der Modellprotein-Bibliothek des DARPs E01	109
5.1.2 <i>In vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Konversion von Modellproteinen durch bakterielles FGE	114
5.1.3 Der duale Aldehyd- <i>tag</i> am <i>single-chain</i> Antikörper.....	122
5.2 Kupferabhängiges FGE in der gerichteten Proteinmodifizierung.....	133
5.2.1 <i>In vivo</i> -Konversionen und <i>rational design</i> des humanen FGEs.....	133
5.2.2 Aktivität des humanen FGEs in Abhängigkeit von Kupfer	145
5.2.3 Der Einfluss von Kupfer auf die Substratspezifität prokaryotischer FGEs <i>in vitro</i> ...	159
5.3 Antikörper-Wirkstoff-Konjugate	170
5.3.1 Konjugationschemie am Aldehyd oder Thiol	171
5.3.2 Analyse der <i>single-chain</i> -Konstrukte und -Konjugate.....	174
5.3.3 Biologische Aktivität des ADCs	180
6 Ausblick	188
7 Literaturverzeichnis.....	192
8 Anhang	210

8.1 weitere Abbildungen	210
8.2 Abkürzungen	217
8.3 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	219
8.4 DNA- und Aminosäuresequenzen.....	222
8.4.1 Enzyme.....	222
8.4.2 DARPs.....	226
8.4.3 scFv425-Fc	230
8.4.4 eGFP	232
8.4.5 MBP	232
8.5 Vektorkarten.....	234
9 Danksagung	238
Erklärung	242

1 Zusammenfassung

Das Formylglycin-generierende Enzym (FGE) wird zur regioselektiven Konjugation von Proteinen eingesetzt. Es katalysiert in einer Sauerstoff-abhängigen Reaktion die Bildung der nicht-kanonischen Aminosäure C^α-Formylglycin (FGly) aus dem Cysteinrest einer Kernerkenntnissequenz vom Typ CxPxR. Das prokaryotische, anaerobe Eisen-Schwefel-Protein AtsB kann neben Cysteinen auch Serinreste zu FGly umwandeln. Zur Proteinkonjugation wurden rekombinante Proteine mit Aldehyd-*tags*, bestehend aus einem Kernmotiv (C/SxP/AxR) und flankierenden Hilfssequenzen, *in vivo* oder *in vitro* enzymatisch umgesetzt. Die resultierende Aldehydfunktion des FGlys wurde chemisch konjugiert. Gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) gerichtete Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs) wurden durch die FGly-Konjugation des Modellproteins DARPin E01 (*designed ankyrin repeat protein*) bzw. des *single-chain* Antikörpers scFv425-Fc erzeugt. Zunächst wurde das Protein durch die Aldehydspezifische HIPS-Ligation (Hydrazino-*iso*-Pictet-Spengler) mit einem Azid funktionalisiert und anschließend mittels Click-Reaktion mit einem Toxin beladen. Der konsekutive Einsatz von Enzymen mit unterschiedlicher Substratspezifität ermöglicht eine Bioorthogonalität der Konjugation, wodurch erstmals auch duale ADCs mittels FGly-Technik erzeugt wurden.

In dieser Arbeit wurde sowohl die Verwendung des FGEs zur selektiven und bioorthogonalen Dualkonjugation als auch die Abhängigkeit des Enzyms von Kupfer betrachtet. Als Kofaktor der aeroben Enzyme hat Kupfer einen großen Einfluss auf die Substratspezifität der prokaryotischen FGE-Varianten. In hohen Enzym-Substrat-Verhältnissen und in Anwesenheit von Kupfer stieg die Akzeptanz für das Prolin-freie Motiv. Dieser Effekt wurde unabhängig davon, ob die Zugabe des Kupfers während der Reaktion oder durch eine vorherige Rekonstitution der Enzyme durchgeführt wurde, beobachtet. Das humane FGE (hFGE) hingegen weist auch in Anwesenheit des Kofaktors die engste Substratspezifität für Prolin-haltige Cysteinsequenzen auf. Zur Untersuchung der intrazellulären Systeme, welche dem ER-ständigen, humanen FGE eine Inkorporation von Kupferionen ermöglichen, wurden indirekte Aktivitätsassays auf der Basis der *in vivo*-Sulfataseaktivierung durchgeführt. Es konnte eine signifikante Aktivitätssteigerung des transient exprimierten hFGEs durch Kupferzugabe in Form von Kupfersulfat in FGE-*knock out*-Zellen (ARPE19 *sumf1*^{-/-}) und eine entsprechende Inhibierung durch den Kupferchelator Tetraethylenpentaamin (TEPA) detektiert werden. Der Zusammenhang zwischen der enzymatischen Aktivität und der intrazellulären Kupferhomöostase wurde initial durch die Verwendung einer Hepatozytenzelllinie, die eine Defizienz des Kupfertransporters ATP7Bs aufweist (HepG2 ATP7B-KO), analysiert. So wurde die Hypothese aufgestellt, dass die sekretorische Route des hFGEs und ggf.

die bislang in ihrer Funktion ungeklärte N-terminale Domäne im Zusammenspiel mit dem Golgi-ständigen Kupfertransporter an der Generierung des Holoenzym beteiligt sind.

Eine vermehrte ER-Retention des hFGEs durch das Anfügen der C-terminalen Aminosäuresequenzen KDEL bzw. PGEL wirkte sich erfolgreich auf die FGly-Konversionsrate der *in situ*-Antikörperproduktion in CHO-Zellen aus, wodurch ein FGly-Gehalt von bis zu 91,7% detektiert werden konnte. Durch eine umfangreiche Modellproteinbibliothek zur Etablierung neuer FGly-Konjugationsstrategien wurden in diesem Kooperationsprojekt der Disziplinen Biochemie, organische Chemie und Biotechnologie Einfach- und Doppelkonjugate erstellt und Faktoren wie Proteininstabilität, Konjugatlagerung und biologische Funktionalität analysiert. Der *single-chain* Antikörper scFv425-Fc wurde mit Monomethylauristatin E (MMAE) und Carboxyfluorescein beladen. In den zellbasierten Methoden *life cell imaging* und alamarBlue[®] Assay wurde eine direkte Korrelation zwischen der Präsentation des EGFRs auf der Zelloberfläche und der ADC-abhängigen Fluoreszenz bzw. Zytotoxizität nachgewiesen. Die C-terminale Konjugation des *single-chain* Antikörpers über die nicht-kanonische Aminosäure FGly interferierte dementsprechend nicht mit einer erfolgreichen Antigenbindung, was zur Auslösung der Internalisierung und der lysosomalen Freisetzung des Toxins führte. Eine zielgerichtete Verabreichung des Wirkstoffs konnte mit einem IC₅₀-Wert des MMAE-ADCs im picomolaren Bereich identifiziert werden.

Summary

The formylglycine-generating enzyme (FGE) is utilized for the regioselective conjugation of proteins. In an oxygen-dependent reaction it catalyzes the formation of the non-canonical amino acid C^α-formylglycine (FGly) from the cysteine residue of a CxPxR-type core recognition sequence. In addition to cysteines, the prokaryotic, anaerobic iron-sulfur protein AtsB can also convert serine residues to FGly. For protein conjugation, recombinant proteins with aldehyde tags, consisting of a core motif (C/SxP/AxR) and flanking auxiliary sequences, were converted enzymatically, both *in vivo* or *in vitro*. The resulting aldehyde function of the FGly was chemically conjugated. Antibody-drug conjugates (ADCs), directed against the epidermal growth factor receptor (EGFR), were generated by the FGly conjugation of the model protein DARPin E01 (designed ankyrin repeat protein) or the single-chain antibody scFv425-Fc. First, the protein was functionalized with an azide by the aldehyde-specific HIPS ligation (Hydrazino-*iso*-Pictet-Spengler) and then loaded with a toxin by click reaction. The consecutive use of enzymes with different substrate specificity enables bioorthogonality of the conjugation, whereby for the first time dual ADCs were generated using FGly technology.

In this thesis the use of FGE for selective and bioorthogonal dual conjugation as well as the copper-dependency of the enzyme was considered. As a cofactor of the aerobic enzymes, copper has a great influence on the substrate specificity of the prokaryotic FGE variants. In high enzyme-to-substrate ratios and in the presence of copper the acceptance of the proline-free motif increased. This effect was observed regardless whether the addition of copper was performed during the reaction or by previous enzyme reconstitution. However, even in the presence of the cofactor the human FGE (hFGE) has the closest substrate specificity for proline-containing cysteine sequences. To investigate the intracellular systems which enable the ER-permanent human FGE to incorporate copper ions, indirect activity assays based on *in vivo* sulfatase activation were performed. In FGE knock-out cells (ARPE19 *sumf1*^{-/-}) the addition of copper sulfate significantly increased the activity of transiently expressed hFGE. In contrast, the treatment with the copper chelator tetraethylene pentamine (TEPA) resulted in an inhibiting effect. The relationship between enzymatic activity and intracellular copper homeostasis was initially analyzed using a copper transporter ATP7B-deficient hepatocyte cell line (HepG2 ATP7B-KO). It has been hypothesized that the secretory route of the hFGE, its N-terminal domain with still unknown function, and an interaction with the Golgi-permanent copper transporter are involved in the generation of the holoenzyme.

The attachment of the C-terminal amino acid sequences KDEL or PGEL successfully increased both, the ER retention of hFGE and the FGly conversion rate of *in situ* antibody production in

CHO cells, resulting in an FGly content of up to 91.7%. Using an extensive model protein library for the establishment of new FGly conjugation strategies, single and double conjugates were created in this cooperation project between the disciplines of biochemistry, organic chemistry, and biotechnology. Factors such as protein stability, conjugate storage, and biological functionality were analyzed. The single-chain antibody scFv425-Fc was loaded with monomethyl auristatin E (MMAE) and carboxyfluorescein. In the cell-based methods life cell imaging and alamarBlue® assay a direct correlation between the presentation of the EGFR on the cell surface and the ADC-dependent fluorescence or cytotoxicity was demonstrated, respectively. Accordingly, the C-terminal conjugation of the single-chain antibody via the non-canonical amino acid FGly did not interfere with successful antigen binding, which led to ADC internalization and lysosomal release of the toxin. A targeted administration of the drug could be identified with an IC_{50} value for the MMAE-ADC in the picomolar range.

2 Einleitung

Die Entwicklung von Antitumormitteln ist ein stark wachsendes Feld in der pharmazeutischen Industrie und hat in den letzten Jahren zunehmend in den Bereichen der personalisierten Therapie und der Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (*antibody drug conjugates*, ADCs) eine starke Entwicklung verzeichnet. Dieser Trend spiegelt das Wegbewegen von einer systemischen Bekämpfung der Tumore durch die Gabe unselektiver Zytostatika hin zu einer gezielten Bekämpfung der malignen Zellen wider. Therapeutika mit erhöhter Selektivität für Tumorzellen zeigen eine verbesserte pharmazeutische Effektivität, ein größeres therapeutisches Fenster und geringere systemische Schädigung (Zhao *et al.*, 2020). Eine zielgerichtete Therapie wird hauptsächlich dadurch ermöglicht, dass eine hochaffine Bindung zwischen dem Therapeutikum und einer für die entsprechende Tumorart charakteristischer Zielstruktur ausgenutzt wird. Besonders häufige Ziele sind Oberflächenproteine, wie der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) (Boni *et al.*, 2020).

Die humane ErbB-Rezeptorfamilie besteht aus vier Mitgliedern, dem ErbB1 (EGFR bzw. humaner EGFR-1 = HER1), dem ErbB2 (HER2/Neu), dem ErbB3 (HER3) und dem ErbB4 (HER4) (Lurje und Lenz, 2010). Besonders die Überexpression oder eine Daueraktivierung der Proteine EGFR und HER2 durch Mutationen stehen im Zusammenhang mit vielen soliden Krebsarten. Zu ihnen zählen kolorektaler Krebs, nicht-kleinzelliger Lungenkrebs, Karzinome der Gliazellen des Auges, Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome sowie auch Brust-, Pankreas-, Eierstock-, Prostata- und Nierentumore (Salomon *et al.*, 1995; Press und Lenz, 2007; Lurje und Lenz, 2010). Aufgrund ihrer komplexen und vielschichtigen Signalweiterleitung sind EGF-Rezeptoren zusätzlich an der Initiierung der Tumorangiogenese und Metastasierung sowie an weiteren nicht-tumorösen Krankheiten wie Kardiomyopathien und neurodegenerativen Störungen wie Parkinson beteiligt (Crone *et al.*, 2002; Iwakura *et al.*, 2005). Zudem können Prozesse, die mit dem EGFR-Signalweg in Verbindung stehen, zu einem progressiven Fortschreiten der Krebserkrankung oder einer Resistenz gegen eine Vielzahl spezifischer Wirkstoffe beitragen (Slamon *et al.*, 1989; Milas *et al.*, 2003).

2.1 EGF-Rezeptor als therapeutisches Ziel

Der EGF-Rezeptor ist an einer Vielzahl von zellulären Vorgängen rund um das Wachstum, die Zelldifferenzierung und das Auslösen der Apoptose beteiligt und vermittelt die Signalweiterleitung durch extrazelluläre Liganden ins Zellinnere (Schlessinger und Lemmon, 2006;

Seshacharyulu *et al.*, 2012). Diese glykosylierten Transmembranproteine bestehen aus vier Cystein-reichen, extrazellulären Domänen, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer C-terminalen, zytosolischen Domäne samt Tyrosinkinase-Aktivität und Phosphorylierungsstellen (**Abb. 1**). Zu ihren natürlichen Liganden gehören neben dem EGF auch der *transforming growth factor α* (TGF- α), Amphiregulin, Neuroregulin, Betacellulin und viele mehr (Dawson *et al.*, 2005; Press und Lenz, 2007). Auf der Zelloberfläche von epithelialen Geweben befindet sich der N-Terminus von EGFR-Monomeren in einer geschlossenen Konformation (Garrett *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 2005). Durch die Bindung des Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung (**Abb. 1**). Die offene Form der extrazellulären Domänen erlaubt eine Dimerisierung zweier Monomere, welche die gegenseitige, intrazelluläre Phosphorylierung von Tyrosin-Seitenketten induziert (Press und Lenz, 2007). An diese Tyrosinphosphate können wiederum Adaptermoleküle rekrutiert werden und somit eine intrazelluläre Signalweiterleitung auslösen (Lowenstein *et al.*, 1992).

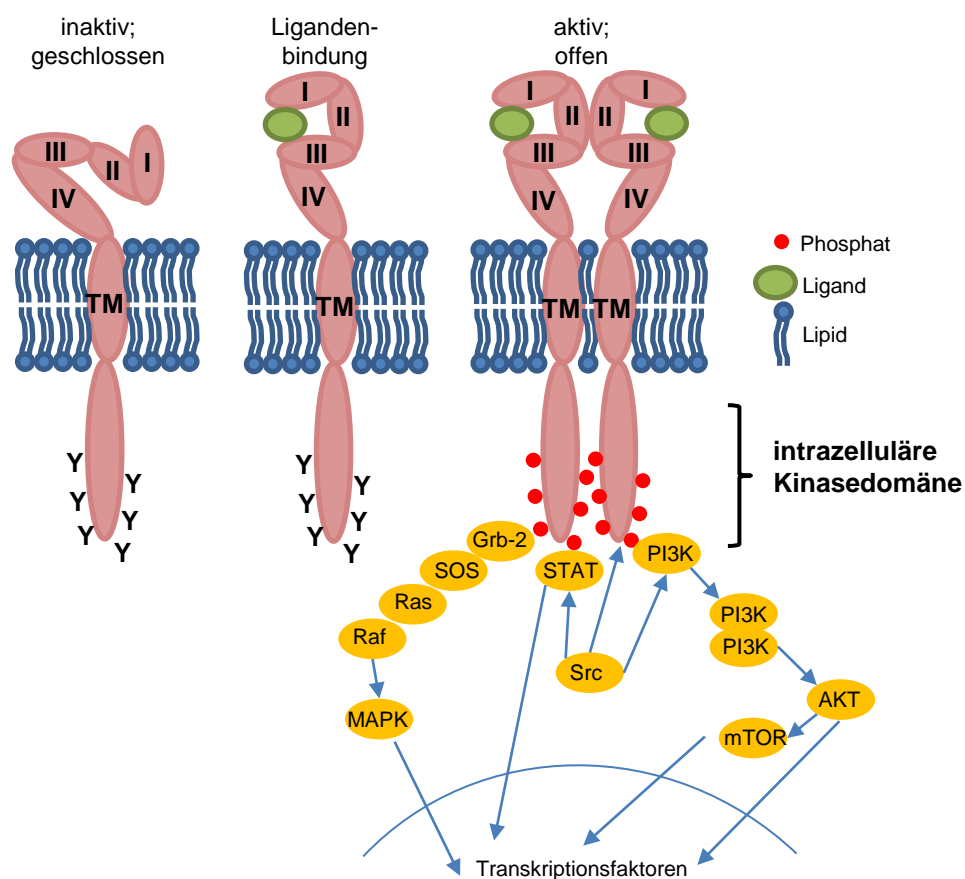


Abb. 1: Der humane EGFR. Der EGFR besteht aus einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne mit C-terminalen Tyrosinen, einer Transmembrandomäne (TM) und vier extrazellulären Domänen (I-IV). Die Bindung des Liganden an Domäne III bedingt den Wechsel der geschlossenen in eine offene Konformation. Die Dimerisierung zweier EGFR-Monomere führt zur Autophosphorylierung der C-terminalen Tyrosinreste, an denen Effektorproteine binden. So werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert (MAPK-, STAT-, Src- und PI3K/AKT-Weg), was letztendlich zu einer Modulation der Transkription auf Ebene der Transkriptionsfaktoren führt.

Im Gegensatz zu EGFR und HER4 gehören HER2 und HER3 zu den nicht-autonomen Rezeptor-tyrosinkinase (RTKs). Durch das Fehlen der EGF-Bindestelle im HER2-Protein bzw. durch die fehlende Tyrosinkinase-Aktivität des HER3s kann durch entsprechende Homodimerisierungen keine Signalweiterleitung stattfinden (Lurje und Lenz, 2010). Erst in einigen heterodimeren Komplexen wird die nachfolgende Signalkaskade und die letztendliche Aktivierung oder Repression nuklearer Transkriptionsfaktoren ausgelöst werden. Welchen Signalweg schlussendlich adressiert wird, wird durch den Liganden und den jeweils am Dimer beteiligten Rezeptortyp gesteuert. So wird bei einem homodimeren EGFR-Komplex vorwiegend die Induktion der Zellproliferation und -migration durch die MAPK(*mitogen-activated protein kinase*)-Kaskade ausgelöst (Liebmann, 2001; Yarden, 2001; **Abb. 1**, linke Kaskade). Heterodimere zwischen EGFR und HER3 führen hingegen zu einer Aktivierung des Phosphatidylinositol 3-Kinasewegs (PI3K; **Abb. 1**, rechte Kaskade), was in gesundem Gewebe zu Zellwachstum, bei malignen Zellen aber auch zu Apoptoseresistenz und invasivem Tumorwachstum trotz Chemotherapie führen kann (Vivanco und Sawyers, 2002). Zudem kann ein STAT (*signal transducers and activators of transcription*)-Signaling entweder durch einen JAK (Januskinase)-abhängigen oder JAK-unabhängigen Prozess ausgelöst werden. Dieser Signalweg ist in vielen Tumorzellen konstitutiv aktiv (Bowman *et al.*, 2000). Das Bindeglied zwischen einigen dieser Signalkaskaden repräsentiert die zytosolische Src-Kinase. Diese Verkettung nimmt wahrscheinlich eine bedeutende Rolle in der zellulären Resistenz gegen EGFR-Tumorthapien ein (Leu und Maa, 2003; Martin, 2003).

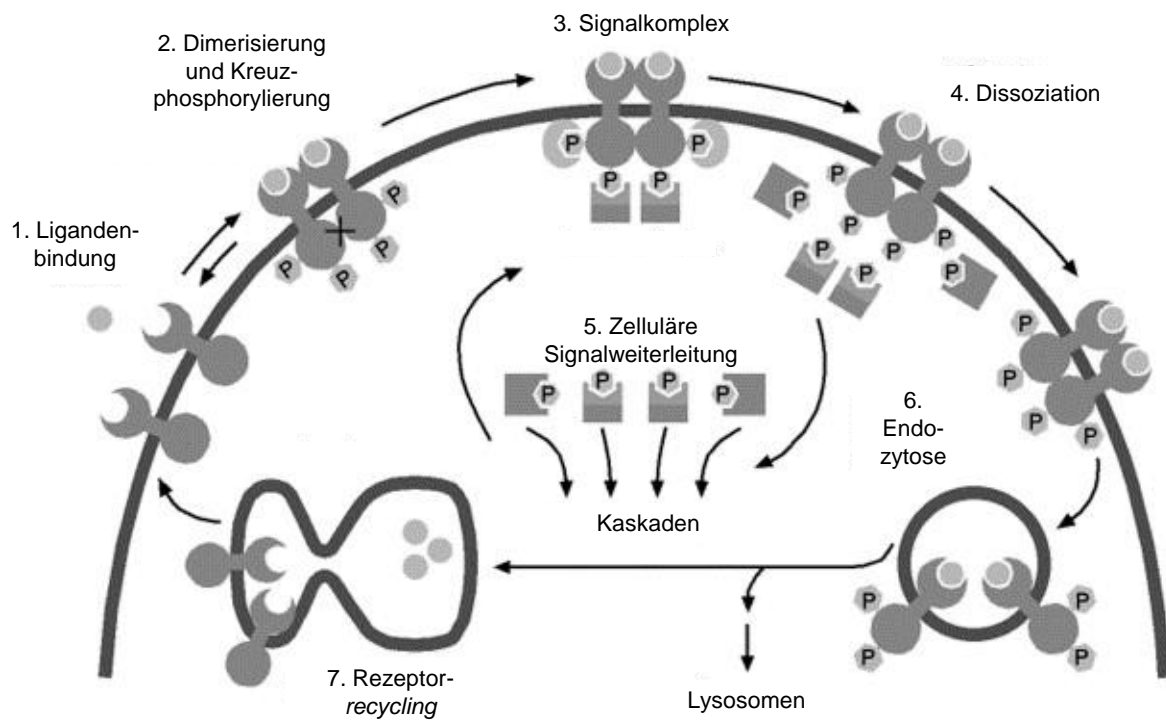


Abb. 2: Zyklus des EGF-Rezeptors. Nach der extrazellulären Bindung eines Liganden (1.) und der darauffolgenden Dimerisierung (2.) werden die intrazellulären Signalwege ausgelöst (3. und 5.). Es folgt die Dissoziation der Effektormoleküle (4.) und die Endozytose des Ligand-Rezeptor-Komplexes (6.). Anschließend kommt es entweder zur Degradation in Lysosomen oder zum Recycling (7.) der EGFR-Monomere durch Rücktransport zur Plasmamembran. Verändert nach Yarden und Kelman, 1991 und Yarden, 2001.

Die Auflösung des EGFR-Signalings wird durch die Internalisierung großer Komplexe aus EGFR, Liganden und Clathrinen eingeleitet (siehe **Abb. 2**, 6.). Diese Clathrin-vermittelte Endozytose beschreibt einen retrograden Transportweg, der mit der Abschnürung von Vesikeln aus der Plasmamembran beginnt. Durch die Fusion der endozytotischen Vesikel mit dem frühen Endosom erfolgt die Dissoziation der Rezeptor-Ligand-Komplexe. Von da aus werden die Rezeptoren entweder recycled, d.h. sie gelangen mittels vesikulären Transport zurück an die Plasmamembran (**Abb. 2**, 7.), oder werden der lysosomalen Degradation zugeführt (Citri und Yarden, 2006). Die Route im endosomalen Transportsystem kann durch die Art des Liganden beeinflusst werden (Decker, 1990).

Wie für einige andere RTK bekannt, ist auch eine Translokation des EGFRs oder Fragmente desselben in den Zellkern beschrieben, wo eine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren stattfindet (Marti *et al.*, 1991; Lo *et al.*, 2006). Eine nukleare Translokation wurde vorwiegend in EGFR-abhängigen Tumorgeweben nachgewiesen (Lo *et al.*, 2006). Zudem tragen weitere Eigenschaften stark EGFR-überexprimierender Zellen zur oftmals sehr progressiven Krebserkrankung mit schlechter Prognose bei. So können diese soliden Tumore vermehrt autokrine und parakrine Faktoren sekretieren (**Abb. 3**). Zu ihnen gehören angiogene und osteoklastogene Wachstumsfaktoren, die nicht nur die Versorgung des Tumors und dessen ungehindertes Wachstum sicherstellen,

sondern auch auf Knochenmarkszellen wirken und die Entwicklung maligner Osteoklasten, sprich Metastasen hervorrufen können (De Luca *et al.*, 2008). Dies und die Beteiligung des EGF-Rezeptors an mehr als einem das Wachstum-, die Zelldifferenzierung- oder den Zelltod-betreffenden Mechanismus führt zu dem Schluss, dass der EGFR ein geeignetes therapeutisches Ziel darstellt.

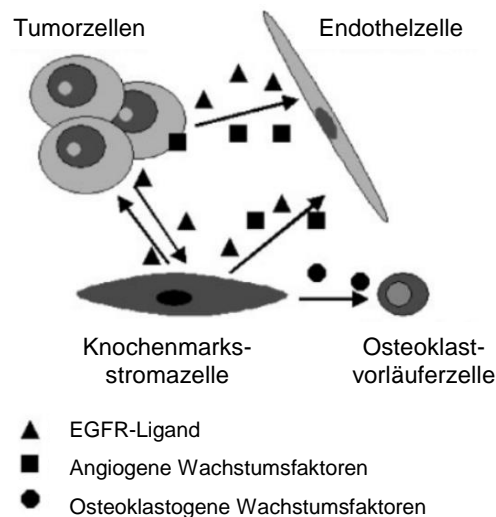


Abb. 3: Effekt EGFR-abhängiger Tumorzellen auf umliegende Zellen. Durch die Sekretion von Signalmolekülen, vor allem angiogene und osteoklastogene Wachstumsfaktoren, beeinflussen Tumorzellen mit gestörtem EGFR-Signaling hauptsächlich Knochenmarks- und Endothelzellen, wodurch die weitere Tumorprogression und Metastasierung ausgelöst werden kann. Verändert nach De Luca *et al.*, 2008.

In der Vergangenheit wurden daher vorwiegend zwei Ansätze zur zielgerichteten Tumorthherapie verfolgt: Zum einen wurden Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) gegen die EGF-Rezeptoren eingesetzt. Beispiele sind Gefitinib (Astra Zeneca) und das duale TKI Lapatinib (GlaxoSmithKline) (Baselga und Albanell, 2002). Zum anderen wurde eine Aktivierung der Rezeptoren durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern (mAK) als Therapeutika unterdrückt, indem sie die extrazellulären Domänen des Rezeptors binden und blockieren (Lurje und Lenz, 2010). Bekannte Beispiele sind Cetuximab und Matuzumab für EGFR sowie Trastuzumab für HER2 (Murthy *et al.*, 1987; Dassonville *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2012). Es wurde gezeigt, dass eine Antikörperbindung zur Oligomerisierung der inaktiven Rezeptoren und zur Internalisierung führt (Murthy *et al.*, 1987; Prenen *et al.*, 2009; Boersma *et al.*, 2011), was wiederum eine Senkung des EGFR-Levels auf der Plasmamembran und ein vermindertes Zellwachstum zur Folge hat (Boersma *et al.*, 2011). Verstärkt wird der zielgerichtete Effekt auf Tumorgewebe im Vergleich zu normal EGFR-exprimierenden Zellen zusätzlich dadurch, dass bei einer starken Überexpression bereits eine stärkere Präsentation des Rezeptors in Clustern vorliegt (Clayton *et al.*, 2007). Zudem kann der Einsatz von mAKs zur Tumorthherapie die Apoptose durch eine Blockierung der Rezeptoren induzieren oder durch die Oberflächenmarkierung der malignen Zellen eine *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC) bzw. eine *complement-dependent cytotoxicity* (CDC) auslö-

sen (siehe **Abb. 4**). Bei der CDC handelt es sich um eine Induktion des komplementären Immunsystems, welches allerdings durch die oftmals hohe Expression von Komplement-regulierenden Oberflächenmolekülen auf Krebszellen inhibiert wird (Gelderman *et al.*, 2004; Iannello und Ahmad, 2005). Die ADCC beschreibt eine Antitumor-Immunreaktion durch die Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), indem die Fc-Teile (*crystallizable fragment*) der AK von Fc-Rezeptoren auf der NK-Zelloberfläche gebunden werden (Ernst *et al.*, 2002). Die Ausschüttung von Cytokinen und Chemokinen und die Oberflächenpräsentation von MHC-Antigenen (*major histocompatibility complex*) inhibiert das Tumorwachstum und rekrutiert weitere Zellen des Immunsystems (Takai, 2005).

2.2 Antikörper-Wirkstoff-Konjugate

Limitierungen der TKI- oder mAK-Tumortherapie für EGFR-überexprimierende Zellen zeigten sich durch einsetzende Resistenz und schneller Ausscheidung der TKIs (Yu *et al.*, 2013; Hoffknecht *et al.*, 2015). Neuere Ansätze verwenden kleine, kostengünstigere Moleküle mit hoher EGFR-Affinität und Antikörper-Wirkstoff-Konjugate.

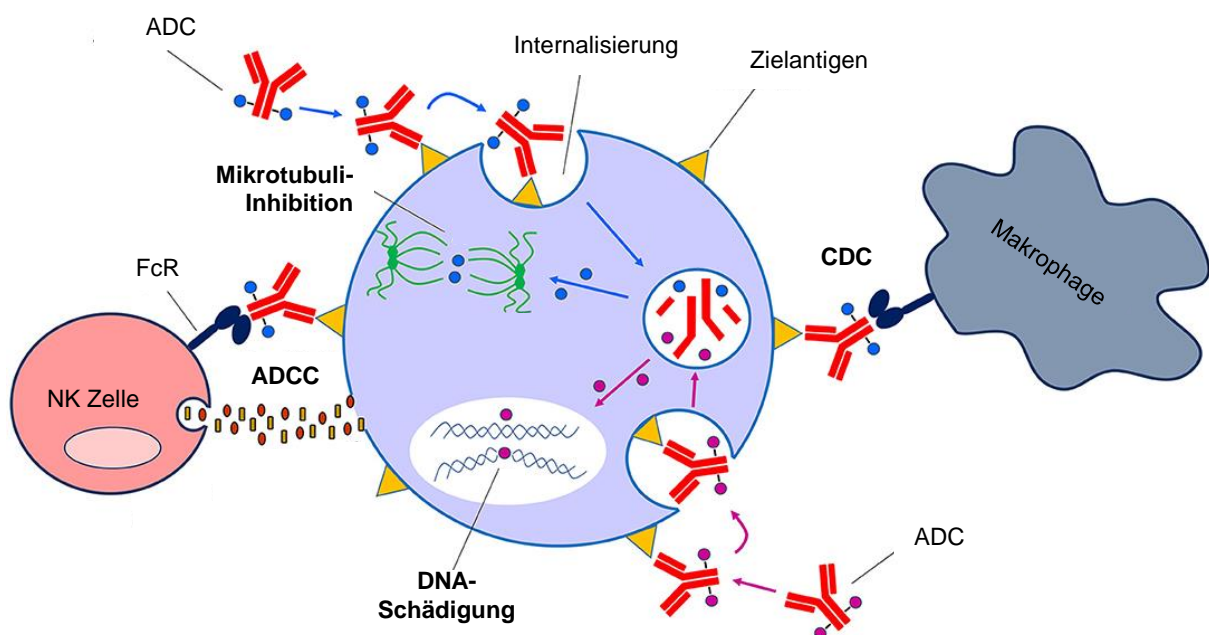


Abb. 4: ADC-Wirkprinzip. Der ADC bindet das Zielantigen auf der Zelloberfläche, wird internalisiert und im Lysosom degradiert. Dadurch wird das Zytostatikum (blaue und pinker Kugel) freigesetzt. In den meisten Fällen führt eine Inhibition der Mikrotubuli oder eine DNA-Schädigung zur Apoptose der Zielzelle. Außerdem kann durch die Oberflächenbindung des ADCs auf der Zelloberfläche das Immunsystem mittels des Komplementsystems (CDC) oder durch NK-Zellen (ADCC) stimuliert werden. Verändert nach Bruins *et al.*, 2020.

Kleine, EGFR-bindende Proteine sind z.B. *single-chain variable fragments* (scFv) aus den variablen Ketten der mAKs, Nanobodies (V_HH-Domänen, *variable heavy-chain only antibodies*)

oder Mimetika der Antigenbindestellen (Adams *et al.*, 2001; Cortez-Retamozo *et al.*, 2004; Steiner *et al.*, 2008). Eine bekannte Klasse der Mimetika sind die *designed ankyrin repeat proteins* (DARPin; **Abb. 5**), die aus einer modularen Einheit von Ankyrin-ähnlichen Domänen aus Helix-Schleife-Helix- β -Haarnadel-Strukturen zusammengesetzt sind, dessen Schleifen die Kontaktfläche zum Epitop nachbilden (Boersma und Plückthun, 2011). An den C- und N-terminalen Enden dieser DARPins befinden sich *cap*-Strukturen, die eine vermehrte Löslichkeit, Stabilität oder auch die Möglichkeit zur Anbringung eines *tags* liefern (Binz *et al.*, 2003). So wurde DARPin E01 entwickelt, der den EGFR in vergleichbarer Weise bindet wie der natürliche Ligand EGF, ebenfalls eine Internalisierung des Rezeptors auslöst und somit die Zellproliferation deutlich herabsenkt (Steiner *et al.*, 2008; Boersma *et al.*, 2011; Plückthun, 2015). Analog wurde auf der Basis von Matuzumab der scFv425 entworfen, der ebenfalls eine hochaffine Bindung zur extrazellulären Domäne III des EGFRs eingeht (Kamat *et al.*, 2008). Vorteil dieser kleinen Bindeproteine ist die geringe Größe, wodurch eine hohe Penetration des soliden Tumorgewebes beobachtet werden konnte (Plückthun, 2015b). Eine verbesserte Halbwertszeit im Blut wird hingegen durch ein erhöhtes Molekulargewicht erreicht. Daher werden Antikörper-Derivate und Mimetika häufig zusätzlich mit Polyethylenglykolen (PEG), Serumalbumin oder einem Fc-Teil eines humanen Antikörpers ausgestattet (Chapman, 2002; Simon *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2019). Die Fusion des scFv425 mit dem Fc-Teil des humanen Immunglobulins G1 (IgG1) (scFv425-Fc; **Abb. 5**) erhöht zudem die therapeutische Wirksamkeit durch die Auslösung der ADCC bzw. CDC.

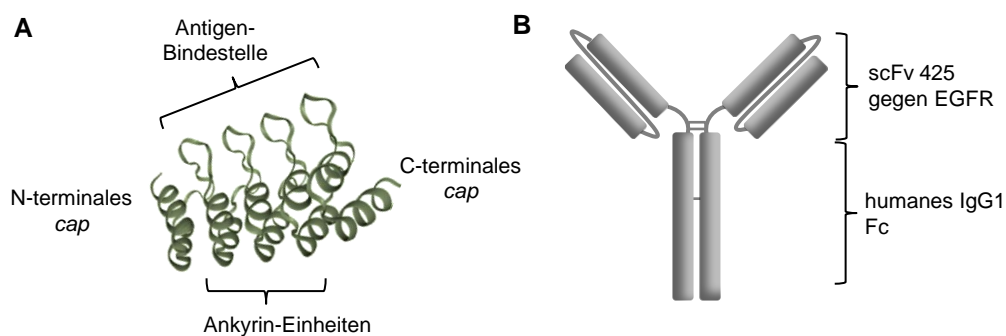


Abb. 5: DARPin und *single-chain* Antikörper. **A)** Der DARPin E01 besteht aus vier Ankyrin-Wiederholungseinheiten, die die Antigenbindestelle zur EGFR-Erkennung bilden, sowie einem C- und einem N-terminalen *cap*. **B)** Der Antikörper aus dem *single-chain variable fragment* 425 (scFv245) ist gegen den EGFR gerichtet und wurde mit einem Fc-Teil eines humanen IgG1 fusioniert. Zwei monomere Fusionsproteine bilden einen Disulfid-verbrückten scFv425-Fc.

Indem die hohe Affinität von Antikörpern und Antikörper-ähnlichen Molekülen mit der zytotoxischen Potenz starker Zellgifte vereint werden, können effektivere Pharmazeutika erzeugt werden. Solche ADCs werden chemisch mit einem Toxin beladen und werden durch die Bindung des EGFRs internalisiert, um ihre Fracht im Inneren der Tumorzelle freizusetzen (**Abb. 4**). Dadurch findet eine hohe Diskriminierung gegenüber wenig EGFR präsentierenden Zellen statt.

ADCs erhöhen die Selektivität, Löslichkeit und Halbwertszeit der Wirkstoffe im Plasma. Gleichzeitig können durch den zielgerichteten Einsatz von Wirkstoffen, deutlich geringere Dosen im Vergleich zu üblichen Chemotherapien eingesetzt werden. Neben den klassischen Toxin-Konjugaten finden auch zahlreiche Radionukleotide und Fluorophore Anwendung als therapeutische oder diagnostische Agenzien (Kaushal *et al.*, 2008; Steiner und Neri, 2011). Zur Vermeidung von Resistenzen werden zudem häufig Mehrfachkonjugate eingesetzt. Sie erlauben die gleichzeitige, gezielte Verabreichung und die definierte Dosierung von mehreren Toxinen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, was die therapeutische Effizienz deutlich erhöht (Levengood *et al.*, 2017; Nilchan *et al.*, 2019). Beispiele für Einfach- und Mehrfachkonjugate sind Trastuzumab-MMAE₂, ein anti-HER2-ADC mit vier Molekülen Toxin pro Antikörper (Oller-Salvia *et al.*, 2018) oder der Isotopen-markierte DARPIn G3, der zur Therapie bzw. Diagnostik von Brustkrebszellen entwickelt wurde (Goldstein *et al.*, 2015). Die Kombination aus Wirkstoff und Detektionsmarker wird als *Theranostic* bezeichnet und ermöglicht eine simultane Nutzung als Therapie und von bildgebenden Methoden. Die Herstellung solcher Pharmazeutika benötigt eine duale und orthogonale Konjugationstechnik (Maruani *et al.*, 2016; Wollschlaeger *et al.*, 2018).

2.3 Proteinkonjugationstechniken

Die Proteinkonjugation zur Generierung von ADCs kann auf vielfältige Weise durchgeführt werden. Eine unselektive Methode zur Beladung ist die Derivatisierung von zugänglichen Aminosäuren auf der Proteinoberfläche. Vornehmlich werden dazu Cysteinreste z.B. mittels Alkylierung durch Maleimide (**Abb. 6 A**) oder Lysine durch Aktivester konjugiert (Cal *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014). Durch eine solche statistische Konjugationsmethode entstehen jedoch inhomogene Mischungen aus ein- und mehrfach beladenen Molekülen, dessen nahezu willkürliche Wirkstoffposition und -anzahl zum Teil große negative Effekte auf die Antigenbindung oder die Proteinstabilität und somit auf die pharmakologische Effektivität des Produktes haben kann (Schumacher *et al.*, 2016). Eine Weiterentwicklung dieser ortsunspezifischen Konjugationsmethode ist die THIOMAB-Strategie. Dabei werden die zugänglichen, intermolekularen Cysteine eines Antikörpers reduziert, reoxidiert und die verbliebenen, freien Thiolgruppen zusätzlicher Cysteine letztendlich chemisch modifiziert (Junutula *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu ermöglichen regioselektive Konjugationsmethoden die Generierung einer definierten *drug-to-antibody ratio* (DAR), wodurch die Löslichkeit und Stabilität des Therapeutikums positiv beeinflusst wird (Brandl *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020). Eine ortsspezifische aber aufwendige Methode ist der Einbau unnatürlicher Aminosäuren (UAS; **Abb. 6 B**) in die Sequenzen der Trägerproteine (Liu

et al., 2007; Maza *et al.*, 2015). Bei der Amber-Suppressions-Methode wird ein alternatives Stopp-Codon ausgenutzt, um mit einer modifizierten tRNA ein Aminosäurederivat mit einer orthogonalen Gruppe zur Biokonjugation einzuführen (Wang *et al.*, 2001). Dazu muss das Genom des Expressionsorganismus dahingehend verändert werden, dass die unnatürliche tRNA durch eine entsprechende tRNA Synthetase gebildet und das Amber-Codon akzeptiert wird.

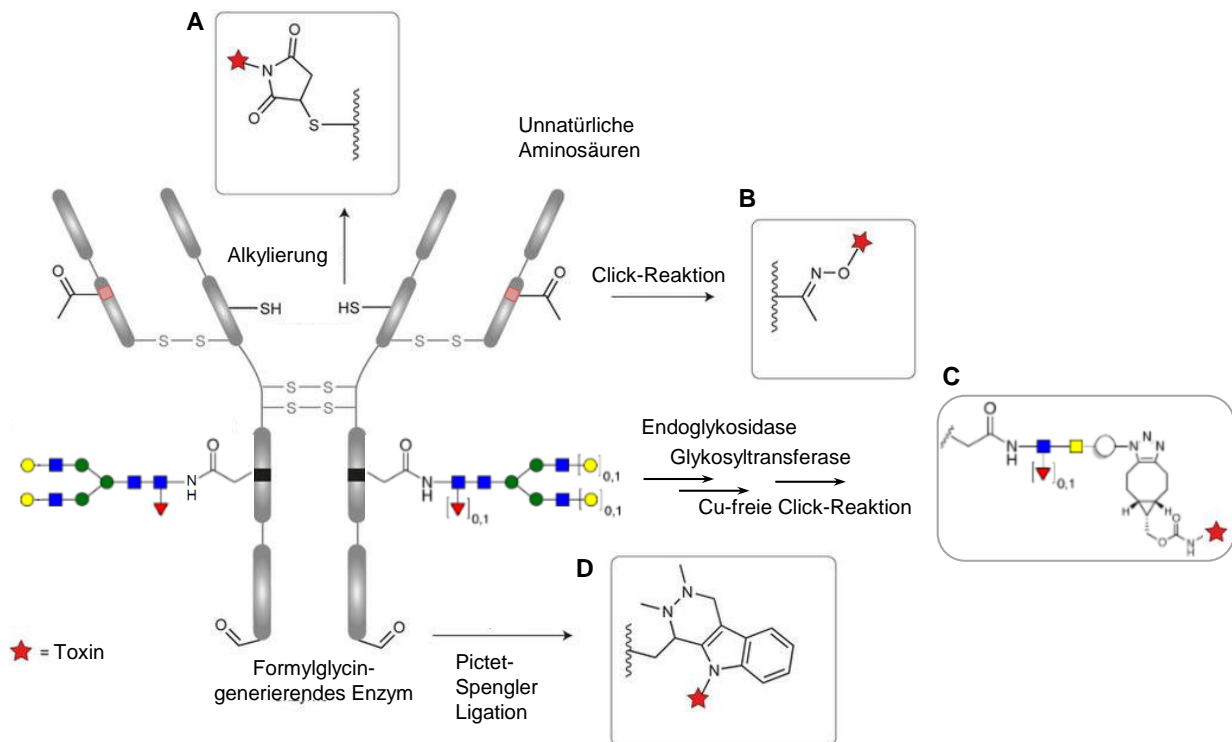


Abb. 6: Beispiele für Proteinkonjugationsmethoden. In diesem Schema ist die Konjugation eines monoklonalen Antikörpers mit einem Toxin (roter Stern) anhand von vier Strategien dargestellt. **A)** Die Alkylierung von Cysteinen findet mittels Maleimid-Toxin-Konstrukten statt. **B)** Durch den Einbau von unnatürlichen Aminosäuren können z.B. Ketone mittels Click-Reaktionen derivatisiert werden. **C)** Das Trimmen der N-Glykanstrukturen durch Endoglykosidasen und der Einbau neuer, bioorthogonal konjugierbarer Saccharide durch Glykosyltransferasen ermöglicht eine Cu-freie Click-Reaktion. **D)** Mit dem Formylglycin-generierenden Enzym kann ein FGly mit einer Aldehydseitenkette erzeugt werden, an der sich eine Pictet-Spengler-Ligation anschließen kann. Verändert nach Chudasama *et al.*, 2016 und Van Geel *et al.*, 2015.

Viele alternative, ortsspezifische Methoden basieren hingegen auf natürlichen, enzymatischen Systemen, die während der Produktion von ADCs eingesetzt werden, um eine sehr spezifische Kondensationsreaktion zwischen Proteinen bzw. Peptiden oder eine chemische Modifikation zu generieren. Vorteil (chemo-)enzymatischer Konjugationsmethoden ist neben der hohen Selektivität die Biokompatibilität, d.h. es können milde Reaktionsbedingungen angewandt oder sogar Konversionsschritte *in vivo* durchgeführt werden (Keilholz, 2007). Nachteile sind oftmals Beschränkungen auf den N- oder C-Terminus sowie unvollständig ablaufende Reaktionen (Falck und Müller, 2018). Viele Enzyme katalysieren post- oder kotranslationale Modifikationsreaktionen. So kann beispielsweise einem Protein ein *Tub-Tag*, eine Sortase-Erkennungssequenz oder ein Aldehyd-*tag* angehängen werden. Beim *Tub-Tag*, einer zwölf Aminosäuren (AS) langen Sequenz, wird durch das Enzym Tubulin-Tyrosin-Ligase (TTL) C-terminal an den Protein-*tag* ein

Tyrosinderivat angehängt (Schumacher *et al.*, 2015). Je nach Derivat kann anschließend eine bioorthogonale, reaktive Gruppe, z.B. ein Aldehyd, in einer chemischen Ligationsreaktion adressiert werden. Die Sortase SrtA katalysiert ebenfalls eine neue Peptidverbindung an einer beispielsweise C-terminalen Erkennungssequenz aus den Aminosäuren LPXTG (Mazmanian *et al.*, 2001). Nach der Hydrolyse der Peptidbindung zwischen den Aminosäuren Threonin und Glycin ligiert SrtA ein N-terminales Glycin eines mit einer Fracht beladenen Tetraglycinpeptids an das Carboxylende des Threonins. Das Formylglycin-generierende Enzym (FGE) kann ebenfalls zur biotechnologischen Proteinkonjugation verwendet werden (**Abb. 6 D**). Als Werkzeug eingesetzt erkennt FGE eine Konsensussequenz aus den Aminosäuren CxPxR und konvertiert das Cystein in ein C^α-Formylglycin (FGly), eine Aminosäure mit einer Aldehydgruppe (Rush und Bertozzi, 2008). Dieses Aminosäuremotiv wird Aldehyd-*tag* oder auch *SMARTag* genannt (Carrico *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009). Aldehyde kommen in Proteinen nur sehr selten vor und können daher sehr selektiv konjugiert werden.

Konjugationsstrategien sind nicht auf die Ebene der Aminosäuren beschränkt. So ist auch die Modifizierung von Glykostrukturen möglich. Bei der *GlycoConnect*-Methode werden N-Glykane durch Endoglykosidasen verkürzt. Anschließend werden orthogonal konjugierbare Saccharidderivate mittels Glykosyltransferasen angehängt (**Abb. 6 C**; Van Geel *et al.*, 2015). Nachteil dieser Methode ist die eventuell erhöhte Immunogenität des Produktes durch die unnatürliche Glykosylierung (Ghaderi *et al.*, 2010).

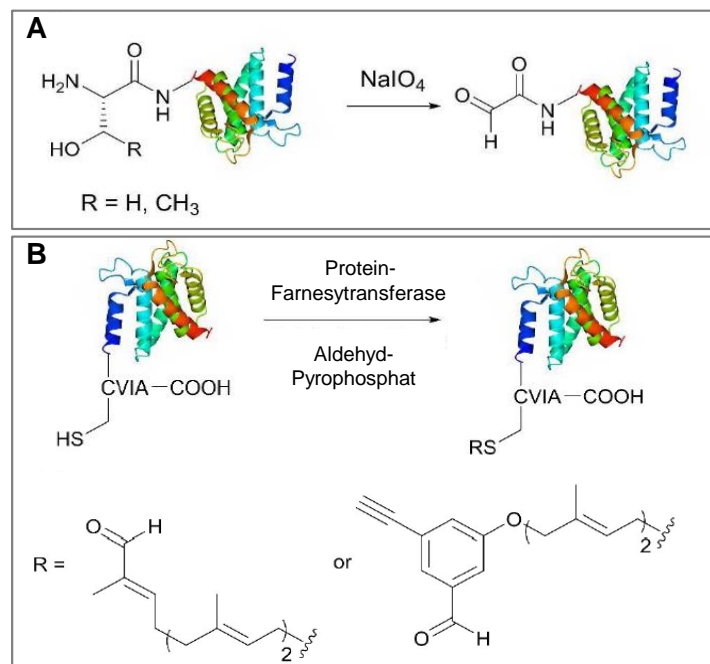


Abb. 7: Alternative Aldehyd-Inkorporation in Proteine. A) Oxidation eines N-terminalen Serin- oder Threoninrestes mit Natriumperiodat. **B)** Protein-Farnesyltransfer eines Aldehydpyrophosphates (R). Verändert nach Spears und Fascione, 2016.

Da eine selektive chemische Modifizierung zur präzisen Proteinkonjugation oder auch zur Mehrfachkonjugation auf die Unität und Reaktivität der funktionellen Gruppe basiert, wird in vielen Konjugationstechniken eine Aldehyd- oder Ketonfunktion verwendet. Wie bereits am Beispiel des *Tub-Tags* erwähnt, können diese funktionellen Gruppen nicht nur durch das Enzym FGE in ein Protein eingeführt werden. So wurden UAS mit einer Aldehyd- oder auch Ketonfunktion bereits in einer Vielzahl von Anwendungen genutzt, bei denen Proteine mit Toxinen oder auch Fluoreszenzmolekülen, Kohlenhydraten oder Biotin-tags modifiziert wurden (Liu *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Axup *et al.*, 2012; Tuley *et al.*, 2014). Chemisch kann ein Aldehyd beispielsweise durch die Oxidation eines N-terminalen Serin- oder Threoninrestes erzeugt werden (**Abb. 7 A**; Spears und Fascione, 2016). Ähnlich wie beim FGE wird z.B. durch die Protein-Farnesyltransferase die post-translationale Modifikation eines Cysteinrestes katalysiert (Gauchet *et al.*, 2006). Dabei kann das Enzym neben dem natürlichen Substrat Farnesylpyrophosphat auch ein Aldehydanalogon auf den Thiolrest innerhalb der als CAAX-Box bezeichneten Aminosäuresequenz übertragen (**Abb. 7 B**; Rashidian *et al.*, 2012).

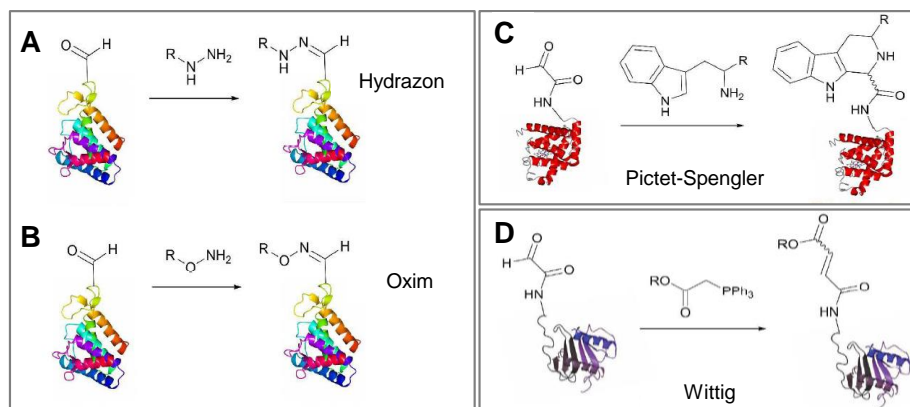


Abb. 8: Aldehyd-spezifische Ligationschemie. Dargestellt sind Schemata von Proteinkonjugationsreaktionen an Aldehydresten. Konjugiert wird die Fracht R durch eine **A**) Hydrazonligation, **B**) Oximligation, **C**) Pictet-Spengler-Reaktion oder **D**) eine Wittig-Reaktion. Verändert nach Spears und Fascione, 2016.

Aldehyde lassen sich mit einer Vielzahl von Ligationsreaktionen, wie der Pictet-Spengler-Ligation, die Wittig-Reaktion mit Triphenylphosphaten oder Oxim- und Hydrazonligationen modifizieren (Spears und Fascione, 2016). Bei Letzteren wird die Tatsache ausgenutzt, dass Aldehyde mit Hydroxylaminen zu Hydrazonen (**Abb. 8 A**) bzw. mit Aminoxy-funktionalisierten Substanzen zu Oximen reagieren (**Abb. 8 B**; Ulrich *et al.*, 2014). Die Pictet-Spengler-Ligation (**Abb. 8 C**) ist eine Reaktion zwischen Tryptaminen und Aldehydgruppen (Agarwal *et al.*, 2013). Bei der Wittig-Reaktion (**Abb. 8 D**; Lum *et al.*, 2013) bilden Phosphorylide mit Ketonen oder Aldehyden Alkenverbindungen aus (Han *et al.*, 2012; Gerlach, 2016). Des Weiteren kann der Aldehyd oder das Keton so funktionalisiert werden, dass anschließend andere, orthogonale Folgereaktionen möglich sind. Das Einführen eines Azides kann beispielsweise dazu genutzt wer-

den eine Cu-katalysierte Zyklisierung mit Acetylenen oder eine *strain-promoted azide-alkyne cycloaddition* (SPAAC) gespannter Cyclooctine durchzuführen (Kolb *et al.*, 2001; Agard *et al.*, 2004; Patterson *et al.*, 2014; Kim und Koo, 2019). Reaktionen von diesem Typ werden Click-Reaktionen genannt.

2.4 Mehrfachkonjugation mittels FGE

Neben der einfachen Proteinkonjugation zur Herstellung von Antikörperkonjugaten mit einem Toxin oder einem Fluorophor, werden duale Konjugate angestrebt. Eine Mehrfachkonjugation kann neben einer kombinatorischen ADC-Tumortherapie oder der Herstellung von *Theranostics* auch Anwendungen wie FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) oder die Konjugation von Molekülen zur Verbesserung der Plasmahalbwertszeit ermöglichen (Maruani *et al.*, 2016). Eine Mehrzahl der dualen Konjugationsmethoden basiert entweder auf der Verwendung von multivalenten Molekülgerüsten (*scaffolds*) oder orthogonale Konjugationschemien bzw. unterschiedliche Reaktivitäten zweier natürlicher oder unnatürlicher Aminosäuren. So wird bei der Thio-Selenomab-Strategie zunächst ein Selenocystein in einen mAK eingeführt, mit einem Iodacetamid-Toxin-Derivat konjugiert und anschließend wird analog zur THIOMAB-Strategie ein weiteres Toxin an ein Cysteinrest ligiert (Nilchan *et al.*, 2019).

Eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung ortsspezifischer, dualer Konjugate ist die Kombination von zwei unabhängigen Konjugationsmethoden. Lee *et al.* erzeugten einen dualen *single-chain* Antikörper mit Rhodamin und einem Fluorescein mittels SrtA- und π -clamp-Technik (Lee *et al.*, 2019). Der π -clamp, eine Aminosäuresequenz aus FCPF, wird am Cysteinrest derivatisiert. Die Regioselektivität entsteht durch die Interaktion der delokalisierten π -Systeme des thiol-spezifischen, perfluorierten Aromaten mit den das Cystein flankierenden Phenylalaninresten (Zhang *et al.*, 2016). Eine andere Variante wurde mit dem EGFR-bindenden scFv425 durchgeführt. Wollschlaeger *et al.* etablierten eine *one-pot* Reaktion durch zwei Varianten des Enzyms O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT), das den Transfer einer Alkylgruppe auf ein Cystein in seinem aktiven Zentrum und die Freisetzung eines Guanins katalysiert (Keppler *et al.*, 2004). Die Fusion eines AGT-Analogons an das *protein of interest* wird SNAP-tag genannt. Dieser akzeptiert Benzylguaninderivate, wohingegen der aus einer AGT-Mutante generierte CLIP-tag Benzylcytosine als Substrate umsetzt (Gautier *et al.*, 2008). Der N- und C-terminal SNAP- und CLIP-getaggte scFv425 wurde mit einem Alexa-Fluor- und einem Nahinfrarot-Farbstoff (NIR) gekoppelt. Das scFv425-Doppelkonjugat zeigt eine hohe Stabilität, selektive Fluoreszenzdetektion und NIR-abhängige Zytotoxizität (Wollschlaeger *et al.*, 2018).

Die Formylglycin-Methode zur Proteinkonversion wurde bislang hauptsächlich zur Bildung von Einfachkonjugaten verwendet (Hudak *et al.*, 2012; Drake *et al.*, 2014). Die Herstellung eines Mehrfachkonjugates mit unterschiedlichen Frachtmolekülen, die in definierter Anzahl und Position ligiert werden, kann allerdings auch rein mittels Formylglycin-Konjugation bewältigt werden. Dazu wird Set an Enzymen mit definierten, orthogonalen Reaktivitäten verwendet (Krüger *et al.*, 2018, 2019). Da die in dieser Arbeit gewählte Konjugationschemie nicht spezifisch zwischen den Aldehyden mehrerer FGly-Motive differenzieren kann, wird zur Generierung eines dualen anti-EGFR-ADCs eine Orthogonalität auf enzymatischer Ebene angestrebt. Dazu werden weitere Homologe der aeroben Formylglycin-generierenden Enzyme bzw. die Klasse der anaeroben Eisen-Schwefel-Proteine AtsB zur Umsetzung verschiedenster Aminosäuremotive eingesetzt.

Das FGE wurde im Zusammenhang mit der Multiplen Sulfatasedefizienz (MSD) entdeckt, einer Krankheit, bei der alle humanen Typ-I-Sulfatasen in ihrer Aktivität reprimiert sind, da in ihren aktiven Taschen die katalytische Aminosäure C^α-Formylglycin fehlt (Schmidt *et al.*, 1995; Dierks *et al.*, 1999). Sulfatasen katalysieren die Hydrolyse von Sulfatestern im katabolen und anabolen Stoffwechsel und kommen in Säugern hauptsächlich in Lysosomen aber auch extrazellulär, im ER und Golgi vor (Hanson *et al.*, 2004). Ihre prokaryotischen Verwandten können sowohl zytoplasmatisch, periplasmatisch oder auch extrazellulär lokalisiert sein (Dodgson *et al.*, 1984). Durch die Defizienz einer Sulfatase können einige ihrer Stoffwechselsubstrate aufgrund eines konsekutiv ablaufenden Abbaumechanismus nicht weiter degradiert werden. Im Menschen tritt folglich eine Akkumulierung unverdaulicher Stoffe in Lysosomen, eine lysosomale Speicherkrankheit, auf (Von Figura *et al.*, 1998).

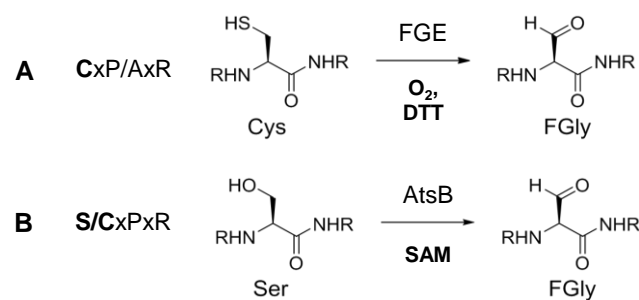


Abb. 9: Schema der Reaktionen von FGE und AtsB. **A)** FGE katalysiert die Oxidation der Thiolgruppe eines Cysteins (Cys) in den Aldehyd des Formylglycins (FGly). Diese Reaktion ist abhängig von molekularem Sauerstoff und einem Reduktionsmittel, hier DTT (Dithiothreitol). **B)** AtsB benötigt für die Konversion eines Serins (Ser) oder Cysteins anaerobe Bedingungen und den Kofaktor SAM (S-Adenosylmethionin).

FGly wird post-translational aus einem Cystein (Cys-Typ-Sulfatasen) oder einem Serin (Ser-Typ-Sulfatasen) in einer FGE-Erkennungssequenz gebildet (**Abb. 9**). Diese Sequenz besteht aus dem minimalen Kernmotiv C/SxP/AxR und N- bzw. C-terminalen Hilfssequenzen. Diese leiten sich von den in Sulfatasen hochkonservierten Aminosäuren des aktiven Zentrums ab (Murooka

et al., 1990; Dierks *et al.*, 1999). Das humane FGE (hFGE) wird durch das Gen *sumf1* (Sulfatase-modifizierender Faktor 1) kodiert und ist ein O₂-abhängiges, ER-ständiges Enzym, von dem Homologe sowohl in vielen Pro- als auch in Eukaryoten vorkommen (Dierks *et al.*, 2003). Das hFGE-Vorläuferprotein besteht aus insgesamt 374 AS, von denen die ersten 33 AS als Signalpeptid zur Translokation ins ER fungieren und im reifen Enzym abgespalten sind (Preusser-Kunze *et al.*, 2005). Das prozessierte 38-kDa-Protein besteht aus einer flexiblen N-terminalen Domäne (NTD; AS 34-91) und einer Kerndomäne, die eine globuläre Struktur mit wenigen, vereinzelten Sekundärstrukturmerkmalen, der sogenannten *FGE fold*, aufweist und zwei Calciumionen gebunden hält (Dickmanns *et al.*, 2005; Roeser *et al.*, 2005). Aufgrund seines Monooxygenase-ähnlichen Mechanismus, bei dem höchstwahrscheinlich ein Kupferion und ein zusätzliches, thiolisches Reduktionsäquivalent benötigt werden (siehe Kapitel 2.5), können ausschließlich die Thiolreste von Cysteinen (**Abb. 9 A**) zu Aldehyden oxidiert werden (Fey *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2015).

In einigen Prokaryoten hat sich zusätzlich ein analoges, anaerobes System entwickelt, das sowohl Cysteine als auch Serine als Substrat akzeptieren kann (**Abb. 9 B**). Diese anaeroben AtsBs, auch anSMEs (*anaerobic sulfatase maturing enzymes*) genannt, sind Eisen-Schwefel-Proteine, d.h. sie beinhalten vier Eisen-Schwefel-Zentren, welche stark oxidationsempfindlich sind (Murooka *et al.*, 1990; Miech *et al.*, 1998; Szameit *et al.*, 1999). Bei der FGly-Generierung dienen die FeS-Cluster der Bindung des Substratrestes und fungieren als Elektronendonator zur Erzeugung eines Radikals aus dem Kofaktor S-Adenosylmethionin (SAM). Durch den radikalischen Charakter der anaeroben FGly-Bildung kann der Aldehydrest sowohl aus einem Cystein als auch aus einem Serin gebildet werden (Bertheau *et al.*, 2006; Grove *et al.*, 2008; Goldman *et al.*, 2013).

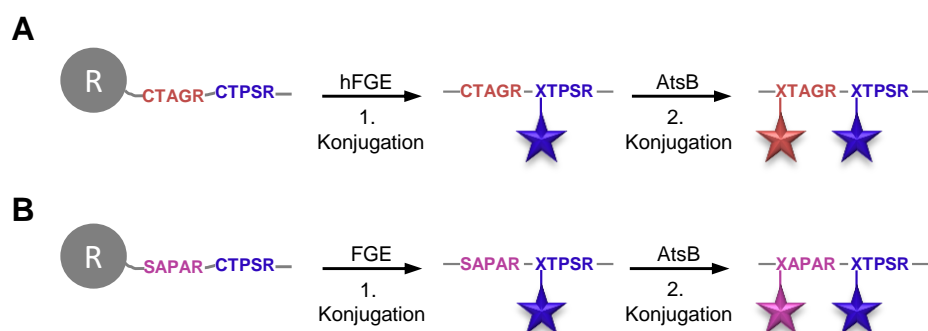


Abb. 10: Konjugationsstrategien mit AtsB und FGE. **A)** Das humane FGE setzt das CTPSR-Motiv (blau) um, wohingegen das AtsB auch das Prolin-freie CTAGR-Motiv (rot) erkennen kann. **B)** Da aerobe FGEs nur Cysteine in FGly umwandeln können (blaues Motiv), wird das Serin des SAPAR-Motivs (pink) ausschließlich vom AtsB konjugiert. Jede Konversionsreaktion an einem Protein (R) ist von einer Konjugation (Stern) gefolgt.

Die unterschiedliche Substratspezifität der aeroben und anaeroben Enzyme im Hinblick auf die Kernerkenntnissequenz erlaubt in Proteinkonjugationsreaktionen eine konsekutive Konversion des Trägermoleküls (**Abb. 10**), jeweils gefolgt von der Aldehyd-spezifischen Konjugationsreaktion. Da das humane FGE sich als sehr spezifisch in der Erkennung Cystein- und Prolin-haltiger Kernmotive erwiesen hat, kann exemplarisch die erste Konversion des Proteins mittels hFGE *in vivo* oder *in vitro* am CTPSR-Motiv stattfinden. Auf den ersten, ortsspezifischen Konversionsschritt folgt die Ligation der ersten Fracht, wodurch die nachfolgende, zweite Konversion auf das übrige Motiv beschränkt wird (Krüger *et al.*, 2018). Die zweite Konversion mittels AtsB wird am CTAGR-Motiv durchgeführt (**Abb. 10 A**; Krüger *et al.*, 2018). Um eine alternative Doppelkonjugation zu erreichen (**Abb. 10 B**), kann AtsB auch ein Serin im Motiv SAPAR zu FGly umwandeln (Krüger *et al.*, 2019). Diese enzymatische Strategie stellt eine Quasi-Orthogonalität dar.

2.5 FGE und Kupfer

Bei dem Sauerstoff-abhängigen Mechanismus der FGly-Bildung aus einem Cystein muss der Thiolrest des Substrates oxidiert werden. Dabei werden insgesamt zwei Protonen (2H^+) und zwei Elektronen (2e^-) auf molekularen Sauerstoff übertragen und Wasser gebildet (Holder *et al.*, 2015). Um aus einem O_2 -Molekül zwei H_2O -Moleküle zu generieren, werden allerdings 4H^+ und 4e^- benötigt, weshalb die Beteiligung eines weiteren Reduktionsäquivalents an der aeroben FGly-Generierung postuliert wurde (Holder *et al.*, 2015). Viele Monooxygenasen, wie die Galactoseoxidase, bewältigen die Sauerstoffaktivierung durch einen metallischen Kofaktor wie Kupfer (Solomon *et al.*, 2014). Tatsächlich wurden in *in vitro*-Experimenten signifikante Aktivitätssteigerungen der Enzyme TcFGE, ScFGE und des FGEs aus *Mycobacterium smegmatis* (MsFGE) durch die Anwesenheit von stöchiometrischen Mengen an Kupfer detektiert (Holder *et al.*, 2015; Knop *et al.*, 2015). Kristallstrukturen dieser Enzyme mit CuI oder dem in der Elektronendichte vergleichbaren Ion AgI bestätigten die Beladung der FGEs mit je einem Metallion (Meury *et al.*, 2017; Appel *et al.*, 2019; Miarzlou *et al.*, 2019), welches in einer linearen Anordnung zwischen den beiden enzymatisch aktiven Cysteinen der aktiven Tasche koordiniert liegt (Álvarez-Barcia und Kästner, 2019). Eine lineare Cu-Koordinierung ist jedoch eher für Kupfertransporter wie Atox1 (Antioxidant 1) bekannt, die keine Oxygenasereaktion katalysieren (Wernimont *et al.*, 2000; Solomon *et al.*, 2014). Mononukleare Kupferproteine, die eine O_2 -Aktivierung vornehmen, wie z.B. die Glykosidhydrolase oder die Cu-Amin-Oxidase (CuAO), weisen hingegen alleamt eine tetraedrische oder quadratisch-planare Anordnung des durch Histidine komplexierten Kupfers auf (Wilmot *et al.*, 1999; Quinlan *et al.*, 2011; Solomon *et al.*, 2014). Analysen mit CdII, welches als weniger oxidationsempfindlicher Ersatz für CuII eingesetzt wurde, zeigten,

dass die Bildung einer CuII-Spezies während der Reaktion zu einer tetraedrischen Koordinierung mitsamt eines Wassermoleküls und eines Acetats anstelle des Substrates führen kann (Álvarez-Barcia und Kästner, 2019; Miarzlou *et al.*, 2019). Dies zeigt zwar eine gewisse Flexibilität der aktiven Tasche, allerdings sind hier keine Histidin- sondern Cysteinreste an der Metallkoordination beteiligt.

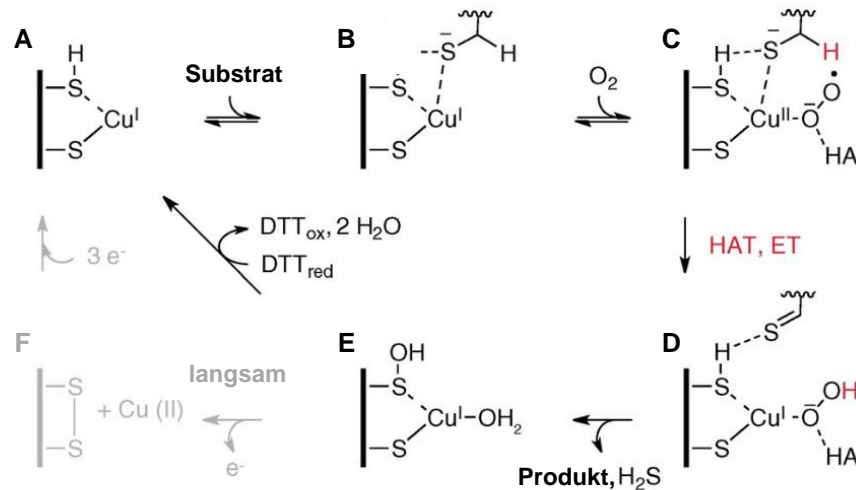


Abb. 11: Postulierter Cu-Katalysemechanismus des FGEs. An der Reaktion ist ein über zwei Cysteinreste gebundenes Kupfer-I-Ion (A), das Thiol des Substratscysteins (B) und molekularer Sauerstoff (C) beteiligt. Über ein Wasserstoff- (HAT) und Elektronentransfer (ET) wird aus einem Superoxo- ein Hydroperoxo-Intermediat (D). Das Thioaldehyd hydrolysiert und gibt das Produktaldehyd (FGly) und Schwefelwasserstoff frei (E). FGE wird oxidiert und die Cu-Spezies zerfällt (F), oder durch die erneute Reduktion mit DTT (E) wird der Ausgangszustand (A) für einen neuen Katalysezyklus wiederhergestellt. Verändert nach Knop *et al.*, 2016.

In Anbetracht dieser Ergebnisse haben Knop *et al.* einen hypothetischen FGE-Mechanismus entworfen (Abb. 11; Knop *et al.*, 2016). Dabei ist CuI über zwei Cysteine koordiniert (A) und das Substratthiol wird durch eines dieser Cysteine und durch das Metallion gebunden (B). Die Aktivierung von Sauerstoff (C) führt zu einem HAT (*hydrogen atom transfer*) und einem Elektronentransfer (ET). Das Thioaldehyd (D) hydrolysiert und gibt das Produkt und Schwefelwasserstoff frei (E). FGE wird oxidiert (F) oder durch Reduktion für einen neuen Katalysezyklus wiederhergestellt (Knop *et al.*, 2016).

2.6 Zielsetzung

Eine grundlegende Analyse der Kupferabhängigkeit des FGEs kann vorteilhaft für die Entwicklung einer verlässlichen, FGE-basierten Konjugationsstrategie zur mehrfachen und ortsspezifischen Biokonjugation sein. Daher wurde sowohl die humane FGE-Aktivität und Cu-Inkorporation auf zellulärer Ebene als auch die FGly-Konversion aerober FGEs *in vitro* genauer

betrachtet. Die Proteinkonjugation sollte anhand der Herstellung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR angewandt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit lag das Hauptaugenmerk daher zum einen auf der Analyse und Verbesserung der Aktivität des humanen FGEs und der Ermöglichung einer Proteinkonversion *in vivo*. Dies diente der Verringerung der Anzahl der bei der ADC-Herstellung benötigten Arbeitsschritte und der Maximierung der Ausbeuten. Da die Orthogonalität der dualen Konjugation im enzymatischen Schritt gewährleistet wird, mussten zum anderen zunächst die Erkenntnisse über die Substratspezifität der pro- und eukaryotischen Enzyme aus Peptidassays auf Proteinebene übertragen werden. Dazu wurde eine Auswahl an Modellproteinen mit verschiedensten Erkennungsmotiven erstellt und mit den pro- und eukaryotischen Enzymen umgesetzt. Unter den aeroben FGEs wurden vor allem das humane FGE, aber auch das MtFGE aus dem Organismus *Mycobacterium tuberculosis*, das ScFGE aus *Streptomyces coelicolor* und das TcFGE aus *Thermomonospora curvata* genutzt. Für die anaeroben Enzyme der radikalischen SAM-Proteinsuperfamilie wurden das MMAtsB von *Methanosarcina mazei* und das KPAtsB von *Klebsiella pneumoniae* verwendet.

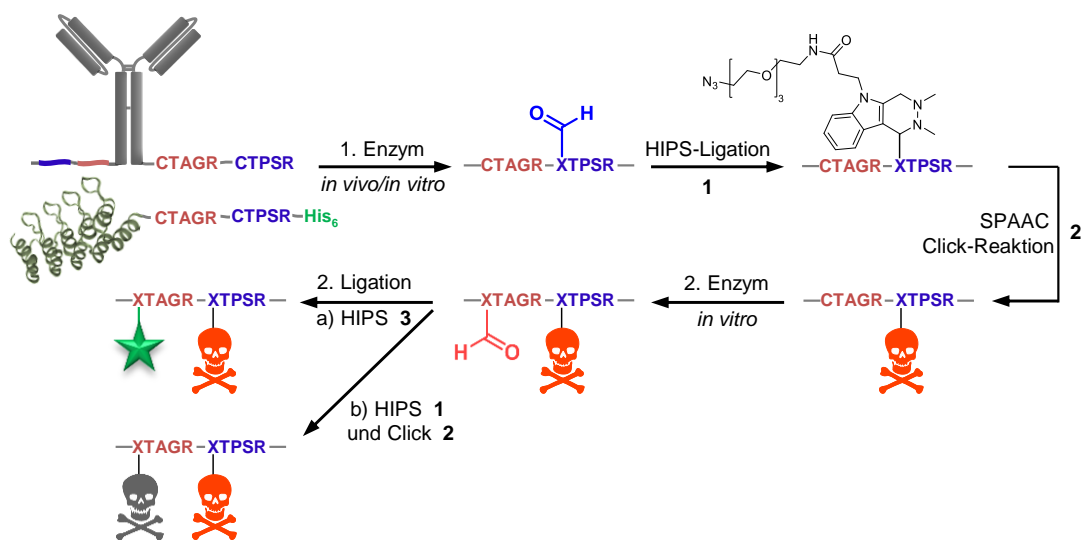


Abb. 12: Konzept einer dualen FGly-Konjugationsstrategie. Um zweifach-beladene Konjugate des *single-chain* Antikörpers oder des DARPins zu erhalten, werden zwei enzymatische Schritte mit der HIPS- und der SPAAC-Click-Reaktion kombiniert. Das erste Enzym setzt ein Erkennungsmotiv (hier blau) zu einem Formylglycin um. Dieser Schritt kann *in vivo* oder *in vitro* stattfinden. Der Aldehyd wird daraufhin durch die HIPS-Ligation mit einer Azid-Funktionalität versehen, welche in einer anschließenden Click-Reaktion mit einem Cyclooctin-Toxin (roter Totenschädel) ligiert wird. Durch die Verwendung eines zweiten Enzyms *in vitro* kann ein zweites FGly (rot) in einer weiteren Erkennungssequenz z.B. entweder mit einem HIPS-Farbstoff markiert (grüner Stern) oder ebenfalls zuerst in ein Azid und anschließend zu einem weiteren Toxin derivatisiert werden (grauer Totenschädel).

Das Konzept für ein duales Wirkstoffkonjugat gegen den EGFR aus DARPIn E01 oder scFv425-Fc ist in **Abb. 12** dargestellt. Dessen Etablierung und Weiterentwicklung wurde im Laufe dieser Arbeit und den assoziierten Publikationen Krüger *et al.*, 2018, 2019 und Boschanski *et al.* (unveröffentlichtes Manuskript) beschrieben, wobei hier der Fokus auf die Substratspezifität und

Aktivität des Formylglycin-generierenden Enzyms gelegt wurde. Die Proteine werden jeweils mittels FGly zunächst mit einem Azid-tragenden HIPS-Baustein (1) beladen. Dieses Azid wird anschließend in der Click-Konjugation mit einem Toxin (2) versehen. Alternativ kann auch eine direkte Konjugation mit einem HIPS-Fluoreszenz-Konstrukt (3) stattfinden. Als Konjugations-substanzen dienten Fluoreszenzmoleküle (Carboxyfluorescein) und ein Zytostatikum (Monomethylauristatin E). Die therapeutische Effizienz der erstellten Konjugate aus Modellproteinen und *single-chain* Antikörpern sollten anschließend auf zellulärer Ebene untersucht werden.

3 Materialien

3.1 Geräte und Laborausstattung

Tab. 1: Verwendete Geräte und Laborausstattungen. Bezeichnung, Hersteller und Firmensitz.

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Bezugsstelle/Hersteller, Ort
Automatisierte Pumpensysteme: Äkta Explorer, 10S Äkta Ettan, LC	GE Healthcare, Marlborough, MA, USA GE Healthcare, Marlborough, MA, USA
Agarose-Geldokumentationssystem: Kamera Bildaufnahmegerät RMB92 Transilluminator ECX-26.c UV-Tisch Biometra TI3	peQLab, Erlangen, Deutschland Rainbow CCTV, Traverse City, MI, USA peQLab, Erlangen, Deutschland Biometra, Analytik Jena, Jena, Deutschland
<i>Charge Coupled Device</i> (CCD)-Kamera <i>Luminescent Image Analyzer</i> LAS 3000, Fujifilm <i>Intelligent Dark Box</i>	Fuji Photo Film, Minato, Japan
Eismaschine	Ziegra B-100, Isernhagen, Deutschland
Elektrophoresekammern: Agarosegele	Mechanische Werkstatt, Universität Bielefeld, Deutschland
Midi SDS-Gele	Mechanische Werkstatt, Universität Bielefeld, Deutschland
Mini-Protean SDS-Gele	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Netzgeräte: <i>Electrophoresis Power Supply</i> EPS 200 Netzteil 250 V/0-0.1 A	Pharmacia Biotech, Emmendingen, Deutschland Elektronische Werkstatt, Universität Bielefeld, Deutschland
Bio-Rad <i>PowerPac</i> HC, 1000/300/200	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Elektroporator 2510	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Inkubatoren/Schüttler: CO ₂ -Inkubator HERA <i>cell</i> CO ₂ -Inkubator, SteriCult	Heraeus, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA Forma Scientific, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Schüttler, Certomat SII Schüttler, <i>Roto Shake Genie</i> Inkubationsschüttler HAT 37 °C Inkubationsschüttler G25 37 °C Innova 42 <i>Incubator Shaker Series</i> 37 °C Innova 4300 <i>Incubator Shaker</i> 30 °C Innova 4230 <i>Incubator Shaker</i> 15-37 °C Inkubatorschrank Heraeus 30 bzw. 37 °C	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA Infors AG, Bottmingen, Schweiz New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA Heraeus, Thermo Scientific, Waltham, MA USA
Kühl- und Gefrierschränke: Herafreeze -80 °C Liebherr Premium, 4 und -20 °C Liebherr <i>Comfort</i> 4 und -20 °C Privileg öko, 4 °C	Heraeus, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland Privileg, Whirlpool Coporation, Benton Harbor, MI, USA
Forma Scientific, -80 °C	Forma Scientific, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Sanyo <i>ultra low</i> , -150 °C Foron Vitacool, 4 °C	Sanyo, Moriguchi, Japan Foron, Niederschmiedeberg, Deutschland
Liquid Scintillation Analyzer (LSA), Tri-Carb 2800TR	Perkin Elmer, Downers Grove, USA
Massenspektrometer UltraFleXtreme MALDI-ToF/ToF	Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland

Fortsetzung Tab. 1: Verwendete Geräte und Laborausstattungen.

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Bezugsstelle/Hersteller, Ort
Magnetrührer/Heizplatten:	
IKA Combimag RCH	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
IKAMAG REO	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Heidolph	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
M21/1 Framo	Framo Morat Gerätetechnik, Eisenach, Deutschland
Advanced VMS-C7	VWR International, Erlangen, Deutschland
MALDI Trägerplatte <i>polished steel target</i> , MTP384	Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland
Mikroskope:	
Durchlichtmikroskop Leica DMi1	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Leica DMIL IRB	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Konfokales Fluoreszenzmikroskop LSM 700	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Mikrowelle LG Intellowave	LG, Seoul, Südkorea
Millipore Milli-Q, Q-Pod Destillationsanlage	Millipore Synergy, Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Multiwell Plate Reader:</i>	
Tecan infinite M200 <i>Microplate Reader</i>	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Tecan Spark <i>Multimode Microplate Reader</i>	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
PCR-Geräte:	
Biometra T personal	Biometra, Analytik Jena, Jena, Deutschland
MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MIC Group, Inc. (dba GMI), Brenham, TX, USA
Peqlab primus 96	Peqlab, VWR International, Erlangen, Deutschland
Peqstar 2x Gradient	Peqlab, VWR International, Erlangen, Deutschland
qPCR <i>StepOnePlus Real-Time PCR System</i>	Life Technologies, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
MJ Research, PTC-200	MJ Research, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
pH-Meter <i>SevenMulti</i>	Mettler Toledo, Giesen, Deutschland
Photometer, Bio-Photometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfen:	
Pipetboy acu-Pipettierhilfe	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Mikroliterpipetten manuell, 2/10/20/200/1000 µL	Gilson Incorporated, Middleton, WI, USA und Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland und ABIMED
Pipetman, Gilson International und Eppendorf	Analysen Technik, Langenfeld, Deutschland
Itegra Pipetboy 2	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Pipetus-Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgerate, Eberstadt, Deutschland
Multipipette Stream	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Proteinchromatographie-Säulen:	
HiTrap Phenyl HP	GE Healthcare; Marlborough, MA, USA
HiTrap ProteinA HP	GE Healthcare; Marlborough, MA, USA
HisTrap HP	GE Healthcare; Marlborough, MA, USA
HisTrap HF	GE Healthcare; Marlborough, MA, USA
MBPTrap HP	GE Healthcare; Marlborough, MA, USA
GSTrap HP	GE Healthcare; Marlborough, MA, USA
PD-10 <i>Desalting Column</i>	GE Healthcare; Marlborough, MA, USA
MonoQ 5/50 GL	GE Healthcare; Marlborough, MA, USA
Superdex 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare; Marlborough, MA, USA
Rotations-Vakuum-Konzentrator, <i>Speed Vac</i> , RVC 2-18	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode, Deutschland
Rotator, SB3	Stuart, Stone, UK
Saugpumpen KNF Laboport, XF54 230 50	KNF Neuberger, Deutschland
Millipore <i>Vacuum pump</i>	Millipore Synergy, Merck, Darmstadt, Deutschland
Saugflasche AC	HLC Biotech, Bovonden, Deutschland
SDS-Gelkammern	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Sicherheitsbrenner:	
<i>Fireboy plus</i>	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Gasprofi 2 SCS	WLD-Tec, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Sterilisatoren:	
Webeco Automat V	Webeco, Berlin, Deutschland
Autoklav CS-Labor II	Webeco, Berlin, Deutschland
Vapour-line	VWR International, Erlangen, Deutschland

Fortsetzung Tab. 1: Verwendete Geräte und Laborausstattungen.

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Bezugsstelle/Hersteller, Ort
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trockenschrank	Heraeus, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Ultraschallgeräte:	
Branson Sonifier 450	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch-Gmünd, Deutschland
Bandelin sonorex	Bandelin, Berlin, Deutschland
Branson Sonifier <i>cell disrupter</i> B15	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch-Gmünd, Deutschland
UV-Lampe VL-4.LC	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Vortex-Genie II	New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA
Vortex-Genie K550-GE	New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA
Vortexer G-560	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Waagen:	
Präzisionswaage Pioneer	Ohaus, Greifensee, Schweiz
Analysenwaage XA205 <i>Dual Range</i>	Mettler Toledo, Giesen, Deutschland
Oberschalenwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
2x3 Velp <i>scientifica</i>	Velp <i>scientifica</i> , Usmate Velate MB, Italien
Wasserbäder:	
Paratherm U4 <i>electronic</i>	Julabo, Seelbach, Deutschland
Thermomix	Laborgerate MS, Dielheim, Deutschland
Memmert M350T	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Wasserstrahlpumpe und Filtrationsanlage	Mechanische Werkstatt, Universität Bielefeld, Deutschland
Werkbänke:	
Steril-Sicherheitswerkbank, HERAsafe <i>clean-bench</i>	Heraeus, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Steril-Sicherheitswerkbank, <i>CleanAir</i> , DFL/BSS6	C-TecCleanroom Technology, Rottenburg
Bakterien-Produktschutzbank, <i>LaminAir</i> HVR 2448	C-TecCleanroom Technology, Rottenburg
Western Blot-Kammer	Mechanische Werkstatt, Universität Bielefeld, Deutschland
Wippen:	
CAT RM5-30V	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer, Staufen, Deutschland
<i>Rocking Platform</i>	VWR, Darmstadt, Deutschland
Wippe	Frobel Labortechnik, Lindau, Deutschland
Überkopfschüttler Stuart <i>tube rotator</i> SB3	Stuart Equipment, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK
Orbitalschüttler KH2/500	Noctua, Wien, Österreich
Zellzähler:	
Cedex Xs	Innovatis, Roche, Mannheim, Deutschland
Zentrifugen:	
Heraeus Pico 17 <i>Centrifuge</i>	Heraeus, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Centrifuge</i> 5804	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Centrifuge</i> 5804R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Centrifuge</i> 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Centrifuge</i> 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Centrifuge</i> 5417R	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus <i>Biofuge pico</i>	Heraeus, Thermo Scientific, Waltham, MA USA
Sorvall RC 5B Plus und 5B	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Sorvall RC 3B <i>Refrigerated Centrifuge</i>	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

3.2 Laborverbrauchsmaterialien

Tab. 2: Verwendete Laborverbrauchsmaterialien. Bezeichnung, Hersteller und Firmensitz.

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Bezugsstelle/Hersteller, Ort
Bechergläser	Schott DURAN Group, Wertheim/Main, Deutschland
Deckgläser rund, quadratisch	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland
Dialyseschlauch Cellulose MWCO 14 kDa	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmalküvetten	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße	
0.5/1.5/2 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
0.5/1.5 mL <i>safe lock tubes</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Erlenmeyerkolben 50/100/250/2000 mL	Rasotherm, Berlin, Deutschland
<i>Falcon Tubes</i> 13/15/50 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Faltenfilter	Merck, Darmstadt, Deutschland
Filtriermembran	Merck, Darmstadt, Deutschland
Handschuhe:	
Einmalhandschuhe Nitril Best Gen	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
Kulturröhrchen, 10 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Messzylinder 50/250/500 mL	Karl Hecht, Sondheim/Rhön, Deutschland
Mikrotiterplatten 96-well	Greiner BioOne, Österreich
<i>Deepwell</i> Platten 96-well	
qPCR Quali-PCR-Platten 96-well, Halbrahmen, <i>low profile</i>	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
MicroAmp <i>Optical Adhesive Film</i> , PCR compatible	Applied Biosystems, CA, USA
Mund- und Nasenschutzmasken	Merck, Darmstadt, Deutschland
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland
Parafilm M	Bemis Europe, Braine L'Alleud, Belgien
PCR- <i>Softtubes</i> 200 µL	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
PCR-Streifen 8x 200 µL	Greiner BioOne, Kremsmünster, Österreich
Pipetten:	
Glasmesspipetten 5/10/20 mL	Hirschmann EM, Eberstadt, Deutschland
Pasteurpipetten, Glas	BRAND, Wertheim, Deutschland
Mikroliterpipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
10/200/1000 µL	
Sterile Zellkulturpipetten 2/5/10/25/50 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Mikroliterpipettenspitzen	Labsolute, Th. Geyer, Renningen, Deutschland
10/200/1000 µL	
Schraubdeckelflaschen 100/500/1000/2000 mL	Schott DURAN Group, Wertheim/Main, Deutschland
SDS-Gelsysteme	Bio-Rad Laboratories, München
Spitzenaufsatzfilter	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ultrazentrifugatoren:	
50 mL Merck 30 MWCO	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Vivaspin Turbo</i> 15 Ultrafiltration Unit	Sartorius, Göttingen, Deutschland
MWCO 15	
Wägeschälchen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Whatman Paper 3MM CHR	GE Healthcare, München, Deutschland
Western Blot Transfermembran Roti-PVDF	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturgefäße:	
Flaschen T25, T75	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA und Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>Tubes</i> 50 mL	
Schüttelkolben 25/40 mL	
Zellkulturschalen und Petrischalen:	
10 cm unbeschichtete Petrischalen	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA und Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Beschichtete Zellkulturschalen	
20/10/6/3 cm und 6-/12-/24-/48-/96-well	
Nunc Lab-Tek <i>Chamber Slide</i> 8-well	
Zellschaber <i>Cell scraper</i> 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
ZipTip U-C18-Spitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

3.3 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 3: Chemikalien und Reagenzien. Bezeichnung, Hersteller und Firmensitz. Sofern nicht anders angegeben wurden die Chemikalien im analytischen Reinheitsgrad bezogen.

Reagenz	Bezugsstelle/Hersteller, Ort
1,4-Bis(5-phenylazol-2-yl)benzen (POPOP)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
2,5-Diphenyloxazol (POP)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
³ H-DHEAS ([1,2,6,7- ³ H(N)]-Dehydroepiandrosteron-3-Sulfat Natriumsalz)	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Acetonitril	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid + Bisacrylamid 1:3	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar	BD Difco, Heidelberg, Deutschland
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
alamarBlue Reagenz	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Ammoniumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Arginin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bacto-Hefeextrakt	BD Difco, Heidelberg, Deutschland
Bacto-Trypton	BD Difco, Heidelberg, Deutschland
Bicin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bradfordreagenz (Coomassie Blue)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau (Natriumsalz)	Serva, Heidelberg, Deutschland
BSA (bovines Serumalbumin) = Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chelex100	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Chloramphenicol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
CHO-Transfektionsmedium (CHO-TF)	Xell AG, Bielefeld, Deutschland
CICCA Matrix	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>complete protease inhibitor cocktail</i> - EDTA free	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Coomassie G250	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAPI	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DBCO-PEG-VC-PAB-MMAE	MedChemExpress, Sollentuna, Schweden
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithioerythritol (DTE)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
<i>Dulbecco 's Modified Eagle 's Medium</i> (DMEM) Pulver	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dehydroandrosteron-3-Sulfat (DHEAS) Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dihydrat	
Desoxynukleotidtriphosphate (Mix dNTPs)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
fötales Kälberserum (FKS)	Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland
G-418 Sulfat	PAA, Pasching, Österreich
<i>Gel Loading Dye Purple</i> (6x)	New England Biolabs, Ipswich, UK
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glutathion, reduziert (GSH)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Hexylaminharz (HA403)	Resindion, Binasco, Italien
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Histidin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Hygromycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Imidazol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Iodacetamid (IAA)	Fluka, Buchs, Schweiz
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Fortsetzung Tab. 3: Chemikalien und Reagenzien.

Reagenz	Bezugsstelle/Hersteller, Ort
Kaliumchlorid	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kupfersulfat-Dihydrat/Pentahydrat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Lipofectamin LTX	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lumasafe Plus Szintillationscocktail	LUMAC-LSC, Groningen, Niederlande
Luminol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LysoTracker Blue DND-22	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Maltose	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Methoxypolyethylenglycol-Maelimid 2k (Mal-PEG 2k)	Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, Deutschland
Methanol	VWR, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver, Sucofin	TSI, Zeven, Deutschland
Mowiol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Natriumcyanoborhydrid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogendosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
N-Ethylmaleimid (NEM)	Acros Organics, NJ, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NP-40 (Nonidet P 40 <i>Substitute</i>)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pansorbin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
p-Coumarsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pepton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
p-Nitrocatecholsulfat (pNCS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Polythylenglycol-Methyletheramin 5k (Amin-PEG 5k)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Polyethylenimin PEI	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Ponceaus S	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Prolin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase Inhibitor-Mix	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ProteinA-Sepharose (CL-4B)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pyruvat	Gibco, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sulfosalicylsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
SyproOrange	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
TC42	Xell AG, Bielefeld, Deutschland
TCEP (Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Tetraethylenpentamin (TEPA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Triflouressigsäure (TFA)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau-Färbelösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin/EDTA Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween R 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
X-Gal	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Zeocin	Invitrogen, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Ziegenserum	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

3.4 Kits

Tab. 4: Verwendete Kits samt Verwendungs- und Herstellerangaben.

Verwendung	Kit	Bezugsstelle/Hersteller, Ort
Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA (kleiner Maßstab)	<i>innuPrep Plasmid Mini Kit 2.0</i>	AnalytikJena, Jena, Deutschland
Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA (großer Maßstab)	<i>PureYield Plasmid Midiprep System</i>	Promega, Madison, WI, USA
Extraktion und Aufreinigung von DNA nach PCR oder Gelelektrophorese	<i>innuPrep DOUBLEpure Kit</i>	AnalytikJena, Jena, Deutschland
Extraktion und Aufreinigung von DNA nach PCR oder Gelelektrophorese	<i>Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System</i>	Promega, Madison, WI, USA
Entwicklung von Western Blots	Thermo Scientific Pierce ECL Western Blotting Substrat	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Verstärkende Chemilumineszenz von Western Blots	Thermo Scientific SuperSignal West Dura Chemilumineszenz-Substrat	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
(Mutagenese-)PCR	KAPA HiFi <i>HotStart ReadyMix</i>	KAPA Biosystems, Roche, Rotkreuz, Schweiz
Gibson Assembly PCR	<i>NEBuilder HiFi DNA Assembly Kit</i>	New England Biolabs, Ipswich, UK

3.5 Antikörper

Tab. 5: Verwendete Antikörper. Spezies, Antigene und Arbeitskonzentrationen.

Antikörper	Spezies	Antigen	Arbeitskonzentration WB/IF
<i>Rabbit-anti-FGE (EB04)</i>	Kaninchen	Formylglycin-generierendes Enzym	1:3 000 / 1:100
<i>Rabbit-anti-STS (ASC)</i>	Kaninchen	Steroidsulfatase	1:4 000 / -
<i>Goat-anti-Rabbit-HRP</i>	Ziege	Fc von Immunglobulinen des Kaninchens	1:10 000 / -
<i>Mouse-anti-RGSHis</i>	Maus	RGSHH	1:1 000 / 1: 1 000
<i>Mouse-anti-PentaHis</i>	Maus	HHHHH	1:1 000 / 1:100
<i>Mouse-anti-GFP</i>	Maus	Green Fluorescent Protein	1:3 000 / -
<i>Mouse-anti-Myc</i>	Maus	<i>Myc-tag</i> (EQKLISEEDL)	1:1 000 / -
<i>Goat-anti-Mouse-HRP</i>	Ziege	Fc von Immunglobulinen der Maus	1:5 000 / -
<i>Rat-anti-HA</i>	Ratte	<i>HA-tag</i> (YPYDVPDYA)	1:1 000 / 1:100
<i>Goat-anti-Rat-HRP</i>	Ziege	Fc von Immunglobulinen der Ratte	1:10 000 / -
<i>Rabbit-anti-HA-POD</i>	Kaninchen	<i>HA-tag</i> (YPYDVPDYA)	1:500 / -
<i>Mouse-anti-PDI</i>	Maus	PDI (Protein-Disulfid-Isomerase, ER-Marker)	- / 1:500
<i>Mouse-anti-GM130</i>	Maus	GM130 (Golgi-Membranprotein 130, Golgi-Marker)	- / 1:100
<i>Rabbit-anti-MBP</i>	Kaninchen	Maltose-bindendes Protein	1:5 000 / -
<i>Donkey-anti-Goat-HRP</i>	Esel	Fc von Immunglobulinen der Ziege	1:10 000 / -
<i>Goat-anti-Mouse-Alexa546</i>	Ziege	Fc von Immunglobulinen der Maus	- / 1:500
<i>Goat-anti-Rat-Alexa546</i>	Ziege	Fc von Immunglobulinen der Ratte	- / 1:500
<i>Goat-anti-Mouse-Alexa488</i>	Ziege	Fc von Immunglobulinen der Maus	- / 1:500
<i>Goat-anti-Rabbit-Alexa488</i>	Ziege	Fc von Immunglobulinen des Kaninchens	- / 1:500
<i>Donkey-anti-Mouse-Alexa488</i>	Esel	Fc von Immunglobulinen der Maus	- / 1:500

3.6 Enzyme

Tab. 6: Verwendete Enzyme und deren zugehörige Puffersysteme.

Enzym/Puffer	Bezugsstelle/Hersteller, Ort
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs, Ipswich, UK
Phosphatase Puffer	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>AgeI</i> -HF	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>DpnI</i>	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>EcoRI</i> -HF	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>EcoRV</i> -HF	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>HindIII</i> -HF	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>NdeI</i>	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>NheI</i> -HF	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>NotI</i> -HF	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>PstI</i>	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>SacII</i>	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>SpeI</i>	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>StuI</i>	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>XbaI</i>	New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>XhoI</i>	New England Biolabs, Ipswich, UK
CutSmart Puffer	New England Biolabs, Ipswich, UK
3.1 Puffer	New England Biolabs, Ipswich, UK
2.1 Puffer	New England Biolabs, Ipswich, UK
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Ipswich, UK
T4 DNA-Ligase Puffer + ATP	New England Biolabs, Ipswich, UK
BioTaq DNA-Polymerase	Qiagen, Mannheim, Deutschland
BioTaq Puffer	Qiagen, Mannheim, Deutschland
Proteinase K	New England Biolabs, Ipswich, UK
Q5-Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, UK
Q5 Puffer	New England Biolabs, Ipswich, UK
Trypsin (MS Reinheit)	Promega, Madison, WI, USA
PNGase F	Promega, Madison, WI, USA

3.7 Antibiotika und Nährmedienzusätze

Tab. 7: Verwendete Antibiotika und Nährmedienzusätze.

Bezeichnung	Stockkonzentration	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/mL	50 µg/mL
Chloramphenicol	50 mg/mL	100 µg/mL
Doxycyclin	1 mg/mL	2 µg/mL
FKS		10%
G-418 Sulfat	25 mg/mL	800 µg/mL
L-Glutamin	2 mM	1%
Hygromycin	50 mg/mL	600-1200 µg/mL
Kanamycin	30 mg/mL	30 µg/mL
Penicillin/Streptomycin	10 000 U/mL	0,5%
Prolin	100 mg/mL	100 µg/mL
Pyruvat	100 mM	100 µM
Zeocin	100 mg/mL	100 µg/mL

3.8 Standards

Tab. 8: Größenstandards für DNA- und Protein-Gelelektrophoresen.

Größenstandard	Bezugsstelle/Hersteller, Ort
1 kb <i>quick-load</i>	Fermentas Life Sciences, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
100 bp DNA-Standard	Fermentas Life Sciences, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Dual Color Precision Plus Protein Standards</i>	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
<i>Precision Plus Protein Standards All Blue</i>	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

Tab. 9: Standards für MALDI-ToF-MS-Messungen.

Standard	Sequenz
<i>Peptide Calibration Standard</i>	Angiotensin II / 1046,5418 Angiotensin I / 1296,6848 Substance P / 1347,7354 Bombesin / 1619,8223 ACTH clip (1-17) / 2093,0862 ACTH clip (18-39) / 2465,1983 Somatostatin 28 / 3147,4710
CS1-Peptid für hFGE	Ac-MTDFYVPVSLCTPSRAALLTGRS-NH ₂

3.9 Medien, Puffer und Lösungen

Tab. 10: Verwendete Nährmedien. Die Zusammensetzung der Nährmedien ist in den zur Verwendung gängigen Größen, Molaritäten oder Volumenprozenten angegeben. Für die Nährmedien der Säugerzelllinien siehe Kapitel 3.11. Der pH-Wert wurde, falls nicht genauer angegeben, mit NaOH, HCl, oder Essigsäure eingestellt.

Medium	Zusammensetzung
LB -Medium (<i>lysogeny broth</i>)	1% Bacto-Trypton 0,5% Bacto-Hefeextrakt 0,1% Glucose 0,5% NaCl pH 7,3; autoklaviert
LB-Agarplatten	LB-Medium, pH 7,3 4% Agar Agar autoklavieren Antibiotikum (Kapitel 3.7)
SOC-Medium	20 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 0,5 g NaCl 2,5 mL KCl (1 M) 2 g MgCl ₂ ad 1 L dH ₂ O pH 7; autoklaviert 20 mL Glucose (1 M)
Autoinduktionsmedium (AI)	6 g Na ₂ HPO ₄ 3 g KH ₂ PO ₄ 20 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 L dH ₂ O; autoklavieren 40 mL Zuckerlösung pro 1 L Medium ansetzen
Zuckerlösung für AI-Medium	75 mL Glycerol 6,25 g Glucose 25 g Lactose ad 500 mL dH ₂ O; sterilfiltriert

Tab. 11: Verwendete Puffer und Lösungen. Die Zusammensetzung der Lösungen ist in den zur Verwendung gängigen Größen, Molaritäten oder Volumenprozenten angegeben. Der pH-Wert wurde, falls nicht genauer angegeben, mit NaOH, HCl, oder Essigsäure eingestellt.

Lösung	Zusammensetzung
Ammoniumpersulfat (APS), 10%	5 g $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ in 50 mL dH_2O , 4 °C
Bicin-Puffer (3x)	150 mM Bicin 45 μM CaCl_2 300 mM NaCl
Blue Silver Coomassie Färbelösung	100 mL Phosphorsäure 100 mL dH_2O 100 g Ammoniumsulfat 1,2 g Coomassie G250 ad 1 L dH_2O frisch 20% MeOH
Coomassie Färbelösung	0,2% Coomassie-Blau 10% Essigsäure 45% MeOH 45% dH_2O
ECL-Reagenz A	200 mL 1 M Tris, pH 8,6 50 mg Luminol in DMSO + 2 μL H_2O_2 (30%ig) frisch dazu
ECL-Reagenz B	10 mL DMSO 11 mg p-Coumarinsäure in DMSO
Gelfiltrationspuffer	100 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,2
GSTrap Bindepuffer	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na_2HPO_4 1,8 mM KH_2PO_4 pH 7,3
GSTrap Elutionspuffer	50 mM Tris 10 mM Glutathion (reduziert, frisch) 1 mM DTT (frisch) pH 8
HEBS-Puffer	280 mM NaCl 50 mM HEPES 1,5 mM NaH_2PO_4 pH 7
HIC Bindepuffer	25 mM Na_2HPO_4 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7
HIC Elutionspuffer	18,75 mM Na_2HPO_4 25% Isopropanol
HisTrap-Bindepuffer A (DARPin und MtFGE)	50 mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl 25 mM oder 50 mM Imidazol pH 8
HisTrap Elutionspuffer A (DARPin und MtFGE)	50 mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl 250 mM oder 500 mM Imidazol pH 8
HisTrap Bindepuffer B (ScFGE)	50 mM Tris 500 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 7,5
HisTrap Elutionspuffer B (ScFGE)	50 mM Tris 500 mM NaCl 500 mM Imidazol pH 7,5

Fortsetzung Tab. 11: Verwendete Puffer und Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung
HisTrap Bindepuffer C (TcFGE)	50 mM Tris 200 mM NaCl 15 mM Imidazol pH 8
HisTrap Elutionspuffer C (TcFGE)	50 mM Tris 200 mM NaCl 400 mM Imidazol pH 8
Lämmli-Puffer (4x)	100 mM Tris, pH 6,8 0,04% Bromphenolblau 2% SDS 10% Glycerin 20% β -Mercaptoethanol (frisch hinzugefügt für +SH-Gele)
Lysepuffer	1x PBS 0,01% TritonX100 oder 1 % NP-40 Proteaseinhibitor-Cocktail <i>complete</i> (1 Tablette auf 50 mL; frisch) Oder 1:100 Proteaseinhibitor-Cocktail
MBPTrap Bindepuffer	20 mM Tris 200 mM NaCl 1 mM EDTA pH 7,4
MBPTrap Elutionspuffer	20 mM Tris 200 mM NaCl 1 mM EDTA 10 mM Maltose pH 7,4
Membran <i>Stripping</i> -Lösung	200 mM Glycin Eisessig, pH 2,1 autoklavieren
PBS (<i>phosphate buffered saline</i> ; 10x)	87,7 g NaCl 6,35 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ oder 5,52 g NaH_2PO_4 28,48 g Na_2HPO_4 ad 1 L dH_2O pH 7,4
PBST	1x PBS, pH 7,4 0,1% Tween 20
pNCS-Abstopplösung	1 N NaOH 0,15 M EDTA
pNCS-Acetattpuffer (2x)	0,8 M Natriumacetat 0,4 M Essigsäure 1 mM Natriumpyrophosphat 20% NaCl pH 5
Ponceau-Färbelösung	2 g Ponceau S 30 g Trichloressigsäure 30 g Sulfosalicylsäure ad 100 mL dH_2O
ProteinA Bindepuffer	20 mM NaH_2PO_4 pH 7,2
ProteinA Elutionspuffer	0,1 M Zitronensäure pH 3
ProteinA Neutralisationspuffer	1 M Tris pH 9
Proteinfällter	50% Ammoniumsulfat
Rekonstitutionspuffer	50 mM Tris 50 mM NaCl pH 7,5
SDS-Gel Entfärber	10% Essigsäure 45% MeOH 45% dH_2O

Fortsetzung Tab. 11: Verwendete Puffer und Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung
SDS-Gel Fixierer	40% EtOH 10% Essigsäure 50 % dH ₂ O
SDS-Gel Laufpuffer (10x)	1,92 M Glycin 1% SDS 0,5 M Tris
SDS-Gel Sammelgelpuffer	0,8 M Tris pH 6,8
SDS-Gel Trenngelpuffer	1,875 M Tris pH 8,8
TA0	0,1% Trifluoressigsäure
TA50	0,1% Trifluoressigsäure 50% Acetonitril
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris 0,1 M Na ₂ EDTA (Titriplex III) 5,7% Eisessig; in dH ₂ O
Western Blot Anodenpuffer	75 mM Tris 20 % Methanol pH 7,5
Western Blot Blotto	5% Milchpuver PBST
Western Blot Kathodenpuffer	25 mM Tris 40 mM Aminocaprinsäure 20% Methanol pH 9,0
Xylol-Szintillationslösung	0,5% PPO 0,03% POPOP Xylol

3.10 Bakterienstämme

Tab. 12: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Eigenschaften
<i>E. coli</i> DH5α el.	elektrokompetente <i>E. coli</i> zur Plasmidvervielfältigung, F ⁻ , φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF) U169, recA1, endA1, λ ⁻ , hsdR12(rK ⁻ , mK ⁺), supE44, thi-1, gyrA, relA1
<i>E. coli</i> DH5α ch.	chemisch kompetente <i>E. coli</i> , zur Plasmidvervielfältigung, F ⁻ , φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF) U169, recA1, endA1, λ ⁻ , hsdR12(rK ⁻ , mK ⁺), supE44, thi-1, gyrA, relA1
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) el.	elektrokompetente <i>E. coli</i> zur Proteinexpression unter dem Lac-IPTG-System, F ⁻ ompT gal [dcm] [lon] hsdSB (rB ⁻ , mB ⁻) λ(DE3), T7-expression
<i>E. coli</i> BL21 ch.	chemisch kompetente <i>E. coli</i> zur Proteinexpression unter dem Lac-IPTG-System,
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) el.	elektrokompetente <i>E. coli</i> , zur Proteinexpression unter dem Lac-IPTG-System, F ⁻ ompT gal [dcm] [lon] hsdSB (rB ⁻ , mB ⁻) λ(DE3) pRARE(CmR)

Der *Escherichia coli*-Stamm DH5α ist durch die genetische Inaktivierung von Rekombinasen und Endonukleasen zur Plasmidvervielfältigung optimiert und zum Blau-Weiß-Screening durch X-Gal befähigt. Bei den zur Expression rekombinanter Proteine verwendeten *E. coli*-Stämmen BL21 und Rosetta sind die OmpT- und Lon-Proteasen genetisch inaktiviert. Das λ(DE3)-

Lysogen enthält die cDNA für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors, welche für die Expression der Gene rekombinanter Proteine auf pET-Vektoren unter dem T7-Promotor notwendig ist. pET-Vektoren codieren für das Repressorprotein LacI, welches durch Lactose reprimiert und durch dessen Stoffwechselprodukt Galactose bzw. dem nicht spaltbaren Analogon IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) vom lac-Promotor verdrängt wird, wodurch die rekombinante Genexpression induziert wird. Die Erweiterung der tRNA-Bibliothek in Rosetta (DE3) erlaubt zusätzlich die Expression von Genen, die seltene Arginincodons (AGA, AGG und CGA), Glycincodons (GGA), Isoleucincodons (AUA), Leucincodons (CUA) und Prolinecodons (CCC) beinhalten.

3.11 Zelllinien

Tab. 13: Säugerzelllinien. Bezeichnung, Wachstumsart, Ursprung, Eigenschaften, Nährmedien und Zusätze.

Zelllinie	Wachstum	Medium	Antibiotika/ Zusätze	Ursprung/Eigenschaften
HT1080	adherent	DMEM	10% FKS 1% PenStrep 1% Glutamin	Humanes epitheliales Fibrosarkom
HT1080-N1	adherent	DMEM	10% FKS 1% PenStrep 1% Glutamin	G418 (+ Dox) Humanes epitheliales Fibrosarkom Tet-On (stabile rtTA-Expression)
MSDi	adherent	DMEM	10% FKS 1% PenStrep 1% Glutamin	Multiple Sulfatase Defizienz Patientenzellen Mutiertes FGE (S155P) mit sehr geringer Restaktivität
MSDi-B	adherent	DMEM	10% FKS 1% PenStrep 1% Glutamin	G418 (+ Dox) Multiple Sulfatase Defizienz Patientenzellen Mutiertes FGE (S155P) mit sehr geringer Restaktivität Tet-On
CHO K1	adherent	DMEM	10% FKS 1% PenStrep 1% Glutamin	1% Prolin Subklon Chinese Hamster Ovary
Flp-In-CHO	adherent	Ham's F12	10% FKS 1% PenStrep 2% Glutamin	Zeo 1% Prolin Flp-In-Zelllinie von Invitrogen zur Herstellung stabiler Expressionszellen mittels Rekombination, mit β -Galactosidase-Aktivität
Flp-In-CHO +stabil inseriertes Gen	adherent	Ham's F12	10% FKS 1% PenStrep 2% Glutamin	Hyg 1% Prolin stabile Expressionszellen ohne β -Galactosidase-Aktivität
Flp-In-CHO	suspension	TC42	1% PenStrep 2% Glutamin	Zeo Flp-In-Zelllinie von Invitrogen zur Herstellung stabiler Expressionszellen mittels Rekombination, mit β -Galactosidase-Aktivität
Flp-In-CHO +stabil inseriertes Gen	suspension	TC42	1% PenStrep 2% Glutamin	Hyg stabile Expressionszellen ohne β -Galactosidase-Aktivität
HepG2 (WT)	adherent in Inseln wachsend	RPMI	10% FKS 1% PenStrep 1% Glutamin	1% Na-Pyruvat Hepatozytische Karzinomazellen; bereitgestellt von Dr. Andree Zibert, Universitätsklinikum, Münster, Deutschland

Fortsetzung Tab. 13: Säugerzelllinien.

Zelllinie	Wachstum	Medium	Antibiotika/ Zusätze	Ursprung/Eigenschaften
HepG2-KO ATP7B ^{-/-}	adherent in Inseln wachsend	RPMI 10% FKS 1% PenStrep 1% Glutamin	1% Na-Pyruvat	Humanes hepatozytisches Karzinom, <i>Knock-out</i> für das Gen der P-Typ-ATPase ATP7B; bereitgestellt von Dr. Andree Zibert, Universitätsklinikum Münster, Deutschland
ARPE19 (WT)	adherent, oft in Inseln	DMEM:F12 (1:1) 10% FKS 1% PenStrep	0,5% Na-Pyruvat 0,5% Glutamin	Humanes retinales Pigmentepithelium; bereitgestellt von Prof. Andrea Ballabio, Telethon <i>Institute of Genetics and Medicine - TIGEM</i> , Italien
ARPE19-KO sumf1 ^{-/-} (CRISPR)	adherent, oft in Inseln	DMEM:F12 (1:1) 10% FKS 1% PenStrep	0,5% Na-Pyruvat 0,5% Glutamin zusätzlich	Humanes retinales Pigmentepithelium, CRISPR <i>knock-out</i> für das Gen sumf1; bereitgestellt von Prof. Andrea Ballabio, Telethon <i>Institute of Genetics and Medicine - TIGEM</i> , Italien
A431	adherent	RPMI oder DMEM:RPMI (1:1) 10% FKS 2% PenStrep 1% Glutamin	Hohe EGFR-Expression	Humanes epidermoides Karzinom
MCF7	adherent	RPMI oder DMEM:RPMI (1:1) 10% FKS 2% PenStrep 1% Glutamin	Sehr geringe EGFR-Expression	Epitheliales Adenokarzinom

Mit dem *knock-out* (KO) des sumf1-Gens in den Retinazellen ARPE19 (Prof. Andrea Ballabio, TIGEM) wurde die Bildung des funktionsfähigen Genproduktes mittels CRISPR-Methode verhindert, wodurch diese Zellen kein aktives hFGE produzieren. Dagegen entstammen die MSDi-Zellen humanen Patientenzellen mit Multipler Sulfatase-Defizienz, in der das Enzym hFGE durch eine Mutation in der Substratbindetasche (S155P) nur geringe Restaktivität zeigt (Dierks *et al.*, 2005). Sowohl von der MSDi-Zelllinie als auch der HT1080-Zelllinie existieren stabil mit dem Gen für den reversen Tetracyclin-abhängigen Transkriptionsfaktor (rtTA) ausgestattete Zellklone (B und N1). Das rtTA bindet in Anwesenheit von Tetracyclin oder dem Analogon Doxycyclin an den tet-Operator. Durch die Verwendung dieser Tet-On-Zellen lässt sich die rekombinante Genexpression unter einem tet-Promotor (pBI-Vektor; Kapitel 3.12 und 8.5) durch Doxycyclin induzieren. Eine entsprechende Expression in Zelllinien ohne stabile rtTA-Expression kann nur durch Kotransfektion eines Plasmides mit rtTA-Gen vollzogen werden. In der Hepatocyten-KO-Zelllinie HepG2-ATP7B^{-/-} wurde zur Störung der intrazellulären Kupferhomeostase die Bildung einer funktionellen P-Typ ATPase ATP7B verhindert. Dieser *knock-out* wird im Hinblick auf die mutmaßlich kupferabhängige FGE-Aktivität betrachtet und wurde ursprünglich von Dr. Andree Zibert (Universitätsklinikum Münster) zur Untersuchung der Zusammenhänge der Morbus Wilson Erkrankung etabliert.

Die Flp-In-CHO-Zelllinien (*life technologies by invitrogen*) gehören zu einem Rekombinationssystem, mit dem eine stabile Insertion des Wunschgens in eine definierte Region des CHO-Genoms vorgenommen werden kann. Die genomische Integration basiert auf einer spezifischen Rekombination durch das Enzym Flippase, dessen Gen auf dem Vektor pOG44 (Kapitel 3.12 und 8.5) vorliegt. Das Gen des stabil zu exprimierenden Proteins, hier das verschiedener humaner FGE-Varianten, wird dazu in den Vektor pcDNA5/FRT (siehe Kapitel 5.2.1) kloniert und durch flankierende Rekombinationssequenzen in den Ziellokus inseriert. Die Flp-In-CHO-Zellen tragen, neben dem Rekombinationslokus, das Zeocin-Resistenzgen und das Gen der β -Galactosidase. Durch die erfolgreiche Rekombination geht die Funktionalität dieser Gene verloren. An ihrer Stelle tritt das Zielgen und ein Hygromycinresistenzgen, wodurch eine Selektion aufgrund der Antibiotikaresistenz bzw. -sensitivität und eines X-Gal-basierten Blau-Weiß-*Screenings* vorgenommen werden kann.

3.12 Plasmide

Tab. 14: Vektoren zur pro- und eukaryotischen Genexpression. Vektorbezeichnung, Resistenzgen, mögliche Fusionsproteine und Proteasespaltstellen, sowie deren Expressionseigenschaften. Siehe Kapitel 8.5 für Vektorkarten.

Vector	Resistenz	Fusionsprotein	Protease-Spaltstelle	Expression/Eigenschaft
pET28a	Kan	His ₆ -tag N-terminal	Thrombin	zytoplasmatische Expression, IPTG/T7 induziert
pET14b	Amp	His ₆ -tag N-terminal	Thrombin PreScission nachträglich eingefügt	zytoplasmatische Expression, IPTG/T7 induziert
pET24b	Kan	His ₆ -tag C-terminal		zytoplasmatische Expression, IPTG/T7 induziert
pETDuet	Amp	MCSI: S-tag C-terminal MCSII: His ₆ -tag N-terminal		zytoplasmatische Expression, IPTG/T7 induziert
pJKME	Cm	His ₆ -tag C-terminal		zytoplasmatische Expression, IPTG/T7 induziert
pMAL c5X	Amp	MBP N-terminal		zytoplasmatisch
pASK-IBA7	Amp	StrepII-tag N-terminal		zytoplasmatisch, Arabinose-induzierter tet-Promotor
pBI	Amp Neo/Kan	MCSI: HA-tag C-terminal MCSII: -		duale, eukaryotische Expression
pSB	Amp Neo/Kan			eukaryotische Expression
pcDNA3.1	Amp			eukaryotische Expression
pcDNA5/FRT	Amp Hyg			eukaryotische Expression; mit Flippase-Koexpression stabile genomische Rekombination
pOG44	Amp			eukaryotische Flippase-Expression
pEGFP-N1	Neo/Kan	Flag-tag und eGFP C-terminal		eukaryotische Expression von <i>enhanced</i> GFP-Fusionsproteinen

3.13 Primer

Tab. 15: Klonierungsprimer. Bezeichnung der Primer und ihre Sequenzen in 5'-3'-Reihenfolge.

Bezeichnung	Sequenz
Mlu_Start_ASB_f	CTTACGCGTATGAGCCGGCCGCCCCACCTGGTCTTC
ASB-RGSHis_Stop_r	ATCAGTGATGGTGATGGTGATGGCTTCCGCGCATCCAAGGGCCC
prf	AAAAATCTAGAGAAGGAGATATACATATGGACTGGGCAAGAAGCTG-
DARPin T7g10SDs_XbaI	CT
prr1	AAAAAAGGCCTCGTTACCCGTTAACAGCATTGAACGTGCCGGCGCCG-
DARPin kpAtsBmot_StuI	AACCGCCCGAGCCCTGGAGGATCTCGGCCAG
prr2	AAAAAAGGCCTCCTGACCCGGTAATAAAGGCCGCACGTCTGCCGTGC-
DARPin mmAtsBmot_StuI	AGCTCTGTTTCGCCCCGAGCCCTGGAGGATCTCGGCCAG
prr3	AAAAAAGGCCTCACGAGACGGCGTGCACAAACCGTTACCCGTTAAC-
DARPin KPAtsB-	GCATTGAACGTGCCGGCGCCGAACCACCGCCCTGGAGGATCTCGGCC-
mot_LCTPSR_StuI	AG
prr4	AAAAAAGGCCTCACGAGACGGCGTGCACAATCCCTGACCCGGTAATAA-
DARPin mmAtsB-	ATGCCGCACGTCTCGCCGTGCAGCTCTGTTTCGCCGCCCTGGAGGATCT-
mot_LCTPSR_StuI	CGGCCAG
LAG_RGSHis6_StuI_rev	GGGAGGCCTCCTAGTGATGGTGATGGTGATGTGATCCTCTCCCAGCA-
	CGAGACGG
MM_RGSHis6_StuI_rev	CCCAGGCCTCCTAGTGATGGTGATGGTGATGTGATCCTCTCTGACCCG-
	TAATAAATGCC
KP_RGSHis6_StuI_rev	CCCAGGCCTCCTAGTGATGGTGATGGTGATGTGATCCTCTGTTACCCG-
	TTAAC
LAG_StuI_rev	GGGAGGCCTCCTACCCAGCACGAGACGGCG
MM_StuI_rev	CCCAGGCCTCCTACTGACCCGGTAATAAATGCCGCAC
KP_StuI_rev	CCCAGGCCTCCTAGTTACCCGTTAACAGCATTGAACGTGCC
MutSPM_KP_for	CGACAACGGCAACGAGGACCTGGCCGAGATCCTCCAGGGTGGTAGCC-
	CGATGTCGGCGCCGGCACGTTCAATGCTGTTAACGGGTAACGGTTTG
MutSPM_KP_rev	ACGAGACGGCGTGCACAAACCGTTACCCGTTAACAGCATTGAACGTG-
	CCGGCGCCGACATCGGGCTACCGCCCTGGAGGATCTCGGCCAGGTCC-
	TCG
XbaI_RBS_RGSHis6_Dar_f	GGGTCTAGAGAAGGAGATATACATATGAGAGGATCACATCACCATCA-
	CCATACGACCTGGG
XbaRBS_MMAtsB_Dar_f	TCTAGAGAAGGAGATATACATATGGGCGGCGAACAGAGCTGCACGG-
	CAGGACGTGCGGCATTTATTACCGGTCAGGACCTGGGCAAGAA
XrbsN_MMAtsB_D16_f	TCTAGAGAAGGAGATATACATATGGGCGGCGAACAGAGCTGCACGG-
	CAGGACGTGCGGCATTTATTACCGGTCAGGACCTGGGCAAGAA
Dar_Mut105-106_CSR_f	CTCTCGCCTGGCCGCCCAACGGC
Dar_Mut102_CSR_r	GGGGTGCAGCCGATATAATCGCTGGCGTTCACATCAG
Dar_Mut102-106_f2	GGCTGCACCCCTCTCGCCTGGCCGCCCAACGGC
021_C_S_for	AGGACGTGCGGCCTTTATTACCGGTC
021_C_S_rev	GCCGTGGAGCTCTGTTTCGCCCCGAGCC
1GFP_Gib_rev	GTAGCGGATCTGACGGTTCAC
2GFP_Gib_for	GAACCGTCAGATCCGCTAGCATGGCTGCGCCCGCACTAG
3GFP_Gib_rev	GGTGGATCCCAGGCCCCGCGGTGCGTAGTCAGGCACATCATACGG
4GFP_Gib_for	CCGCGGGCCCCGGGATCCA
Da_G_K_rev	AAAAGCGGCCGCTCACAGCTCGTCCTTAGACGATCCCTTGTACAGCT-
	CGTC
Db_G_P_rev	AAAAGCGGCCGCTCACAGCTCCCCTGGAGACGATCCCTTGTACAGCT-
	CGTC
Aa_0_PPHis_f	TTTCAAGGTCTCACCATCATCACCATCATTAGTAAGCTTGCG
Aa_0_PPHis_r	TAAAACTTCTAAACCTCCGCGAGACGGCGT
Ab_1_rev	ACCTCCGCGAGACGGCGTGCACAAAGGACCTTGAATAAACTTCTA-
	ACATATGGC
Ab_2_for	AAGTTTTATTTCAAGGTCTTTGTGCACGCCGTCTCGCGGAGGGACCT-
	GGGCAAGAAGCTG
Ab_3_rev	CGGATCCTCGAGTCACTGGAGGATCTCGGCCAG
Ab_4_BI_4_for	TGACTCGAGGATCCGGCTG
BI_1_rev	GTCAGCAGGCCTTGCTTGTAAATATCTCGGCCAG

Fortsetzung Tab. 15: Klonierungsprimer.

Bezeichnung	Sequenz
BI_2_for	GCCGAGATATTACAAGCAAGGCCTGCTGACTTAGGCAAAAAGCTG
BI_3_rev	CGGATCCTCGAGTCAATGATGGTGATGATGGTGAGG
025_Nde_CTPSR_f	AAACATATGGCGGGCGCCGTGGGACTGTGTACCCAAGCCGGGCAG-GAGACTGGGCAAGAAGCTGC
ASB_3_for	AGCCACCATGAGCCGGCCGCCACCTG
His_4_rev	AGAGATATCAGTGATGGTGATGGTGATGGCTTCCGCG
MUT_Aa_teil2_f	GTTTTATTTCAAGGTCCTCACCATCATCACCATCATTAG
MUT_Aa_teil2_r	TTCTAAACCTCCGCGAGACGGCGT
Nde_MM_016_f	AAACATATGGGCGGCGAACAGAGCTGCACGGCAGGACGTGCGGCA-TTTATTACCGGTCAGGACCTGGGCAAGAAGCTG
pBI_1_for	TCACCATCACTGATATCTCTAGACTGAGAACTTCAGGG
pBI_2_rev	GCGGCCGGCTCATGGTGGCTAGCACGCG
FGE-NheI fwd	GCTAGCTAGCGGGACAACATGGCTGCG
FGE-His-NotI rev	ATAGTTTAGCGGCCGCTAGTGATGGTGATGGTGATGTGATCCTCTG-TCCATGGTGGGCAGGC
AgeI FGE f	GGACCGGTGCGGGCGCGG
FGE-KDEL rev	GGGGCGGCCGCTCAGAGTTCATCCTTGTCCATAGTGGGCA
FGE-PGEL rev	GGGGCGGCCGCTCAGAGTTCCTGGGTCCATAGTGGGCA
Nde_FG_PP_MBP_f2	AAACATATGGGTGCAGCTGGATTGTGCACGCCGTCTCGTGCTGGGG-CATTAGAAGTTTTATTTCAAGGTCCTGCAAAAATCGAAGAAGGTAA-ACTGG
028_1_His_for	TACCGTTCAGCACCATCATCACCATCATTAGTAAGCTTGC
028_2_FGEmot_rev	CGCCCGAGCCCCAGCGCGAGACGGCGTGCACAAC
028_3_MMmot_for	GCCGTCTCGCGCTGGGGGCTCGGGCGAACAGAGC
028_4_MMmot_rev	GATGATGGTGCTGACCGGTAATAAAGGCCGCAC
M_MBP_CT_F	GGGAGCGGGTGGTAGCCCGATG
M_MBP_CT_R	CACCCGCTCCCTCGATCCCGAG
GAA_MBP-KP_f	TGCAGGTGGTAGCCCGATGTCG
GAA_MBP-KP_r	GCTCCCTTCCCTCGATCCCGAG

Tab. 16: Sequenzierungsprimer. Bezeichnung der Primer und ihre Sequenzen in 5'-3'-Reihenfolge.

Bezeichnung	Sequenz
EGFP-C	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
EGFP-N	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG
T7 Promotor	TAATACGCATCACTATAGG
T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCG
ERp40_340nc (hFGE reverse)	CTGAGGATCATCTGTGCC
ERp40_743c (hFGE forward)	AGACTTTTCCCCTGGGGC
ERp40_719nc (hFGE reverse)	TGTATTCCCCTCAGCTTCC
FGE 343c (hFGE forward)	CCTGCGAGGAGAGTTACTATTGAT
pJKME Seq f	GCTCGTATGTTGTGTGGAA
pJKME Seq r	ATCCGTGACGCAGTAGC

3.14 Software und Internetanwendungen

Tab. 17: Verwendete Software und Internetanwendungen. Bezeichnung, Anwendungsgebiete und Vertreiber.

Name	Anwendung	Quelle
SeqManPro bzw. DNASTar	DNA-Sequenzen kontrollieren	DNASTAR Lasergene, http://www.dnastar.com/
SnapGene Viewer	Vektorkarten und Primer erstellen	GSL Biotech LLC, GraphPad Holdings, San Diego, CA, USA
PubMed	Literaturrecherche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

Fortsetzung Tab. 17: Verwendete Software und Internetanwendungen.

Name	Anwendung	Quelle
Mendeley	Literaturverwaltung	Mendeley Ltd., Elsevier, Amsterdam, Niederlande
pBlast, <i>basic local alignment search tool</i>	Vergleich von Aminosäuresequenzen	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi , National Center for Biotechnology Information (NCBI), Thalwil, Schweiz
WebCutter 2.0	Analyse von Restriktionsschnittstellen	http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/ , Max Heiman
NEB-Tool: <i>T_m Calculator</i>	Berechnung von Schmelz- und <i>Annealing</i> -temperaturen	https://www.neb.com/tools-and-resources , New England Biolabs, Ipswich, UK
<i>NEBCloner</i>	Vorhersage von Klonierungsstrategien	
<i>NEBuilder</i>	Berechnung von <i>Gibson Assemblies</i>	
<i>Double Digest Finder</i>	Restriktionspuffer-Auswahl	
<i>Cleavage Close to End</i>	Restriktionsenzym-spezifische Basenpaarüberhänge	
<i>Compatible Cohesive Ends</i>	Vergleich von Restriktionsschnittstellen	
<i>NEBase Changer</i>	Berechnung von Mutageneseprimern	
<i>GlycoBuffer System</i>	Reaktionspufferauswahl für Deglykosylierungen	
<i>PCR Selector</i>	Produktauswahl für PCR-Anwendungen	
<i>DoubleDigest</i>	Reaktionspuffer-Auswahl	http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest/ , Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
ND-1000 V3.5.2	Steuersoftware NanoDrop	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
<i>i-control Tecan</i>	Steuersoftware Tecan	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
<i>StepOne Software v2.3</i>	Steuersoftware RealTime-PCR	Life Technologies, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
Ms Office	Text- und Bildverarbeitung, Tabellenkalkulation	Microsoft, Redmond, WA, USA
Ms Windows 7; 10	Betriebssystem	Microsoft, Redmond, WA, USA
Gimp GNU <i>Image Manipulation Programm</i>	Bildbearbeitung	www.gimp.org
AIDA	Bildbearbeitung	Fuji Photo Film, Minato, Japan
Multi-Gauge V3.0		
Colony V1.1		
<i>LAS3000 lite Unicorn</i>	CCD-Kamerasteuerung	Fuji Photo Film, Minato, Japan
<i>Sequence Core Facility, CeBiTec</i>	Sequenzierungsaufträge	GE Healthcare, Marlborough, MA, USA
<i>ExPASy Translate tool</i>	DNA- oder RNA-Sequenzen in Aminosäuresequenzen übersetzen	https://scf.cebitec.uni-bielefeld.de/ , Universität Bielefeld, Deutschland
<i>ProtParam</i>	Berechnung von Proteinparametern (M_w , pI, etc.)	http://web.expasy.org/resources , Swiss Institute for Bioinformatics, Lausanne, Schweiz
<i>PeptideMass</i>	Vorhersage von Proteinfragmentierungen	

Fortsetzung Tab. 17: Verwendete Software und Internetanwendungen.

Name	Anwendung	Quelle
Zen	Software Fluoreszenzmikroskop	http://www.zeiss.com/microscopy/en_de/products/microscope-software/zen-lite , ZEISS Germany
GraphPad Prism	Mathematische Datenkalkulation und -darstellung	GraphPad Holdings, San Diego, CA, USA
Origin	Mathematische Datendarstellung	OriginLag corporation, Northampton, MA, USA
mMass	Analyse und Darstellung von Massenspektren	Martin Strohaln
ChemDraw	Darstellung von Molekülstrukturen	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
flexAnalysis	MALDI-Analysesoftware	Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland
Ecapt	Agarose-Geldokumentation	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) beschreibt eine Technik zur Vervielfältigung und Manipulation von Desoxyribonukleinsäuren (DNA), die auf der Enzymaktivität der DNA-Polymerase basiert. Polymerasen kommen bei der natürlichen DNA-Replikation vor. Dort repliziert das Enzym einen DNA-Strang durch das schrittweise Hinzufügen von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) an freien 3'-Hydroxyenden anhand der komplementären Vorlage (*template*). Die Synthese des neuen DNA-Stranges erfolgt in 5'-3'-Richtung, wobei einige Polymerasen auch eine Korrekturlesefunktion (*proof reading*) besitzen. D.h. sie können eine fehlerhafte Basenpaarung durch ihre zusätzliche 3'-5'-Exonukleaseaktivität wieder entfernen.

Bei der Polymerasekettenreaktion werden thermostabile Polymerasen eingesetzt, die in einem Thermozyklus eine *template*-DNA replizieren, indem der Reaktion zusätzlich eine Mischung aus dNTPs und zur DNA-Matrize komplementäre, kurze Oligonukleotide (*primer*) zugesetzt werden. Die Bindestelle dieser *primer* markiert den Startpunkt der Polymerisation. Durch die Kombination eines zum Mutterstrang komplementären *forward primers* und einem revers-komplementären *reverse primers* kann ein doppelsträngiger DNA-Bereich des *templates* begrenzt werden, der in den darauffolgenden Zyklen exponentiell repliziert wird. Diese Technik wird zur Klonierung von Genen und Genabschnitten angewendet. Werden der Sequenz dieser synthetischen Oligonukleotide zusätzliche Basen angefügt, trägt das PCR-Produkt diese ebenfalls. Diese Technik wird *add-on-PCR* genannt und findet vor allem zur Klonierung von Genen in Plasmid-DNA Verwendung, da mittels *add-on-primern* Schnittstellen von Restriktionsenzymen angehangen werden können.

Die Thermozyklen der PCR sind in Denaturierung, Anlagerung (*annealing*) und Elongation zu unterteilen. Die Denaturierung doppelsträngiger DNA zu Einzelsträngen, an denen sich die *primer* und die Polymerase anlagern können, wird durch Erhitzen auf 98 °C gewährleistet. Anschließend wird die Temperatur soweit herabgesetzt, dass die Oligonukleotide an ihre komplementären Bindestellen binden können. Allerdings muss die Temperatur noch ausreichend hoch sein, um unspezifische Bindungen zu unterdrücken. Die *annealing*-Temperatur wird demnach an die errechnete Schmelztemperatur der *primer*-Paarung angepasst und ist abhängig vom ihrem G-C-Anteil. Die Elongation der DNA findet beim Temperaturoptimum der jeweiligen Polymerase statt, wobei die Zeit dieses Teilschrittes abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-

Stückes ist. Sie wird meist mit 30 s pro Kilobase berechnet. Um eine exponentielle Vervielfältigung des Amplifikats zu erzielen, wird die Abfolge aus Denaturierung, Anlagerung und Elongation zwischen 20- und 35-mal wiederholt. Danach kommt es zu einer finalen Extension, bei der eventuell verkürzte Amplifikate vervollständigt werden. Die PCR-Produkte wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert und mittels *innuPrep DOUBLEpure Kit* aufgereinigt. Einige typische Reaktionsansätze für die Q5- und die Taq-Polymerase sind in **Tab. 18** angegeben, wobei auch vorgemischte Reaktionsansätze, wie der KAPA HiFi *Ready Mix*, genutzt wurden, bei dem lediglich die *primer* und die *template*-DNA sowie Wasser zugesetzt werden mussten. Die PCR-Protokolle finden sich in **Tab. 19**.

Zur Identifizierung der effizientesten *annealing*-Temperatur kann eine Gradienten-PCR durchgeführt werden. Dabei wurde eine PCR-Reaktion auf acht PCR-*tubes* aufgeteilt (mindestens 5 µL pro *tube*) und bei acht verschiedenen *annealing*-Temperaturen durchgeführt. Die Temperaturstufen werden durch den *Thermocycler* gradiell um eine mittlere Temperatur herum gewählt. Standardmäßig wurde für die PCR mit einer KAPA-Polymerase der Gradient bei 65 °C +/- 5 °C angelegt. Anschließend wurden die Proben per Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Für den präparativen PCR-Ansatz wurde dementsprechend die Temperaturstufe gewählt, die als PCR-Produkt eine alleinige Bande mit der vorhergesagten Größe aufwies.

Tab. 18: PCR-Ansätze für Q5- und Taq-Polymerase sowie der KAPA HiFi *Ready Mix*. Angegeben sind die Volumina in µL bzw. die Substanzmengen in ng. Substanzen mit * sind bereits im entsprechenden Puffer vorhanden und müssen nicht zugegeben werden.

Polymerase	Q5	Taq	KAPA
Reagenz			
Polymerasepuffer 10x	10 µL	5 µL	*
10 mM dNTPs	5 µL	1 µL	*
GC- <i>Enhancer</i>	10 µL	/	/
DMSO	/	0-2,5 µL	*
MgCl ₂	*	2,5 µL	*
10 µM <i>forward primer</i>	1,25 µL	1 µL	1 µL
10 µM <i>reverse primer</i>	1,25 µL	1 µL	1 µL
DNA-Polymerase	0,5 µL	1 µL	25 µL (2x Mix)
DNA- <i>Template</i>	1 ng	10 ng	10 ng
ddH ₂ O	ad 50 µL	ad 50 µL	ad 50 µL

Tab. 19: PCR-Programme für Q5, Taq oder KAPA. Angegeben sind die Temperaturen (*T*) und die Zeiten (*t*) der einzelnen Schritte im Thermozyklus. Die *annealing*-Temperaturen richten sich nach den Schmelztemperaturen (*T_m*) der verwendeten *primer*-Paarungen. Die Elongationszeiten wurden durch die Länge des zu amplifizierenden DNA-Stranges bestimmt.

Schritt	Q5		Taq		KAPA	
	<i>T</i>	<i>t</i>	<i>T</i>	<i>t</i>	<i>T</i>	<i>t</i>
initiale Denaturierung	98 °C	5 min	98 °C	5 min	98 °C	5 min
35 Denaturierung	98 °C	10 s	98 °C	10 s	98 °C	10 s
Zyklen Anlagerung	<i>T_m</i> -5 °C	30 s	<i>T_m</i>	30 s	<i>T_m</i>	30 s
Elongation	72 °C	20 s/kb	72 °C	20-30 s/kb	72 °C	30 s/kb
finale Extension	72 °C	72 °C	72 °C	2 min	72 °C	2 min
Halten	4 °C	∞	4 °C	∞	4 °C	∞

4.1.2 Mutagenese-PCR

Bei der Mutagenese-PCR werden Genamplifikate durch die Verwendung von synthetischen, eine Mutation-tragenden Oligonukleotid-*primern* während der PCR verändert. Meist werden dazu die kompletten Plasmide, die diese Gene beinhalten, mit *primern* amplifiziert, die komplementär zur Mutationsstelle sind und die gewünschte Veränderung tragen. Zahlreiche *online tools*, wie *NE-BaseChanger*, ermöglichen eine Vorhersage der besten Mutagenese-Strategie und ermitteln die *primer*-Sequenzen und PCR-Protokolle. Schemata von gängigen Mutagenesestrategien sind in **Abb. 13** vereinfacht dargestellt. Dabei handelt es sich um Beispiele für die Insertion neuer Sequenzen, Deletion von Sequenzabschnitten oder der Substitution einiger vorliegender Basen.

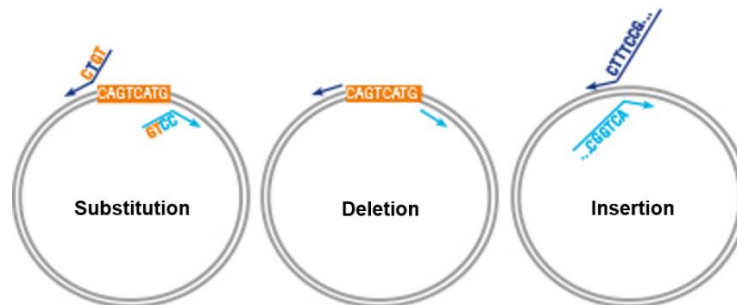


Abb. 13: Schema der Mutagenesestrategien. Bei der Substitution werden *primer* mit Anhängen synthetisiert, die die neu einzubringende Information enthalten. Der DNA-Bereich, der durch die Bindung der *primer* flankiert wird, wird nicht amplifiziert. Das PCR-Produkt trägt an dieser Stelle die Basenpaarungen der *primer*. Bei der Deletion wird durch die flankierende Bindung der *primer* der DNA-Bereich abgegrenzt, der im PCR-Produkt fehlen wird. Bei der Insertion werden *primer* designt, die nicht vollständig komplementär zur Mutagenesestelle sind. Die Abweichungen bzw. zusätzlichen Basen inmitten der beiden *primer* werden dem Amplifikat hinzugefügt. Verändert nach Eurofins.

Bei einer Mutagenese-PCR wurde das *template* in sehr geringen Konzentrationen eingesetzt und nur wenige Zyklen durchlaufen, damit möglichst korrekte Amplifikate auf der Basis der mutierten Version erstellt wurden. Standardmäßig wird hierfür die Q5-Polymerase verwendet (Kapitel 4.1.1). Aufgrund der Länge des Gesamtplasmids wurde zudem die Elongations- und finale Extensionszeit deutlich heraufgesetzt. Nach Beendigung der PCR muss die maternale DNA aus der Reaktionslösung entfernt werden. Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, dass das Ausgangsplasmid in *Escherichia coli* (*E. coli*) vervielfältigt und aus diesem Organismus aufgereinigt wurde. Diese DNA trägt, im Unterschied zu den in einer Polymerasekettenreaktion hergestellten DNA-Strängen, natürliche Methylierungen am Adenin in der Basenabfolge GATC. Das Restriktionsenzym *DpnI* erkennt und schneidet methylierte DNA-Sequenzen, sodass in einer anschließenden Restriktion die maternale DNA mehrfach geschnitten wird, das Amplifikat allerdings intakt bleibt. Im Gegensatz zum Ausgangsplasmid sind die PCR-Amplifikate linear. Eine Überlappung komplementärer Regionen der *primer*-Sequenzen ist zwar möglich, für einen Ringschluss ist allerdings eine Ligase notwendig. Die Ligationsreaktion kann demnach im Anschluss

an den *DpnI*-Verdau durch das Inkubieren mit PNK-Kinase und T4-DNA-Ligase im entsprechenden Puffer oder aber durch die Nutzung des endogenen DNA-Reparatursystems der *E. coli* erfolgen. Dazu wird die lineare Plasmid-DNA in *E. coli* DH5 α transformiert, die Plasmidhaltigen Bakterien mittels eines Antibiotikums selektiert und durch die Kultivierung positiver Bakterienkolonien das mutierte und zirkularisierte Plasmid aufgereinigt. Eine anschließende Sequenzierung diente der Verifizierung der erfolgreichen Mutagenese.

4.1.3 Gibson Assembly-PCR

Herkömmliche Klonierungen basieren auf den Einsatz von Restriktionsenzymen, was neben den Problemen von Enzyminaktivitäten oder unspezifischen Star-Aktivitäten auch Limitierungen in der Enzymkompatibilität mit sich bringt. So kann es sein, dass das Set an anwendbaren Enzymen, festgelegt durch die *multiple cloning site* des Zielvektors, auch das gewünschte Gen als Substrat erkennen würde. Zudem ist das Zusammenfügen von Fusionsproteinen aus mehr als zwei Teilen mit einem enormen Aufwand verbunden. Es sind mehrere Klonierungen als Zwischenschritte mit zum Teil sehr langen *add-on-primern* nötig, die nur selten erfolgreich und fehlerlos verlaufen. Vorteil der Gibson Assemblierung ist die Möglichkeit ein Fusionsprotein aus zwei oder mehr Teilen gleichzeitig zu klonieren und in einen gewünschten Zielvektor einbringen zu können. Dies geschieht via PCR und Anlagerung komplementärer Sequenzen, ist komplett unabhängig von Restriktionsenzymen und die Reihenfolge der Teilsequenzen wird durch die konstruierten *primer* strikt festgelegt. Mit der Hilfe von *online tools* wie *NEBuilder* lassen sich auch komplexere Klonierungsstrategien berechnen und *primer*-Sequenzen sowie PCR-Protokolle ermitteln. Auch zusätzliche Änderungen, wie die Insertion einiger Basen, sind möglich. Nachteil dieser Methode ist, dass nicht beliebige Sequenzen durch synthetische Oligonukleotide erstellt werden können. Der Hauptteil des finalen Fusionskonstruktes muss, wie auch bei der *add-on-PCR*, bereits als *DNA-template* auf einem oder mehreren Plasmiden vorhanden sein.

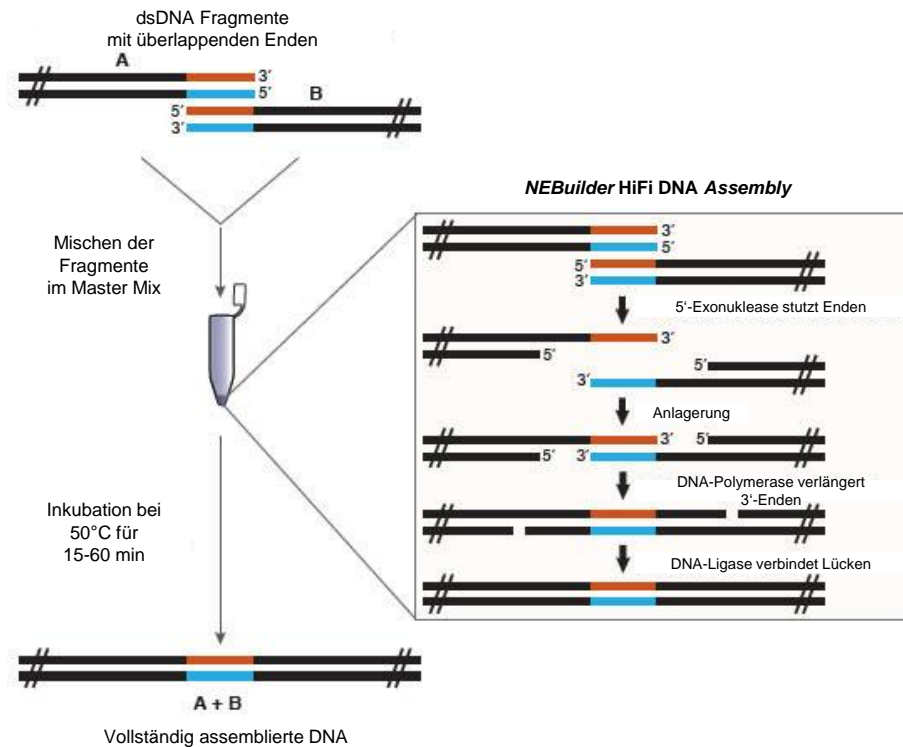


Abb. 14: Schema des NEBuilder Assemblys von New England Biolabs. Die PCR-Produkte A und B samt überlappenden Sequenzen werden mit dem Master Mix gemischt, in dem die 5'-Exonukleaseaktivität, das komplementäre *Annealing*, die DNA-Polymerisation zum Auffüllen der Lücken und die Ligation der Strangbrüche stattfindet. Das finale Konstrukt kann anschließend in *E. coli* transformiert werden. Verändert nach NEB.

Beim *Gibson Assembly* wurden die DNA-Sequenzen, welche in einer bestimmten Reihenfolge in die *multiple cloning site* eines Plasmids eingebracht werden sollen, und auch das Zielplasmid selbst per Polymerasekettenreaktion (KAPA HiFi *HotStart ReadyMix*; Kapitel 4.1.1) verlängert und amplifiziert. Die durch die Primer angefügten Sequenzen bestehen aus Überlappungen zu den gewünschten, benachbarten DNA-Abschnitten. Wie in **Abb. 14** zu sehen, wurden beim *NEBuilder HiFi DNA Assembly Kit* anschließend die PCR-Amplifikate gemischt, für maximal 60 min bei 50 °C inkubiert und deren Enden durch eine 5'-Exonukleaseaktivität zu einzelsträngigen Enden getrimmt. Durch die komplementären 3'-Überlappungen der jeweiligen Abschnitte, reihen sich die DNA-Teilstücke zu längeren Ketten aneinander. Eine Polymerase füllt die Lücken auf und eine Ligase verbindet die Stränge miteinander, sodass ein komplettes Plasmid samt *inserts* entstand, das in *E. coli* transformiert, selektioniert und aufgereinigt werden konnte.

4.1.4 Colony-PCR

Die *Colony-PCR* wendet die Polymerasekettenreaktion als Nachweisreaktion an. Durch Wachstum auf Selektions-Nährplatten (LB-Platten) generierte Bakterienkolonien einer Klonierung werden auf die Anwesenheit des *gene of interest* getestet, indem ein kurzer DNA-Abschnitt durch spezifische *primer* per PCR amplifiziert und per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt

wird. Dazu wurden die Bakterienkolonien von der Selektionsplatte mit einem sterilen Zahnstocher oder einer sterilen Mikroliterpipettenspitze sowohl in ein PCR-*tube* als auch auf eine Sicherungsplatte übertragen und durchnummeriert. Im PCR-*tube* wurde ein Mastermix aus Polymerase, dNTPs, Wasser, Polymerasepuffer und spezifischen *primer*-Paarungen vorgelegt (siehe **Tab. 20**). Durch den hohen Salzgehalt im Puffer und die starke Erwärmung während der anschließenden PCR werden die Bakterien lysiert und die DNA kann amplifiziert werden. Eine Positivkontrolle mit dem Ausgangsplasmid des *gene of interest* und eine Negativkontrolle ohne Bakterienkolonie wurde mitgeführt. Die mit einem *loading dye* versetzten PCR-Proben wurden im Anschluss über ein 1,5% Agarosegel im Vergleich zu einem 100 bp-Marker aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Durch die Anwesenheit einer Bande auf derselben Höhe wie die Positivkontrolle kann eine positive Probe von einer falsch-positiven unterschieden werden. Die entsprechenden Bakterienkolonien wurden demnach kultiviert, das Plasmid aufgereinigt und zur Verifizierung sequenziert.

Tab. 20: Zusammensetzung des Mastermix pro Reaktion einer Colony-PCR.

Reagenz	Volumen
10x Polymerasepuffer	2 μ L
10 mM dNTPs	0,4 μ L
MgCl ₂ -Lösung	1,5 μ L
20 μ M <i>forward primer</i>	0,125 μ L
20 μ M <i>reverse primer</i>	0,125 μ L
Taq-Polymerase	0,5 μ L
dH ₂ O	ad 20 μ L

Tab. 21: PCR-Programm der Colony-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	98 °C	2 min
35 Zyklen	Denaturierung 98 °C	10 s
	<i>Annealing</i> T_m	30 s
	Elongation	72 °C
		20 s/kb
finale Extension	72 °C	2 min
Hold	4 °C	∞

4.1.5 Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden Oligonukleotide durch die Wanderung in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe getrennt, indem sie durch die Poren eines Polymers wandern. Dabei wandern kleine Moleküle schneller durch das Gel, da sie weniger durch die Interaktionen mit dem engmaschigen Netzwerk gebremst werden. Die mobile Phase ist TAE-Puffer (Kapitel 3.9, **Tab. 11**) und das Trägermaterial besteht aus Agarose in TAE-Puffer, welche aufgeköcht, zur Färbung doppelsträngiger DNA mit 0,1% Ethidiumbromid (EtBr) versetzt und in eine Gelkammer gegossen wurde. Typische Agarose-Konzentrationen waren 0,8-1,5%, wobei bei steigender Prozentigkeit die Auftrennung kurzer DNA-Stränge begünstigt wird. Die Proben wurden mit einem 6x *Gel Loading Dye Purple* angefärbt und beschwert, in vorgeformte Geltaschen gefüllt und aufgetrennt, bis die Lauffront die untere Gelkante erreichte. Die Detektion der DNA geschah auf einem UV-Transilluminator. Die Interkalation des Phenanthridin-Farbstoffes in doppelsträngige DNA verschiebt das Absorptionsspektrum des EtBr und die Fluoreszenzintensität bei Anregung mit UV-Licht nimmt zu.

4.1.6 DNA-Aufreinigung und Geextraktion

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten und zur Isolation von DNA-Strängen nach ihrer Auftrennung in der Agarose-Gelelektrophorese wurde hauptsächlich das Kit *innuPrep DOUBLEpure* von *AnalytikJena* verwendet. Die zugrunde liegende Methode ist eine Variante des Phenol-Chloroform-Extraktionsverfahrens. Hierbei werden unterschiedliche Löslichkeiten der DNA und die DNA-Bindung an eine Säulenmatrix ausgenutzt. Proteine werden in der organischen Phase gelöst, RNA befindet sich in der wässrigen Phase und DNA an der Phasengrenze. Durch *spin filter* werden die Phasen voneinander getrennt, gewaschen und die DNA anschließend durch Isopropanol oder Ethanol gefällt.

Bei einer Geextraktion musste zunächst die DNA-Bande mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten (bis zu 300 mg) und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt werden. Durch das Erwärmen bei 50-65 °C in ca. 650 µL einer Lösung aus Guanidiniumthiocyanat als chaotrope Denaturierungssubstanz und Polyethylenglykolyoctylphenylether (Triton) als Detergenz wurde das TAE-Agarosegel aufgelöst und die DNA freigesetzt. Durch Hinzufügen von 50 µL Essigsäure wurde die Lösung angesäuert, was die Löslichkeit der DNA in wässrigen Umgebungen weiter senkt und die DNA-Bindung an die Silica-Säulenmatrix während der Zentrifugation bei 10000 ×g für 1 min erhöht. Der Durchfluss wurde in einem 2 mL-Reaktionsgefäß aufgefangen und die Bindung wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde die Säulenmatrix zweimal mit je 700 µL ethanolhaltigem Waschpuffer gewaschen (10000 ×g, 1 min), was zur Fällung der DNA auf der Säulenmatrix führt. Durch erneute Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit für 2 min wurde die Matrix getrocknet und anschließend die DNA eluiert, indem sie für 2 min in 30 µL wässrigem Elutionspuffer bzw. dH₂O inkubiert und 1 min bei 6000 ×g in ein frisches 1,5 mL-Reaktionsgefäß zentrifugiert wurde. Die Elution wurde ein weiteres Mal wiederholt und die DNA-Konzentration des Eluats am *NanoDrop* Spektralphotometer ermittelt.

Im Gegensatz zur Geextraktion wurde bei der Aufreinigung von PCR-Produkten die Probe (ca. 50 µL) nicht erwärmt, sondern lediglich in 500 µL Bindepuffer aus Ammoniumcitrat und Isopropanol aufgenommen. Dies präzipitiert die DNA und ermöglicht die Bindung an die Säulenmatrix. Anschließend wurden die *spin filter* für 2 min bei 10000 ×g zentrifugiert, der Durchfluss in einem 2 mL-Reaktionsgefäß aufgefangen und die Bindung noch einmal wiederholt. Die Elution in ein frisches 1,5 mL-Reaktionsgefäß fand nach 2 min Inkubation in 30 µL dH₂O oder wässrigem Elutionspuffer statt, indem zweimal für je 2 min bei 6000 ×g zentrifugiert wurde.

Alternativ zum DNA-Extraktionssystem von *AnalytikJena* wurde das *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* von *Promega* verwendet, bei dem in vergleichbarer Weise ebenfalls eine DNA-Fällung und Aufreinigung mittels *spin filter* durchgeführt wurde.

4.1.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der Konzentration an einzel- oder doppelsträngiger DNA oder RNA kann absorptionspektrometrisch vorgenommen werden. Aufgrund der aromatischen, delokalisierten π -Systeme der (Desoxy-)Ribonukleotide absorbieren sie Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm, wohingegen Proteine bei einer Wellenlänge von hauptsächlich 280 nm absorbieren. Am Spektralphotometer *NanoDrop* wurde dazu je 1 μ L Wasser zur Kalibrierung bei 260 nm gemessen, Wasser oder der vorliegende Puffer des Analyten als Leerwert aufgenommen und anschließend 1 μ L des Analyten vermessen. Anschließend konnte sowohl mittels *ND-1000-Software* die Konzentration an DNA bzw. RNA berechnet als auch über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm eine Aussage über die Verunreinigung mit Proteinen getroffen werden.

4.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

MiniPrep

Zur Plasmidisolierung aus Bakterien wurden 5-15 mL einer LB-Flüssigkultur von rekombinant transformierten *E. coli* DH5 α über Nacht bei 37 °C und Schütteln kultiviert und durch Zentrifugation bei ca. 5000 \times g, 4 °C und 10 min vom Überstand getrennt. Mittels *innuPREP Plasmid Mini Kit 2.0* wurde anschließend eine alkalische Lyse durchgeführt. Dazu wurde das Bakterienpellet in 550 μ L Resuspensionspuffer aufgenommen, 1:1 mit Lysepuffer aus Natriumdodecylsulfat (SDS) und Natronlauge vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Das Tensid SDS dient zur Solubilisierung der Zellmembran und die Natronlauge führt zur Hydrolyse der Lipidester. Zur Neutralisation wurde die Lösung mit 750 μ L eines Guanidiniumchlorid-Essigsäure-Puffers versetzt. Dadurch werden Proteine denaturiert. Sie werden zusammen mit den Lipiden durch starke Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit für 10 min präzipitiert. Die chromosomale DNA und Plasmid-DNA im Überstand wurde durch NaOH denaturiert, wobei die ringförmige, kompakte Plasmid-DNA in der Lage ist, wieder zu renaturieren. Sie wurde durch die Bindung an eine Silica-Säulenmatrix in *spin filter-tubes* und 2 mL-Auffanggefäßen vom Überstand abgetrennt (10000 \times g, 1 min, RT; zweimal) und mit zwei Waschpuffern gewaschen. Von Puffer A aus Guanidiniumchlorid und Isopropanol zur DNA-Fällung wurden 650 μ L eingesetzt und vom ethanolhaltigen Puffer B wurden 750 μ L verwendet. Anschließend wird die Matrix durch Zentrifugation für 2 min getrocknet und die Plasmid-DNA zweimal durch 50 μ L wässrigem Puffer oder dH₂O eluiert, indem zunächst die DNA für 3 min bei 37 °C gelöst und anschließend 1 min bei 6000 \times g in ein frisches 1,5 mL-Reaktionsgefäß zentrifugiert wird. Die DNA-Konzentration wurde mittels *NanoDrop* Spektralphotometer ermittelt.

MidiPrep

Die Plasmidisolierung wurde in einem größeren Maßstab mittels *PureYield Plasmid Midiprep* Systems von *Promega* durchgeführt, wobei das Verfahren analog zur MiniPrep aus alkalischer Lyse, alkoholischer DNA-Fällung und Bindung an Silica-Material bestand. Zur MidiPrep wurden LB-Flüssigkulturen eines Volumens von bis zu 250 mL eingesetzt. Bei einem Volumen unter 100 mL wurden jeweils 3 mL Resuspensions- und Lysepuffer und 5 mL Neutralisationspuffer verwendet. Bei Kulturen zwischen 100 und 250 mL wurden die doppelten Volumina der Puffer eingesetzt. Ein Unterschied zur MiniPrep ist die Größe der Säulen, die entweder in einem 50 mL-Gefäß zentrifugiert oder an einer Vakuumapparatur abgesaugt werden können. Zudem gibt es zur Entfernung des Präzipitats aus Zellbestandteilen neben der Zentrifugation bei $15000 \times g$ für 15 min noch eine weitere Filtersäule, durch die der Überstand geklärt wird. Beim Zentrifugationsprotokoll wurden weiterhin folgende Schritte durchgeführt: 1. Nach der Neutralisation wurde das Lysat 2 min bei RT inkubiert, präzipitiert und mehrmals bei $1500 \times g$ für 5 min durch die *clearing column* (blau) geklärt, bis der Überstand komplett durchgetreten war. 2. Der Durchfluss wurde in eine *binding column* (weiß) überführt und zweimal für je 3 min bei $1500 \times g$ zentrifugiert. 3. Die Säule wurde mit 5 mL Endotoxin-Waschpuffer und 20 mL Säulenwaschpuffer gewaschen (je 5 min, $1500 \times g$) und getrocknet (10 min, $1500 \times g$). 4. Die weiße Säule wurde in ein frisches 50 mL-Gefäß überführt, für 2 min mit 600 μ L Nuklease-freiem Wasser (vorgewärmt auf 37 °C) inkubiert, die DNA bei $1500 \times g$ für 5 min eluiert und eine weitere Elution mit 300 μ L Wasser vorgenommen.

4.1.9 Isolierung chromosomaler DNA aus Säugerzellen

Zur Isolierung von DNA aus Säugerzellen oder Geweben kann Chelex100-Harz verwendet werden. Dieses Harz bindet Proteine, Lipide und weitere Zellbestandteile, die DNA jedoch verbleibt im Überstand. Chelex besteht aus einem Polymer aus Styrol und Divinylbenzol und bindet mit seinen Iminodiessigsäuregruppen Metallionen, wie z.B. Mg^{2+} . Dies ist ein essenzieller Kofaktor von DNasen, dessen Bindung zu ihrer Inaktivierung führt. Um das Eintragen weiterer DNasen zu vermeiden, sollte die DNA-Extraktion in einer sterilen Umgebung mit frisch sterilisierten Materialien durchgeführt werden. Die Reagenzien und der Arbeitsplatz können mit UV-Bestrahlung sterilisiert, die Materialien, wie Rührer, Spatel und Reaktionsgefäße, sollten autoklaviert und/oder mit 10%iger Wasserstoffperoxidlösung behandelt werden.

Zellen einer konfluenten 24-*well*- oder 12-*well*-Vertiefung wurden trypsiniert, mit PBS in ein Reaktionsgefäß überführt, 10 min bei $14000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 200 μ L einer 5%igen Chelexlösung in DNase- und RNase-freiem Wasser durch Verwendung eines Vortexers resuspendiert. Anschließend wird die Mischung unter Schüt-

teilen für 20 min bei 56 °C erwärmt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Lösung sollte kurz auf Eis ruhen und erneut stark resuspendiert werden, bevor der Vorgang ein weiteres Mal wiederholt wird. Nach 10 min Zentrifugation bei 14000 ×g und 4 °C wurde etwas Überstand abgenommen, 1:1 verdünnt und 5 µL für die PCR verwendet oder direkt eingefroren. Es sollten keine Proben verwendet werden, die älter als 24 h sind.

4.1.10 DNA-Sequenzierung

Die Anwesenheit des gewünschten *inserts* nach Klonierungen, die korrekt durchgeführte Mutagenese oder aber die Identität eines stabil eingebrachten Gens konnte mittels DNA-Sequenzierung verifiziert werden. Die Sequenzierung erfolgte mittels der Plasmid- oder *insert*-spezifischen Sequenzierungs-*primer* (10 µM) in der *Sequencing Core Facility* des CeBiTec (*Center for Biotechnology*) der Universität Bielefeld durch die Verwendung eines *Abi Prism 377*, *3100* und *3730xl Sequencers* und dem *BigDye-terminator v3.1 Systems* von *Applied Biosystems* (Weiterstadt, Deutschland). Die Analyse der Fasta-Daten und Pherogramme erfolgte mit der *SeqManPro*- bzw. *DNASStar*-Software oder per *SerialCloner*.

4.1.11 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau beschreibt die sequenzspezifische Spaltung doppelsträngiger DNA durch Endonukleasen, typischerweise Typ II Endonukleasen, welche inmitten oder in direkter Nachbarschaft ihrer Erkennungssequenz schneiden. Natürlicherweise dienen Restriktionsenzyme den Bakterien oder Archaeen zur Abwehr von Fremd-DNA, werden in der Gentechnologie allerdings zur Klonierung von Genen in ein Vektorplasmid genutzt. Ihre meist palindromischen Erkennungssequenzen aus ca. vier bis zwölf Basenpaaren können je nach Enzym zu *sticky* oder *blunt ends* geschnitten werden. Bei *blunt ends* kommt es zu einem geraden Zerteilen beider Doppelstränge, wohingegen *sticky ends* durch einen versetzten Schnitt entstehen, sodass sich 3'-Überhänge bilden, die sich leichter mit komplementären Sequenzen paaren lassen. Bei der Klonierung wurden demnach vorzugsweise Restriktionsenzyme verwendet, welche nur eine einzige Erkennungssequenz in der *multiple cloning site* des vorliegenden Plasmids erkennen, keine Erkennungssequenz im Zielgen haben, *sticky ends* generieren und bei milden Bedingungen bzw. in übereinstimmenden Puffersystemen zu ihrem Restriktionsenzym-Partner aktiv sind. Die Nutzung von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen für eine Klonierung einer *insert*-DNA in ein Plasmid hat den Vorteil, dass die Orientierung des *inserts* durch die Basenpaarung der *sticky ends* strikt festgelegt ist. Das *insert* wurde entweder aus einem Ausgangsplasmid ausgeschnitten und in den Zielvektor ligiert, der ein kompatibles Set an Restriktionsschnittstellen aufwies, oder die

insert-Sequenz wurde mittels *add-on*-PCR um die Restriktionsschnittstellen erweitert. Zur Auswahl der Klonierungsstrategie und für Parameter wie die Wahl des Puffers, die optimale Restriktionstemperatur, das Verhältnis beider Restriktionsenzyme zueinander und das eventuelle Inaktivierungsprotokoll, wurden das Programm *Snap Gene Viewer* und die *online* Anwendungen von *New England Biolabs* (*Cleavage Close to End*, *NEBCloner*, *Double Digest Finder* und *Compatible Cohesive Ends*) und von *Thermo Fisher Scientific* (*DoubleDigest*) verwendet. Bei einer präparativen Restriktion wurden ca. 3 µg Plasmid-DNA, 0,5-1 µL Enzym und die entsprechende Menge an 10x Enzympuffer in Reaktionsansätzen von ca. 10 µL Volumen verwendet. Die Inkubationszeiten betragen ca. 3 h. Nach der eventuellen Inaktivierung der Restriktionsenzyme folgte im Falle eines Vektorverdaus häufig die Dephosphorylierung, bevor die präparativen Ansätze per Agarose-Gelelektrophorese getrennt und die entsprechenden Banden bei den erwarteten Laufweiten mittels Gelextraktion aufgereinigt wurden. Bei einem analytischen Restriktionsverdau wurden ca. 10% der Mengen eingesetzt und die Inkubationszeit auf 1 h verkürzt.

4.1.12 Dephosphorylierung der 5'-Phosphatenden

Durch die Entfernung der 5'-Phosphatenden von restriktionsverdauten Vektoren kann eine Religation des Ausgangsplasmids verhindert werden, da zu einer Ligation 5'-Phosphatenden mit 3'-Hydroxyenden verknüpft werden müssen. Erst durch die Anwesenheit der 5'-Phosphate der *insert*-DNA kann es demnach zu einer erfolgreichen Ligation kommen. Die Antarktische Phosphatase spaltet gezielt 5'-Phosphatenden von DNA-Strängen, weshalb die Dephosphorylierung von Plasmid-DNA meist im Anschluss an den Restriktionsverdau einer Klonierung stattfand. Dabei wurde ca. 1,5 µL Enzympuffer und 0,5 µL Enzym zu einem Reaktionsansatz von ca. 10 µL gegeben und für 10-30 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase fand für 10 min bei 85 °C statt.

4.1.13 Ligation

Um ein Gen oder Genabschnitt in einen Plasmidvektor zu klonieren, wird neben der Paarung an Restriktionsschnittstellen auch eine Ligase benötigt, die die Reaktion von 3'-Hydroxiden mit 5'-Phosphatenden katalysiert. Das Enzym T4 DNA-Ligase schließt Lücken im DNA-Rückgrat unter der Verwendung von Adenosintrisphosphat (ATP), wodurch DNA-*insert* und dephosphoryliertes Plasmid miteinander verbunden oder linearisierte Plasmide zyklisiert werden. Eine Religation von geschnittenem und dephosphoryliertem Vektor hingegen ist wegen eines fehlenden 5'-Phosphates nicht möglich. Die Ligationen von *insert* und Vektor wurden in einem Verhältnis von 7:1 angesetzt, 1:10 mit T4-Puffer versetzt, mit 1 µL T4 DNA-Ligase vermischt und ggf. mit

dH₂O auf 10 µL ausgefüllt. Die Ligationsreaktion fand bei RT für 2-4 h oder bei 16 °C über Nacht statt. Im Anschluss wurden ca. 3 µL des Ansatzes zum Hitzeschock oder 1 µL zur Elektroporation in *E. coli* eingesetzt.

4.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

Escherichia coli sind gram-negative Geißelbakterien, die Teil der natürlichen, tierischen Darmflora sind. Ihre relativ kurze Replikationszeit von ca. 30 min, die einfache, aerobe Kultivierung bei 37 °C und die leichte genetische Manipulierbarkeit zeichnen *E. coli* als ein wichtiges Modellorganismus für gentechnische Anwendungen aus. Für gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 1 können zahlreiche Laborstämme verwendet werden, unter anderem die in Kapitel 3.10 beschriebenen Stämme DH5α, BL21 (DE3) und Rosetta (DE3), die durch Genmanipulationen zur rekombinanten Proteinproduktion oder Plasmidvervielfältigung verbessert wurden. Die Kultivierung dieser *E. coli*-Stämme findet standardmäßig im Flüssignährmedium LB oder auf festen Nährplatten aus LB-Agar (Kapitel 3.9, **Tab. 10**) bei 37 °C unter aeroben Bedingungen statt. Durch spezielle Verfahren lassen sich für bestimmte Transformationsverfahren geeignete Zellen herstellen, die ein Plasmid aufnehmen und durch dessen Resistenzgene mittels Antibiotika selektioniert werden können. Die hier angewendeten Transformationsmethoden sind die Elektroporation und das Hitzeschockverfahren.

4.2.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen der Stämme *E. coli* DH5α, BL21 (DE3) oder Rosetta wurden zwei 20 mL-Flüssigkulturen aus LB in einem Erlenmeyerkolben mit den entsprechenden *E. colis* angeimpft und über Nacht bei 160 rpm und 37 °C geschüttelt. Vier 2 L-Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurden mit 500 mL LB-Medium und 2,5 mL Übernachtskultur überimpft und bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0,4-0,6 weiterkultiviert, bevor die Suspension für 15-30 min auf Eis gekühlt und auf Zentrifugenbecher verteilt wurde. Durch Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm für 30 min wurden die Zellen pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets jeweils in 250 mL kaltem, sterilem Wasser resuspendiert und die Suspension erneut bei 5000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde erneut mit jeweils 125 mL Wasser gewaschen, zentrifugiert und die Pellets in 40 mL kaltem, sterilem Glycerol (10%) resuspendiert. Glycerol dient dem Schutz vor Eiskristallbildung beim Einfrieren der Zellsuspensionen. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C und 6000 rpm für 15 min wurden die

Zellpellets in insgesamt 8 mL Glycerol (10%) resuspendiert und die Suspension in 40 μ L-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

4.2.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Chemisch kompetente *E. coli* der Stämme DH5 α und BL21 (DE3) wurden mittels Behandlung durch Calciumchlorid hergestellt. Dazu wurde eine 10 mL-Übernachtskultur angesetzt, bei 37 °C kultiviert und vier Hauptkulturen à 250 mL daraus angeimpft. Die LB-Hauptkulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert, 10 min auf Eis gekühlt und anschließend für 10 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet einer 250 mL-Kultur wurde mit $\frac{1}{4}$ des Kulturvolumens (65 mL) an eiskalter Magnesiumchloridlösung (100 mM) resuspendiert, für 5 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in $\frac{1}{20}$ Kulturvolumen (12,5 mL) eiskaltem Calciumchlorid (85 mM) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension erneut zentrifugiert und in $\frac{1}{100}$ des Volumens (2,5 mL) eiskaltem CaCl₂ (85 mM) sowie 15% Glycerol resuspendiert. Die Aliquots à 40 μ L wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.2.3 Transformation in *E. coli* mittels Elektroporation

Die Elektroporation stellt eine Methode zur Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen dar. Dabei wurden ca. 1 μ L DNA (maximal 100 ng) mit 40 μ L der Bakteriensuspension elektrokompeter *E. coli*s auf Eis vermischt. Die DNA setzt sich auf den Zelloberflächen ab. Durch einen kurzen, elektrischen Puls von ca. 0,6 ms werden die Zellen gestresst, ihre Zellwände werden kurzzeitig permeabel und die DNA kann in die Zellen gelangen. Dies geschah in einer auf Eis vorgekühlten Elektroporationsküvette, um die *E. coli*-Zellen vor übermäßiger Hitze durch den Stromstoß zu schützen. Die Küvette ist mit einem Leiter, kleinen Metallplättchen und Draht, versehen, der den Strompuls des Elektroporators durch die Lösung leitet. Anschließend wurde die Zellsuspension in 500 μ L auf 37 °C vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen und für mindestens 30 min unter Schütteln kultiviert. Hier sollen sich die Zellen erholen und die Genexpression der Resistenzgene des rekombinanten Plasmids starten, sodass im Anschluss die SOC-Zellsuspension auf einer LB-Agarplatte ausplattiert werden und bei 37 °C über Nacht kultiviert werden konnte. Durch das Antibiotikum wurden Plasmid-haltige Zellen selektioniert.

4.2.4 Transformation in *E. coli* mittels Hitzeschock

Die Hitzeschockmethode ist eine chemische Transformationsmethode, bei der chemisch kompetente *E. coli*s (40 μ L) auf Eis aufgetaut und mit ca. 3 μ L DNA vermischt wurden. Durch die Inkubation von DNA und Zellsuspension für 10-15 min auf Eis bilden sich Calcium-DNA-Präzipitate, welche sich besonders auf den geladenen Zelloberflächen ablagern. Bei der Inkubation für 90 s bei 42 °C, werden die Zellmembranen aufgrund des Hitzeschocks kurzzeitig liquide und permabler für die DNA-Calcium-Präzipitate, welche ins Zellinnere gelangen können. Die anschließende, rasante Abkühlung auf Eis schließt die Zellmembranen. Die Suspension wurde mit 500 μ L SOC-Medium bei 37 °C und Schütteln für 45 min inkubiert, sodass die Produkte der Resistenzgene gebildet werden können. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Selektionsplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht kultiviert.

4.2.5 Bestimmung der optischen Dichte einer Bakterienkultur

Das Wachstum von Bakterienzellen in Lösung wird mittels optischer Dichte nachverfolgt. Die optische Dichte gibt die Trübung einer Lösung an, indem die Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen wird. Je höher der Bakterientiter in Lösung, desto größer ist die Absorption. Dazu wurden 700-1000 μ L der Zellsuspension in eine Küvette (Schichtdicke $d=1$ cm) möglichst luftblasenfrei überführt und in einem Absorptionsspektrometer bei 600 nm vermessen. Der Leerwert der Lösung bestand aus einer Probe an LB-Medium. Bei *E. coli* bietet sich eine Kultivierung bei einer Start-OD von 0,05-0,2 an. Hier befinden sich die Zellen noch in der Latenzphase ihres Wachstums, d.h. der Metabolismus der Zellen hat sich noch nicht an das plötzliche Nahrungsangebot und die Erwärmung angepasst. Darauf folgt das exponentielle Wachstum, bei dem es nach einer Replikationszeit von 30 min zu einer Verdoppelung der Zellzahl kommt. Das exponentielle Wachstum wird bei einer OD₆₀₀ von 0,4-0,8 erreicht. Bei einer OD über 1 flacht die Wachstumskurve der Zellen zu einer stationären Phase ab, bei der sich viele Zellen in Lösung befinden, es aufgrund des Nahrungs- und Platzmangels allerdings kaum mehr zur Zellteilung kommt. Die eigenen katabolischen Produkte werden verwertet. Dauert diese Phase länger an, sterben die Bakterien ab.

4.2.6 Rekombinante Proteinproduktion in *E. coli*

LB-Medium

Zur Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli* wurden Vektoren vom Typ pET eingesetzt (Kapitel 3.12 und 8.5), die für His₆-tag- oder MBP-Fusionsproteine codierten. Als Expressions-

stamm diente *E. coli* BL21 (DE3), welche per Hitzeschock- oder Elektroporationsverfahren mit ca. 100 ng des jeweiligen Plasmides transformiert, entsprechend auf Ampicillin- oder Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten über Nacht bei 37 °C selektioniert und für die Anzucht von Vorkulturen eingesetzt wurden. Frühere Varianten der DARPin-Konstrukte lagen im *low copy*-Plasmid pJKME mit Chloramphenicol-Resistenzgen vor. Für die Expression von GST-getaggtter PreScission-Protease wurde dagegen der Codon-optimierte Expressionsstamm Rosetta (DE3) verwendet.

Bei pET-Vektoren und dem pJKME handelte es sich um ein lac-System mit einer T7-Promotor-gesteuerten Genexpression, die durch IPTG-Zugabe induzierbar ist. Zur reinen Anzucht der Bakterien in 50-75 mL-Vorkulturen in antibiotikahaltigem LB wurde daher Glucose-freies Medium eingesetzt, um eine hohe Teilungsrate und Plasmidreplikation zu fördern, aber eine vorzeitige Genexpression zu unterdrücken. Dazu wurden Einzelkolonien von der Selektionsplatte mittels Zahnstocher oder steriler Mikroliterpipettenspitze abgenommen und in das Flüssigmedium überführt. Nach über Nacht-Inkubation bei 37 °C und 160 rpm in einem Erlenmeyerkolben wurde die Zellsuspension mittels Zentrifugation bei 5000 ×g für 10 min geerntet, der Überstand bis auf 2 mL verworfen, das Pellet resuspendiert und je 1 mL in zwei 2 L-Erlenmeyerkolben mit 750 mL vorgewärmtem LB-Medium plus Antibiotikum überführt. Dies entsprach einer OD₆₀₀ von ca. 0,1. Die Hauptkulturen wurden bis zu einer OD von 0,6-0,8 bei 37 °C und Schütteln weiterinkubiert, auf Raumtemperatur runtergekühlt, mit je 100 µM IPTG (1 M Stammlösung) versetzt und über Nacht bei 18 °C und 160 rpm inkubiert. Durch das Schütteln wurde die Sauerstoffversorgung gewährleistet und eine Sedimentierung der Bakterien verhindert, wohingegen die Reduktion der Temperatur von 37 °C in der Anzuchtphase auf 18 °C während der Proteinexpression den Metabolismus der Bakterien verlangsamt. Dadurch soll Stress durch die stark gesteigerte Proteinexpression verringert und die Fehlfaltung der Proteine vermieden werden, was den Anteil an rekombinantem Protein in *inclusion bodies* verringert und letztendlich zu einer höheren Ausbeute an korrekt gefaltetem, löslichem Produkt führt. Zudem würde eine erhöhte Temperatur zu rasantem Wachstum und einem schnellen Überschreiten der stationären Phase führen. Die Inkubationszeit kann hingegen bis auf 8 h herabgesetzt werden, indem eine Produktionstemperatur von 30 °C verwendet wird.

Autoinduziertes Medium

Beim Autoinduzierten Medium (AI-Medium) wurde eine Mischung an Zuckern eingesetzt, die mit unterschiedlicher Priorität verstoffwechselt werden, wodurch die Proteinproduktion bei Erreichen einer gewissen metabolische Leistung selbst induziert wird. Zunächst wird dabei Glucose in der Wachstumsphase der Bakterien metabolisiert. Die Anwesenheit der Lactose führt zu-

nächst zur Repression der Genexpression. Sinkt der Glucose-Gehalt, geraten die Bakterien in einen Mangelmetabolismus und schalten auf Lactose als Kohlenstoffquelle um. Nun sollte der Bakterientiter hoch genug sein, um in die Produktionsphase zu wechseln. Durch die Verstoffwechslung der Lactose zu Galactose wird die Proteinproduktion induziert. Nachteil dieser Methode ist die relativ starke Hintergrundexpression und die unregelmäßige, wenn auch selbstständige Induktion der rekombinanten Genexpression, bei der die Produktionstemperatur nicht entsprechend herabgesetzt wird, was zu erhöhter Einlagerung an fehlgefalteten und ungefalteten Proteinen führt. Sollen *inclusion bodies* reduziert werden, muss die gesamte Wachstumsphase ebenfalls bei 18 °C stattfinden, was das Wachstum hemmt, einen weniger präzisen Übergang zwischen Wachstumsphase und Proteinproduktion hervorruft und längere Inkubationszeiten zur Folge hat.

4.2.7 Ernte und Lyse von Bakterienkulturen

Nach erfolgter Proteinproduktion wurden die Zellsuspensionen auf Eis gekühlt, um ein Absterben der Bakterien und eine Verstoffwechslung der Proteinprodukte in der folgenden Nahrungs- und Platzmangelsituation zu unterdrücken. Durch Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm für 30 min an den Sorvall Zentrifugen wurden die Zellen präzipitiert, die Überstände bis auf ca. 50 mL verworfen und die Pellets auf Eis resuspendiert und vereint. In 50 mL-Gefäßen wurden die Zellen erneut zentrifugiert (5000 rpm, 10 min, 4 °C), der Überstand verworfen und die Bakterienfeuchtmasse bei -20 °C gelagert.

Zur Lyse wurde das Pellet einer 1,5 L-Kultur auf Eis mit einer Spatelspitze DNase I aufgetaut und in ca. 15-25 mL Puffer resuspendiert. Der verwendete Puffer entsprach jeweils dem Bindepuffer der nachfolgenden Aufreinigungsmethode. Zum Schutz vor Proteasen wurde die Suspension mit einer Tablette EDTA-freiem Protease-Inhibitor versetzt und für 10 min unter Umwälzung bei 4 °C inkubiert. Bei Bakterienpellets einer Kulturgröße < 250 mL betrug das Resuspensionsvolumen ca. 5-7 mL. Volumina unter 10 mL wurden durch Sonifizierung lysiert, wohingegen größere Volumina mittels FRENCH Press behandelt wurden.

Die Lyse fand stets auf Eis statt, um eine Degradation der Proteine zu verhindern. Zur Ultraschallbehandlung wurde die Suspension in einem 15 mL-*tube* gefüllt, die Ultraschallspitze in der Lösung versenkt und einem gepulsten Ultraschallpuls (40%) für je 2 min mit 2 min Pause ausgesetzt. Das Sonifizieren wurde ca. fünfmal wiederholt. Zur Lyse an der FRENCH Press wurde ein vorgekühlter Zylinder mit einem regelbaren Auslass mit maximal 25 mL Bakteriensuspension gefüllt, mit einem Stempel verschlossen und bei einem maschinellen Druck von 1000 psi gepresst. Durch den hohen Druck auf den Stempel wurden beim langsamen Entweichen der Flüssigkeit aus einem engen Auslass starke Scherkräfte auf die Zellen ausgeübt, was zum Aufbre-

chen der Zellwände führt. Das Lysat wurde auf Eis aufgefangen und der Vorgang zweimal wiederholt. Im Anschluss an die Lyse wird die Lösung von Zelltrümmern durch Zentrifugation für zweimal 30 min bei $12000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ geklärt. Zur Proteinaufreinigung wird das geklärte Lysat nochmal durch einen Spritzenaufsatzfilter ($42 \text{ }\mu\text{m}$) filtriert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

4.2.8 Kryokonservierung von Bakterienkulturen

Zur Konservierung von Plasmiden wurden von jedem Konstrukt, welches zur Plasmidamplifikation oder zur Proteinexpression in *E. coli* DH5 α oder BL21 (DE3) eingebracht wurde, im Anschluss an die Selektion auf Agarplatten eine Kultur zur Kryokonservierung angezogen. Dazu wurden jeweils 4 mL LB-Medium mit Antibiotikum versetzt, mit einer Kolonie angeimpft und bei 200 rpm in 10 mL-Kulturröhrchen bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht kultiviert. Die Lösung wurde bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5000 \times g$ für 5 min abzentrifugiert, der Überstand bis auf $700 \text{ }\mu\text{L}$ verworfen und das Bakterienpellet vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension zur Kryokonservierung mit $700 \text{ }\mu\text{L}$ hochprozentigem Glycerin (86-96%) versetzt, in ein Kryogefäß mit Schraubdeckelverschluss überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kryogefäße wurden bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Das Animpfen einer Kultur auf Kryostocks wurde auf Eis mit einer Mikroliterpipettenspitze durchgeführt, durch die eine geringe Menge der angetauten Probe in 4 mL LB-Flüssigkultur überführt wurde.

4.3 Kultivierung von Säugerzellen

4.3.1 Auftauen, kultivieren und konservieren adhärenter Säugerzellen

Das Kultivieren adhärenter Säugerzellen bedarf einer Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in einer Umgebung mit 5% CO_2 und einer Luftfeuchte von ca. 70%. Die Zellen wachsen auf einer beschichteten, sterilen Oberfläche von Zellkultur-Petrischalen oder Zellkulturflaschen, welche mit einem Filter im Deckel vor Kontaminationen geschützt sind, aber einen Luftaustausch zulassen. Das gängigste Medium ist DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), welches eine isotone Umgebung und die Versorgung mit Nährstoffen, Elektrolyten und Spurenelementen sicherstellt, indem es zusätzlich mit Glutamin versetzt wird (1%). Adhärenente Zellen brauchen zudem Spurenelemente und Wachstumsfaktoren aus fetalem Kälberserum (10% FKS) und zur Verhinderung von Bakterien- oder Pilzbefall wird den Nährmedien zusätzlich eine Mischung als Penicillin und Streptomycin (1% Pen/Strep) zugesetzt. Zudem können auch Säugerzellen auf die Anwesenheit eines

Plasmides oder einer stabilen Gensequenz hin selektioniert werden, weshalb den Nährmedien zusätzlich die entsprechenden Antibiotika zugesetzt wurden. Die verwendeten Nährmedien und weitere Nährmedienzusätze, wie Prolin oder Natriumpyruvat, sind für die einzelnen Zelllinien in **Tab. 13** angegeben. Sämtliche Arbeiten mit Säugerzellen fanden an einer Sterilwerkbank statt und alle Reagenzien sind entweder durch Autoklavieren oder durch Sterilfiltrieren sterilisiert und vor der Verwendung vorgewärmt worden.

Kryokonservierte Säugerzellen wurden bei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, zum Auftauen kurz auf Eis transportiert und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Wasserbad vollends aufgetaut. Die Zellsuspension wurde unverzüglich in ca. 5 mL vorgewärmtes Nährmedium aufgenommen und bei RT für 5 min bei 200 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in weitere 5 mL Nährmedium aufgenommen und in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Nach der Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Dazu wurde der Überstand samt Zelltrümmer und toter, schwimmender Zellen abgesaugt und 5 mL frisches, warmes Medium auf die adhärenen Zellen gegeben und diese weiterinkubiert. Das Wachstum adhärenen Zellen wurde mit einem Durchlichtmikroskop bei einer Vergrößerung von 100-4000-fach beobachtet. Die Zelldichte auf der vorhandenen Oberfläche wird Konfluenz genannt. Bei einer Konfluenz von 80-100% wurden die Zellen gesplittet, d.h. ihre Anzahl reduziert, um ein Überwuchern und somit eine Platz- und Nährstoffmangelsituation zu verhindern. Dazu wurde das Medium verworfen, die Zellen mit ca. 1 mL sterilem PBS gewaschen und anschließend für 5-10 min mit ca. 500 μL einer Trypsin-EDTA-Lösung überschichtet und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Trypsin spaltet die Oberflächenproteine der Zellen, welche für den Kontakt an den Untergrund verantwortlich sind. Durch sanftes Auf- und Abpipettieren mit 4,5 mL Medium lösten sich die Zellen ab und wurden im Medium aufgenommen. 500 μL der Zellsuspension wurden zurück in die Flasche gegeben. Der Rest konnte zur Expansion der Kultur auf weitere Kulturgefäße verteilt oder verworfen werden. Anschließend wurde das Volumen wieder auf 5 mL mit frischem Medium aufgefüllt, die Zellsuspension geschwenkt und die Kultur bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Zellen sedimentieren und wachsen nach ca. 2-4 h wieder adhären.

Zur Kryokonservierung wurde eine Kultur mindestens auf eine T75-Zellkulturflasche (12-15 mL Volumen) oder eine 10 cm-Zellkulturschale (10 mL Volumen) expandiert, bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert und mittels Trypsinbehandlung abgelöst. Die Zellen wurden in ca. 5 mL Medium aufgenommen und für 2 min bei 200 rpm sedimentiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen wurden in 3 mL Nährmedium versetzt mit 10% DMSO aufgenommen und auf drei Kryoröhrchen mit Schraubdeckelverschluss aufgeteilt. Das Einfrieren fand schrittweise zunächst für 1 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und dann für mindestens 16 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ statt, um die Kryokulturen anschließend bei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu lagern.

4.3.2 Auftauen, kultivieren und einfrieren von Suspensionszellen

Im Unterschied zu adhärennten Säugerzellen, wachsen Suspensionszellen ohne die Ausbildung von Kontaktflächen frei in Lösung, wo sie ebenfalls bei 37 °C, 5% CO₂ und einer hohen Luftfeuchte unter ständigem Schütteln (120 rpm) in Kolben oder 50 mL-Gefäßen mit Schraubdeckeln samt Filtereinsatz kultiviert wurden. Aufgrund dessen wurden Suspensionskulturen der CHO-Zelllinien in TC42-Medium mit Glutamin aber ohne die Zugabe von FKS kultiviert (siehe **Tab. 13**). Das Auftauen von Kryokulturen wurde analog zu den adhärennten Zellen durchgeführt, wobei das Zellpellet in 5 mL Nährmedium aufgenommen, in einen Schüttelkolben überführt und auf 20 mL mit Nährmedium aufgefüllt wurde. Das Wachstum in Lösung wurde mittels Trypanblau-Färbung dokumentiert (Kapitel 4.3.4). Beim Splitten von CHO-Suspensionen wurde die gesamte Kultur abgenommen, das entsprechende Volumen für $1 \cdot 10^5$ Zellen/mL zurück in den Kolben gegeben und der Rest zur Expansion auf weitere Gefäße verteilt oder verworfen. Die Kulturgefäße wurden erneut mit Medium auf 20 mL aufgefüllt und bei 37 °C weiterinkubiert. Zur Kryokonservierung wurde die Zellzahl bei einer Viabilität von mindestens 90% ermittelt, die Kulturen in ein 50 mL-Gefäß überführt, bei 200 rpm für 5 min sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit dem entsprechenden Volumen an Nährmedium samt 10% DMSO aufgenommen, sodass ein Titer von $1 \cdot 10^7$ Zellen/mL erreicht wurde. Diese Lösung wurde mit je 1 mL pro Kryoröhrchen zunächst bei -20 °C für 1 h gekühlt, für mindestens 16 h zu -80 °C überführt und bei -150 °C gelagert.

4.3.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Die Neubauer-Zählkammer besteht aus einem Objektträger mit eingefrästen Nuten und einem Deckgläschen, zwischen denen sich aufgrund einer Vertiefung ein Hohlraum definierten Volumens befindet. Auf den durch die Fräsung eingeteilten Flächen mit einer Höhe zum Deckglas von 0,1 mm befindet sich eine präzise Gitterstruktur, die in einem Durchlichtmikroskop mit ca. 100facher Vergrößerung sichtbar ist. Eine Zellsuspension wird in den Zwischenraum gegeben, die Zellen verteilen sich nahezu gleichmäßig auf dem Raster und können in einzelnen Quadranten unterm Mikroskop betrachtet und gezählt werden. Diese Quadranten sind entweder Großquadrate mit 1 mm² Fläche oder Gruppenquadrate mit 0,04 mm² Fläche. Dabei wurden jeweils vier Großquadrate oder fünf Gruppenquadrate ausgezählt, ein Mittelwert errechnet und durch die bekannte Höhe von 0,1 mm wird die Zellzahl pro Volumen der Quadranten erhalten. Mit Berücksichtigung der Verdünnung wurde demnach die Zellzahl pro Mikroliter Zellsuspension errechnet.

Die Bestimmung der Zellzahl diente dem Aussäen von definierten Zellmengen auf 6well-Platten, um möglichst vergleichbare experimentelle Bedingungen einstellen zu können. Dazu wurden adhärent-wachsende Zellen mittels Trypsinierung abgelöst und in Medium aufgenommen. Von dieser gut durchmischten Zellsuspension wurde eine Probe von 10 μL abgenommen und 1:1 bis 1:10 in Medium verdünnt, sodass in der Zählkammer eine gleichmäßige Verteilung an vereinzelt Zellen mikroskopisch zu beobachten waren. Anschließend an die Zählung wurde die Zellsuspension auf den 6-well Platten verteilt und mit der entsprechenden Menge Medium verdünnt, sodass ca. $3 \cdot 10^5$ Zellen pro 6-well ausgesät wurden.

4.3.4 Bestimmung von Zellzahl und Zellviabilität durch Trypanblau-Färbung

Die Trypanblau-Färbung dient der Bestimmung der Zellzahl und der Zellviabilität und wurde vor allem für die Beobachtung des Wachstums der Suspensionskulturen durchgeführt. Der Farbstoff Trypanblau ist ein Bisazofarbstoff, der aufgrund seines anionischen Charakters vermehrt Proteine bindet. Der Farbstoff gelangt nicht über die Plasmamembran von lebendigen Zellen, weshalb diese lediglich vom Farbstoff umhüllt werden, wohingegen tote Zellen mit Fehlender Integrität der Zellmembran durch Trypanblau auch zytosolisch stark angefärbt werden. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 μL Zellsuspension 1:1 mit einer Trypanblau-PBS-Lösung vermischt und ca. 10 μL in Cedex-Objektträgern überführt. Die Objektträger besitzen acht Vertiefungen, durch die die eingegebene Lösung flache Kammern befüllt. Diese werden im automatischen Zellzähler Cedex XS grafisch ausgewertet, indem das Gerät in ca. 100facher Vergrößerung ein Bild der dünnen Zellsuspension aufnimmt, in der die Zellen aufgrund des begrenzten Volumens vereinzelt vorliegen. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe wurde so die Gesamtzahl der Zellen in Doppelbestimmung ermittelt und anhand der Trypanblau-Färbung die Viabilität als Verhältnis von lebendigen zu toten Zellen errechnet.

4.3.5 Säugierzell-Transfektion mit PEI

Bei der Transfektion von Säugierzellen werden Plasmide, welche zur Genexpression in eukaryotischen Systemen geeignet sind, mittels verschiedenster Techniken in die Zellen eingebracht. Die gängigsten, chemischen Methoden basieren auf der Bildung von Plasmid-Präzipitaten auf den Zelloberflächen, welche endozytotisch oder durch die zeitweise erhöhte Permeabilität der Plasmamembran ins Zellinnere gelangen können. Während der Zellteilung löst sich der Zellkern auf, die gesamte DNA innerhalb einer Zelle, auch die transformierten Plasmide, wird zentriert und durch den Spindelapparat gleichmäßig auf die zukünftigen Tochterzellen verteilt. Anschließend

umschließt ein neu gebildeter Zellkern die DNA und die Expression der rekombinanten Gene kann vonstattengehen.

Bei der Transfektion mittels PEI bildet das kationische Polymer Polyethylenimin Komplexe mit der negativ geladenen Plasmid-DNA und fällt diese aus. Die Präzipitate lagern sich an den Oberflächen der adhären Zellen an und werden so aufgenommen. Zur Transfektion mit PEI wurden pro Ansatz 300 μL Nährmedium ohne FKS mit 2 μg DNA versetzt und mit der dreifachen Menge an PEI stark vermischt. Nach 30minütiger Inkubation bei RT wurde das Gemisch auf die Zellen aufgetropft. Bei der Verwendung des Expressionsplasmids pBI kann die rekombinante Genexpression durch die Zugabe von Doxycyclin, ein Tetracyclin-Analogon, in Anwesenheit des reversen Transkriptionsaktivators rtTA induziert werden. Dazu wurden die Medien 4 h nach der Transfektion mit 2 μL Doxycyclin-Lösung pro Milliliter Zellüberstand versetzt und mindestens 24 h bei 37 °C inkubiert, bevor sowohl das Medium als auch die Zellen geerntet wurden.

Bei der Transfektion von Suspensionszellen mit PEI wurden die Zellen einer 20 mL-Kultur zunächst zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 5 mL Transfektionsmedium (CHO-TF) aufgenommen. Die DNA-PEI-Lösung wurde wie oben beschrieben vorbereitet und auf die Zellen gegeben, diese vermischt und zunächst ohne Schütteln inkubiert. Im Anschluss daran wurden die sedimentierten Zellen erneut zentrifugiert und in 20-50 mL TC42-Medium aufgenommen und für mindestens 42 h bei 37 °C und Schütteln inkubiert. Die Ernte geschah mittels Zentrifugation.

4.3.6 Säugerzell-Transfektion mit Lipofectamin

Bei der Lipofektion handelt es sich ebenfalls um ein chemisches Transfektionsverfahren, bei der die Plasmid-DNA durch die Bildung von Liposomen umhüllt wird. Diese Vesikel verschmelzen leicht mit der Membran der Säugerzellen und werden endozytotisch aufgenommen. Zur Liposombildung in Lösung werden zumeist kationische Lipide eingesetzt, welche die anionische DNA komplexieren und so leicht Mizellen bilden. Ein solches Reagenz ist Lipofectamin bzw. LTX. Es wird zunächst mit FKS-freiem Medium (6 μL in 125 μL) vermischt, maximal 5 min bei RT inkubiert und anschließend mit einer Mischung aus 2 μg DNA und 125 μL Nährmedium vermengt. Während der erneuten Inkubation von maximal 10 min bilden sich die Liposomen, welche anschließend auf die Zellen getropft werden. Nach ca. 4 h kann die Proteinexpression ggf. mit Doxycyclin induziert werden.

4.3.7 Säugerzell-Transfektion mittels Calciumphosphat-Methode

Die Calciumphosphat-Transfektion zählt zu den chemischen Transfektionsmethoden und basiert auf der Präzipitation von DNA an Calciumphosphat aus einer übersättigten Lösung. Dabei werden DNA-haltige Kristalle erzeugt, welche von den Zellen per Endozytose aufgenommen werden. Die Calciumphosphatpräzipitation wird erzielt, indem hochkonzentrierte Calciumchloridlösung mit einem Natriumphosphat-haltigen Puffer in Gegenwart von DNA versetzt wird. Es wurden 2 µg DNA eingesetzt, auf 135 µL mit Wasser aufgefüllt und mit 15 µL 2,5 M CaCl₂-Lösung vermischt. Dieser Mischung wurden 150 µL 2x HEBS-Puffer (pH 7) tropfenweise zugegeben. Die Lösung ist sorgfältig vermischt, 30 min bei RT inkubiert und die kristallhaltige Suspension auf Zellen getropft worden. Nach 3 h bei 37 °C wurde der Überstand entfernt und die Zellen wurden für 2 min mit einer DMSO-Lösung (10%) überschichtet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde der Kultur frisches Nährmedium verabreicht und ggf. die Genexpression durch Doxycyclinzugabe induziert.

4.3.8 Rekombinante Proteinproduktion in Säugerzellen, ernten und lysieren

Die Proteinproduktion und Aufreinigung in Säugerzellen wurde je nach Lokalisation des Genproduktes entsprechend mit der Ernte der Zellen und der Isolation des Proteins aus dem Zellysate oder der Ernte der Zellkulturüberstände zur Isolierung sekretierter Proteine durchgeführt.

Bei der Antikörperproduktion in CHO-Suspensionszellen wurde eine 50 mL Kultur bis zu einer Viabilität von über 90% und einer Zelldichte von über $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL angezogen, mittels PEI mit dem Vektor pcDNA5_scFv425-Fc-CTPSR-His₆ wie in Kapitel 4.3.5 beschrieben transfiziert und die Proteinproduktion für 42 h durchgeführt. Das Medium wurde durch Zentrifugation bei RT, 200 rpm für 5 min abgenommen und bei 4 °C gelagert, die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und erneut für 42 h kultiviert. Anschließend wurde der Überstand ebenfalls geerntet und mit den vorherigen Überständen vereinigt. Zur Protein A-Aufreinigung aus dem Zellkulturüberstand wurde eine Proteinfällung (Kapitel 4.4.1) und anschließend die Protein A-Affinitätschromatographie aus Kapitel 4.4.6 durchgeführt.

Bei der Proteinproduktion und zur Analyse der Zellysate durch Aktivitätsassays oder Western Blots wurden adhärenente Zellen auf 6-well- oder 10 cm-Platten ausgesät. Die Transfektion wurde je nach Zelllinie und Verwendungszweck mittels PEI, LTX oder Calciumphosphat vorgenommen. Von den Vektoren pBI, pcDNA3.1, pcDNA5 und pSB wurden jeweils ca. 2 µg pro Probe verwendet. Für eine Kotransfektion von zwei Plasmiden wurden diese in einem Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Im Falle des pBI-Vektors musste für die Induktion der Genexpression durch das tet-System das rtTA-Konstrukt vorliegen. D.h. in TetOn-Zellen (HT1080-N1 und MSDi-B) wur-

de der Vektor pBI ohne Kotransfektion eingesetzt, in allen anderen Zelllinien hingegen wurden pro Probe 0,5 µg des Plasmids mit dem rtTA-Gen zugegeben und die Induktion ca. 4 h nach der Transfektion durch die Zugabe von Dox gestartet. Die Medien wurden nach 24-48 h in 2 mL-Reaktionsgefäße gesammelt, für 10 min bei 4 °C und 10000 ×g zentrifugiert, um Zelltrümmer und tote Zellen abzutrennen, und deren Überstände in neue Gefäße überführt. Die Ernte der Zellen geschah durch Trypsinieren. Die abgelösten Zellen wurden in Medium oder PBS aufgenommen, in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 12000 ×g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in bis zu 200 µL Tris- oder PBS-Puffer (pH 7,4) mit Protease-Inhibitor-Cocktail (1:100) und Triton X-100 (0,1%) resuspendiert. Zur Fixierung freier Thiole wurde N-Ethylmaleinimid (NEM; 20 mM) direkt bei der Ernte dem PBS und bei der Lyse dem Puffer zugesetzt. Die Lyse geschah am Ultraschallgerät, bei einer gepulsten Ultraschallintensität von 80% unter ständiger Kühlung für zweimal je 30 s mit mindestens 10 s Pause. Anschließend wurde das Lysat durch Zentrifugation (12000 rpm, 10 min, 4 °C) von Schwebstoffen geklärt und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay ermittelt.

4.3.9 Isolierung von stabilen Säugerzell-Einzelklonen – Flp-In-System

Flp-In-System

Zur Herstellung von Zelllinien, die ein gewünschtes Gen stabil in die genomische DNA integriert haben und permanent exprimieren, wurde das Flp-In-System von *invitrogen* genutzt. Sowohl mithilfe dieses Kits etablierte Wirtszelllinien als auch kommerziell erhältliche Flp-In-Zellen können als Ausgangszellen genutzt werden. Flp-In-Zellen werden mit einem Plasmid, das das *gene of interest* trägt (pcDNA5/FRT), und dem Gen für das Enzym FLP, auch Flippase genannt, welches auf dem Plasmid pOG44 codiert wird, kotransfiziert. Die hier genutzte Flp-Rekombinase ist eine temperatursensitive Variante des ortsspezifischen Enzyms aus *Saccharomyces cerevisiae* (Broach und Hickst, 1980; Broach und Guarascio, 1982; Argos *et al.*, 1986). Sie rekombiniert die *FLP recombinase target* (FRT)-Sequenzen im Genlokus der Flp-In-Zellen, mit denen des pcDNA5-Vektors. Das Flp-In-System bietet den Vorteil, dass Ort und Anzahl der genomischen Integrationen in die chromosomale DNA der Wirtszelle durch das spezifische Rekombinationsereignis gesteuert werden. Dies sorgt für eine hohe Stabilität der inserierten Sequenz, verhindert eventuelle negative Effekte durch eine zu starke Überexpression des Zielgens aufgrund von zahlreichen Mehrfach-Integrationen und schafft ein genetisch weniger heterogenes Produkt, da zufällige Integrationsorte und dadurch eventuell negative Effekte auf das native Genom umgangen werden. Zudem bietet das Flp-In-System mehrere Möglichkeiten der Selektion. Zum einen dient die Kotransfektion von pOG44 und pcDNA5/FRT/CAT als Positivkontrolle. Das CAT-Gen codiert für eine Chloramphenicol-Acetyl-Transferase. Ist die Rekombination mit

diesem Kontrollsystem erfolgreich, kann per Western Blot oder ELISA auf die Expression des Enzyms CAT, sowie durch CAT-Assays auf die Enzymaktivität hin getestet werden. Zudem kann die CAT-Positivkontrolle auch über das zu erwartende Expressionslevel des stabil inserierten Gens Aufschluss geben, falls verschiedene Wirtszelllinien genutzt oder Flp-In-Wirtszellen selbst generiert wurden. Zum anderen tragen Flp-In-Zellen in der FRT-Sequenz ein lacZ-Zeocin-Fusionsgen, welches eine Zeocin-Resistenz vermittelt und für die β -Galactosidase codiert. Durch das Rekombinationsereignis verliert die Zelle die Zeocin-Resistenz und die β -Galactosidase-Aktivität. Dagegen wird allerdings das Hygromycin-Resistenzgen in räumliche Nähe zum SV40-Promotor gebracht, wodurch positive Zellklone sowohl durch Hygromycin-Resistenz, Zeocin-Sensitivität, Expression des Zielgens als auch durch Blau-Weiß-Färbung im X-Gal-Assay selektiert werden können.

Serielle Verdünnung und Selektion auf Antibiotikaresistenz und -sensitivität

Um stabile CHO-Suspensionszelllinien mit Expression von verschiedenen Varianten des humanen FGEs zu generieren, die zur Produktion von transient transfizierten Antikörpern dienen sollten, wurden zunächst kommerziell erwerbliche Flp-In-CHO Suspensionszellen in TC42-Medium mit Zeocin kultiviert und parallel mit verschiedenen Hygromycin-Konzentrationen behandelt. Durch die über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen gemessene Zellzahl und Zellviabilität wurde eine *killing curve* erstellt, die zur Ermittlung der wirksamsten Antibiotikakonzentration für die Selektion der Suspensionszellen diente. Kurz vor der Transfektion wurden ca. $4,5 \cdot 10^6$ Zellen auf Antibiotika-freies CHO-TF-Medium umgesetzt und anschließend mit den Plasmiden pOG44 und pcDNA5/FRT_hFGE-WT-His, _hFGE-RRA-His, _hFGE-WT-KDEL, _hFGE-RRA-KDEL, _hFGE-WT-PGEL oder _hFGE-RRA-PGEL in einem Verhältnis von 9:1 mittels PEI kotransfiziert. Als Negativkontrollen dienten untransfizierte Zellen und die Kotransfektion mit pOG44 und einem pcDNA3.1_hFGE-Vektor. 6 h bis einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit Hygromycin (bis zu 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) behandelt und mindestens jeden zweiten Tag mittels Trypanblau-Färbung die Zellzahl und -viabilität kontrolliert. Da es nach wiederholter Durchführung nicht möglich war, hygromycinresistente Zellen zu isolieren, wurden die Flp-In-CHO-Zellen durch die schrittweise Erhöhung von FKS (0-10%) an adhärentes Wachstum angepasst. Zur besseren Zellviabilität wurden die adhären Zellen auf das CHO-Medium HAMS F12 mit Prolin (+10% FKS) umgestellt und erneut mit Zeocin-Zugabe kultiviert. Die *killing curve* und die Kotransfektionen wurden bei geringer Konfluenz (ca. 20%) wiederholt und die Zellen mit Hygromycin versetzt, welches innerhalb von drei Tagen von 600 auf 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ heraufgesetzt wurde. Durch serielle Verdünnungsschritte konnten Kolonien aus Einzelzellen angezogen werden, von denen 20 bis 40 Kolonien auf 24-well-Platten umgesetzt wurden. Nach erreichter Konfluenz wurden die hygromycinresistenten Zellen auf weitere 24-well-Platten gesplittet und dort

parallel mit Zeocin behandelt. Die Klone, welche sich auch bei 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resistent gegen Hygromycin und schon bei 50-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sensitiv gegenüber Zeocin zeigten, wurden in 10 cm-Schalen unter Hygromycin-Gabe expandiert und kryokonserviert. Anschließend wurde ein β -Galactosidase-Assay (Kapitel 4.3.10) und ein Test auf FGE-Expression durchgeführt.

4.3.10 β -Galactosidase-Assay

Von jedem CHO-Zelltyp pro hFGE-Variante wurden je zwei Zellklone trypsiniert, stark verdünnt und in 96-*well*-Platten ausgesät, sodass zahlreiche Kolonien erneut aus Einzelzellen angezogen werden konnten. Bei einer Konfluenz von ca. 20% wurden pro Vertiefung 200 μL PBS mit 2 μL einer 50 mM X-Gal-Lösung in DMSO versetzt und weiterhin bei 37 °C kultiviert. Eine Blaufärbung der falsch-positiven Klone konnte nach 8-24 h beobachtet werden. Die farblich unveränderten Vertiefungen wurden gewaschen, mit HAMs F12 und Hygromycin kultiviert und auf 24-*well*-Platten umgesetzt. Anschließend wurden die Zellüberstände beim Splitten der konfluenten Zellen gesammelt und mit den Zelllysaten der überschüssigen, trypsinierten Zellen mittels einem SDS-PAGE-Gel und einer Western Blot-Detektion mit α FGE- und α PentaHis-Antikörper auf FGE-Expression und -Sekretion sowie ggf. auf das Vorhandensein eines His-Signals hin analysiert. Ausgewählte Klone wurden erneut expandiert und kryokonserviert, sowie die chromosomale DNA mittels Chelex (Kapitel 4.1.9) extrahiert, das Zielgen durch hFGE-spezifische *primer* per PCR vervielfältigt und die PCR-Produkte durch Sequenzierung verifiziert.

4.3.11 Fixieren und Färben von Säugerzellen zur Fluoreszenzmikroskopie

Zur Fluoreszenzmikroskopie wurden Säugerzellen zu ca. 40-60% Konfluenz auf PLL-beschichtete Deckgläschen (Poly-L-Lysin *cover slips*) in 12-*well*-Platten kultiviert und ggf. mit 1 μg DNA transfiziert, induziert und für 24-48 h zur Expression kultiviert. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend fixiert und permeabilisiert. Zur Fixierung wurde entweder PFA (40 g/L Formaldehydlösung aus Paraformaldehyd) oder Alkohole (reines Ethanol oder Methanol) eingesetzt, wobei letzteres die Zellen auch direkt permeabilisiert. Bei der PFA-Fixierung dagegen schloss sich eine Permeabilisierung durch Triton X-100 an. Hierzu wurden die Zellen mit 250 μL einer 4% PFA-PBS-Lösung für 15-20 min bei RT inkubiert, zweimal für je 5 min mit PBS gewaschen und das restliche PFA durch die 10-minütige Behandlung mit 250 μL einer 50 mM Ammoniumchloridlösung in PBS entfernt. Die Aldehyd-Fixierung basiert auf der Bindung an Aminogruppen, wodurch die Proteine vernetzt und immobilisiert werden. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 250 μL einer 0,02% Triton X-100-Lösung in PBS für 10 min bei RT inkubiert, zweimal gewaschen und

20 min mit 250 μ L 1% Ziegen Serum oder BSA in PBS blockiert. Das Permeabilisieren durch die Verwendung eines Tensids dient dem Eindringen der Fluoreszenzantikörper in das Zellinnere, wohingegen das Ziegen Serum oder BSA eventuell vorhandene Stellen absättigen, an denen Proteine und somit auch die Antikörper unspezifisch gebunden werden könnten.

Die chemische Fixierung durch eiskalten Alkohol soll den Zellen Wasser entziehen, wodurch Proteine gefällt werden. Hierbei wurden die Zellen für 5 min mit eiskaltem, reinem Ethanol oder Methanol inkubiert, einmal kurz und zweimal für 10 min mit PBS gewaschen und anschließend durch 250 μ L 1% Ziegen Serum oder BSA in PBS für 20 min blockiert.

Die Immunfärbung fixierter Zellen fand in einer dunklen, feuchten Kammer bei RT statt. Dazu wurden die Deckgläschen auf Parafilm mit der mit Zellen beschichteten Seite nach unten in Tropfen aus Antikörperverdünnungen für je 1 h inkubiert. Der Erstantikörper (R α FGE, M α PentaHis, R α HA, M α GM130 oder M α PDI) wurde in einer Verdünnung von 1:100-1:500 für 1 h eingesetzt, danach wurden die Zellen dreimal je 5 min mit PBS gewaschen und mit einer Verdünnung des Sekundärantikörpers (G α M-Alexa546, G α M-Alexa488, G α R-Alexa433 oder G α Rat-Alexa488) von 1:500 für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde entweder die Färbung zur Detektion mit einem weiteren Typ von Erstantikörper wiederholt oder der Zellkern bzw. die DNA wurde mit dem Organellmarker DAPI bzw. Höchst (1:2000) angefärbt. Dazu wurden die Deckgläschen kurz in Wasser getunkt, 30 s in DAPI inkubiert, erneut in Wasser getunkt, überschüssiges Wasser an einem saugfähigen Tuch abgestrichen und die Gläschen mit den Zellen voran in einen Tropfen Mowiol (ca. 10 μ L) auf die Objektträger gelegt und über Nacht im Dunkeln ausgehärtet. Zur Kontrolle einer unspezifischen Bindung der fluoreszenzmarkierten Antikörper wurden jeweils Proben nur mit Sekundärantikörper behandelt. Bis zur Fluoreszenzdetektion wurden die Proben bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Die Detektion wurde entweder am Fluoreszenzmikroskop Leica DMIL IRB mit einer 40- bis 100-fachen Vergrößerung vorgenommen oder am konfokalen Fluoreszenzmikroskop LSM 700 durchgeführt. Die verwendeten Emissionswellenlängen betragen 488 nm (grün), 546 nm (rot) und 405 nm (blau), wobei die Laserintensität von 2, das *pinhole* >30, *frame size* 1024x1024 und *speed* 6-8 gewählt und der *gain* entsprechend angepasst wurde.

4.3.12 Bestimmung der Zellzytotoxizität mittels *alarBlue*-Assay

Durch den *alarBlue*-Assay von *Thermo Fisher Scientific* kann der Effekt von Toxinen und deren Konjugaten auf die Proliferation von Säugerzellen beobachtet werden. Grundlage für diesen Test ist der zellpermeable Farbstoff Resazurin, der vom Metabolismus einer viablen Zelle zu Resafourin reduziert wird. Dies bewirkt eine Veränderung der Absorptionseigenschaften des Farbstoffes, wodurch entweder die Absorption bei 570 nm oder die Fluoreszenzemission des

Resazourins bei 590 nm nach Anregung mit einer Wellenlänge von 560 nm detektiert werden kann.

Der Zytotoxizitätstest wurde mit adhären wachsenden A431- und MCF7-Zellen durchgeführt, welche in 96-*well* Zellkulturplatten ausgesät und 72 h in RPMI-Medium, versetzt mit unterschiedlichen Konzentrationen des Zellgifts, kultiviert wurden. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit dem *AlamarBlue*-Reagenz (0,1% Endkonzentration) in RPMI-Medium bei 37 °C inkubiert. Nach 1, 2, 3 und 4 h wurde die Fluoreszenz am *Multiwell Plate Reader* Tecan Spark bei 560 nm angeregt und bei 590 nm detektiert, indem jede Vertiefung viermal gemessen (quadratische Anordnung) und die Fluoreszenzwerte gemittelt wurden. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen und als Positivkontrolle diente durch Autoklavieren reduziertes Resazourin. Alle Proben wurden mindestens in Dreifachbestimmungen eingesetzt. Zur Ermittlung der optimalen Zelldichte wurde zunächst ein Assay nur mit Negativ- und Positivkontrollen mit unterschiedlicher Zellzahl pro Zelllinie durchgeführt, da nach der 72 h Inkubation die Zellen weder zu wenig konfluent und ungleichmäßig verteilt, noch zu konfluent oder sogar überwachsen sein dürfen, um eine effiziente Verteilung sowohl vom Toxin als auch vom Farbstoff und dementsprechend eine gleichmäßige Fluoreszenzmessung gewährleisten zu können. Für A431-Zellen wurde eine optimale Zellzahl von $3\text{-}5 \cdot 10^3$ Zellen/mL und für MCF7-Zellen eine Zellzahl von $1\text{-}3 \cdot 10^3$ Zellen/mL in 200 μL Medium pro Vertiefung ermittelt. Zudem wurden durch zusätzliche Kontrollen auch eventuelle Einflüsse von DMSO-Verdünnungen, den unkonjugierten Proteinen DARPin004 und Sc2 und deren Puffern auf die Zellviabilität untersucht. In den ersten Assays mit dem Toxin-Konjugat DBCO-PEG-VC-PAB-MMAE konnten optimale Verdünnungsstufen (0,01 nM-1 mM) ermittelt werden, in denen die prozentuale Reduktion des Resazourins annähernd linear mit dem Logarithmus der Toxinkonzentration zusammenhängt und sich eine sigmoidale Kurve bei gegenseitiger Auftragung ergibt. Sowohl dieses MMAE-Konstrukt als auch verschiedene Chargen der Konjugate von MMAE mit DARPin004 und mit Sc2 wurden diesem Experiment unterzogen. Der dabei mittels Excel und GraphPad Prism ermittelte IC_{50} -Wert einer jeden Substanz gibt die Konzentration an, die zu einer Reduktion der Zellviabilität um 50% verursacht und wurde jeweils für beide Zelllinien parallel ermittelt.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Proteinfällung aus Zellkulturüberständen

Zur Produktion von *single-chain* Antikörpern aus stabil FGE-exprimierenden CHO-Zellen wurden die Zellen in frischem Medium mit dem Plasmid für Sc1 (pcDNA5_scFv425-Fc-CTPSR-

His₆) bzw. Sc2 (pcDNA5_scFv425-Fc-CTPSR-CTAGR) transient transfiziert und einen Tag bei 37 °C kultiviert. Der Zellkulturüberstand wurde gesammelt und die Zellen mit neuem Medium versetzt. Nach 2 und 4 Tagen wurde die Prozedur wiederholt. Die Überstände wurden jeweils für 10 min bei 10000 ×g zentrifugiert, um eventuelle Zelldebris zu entfernen. Die vereinigten, geklärten Überstände wurden mit 50% (w/v) Ammoniumsulfat versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend für 24-72 h bei 4 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 4 °C, 10000 ×g und 30 min wurde das Präzipitat in wenigen Millilitern des Bindepuffers der anschließenden Protein A-Aufreinigung komplett gelöst, in einen Dialyseschlauch gefüllt (MWCO mind. 20 kDa) und über Nacht gegen den Bindepuffer (mindestens 200fach größeres Volumen) unter kontinuierlicher Umwälzung bei 4 °C dialysiert. Zur Verhinderung weiterer Präzipitate in der anschließenden Affinitätschromatographie wurde die Lösung dreimal bei 18000 ×g und 4 °C für je 30 min zentrifugiert und der Überstand anschließend durch einen 0,42 µm Spitzenaufsatzfilter steril filtriert.

4.4.2 HisTrap – Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Bei der Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie wird eine spezifische Bindung zwischen einem Protein oder des Aufreinigungs-*tags* eines Fusionsproteins an einen Bindepartner im Säulenmaterial ausgenutzt. Basis eines solchen Säulenmaterials ist meistens Agarose oder Sepharose. Im Falle der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie bilden die Imidazolringe von Histidinresten einen Komplex mit dem Nickelion im Nitrilotriessigsäure-(NTA-)Säulenmaterial. Zur Verstärkung der Komplexbildung und selektiveren Bindung des gewünschten, rekombinanten Proteins, werden Fusionsproteine mit Hexa-Histidin-*tags* genutzt. Das rekombinante Protein wird über die Säule geleitet und bindet hochaffin an das Material, wohingegen unerwünschte Proteine und weitere Zellbestandteile nicht binden können und im Durchfluss eluiert werden. Imidazol ist der Kompetitor zum Histidin und verdrängt dieses mit zunehmender Konzentration aus dem Nickelkomplex. Durch die Nutzung eines Puffers, der geringe Mengen an Imidazol enthält, werden schwache und unspezifische Bindungen, durch z.B. Proteine mit geringer Histidinanzahl, unterbunden, sodass diese demnach in der Waschfraktion eluieren. Zur Elution des gewünschten Proteins wird die Kompetitorkonzentration stark erhöht. Dies kann entweder stufenweise oder in einem linearen Gradienten geschehen, wobei das Eluat in Fraktionen gesammelt wird.

Die HisTrap 1 mL HP- oder FF *crude*-Säulen von *GE Healthcare* eignen sich besonders für die Anwendung an automatisierten Pumpensystemen, da sie höhere Flussgeschwindigkeiten von bis zu 5 mL/min und Drücke mit maximal 0,3 MPa aushalten, ohne dass dies die Säulenpackung beeinträchtigt. Neben der Zeitersparnis durch die schnellen Flussgeschwindigkeiten bei automa-

tisierten Pumpensystem, sind weitere Vorteile die parallele Messung der UV-Absorption zur Detektion der Proteinelution zur Erstellung eines Chromatogramms, das automatisierte Mischen von mehr als einem Puffer, was die Nutzung von Gradienten ermöglicht und die automatisierte Fraktionierung der Eluate.

Die Aufreinigung von rekombinant in *E. coli* exprimierten Proteinen, wie die DARPin-Konstrukte und die bakteriellen FGEs, wurde mittels HisTrap am *Äkta Explorer* UPLC-System bei 4 °C durchgeführt und bei 280 nm Absorption detektiert. Dazu wurde das geerntete Bakterienpellet im jeweiligen Bindepuffer mit maximal 40 mL Volumen (Kapitel 3.9, **Tab. 11**), versetzt mit Protease-Inhibitoren, lysiert (Kapitel 4.2.7) und durch zweimalige Zentrifugation für jeweils 30 min bei 12000 rpm und Sterilfiltration mittels 0,42 µm Spitzenaufsatzfilter von unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Die 1 mL-HisTrap-Säule, gelagert auf 20% Ethanol, wurde mit mindestens fünf Säulenvolumina (5 CV) Wasser gewaschen, mit Bindepuffer äquilibriert (5 CV) mit Elutionspuffer gereinigt (5 CV) und mit Bindepuffer reäquilibriert (5 CV). Das geklärte Lysat wurde mittels 50 mL-*superloops* bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,8 mL/min auf die Säule geladen und der Durchfluss aufgefangen. Anschließend wurde für mindestens 15 CV mit dem Bindepuffer mit geringem Imidazolanteil (Puffer A) bei 1 mL/min gewaschen, die Waschfraktion ebenfalls aufgefangen und die Elution mit einem Gradienten an Elutionspuffer (Puffer B) von 0 auf 100% über einem Intervall von 20 CV und einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min vollzogen. Das Eluat wurde in 1 mL-Fraktionen gesammelt, um anschließend per Bradford-Proteinbestimmung und SDS-Gelelektrophorese zusammen mit Proben des Lysats (L), des Durchflusses (FT) und der Waschfraktion (W) analysiert zu werden. Die Säule wird anschließend mit weiterem Elutionspuffer gereinigt, mit Bindepuffer reäquilibriert und direkt wiederverwendet oder mit Wasser gewaschen und auf 20% Ethanol bei 4 °C gelagert.

4.4.3 HisBatch – Ni²⁺-NTA-Agarose

Im Gegensatz zur HisTrap wird im *batch*-Verfahren keine vorgepackte Säule mit Ni²⁺-NTA-Sepharose genutzt, durch die die Probe durchgeleitet wird, sondern entsprechende Agarose-Harzkügelchen werden mit der Probe für einen bestimmten Zeitraum unter ständiger Umwälzung inkubiert. Das Austauschen der Flüssigkeiten in den Äquilibrierungs-, Wasch- und Elutionsschritten wird entweder durch Pellettierung des Harzes mittels Zentrifugation, durch die Überführung in eine *gravity flow*-Säule, bei der ein Filter das Harz zurückhält, oder durch die Überführung in eine *spin*-Säule, bei der die Flüssigkeit durch Zentrifugation entfernt und das Harz ebenfalls durch einen Filter zurückgehalten wird, vorgenommen. Das Waschen und Eluieren wird schrittweise mit kleinen Volumina durchgeführt, die aufgefangen und mittels Bradfordreagenz auf die Anwesenheit von Protein untersucht werden.

Bei einer standardmäßigen HisBatch-Aufreinigung von rekombinantem Protein wurde das Lysat, wie bereits in Kapitel 4.4.2 beschrieben, mit Bindepuffer (Kapitel 3.9, **Tab. 11**) und Protease-Inhibitoren vorbereitet, wobei pro einem Volumen an Agarose-*beads* von ca. 1 mL, äquilibriert in Bindepuffer, das Volumen des Lysates 15 mL nicht überschreiten sollte. Die *batch*-Inkubation von Lysat und *beads* wurde bei 4 °C und Rotation für mindestens 1 h durchgeführt. Anschließend wurde der Überstand als Durchfluss gesammelt, das *batch* mit Bindepuffer mit geringen Mengen an Imidazol (10-50 mM) gewaschen und 10 µL der Waschfraktion mit 200 µL Bradfordreagenz vermischt. Dies wurde so lange wiederholt, bis kein Farbumschlag im Bradford-Nachweis zu beobachten war. Die Elution wurde durch schrittweise Erhöhung der Imidazolkonzentration (50-500 mM) vollzogen, indem Binde- und Elutionspuffer in verschiedenen Verhältnissen gemischt wurden. Das Volumen der Elutionsfraktionen betrug 1 mL. Mit der höchsten Konzentration wurde eluiert, bis wiederum kein Farbumschlag im Bradford-Nachweis zu beobachten war. Anschließend wurden Proben von Lysat, Durchfluss, Waschfraktionen und Elutionsfraktionen per SDS-PAGE analysiert. Das Harz kann gereinigt und bis zur Wiederverwendung in 20% Ethanol bei 4 °C gelagert werden.

4.4.4 MBPTrap – MBP-Affinitätschromatographie

Die MBP-Affinitätschromatographie beruht auf der Bindung des Maltose-bindenden Proteins (MBP) an immobilisierte Maltose und wurde bei einem maximalen Druck von 0,3 MPa an dem automatisierten UPLC-System *Äkta Explorer* bei 4 °C und 280 nm Absorption durchgeführt. Zur Aufreinigung von rekombinanten Proteinen kann MBP als Fusionsprotein genutzt werden. Freie Maltose als Kompetitor verdrängt den Bindepartner der Säulenmatrix vom MBP und sorgt demnach für die Elution des Fusionsproteins.

Zur Aufreinigung von Maltose-bindenden Proteinen mit Aldehyd-*tags*, wurde das Bakterienpellet mit maximal 40 mL Bindepuffer (Kapitel 3.9, **Tab. 11**), versetzt mit Protease-Inhibitoren, lysiert (Kapitel 4.2.7), zweimal für jeweils 30 min bei 12000 rpm zentrifugiert und sterilfiltriert. Die 1 mL-MBPTrap-Säule, gelagert auf 20% Ethanol, wurde mit jeweils 5 CV Wasser, Bindepuffer, Elutionspuffer und anschließend erneut mit Bindepuffer vorbereitet. Das geklärte Lysat wurde mittels 50 mL-*superloops* bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,8 mL/min auf die Säule geladen, der Durchfluss aufgefangen und die Säule mit 15 CV Bindepuffer (Puffer A) bei 1 mL/min gewaschen. Nach dem Auffangen der Waschfraktion wurde zur Elution 100% Elutionspuffer (Puffer B) über 10 CV eingesetzt und 1 mL-Fractionen aufgefangen, um anschließend per Bradford-Proteinbestimmung und SDS-Gelelektrophorese zusammen mit Proben des Lysats (L), des Durchflusses (FT) und der Waschfraktion (W) analysiert zu werden. Die Säule wurde

anschließend mit weiterem Elutionspuffer gereinigt, mit Bindepuffer reäquilibriert und direkt wiederverwendet oder mit Wasser gewaschen und auf 20% Ethanol bei 4 °C gelagert.

4.4.5 GSTrap – GST-Affinitätschromatographie

Die GSTrap funktioniert analog zur MBPTrap und ist eine Methode der Affinitätschromatographie von GST(Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteinen. Die Sepharose-Säulenmatrix ist mit dem Bindepartner Glutathion beladen, sodass GST-Fusionsproteine affin an die Säule binden und nur durch die kompetitive Bindung an freies Glutathion eluiert werden.

Zur Aufreinigung der PreScission-Protease wurde das entsprechende Fusionsprotein rekombinant hergestellt, die Bakterienkultur geerntet und im GST-Bindepuffer (Kapitel 3.9, **Tab. 11**) lysiert, zentrifugiert (zweimal 4 °C, 12000 rpm, 30 min) und sterilfiltriert. Da PreScission nicht zu den *consensus serine proteases* gehört, wird sie von den meisten Serin-Protease-Inhibitoren nicht inhibiert, sodass das Lysat mit kleinen Mengen des Protease-Inhibitor-Cocktails versetzt werden darf. Die 1 mL GSTrap FF-Säule wurde an der *Äkta Explorer* mit einem maximalen Druck von 0,3 MPa und einer maximalen Flussrate von 4 mL/min mit Wasser vom Ethanol gereinigt (5 CV), mit Bindepuffer äquilibriert (5 CV), mit Elutionspuffer gereinigt (5 CV) und mit Bindepuffer reäquilibriert (5 CV). Das Lysat (maximal 40 mL) wurde per *superloop* bei einer reduzierten Flussgeschwindigkeit von 0,2 mL/min beladen, da die GST-Glutathion-Bindung eine langsame Kinetik hat, wobei die Absorption bei 280 nm detektiert wurde. Der Durchfluss und die Waschfraktion mit PBS-Bindepuffer (Puffer A) von 15 CV wurde aufgefangen. Die Elution wurde mit Tris-Elutionspuffer (Puffer B) durchgeführt, der frisch mit 1 mM DTT versetzt wurde, um das Glutathion (10 mM) reduziert zu halten. Durch die Gradientenelution von Puffer B von 0 auf 100% über 10 CV wurden 1 mL-Fractionen gesammelt und mittels Bradford-Assay und SDS-PAGE analysiert. Der Tris-Elutionspuffer ermöglicht anschließend bereits ideale Pufferbedingungen zur Anwendung der Protease, welche mit 20% Glycerin bei -80 °C gelagert wurde. Die Säule wurde mit Bindepuffer, Wasser und 20% Ethanol gewaschen und bei 4 °C gelagert.

4.4.6 Protein A-Affinitätschromatographie

Bei der Aufreinigung von Antikörpern ist die Protein A-Chromatographie eine gängige Methode, die auf der Bindung des Proteins A an die schwere Kette der konstanten Regionen (Fc) von Immunglobulinen beruht. Das Protein A stammt ursprünglich aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus* und kann humanes IgG1 und IgG2 mit hoher und IgA, IgE und IgM mit mäßiger Affinität binden. Für andere Immunglobulin-Subklassen und Antikörper aus anderen Spezies können ne-

ben Protein A auch die analogen Antikörperbinder Protein G, Protein M, Protein L oder das Fusionsprotein A/G zur affinitätschromatographischen Reinigung genutzt werden.

Bei HiTrap ProteinA HP 1 mL-Säulen ist Protein A über N-Hydroxysuccinimid an die Sepharose-Matrix gekoppelt und toleriert eine Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min und einen Druck von 0,3 MPa. Zur Aufreinigung der *single-chain* Antikörperkonstrukte und ihrer Konjugate an der *Äkta Explorer* bei 4 °C wurden die Proben mindestens 1:1 mit Bindepuffer verdünnt, mit einem 0,42 µm Spitzenaufsatzfilter filtriert und je nach Probengröße mit einem 2-10 mL *loop* oder einem 50 mL-*superloop* auf die zuvor gereinigte und äquilibrierte Säule geladen. Die UV-Absorption wurde bei 280 nm detektiert. Gewaschen wurde mit 10 CV Puffer A und eluiert mit 5-10 CV Puffer B. Dabei wurden Bindepuffer auf Natriumphosphat-Basis mit pH 7,2 und Elutionspuffer auf Zitronensäure-Basis bei pH 3 verwendet (Kapitel 3.9, **Tab. 11**) und die Eluate zur sofortigen Neutralisation in 200 µL vorgelegtem Neutralisationspuffer (pH 9) à 1 mL fraktioniert. Das Protein A-Material wird jeweils nur für eine Sorte an Antikörper wiederverwendet, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

4.4.7 Protein A-Sepharose-Batch

Das *batch*-Verfahren der Protein A-Aufreinigung wurde zur Rückgewinnung kleiner Antikörpermengen zwischen den Schritten der Konjugationsreaktionen durchgeführt. Hierbei wurden 500 µL einer Protein A-Sepharose-Lösung aufgeschwemmt und in eine *spin*-Säule transferiert, welche in einem 2 mL-Auffanggefäß platziert wurde. Der Flüssigkeitsaustausch wurde mittels Zentrifugation für 1 min bei 6000 ×g durchgeführt. Die Protein A-*beads* wurden mit Bindepuffer äquilibriert und nach und nach mit jeweils 500 µL eines 1:1-Gemisches aus Antikörper-haltigen Reaktionsansätzen und Bindepuffer aufgeschwemmt, kurz bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert. Die Durchflüsse wurden noch ein weiteres Mal auf die *spin*-Säule geladen und anschließend vereint gesammelt, bis der komplette Reaktionsansatz von maximal 2 mL verarbeitet wurde. Anschließend wurde zweimal mit 500 µL Bindepuffer gewaschen und zweimal mit je 200 µL Elutionspuffer eluiert, wobei die Elutionen getrennt gesammelt und 10 µL einer 1:10-Verdünnung mittels Bradfordreagenz auf Anwesenheit von Proteinen hin untersucht wurde. Dies wurde wiederholt, bis kein Protein mehr eluierte. Anschließend wurden die Eluate vereinigt und mit Neutralisationspuffer versetzt oder mit dem Puffer der Folgeanwendung auf den dafür jeweils notwendigen pH-Wert eingestellt.

Alternativ konnten Konjugations- oder Konversionsschritte auch am gebundenen Antikörper direkt in der Protein A-*spin*-Säule durchgeführt werden. Dazu wurde nach dem Binden und Waschen des Reaktionsansatzes auf die Elution verzichtet und die *beads* wurden stattdessen im Reaktionspuffer der Folgeanwendung aufgeschwemmt, mit den entsprechenden Reagenzien versetzt,

inkubiert und anschließend wieder gewaschen. Am Ende der Reaktionskette wurden die Konjugate wie oben beschrieben eluiert und der pH-Wert neutralisiert.

4.4.8 Bradford-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Bradford-Assay dient der Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration einer Probe und basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie an basische und aromatische Aminosäuren. Durch die Proteinbindung wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes verschoben, wodurch es zu einem Farbumschlag von braun zu blau kommt. Da die Absorption in einem geringen Konzentrationsbereich von 0-1000 $\mu\text{g/mL}$ linear proportional zur Proteinkonzentration ist, kann durch eine Standardreihe bekannter Konzentrationen eine Regressionsgerade ermittelt werden, die der Berechnung der Proteinkonzentration einer unbekanntem Lösung dient.

Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin (BSA; 0, 25, 125, 250, 500, 750 und 1000 $\mu\text{g/mL}$) vermessen, indem je 10 μL Probe in einer Doppelbestimmung mit je 200 μL Bradfordreagenz vermischt und die Absorption nach 5 min Inkubation in einer 96-well-Platte im *Multiwell Plate Reader Tecan* vermessen wurde. Zur Messung wurde die Platte 10 s geschüttelt und die Absorption bei einer Wellenlänge $\lambda = 595 \text{ nm}$ mit 25 Lichtblitzen pro Vertiefung detektiert. Proben unbekannter Konzentration wurden ebenfalls in Doppelbestimmungen unverdünnt und in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt. Als Leerwert dienten Wasser bzw. der vorliegende Probenpuffer.

4.4.9 SEC – Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*) ist eine Flüssig-Fest-Chromatographie, genauer eine Gelfiltrationstechnik, bei der die Porengröße des verwendeten Gels das Laufverhalten der analysierten Moleküle in der flüssigen Phase beeinflusst. Kleine Moleküle können besser in die Poren des Gels diffundieren als große und legen daher eine weitere Strecke zurück und passieren die Säule mit einer höheren Laufzeit. Die Moleküle werden dementsprechend ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei sie in abnehmender Größe eluieren. Je kleiner die Porengröße des verwendeten Gelmaterials, desto besser werden Moleküle kleineren Molekulargewichts aufgetrennt. Eine SEC dient nicht nur der Reinigung im präparativen Maßstab, sondern kann im analytischen Maßstab auch der Analyse von Makromolekülen dienen. Der Logarithmus des Molekulargewichts von bekannten Standardsubstanzen, aufgetragen gegen den Quotienten aus ihrem jeweiligen Elutionsvolumen und dem Ausschlussvolumen der Säule, ergibt einen linearen Zusammenhang, anhand dessen die Größe einer unbekanntem Substanz unter gleichen Bedingungen errechnet werden kann. Das Ausschlussvolumen, wird durch ein Makromole-

kül ermittelt, das weit größer als die Trennleistung der Säule ist. Dies ist im Allgemeinen häufig Dextranblau ($M_w=2000$ kDa). Diese Moleküle können gar nicht in die Zwischenräume der festen Phase eindringen und wandern mit der mobilen Phase am Gel vorbei schnell durch die Säule. Da die Größenausschlusschromatographie in der Regel mit nativen Proteinen durchgeführt wird, wird die ermittelte Größe nicht ausschließlich durch das Molekulargewicht des Proteins, sondern auch durch seine räumliche Struktur und seinem hydrodynamischen Radius bestimmt. Dementsprechend würde ein idealerweise kugelförmiges Protein später eluieren als ein Protein gleichen Molekulargewichts, aber mit ausladenden, dreidimensionalen Strukturmerkmalen, die ein Eindringen in kleine Poren verhindern. Durch den Vergleich Chromatographieläufen in reduzierenden und nicht-reduzierenden Pufferbedingungen und durch den Vergleich zwischen SEC und SDS-PAGE, lassen sich Rückschlüsse auf ggf. die Zusammensetzung aus Untereinheiten und den Einfluss von Pufferzusätzen auf die Struktur von Makromolekülen ziehen.

Für eine native Größenausschlusschromatographie wurde an der *Äkta Ettan* die *Superdex 200 Increase 10/300 GL* von *GE Healthcare* in einem Phosphatpuffer verwendet, welche eine optimale Trennleistung im Bereich von 10-600 kDa für Proteine und 1-100 kDa für Dextrane aufweist. Diese Säule besteht aus einer speziellen Agarose-Dextran-Matrix, die einem Druck von bis zu 4 MPa und Flussgeschwindigkeiten von maximal 1.8 mL/min standhält. Es wurden Proben volumina von bis zu 500 μ L bei einer Standardflussgeschwindigkeit von 0,75 mL/min bei RT eingesetzt. In **Tab. 22** sind die verwendeten Standardsubstanzen und ihr Molekulargewicht angegeben.

Tab. 22: Standardsubstanzen für die Größenausschlusschromatographie.

Standardsubstanz	M_w /kDa
Dextranblau	2000
Ferritin	444
BSA	67
Ovalbumin	45
Cytochrom c	12,5
Aprotinin	6,5

4.4.10 PD10 – Entsalzung und Umpufferung

Eine Entsalzung oder Umpufferung gelingt mittels 8 mL PD10-Säulen (PD Miditrap G-25) im so genannten *gravity flow*-Verfahren. Alternativ können auch *spin*-Säulen (PD SpinTrap) oder Säulen zur Anwendung an Pumpensystemen (*HiTrap Desalting*) genutzt werden. Das Sephadex-Material besteht aus kreuzverzweigten Dextranen mit der mittleren Körnung von 25 μ m und reduziert dadurch die Laufgeschwindigkeit von Molekülen mit zunehmender Größe. Der Lagerpuffer der PD10 Miditrap-Säule tropft allein durch Gravitation aus der Säule heraus, die Säulenfüll-

lung bleibt, umschlossen von zwei Filtern mit der Porengröße 0,42 μm , in der Säule zurück und wird mit dem Zielpuffersystem äquilibriert, indem mit mindestens 10 mL Puffer gewaschen wird. Anschließend kann die abzentrifugierte Proteinlösung, meist rekombinantes Protein zuvor angereichert über Affinitätschromatographie, mit einem maximalen Volumen 2,5 mL pro Probe auf die Säule aufgetragen werden. Der Durchfluss enthält niedrigmolekulare Substanzen aus dem Startmaterial, wie z.B. Salze und Imidazol, welche schnell mit dem Puffer durch die Säule wandern. Die Proteine werden retardiert und wandern mit dem darauffolgenden Zielpuffer durch die Säule. Die Elution im Zielpuffer, ca. 3,5 mL, wurde in 0,8-1 mL-Fractionen aufgefangen und die Protein-beihaltenden Fractionen wurden mittels Bradford-Proteinbestimmung identifiziert.

4.4.11 Proteolytische Spaltung

Viele Vektoren ermöglichen die Expression von Fusionsproteinen mit Affinitäts-*tags*, so auch einige pET-Vektoren (Kapitel 3.12 und 8.5), die eine N- oder C-terminale His₆-*tag*-Sequenz tragen. Um diesen eventuell für die spätere Anwendung störenden Affinitäts-*tag* wieder zu entfernen und im Falle von ScFGE das Risiko einer Präzipitation zu verringern, lassen sich diese Sequenzen häufig mit einer dazwischenliegenden Erkennungssequenz für Proteasen entfernen. Dies sind im erwähnten pET-System meist Thrombin- bzw. Faktor Xa-Spaltstellen und im Fall vom umklonierten pET14b_ScFGE-Plasmid befindet sich zusätzlich eine PreScission(PP)-Spaltstelle zwischen dem His-*tag* und der Enzymsequenz. Dazu wird die Proteinlösung in einem Verhältnis von ca. 100:1 mit der GST-getagten PreScission-Protease versetzt und über Nacht bei 4-22 °C inkubiert. Hierbei sollte der pH-Wert zwischen 7,0 und 8,5 liegen. Da die Spaltung durch Proteasen in der Regel direkt nach der ersten Affinitätschromatographie des rekombinant hergestellten Fusionsproteins stattfindet, kann diese daher besonders gut mit einer Umpufferung mittels Dialyse verbunden werden, indem die Protein-Protease-Mischung in einem semi-permeablen Dialyseschlauch mit passendem *molecular weight cut-off* (MWCO; für ScFGE 14 oder 20 kDa) gefüllt, fest verschlossen und über Nacht bei 4 °C in mindestens 200fach größeren Volumen des Zielpuffers unter langsamer Umwälzung inkubiert wird. Die Protease kann nach Bedarf anschließend durch eine Rechromatographie mittels GSTrap abgereinigt werden.

Bei einer proteolytischen Spaltung der Thrombinspaltstelle kann 1 Unit Enzym ca. 100 μg Protein in 16 h bei 22 °C spalten. Dabei sind die optimalen Pufferbedingungen ein Tris-Puffer bei pH 6,5. Nachteilig für eine Proteolyse durch Faktor Xa sind Pufferbedingungen von mehr als 100 mM Imidazol oder DTT, weshalb bei Eluaten von Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographien die Dialyse oder Umpufferung vor der Spaltung stattfinden sollte. Die Spaltungsreaktion kann durch 1 mM PMSF gestoppt werden.

4.4.12 Ultrakonzentration

Bei der Ultrakonzentration werden Konzentratoren, bestehend aus einem *spin*-Behälter (15 oder 50 mL-*tube*) und einem Einsatz mit zwei Membranen, mit einer Proteinlösung befüllt und zentrifugiert. Die Lösung und alle Substanzen, die kleiner als der MWCO-Wert der Membranen sind, fließen durch den Einsatz und werden im unteren Teil des Gefäßes aufgefangen. Die Proteine dagegen werden entsprechend ihrer Größe zu mehr als 90% zurückgehalten und liegen demnach in einem verringerten Volumen vor. Dadurch wird die Proteinkonzentration erhöht. Durch wiederholtes Auffüllen und Einengen im Zielpuffer können Proteinproben umgepuffert werden. Um eine Kontamination der Lösung und eine zu hohe Adsorption des Proteins an der Membran zu verhindern, werden die Ultrakonzentratoren vor und nach jedem Gebrauch mit dem entsprechenden Puffer und Wasser äquilibriert und gereinigt. Ultrakonzentratoren in 15 mL-*tubes* (VivaSpin, Sartorius) lassen sich mit ca. 4 mL Flüssigkeit befüllen, wobei 50 mL-Konzentratoren (Amicon Ultra, Merck) ca. 15 mL Probenvolumen fassen. Die Zentrifugation fand in einem Ausschwingrotor bei maximal $4000 \times g$ und in einem Festwinkelrotor bei maximal $5000 \times g$ statt, wobei die Zentrifugationszeiten abhängig vom eingesetzten Volumen und dem Grad der gewünschten Einengung zwischen 5 und 30 min pro Durchgang betragen. Die Konzentratoren wurden stets nur für eine Proteinsorte wiederverwendet und in 20% Ethanol bei 4°C gelagert.

4.4.13 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Fest-Flüssig-Gelelektrophorese, bei der Proteine in der mobilen Phase in einem elektrischen Feld durch die Poren eines Gels wandern und ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Das Tensid SDS (Sodiumdodecylsulfat) in der mobilen Phase dient der Umhüllung der Proteine. Die negativen Ladungen der Tensidmoleküle überlagern die Eigenladung des Proteins, wodurch alle Proteine ungeachtet ihrer Nettoladung im elektrischen Feld zur Anode wandern. In einer SDS-PAGE werden denaturierte Proteine analysiert, d.h. ihre Laufgeschwindigkeit hängt von ihrer Größe, nicht jedoch von ihrer dreidimensionalen Struktur ab. Um dies zu erzielen, werden die Proteine durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol und das Aufkochen für 5 min bei 95°C denaturiert und die Disulfidbrücken werden reduziert. Darüber hinaus werden die Polypeptidketten durch die Abstoßung der Ladungen benachbarter SDS-Moleküle gestreckt. Neben der reduzierenden SDS-PAGE kann auch eine nicht-reduzierende SDS-PAGE durchgeführt werden, bei der die Disulfidbrücken intakt bleiben. Dies kann Aufschluss über die Proteinzusammensetzung aus Untereinheiten geben.

Das feste Trägermaterial der SDS-PAGE besteht aus einem Polyacrylamidgel, welches mit N, N'-Methylenbisacrylsäureamid (Bisacrylamid) quervernetzt wurde, indem die Polymerisation radikalisch durch den Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) und dem Katalysator N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) ausgelöst wurde. Das Verhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt die Prozentigkeit, also den Verzweigungsgrad des Gels und damit die Porengröße. Kleine Proteine werden vom Gel weniger zurückgehalten, da sie leicht in die Poren eindringen können. Sie wandern im Gegensatz zu den großen Proteinen, die vom Polyacrylamidnetzwerk gebremst werden, schneller durch das Gel. Je kleiner die Porengröße ist, desto besser ist die Auftrennung im geringeren Molekulargewichtsbereich. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden zwei Gele verschiedener Porengröße und mit verschiedenen pH-Werten genutzt. Das untere Trenngel von 8,5-15% wird aus einem Trispuffer mit pH 8,8 hergestellt. Darüber wird das Sammelgel geschichtet, welches eine Prozentigkeit von 4% und einen pH-Wert von 6,8 aufweist. Die Zusammensetzung des Sammelgels und der verschiedenen Trenngele von kleinen *BioRad*-Gelsystemen ist in **Tab. 23** gegeben.

Die Proteine werden mit 4x Lämmli-puffer versetzt, erhitzt und in die vorgeformten Taschen des Sammelgels geladen. Das Glycerin im Lämmli-puffer sorgt für eine erhöhte Dichte, der Trispuffer sorgt für einen dem Sammelgel identischen pH-Wert und das Bromphenolblau färbt die Probe zur leichteren Handhabung an, wodurch sich das Ende der Gelelektrophorese durch das Austreten der blauen Lauffront ablesen lässt. Durch Anlegen eines Stromes von zunächst ca. 10 mA und anschließend 20-30 mA am Pufferreservoir, wandern die Proben durch das Sammelgel, wobei sie durch die geringe Verzweigung des Gels noch nicht aufgetrennt werden. Das Sammelgel dient der Fokussierung der Proben, um einen definierten Trennungsstart und somit präzisere Proteinbanden erzielen zu können. Der Fokussierungseffekt wird durch die Begleitionen ausgeübt. Chloridionen mit einer im Vergleich zu ihrer Größe sehr hohen negativen Ladungsdichte wandern schnell voran, gefolgt von den mit SDS-umhüllten Proteinen. Glycinat-Ionen sind bei pH 6,8 schwach geladen und wandern als Folgeionen hinterher. Die Proteine werden an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel gestaucht. Hier kommt es zu einem pH-Sprung infolgedessen die Glycinat-Ionen deprotoniert werden und die Proteine überholen. Durch die verringerte Porengröße kommt es nun zu einer Auftrennung der Proteinproben. Zur Molekulargewichtsbestimmung wird zudem ein Größenstandard aus Proteinen verschiedenen Molekulargewichts mit aufgetragen, dessen Laufweiten als Vergleich dienen. Das fertige Gel kann einer Coomassie-Färbung zur Detektion aller Proteine unterzogen werden. Zur Detektion bestimmter Proteinbanden wird das SDS-PAGE-Gel zum Western Blot eingesetzt.

Tab. 23: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele. Angegeben sind die Volumina der Substanzen und Lösungen für ein Sammelgel (4%) und ein Trenngel von entweder 10%, 12,5% oder 15%.

Reagenz	Sammelgel 4%	Trenngel 10%	Trenngel 12,5%	Trenngel 15%
Rotiphoresegel 30 (Acrylamid und Bisacrylamid 37,5:1)	0,83 mL	3 mL	3,75 mL	4,5 mL
0,8 M Tris pH 6,8	0,5 mL	-	-	-
1,875 M Tris pH 8,8	-	1,8 mL	1,8 mL	1,8 mL
dH ₂ O	3,6 mL	4 mL	3,25 mL	2,6 mL
SDS 10%	50 µL	90 µL	90 µL	90 µL
TEMED	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
APS 10%	25 µL	50 µL	50 µL	50 µL

Fluoreszenzdetektion

Fluoreszenz-markierte Proteine, z.B. durch die Konjugation mit HIPS-Carboxyfluorescein (HIPS-CF), können mit dem entsprechenden Wellenlängefilter an der CCD-Kamera detektiert werden, solange die Proteine noch nicht angefärbt wurden. Zum Schutz der empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffe wird die Elektrophorese im Dunkeln vollführt, das Gel zweimal je 5-10 min mit destilliertem Wasser gewaschen und auf der schwarzen Trägerplatte zur Detektion in die CCD-Kamera gelegt. Anschließend kann eine Proteinfärbung durch Coomassie vorgenommen werden.

Färbung mittels Coomassie oder *Blue Silver* Coomassie

Um die Proteine im Gel einer SDS-PAGE sichtbar zu machen, wurde das Gel nach Ende der elektrophoretischen Trennung zweimal mit Wasser gewaschen und für die Färbung mit *Blue Silver* Coomassie (Kapitel 3.9 **Tab. 11**) zunächst für 30 min mit einer Ethanol-haltigen Fixierlösung auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Die Fixierlösung wurde mit Wasser gewaschen und durch eine frisch angesetzte Färbelösung ersetzt. Diese setzt sich aus der *Blue Silver* Coomassie-Lösung und 20% Methanol zusammen, dass unter Rühren eingetropfelt wurde, um eine kolloidale Mischung zu erzeugen. Die Färbung wurde mindestens für 8 h vollzogen. Dabei dringt der Coomassie-Brilliant-Blau-Farbstoff in das Gel ein und bindet an aromatische und basische Aminosäuren der Proteine. Anschließend wurde ungebundener Farbstoff durch mehrmalige Inkubation mit Methanol- und Essigsäure-haltigem Entfärbemittel entfernt, das Gel in Wasser gewaschen und auf der Milchglas-Trägerplatte der CCD-Kamera (*charge coupled device*) im Durchlichtmodus (DIA) fotografiert. Die Färbung mittels nicht-kolloidalem Coomassie wurde analog durchgeführt, wobei die Coomassie-Färbelösung keine vorherige Fixierung benötigt. Die nicht-kolloidale Färbung färbt Proteine schneller, erzeugt allerdings einen höheren Hintergrund an unspezifischer Blaufärbung, die durch eine verlängerte Entfärbung entfernt werden muss. Die Sensitivität beider Färbemethoden ist vergleichbar.

4.4.14 Western Blot im *Semi-Dry*-Verfahren

Das Western Blot-Verfahren beschreibt die Übertragung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus einem Gel auf eine Membran, wo die Detektion bestimmter Proteine mittels spezifischer Antikörper stattfinden kann. Die Übertragung von Gel auf Membran geschieht durch Anlegen eines Stroms, in dessen elektrischen Feld die negativ mit SDS-beladenen Proteine zur Anode wandern und dabei die Membran passieren. Im *Semi-Dry*-Verfahren werden die Membran, saugfähige Papiere, sogenannte Whatman-Papiere, und das Gel vorher in Puffer getränkt aber ohne ein Pufferreservoir übertragen. Häufig verwendete Membranen zur Proteinbindung sind PVDF (Polyvinylidenfluorid) und Nitrozellulose. Je nach Membran werden zur Proteinübertragung Methanol-haltige oder -freie Puffer eingesetzt. Nach Beendigung des Blottens werden freie Bindestellen der Membran durch eine Blotto-Lösung abgesättigt, die BSA (bovines Serumalbumin) oder Milchpulver enthält. Anschließend kann die Immundetektion mittels Antikörper stattfinden.

Im hier verwendeten *Semi-Dry*-Verfahren mittels PVDF-Membran wurden zwei Puffersysteme genutzt, durch die die Wanderungsbereitschaft und -richtung der Proteine verstärkt werden soll. Eine Lage Membran von der Größe des SDS-Gels wurde für maximal 2 min durch ein Methanolbad aktiviert und anschließend mit einer Lage Whatman-Papier derselben Größe für ca. 10 min im methanolhaltigen Anodenpuffer (Kapitel 3.9, **Tab. 11**) inkubiert. Das Gel und ein weiteres Whatman-Papier wurden dagegen in Kathodenpuffer inkubiert. In einer Western Blot-Kammer mit zwei Graphitelektroden wurden das Kathoden-Whatman-Papier, danach das Gel, anschließend die Membran und schließlich das Anoden-Whatman-Papier auf der Kathode gestapelt und die Luftblasen ausgestrichen. Anschließend wurde die Anode als Deckel aufgelegt und ein Strom entsprechend der Membrangröße (1 mA/cm^2) für 1 h und 10 min angelegt. Die Membran wurde mit der proteinbeladenen Seite nach oben auf einem Orbitalschüttler für 1 h bei RT mit einer 5%igen Blotto-Lösung (5% Milchpulver in PBST) blockiert. Zuvor kann der Proteinstandard (vorgefärbter Marker) mit einem Stift übertragen oder die Anwesenheit aller Proteine mit dem Ponceau S-Reagenz dokumentiert werden. Dazu wurde die Membran noch vor dem Blockieren kurz in Wasser gewaschen und mit einigen Millilitern Ponceau-Lösung für 5-10 min inkubiert, das Reagenz verworfen und ein Foto der rot eingefärbten Proteinbanden aufgenommen. Anschließend wurde die Membran mit Wasser gewaschen und wie zuvor beschrieben mit Blotto blockiert.

4.4.15 Immundetektion von Western Blots und verstärkte Chemilumineszenz

Bei der Immundetektion von spezifischen Proteinbanden im Western Blot-Verfahren werden zwei Typen von Antikörpern verwendet. Der Erstantikörper bindet sein Epitop, das gesuchte Protein, auf der mit Blotto abgesättigten PVDF-Membran. Der Zweitantikörper ist ein Fusionsprotein aus einem Reporterenzym und einem Antikörper, der die konstante Region (Fc-Teil) des Erstantikörpers bindet. Die *horse raddish peroxidase* (HRP; Meerrettichperoxidase) als Reporterenzym katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid der ECL-Lösung (*enhanced chemiluminescence*), welches für die Oxidation des Reagenzes Luminol verantwortlich ist. Wird das Dianion des Luminols oxidiert entsteht zunächst ein angeregter Zustand, der durch die Freisetzung von Licht in seinen Grundzustand überführt wird. Da die Proteinbanden auf der Western Blot-Membran von mehreren Erstantikörpern und diese wiederum von mehreren Zweitantikörpern gebunden werden können, wird das so entstehende Chemilumineszenzsignal über eine Detektionsgrenze hinweg verstärkt und kann mittels einer CCD-Kamera detektiert werden. Neben dem System aus Erst- und Zweitantikörper kann auch ein einziger Antikörper eingesetzt werden, der sowohl das Epitop spezifisch bindet als auch als Fusionsprotein mit der Peroxidase vorliegt (z.B. *Rabbit-anti-HA-POD*). Vorteil ist, dass nur einer der recht kostspieligen Antikörper benötigt wird. Nachteilig hingegen ist, dass aufgrund der fehlenden Ebene der Verstärkung durch die Bindung vieler Zweitantikörper eine hohe Menge des Direktkonjugates eingesetzt werden muss und dass für jedes Epitop ein Antikörper geschaffen werden muss, der nicht nur spezifisch ist, sondern auch als Fusionsprotein hergestellt werden muss. Daher ist die Nutzung von Zweitantikörpern, die gegen den Fc-Teil nahezu aller Immunglobuline einer Spezies gerichtet sind, weit aus verbreiteter.

Die Membran des Western Blots wird, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, mit einer 5% Blottolösung abgesättigt, damit die Bindung der Antikörper allein auf der Spezifität zum Antigen beruht. Der Erstantikörper wird ebenfalls in 5% Blotto dazugegeben, wobei Verdünnungen für gängige Antikörper aus Maus, Ratte oder Kaninchen in **Tab. 5** (Kapitel 3.5) aufgelistet sind. Nach der Inkubation bei RT für 3 h oder bei 4 °C über Nacht auf einem Orbitalschüttler wurde die Membran dreimal mit Tween-haltigem PBS-Puffer (PBST) gewaschen und für 1 h bei RT mit dem Zweitantikörper (meist 1:10000) in Blotto inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen kann der Blot mit der ECL-Lösung behandelt werden. Dazu wurde die Membran mit der proteinbeladenen Seite nach oben in eine klare Folie gelegt, eine 1:1-Lösung aus ECL-A und ECL-B (*Pierce ECL Western Blotting Substrat*) angesetzt, gleichmäßig auf der Membran verteilt und die Folie Luftblasenfrei verschlossen. Die sofort startende Chemilumineszenzreaktion wurde mittels CCD-Kamera auf dem schwarzen Träger mittels Chemilumineszenz-Methode detektiert,

wobei das Signal alle 10 s addiert wurde. Neben den ECL-Reagenzien von *Pierce (Thermo Scientific)* wurde ebenfalls eine eigens hergestellte ECL-Mischung verwendet. Bei dieser Variante mussten 100 μL ECL-B mit 900 μL ECL-A und 4 μL H_2O_2 vermischt werden (Kapitel 3.9, **Tab. 11**). Zur Verstärkung schwacher Signale konnten sowohl die hergestellte als auch die kommerziell erhältliche ECL-Lösung in einem Verhältnis von 1:10 mit einer 1:1-Mischung der ECL-A- und -B-Reagenzien des Verstärkers *SuperSignal West Dura Chemilumineszenz-Substrats (Thermo Scientific)* versetzt und die Chemilumineszenz erneut detektiert werden. Nach dem Speichern und Bearbeiten des Bildes (*AIDA* und *Multi-Gauge Software*) wurde im EPI-Modus ein Auflichtfoto von der Membran samt Markermarkierungen getätigt.

4.4.16 Deglykosylierung mittels PNGase F

Das Enzym Peptid-N-Glykosidase F ist eine Amidase, die N-verlinkte Oligosaccharide von Peptidketten abspaltet. Sie greift die Bindung von N-Acetylglucosaminen und der Aminosäure Asparagin an, wobei eine 1-3-Fucose am ersten Zucker inhibierend wirkt. Die Deglykosylierung von rekombinanten Proteinen, wie dem Sc2-Antikörper und seiner Konjugate, wurde angewendet, um in der darauffolgenden Analytik ein homogenes Produkt zu erhalten, dessen Masse nicht vom Glykosylierungsgrad abhängig ist. PNGase F kann in einem denaturierendem oder nicht-denaturierendem Protokoll eingesetzt werden, wobei die Denaturierung den Vorteil hat, dass Glykane, welche nicht lösungsmittlexponiert sind, besser zugänglich werden. Die Denaturierung findet in einem SDS- und ggf. Reduktionsmittel-haltigem Puffer für 10 min bei mindestens 95 °C statt. Der pH-Wert musste für die nachfolgende enzymatische Umsetzung zwischen 7 und 9 liegen. Um eine Inaktivierung der PNGase F zu verhindern, wurde sie erst nach dem Abkühlen der Glykoproteinlösung und in Gegenwart von NP-40-haltigem Puffer hinzugefügt, da SDS das Enzym inhibiert. 1 Unit PNGase F (10 U/ μL) wurden für 0,1 mg Protein eingesetzt und 1 h bei 37 °C oder über Nacht inkubiert. Das deglykosylierte Protein konnte im Anschluss für die ESI-MS-Messung vorbereitet werden (Kapitel 4.4.19). Im nativen Ansatz wurde die Denaturierung übersprungen, in einer Pufferbedingung von pH 7-9 die 2- bis 5-fache Menge Enzym eingesetzt und 4 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Produkt wurde für eine native Größenauschlusschromatographie eingesetzt.

4.4.17 Tryptische Proteinfragmentierung

Um Proteine massenspektrometrisch detailliert analysieren zu können, werden sie durch Peptidasen in kleinere Peptide zerteilt, was die Ionisierbarkeit und damit die Detektierbarkeit in einer MALDI-ToF-MS-Anwendung (Kapitel 4.4.19) erhöht. Gängige Enzyme sind Trypsin, wel-

ches die Peptidbindung C-terminal nach Arginin- und Lysinresten angreift, und Pepsin, was bevorzugt N-terminal vor Phenylalaninen spaltet. Durch die Verwendung bestimmter Endopeptidasen entstehen folglich sequenzspezifische Fragmentmuster, welche durch bioinformatische Programme wie *PeptideMass* von *ExpASY* vorhergesagt werden. Zur Identifikation der Ausgangsproteine müssen die dazugehörigen Fragmentmassen im Massenspektrum detektiert werden. Auch die verwendete Erkennungssequenz des Formylglycin-generierenden Enzyms besitzt ein Arginin in der +4-Position vom Cysteinsubstrat. Für den Nachweis der Präsenz eines Formylglycins anstelle eines Cysteins in den FGE-Erkennungssequenzen, wird demnach die Massenverschiebung von -18 Da des tryptischen Peptidfragmentes detektiert, das die Erkennungssequenz beinhaltet. Ein tryptischer Proteinverdau wurde entweder direkt in Lösung oder nach gelelektrophoretischer Trennung im Gel durchgeführt.

Tryptischer Verdau in Lösung

Der tryptische Verdau von Proteinen in Lösung fand in Tris- oder 50 mM Ammoniumdicarbonat-Puffer für mindestens 3 h bei 37 °C oder über Nacht bei 30 °C statt. Zur Fixierung freier Thiolgruppen wurden diese durch die Verwendung von 10 mM Iodacetimid alkyliert. Zur Reduktion von Disulfiden hingegen wurde ca. 5-10 mM DTT eingesetzt. Zu einem Probenvolumen von 30 µL wurde 0,1 µL Trypsin (0,5 µM; MS-rein) dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Zur verbesserten Zugänglichkeit stark gefalteter Proteinareale kann dem Hinzufügen des Trypsins auch eine kurze Denaturierung (95 °C, 5 min) vorangestellt werden. Die Trypsinierung kann mit einer finalen TFA-Konzentration von 1% abgestoppt werden. Je 0,5 µL der verdauten Probe wurde entweder direkt mit 0,5 µL der entsprechenden Matrix (CICCA oder HLCCA) kokristallisiert oder zunächst von Salzen durch ZipTip-Verfahren befreit (Kapitel 4.4.18).

Tryptischer Verdau im Gel

Zur Analyse von Proteinbanden aus Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gelen wurden die Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten, zerkleinert und in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Zum Entfärben wurden die Gelstücke mehrmals mit einer Lösung aus Wasser und Acetonitril (1:1) überschichtet und bei 30 °C inkubiert. Die Überstände wurden verworfen die Gelstücke mit einer 1:1-Mischung aus Acetonitril und 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung bei pH 8 für 30 min bei 30 °C inkubiert und an der *SpeedVac* vakuumgetrocknet. Anschließend haben sich die Gelstücke mit 200 µL einer Lösung aus 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat und ca. 1 µL Trypsin (0,5 µM; MS-rein) über Nacht bei 37 °C vollgesogen, wodurch Trypsin ins Gel gelangen und dort die Proteine spalten konnte. Sollten die Cysteine der analysierten Probe dabei reduziert vorliegen, wurden zusätzlich 5-100 mM DTT hinzugefügt. Nach erneuter Behandlung durch 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat (+ ggf. 5-10 mM DTT) für 1 h bei 30 °C wurde die Probe

mit ca. 30 μL TA50 (50% Acetonitril in 0,1% TFA) aus dem Gel gelöst, sodass anschließend eine 1 μL -Probe mit der MALDI-Matrix kokristallisiert werden konnte.

4.4.18 C18-Peptidanreicherung mittels ZipTip-Verfahren

C18-Material besteht aus Octyldecylsalin, einem Silica-Säulenmaterial mit Kohlenwasserstoffketten aus 18 C-Atomen, welche besonders viel Oberfläche für eine Interaktion zu z.B. Aminosäuren bieten. Geringe Mengen an Peptiden und kurzen Peptidfragmenten, die zur Massenspektrometrie eingesetzt werden sollen, werden durch die Bindung an C18-Material aufgereinigt und angereichert. Die Peptide aus einem tryptischen Verdau liegen in wässriger Lösung vor und werden durch das mehrmalige Auf- und Abpipettieren mit einer mit C18-Material gefüllten ZipTip-Mikroliterpipettenspitze gebunden, die zunächst mit dem Bindepuffer TA0, also 0,1% TFA (Trifluoressigsäure), äquilibriert wurde. Anschließend werden störende Salze durch das mehrmalige Pipettieren von TA0 entfernt. Ein erhöhter polarer Lösungsmittelanteil führt zur Elution des Peptides. Eluiert wird daher durch das Auf- und Abpipettieren in 10 μL einer in einem *safe lock tube* (Eppendorf) vorgelegten Lösung aus 0,1% TFA und 50% Acetonitril (TA50). Die TA50-Lösung erlaubt eine direkte Anwendung dieser Proben zur Kokristallisation mit MALDI-Matrizes, da die Substanzen während der Ionisierung nicht stören und der organische Lösemittelanteil schnell verdampft.

4.4.19 Massenspektrometrie

MALDI-ToF-MS-Messung

Bei dem *Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation*-Verfahren (MALDI) handelt es sich um eine Technik der Massenspektrometrie (MS) zur Analyse von Makromolekülen, die selbst durch eine Lasereinwirkung nur schwer zu ionisieren sind oder zu stark unkontrolliert fragmentieren würden, was die Interpretation der Daten erschwert. Der Analyt wird stattdessen mit einer Matrix kokristallisiert, welche die Energie des Lasers absorbieren kann, was anschließend zu einem Zersplittern des Kristalls führt (*desorption*), bei dem die Makromoleküle in das Vakuum des Massenspektrometers geschleudert werden. Infolgedessen ionisieren die Moleküle und fliegen im Massenspektrometer entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell zum Ionendetektor. Die Flugzeitanalyse (*Time of Flight*, ToF) ist sowohl von der Masse (m) als auch der Ladung dieser Ionenspezies (z), welche häufig vom Typ $[\text{M}+\text{H}^+]$, $[\text{M}+\text{Na}^+]$ oder $[\text{M}+\text{K}^+]$ sind, abhängig. Durch die Analyse der relativen Intensitäten von tryptischen Protein-Fragmentsignalen lässt sich neben der Identität des Proteins mittels MALDI-ToF-MS auch die Verteilung von Cystein- zu FGly-haltigen Fragmenten einer Peptidspezies vergleichen, was Aufschluss über den Umsatz

durch das Formylglycin-generierenden Enzym zulässt. Die Oxidation eines Cysteins zu einem Formylglycin führt zu einer Massenreduktion von 18 Da. Dafür wurde der jeweilige Analyt mit Trypsin fragmentiert (Kapitel 4.4.17), ggf. mittels ZipTip-Verfahren aufgereinigt (Kapitel 4.4.18) und mit einer CICC-Matrix kokristallisiert. Auf einer MTP 384 *polished steel* MALDI *target*-Platte wurden jeweils maximal 0,5 µL der Probe mit 0,5 µL einer Matrix-Aceton-Lösung vermischt und getrocknet. Zudem wurde eine Standard-Peptidmischung mit aufgetragen, welche aus Peptiden bekannter Größe besteht und dessen Signale zur Kalibrierung der Messung dienen (Kapitel 3.8, **Tab. 9**). Die Messung fand an einem *UltraFlexTreme* MALDI-ToF-Massenspektrometer der Firma *Burker Daltonics* im Reflektor-positiv-Modus (RP) mit einer standardisierten RP-Peptidmethode statt. Über die Steuersoftware *flexControl* wurde die Laserintensität und der verwendete Massenbereich des Detektors (0-5000 Da) geregelt. Sowohl zur Kalibrierung als auch zur Messung des Experimentes wurden Lasereinwirkungen im ms-Bereich mit je 500 Laserpulsen im zufälligen Umkreis der ausgewählten Probenposition (*random walk*) eingesetzt und die erhaltenen Spektren von mindestens 3000 Laserpulsen zum finalen Spektrum aufaddiert. Die Analyse der Spektren, die Ermittlung der Signalintensitäten und Signal-zu-Rausch(S/N)-Werte, wurden mit *flexAnalysis* oder *mMass* durchgeführt. Die relevanten Ausschnitte der Spektren wurden anschließend mit Hilfe von *Origin* dargestellt.

MALDI-ToF-MS/MS-LIFT-Messung

Da die Iminbildung eines Formylglycins ebenfalls zu einer Massenverschiebung von -18 Da führt, kann bei Peptiden mit mehr als einem FGE-Erkennungsmotiv nicht allein anhand des m/z-Wertes der Ionenspezies zwischen den Peptidsignalen eines einfachen FGly und seinem Imin oder einem Peptid mit zwei FGly-Resten unterschieden werden. Daher werden diese Peptide standardmäßig in einer zweiten massenspektrometrischen Messung analysiert. Dabei kommt es aufgrund der hohen Laserintensität zu einer wiederholten Fragmentierung und Ionisierung der ausgewählten Peptidfragmente, welche erneut an einem Ionendetektor detektiert werden. Hier wird die Labilität der Peptidbindung benachbart zum reaktiven Aldehyd ausgenutzt, welche zu einer Fragmentierung FGly-haltiger Peptide C-terminal zum Formylglycin und dementsprechend zu einer Detektion von Fragmenten verringerter Masse neigt. Cystein- oder Imin-haltige Peptide dagegen werden nicht erneut fragmentiert. Das Signalmuster einer MS/MS-Analyse erlaubt die Differenzierung, ob es sich bei dem Ursprungssignal um ein FGly-Imin-Peptid oder einem doppelt FGly-haltigen Peptid handelte.

Die MS/MS-Messung wurde direkt im Anschluss an die Reflektor-positiven MALDI-ToF-MS-Messung am *UltraFlexTreme* mit der LIFT-Methode (LP) und einem Messfenster von 4 Da durchgeführt und ebenfalls mit *flexAnalysis*, *mMass* und *Origin* ausgewertet und dargestellt.

ESI-MS

Bei der ESI-MS, genauer der LC-ESI-MS, handelt es sich um eine Variante der Massenspektrometrie mit vorgeschalteter Flüssigchromatographie (*liquid chromatography*, LC). Die Ionisierung der Analyten wird, anders als beim MALDI-Verfahren, durch Elektrosprayionisation (ESI) erreicht. Hierbei wird die Analytlösung direkt aus der Chromatographie durch eine dünne Metallkapillare geführt und zusätzlich ein Strom angelegt. In der folgenden Vernebelung der Lösung kommt es zu einer elektrophoretischen Wanderung im elektrischen Feld, während die Tropfen im Aerosol stetig kleiner werden und die Moleküle letztendlich ionisiert werden. Dabei werden je nach Spannung die Pseudoionenspezies $[M+H^+]$ (positive Spannung) oder $[M-H^-]$ (negative Spannung) erzeugt. Die Ionen werden anschließend im Massenspektrometer nach ihrer Fluggeschwindigkeit analysiert.

Die LC-ESI-MS-Analytik bietet sich besonders für empfindliche Probengemische und zur Ermittlung der Intaktmassen von hochmolekularen Biomolekülen an. Daher wurde die Auftrennung und Identifizierung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten im Anschluss an die Biokonjugationsreaktionen mittels ESI-MS durchgeführt. Hierzu wurden die Proteinkonjugate (ca. 10 μ M) ggf. mit PNGase F deglykosyliert, für 10 min mit 5 mM TCEP reduziert und mit wässriger Ameisensäure mit einer finalen Konzentration von 0,1% versetzt. Die Durchführung der Messung sowie Darstellung der Spektren wurde von Dr. Benjamin Müller (Biofidus AG) übernommen.

4.4.20 Schmelzpunktbestimmung mittels DSF

Bei der *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF), auch *Thermal Shift Assay* (TSA) genannt, wird anhand des Fluoreszenzsignals eines Bindepartners ein Protein hinsichtlich seiner thermischen Stabilität analysiert. Eine Veränderung der Protein-Protein-Interaktion von zum Beispiel Proteinuntereinheiten oder die Denaturierung von gefalteten Polypeptidketten führt zu einer verstärkten Bindung und somit erhöhten Fluoreszenz des Farbstoffes, da hydrophobe Aminosäurereste des vorliegenden Proteins zugänglicher werden. Durch die Messung der Fluoreszenz mit zunächst steigender und anschließend wieder sinkender Temperatur, wird eine Schmelzkurve aufgenommen, anhand deren Wendepunkts die Schmelztemperatur (T_m) des untersuchten Proteins oder Protein-Komplexes bestimmt werden kann. Durch den Einsatz unterschiedlicher Pufferbedingungen und verschiedener Konzentrationen von Agentien, sowie einer Messung in einem bestimmten pH-Bereich, können Informationen über stabilisierende oder destabilisierende Wirkungen von Umgebungsbedingungen gewonnen werden.

Die Fluoreszenzintensität des proteinbindenden Farbstoffes *SYPRO Orange* ($\lambda_{ex}=470$ nm, $\lambda_{em}=569$ nm) kann gleichzeitig in 96 Bedingungen im *RealTime*-Thermocycler gemessen wer-

den. Dabei wird *SYPRO Orange*, das in DMSO gelöst vorliegt, in einem Verhältnis von 10:1 zur Proteinlösung (ca. 1-2 mg/mL) in einem 5 μ L-Reaktionsansatz eingesetzt und dieser 1:10 mit dem jeweiligen Puffer verdünnt (Endkonzentration Protein 0,1-0,2 mg/mL). Wie in **Tab. 24** und **Tab. 25** zu sehen, werden in einem standardmäßigen sauren oder basischen Puffer-*Screen* jeweils zwölf verschiedene Puffer (Endkonzentration 100 mM) mit je acht Konzentrationsstufen an NaCl (20, 50, 100, 150, 250, 500, 750 und 1000 mM) eingesetzt. Bei den Experimenten des *single-chain* Antikörperkonstruktes Sc1 (1 mg/mL) wurde, zusätzlich zum basischen und sauren Puffer-*Screen*, auch die Bedingung PBS, pH 7,0 mit acht Konzentrationsstufen an Arginin (0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 und 250 mM) getestet. Das Konstrukt Sc2 (1 mg/mL) wurde in einem Kupfer-Arginin-*Screen* (**Tab. 26**) mit acht Pufferbedingungen von je fünf Konzentrationsstufen an DTT (0, 2,5, 5, 10 und 20 mM) eingesetzt.

5 μ L der Protein-Farbstoff-Mischung wurden in eine *Quali-PCR low level 96-well*-Platte vorgelegt, mit 45 μ L des in einer *Deepwell*-Platte vorbereiteten Puffer-*Screens* versetzt und die Vertiefungen mit einer *Optical Adhesive*-Folie verschlossen. Nach der Zentrifugation bei RT für 5 min bei 2500 rpm wird die Messung im *StepOne Plus RealTime-PCR*-System mit einem Temperaturbereich von 25-95 $^{\circ}$ C und einer Änderung von 1 $^{\circ}$ C/min gestartet und die Daten mittels *Excel* und *GraphPad Prism* analysiert und in *Origin* als *Heatmap* dargestellt.

Tab. 24: Saurer DSF-Puffer-Screen. pH-Werte und Puffer (je 100 mM) eines standardmäßigen sauren Puffer-*Screens*. Alle zwölf Pufferbedingungen wurden mit je acht Konzentrationsstufen an NaCl (20, 50, 100, 150, 250, 500, 750 und 1000 mM) angesetzt.

pH-Wert	Puffer
3,0	Citronensäurephosphat
4,5	Natriumacetat
4,7	Natriumacetat
5,0	Natriumacetat
5,0	Kaliumphosphat
5,5	Kaliumphosphat
5,5	Natriumcitrat
5,8	MES
6,0	Kaliumphosphat
6,2	MES
6,5	Natriumphosphat
6,5	MES

Tab. 25: Basischer DSF-Puffer-Screen. pH-Werte und Puffer (je 100 mM) eines standardmäßigen basischen Puffer-*Screens*. Alle zwölf Pufferbedingungen wurden mit je acht Konzentrationsstufen an NaCl (20, 50, 100, 150, 250, 500, 750 und 1000 mM) angesetzt.

pH-Wert	Puffer
7,0	Kaliumphosphat
7,0	HEPES
7,3	Ammoniumacetat
7,4	Kaliumphosphat
7,5	Natriumphosphat
7,5	Tris
8,0	Imidazol
8,0	HEPES
8,0	Tris
8,5	Bicin
8,5	Tris
9,0	Bicin

Tab. 26: Kupfer-Arginin-DSF-Screen. pH-Werte und Puffer (je 100 mM) eines DSF-Experiments mit Kupfer- und Arginin-haltigen Puffern im pH-Bereich 6,0-9,0. Alle acht Pufferbedingungen wurden mit je fünf Konzentrationsstufen an DTT (0, 2,5, 5, 10 und 20 mM) angesetzt.

pH-Wert	Puffer
6,0	PBS
7,5	Tris
8,0	Tris + 50 mM Arginin
9,0	Bicin
6,0	PBS + 15 μ M CuSO ₄
7,5	Tris + 15 μ M CuSO ₄
8,0	Tris + 50 mM Arginin + 15 μ M CuSO ₄
9,0	Bicin + 15 μ M CuSO ₄

4.5 Enzym- und Aldehydchemie

4.5.1 Kupfer-Rekonstitution

Um eine möglichst hohe Aktivität der rekombinant hergestellten Proteine ScFGE und MtFGE zu erlangen, wurden diese nach erfolgter Aufreinigung und ggf. Abspaltung des His-tags *in vitro* mit Kupfer beladen. Dazu wurde eine 10 mM CuSO₄-Lösung hergestellt und zu ca. 1 mg des jeweiligen Enzyms in Tris-Rekonstitutionspuffer gegeben, sodass ein Cu-FGE-Verhältnis von ca. 5:1 vorlag. Nach ca. 10-minütiger Inkubation bei 25 °C wurden die verbliebenen Kupferionen durch EDTA cheliert und die Präzipitate durch Schütteln bei 25 °C für weitere 10 min resuspendiert. Anschließend wurde eine Umpufferung mittels PD10 und Tris-Rekonstitutionspuffer vorgenommen (Kapitel 4.4.10).

4.5.2 Lagerung von bakteriellen FGEs und DARPins

Die rekombinanten, bakteriellen FGEs MtFGE, ScFGE und TcFGE neigen bei wiederholten Einfrier- und Auftauzyklen zur Präzipitation. Um unerwünschte Aggregationen zu verhindern, können Affinitäts-tags abgespalten werden. Besonders der His₆-tag neigt zur Aggregatbildung. Zusätze, wie Histidin, Arginin, Imidazol und Glycin haben eine stabilisierende Wirkung für eingefrorene Proteinproben und halten diese vermehrt in Lösung. Auch DARPins können durch die Beanspruchung während des Einfrierens und Auftauens präzipitieren, vor allem, wenn sie in einer Proteinkonzentration von über 4 mg/mL vorliegen. Zudem wurden bei DARPins, welche bereits mit FGE umgesetzt wurden und somit Formylglycine enthielten, neben Präzipitationen auch Degradationen anhand von mehreren, niedrigeren Banden in SDS-PAGE-Gelen beobachtet. Hier scheint Arginin einen stabilisierenden Effekt aufzuweisen. Dabei hat sich für unsere Anwendung herausgestellt, dass für MtFGE besonders Konzentrationen von 200-400 mM Arginin eine positive Wirkung haben, wobei ein neutraler bis basischer pH von bis zu 9,0 ebenfalls posi-

tiv zur Proteininstabilität beiträgt. Die Anwesenheit von Arginin oder mehr als 100 mM Imidazol und Glycin kann allerdings auch negative Effekte auf die weitere Anwendung der Enzyme und Proteine in HIPS-Konjugationsreaktionen haben, weshalb bei frisch aufgetauten Proben zunächst je nach Folgeanwendung eine Rechromatographie oder Umpufferung durchgeführt wird. Die verwendeten Lagerpuffer sind in **Tab. 27** zu finden. Alle Proteine wurden standardmäßig bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tab. 27: Lagerpuffer. Angegeben sind die verwendeten Standardlagerbedingungen für MtFGE, ScFGE, TcFGE und DARPins mit und ohne Formylglycin.

Puffer/Enzym	Zusammensetzung
Lagerpuffer MtFGE	200 mM Arginin (ggf. $1\text{ }\mu\text{M}$ CuSO_4) PBS pH 7,4
Lagerpuffer DARPins	20 mM Arginin oder 10 mM Imidazol PBS pH 7,4
Lagerpuffer ScFGE _(rek)	10 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,5
Lagerpuffer TcFGE	50 mM Tris 50 mM NaCl pH 8

4.5.3 Umsetzung von Aldehyd-tags *in vitro*

Die *in vitro*-FGly-Generierung durch prokaryotische oder durch das humane Formylglycin-generierende Enzym findet nahe dem pH-Optimum des Enzyms bei pH 8-9 statt. Dabei können sowohl humanes als auch Mt-, Sc- und TcFGE in einem Tris-Puffer (50 mM Tris, 50 mM NaCl) oder Bicin-Puffer eingesetzt werden. In analytischen Maßstäben werden Enzym und Substrat in einem 1:200-Verhältnis eingesetzt. Im präparativen Maßstab kann das Verhältnis zugunsten der weniger bevorzugten Erkennungsmotive auf 1:2 angehoben werden. Sowohl eukaryotisches als auch prokaryotisches FGE braucht zur Oxidation von Cysteinen Reduktionsäquivalente. Dies ist bevorzugt eines der stärkeren Reduktionsmittel wie DTT und DTE, welche in einer Standardreaktion von FGE mit einer Konzentration von ca. 2,5 mM (Verhältnis Enzym:DTT 1:1) eingesetzt werden. Bei der Verwendung von nicht-rekonstituierten Enzymen wird der Reaktionslösung zusätzlich CuSO_4 im Verhältnis 200:1 hinzugefügt. Typischerweise finden Konversationsreaktionen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 1-2 h oder über Nacht bei $22\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter ständigem Schütteln (800 rpm) statt.

4.5.4 indirekte FGE-Aktivitätsbestimmung mittels STS-Assay

Aussagen über die *in vivo*-Aktivität des Formylglycin-generierenden Enzyms können durch einen indirekten, radioaktiven Assay gewonnen werden, bei der die humane Steroidsulfatase (STS), auch bekannt unter dem Namen Arylsulfatase C (ASC), mit dem humanen FGE koexprimiert wird. Das FGE aktiviert intrazellulär die Steroidsulfatase durch die Generierung eines katalytischen FGly-Restes der Sulfatase. Die Zellysate werden anschließend mit einem radioaktiv-markierten Substrat der STS, dem ^3H -DHEAS (Tritium markiertes Dehydroepiandrosteron-3-Sulfat) inkubiert. Da das desulfatierte Produkt hydrophob, das Substrat allerdings hydrophil ist, können Pro- und Edukt mittels Phasentrennung voneinander separiert werden. Die mittels Szintillationsmessgerät ermittelte Radioaktivität in der organischen Phase dient unter Kenntnis der Inkubationszeit und der Substratmenge zur Errechnung der spezifischen Enzymaktivität. Werden in diesem Assay Lysate unterschiedlicher Expressionsbedingungen oder verschiedener FGE-Varianten miteinander verglichen, lassen sich Rückschlüsse über die FGE-Aktivität beeinflussende Faktoren ziehen. Das Substrat wurde präpariert, indem $5\ \mu\text{L}$ ^3H -DHEAS ($5\ \mu\text{Ci}$) in $400\ \mu\text{L}$ unmarkiertem DHEAS ($0,1\ \text{mM}$) gelöst wurden.

Zur Durchführung eines STS-Assays werden Zellysate von 6-well-Zellkulturschalen oder größer erstellt, wobei bei jedem Experiment Kontrollen ohne STS sowie ohne und mit FGE mitgeführt und alle Proben in mindestens zwei biologischen Replikaten angesetzt wurden. Jedes Lysat wird in Doppelbestimmung für den radioaktiven Assay eingesetzt, wobei es zu Beginn der Arbeit mit einer neuen Zelllinie die optimale Lysatmenge und Inkubationszeit zu bestimmen galt. Diese Parameter wurden so gewählt, dass der Produktumsatz in der Positivkontrolle etwa bei 50% liegt, um einen linearen Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und radioaktivem Produktsignal gewährleisten zu können und nicht in eine Sättigung zu geraten. Standardmäßig wurden $20\ \mu\text{L}$ Lysat mit $23\ \mu\text{L}$ Tris-Puffer (pH 8) und $2\ \mu\text{L}$ der ^3H -DHEAS-Lösung ($0,2\ \text{nM}$, $-20\ ^\circ\text{C}$ gelagert) vermischt, runterzentrifugiert und für 30 min bei $37\ ^\circ\text{C}$ unter Schütteln inkubiert. Die Reaktion der STS wurde durch Anhebung des pH-Wertes mit $45\ \mu\text{L}$ $1\ \text{N}$ NaOH gestoppt. Anschließend wurden die Proben für weitere 30 min bei RT mit $2\ \text{mL}$ des organischen Szintillationscocktails auf Xylol-Basis inkubiert (Kapitel 3.9, **Tab. 11**). Diese Szintillationslösung verstärkt die radioaktive β^- -Strahlung in ein messbares Lichtsignal. Das hydrophile Pendant ist das wässrige *LumaSafe*-Reagenz, mit dem die Negativkontrolle mit Wasser anstelle des Lysates vermessen wurde. Zur Bestimmung des maximalen Szintillationswertes bei eingesetzter Substratkonzentration wurden ebenfalls $2\ \mu\text{L}$ Substrat ohne Lysat mit der Xylol-haltigen Lösung versetzt und ein Leerwert ohne Substrat ebenfalls im Xylol-Szintillationscocktail vermessen. Die Aktivität wurde mit Hilfe von *Excel* aus dem Produktumsatz pro Inkubationszeit und Protein-

menge analog zu dem etablierten Protokoll (Schlotawa *et al.*, 2011) errechnet. Dazu wurden die Proteinkonzentrationen der Lysate durch Bradford-Assay bestimmt. Der Produktumsatz ergibt sich aus dem Verhältnis von dem um den Leerwert korrigierten Messwert (in cpm, *counts per minute*) und der Substratkonzentration, welche zum maximalen Messwert der Positivkontrolle führt. Zur Errechnung der spezifischen Aktivität, bezogen auf die Proteinmenge, wurde die Aktivität um die mittels Western Blot ermittelten Signalverhältnisse korrigiert. Dementsprechend wurden von jedem Lysat 30 μg Protein per SDS-PAGE aufgetrennt, per Western Blot mit den Antikörpern $\text{R}\alpha\text{STS}$ und $\text{R}\alpha\text{FGE}$ detektiert und anschließend die Signalintensität quantifiziert.

4.5.5 indirekte FGE-Aktivitätsbestimmung mittels pNCS-Assay

Der pNCS-Assay wird zur Bestimmung von Sulfatase-Aktivitäten in Zelllysaten eingesetzt und kann, analog zum STS-Assay, indirekt Aussage über die Aktivität des Enzyms hFGE geben. Dazu werden hFGE und eine Arylsulfatase, hier His-getaggte Arylsulfatase A (ASA-RGSHis₆), koexprimiert und die Zelllysate mit dem Pseudosubstrat *para*-Nitrocatecholsulfat (pNCS) inkubiert. Durch die Hydrolyse dieses chromogenen Arylsulfates entsteht das desulfatierte Anion, dessen Absorptionsmaximum im Basischen von Gelb zu Rot verschoben wird. Mittels Messung der Absorption bei $\lambda = 515$ nm kann der Umsatz an pNCS und demzufolge die Sulfataseaktivität durch den Umsatz pro Zeit und Menge berechnet werden. Auch hier wird die Gesamtproteinmenge im Lysat durch Bradford-Assay bestimmt und die Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die spezifische Aktivität gibt die Enzymaktivität pro Proteinmenge an, wobei letztere durch die Quantifizierung der $\text{M}\alpha\text{PentaHis}$ - und $\text{R}\alpha\text{FGE}$ -Western Blots an die Intensitätsverhältnisse angepasst wurden. Durch den Vergleich von Messungen unterschiedlicher Expressionsbedingungen kann demnach eine Aussage über die Umgebungsbedingungen getroffen werden, die die FGE-Aktivität *in vivo* beeinflussen.

Für den pNCS-Assay wurden Lysate von 6-*well*-Zellkulturplatten mittels Bradford-Assay analysiert und anschließend wurden je 120 μg Gesamtprotein 1:1 mit Acetatpuffer (Kapitel 3.9, **Tab. 11**) versetzt und mit Wasser auf 120 μL aufgefüllt, um einen pH-Wert nahe am pH-Optimum der lysosomalen Arylsulfatase zu gewährleisten. Es wurden pro Bedingung mindestens zwei biologische Replikate mitgeführt. Die Lysatlösungen wurden 1:1 mit einer 10 mM pNCS-Acetat-Lösung vermischt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden zweimal je 50 μL der Reaktionslösung als Doppelbestimmung zum Erhöhen des pH-Wertes in die vorgelegte Abstopplösung (150 μL) in einer 96-*well*-Platte überführt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 515 nm am *Tecan Multiwell Plate Reader* detektiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz aus pNCS- und Lysat-lösungen, die getrennt voneinander inkubiert und erst beim Abstoppen miteinander vermischt wurden. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolge nach dem

Labert-Beer'schen-Gesetz mit einer Schichtdicke von 0,56 cm (200 μL) und einem molaren Extinktionskoeffizienten von $12400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ mit Hilfe von *Excel*. Die spezifischen Aktivitäten als Substratumsatz pro Enzymmenge wurden mittels Western Blot-Intensitätsverhältnisse normalisiert.

4.5.6 Cystein-Derivatisierung mit Maleimiden

Die Thiolgruppen von Cysteinen können durch eine Reihe von Proteinkonjugationsreaktionen adressiert werden. So reagiert beispielsweise die Doppelbindung von Maleimiden als Michael-Akzeptor mit den Thiolen unter Bildung einer stabilen Kohlenstoff-Schwefel-Bindung. Maleimide bestehen aus einer Maleinsäure und der funktionellen Imid-Gruppe, welche zur Proteinkonjugation derivatisiert vorliegt. Beim Mal-PEG handelt es sich um ein mit Polyethylenglycol-derivatisiertes Maleimid. Nur freie Thiole können mit Maleimiden konjugiert werden. Durch Zusatz von Thiol-freien Reduktionsmitteln wie TCEP können hingegen auch Disulfidbrücken getrennt und anschließend alle Cysteine derivatisiert werden. Zu einem Formylglycin oxidierte Cysteine hingegen lassen sich nicht mehr mit Maleimid konjugieren. Somit kann diese Konjugationstechnik z.B. der Analyse des Redoxstatus oder des FGE-Umsatzes dienen. Für eine Analyse per SDS-PAGE bieten sich fluorophore Maleimide oder Maleimid-Polyethylenglykole (Mal-PEG) an, die zu einer Erhöhung des Molekulargewichtes und somit einer Verschiebung der Proteinbande im SDS-Gel führen.

Die Konjugation von Mal-PEG_{2k} wurde in PBS- oder Tris-Puffern durchgeführt, wobei der pH-Wert zwischen 6,8 und 7,5 liegen sollte. Ein pH über 8 führt zu unspezifischen Amin-Addukten. Viele Maleimide sind schwer wasserlöslich, daher sollten sie zunächst in DMSO-haltigen Lösungsmitteln gelöst werden, bevor sie in einem ca. 20-fachen Überschuss eingesetzt werden. Die Reaktion kann bei 4 °C über Nacht, RT oder bei 37 °C für ca. 30 min durchgeführt werden. Im Anschluss an die Inkubation unter Schütteln wurde der Reaktionsansatz zentrifugiert und auf Eis gekühlt. Die Proteine wurden durch TCA (Trichloressigsäure) oder Aceton gefällt, indem eine eiskalte Lösung von TCA (final 20%) bzw. Aceton (final 80%) zum Reaktionsansatz hinzugegeben und bis zur deutlichen Präzipitation auf Eis gelagert wurde. Durch mehrmaliges Zentrifugieren und Waschen mit Aceton wurde das Protein isoliert, anschließend getrocknet und mit Tris-puffer pH 8 aufgenommen. Durch Erwärmen auf 37 °C wurde das Proteinpellet resuspendiert und anschließend bei 95 °C mit Lämmli-Puffer denaturiert, um in einer SDS-PAGE analysiert zu werden.

4.5.7 Cystein-Derivatisierung mittels Iodacetamid

2-Iodacetamid (IAA) ist ein gängiges Mittel zur Alkylierung von Thiolen, bei der Iodwasserstoff frei wird. Neben den Thiolresten freier Cysteine reagiert es auch in einer viel langsameren Reaktion mit Histidinen. Da eine irreversible Schwefel-Kohlenstoffbindung erzeugt wird, dient die Derivatisierung von Cysteinen der Fixierung des Redoxstatus der Proteine. Eine vergleichende Analyse von IAA-derivatisierten Proteinen mit und ohne Behandlung mit Reduktionsmittel gibt Aufschluss darüber, welche Cysteine reduziert oder oxidiert vorlagen.

Zur Analyse von redoxempfindlichen Proteinen im SDS-PAGE-Gel wurden die Proben wie gewohnt behandelt, z.B. FGE-Umsetzung *in vitro*, und anschließend Iodacetimid in einer finalen Konzentration von 50 mM für mindestens 15 weitere Minuten hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben zur Analyse im MALDI-ToF-MS oder einem reduzierenden und einem nicht-reduzierendem SDS-PAGE-Gel aufgearbeitet. Da die IAA-Markierung zu einem leicht veränderten Laufverhalten im Gel führt, wurden mit IAA-unbehandelte Proben als Kontrollen mitgeführt.

4.5.8 Formylglycin-Derivatisierung mittels reduktiver Aminierung

Bei der Reduktiven Aminierung werden Aldehyde oder Ketone in ein Imin umgewandelt. Diese reversible Zwischenstufe wird durch anschließende Reduktion irreversibel in ein Amin überführt. Dabei wird oftmals Natriumcyanoborhydrid als Reduktionsmittel eingesetzt, da es eine höhere Reaktivität dem Imin als dem Carbonyl gegenüber aufweist. Die reduktive Aminierung bietet eine Gelegenheit, der Aldehyd eines Formylglycin-tragenden Proteins mit einem Amin-derivatisierten Konstrukt zu konjugieren und wurde genutzt, um Proteine an Harzen zu immobilisieren bzw. die Größenverschiebung durch Amin-Polyethylenglykole (NH₂-PEG) per SDS-PAGE zu analysieren.

Bei der Protein-Immobilisierung wurde ein Protein mit Aldehyd-tag *in vitro* mit FGE umgesetzt. Als Kontrolle diente unkonvertiertes Protein. Es wurde ca. 1 µg Protein mit 1 mg Hexylamin-Harz (HA403) bei neutralem pH im wässrigen Puffer versetzt und bei 4 °C und 500 rpm Schütteln über Nacht inkubiert. Nach Zentrifugation bei maximal 5000 rpm wurde der Überstand abgenommen und das Harz im selben Volumen PBS mit frisch hinzugefügtem Natriumcyanoborhydrid (50 mM) versetzt. Nach der Reduktion für 20 min bei 4 °C wurde der Überstand verworfen, das Harz dreimal mit ca. dreifachem Volumen an 1 M NaCl-Lösung und dreimal mit PBS gewaschen. Der Immobilisierungserfolg konnte in einer kleinen Fraktion durch Farbumschlag des Bradfordreagenzes und massenspektrometrischer Analyse eines tryptischen Verdaus festgestellt werden.

Die reduktive Aminierung eines Proteins mit Amin-PEG_{2k} hat im Vergleich zur Immobilisierung den entscheidenden Nachteil, dass sich die Überstände nicht mit Zentrifugation entfernen lassen. Stattdessen wird das Protein ca. 1:20 mit NH₂-PEG versetzt, nach Inkubation bei 4 °C über Nacht oder 22 °C für 1 h mit 50 mM Natriumcyanoborhydrid für 20 min reduziert und anschließend aus der Lösung gefällt. Zur Fällung kann Aceton oder TCA verwendet werden, wobei TCA die Reduktion durch die Veränderung des pH-Wertes sofort abstoppt. Nach mehrmaligem Waschen mit Aceton wurde das Proteinkonjugat in PBS aufgenommen und massenspektrometrisch analysiert. Ein Vorteil der PEGylierung gegenüber der Immobilisierung am Harz, ist die einfache Analyse des Produktes im SDS-PAGE-Gel, wobei eine starke Massenverschiebung zu erwarten ist.

4.5.9 HIPS-Konjugation

Bei der Hydrazino-*iso*-Pictet-Spengler-Ligation (HIPS-Ligation) handelt es sich um eine biokompatible Konjugationstechnik an Aldehyden. In der ursprünglichen Pictet-Spengler-Ligation reagieren Aminoxy-funktionalisierte Indole mit Aldehydresten zu einem Oxyiminiumion-Intermediat, welches zur hydrolytisch stabilen C-C-Bindung weiterreagiert (Stöckigt *et al.*, 2011). Mit dieser Technik wird eine intermolekulare Alkylierung vollzogen, wobei das Indol als Nukleophil agiert. Nachteil dieser Reaktionschemie ist der stark saure pH-Wert unter 5, der mit Biomolekülen nicht kompatibel ist. Die verbesserte Variante, die HIPS-Ligation, ersetzt das Aminoxy-Nukleophil durch ein Alkylhydrazin (Agarwal, Kudirka, *et al.*, 2013), wodurch ein stabiler Ringschluss über ein Hydrazoniumion-Intermediat geformt wird, was sich unter milderen, wässrigen Bedingungen vollziehen lässt.

Für die Konjugation eines FGly-tragenden Proteins wird ein zehnfacher Überschuss an HIPS-Komponente eingesetzt. Die Reaktion kann in einer Vielzahl von z.B. Phosphat- oder Tris-basierten Puffern stattfinden und benötigt einen pH-Wert von 5,5-6,5. Agentien wie Arginin und Glycin hingegen inhibieren die Reaktion. Konjugationen wurden standardmäßig bei 22 °C und unter 850 rpm Schütteln über Nacht durchgeführt. Es bildete sich Präzipitat, das vor der Rechromatographie des Proteinkonjugates durch Erwärmen auf 37 °C und Vortexen resuspendiert und danach stark abzentrifugiert wurde. Die HIPS-Ligation wurde von Dr. Tobias Krüger etabliert und die verwendeten Komponenten HIPS-Azid (HIPS-Az) und HIPS-Carboxyfluorescein (HIPS-CF) wurden ebenfalls von Dr. Tobias Krüger hergestellt, aufgereinigt und analysiert. Die Konjugationsprodukte wurden mittels Chromatographie aufgereinigt, ggf. per SDS-PAGE analysiert und zur weiteren Konjugation eingesetzt.

4.5.10 SPAAC Click-Reaktion

Unter dem Begriff Click-Chemie (oder Klick-Chemie) werden Reaktionen zusammengefasst, die regio- und stereospezifisch sowie breit einsetzbar sind und mit gut abtrennbaren Nebenprodukten und Lösemitteln zu hohen Ausbeuten führen. Dies sind zum Beispiel Michael-Additionen und Cycloadditionsreaktionen. Eins der bekanntesten Beispiele ist die Azid-Alkin-Cycloaddition, welche unter Kupferkatalyse regioselektiv 1,2,3-Triazole erzeugt und somit bei Raumtemperatur in wässrigen Lösungen anwendbar ist. Diese Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) kann zwar über einen breiten pH-Bereich von 2-12 angewendet werden, wegen der Redoxaktivität und Zytotoxizität des Kupfers ergibt sich allerdings eine Limitierung für biologische Systeme und lebende Zellen (Himo *et al.*, 2005). Eine Kupfer-freie Alternative ist die *strain-promoted azide-alkyne cycloaddition* (SPAAC), bei der das Alkin Teil eines gespannten Cyclooctin-Rings ist, was zu einer schnellen Reaktion am Azid führt (Agard *et al.*, 2004). Um einen gespannten Cyclooctin-Ring zu erhalten, können Derivate mit zwei flankierenden, Elektronen-ziehenden Substituenten, wie Difluorocyclooctin (DFCO) oder Dibenzocyclooctin (DBCO), verwendet werden. Die biokompatible SPAAC Click-Reaktion lässt sich demnach im wässrigen Milieu zur Verbindung einer Azid-haltigen und einer Cyclooctin-haltigen Spezies über ein Tetrazin-Produkt anwenden.

Zur Generierung eines Antikörper-Wirkstoff-Konjugates wurde die von Dr. Tobias Krüger etablierte Reaktion eines HIPS-Azid-derivatisierten Proteins mit dem DBCO-Derivat eines Toxins genutzt. Dabei wurden das kommerziell erhältliche DBCO-PEG-VC-PAB-MMAE (10 mM in DMSO) aus Dibenzocyclooctin mit Polyethylenglycol-Valin-Citrullin-*para*-Aminobenzyl-Linker und dem Toxin Monomethylauristatin E verwendet. 1,1 Äquivalente dieses mit DBCO-MMAE abgekürzten Konstruktes wurden für mindestens 2 h bei 22 °C unter Schütteln (850 rpm) mit dem HIPS-Azid-Antikörper oder -DARPin bei pH 9 inkubiert. Im Anschluss wurden die Proteinkonjugate für eine zweite Konjugation mittels Protein A-Sepharose oder HisTrap abgereinigt oder aber die Reaktionslösung wurde mittels HIC (Kapitel 4.5.11) aufgetrennt und die Proteinkonjugate ggf. durch ESI-MS analysiert.

4.5.11 HIC – hydrophobe Interaktionschromatographie

Die HIC ist eine Chromatographietechnik, bei der die Trennung von Molekülen, nicht durch affine Bindungen, sondern durch hydrophobe Interaktionen vermittelt wird. Hierbei kann es, je nach Wahl des Säulenmaterials, gleichzeitig auch zu ionischen Wechselwirkungen kommen. Zur Aufreinigung von DARPin- oder Antikörper-Konjugaten nach der erfolgten HIPS- oder SPAAC Click-Reaktion wurde die HiTrap Phenyl HP 1 mL-Säule von *GE Healthcare* genutzt. Diese

Säulenmatrix besteht aus stark verzweigter Agarose mit Phenylgruppen, welche, ähnlich wie Butylgruppen, sehr hydrophob sind und geringe ionische Wechselwirkungen zulassen. Anders als die *Reverse Phase Chromatography* (RPC), welche die standardmäßige Flüssigchromatographie mit hydrophober stationärer Phase darstellt, können bei der HIC mildere Laufmittel verwendet werden. Sie ist demnach besonders geeignet für die Trennung von Biomolekülen, da sie kompatibel ist mit einer Vielzahl von wässrigen und organischen Lösemitteln, sowie Detergenzien und hohen Salzkonzentrationen. Butyl- und Phenyl-Sepharose eignen sich tatsächlich besonders als Teilschritt in der Reinigung von Antikörpern (Matsuda *et al.*, 2019; Müller *et al.*, 2020). Zur verbesserten Bindung von Proteinen werden oftmals Puffer mit hohen Salzkonzentrationen verwendet. Die Elution kann durch die Verringerung der Salzkonzentration oder die Verwendung von organischen Lösemittelgemischen erfolgen. Für die Trennung von unkonjugiertem, einfach- und mehrfach-konjugiertem Antikörper hat sich die Verwendung eines Gradienten mit 20% Isopropanol als geeignet herausgestellt. Da Isopropanol in der elutropen Reihe zwischen den stark polaren Lösemitteln Wasser und Ethanol und den unpolaren Lösemitteln Acetonitril und DMSO steht, vermittelt es genau die richtige Löslichkeit von Protein-Anteil und unpolarem Toxin.

Eine typische hydrophobe Interaktionschromatographie zur Trennung von Antikörper und Antikörperkonjugat wurde mit einem Probenvolumen von 1-10 mL aus einem 1:1-Gemisch aus Reaktionslösung und dem HIC-Bindepuffer durchgeführt. Die HiTrap Phenyl HP 1 mL-Säule wurde bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min und einem maximalen Druck von 0,3 MPa zuvor mit dem Bindepuffer aus Dinatriumhydrogenphosphat und Ammoniumsulfat (Kapitel 3.9, **Tab. 11**) äquilibriert, nach dem Auffangen des Durchflusses mit weiteren 5 CV Bindepuffer gewaschen und bei reduzierter Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL/min in einem linearen Gradienten von 0-100% Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer mit 20% Isopropanol über 10 CV eluiert, wobei das Eluat in 0,5 mL-Fractionen aufgefangen wurde. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend für eine weitere Konjugation eingesetzt oder massenspektrometrisch und gelelektrophoretisch analysiert und die Säule auf 20% Ethanol gelagert.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Der duale Aldehyd-tag

Die duale Proteinmodifikation bietet vielschichtige Anwendungsmöglichkeit zu denen die Kombination zweier Wirkstoffe oder eines Wirkstoffes und einer diagnostischen Komponente an Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten zählt (Levengood *et al.*, 2017). Das therapeutische Fenster solcher Antitumormittel beschreibt die Beziehung zwischen der Dosis und der Wirkung bzw. dem toxischen Effekt und wird unter anderem durch die Homogenität des Arzneimittels beeinflusst. Je definierter die Zahl und Position von Toxinen in einem Konjugat ist, desto präziser lässt sich seine Pharmakokinetik bestimmen. Die Proteinkonjugationstechnik hat dabei den entscheidenden Einfluss auf die ADC-Homogenität. So ist die Biokonjugation mit Formylglycinen eine sehr ortsspezifische Methode. Das Enzym FGE bzw. AtsB erkennt ein Aminosäuremotiv in einem so genannten Aldehyd-tag und setzt den darin befindlichen Cystein- bzw. Serinrest in ein Formylglycin um. Das FGly kann danach selektiv mit Aldehyd-spezifischer Konjugationschemie verlinkt werden. Aufgrund der enzymatischen Schritte ist die FGly-Methodik zwar aufwendiger, aber auch ortsspezifischer als eine klassische Proteinkonjugation an natürlichen Aminosäuren. Sollen nun duale Konjugate mit zwei verschiedenen Reagenzien pro Antikörper hergestellt werden, muss der Konjugationsprozess nicht nur gegenüber anderen Cystein- bzw. Serinresten selektiv sondern auch zwischen zwei verschiedenen Motiven orthogonal sein. Zur zweifachen Proteinmodifizierung werden daher duale Aldehyd-tags an ein rekombinantes Protein angefügt, die aus zwei Erkennungsmotiven bestehen, deren Aminosäureabfolgen jeweils die Regioselektivität der enzymatischen Umsetzung steuern soll. Durch eine große Auswahl an Motiven und Enzymen kann somit ein modulares System für vielfältige Proteinkonjugations-Anwendungen angeboten werden.

Die Sequenzen, die von den Enzymen AtsB und FGE erkannt und umgesetzt werden, bestehen nicht nur aus dem fünf Aminosäuren großen Kernmotiv (C/SxP/AxR) an dessen Anfang das zu FGly konvertierbare Serin oder Cystein steht. Vielmehr basiert die Enzymaktivität auch auf der Erkennung und Bindung der flankierenden Hilfsmotive. Diese leiten sich von den Sequenzen derjenigen Sulfatasen ab, die als natürliche Substrate der entsprechenden Enzyme bekannt sind. Über die prokaryotischen, anaeroben Enzyme MMAtsB aus *Methanosarcina mazei* und KPAtsB aus *Klebsiella pneumoniae* ist bekannt, dass sie theoretisch sowohl Serin- als auch Cysteinreste zu C^α-Formylglycinen umsetzen können (Miech *et al.*, 1998). Die Sequenz SPMSAPARS-MLLTGN, abgeleitet vom aktiven Zentrum der Sulfatase AtsA aus *K. pneumoniae*, wird dementsprechend KPAtsB- oder SAPAR-Motiv genannt (Murooka *et al.*, 1990). Das MMAtsB-

Motiv EQSCTAGRAAFITGQ basiert auf der *M. mazei* Sulfatase MMS und wird ebenfalls mit CTAGR-Motiv abgekürzt (Berteau *et al.*, 2006). Als Motiv für die aeroben, Cystein-abhängigen FGEs wird die Prolin-haltige Konsensussequenz **LCTPSR** verwendet. Für die Nutzung des humanen FGEs kann diese ein zusätzliches, C-terminales Hilfsmotiv (**LCTPSRAALLTGR**) entsprechend der Sequenz der humanen Arylsulfatase A (ASA) tragen (Dierks *et al.*, 1999). Dual getaggte Proteine werden dementsprechend mit einer Kombination aus zwei der genannten Motive hergestellt, die nicht zwangsweise an derselben Stelle im Protein angebracht sein müssen. Eine Verlängerung der Substratpeptide zu einem 14- oder 23-mer (**ALCTPSRGSLFTGR** oder **MTDFYVPVSLCTPSRAALLTGRS**) wirkte sich positiv auf den *in vitro* erzielten FGly-Umsatz durch hFGE und MtFGE aus (Holder *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2015). Allerdings werden für biotechnologische Anwendungen möglichst kurze, einfach zu integrierende Sequenzen den langen Motiven vorgezogen. Für die Konstruktion eines dualen Aldehyd-tags wird daher tendenziell auf eine gesteigerte Aktivität durch die Verlängerung der Motivsequenz zugunsten eines kurzen aber sehr spezifisch umgesetzten Motivs verzichtet. Proteinkonversionen mit einem Aldehyd-tag der Form **LCTPSRAALLTG** (Wu *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2014) bzw. vom allgemeinen Schema CxPxR (Carrico *et al.*, 2007; Hudak *et al.*, 2012; Drake *et al.*, 2014; York *et al.*, 2016) wurden bereits erfolgreich in Einzelkonjugationen rekombinanter Proteine angewandt und eine mögliche Doppelkonjugation mithilfe der bis dato bekannten Substratspezifitäten der pro- und eukaryotischen Enzyme wurde in Krüger *et al.*, 2018 und 2019 publiziert.

5.1.1 Erstellung der Modellprotein-Bibliothek des DARPins E01

Die Abhängigkeiten von den Hilfsmotiven und die Substratspezifitäten wurden standardmäßig an Peptiden in *in vitro*-Assays untersucht. Um die Konversion von Cystein- und Serinresten durch die Auswahl an verschiedenen AtsBs und FGEs an Proteinen durchzuführen, wurde das *designed ankyrin repeat protein* (DARPin) E01 der Arbeitsgruppe Plückthun als Modellsystem gewählt (Steiner *et al.*, 2008). DARPins sind aufgrund ihrer definierten Struktur, geringen Größe und fehlenden Glykosylierungen oder Disulfidbrücken besonders zur Herstellung im bakteriellen System geeignet (Binz *et al.*, 2003). Sie werden für die Tumorthherapie bzw. für die Tumordiagnostik vor allem auf Grund ihrer stabilen und schnellen Faltung, geringeren Aggregationstendenzen und der hochaffinen Epitopbindung genutzt. DARPins erreichen aufgrund ihrer geringen Größe (ca. 18 kDa) eine hohe Penetration soliden Tumorgewebes (Plückthun, 2015a). Zudem eignet sich die Abwesenheit von Cysteinen besonders für Cystein-abhängige Konjugationstechniken (Boersma und Plückthun, 2011; Boersma *et al.*, 2011). Da die N- und C-terminalen *cap*-Segmente Lösemittel-exponiert sind, können sie leicht um Affinitäts- und Konjugations-tags verlängert oder mit weiteren Proteinen fusioniert werden (Boersma *et al.*, 2011). Für die FGly-

Konjugation ist eine Abwesenheit von weiteren Cysteinen neben denen des Aldehyd-tags zwar nicht zwingend notwendig, da die zielgerichtete Konversion der Cysteine durch die Erkennung der Konsensussequenzen gesteuert ist. Allerdings könnten so die Cysteine des Aldehyd-tags zusätzlich selektiv durch z.B. Maleimid-Ligationsreaktionen adressiert werden (siehe Kapitel 5.3.1). Für therapeutische Anwendungen wurden bereits einige DARPin-Moleküle entwickelt, die auf einem multivalenten Fusionsprotein aus zwei DARPins oder einem Fusionsprotein aus DARPin und einem Serumprotein basieren (Simon *et al.*, 2013). Im Zuge dessen konnte auch die direkte Beladung mit einer toxischen Fracht oder eine PEGylierung (siehe Kapitel 2.2) bereits an einigen Beispielen vollzogen werden (Martin-Killias *et al.*, 2011; Simon *et al.*, 2014). Das Serumprotein bzw. die PEGylierung kann zur Erhöhung der Plasmahalbwertszeit eingesetzt werden. Das hier gewählte Modellprotein DARPin E01 wurde speziell aufgrund seiner Bindung der extrazellulären Domäne III des humanen EGF-Rezeptors ausgewählt (Steiner *et al.*, 2008), welcher für die geplanten Antikörper-Wirkstoff-Konjugate als therapeutisches Ziel ausgewählt wurde (siehe Kapitel 2.1).

Ein DARPin E01 mit einem C-terminalen CTPSR- und His₆-tag (DARPin 000) wurde bereits durch *add-on*-PCR kloniert, in großen Mengen in *E. coli* exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt (durch Georg Falck und Dr. Marcus Gerlach). Humanes FGE wird aus dem Zellkulturüberstand von Insektenzellen gewonnen (Peng *et al.*, 2015). FGE aus *Mycobacterium tuberculosis* (MtFGE; Plasmid bereitgestellt von Dr. David Rabuka, Redwood Laboratories), aus *Streptomyces coelicolor* (ScFGE) und aus *Thermomonospora curvata* (TcFGE) werden ebenfalls mittels Hexahistidin-tags aus *E. coli*-Lysaten aufgereinigt und *in vitro* mit den DARPin-Konstrukten umgesetzt. Bei TcFGE handelt es sich um eine hochaktive Variante (bereitgestellt von der AG Seebeck, Universität Basel) bei der alle vier Cysteine außerhalb der aktiven Tasche (C187A, C231A, C284S und C298A) zu Alaninen und das Tyrosin der aktiven Tasche zum Phenylalanin (Y273F) mutiert worden sind (Knop *et al.*, 2017). Dieses Enzym konnte bislang erfolgreich für Konversionen von Substratpeptiden (SALCSPTRA) eingesetzt werden, wobei die eingeführten Mutationen zu einer 40-fachen Aktivitätssteigerung führten (Knop *et al.*, 2015; Knop *et al.*, 2017). Die TcFGE-Mutante wurde vergleichend zu MtFGE und ScFGE *in vivo* und *in vitro* eingesetzt, um Substratspezifitäten und die Anwendbarkeit am Protein zu ermitteln.

Bei der Konversion von Erkennungsmotiven in Proteinen (siehe Kapitel 5.1.2) kann es zu vielfältigen Einflussfaktoren kommen. Die Reaktionsbedingungen der Peptidassays müssen nicht zwangsweise auf Proteinebene anwendbar sein und auch eine Umsetzung bereits während der rekombinanten Proteinexpression unterliegt anderen Gegebenheiten. Im eukaryotischen System findet die post-translationale Modifikation zwar während der Translokation ins ER statt und ist damit relativ unabhängig von der Position des Erkennungsmotivs und der Proteinfaltung. Bei

einer prokaryotischen *in situ*-Konversion dagegen sollte der Aldehyd-*tag* an einer leicht zugänglichen Position liegen. Somit kann neben den konservierten Aminosäuren des Kernmotivs auch die N- oder C-terminale Positionierung am jeweiligen *protein of interest* limitierend für die enzymatische Umsetzung sein. Aber auch die An- oder Abwesenheit von flankierenden Aminosäuren oder die Reihenfolge der in einem *tag* befindlichen Doppelmotive, sowie die Position des zur Aufreinigung verwendeten Affinitäts-*tags* sind womöglich von Bedeutung. Ebenso spielen eventuelle sterische Hinderungen bei der nachfolgenden Konjugation in gefalteten Proteinen eine bedeutendere Rolle als im Peptid. Daher wurde eine Auswahl an DARPIn-Konstrukten mit unterschiedlicher Position, Anzahl und Zusammensetzung einfacher und doppelter Konjugations-*tags* erstellt.

Das erste Konstrukt 000 war der Ausgangspunkt für die Klonierung der DARPins mit AtsB-Erkennungsmotiven (001 mit SAPAR und 003 mit CTAGR) und die Kombination der Motive zu einem dualen Aldehyd-*tag*. Eine Übersicht der auf diesen grundlegenden DARPins erstellten Modellprotein-Bibliothek ist in **Abb. 15** zu sehen. So wurde ebenfalls mittels *add-on*-PCR (Kapitel 4.1.1) das Konstrukt 002 und 004 erstellt. In diesem C-terminalen *tag* befinden sich die Erkennungsmotive SAPAR bzw. CTAGR jeweils N-terminal zur CTPSR-His₆-Sequenz. Diese Zusammensetzungen wurden von den *in vitro*-umgesetzten Peptiden abgeleitet. Alle Klonierungen wurden mittels *Colony*-PCR oder analytischer Restriktion und anschließender Sequenzierung verifiziert (Kapitel 4.1.4 - 4.1.11). Wie CD-spektroskopische Experimente (*circular dichroism*) zeigten, hat die Anwesenheit eines einfachen oder dualen Aldehyd-*tags* keine störenden Effekte auf die Sekundärstruktur (Krüger *et al.*, 2018).

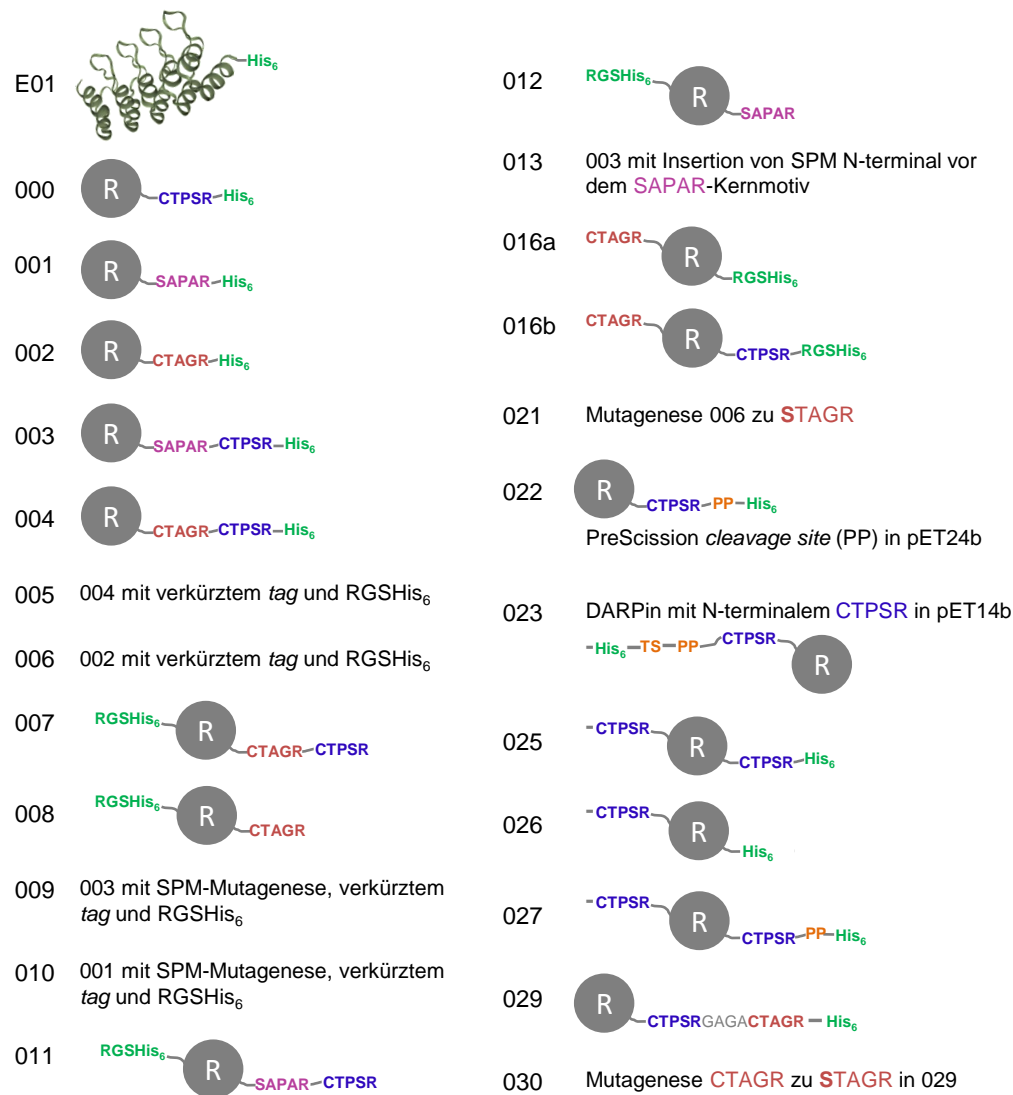


Abb. 15: Modellprotein-Bibliothek. Die Übersicht über erstellte DARPin E01-Konstrukte zeigt neben den Positionen der Affinitäts-tags His₆ oder RGSHis₆, der FGE-Motive CTPSR (blau), der KPAtsB-Motive SAPAR (pink) und der MMAtsB-Motive CTAGR (rot) auch die zusätzlichen Weiterentwicklungen der einfachen und zweifachen Aldehyd-tags im Hinblick auf die Hilfsmotive und die Aminosäuren des Kernmotivs.

Als Ergebnis der Klonierungsstrategie in den prokaryotischen Expressionsvektor pJKME (Kapitel 3.12 und 8.5) befanden sich zwischen der Sequenz für das CTPSR-Motiv und dem Hexahistidin-tag weitere DNA-Restriktionsschnittstellen. Diese wurden in einer erneuten Klonierung entfernt, bei der gleichfalls die Immundetektion mittels Western Blot durch die Verwendung eines RGSHis₆-tags verbessert wurde. Dadurch entstanden die auf 004 und 002 basierenden Konstrukte 005 und 006. Sowohl die N- als auch die C-terminale Verlängerung der SAPAR-Sequenz erwiesen sich in der Umsetzung von Peptiden durch MMAtsB als essenziell (Krüger *et al.*, 2019). Da den Konstrukten 001 und 003 (S/GGGSAPARSMLLTGN) zunächst die putative N-terminale Hilfssequenz (SPM) fehlte, wurde eine Mutagenese zur Verbesserung der Motivakzeptanz durchgeführt. An der Stelle 1851-1853 (G157) wurde die Basenabfolge 5'-agcccgatg-3' eingefügt, welche in dem AS-Motiv GGSPMSSAPARSMLLTGN resultierte (Konstrukt 013;

siehe **Abb. 16 A**). Mit 013 als Ausgangskonstrukt konnte demnach der präzisierte *tag* mit RGS-His₆-Motiv in Konstrukt 009 und 010 dargestellt werden. Um die Fragen zu adressieren, ob eine Umsetzung des CTPSR-Motivs auch ohne C-terminale Verlängerung durch den His₆-tag möglich ist oder ob der Affinitäts-*tag* sich ggf. als störend erweisen sollte, wurden von den einfach- und doppel-getaggen Konstrukten jeweils Varianten kloniert, bei denen das RGSHis₆ N-terminal angehängen wurde (007, 008, 011 und 012). Die erfolgreichen *add-on*-PCRs von 001-012 und die Mutagenese für 013 sind in **Abb. 16 B** zu sehen. Die PCR-Produkte von 001-012 und die analytische Restriktion des Plasmides pJKME_DARPin013 mit *XbaI* und *StuI* wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die *insert*-Größen der einfach- oder zweifach-getaggen DARPin liegen zwischen 520 und 600 bp und der linearisierte Vektor pJKME besteht aus ca. 3800 bp.

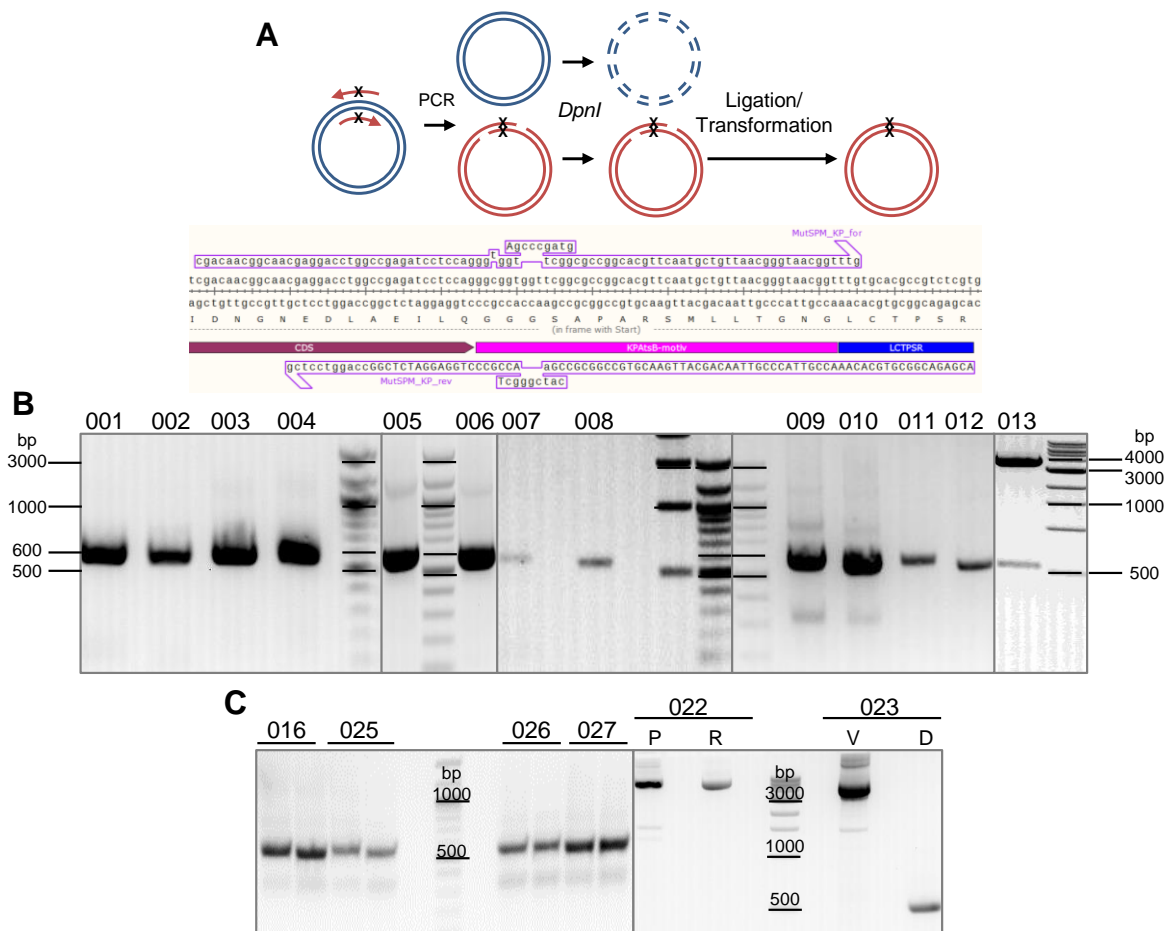


Abb. 16: Klonierung der DARPin-Bibliothek. **A**) Schema und *primer*-Design der Mutagenese des Konstruktes 003 zu 013. **B**) Agarose-Gel der *add-on*-PCR-Produkte 001-012 und analytischer Restriktionsverdau der Mutagenese 013 (*XbaI* und *StuI*). Der Vektor pJKME umfasst ca. 3800 bp und die *inserts* haben eine Größe von ca. 520-600 bp. Die Größenstandards sind der 100 bp-Marker und der 1 kb-Marker, deren Banden bei 4000, 3000, 1000, 600 und 500 bp hervorgehoben sind. **C**) PCR-Produkte der *add-on*-Klonierungen 016 und 025-027, der zweifachen Mutation zum Einfügen der PreScission-Schnittstelle (P) und der Restriktion (R) mit *DpnI* des Konstruktes 022 sowie der Gibson-PCRs des Vektors pET14b (V) und des DARPin 000 mit N-terminaler CTPSR-Sequenz (D) zur Klonierung von 023. Hervorgehoben sind die Markerbanden des 100 bp- bzw. 1 kb-Markers bei 3000, 1000 und 500 bp.

DARPin 016 wurde erzeugt, um die Umsetzung eines N-terminalen CTAGR-Motivs zu testen. Auf der Grundlage von DARPin E01 und 000 wurde ein Konstrukt nur mit N-terminaler (026) und eins mit N- und C-terminaler CTPSR-Sequenz (025) erstellt. Die Abspaltbarkeit des Affinitäts-tags kann durch die Insertion einer PreScission-Proteasespaltstelle (PP) gewährleistet werden. Dafür wurden in einer zweistufigen Mutation die Basen für jeweils vier Aminosäuren der PP-Sequenz in den C-terminalen Aldehyd-tag des DARPin 000 inseriert (022) bzw. zusätzlich mit einem weiteren hFGE-Motiv am N-Terminus versehen (027). Das N-terminale Analogon zu 022 wurde mittels *Gibson Assembly* (Kapitel 4.1.3) erstellt. Anders als bei der klassischen *add-on*-Klonierungsstrategie wurden mittels PCR keine Fragmente erzeugt, die durch die spezifischen Schnittstellen der Restriktionsenzyme zusammengesetzt werden. Stattdessen wurden aufgrund spezieller *primer* komplementäre Regionen in den PCR-Produkten erzeugt, wodurch sich das *gene of interest* (DARPin E01) an die gewünschte Stelle des per PCR linearisierten Vektors (pET14b) setzen ließ. Durch die Erweiterung des DARPin-spezifischen *primers* konnte im selben Schritt das CTPSR-Motiv N-terminal angefügt werden. Das entstandene Fusionsprotein DARPin 023 bestand demnach aus His₆-TS(Thrombinspaltstelle)-PP-CTPSR-DARPinE01.

Nicht nur die Positionen und Kombinationen der Erkennungsmotive wurden in der DARPin-Bibliothek berücksichtigt, sondern auch die Substratspezifität hinsichtlich der Hilfssequenzen und einzelner Substitutionen im Kernmotiv. Dazu konnten die bereits vorhandenen Varianten 029 und 030 sowie 021 genutzt werden. Im Konstrukt 029 wurden, im Vergleich zu den vorherigen Doppel-tags, die Positionen der FGE- und MMAtsB-Motive durch Georg Falck vertauscht und zusätzlich die N-terminal flankierenden Aminosäuren der CTAGR-Hilfssequenz durch die *spacer*-Sequenz GAGA ersetzt. DARPin 030 ist, bis auf die Mutation des Cysteins im CTAGR-Motiv zu einem Serin, identisch zu 029. 021 hingegen trägt das vollständige CTAGR-Motiv von 006 mit der entsprechenden Substitution des Cysteins zu einem Serin.

Insgesamt konnte demnach das Repertoire an Modellproteinen auf 25 Varianten des getaggen DARPins E01 und zwei MBPs (Kapitel 8.1, **Abb. 43** und Kapitel 8.4.5) für die enzymatische Umsetzung mit FGE und AtsB erweitert werden.

5.1.2 *In vivo*- und *in vitro*-Konversion von Modellproteinen durch bakterielles FGE

FGly-Proteinkonjugationen mit aeroben FGEs können sowohl *in vitro* (Smith *et al.*, 2014) als auch *in vivo* (Wu *et al.*, 2009) mittels heterologer Koexpression zum Substrat durchgeführt werden. Eine Anwendung der AtsB-Enzyme hingegen erwies sich aufgrund der oxidationsempfind-

lichen FeS-Cluster und des semi-anaeroben Charakters der Konversionsreaktion *in vitro* als deutlich herausfordernder (Krüger *et al.*, 2019). Im Hinblick auf eine mehrstufige Konversions- und Konjugationsabfolge kann ggf. die Ausbeute des Konjugats erhöht und der Arbeitsaufwand minimiert werden, indem zunächst der erste enzymatische Katalyseschritt *in situ* stattfindet. Im Folgenden sind daher Umsetzungen der DARPin-Konstrukte sowohl *in vitro* als auch im prokaryotischen Expressionssystem aufgeführt.

Aufreinigung und Lagerung der Modellproteine zur *in vitro*-Konversion

Nach erfolgter Klonierung wurde jedes Modellprotein einem Expressionstest in *E. coli* BL21 (DE3) mit IPTG-Induktion unterzogen. Zur *in vitro*-Konversion wurden die Expressionskulturen über Nacht bei 18 °C angezogen, um Proteinaggregationen in *inclusion bodies* zu vermeiden, und durch HisTrap affinitätschromatographisch isoliert. Aufgrund der geringen Ausbeute im *low-copy* Expressionsvektor pJKME wurde eine Umklonierung in das pET24b-Expressionssystem vollzogen. Am Beispiel von DARPin 004 (**Abb. 17 A** und **B**) wird deutlich, dass durch den Wechsel des Expressionssystems eine mehr als vierfache Steigerung der Ausbeute von ursprünglich bis zu 10 mg/L Kultur bei vergleichbarer Reinheit erreicht werden konnte. Das Coomassie-gefärbte Gel der HisTrap von pJKME_DARPin004 (**Abb. 17 B**, oben) zeigt eine vollständige Bindung des Zielproteins an das Säulenmaterial, da die DARPin-Bande bei ca. 20 kDa des Lysats (L), die denen der Elutionsfraktionen entspricht, weder im Durchfluss (FT) noch in den Waschfraktionen (W) zu detektieren war. Das analoge Gel der Aufreinigung aus einer Kultur des pET24b_DARPin004 zeigt stärkere mit dem DARPin korrelierende Banden in Lysat und Elutionsfraktionen, was mit der gesteigerten Absorption des Elutionssignals von ca. 1000 auf 2000 mAU im Chromatogramm (**Abb. 17 A**) übereinstimmt. Darüber hinaus sind sowohl im Durchfluss (FT) als auch in der Waschfraktion (W) noch große Mengen an rekombinantem Protein zu detektieren (**Abb. 17 B**, unten), was für eine Überschreitung der Bindekapazität der Chromatographiesäule (ca. 40 mg) spricht.

Die Eluate der HisTrap wurden mittels *VivaSpin*-Konzentratoren in einen Phosphatpuffer pH 7.2-7.5 umgepuffert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. In **Abb. 17 C** ist die Western Blot-Detektion solcher Proben mittels *Mouse*-anti-PentaHis-Antikörper abgebildet. Die bei -80 °C gelagerten DARPins 002 und 004 weisen im Coomassie-gefärbten Gel Doppelbanden bei knapp unter 20 kDa auf, wohingegen in den frischen Proben von 004 (Gel in **Abb. 17 B**) nur eine einzelne Bande zu detektieren war. DARPins tendierten nach Einfrier-Auftauzyklen zur Degradation, zu sehen an entsprechenden niedermolekularen Banden in der Gelelektrophorese. Als negative Auswirkungen auf die Proteinstabilität ist bei Einfrier-Auftauzyklen (Chang *et al.*, 1996) unter anderem Isomerisierung von Prolinen und eine gesteigerte Protein-Protein-Interaktion besonders an der Proteinoberfläche bekannt, was häufig zu verringerter Löslichkeit

und Stabilität und damit zur Präzipitation von Aggregaten führt (Gekko und Timasheff, 1981; Hamada *et al.*, 2009). Auch das Western Blot-Signal der Probe 002 zeigt Banden bei unter 20 und ca. 15 kDa, wobei für die Hauptbande bei 20 kDa ein deutlich stärkeres Signal detektiert werden konnte. Auffällig ist zudem, dass für DARPin 004 zwar die zu 002 sehr ähnlichen Banden im Coomassie-Gel, allerdings keine Signale im Western Blot detektiert werden konnten. Es könnte sich um ein Problem mit der Detektion des Hexahistidin-tags durch den PentaHis-Antikörper in längeren und ggf. sterisch gehinderten Sequenzen handeln. Deshalb wurden in vielen späteren DARPin-Konstrukten zunächst RGSHis₆-tags (siehe Kapitel 5.1.1, **Abb. 15**, 005-021) und der entsprechende *Mouse*-anti-RGSHis-Antikörper verwendet, welcher in einigen Fällen bessere Resultate erzielte.

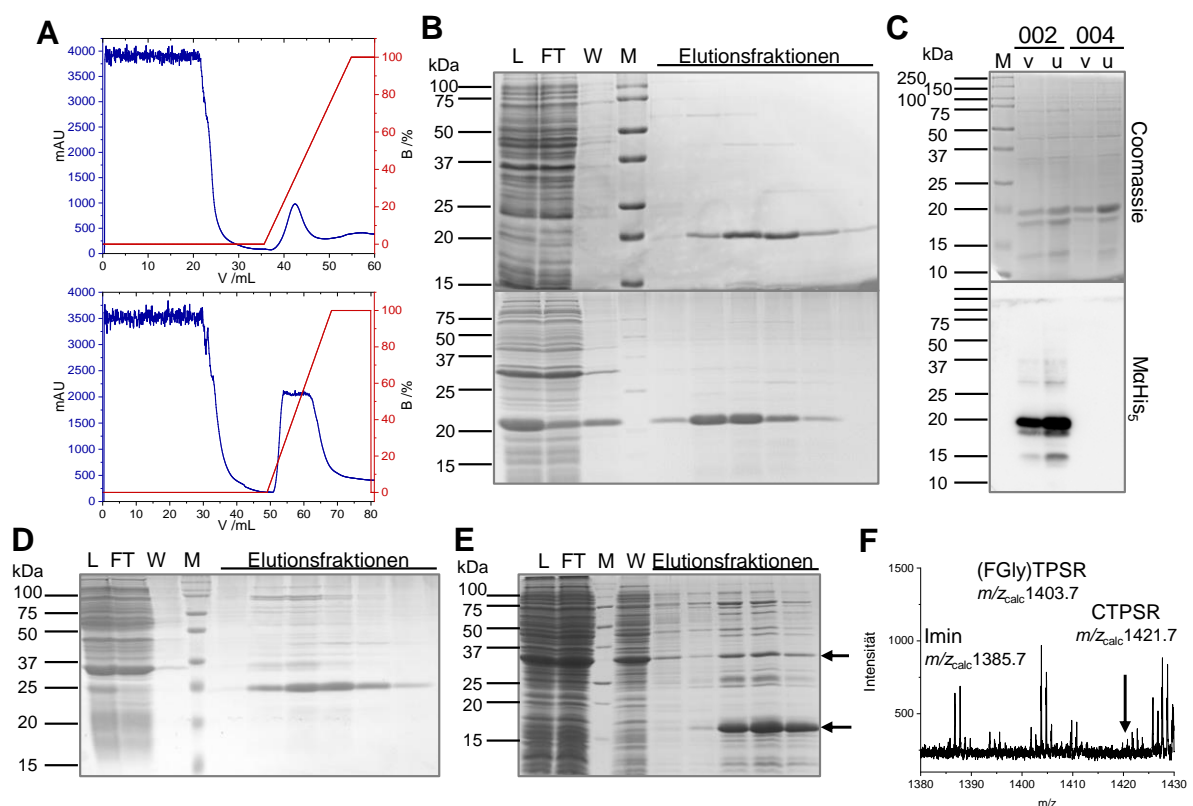


Abb. 17: Expression und Aufreinigung der DARPins. **A)** Ni²⁺-NTA-Chromatogramme von DARPin 004 aus pJKME (oben) und pET24b (unten). Aufgetragen bei 1 mL/min wurden jeweils Lysate aus einer 1,5 L-Bakterienkultur in DARPin-Bindepuffer, gewaschen wurde mit 10-20 mL und eluiert wurde in einem Gradienten an Elutionspuffer (B) von 0-100% über 15 mL, fraktioniert in 1 mL-Fractionen. Detektiert wurde die Absorption bei 280 nm (mAU). **B)** Coomassie-Gel (15%) der HisTraps aus A); oben pJKME_DARPin004 (Elutionsfraktionen je 4 μ L), unten pET24b_DARPin004 (Elutionsfraktionen je 1 μ L). L: Lysat (1:10); FT: Durchfluss; M: Marker; W: Waschfraktion. **C)** Coomassie und Western Blot eines 15% SDS-PAGE-Gels des 1:5-verdünnten (v) oder unverdünnten (u) DARPins 002 bzw. 004. Der Blot wurde mit MaHis₅ und GaM-HRP detektiert. M: Marker. **D)** Coomassie-Gel (15%) einer 250 mL-HisBatch-Aufreinigung von pET24b_DARPin004. L: Lysat; FT: Durchfluss; W: Waschfraktion; M: Marker. **E)** Coomassie-Gel (12,5%) einer 250 mL-Koexpression von DARPin 000 mit MtFGE im pETDuet-Vektor. L: Lysat; FT: Durchfluss; M: Marker; W: Waschfraktion. **F)** MALDI-ToF-MS-Spektrum eines CTPSR-Peptides, welches eine -18-Verschiebung durch die Umsetzung des Cysteins zu FGly und eine weitere -18-Verschiebung zum Imin zeigt.

Im Unterschied zum 002 trägt 004 ein zusätzliches CTPSR-Motiv. Während der Lagerung FGly-haltiger DARPins konnten häufig Aggregate und mehrere kleinere Banden im Coomassie-Gel

detektiert werden (nicht gezeigt), bei denen ebenfalls eine Detektion mittels Western Blot fehlgeschlug. Daher scheint eine Spaltreaktion innerhalb des Aldehyd-tags und ein damit einhergehender Verlust des Affinitäts-tags möglich. Vorherige Beobachtungen legen nahe, dass die CTPSR-Motive während der rekombinanten Proteinausdrucks bereits zu geringen Mengen durch das endogene FGly-generierende System umgesetzt werden. Obwohl das FGly-generierende System in *Escherichia coli* noch nicht identifiziert werden konnte, ist bereits durch die rekombinante Expression von Sulfatasen oder CxPxR-haltiger Proteine in *E. coli* bekannt (Wu *et al.*, 2009), dass das endogene System Erkennungssequenzen vom Typ CxPxR präferiert, zusätzlich aber auch eine breite Variation an Substraten ohne die konservierten Prolin- oder Argininreste akzeptiert werden können (Rush und Bertozzi, 2008). Zudem wurden im *E. coli*-Genom Gene für putative Serin-Typ-Sulfatasen entdeckt, welche ein Vorhandensein eines anaeroben Enzyms ähnlich dem AtsB für die FGly-Generierung nahelegt (Miech *et al.*, 1998; Schirmer und Kolter, 1998). Eine Spaltung Aldehyd-haltiger Peptidsequenzen würde neben den Degradationen zusätzlich einen Verlust des His-tags bei Fragmenten des Proteins 004 erklären. Die Labilität von Formylglycin-beinhaltenen Peptiden wurden bereits durch einen hypothetischen Mechanismus beschrieben, bei dem unter sauren Bedingungen ein nukleophiler Angriff auf die Formylgruppe durch eine benachbarte Carbonylgruppe postuliert wurde (Zhang *et al.*, 2018). Durch Hydrolyse kommt es demnach zur Spaltung des Peptidrückgrats zwischen FGly und C-terminal benachbarten Aminosäuren (**Abb. 18**).

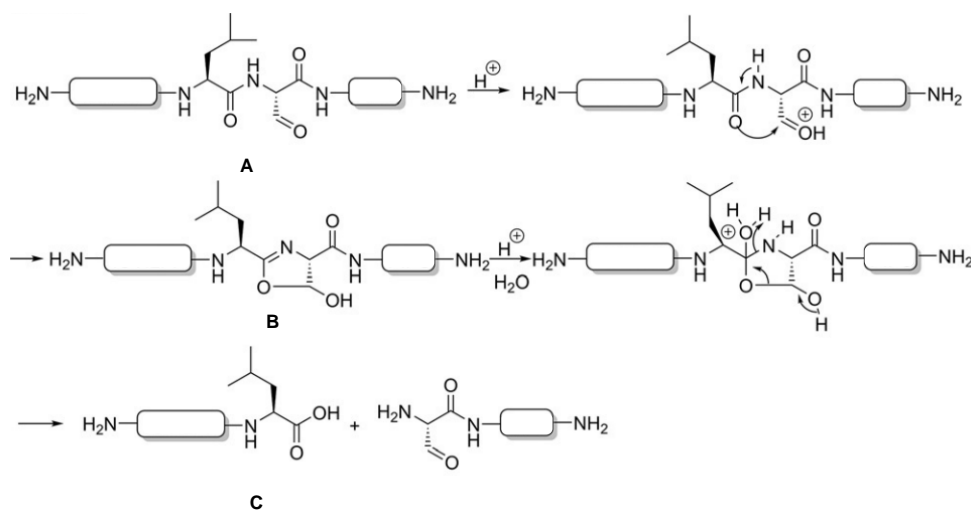


Abb. 18: Postulierter FGly-Spaltmechanismus. Unter sauren Bedingungen greift das Carbonyl der C-terminal benachbarten Aminosäure (A) das C^α-Atom des Formylglycins nucleophil an. Es entsteht ein 4,5-Dihydrooxazol-Intermediat (B), dessen Hydrolyse zu einer Spaltung des Peptides führt (C). Verändert nach Zhang *et al.*, 2018.

Für das Enzym MtFGE war eine starke Präzipitation durch die Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, vorwiegend bei konzentrierten Proben ab ca. 2 mg/mL , bekannt. Diese konnte mit der Zugabe von Arginin zum Lagerpuffer unterdrückt werden. Somit wurden im Allgemeinen auch die

DARPin unter Zugabe von mindestens 50 mM Arginin gelagert. Der Effekt von Arginin und anderen Agenzien auf die Proteinstabilität wird nochmals in Kapitel 5.1.3 erläutert. Auch für humanes FGE wurde bereits die Tendenz zur Aggregation beschrieben, welche durch die Verwendung einer N-terminal verkürzten Version und eines Lagerpuffers mit 8% Glycerol umgangen wurde (Holder *et al.*, 2015).

Bei der Konversion *in vitro* wurden Enzym und Substrat im analytischen (1:200) oder präparativen Maßstab (1:2) miteinander zumeist in Bicin-Puffer bei pH 9 für ca. 16 h bei 22 °C oder 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Analyse mussten Proteinsubstrate anschließend tryptisch in Fragmente gespalten werden. Die Fragmente oder die Peptide wurden anschließend mittels C18-ZipTip-Spitzen gereinigt und massenspektrometrisch vermessen (Kapitel 4.4.19). Wie in dem Beispiel in **Abb. 17 F** zu sehen, kann bei erfolgreicher Konversion von Cys zu FGly eine Massenreduktion von 18 Da ($m/z=1421,7$ zu $m/z=1403,7$) detektiert werden (Peng *et al.*, 2003). Das Signal bei $m/z=1429,7$ stammt vom tryptisch gespaltenen Enzym. Bei einem Serin-Motiv läge die Verschiebung bei -2 Da. Eine mögliche Nebenreaktion ist die Kondensation von Aldehyden mit primären Aminen zu Iminen. Diese Schiff'schen Basen können durch die Reaktion des FGly-Restes mit den Aminogruppen einiger Seitenketten, wie z.B. die des Lysins, oder mit den α -Aminogruppen von N-terminalen Aminosäuren auftreten (Peng *et al.*, 2003; Krüger *et al.*, 2019). Durch den Verlust eines Wassermoleküls lassen sich daher während der Massenspektrometrie weitere um $m/z=-18$ reduzierte Signale detektieren (siehe **Abb. 17 F**; $m/z=1385,7$). Durch den Vergleich der Signalintensitäten der Cystein- bzw. Serin-haltigen Peptide mit den Intensitäten der FGly- und der Imin-Spezies lässt sich, bei angenommener vergleichbarer Ionisierbarkeit aller Spezies, der prozentuale Umsatz ermitteln (Peng *et al.*, 2003). Zusätzlich wurden auch etwaige Disulfide der entsprechenden Cystein-Peptide berücksichtigt.

Heterologe Koexpression bakterieller FGEs mit Modellproteinen

Für die *in vivo*-Konversion von DARPins mit prokaryotischen FGEs wurden koexprimierende Kulturen in *E. coli* BL21 (DE3) hergestellt. Dies geschah auf unterschiedlichen Wegen. Zunächst konnten die Plasmide pET14b_His₆-TS-MtFGE (Amp^R), pET14b_His₆-TS-PP-ScFGE (Amp^R) mit dem entsprechenden DARPin in den Plasmiden pET24b (Kan^R) kotransformiert werden. Da das Plasmid pET28a_His₆-TS-TcFGE (Kan^R) ebenfalls ein Kanamycin-Resistenzgen trägt, konnte es aufgrund der benötigten Selektion mit zwei verschiedenen Antibiotikaresistenzen nur mit einer Kotransformation des pJKME-Vektors (Cm^R) eingesetzt werden. Die DARPin-Konstrukte im pJKME wurden allerdings in einem zu geringen Maße exprimiert, weshalb diese Strategie kaum zu brauchbaren Ergebnissen führte. Zunächst wurden die rekombinanten, His₆-getaggte Enzyme gemeinsam isoliert und ggf. der His-tag der Enzyme proteolytisch abgespalten und somit die FGEs per erneuter HisTrap abgetrennt. Nachteil dieser Methode war die geringe

Effizienz der Kotransformation und die mehrstufige Aufreinigungsprozedur. Alternativ wurde daher die Koexpression zweier Gene auf nur einem Plasmid durchgeführt. Dazu wurde das ungetaggte MtFGE und das His₆-getaggte DARPin-Konstrukt (000, 002 oder 004) in den bivalenten Vektor pETDuet einkloniert. Um Aussagen über den FGly-Gehalt möglichst vieler Konstrukte machen zu können, wurde für die schnelle Aufreinigung kleinerer Mengen im *in vivo*-Ansatz das HisBatch-Verfahren angewandt. Wie in **Abb. 17 D** zu sehen, kann durch dieses Verfahren aus einer 250 mL-Bakterienkultur zwar der DARPin angereichert werden, allerdings nicht in zufriedenstellender Reinheit, was an den vielen Banden größeren und kleineren Molekulargewichts zu sehen ist, die die Elutionsfraktionen verunreinigen. Bei der Säulenchromatographie konnten unspezifische Bindungen und Proteinanlagerungen an Oberflächen zuverlässiger unterbunden werden.

Bei beiden Koexpressionsstrategien war eine starke Überexpression des FGEs und eine im Vergleich dazu eher reduzierte Expression des DARPins sowie eine zusätzlich stark ausgeprägte Aggregation zu beobachten. Bereits in *in vitro*-Ansätzen sind während der Inkubation von DARPin und FGE starke Präzipitationsreaktionen, ähnlich denen der Lagerung, aufgetreten. Basierend auf der Annahme, dass die Aufreinigung und Analyse des Modellproteins in einem größeren Expressionsverhältnis von DARPin zu Enzym zu verbessern wäre, wurden Kolonien mit hoher DARPin- aber schwächerer FGE-Expression selektiert. Um entsprechende Kolonien anzuziehen, musste erneut die Strategie gewechselt werden. Es sollte wiederum eine Kotransformation der DARPin-Vektoren pET24b (Kan^R) mit den nun ungetaggtten Enzymen im pETDuet-Vektor (Amp^R) vorgenommen werden. Dazu wurden die noch fehlenden pETDuet-Plasmide mit den Sequenzen für TcFGE, ScFGE und MMAtsB kloniert (Masterarbeit Anna Witte). Aus Expressionstests konnten nun diejenigen Bakterienkolonien selektiert werden, die das Modellprotein in einem erheblich höheren Level als FGE zu exprimieren scheinen. In **Abb. 17 E** ist das Gel eines Koexpressionsexperiments beispielhaft dargestellt. Die markierten Banden erwiesen sich als His₆-getaggttes DARPin 000 und das ungetaggte Enzym MtFGE. Demzufolge wurde MtFGE auch ohne Affinitäts-tag allein durch die Bindung an den DARPin aus dem Lysat isoliert. Eine erhöhte Anreicherung des unspezifisch isolierten MtFGEs korrelierte mit einer geringen ermittelten Umsatzrate. Dies lag wahrscheinlich an der Präzipitation der DARPin-FGE-Komplexe, welche zumeist aus FGly-haltigem DARPin bestanden haben könnten, wodurch das detektierbare Verhältnis auf die Seite der löslicheren Cys-DARPin-Spezies verschoben wurde. Eine Analyse des Pellets konnte aufgrund der fehlenden Resolubilisierung präzipitierter Proteine keine Aufschlüsse liefern.

Zusammenfassend stellte sich die Umsetzung der Modellproteine *in vivo* als problematisch heraus, da die ermittelten FGly-Gehalte zumeist zwischen 5 und 50% lagen. Für ausreichende Aus-

beuten der Proteinkonjugation wären nahezu vollständige Umsätze im ersten Schritt sinnvoll. In bereits vorangegangenen Studien wurden ebenfalls FGly-Konversionsraten für die natürlichen Substrate der jeweiligen bakteriellen Enzyme ermittelt. So wurde für KP-AtsB ein Umsatz der Sulfatase AtsA *in vivo* von ca. 56% durch Marquardt *et al.*, 2003 und 60% durch Miech *et al.*, 1998 publiziert. Carrico *et al.*, 2007 beschreiben einen Umsatz rekombinanter Proteine (LCTPSR-tag) von über 90% durch MtFGE *in vivo*. In vergleichbaren *in vitro*-Ansätzen wurden DARPin-Umsätze der bakteriellen Enzyme von ca. 80% detektiert, weshalb für die prokaryotischen Enzyme *in vitro*-Konversionen den *in situ*-Konversionen vorgezogen wurden.

Substratspezifität bakterieller FGEs

In **Tab. 28** sind die Ergebnisse der prokaryotischen *in vivo*- und *in vitro*-Experimente für die verschiedenen Cys- und Ser-haltigen Motive am Beispiel von DARPin 004, 010 und 021 zusammengefasst. Da die Konversion eines Serins zu einem Formylglycin allein durch den radikalischen Mechanismus der anaeroben Eisen-Schwefel-Enzyme zu bewerkstelligen ist, wurde für SAPAR und STAGR wie erwartet keinerlei FGly-Konversion durch die Sauerstoff-abhängigen FGEs detektiert. ScFGE, TcFGE und MtFGE setzten allesamt das Prolin-haltige FGE-Motiv um. Die FGly-Konversionen von Sc- und MtFGE lagen *in vitro* ca. bei 60 bis 70% und *in vivo* zwischen 10 und 45%. Wie an den Daten des Proteins 004 zu sehen (**Tab. 28**), wurden in geringen Mengen auch Konversionen des CTAGR-Motivs durch Sc- und MtFGE festgestellt. So konnten Konversionen von 20-25% detektiert werden. Die Substratspezifität scheint hingegen *in vivo* stringenter zu sein als *in vitro*. Eine ausgeprägtere Umwandlung des Cysteinrestes in Prolin-freien Sequenzen wurde ebenfalls beobachtet, sobald die Enzyme *in vitro* unter Zugabe von Kupfer und/oder in einem erhöhten Enzym-Substrat-Verhältnis von ca. 1:2 eingesetzt wurden. Der Effekt von Kupfer auf die Spezifität, der ein Kofaktor des Enzyms FGE zu sein scheint, wurde in Kapitel 5.2.3 gesondert genauer betrachtet. Die hochaktive Variante des TcFGEs zeigte unter den vorliegenden Bedingungen weder *in vitro* (50% CTPSR-Umsatz) eine vergleichbar hohe Aktivität wie die der homologen Wildtypenzyme aus *S. coelicolor* oder *M. tuberculosis*, noch wurde eine Abweichung von der postulierten Substratspezifität detektiert (0% CTAGR-Umsatz).

Die *in vitro*-Konversionen mit den anaeroben Enzymen wurden wie in Krüger *et al.*, 2019 durchgeführt. Aktives KPAtsB konnte für *in vitro*-Experimente nicht in zufriedenstellender Form isoliert werden und wurde daher nur für die bakterielle Koexpression vergleichend hinzugezogen (pASK-IBA7_KPAtsB; Klonierung Anna Witte Masterarbeit). Die Serin-haltigen Sequenzen der DARPins 010 und 021 wurden ausschließlich von MMAtsB konvertiert. Eine Koexpressionskultur für die *in vivo*-Konversion von DARPin 010 mit MMAtsB konnte allerdings nicht erzielt werden. Für beide AtsB-Varianten wurden 5-15% höhere FGly-Konversionen für das CTAGR-

Motiv aus der *K. pneumoniae* Sulfatase AtsA als für das FGE-Motiv (CTPSR) vorgefunden. Der Austausch des Cysteins gegen ein Serin im Prolin-freien Kernmotiv wird hingegen nicht toleriert (Umsatz 0-1%). Dagegen wurde die Prolin-haltige Sequenz SAPAR mit bis zu 20% durch MMAtsB deutlich stärker umgesetzt.

Tab. 28: Gegenüberstellung der durchschnittlichen, prozentualen Umsätze in *in vivo*- und *in vitro*-Ansätzen. Aufgelistet sind die mittels Proteinaufreinigung, tryptischen Verdaus und MALDI-ToF-MS ermittelten prozentualen FGly-Anteile von Serin- (SAPAR oder STAGR) oder Cystein-haltigen (CTAGR oder CTPSR) Erkennungsmotiven in den Modellproteinen DARPin 004, 010 und 021. Die *in vivo*-Konversion wurde durch Koexpression der Modellproteine mit den entsprechenden Enzymen MtFGE, ScFGE, TcFGE, MMAtsB und KPAtsB in *E. coli* erzielt. Mit „/“ gekennzeichnete Paarungen wurden nicht analysiert.

		MtFGE		ScFGE		TcFGE		MMAtsB		KPAtsB	
DARPin		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
004	CTAGR	25%	0%	20%	0%	0%	0%	35%	45%	/	15%
	CTPSR	70%	45%	60%	10%	50%	15%	20%	0%	/	10%
010	SAPAR	0%	/	0%	/	0%	/	20%	/	/	/
021	STAGR	0%	/	0%	/	0%	/	1%	0%	/	0%

Diese Tendenzen lassen sich ebenfalls auf die restlichen Konstrukte der DARPin-Bibliothek übertragen. Wo das STAGR-Motiv in DARPin 021 oder in Peptiden (Krüger *et al.*, 2019) noch zu sehr geringen Mengen durch MMAtsB umgesetzt wurde, ist mit dem Verlust der N-terminalen Hilfssequenz in DARPin 030 *in vitro* keine Konversion zu beobachten. Zu sehen an den Konversionen des DARPin 003 und 011, ist MMAtsB in der Lage Serin zu Formylglycin zu konvertieren, bevorzugt aber Cystein-haltige Sequenzen, unter denen das Prolin-freie CTAGR dem CTPSR (DARPin 004, 005 und 029) vorgezogen wird (Vgl. Krüger *et al.*, 2019). Ähnliches konnte unter den entsprechenden Bedingungen auch für MtFGE und ScFGE beobachtet werden. Eine Umsetzung der DARPins 004, 005 und 007 mit Mt- und ScFGE erzeugte wie erwartet hohe Konversionsraten beim FGE-Motiv, aber auch relativ geringe Umsätze in den CTAGR-Motiven. Die Messungen mit den Varianten 007, 008, 011 und 012 unterscheiden sich nicht signifikant von 001-006, 009 und 010. DARPins mit N-terminalem His₆-tag ließen sich gut exprimieren und konvertieren. N-terminale CTPSR- und CTAGR-Motive hingegen bereiteten Schwierigkeiten bei der Expression und schienen weniger stabilisiert, da sie zu hohen Teilen aggregierten. So wurde das N-terminale MMAtsB-Motiv des DARPin 016 zwar als Substrat erkannt, aber in geringerem Maße umgesetzt als das C-terminale Analogon. So wie auch durch die Nähe zum N-Terminus die Iminbildung begünstigt wird, ist gegebenenfalls die Länge und damit Flexibilität des Linkers entscheidend für die Proteinbindung.

Wie bereits für einige *in vitro*-konvertierte DARPins publiziert werden konnte, stimmen die für die Modellprotein-Bibliothek erhaltenen Daten mit den Peptidassays überein (Krüger *et al.*, 2018, 2019). So war bekannt, dass aerobe Formylglycin-generierende Enzyme auf die Konversion von Cysteinen limitiert sind und die Anwesenheit des Prolins im Kernmotiv benötigen (Dierks *et al.*, 1999; Carlson *et al.*, 2008). Aber auch für das CTAGR-Motiv konnten durch die prokaryotischen Enzyme aus *M. tuberculosis* und *S. coelicolor* geringe Umsatzraten bestimmt werden (siehe außerdem Kapitel 5.2.3). Die hochaktive Mutante des *T. curvata* FGEs hingegen zeigte im Vergleich dazu eine recht hohe Substratspezifität gegenüber Prolin-haltigen Cys-Motiven in Proteinkonversionsreaktionen, die der des humanen Enzyms entspricht. Eventuell ist durch die Mutation der aktiven Tasche eine gewisse Flexibilität in der Substratpeptidbindung verloren gegangen, welche dem TcFGE eine hohe Aktivität auf Peptidebene ermöglicht (Knop *et al.*, 2017), aber gleichzeitig auch die Spezifität für Prolin-Motive heraufsetzt. Die *in vivo*-Experimente haben gezeigt, dass MMAtsB aufgrund des anaeroben Katalysemechanismus sowohl Serin- als auch Cystein-haltige Sequenzen konvertieren kann. Cys-Motive werden allerdings bevorzugt umgesetzt und unter den Cystein-Motiven scheinen sowohl MM- als auch KPAtsB das Prolin-freie CTAGR dem CTPSR vorzuziehen (Krüger *et al.*, 2019). In Übereinstimmung mit den Befunden zum AtsB von *Clostridium perfringens* (Goldman *et al.*, 2013), ist bei der Bildung eines Formylglycins aus einem Serin die Anwesenheit des Prolins (SAPAR) notwendig. Bei der Substratbindung spielt die Anwesenheit flankierender Aminosäuren eine große Rolle. Das Fehlen N-terminaler Hilfsmotive wird im Allgemeinen eher toleriert als das Fehlen C-terminaler Sequenzen. Die räumliche Nähe zwischen zwei Erkennungssequenzen und auch die Reihenfolge der Kernsequenzen innerhalb eines dualen Aldehyd-tags am selben Terminus hat keinen negativen Einfluss auf die FGly-Konversion und kann daher zur Erzeugung mehrfach beladener ADCs genutzt werden.

5.1.3 Der duale Aldehyd-tag am *single-chain* Antikörper

Mit den Erkenntnissen über die enzymatische Umsetzung eines dualen Aldehyd-tags auf Proteinebene wurden zur Erzeugung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten Aldehyd-getaggte Konstrukte des scFv425-Fc-Antikörpers genutzt (siehe **Abb. 19 A**). Dieser dimere *single-chain* Antikörper basiert auf dem EGFR-bindenden *single-chain variable fragment* scFv425 und einem Fc-Teil eines humanen Immunglobulins G1 (IgG1; Müller *et al.*, 1998). Vorteil eines *single-chain* Antikörpers gegenüber einem monoklonalen Antikörper (mAK) ist der einfachere Aufbau. Herkömmliche mAK bestehen aus insgesamt vier Ketten, zwei leichten und zwei schweren Ketten.

Da die variablen Regionen beider Ketten gemeinsam die Epitop-bindende Region bilden, ist dessen vollständige und fehlerfreie Zusammensetzung durch die Ausbildung von ca. acht intermolekularen Disulfidbrücken (Klasse IgG1) limitierend für die biologische Aktivität. Im *single-chain* AK hingegen liegen beide variablen Regionen miteinander verbunden vor, was eine korrekte Assemblierung vereinfacht. Im Vergleich zu einem scFv ohne konstanten Fc-Teil wird durch die Dimerisierung der hier verwendeten Proteine eine Verdoppelung der DAR bewerkstelligt. Das erhöhte Molekulargewicht verlängert die Halbwertszeit des Proteins im Plasma, da kleine Konstrukte wie scFv oder DARPs besonders schnell über die Nieren aus dem Blut ausgeschieden werden (Plückthun, 2015a). Sie müssen eine starke Affinität zur Zielstruktur aufweisen, um in einem hohen Maße an den Wirkort zu gelangen, bevor sie ausgeschieden werden. Dagegen wird die Penetration von solidem Tumorgewebe mit steigender Größe herabgesetzt (Plückthun, 2015a). Der Fc-Teil bietet zusätzlich den Vorteil zur Bindung, Markierung oder Detektion in z.B. ELISA-ähnlichen Anwendungen eingesetzt werden zu können. Er dient als Gerüst für die Konjugation, denn eine C-terminale Konjugation sorgt für eine Vergrößerung des Abstandes zwischen den Antigenbindestellen und dem Konjugat, wodurch das Risiko einer sterischen Hinderung oder einer Repression der Antigenbindung minimiert wird. Drake *et al.* untersuchten die Stabilität von Konjugaten monoklonaler Antikörper, welche mittels enzymatischer FGly-Konjugation und HIPS-Chemie erstellt wurden. Der mA-K wurde dazu entweder in einer leichten Kette (Lc), in verschiedenen Domänen der schweren Kette oder dem C-Terminus mit einer FGE-Erkennungssequenz versehen und mit einem Maytansin-Toxin bzw. dem Fluoreszenzmolekül AlexaFluor A488 konjugiert (Drake *et al.*, 2014). Hierbei wurde ebenfalls die C-terminale Konjugation aufgrund der hohen Zytotoxizität und Stabilität des Produktes favorisiert.

Da von den aeroben Enzymen das Prolin-haltige Cys-Motiv favorisiert und das CTAGR-Motiv von AtsB umgesetzt wurde, wurden mit Hilfe von Georg Falck und Lennard Kasten drei Varianten des scFv425-Fcs kloniert: Sc0 (54179,36 Da) mit C-terminalem Hexahistidin-*tag*, Sc1 (55862,31 Da) mit der hFGE-Erkennungssequenz LCTPSRAALLTGR sowie einem His₆-*tag* am C-terminus jeder monomeren Untereinheit und Sc2 (55462,77 Da) mit einem C-terminalen, dualen Aldehyd-*tag* aus EQSCTAGRAAFITGQLCTPSRTG (**Abb. 19 A**). Das scFv425-Fc-DNA-Konstrukt im Vektor pcDNA5 kodiert zusätzlich für ein N-terminales Signalpeptid, das die Sekretion über die Plasmamembran von Säugerzellen vermittelt und währenddessen abgespalten wird. Dies erleichtert die Isolation. Die resultierenden Proteine wurden anschließend auf Stabilität, *in situ*-Produktion und Ein- und Zweifachkonversion hin analysiert und die biologische Funktionalität der finalen Konjugate ermittelt.

Antikörperreinigung und Lagerung

Die Expression der *single-chain* AK wurde mittels PEI-Transfektion in CHO-Zellen (oder HEK-Zellen) für mindestens zwei Tage und maximal bis zu einer Zellviabilität von ca. 50% durchgeführt, bevor die Proteine direkt oder nach Proteinfällung mittels Protein A-Chromatographie aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt wurden (**Abb. 19 B**). Dabei wurden die Proteine mit einem Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) auf die Säule geladen und mit einem Zitronensäure-Elutionspuffer (pH 3) in vorgelegten Tris-Neutralisationspuffer (pH 9) eluiert (Kapitel 4.4.6). Das exemplarische Coomassie-Gel einer Protein A-Aufreinigung von Sc2 ist in **Abb. 19 C** zu sehen. Die großen Proteinmengen aus dem *load* (L; Bande zwischen 50 und 75 kDa) entsprechen den Proteinen im fötalen Kälberserum, welches von Zellkulturüberständen einer adhärennten CHO-Kultur stammt. Das Sc2-Monomer konnte in sieben Fraktionen bei ca. 50 kDa detektiert werden.

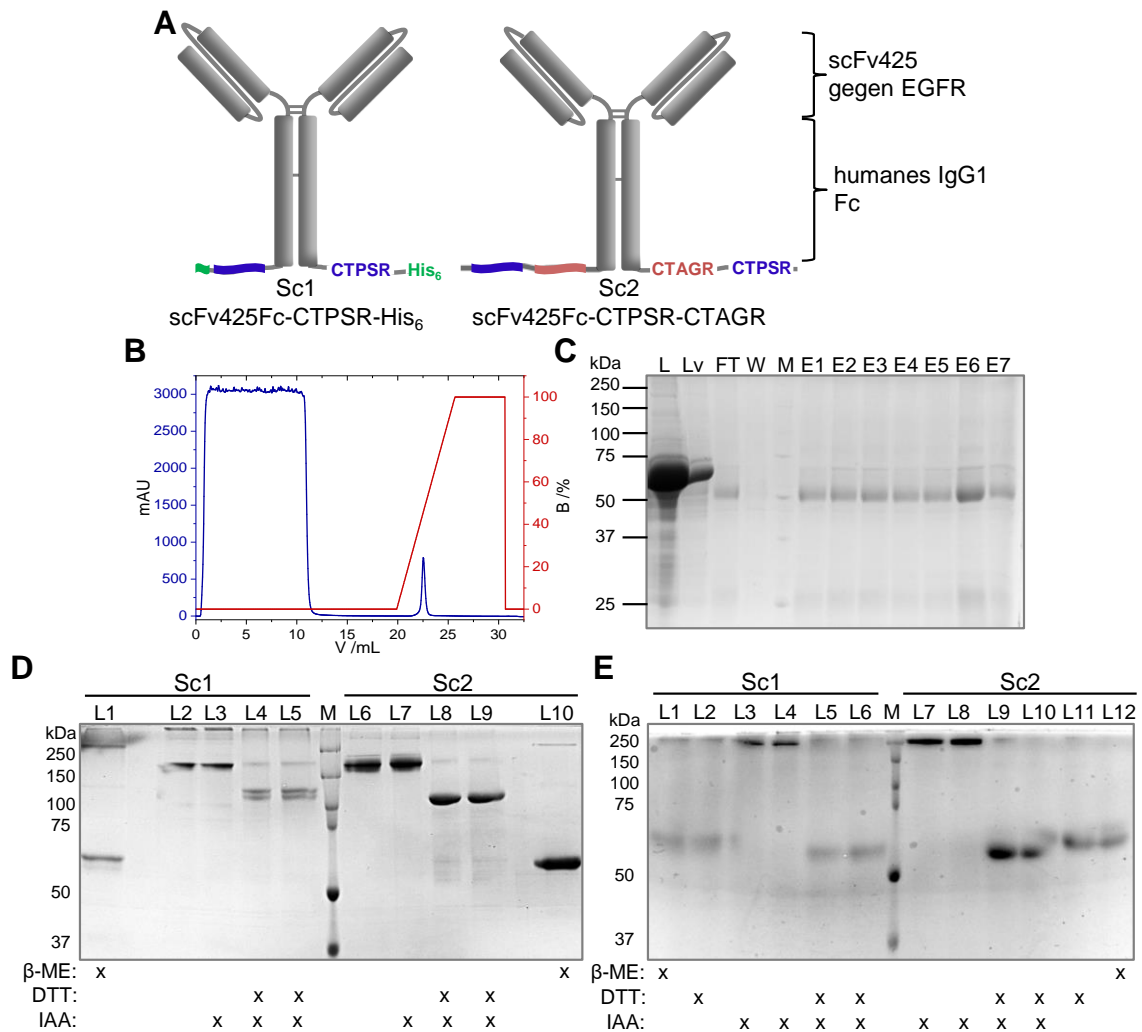


Abb. 19: Die Konstrukte des *single-chain* Antikörpers scFv425-Fc. **A)** Schema der Konstrukte Sc1 mit CTPSR-Motiv sowie His₆-tag und Sc2 mit CTAGR- und CTPSR-Motiv. Der Antikörper besteht aus einem Dimer von Fusionsproteinen aus dem EGFR-bindenden *single-chain variable fragment* (scFv425) und dem Fc-Teil (*crystallizable fragment*) eines humanen Immunglobulins G1 (IgG1). **B)** Chromatogramm der Protein A-Aufreinigung des Sc2 aus der Proteinfällung eines 100 mL-CHO-Zellkulturüberstandes. Die 1 mL HiTrap ProteinA HP wurde bei 1 mL/min beladen, mit 8 mL Bindepuffer gewaschen und die Proteine in einem linearen Gradienten von 0-100% B (Elutionspuffer) über 5 mL in vorgelegten Neutralisationspuffer (100 µL) à 0,5 mL-Fractionen eluiert. Die Absorption wurde bei 280 nm detektiert (mAU). **C)** Reduzierendes Coomassie-Gel der Protein A-Aufreinigung aus B). L: *load*; Lv: L 1:10 verdünnt; FT: Durchfluss; W: Waschfraktion; M: Marker; E1-7 Elutionsfraktionen. **D)** Coomassie-Gel (10%) der Proteine Sc1 und Sc2, welche entweder nativ, reduziert und denaturiert mit 5% β-ME (5 min, 95 °C) oder reduziert mit 2,5 bzw. 10 mM DTT (20 min, 37 °C) aufgetragen wurden. Die Fixierung des Redoxstatus geschah für 15 min bei 37 °C mit 50 mM IAA. M: Marker. **E)** Coomassie-Gel (12,5%) der hitzedenaturierten Proteine Sc1 und Sc2 (5 min 95 °C), welche mit 0, 2,5 oder 10 mM DTT (1 h, 37 °C) behandelt wurden. Die Fixierung des Redoxstatus in L3-10 geschah für 15 min bei 37 °C mit 50 mM IAA. Zur Kontrolle wurde mit β-ME reduzierter Sc1 und Sc2 aufgetragen. M: Marker.

Die Analyse der *single-chain* Antikörper in reduzierenden und nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Gelen (**Abb. 19 D** und **E**) gibt Aufschluss über die Oligomerisierung der AK und ihrer elektrophoretischen Mobilität. Durch die Behandlung sowohl mit 2,5-10 mM DTT (**E**, L2, L5, L6, und L9-11) als auch mit 5% β-Mercaptoethanol (**D**, L1 und L10; **E** L1 und L12) ist das Monomer mit ca. 56 kDa nachzuweisen, wohingegen native Antikörper-Konstrukte (**D**, L2-3, L6-7 und **E**, L3-4, L7-8) eine dem Dimer zuzuweisende Bande zwischen 150 und 250 kDa (10%iges Gel) produziert. Der Redoxstatus der Proteine kann durch die Behandlung mit Iodacetamid (IAA) fixiert

werden. Dadurch werden freie Thiolgruppen derivatisiert, wodurch sie nicht mehr zur Bildung von Disulfiden zur Verfügung stehen. Ein *disulfide shuffling* wird unterdrückt. Mit IAA-Fixierung wird das Laufverhalten des Dimers nicht und das des Monomers nur geringfügig verändert, wodurch letztere Signale leicht zu kleineren Molekulargewichten verschoben wurden (siehe **Abb. 19 E**, Vgl. L9-10 mit L11-12). Über die Zugänglichkeit und Labilität der Disulfide des *single-chain* AK gibt eine milde Reduktion ohne Denaturierung Aufschluss. Wird den Antikörperkonstrukten Reduktionsmittel bei kurzer Inkubation bei lediglich 37 °C zugesetzt, sind Banden bei knapp über 100 kDa zu detektieren, welche dem Molekulargewicht eines noch dimeren Antikörpers entsprechen würde (**Abb. 19 D**, L4-5 und L8-9), dessen elektrophoretische Mobilität durch die Auflösung Solvent-exponierter Disulfide gesteigert wurde. Zumeist führt die Behandlung mit Reduktionsmitteln wie DTT und β -ME allein noch nicht zum Aufbrechen der internen Disulfide von Antikörpern (Willner *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2010; Abdollahpour-Alitappeh *et al.*, 2017), wodurch die Struktur zunächst nur geringfügig kleiner oder kompakter wird und eine höhere Laufgeschwindigkeit beobachtet werden kann. Erst durch die Zufuhr von Hitze wird der denaturierende Effekt verstärkt und abgeschirmte Disulfidbrücken im Proteininneren für eine Reduktion zugänglich (Willner *et al.*, 1993; Abdollahpour-Alitappeh *et al.*, 2017). Die Reduktionen und IAA-Behandlungen weisen auf eine korrekte Ausbildung der Disulfide im getaggen scFv425-Fc hin.

Auffällig ist, dass in **Abb. 19 D**, L4 und L5 Doppelbanden zu detektieren sind. Inter- und intramolekulare Disulfide beeinflussen die dreidimensionale Struktur des Dimers und somit auch das Laufverhalten im Gel. Eine Abweichung im Laufverhalten könnte daher durch das Einfügen zweier weiterer Cysteine im dualen Aldehyd-*tag* hervorgerufen worden sein. In einem elektrophoretischen Vergleich zwischen Sc0 und Sc2 (siehe Kapitel 5.3.1 und Kapitel 8.1, **Abb. 44**) konnte gezeigt werden, dass Unterschiede im Laufverhalten und das Auftreten der Doppelbanden nur bei unvollständig oder nicht-reduziertem Sc2 auftreten, nicht jedoch bei Sc0. Dieser Effekt kann demnach allein oxidierten Cysteinen im Aldehyd-*tag* zugesprochen werden. In den dual-getaggen DARPin-Modellproteinen wurde ein entsprechendes Verhalten nicht detektiert. Die DARPins liegen im Gegensatz zu den Antikörpern als Monomere vor. Eine massenspektrometrische Analyse der exponierten Disulfide des Sc0 und des Sc2-Konstruktes aus dem Gel und in Lösung erlaubte die Betrachtung der entsprechenden Disulfide. Die strukturellen, internen Disulfide des scFv425 (C27-C101) und des Fc-Teils (C294-C354 und C400-C458) schienen sowohl bei Sc0 als auch bei Sc2 unter den vorliegenden Bedingungen unverändert (Kapitel 8.1, **Abb. 44**). Dies geht einher mit einer geringeren Anfälligkeit intramolekularer Disulfidbrücken gegenüber Reduktionsmitteln. Die S-S-Brücken zwischen den Monomeren sind deutlich lösemittel-exponierter (Liu *et al.*, 2010). Für die C-terminalen Cysteine des dualen Aldehyd-*tags*

konnte die Anwesenheit von Disulfiden bestätigt werden. Zwischen den einzelnen Banden des Sc2-Gelsignals wurden jeweils unterschiedliche inter- oder intramolekulare Disulfidbrücken ermittelt (Kapitel 8.1, **Abb. 44**). Wie es scheint, liegen die Cysteine C⁴⁸⁷TPSR und C⁵⁰¹TAGR entweder zu hohen prozentualen Anteilen als gemischte Disulfide vor (C487-C501-Verbrückungen), die zu einer geringeren elektrophoretischen Mobilität führen (obere Bande), oder es herrscht eine Mischung aus vorwiegend C487-C487- und C501-C501-verbrückten Disulfiden (untere Bande).

Als Konsequenz wird die Doppelkonversion von Sc2-Proteinen *in vitro* in Gegenwart von bis zu 5 mM DTT vollzogen, um die Reduktion der Aldehyd-tag-Cysteine und somit eine Zugänglichkeit der Thiolgruppen zu gewährleisten. DTT wird auch für die enzymatische Katalyse des FGEs *in vitro* genutzt. Dies führt zur Monomerisierung der *single-chain* Antikörper, welche im finalen Konjugat zwar wieder reoxidiert werden sollten. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die strukturell wichtigen, intramolekularen Disulfide davon nicht beeinträchtigt werden.

Pufferstabilität

Wie zusätzlich in **Abb. 19 D** zu sehen, sind für Sc1- und Sc2-Proteine sowohl unter DTT- als auch β -ME-Gabe häufig schwächere Banden bei hohen Molekulargewichten (>250 kDa) zu beobachten. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um Aggregate, die sich durch Reduktion, SDS-Beladung und Hitzedenaturierung nicht auflösen ließen. Auch in Lösung wurden zum Teil recht große Mengen an Präzipitaten beobachtet. Diese traten vor allem nach Einfrier-Auftauzyklen auf und wurden durch Zentrifugation oder Sterilfiltration abgetrennt. Hochmolekulare Spezies werden nicht selten bei der Präparation und Lagerung von Antikörpern beobachtet (Sadineni *et al.*, 2014; siehe Kapitel 5.3.2) und sind wahrscheinlich der Aggregation von scFv425 und der Zusammenlagerung der Dimere untereinander zu großen Multimeren zuzuschreiben, die mutmaßlich noch durch Disulfidbrückenbindungen der freien Cysteine des *tags* unterstützt wurden. Für die scFv-Fragmente ist zwar das Monomer die thermodynamisch stabilste Form, allerdings wurden auch beim scFv425 Bedingungen, wie ein hoher Salzgehalt oder saurer pH-Wert, beschrieben, die den oligomeren Zustand begünstigen (Arndt *et al.*, 1998). Besonders starke Stabilitätsprobleme nach Einfrier-Auftauzyklen wurden vorwiegend beim Sc1-Antikörper beobachtet. Da abgesehen von der Anzahl der Cysteine der größte Unterschied im Vergleich zwischen Sc1 und Sc2 im His₆-tag besteht, übt dieser Affinitäts-tag eventuell einen großen Einfluss auf das Löslichkeitsverhalten des Konstruktes Sc1 aus. Polyhistidin-Affinitätskonstrukte können strukturelle Veränderungen und Oligomerisierungen bis hin zu Aggregationsproblemen auslösen, wodurch diese *tags* bei pharmazeutischen Anwendungen, nicht zuletzt wegen des Risikos einer erhöhten Immunogenität des Fusionsproteins, abgespalten oder gar nicht erst verwendet werden (Khan *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2020).

Wie auch bei FGly-tragenden DARPins und beim zur Präzipitation neigenden MtFGE (siehe Kapitel 5.1.2), wurde Arginin zur Lagerung hinzugefügt. Nachteil der Lagerung in Arginin ist die Unverträglichkeit mit der HIPS-Konjugationschemie (persönliche Kommunikation T. Krüger), was einen weiteren Umpufferungsschritt und damit einhergehende Proteinverluste nach sich zog. Zur Lösung dieses Problems wurde die Verträglichkeit verschiedener Puffer und Zusätze gescreent. Bei der kurzzeitigen Inkubation bei RT, 1 h bei 37 °C und über Nacht bei 4 °C wurde ein pH-Bereich von 3,0-13,0 abgedeckt und stabilisierende Effekte der möglichen Zusätze Arginin, Triton X-100 und Glycerin dokumentiert. Neben Guanidiniumhydrochlorid und einigen Salzen ist Arginin ein bekanntes Faltungs- und Stabilisierungsreagenz für Proteine. Es wird, ähnlich wie Glutathion, in Konzentrationen von 0,1-2 M für das Rückfalten von Proteinaggregaten und auch zur Unterdrückung von *inclusion bodies* aus vorwiegend Disulfid-haltigen Proteinen während der rekombinanten Expression in *E. coli* eingesetzt (Tsumoto *et al.*, 2004). Auch zur Lagerung von Proteinlösungen können einige Zucker, Detergenzien und Aminosäuren verwendet werden. So verhindert Glycerin die Bildung von schädlichen Eiskristallen und Arginin stabilisiert die Proteinstruktur, indem Protein-Protein-Interaktionen unterdrückt werden (Hamada *et al.*, 2009). Der niedrige pH-Wert während der Elution rekombinanter Antikörper von Protein A-Matrizes kann zu einer teilweisen Entfaltung des Proteins und infolgedessen zur erhöhten Aggregation während der Neutralisation führen (Tsumoto *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2014). Deshalb kann schon bei der Chromatographie eine höhere Ausbeute an stabilem Antikörper durch die Elution mit z.B. Magnesiumchlorid bei neutralem pH oder in Anwesenheit der Aminosäuren Histidin bzw. Arginin erzielt werden (Arakawa *et al.*, 2004; Ejima *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse der Testreihe sind in **Tab. 29** aufgelistet. Herausstechend ist zunächst der pH-Bereich, in dem die Lagerung des Antikörpers zufriedenstellend möglich war. Dieser beschränkte sich auf den leicht sauren bis neutralen Bereich, wobei basische Bedingungen nur im Ammoniumacetat-Puffer bei pH 8 und im Glycin-Puffer bei pH 11 unter der Anwesenheit von 50 mM Arginin toleriert wurden. Dies entsprach in etwa dem Bereich rund um die isoelektrischen Punkte der jeweiligen Proteine (pI Sc0= 6,46; Sc1= 6,60; Sc2= 6,38; ExPASy). Da der pI dem pH-Wert entspricht, bei dem das native Protein nach außen hin eine Nettoladung von Null aufweist, befindet sich bei diesem pH-Wert die Löslichkeit zumeist am Minimum. Auch Glycerin und Triton erwiesen sich nicht als förderlich. Dagegen konnte ein positiver Effekt des Arginins detektiert werden. Dieser Effekt lässt sich mit der Guanidiniumseitenkette erklären, die sowohl Phosphate binden als auch mit den delokalisierten π -Systemen von aromatischen Aminosäuren interagieren kann (Nozaki und Tanford, 1970; Flocco und Mowbray, 1994).

Tab. 29: Puffer-Screen für die *single-chain* Antikörper. Es wurde die Stabilität eines scFv425-Antikörpers unter den verschiedenen Pufferbedingungen bei kurzzeitiger Inkubation bei Raumtemperatur, zusätzlicher Inkubation für 1 h bei 37 °C und anschließender Lagerung über Nacht bei 4 °C nach ungeeignet (-, rot), möglich (o, weiß) und sichtbar verbessert (+, grün) beurteilt. Eingesetzt wurden Citrat-, Phosphat-, Tris-, Ammoniumacetat-, Glycin- und der Protein A-Aufreinigungspuffer über einen pH-Bereich von 3,0-13,0. Mit einem „/“ markierte, grau hinterlegte Felder entsprachen nicht getesteter Bedingungen.

Puffer	pH	ohne Zusätze	50 mM Arginin	2% Glycerin	0,1% Triton X-100
Citratpuffer	3,0	-	/	/	/
	4,0	-	/	/	/
	5,0	-	/	/	/
	6,0	-	/	/	/
Phosphatpuffer	5,0	o	o	o	o
	6,0	+	o	o	o
	7,0	+	+	o	o
	8,0	-	+	/	/
Trispuffer	7,0	-	+	o	o
	8,0	o	-	/	/
	9,0	-	-	-	-
Protein A-Puffer	7,0	o	+	-	-
Ammoniumacetat	8,0	o	-	-	-
	9,0	-	/	/	/
	10,0	-	/	/	/
Glycin	11,0	-	+	/	/
	12,0	-	/	/	/
	13,0	-	/	/	/

Schmelztemperaturanalyse

Zur Analyse, ob gewisse Pufferbedingungen einen Effekt auf die Schmelztemperatur und damit direkt auf die Stabilisierung der Proteinstruktur haben, wurde die *differential scanning fluorimetry* (DSF; Kapitel 4.4.20) durchgeführt. Dazu wurde die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes *SYPRO Orange* in Anwesenheit von jeweils 0,1 mg/mL *single-chain* Antikörper während des Temperaturan- und -abstiegs zwischen 24 und 95 °C detektiert und die Schmelztemperaturen der Proteine (T_m) in einem pH-Bereich von 3,0-6,5 (saurer Ansatz) bzw. 7,0-9,0 (basischer Ansatz) unter verschiedenen Salzkonzentrationen (20-1000 mM NaCl) als *Heatmap* dargestellt (**Abb. 20 A und B**).

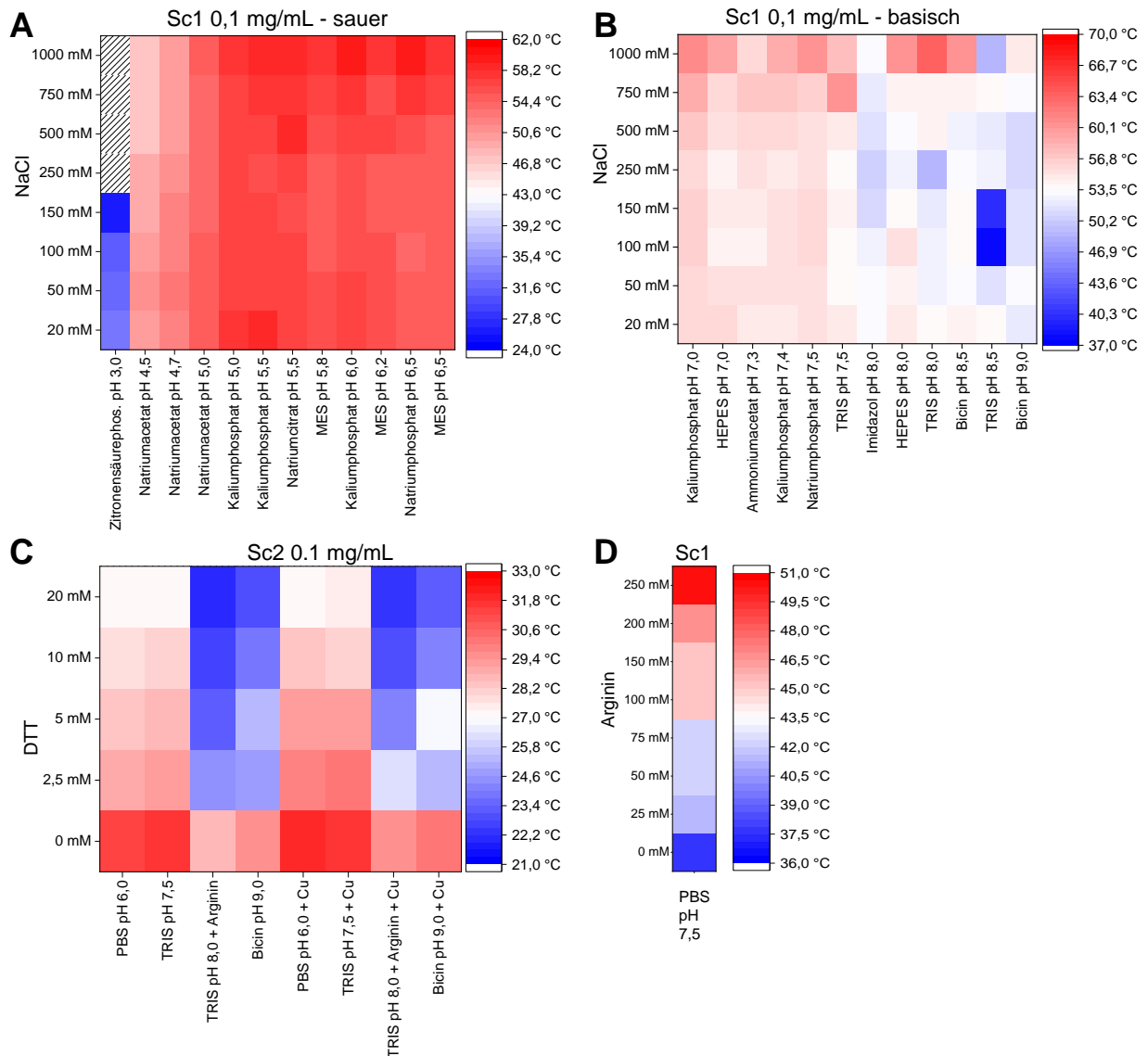


Abb. 20: Heatmaps der DSF-Puffer-Screens des single-chain Antikörpers. A) Saurer DSF-Ansatz (pH 3,0-6,5) des Sc1 (0,1 mg/mL) unter steigender Salzkonzentration (20-1000 mM NaCl). $T_{m,min}=37,5\text{ °C}$; $T_{m,max}=69,1\text{ °C}$. **B)** Basischer DSF-Ansatz (pH 7,0-9,0) des Sc1 (0,1 mg/mL) unter steigender Salzkonzentration (20-1000 mM NaCl). $T_{m,min}=26,8\text{ °C}$; $T_{m,max}=61,6\text{ °C}$. **C)** DTT-DSF-Ansatz (pH 6,0-9,0) des Sc2 (0,1 mg/mL) mit und ohne CuSO_4 (+Cu; 15 μM) unter steigender DTT-Konzentration (0-20 mM). $T_{m,min}=22,0\text{ °C}$; $T_{m,max}=32,0\text{ °C}$. **D)** Arginin-DSF-Ansatz (pH 7,0) des Sc1 (0,1 mg/mL) unter steigender Arginin-Konzentration (0-250 mM). $T_{m,min}=36,7\text{ °C}$; $T_{m,max}=50,5\text{ °C}$.

Deutlich erkennbar ist die Tendenz, dass im sauren Bereich die stabilisierenden Effekte bei pH 5,0-6,5 erreicht werden konnten ($T_m > 54\text{ °C}$). In diesem Bereich konnte mit zunehmender Salzkonzentration eine allgemeine Tendenz zu steigender Schmelztemperatur beobachtet werden, wobei die maximale Schmelztemperatur von $61,5\text{ °C}$ im Natriumphosphatpuffer bei pH 6,5 und maximaler Salzkonzentration detektiert wurde. Bei leichter Erhöhung des pH-Wertes (Natriumphosphat pH 7,5) wurde bereits eine Reduktion der Schmelztemperatur um $8,2\text{ °C}$ verzeichnet. Die höchsten Werte des basischen DSF-Ansatzes wurden bei Kaliumphosphat pH 7,0 und ebenfalls maximaler Salzkonzentration ermittelt ($T_{m,max}=63,6\text{ °C}$). Je höher der pH-Wert, desto geringer war die ermittelte Schmelztemperatur des Sc1-Proteins, wobei sehr hohe Salzkonzentrationen diesen Effekt abmilderten ($> 750\text{ mM}$). Das Minimum im basischen Screen wurde bei

Tris-Puffer pH 8,5 und 100 mM NaCl detektiert ($T_{m,min}=37,6$ °C). Auch ein Unterschreiten von pH 4,5 führt zu einem drastischen Abfall der Schmelztemperatur ($T_{m,min}=26,8$ °C). Die Tendenz, dass der Antikörper zwischen pH 5 und 7 stabil und im basischen ab pH 8 instabiler wird, korreliert mit den vorherigen Beobachtungen im Puffertest.

Durch die DSF-Analyse konnten auch die Einflüsse von Kupfersulfat (+Cu; 15 μ M) und DTT (0-20 mM) auf die *single-chain* Antikörper untersucht werden (**Abb. 20 C**). Wie erwartet, wurde mit steigender DTT-Konzentration eine Senkung der Schmelztemperatur beobachtet, da die Disulfidbrücken des Antikörpers aufgebrochen wurden. Dieser Effekt war allerdings in basischen Puffern deutlich stärker ausgeprägt. Sowohl mit und ohne Kupferzugabe lagen die jeweils geringsten Schmelztemperaturen bei ca. 22 °C in Tris mit Arginin pH 8,0 und 20 mM DTT vor. Durch Kupferzugabe hingegen wurde ein allgemeiner Anstieg der Schmelztemperatur um durchschnittlich 0,6 °C detektiert. Auch Moggridge *et al.*, 2017 konnte durch DSF-Analysen von Antikörpern eine besonders hohe Stabilität bei pH 6-8 verzeichnen. Bicinpuffer bei pH 9 hingegen ist für eine längere Lagerung des Proteins nicht förderlich. Zudem wird der Anwesenheit von Metallionen in Antikörperlösungen eine fragmentierende Wirkung zugesprochen. Metall- und vor allem Cu-induzierte Fragmentierungen treten häufig an der *hinge*-Region der AK auf und werden durch einen basischen pH weiter begünstigt (Rustandi und Wang, 2011; Vlasak und Ionescu, 2011). Das Zusetzen Cu-chelatisierender Agentien wie EDTA kann eine solche Nebenreaktion unterdrücken. Mit gleichzeitiger Anwesenheit eines Reduktionsmittels (TCEP) steht die Verwendung von EDTA in der Reaktionslösung allerdings auch im Verdacht die Reaktion des FGEs zu inhibieren (Holder *et al.*, 2015). Die Reaktionsbedingungen der *in vitro*-Konversion von Peptiden durch hFGE, ScFGE, MtFGE und TcFGE zeigen allerdings, dass EDTA allein, in Kombination mit DTT und/oder Kupfer sich nicht negativ auf den Erfolg der Reaktion auswirkt (Preusser-Kunze *et al.*, 2005; Carlson *et al.*, 2008; Knop *et al.*, 2015). Als Konsequenz für die Konjugationschemie wurde nach der Behandlung mit DTT, Cu und Bicinpuffer eine sofortige Umpufferung des Antikörperkonjugats in phosphathaltigen Puffern bei pH 6,5-7 oder den entsprechenden Reaktionsbedingungen des nachfolgenden Konjugationsschrittes durchgeführt. Eine Reoxidation reduzierter scFv45-Fc-Proteine wird in Kapitel 5.3.2 nochmals beschrieben. Im Kontrast dazu macht die Auftragung von DSF-Messwerten in PBS-Puffer pH 7,5 in Anwesenheit verschiedener Mengen an Arginin (**Abb. 20 D**) deutlich, dass tatsächlich eine Stabilisierung des Proteins durch zunehmende Argininkonzentrationen zu beobachten ist, auch wenn die Zugabe des Arginins nicht zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur im Vergleich zur unbehandelten Probe (Vgl. Natriumphosphat pH 7,5 aus **Abb. 20 B**) führte. Auch in den Studien von Arakawa *et al.* wurde auf einen Effekt des Arginins auf die Reversibilität der Denaturierung, allerdings keiner Veränderung der Schmelztemperatur, hingewiesen (Arakawa *et al.*, 2004). Bei der Erstel-

lung eines ADCs wurde folglich der Fokus auf das Affinitäts-*tag*-freie Sc2-Konjugate gelegt, da ohnehin Doppelkonversionen angestrebt wurden, und zur Lagerung 50 mM Arginin bei neutralem bis leicht saurem pH-Wert eingesetzt.

5.2 Kupferabhängiges FGE in der gerichteten Proteinmodifizierung

Dem humanen Formylglycin-generierenden Enzym wird in der initialen Strategie einer (bio-)orthogonalen, dualen Konjugation von zwei verschiedenen Liganden mittels FGly aufgrund seiner hohen Substratspezifität eine wichtige Rolle zugeteilt (siehe Kapitel 2.4 und 2.6). Daher sollte das hFGE nicht nur allein im Hinblick auf Substraterkennung und Aktivität analysiert und gegebenen Falls durch einen *rational design approach* verbessert werden. Vielmehr kann die Doppelkonjugation mit zwei verschiedenen Enzymen deutlich vereinfacht werden, wenn der erste enzymatische Schritt während der Proteinproduktion (*in situ*) ausgeführt wird. Nach neueren Erkenntnissen ist das FGE eine Kupfer-abhängige Monooxygenase, die das Kupferion als Kofaktor für die Aktivierung des molekularen Sauerstoffs zu benötigen scheint (Holder *et al.*, 2015; Knop *et al.*, 2015). Demzufolge wurde die Möglichkeit einer *in vivo*-Konversion des Antikörperkonstruktes durch das humane FGE und gleichzeitig der Einfluss des Kupfers auf die Enzymaktivität und -spezifität der eu- und prokaryotischen Varianten erörtert.

5.2.1 *In vivo*-Konversionen und *rational design* des humanen FGEs

Bei der *in vivo*-Konversion müssen das Enzym hFGE und der Antikörper als dessen Substrat in Säugerzellen koexprimiert werden. Im endoplasmatischen Retikulum (ER) erkennt hFGE die CxPxR-Aminosäureabfolge in der Polypeptidkette des während der Translation ins ER geschleusten Proteins Sc1 oder Sc2 und konvertiert das Cys zu einem FGly. Anschließend können sich die strukturellen Disulfide ausbilden, das Protein wird gefaltet und die entsprechenden Monomere lagern sich zu dimeren, funktionellen Antikörpern zusammen. Durch das N-terminale Signalpeptid des AK wird die Sekretion über die Plasmamembran der Säugerzelle gesteuert, wodurch das einfach FGly-haltige Produkt aus dem Zellkulturüberstand geerntet werden kann.

Die größte Limitierung der Ausbeute kommt durch eine unvollständige enzymatische Umsetzung im ersten Schritt zustande. Um die Konversionsrate des hFGEs im zellulären System zu steigern, müssen zunächst die natürlichen Bedingungen des endogenen oder heterolog überexprimierten Enzyms verstanden werden. Das humane FGE wird nach der ER-Translokation aus einem Vorläufer durch die Spaltung des aus 33 AS bestehenden, N-terminalen Signalpeptides gebildet und trägt eine N-Glykosylierung an Position 141 (siehe **Abb. 21 A**). Es ist zwar ein ER-ständiges Enzym, kann aber auch der ER-Sortierungsmaschinerie entkommen und über die Plasmamembran sekretiert werden. Die Sekretion wird maßgeblich über die Interaktion mit ERGIC-53 (ER-Golgi *intermediate compartment marker* 53) gesteuert (Fraldi *et al.*, 2008; Mariappan *et al.*, 2008b). Während des Transportes durch das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) wird der N-Terminus des reifen Enzyms durch die Endoprotease Furin abgespalten (Preusser-Kunze

et al., 2005; Ennemann *et al.*, 2013). Die Spaltstelle R⁶⁹YSR⁷² (siehe **Abb. 21 A**) im Wildtyp-Enzym (WT) wird nicht mehr erkannt, sobald die Arginine zu Alaninen mutiert werden (Ennemann *et al.*, 2013). Die Furin-resistente Mutante des hFGEs, im weiteren Verlauf hFGE-RRA genannt, wird zur Herstellung von *full-length* hFGE (fl-hFGE) aus Überständen der Insektenzellkultur verwendet, wohingegen hFGE-WT der Aufreinigung von N-terminal trankiertem hFGE (Δ hFGE) dient. Sekretiertes hFGE kann über den Mannose-Rezeptor bzw. den Mannose-6-Phosphatweg erneut in die Zellen aufgenommen werden (Zito *et al.*, 2007). Der retrograde Transport ins ER dagegen erfolgt hauptsächlich durch die Interaktion der N-terminalen Domäne (NTD) mit ERp44 (ER-resident protein 44) des ER-Qualitätskontrollsystems (Fraldi *et al.*, 2008; Mariappan *et al.*, 2008a; Schlotawa *et al.*, 2018). ERp44 trägt ein ER-Retentionssignal bestehend aus einer vier Aminosäuren langen, C-terminalen Sequenz vom KDEL-Typ (RDEL). Die Aminosäureabfolge KDEL ist ein klassisches, starkes ER-Retentionssignal, das durch membranständige KDEL-Rezeptoren im *cis*-Golgi erkannt wird und somit den retrograden Transport auslöst (Munro und Pelham, 1987; Lewis und Pelham, 1992).

Folglich sollte sich die FGly-Konversionsrate für die *in situ*-Konversion des Sc2-Proteins im Säugerzellsystem steigern lassen, indem die Sekretion des hFGEs unterdrückt und die Relokalisation ins ER gefördert wird. Dies könnte zum einen durch die Unterdrückung der N-terminalen Spaltung sekretierten und wieder endozytierten Enzyms vollzogen werden. Eine Mutation der Furinspaltstelle könnte demnach zu einer vermehrten ER-Retention durch Interaktion mit ERp44 führen. Zum anderen ist bekannt, dass das Anfügen der starken ER-Retentionssequenz KDEL eine zuverlässige ER-Retention des hFGEs auslöst (Mariappan *et al.*, 2008b). Für das *rational design* des hFGEs sollten daher WT- und RRA-Varianten des mit und ohne KDEL-Sequenz hergestellt, auf Lokalisation analysiert und die *in vivo*-Aktivitäten bestimmt werden. Des Weiteren wurde ebenfalls ein alternatives ER-Retentionssignal, das PGEL wie es in dem paralogen FGE (pFGE; SUMF2) zu finden ist, verwendet (Mariappan, 2005; Zito *et al.*, 2005; Gande *et al.*, 2008).

Stabile hFGE-CHO-Suspensionskulturen

CHO-Zellen haben sich sowohl als Expressionssystem für monoklonale Antikörper und Antikörperderivate als auch zur rekombinanten Proteinexpression von stark gefalteten Glykoproteinen etabliert (Trill *et al.*, 1995). Vorteile dieser Produktionsmethode sind die Zelltransfektion mit geringem Zeit- und Arbeitsaufwand und hohem Transfektionserfolg, die vollständige Säugerzell-Glykosylierung sowie die Möglichkeit des viablen Zellwachstums in hohen Zelldichten und unter Serum-freien Bedingungen. Dies begünstigt die Produktisolierung, Reinheit und das Hochskalieren von Produktionsmaßstäben in Suspensionskulturen (Trill *et al.*, 1995; Zang *et al.*, 1995). Aufgrund der Kosten- und Zeitersparnis ist zudem ein stabil exprimierendes System für eine

dauerhafte AK-Produktion einer transienten Transfektion vorzuziehen. Daher sollten neben den CHO-Zelllinien mit stabiler Sc1- bzw. Sc2-Expression (Georg Falck) auch CHO-Zellen mit stabiler Expression verschiedener Enzymvarianten erzeugt werden. Mit dem Flp-In-System von *Invitrogen* wird die Integration einer gewünschten Gensequenz aus dem Vektor pcDNA5/FRT in das Genom der Flp-In-Zelle durch homologe Rekombination ermöglicht (Kapitel 4.3.9).

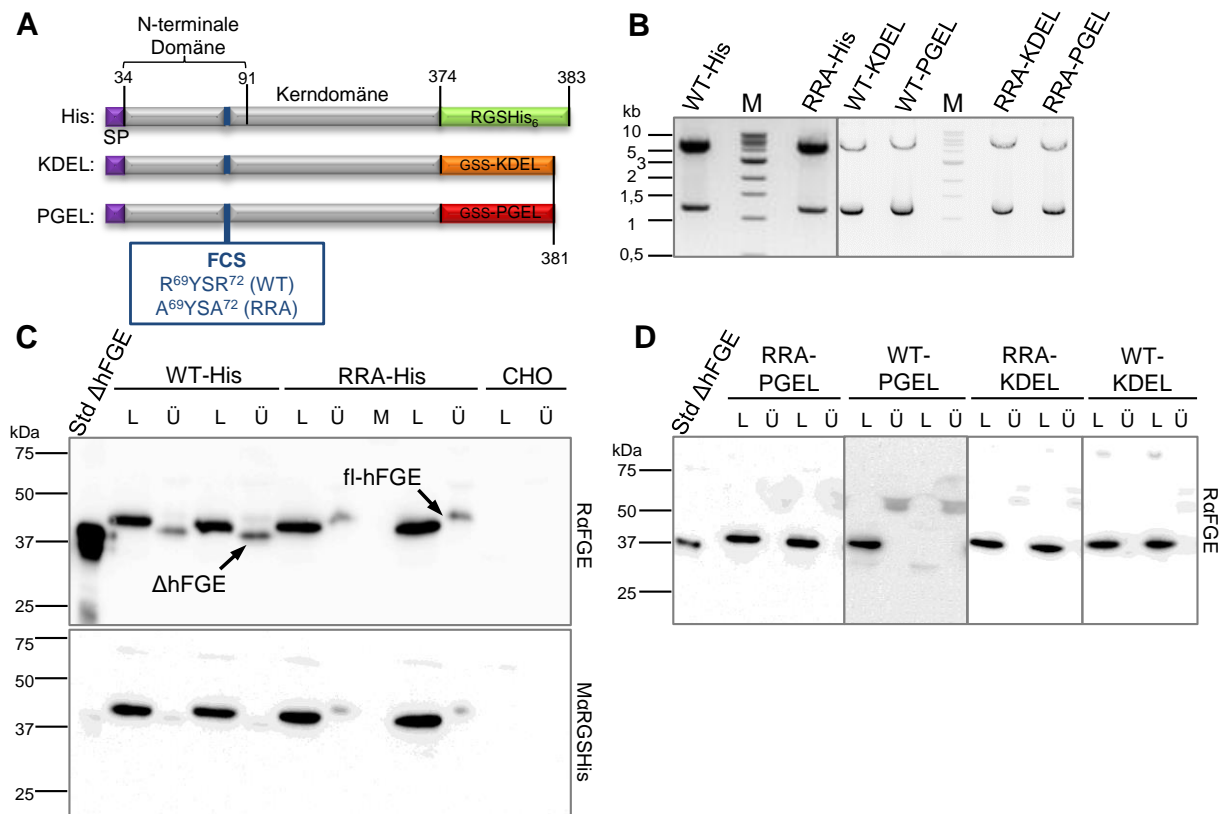


Abb. 21: Varianten des humanen FGEs. **A)** Schema der WT- bzw. RRA-Enzymvarianten hFGE-His, hFGE-KDEL und hFGE-PGEL mit *tags* an Position 374. Durch die Spaltung der NTD an der Furinspaltstelle (Position 69) entsteht im Wildtyp (WT) ein trunkeiertes Δ hFGE (72-381 bzw. 72-383 AS). Die Mutante R69A/R72A (RRA) resultiert in *full-length* (fl)-hFGE (34-381 bzw. 34-383 AS). **B)** Agarosegel der Kontrollrestriktion der pcDNA5_hFGE-Varianten mit *NheI* und *NotI*. **C)** Western Blots verschiedener Klone der stabil exprimierenden CHO-Zelllinien WT-His und RRA-His. Aufgetragen wurden jeweils 30 μ g Gesamtprotein des Zelllysats (L) und des Kulturüberstands (Ü). Als Kontrollen dienten aufgereinigtes Protein (Std Δ hFGE) und untransfizierte CHO-Zellen. M: Marker. Detektiert wurde mittels α FGE- und α R-HRP- (oben) sowie α M α RGSHis- und α M-HRP-Antikörpern (unten). **D)** Western Blots verschiedener Klone der stabil exprimierenden CHO-Zelllinien RRA-PGEL, WT-PGEL, RRA-KDEL und WT-KDEL. Aufgetragen wurden jeweils 30 μ g Gesamtprotein des Zelllysats (L) und des Kulturüberstands (Ü). Als Kontrolle diente aufgereinigtes Protein (Std Δ hFGE). Detektiert wurde mittels α FGE- und α R-HRP-Antikörpern.

In **Abb. 21 A** sind die Schemata der Varianten hFGE-WT- bzw. -RRA-His, hFGE-WT/RRA-KDEL und hFGE-WT/RRA-PGEL dargestellt, welche mittels *add-on*-PCR und den Restriktionsenzymen *NheI* und *NotI* in den Vektor pcDNA5/FRT kloniert wurden (**Abb. 21 B**). Da zur Produktion großer Mengen an rekombinanten Antikörpern Suspensionskulturen verwendet werden, deren Transfektion und Selektion auf stabile Integration allerdings nicht erfolgreich war, wurden zunächst adhärenente Flp-In-Zellen genutzt. Die Transfektion der CHO-Zellen geschah

mittels PEI, wobei eine serielle Verdünnung der mit Hygromycin-selektionierten Zellen zur Gewinnung von Einzelzellkolonien durchgeführt wurde (Kapitel 4.3.9). Hygromycin-resistente und Zeocin-sensitive Klone wurden einem β -Galactosidase-Assay (Kapitel 4.3.10) unterzogen, anschließend sequenziert und die rekombinante Genexpression mittels Western Blot nachgewiesen (**Abb. 21 C und D**).

Die Signale im *Mouse*-anti-RGSHis-Blot (**Abb. 21 C**, unten) sind etwas weniger intensiv aber entsprechen denen des *Rabbit*-anti-FGE-Blots (**Abb. 21 C**, oben) und zeigen eindeutig, dass die detektierten Banden bei knapp über 37 kDa dem rekombinanten, getaggtten Protein zuzuordnen sind. Für das intrazelluläre hFGE wurden Proteinbanden im Zelllysats (L) zwischen 37 und 50 kDa detektiert ($M_{w,calc} = 38,5$ kDa). Endogenes FGE in CHO-Zellen wird durch diesen Antikörper nicht detektiert (siehe Probe CHO). An den Signalen des Überstands (Ü) ist auffällig, dass sie bei der Isoform WT-His niedriger und bei RRA-His höher als die Banden des Lysats liegen. Da sich diese niedrigeren FGE-Signale in etwa auf der Höhe des oberen Standardprotein-Signals (Std Δ FGE) befinden, konnte hier die N-terminal trunke Version des hFGEs detektiert werden ($M_{w,calc} = 34,9$ kDa), wohingegen bei der RRA-Variante wie erwartet das intakte fhFGE sekretiert wurde. Im Vergleich dazu wird in **Abb. 21 D** deutlich, dass bei keiner der KDEL- und PGEL-Varianten, sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutante, eine Sekretion des hFGEs detektiert werden konnte. Die Banden der Lysate liegen allesamt bei knapp 37 kDa ($M_{w,calc} = 38,1$ bzw. $38,0$ kDa) und damit oberhalb des Δ hFGEs. An dem Vergleich zweier Klone von WT-PGEL ist zudem zu erkennen, dass es zum Teil zu Unterschieden in der Proteinexpression innerhalb der positiven Klone einer jeweiligen hFGE-Variante kommen konnte, weshalb zunächst verschiedene Klone unterschiedlichen Expressionsniveaus selektiert wurden. Für alle weiteren Tests wurden Klone vergleichbaren Expressionsniveaus gewählt.

ER-Retention

Zur zusätzlichen Verifizierung, dass die ER-Retentionssignale KDEL und PGEL eine Sekretion des humanen FGEs unterdrücken können, wurden Fusionsproteine aus hFGE, dem Fluoreszenzprotein *enhanced green fluorescence protein* (eGFP) und den ER-Retentionssignalen durch die Klonierung in den Vektor peGFP-N1 erstellt (**Abb. 22 A**), welche der Detektion der intrazellulären Lokalisation dienen sollten. Dazu wurde im Verlauf dieser Arbeit und der Masterarbeit von Anna Witte eine zweistufige Klonierung vorgenommen, die sich aus Gibson Assemblierung und *add-on*-PCR zusammensetzt (siehe Schema in **Abb. 22 B**). Per PCR wurde der Vektor peGFP-N1 linearisiert und die Sequenz für das hFGE-WT bzw. hFGE-RRA aus dem entsprechenden pBI-Plasmid amplifiziert. Die überlappenden DNA-Sequenzen wurden mittels *NEBuilder HiFi DNA Assembly Kit* (Kapitel 4.1.3) so angeordnet, dass das *insert*, welches für das HA-getaggte Enzym codiert, zwischen den Restriktionsschnittstellen für *NheI* und *SacII* eingefügt wurde, so-

dass diese Sequenz für ein Fusionsprotein mit N-terminalem hFGE und C-terminalem eGFP codiert. Dies war notwendig, da ein N-terminales Fusionskonstrukt im hFGE-WT durch die proteolytische Spaltung verloren gehen würde. Nach erfolgter Isolation und Sequenzierung der Plasmide *peGFP-N1_hFGE-(WT)-HA* und *peGFP-N1_hFGE-(RRA)-HA* wurden den Fusionsproteinen mittels *add-on*-Verfahren wiederum C-terminale KDEL- und PGEL-Signale angehängen. Die PCR-Produkte sind in **Abb. 22 C** zu sehen, wobei die Größenunterschiede vom hFGE-PCR-Produkt (1189 bp) zu den *inserts* des KDEL- bzw. PGEL-getaggten hFGEs (1927 bp) und dem des Fusionsproteins ohne ER-Retentionssignal (1907 bp) eindeutig zu beobachten sind.

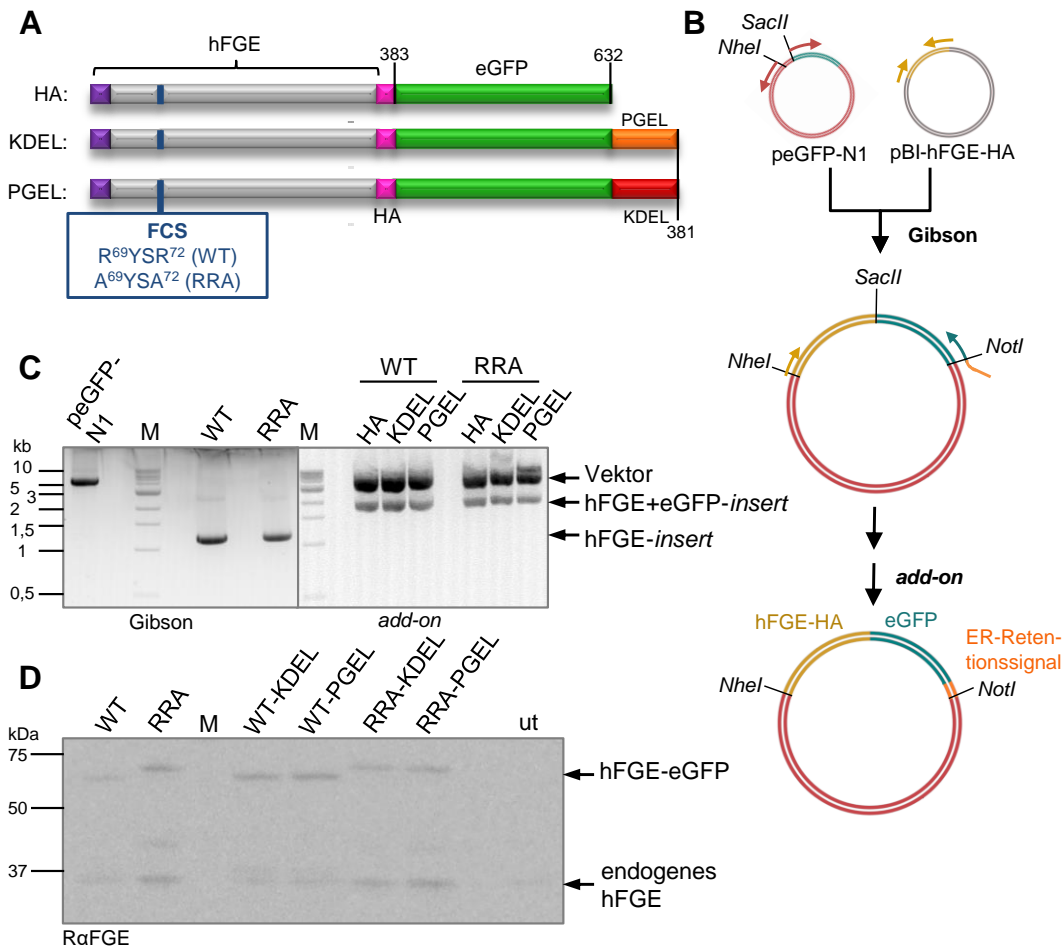


Abb. 22: Die hFGE-eGFP-Fusionsproteine. **A)** Schema der eGFP- (HA), eGFP-KDEL- und eGFP-PGEL-Variante des humanen Wildtyp-FGEs (WT) und ihrer R69A/R72A-Mutante (RRA). **B)** Schema der Klonierungsstrategie der Fusionsproteine aus A) samt Gibson Assemblierung und *add-on*-PCR. Im Gibson-Ansatz wurde der Vektor mittels PCR linearisiert, wohingegen in der *add-on*-Klonierung die Restriktionsenzyme *NheI* und *NotI* verwendet wurden. **C)** Agarosegel der PCR-Produkte aus Gibson Assemblierung (links) und der analytischen Kontrollrestriktion der *add-on*-Klonierung (rechts) mit *NheI* und *NotI*. **D)** Western Blot mit α FGE- und α R-HRP-Antikörpern von HT1080-N1-Zelllysaten, die transient mit den hFGE-eGFP-Fusionsproteinen des Wildtyps (WT), der RRA-Mutante (RRA) und ihrer KDEL- und PGEL-Varianten transfiziert wurden, sowie untransfizierte Zellen (ut) als Kontrolle. M: Marker.

Die entsprechenden Proteine wurden in HT1080-N1-Zellen transient exprimiert und mittels α FGE-Antikörper im Western Blot nachgewiesen (**Abb. 22 D**). Die Signale bei ca. 37 kDa entsprechen dem endogenen FGE. Die Signale zwischen 50 und 75 kDa können den WT- bzw. RRA-Varianten der Fusionsproteine hFGE-HA-eGFP ($M_w = 69,9$ kDa) bzw. hFGE-HA-eGFP-

KDEL und hFGE-HA-eGFP-PGEL ($M_w = 70,3$ kDa) zugeordnet werden. Hierbei fällt wiederum auf, dass die RRA-Varianten etwas langsamer laufen als die WT-Varianten, was auf die Spaltung des N-Terminus im Wildtyp hindeutet.

Die Lokalisationsexperimente ähnelten denen des pFGEs und der Lysozym-Fusionsproteine mit verschiedenen ER-Retentionssignalen, zu sehen in den Immunfluoreszenzen von Lewis und Pelham sowie Gande *et al.* und spiegeln erfolgreich die Ergebnisse der hFGE-Lokalisationsstudien von Mariappan *et al.* wider (Lewis und Pelham, 1992; Gande *et al.*, 2008; Mariappan *et al.*, 2008b). Die Detektion der Fluoreszenzsignale in CHO-Zellen bestätigte die vornehmliche Kolo-kalisation der Proteine mit Retentionssignalen mit dem ER-Markerprotein PDI (Proteindisulfidomerase), wohingegen das Fehlen der entsprechenden Tetrapeptide unter anderem auch eine Kolo-kalisation mit dem *cis*-Golgi-Marker GM130 (Golgi-Membranprotein 130) hervorrief (nicht gezeigt bzw. siehe Masterarbeit Anna Witte). Zwischen WT und RRA hingegen konnte kein Unterschied beobachtet werden. Somit handelt es sich allein bei den KDEL- und PGEL-Varianten um CHO-Zelllinien mit erhöhter ER-Lokalisation des humanen FGEs, wohingegen die Zelllinien mit stabiler hFGE-WT-His- und -RRA-His-Expression das natürliche Verhalten mit partieller Sekretion widerspiegeln.

Antikörperkonversion *in situ*

Die stabilen, adhärenenten CHO-Zellen wurden unter Hygromycin-Zugabe kultiviert, schrittweise an eine Suspensionskultivierung adaptiert und zur Expression der Antikörperkonstrukte transient transfiziert. Zur Kontrolle wurde der Antikörper ebenfalls in der Ausgangszelllinie CHO-Flp-In und humanen HEK-Zellen (HEK *FreeStyle*TM 293-F; Lennard Karsten) exprimiert, anschließend per Protein A-Chromatographie gereinigt und nach dem tryptischen Verdau per MALDI-ToF-MS analysiert. Entsprechende Spektren sind in **Abb. 23**, die berechneten Massen der Fragmente (m/z_{calc}) in **Tab. 30** und die prozentualen FGly-Gehalte in **Tab. 31** aufgelistet.

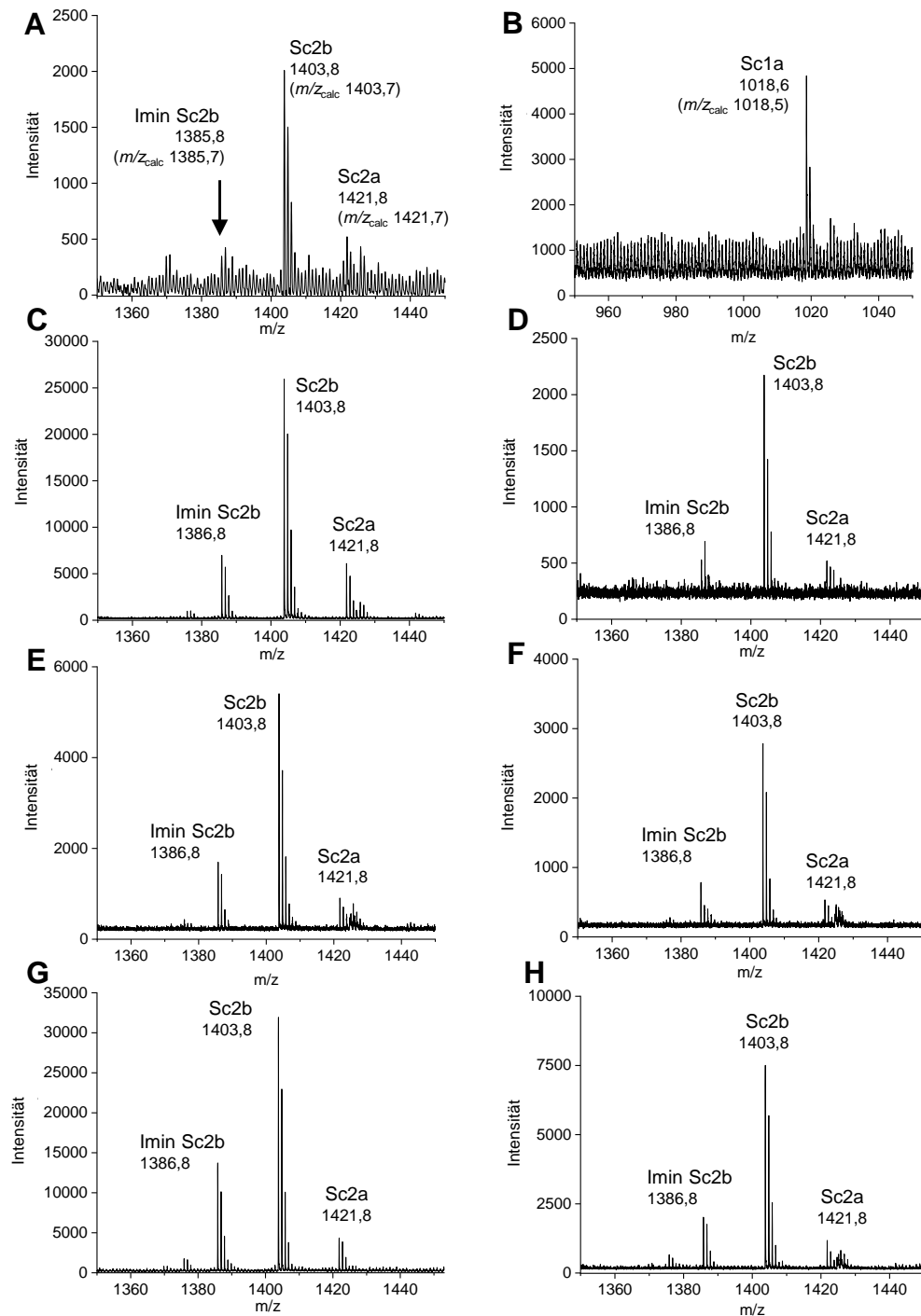


Abb. 23: MALDI-ToF-MS-Spektren der *in vivo*-Antikörperkonversionen. Bestimmt wurde die FGly-Konversionsrate des CTPSR-Motivs der *single-chain* Antikörper, welche in folgenden Zelllinien transient exprimiert wurden, per Protein A-Chromatographie aufgereinigt und tryptisch verdaut wurden: **A)** HEK, **B)** CHO-Flp-In, **C)** stabil hFGE-WT-His-exprimierende CHOs, **D)** stabil hFGE-RRA-His-exprimierende CHOs, **E)** stabil hFGE-WT-KDEL-exprimierende CHOs, **F)** stabil hFGE-RRA-KDEL-exprimierende CHOs, **G)** stabil hFGE-WT-PGEL-exprimierende CHOs, **H)** stabil hFGE-RRA-PGEL-exprimierende CHOs. Die berechneten m/z -Werte des $[M+H]^+$ -Ions der Cys-haltigen Peptide liegen bei $m/z_{\text{calc}}=1421,7$, der FGly-haltigen Peptide bei $m/z_{\text{calc}}=1403,7$ und der Imine bei $m/z_{\text{calc}}=1385,7$.

Tab. 30: Tryptische Fragmente der Proteine Sc1 und Sc2. Angegeben sind die Sequenzen der Aldehyd-*tags* von Sc1 und Sc2, sowie die CTPSR- bzw. CTAGR-haltigen tryptischen Fragmente, deren FGly-haltigen Analoga und deren berechneten m/z -Werte im MALDI-ToF-MS.

Fragment	Sequenz	m/z_{calc} ([M+H] ⁺)
Sc1 (tag)	-GGLCTPSRAALLTGRDIMHHHHHTG	
Sc1a	DIGGLCTPSR	1018,5
Sc1b	DIGGL(FGly)TPSR	1000,5
Sc2 (tag)	-GGEQSCTAGRAAFITGQGLCTPSRTG	
Sc2a	AAFITGQGLCTPSR	1421,7
Sc2b	AAFITGQGL(FGly)TPSR	1403,7
Sc2c	DGGEQSCTAGR	1080,4
Sc2d	DGGEQS(FGly)TAGR	1064,2

Die in den stabilen CHO-Zellen gemessenen Umsätze lagen beim Sc1 zwischen 61,2% und 82,0% und beim Sc2 zwischen 84,7% und 91,7%, wobei die Messergebnisse der Sc1-Konversionen durch Präzipitation der Antikörper in Lösung nicht zur Bewertung der *in vivo*-Konversion herangezogen werden können. Die Umsetzung des CTPSR-Motivs im Antikörper Sc2 wurde durch die hFGE-Koexpression gegenüber dem endogenen hFGE der HEK-Zellen gesteigert. Die höchsten gefundenen Werte der HEK-Expression betragen 82,4% FGly-Anteil im CTPSR-Motiv (siehe **Abb. 23 A**), wohingegen im Durchschnitt (n=3) etwas mehr als 50% des rekombinanten Proteins konvertiert worden war. Ohne die hFGE-Expression in CHO-Flp-In-Zellen wurden durchschnittlich ca. 20% FGly (maximal 59,5%) registriert.

Tab. 31: FGly-Umsätze der *single-chain* Konstrukte mittels *in vivo*-Konversion durch hFGE. Der Antikörper Sc1 oder Sc2 wurde in CHO- bzw. HEK-Zellen transient exprimiert. Das hFGE wurde stabil exprimiert. Aufgelistet ist der maximal gefundene, prozentuale FGly-Gehalt im CTPSR-Motiv.

Zelllinie	Sc1	Sc2
	FGlyTPSR /%	FGlyTPSR /%
HEK	/	82,4
CHO	0,0	59,5
CHO_hFGE-WT-His	61,2	84,7
CHO_hFGE-WT-KDEL	63,9	89,9
CHO_hFGE-WT-PGEL	68,9	91,7
CHO_hFGE-RRA-His	84,3	89,0
CHO_hFGE-RRA-KDEL	57,2	90,1
CHO_hFGE-RRA-PGEL	82,0	90,8

Die drei höchsten FGly-Konversionen von über 90% konnten für hFGE-WT-PGEL, -RRA-KDEL und -RRA-PGEL detektiert werden und der niedrigste prozentuale Umsatz von 84,7% bzw. 89,0% wurden für WT- und RRA-His ermittelt, was auf eine erhöhte *in vivo*-Konversion durch ER-Retention hindeutet. Zwischen Enzymen mit intakter Furinspaltstelle (WT) und der Mutante (RRA) bzw. zwischen denen mit der jeweiligen Sequenz KDEL oder PGEL waren hin-

gegen keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Diese Befunde decken sich mit anderen, analog durchgeführten Studien in CHO-Zellen. So wurde für einen *in vivo*-konvertierten Fc ein FGly-Gehalt von 28-67% durch endogenes FGE (Wu *et al.*, 2009) und 45-91% für transient bzw. 62-77% für stabil koexprimiertes hFGE angegeben (Rabuka *et al.*, 2012). York *et al.* publizierten ebenfalls eine ER-Retentionsstrategie des humanen FGEs während der *in situ*-Produktion von Antikörpern in CHO-Suspensionskulturen. Die ER-Retention stabil transfizierter hFGE-Varianten führte in dieser Studie zwar zu vergleichbaren Umsätzen von 54-97% für die transiente und 92-99% für die stabile Antikörperexpression, allerdings wurde eine Konversionssteigerung vor allem durch Kupferzugabe erzielt (York *et al.*, 2016). Über dieser nahezu vollständigen, enzymatischen Umsetzung in stabilen CHO-Zellen hinaus wurde daher kein signifikanter Effekt durch die Deletion der Furinspaltstelle oder das Anhängen eines KDEL-Peptides an hFGE verzeichnet (York *et al.*, 2016). Eine Zugabe von Kupfer zu den oben genannten Expressionskulturen erzielte hingegen keine detektierbaren Veränderungen. Der Effekt des Kupfers wird nochmals genauer in Kapitel 5.2.2 aufgeführt.

Sulfataseaktivierung *in vivo*

Da die Messung der Umsatzraten mittels MALDI großen Schwankungen unterlag und neben der Enzymaktivität auch von der Ionisierbarkeit der einzelnen Spezies und vom Expressionslevel des Enzyms und Antikörpers in den jeweiligen Zellklonen abhängig war (siehe auch York *et al.*, 2016), wurden die hFGE-Varianten zusätzlich mittels indirekter FGE-Aktivitätsassays analysiert. Der pNCS-Assay und der STS-Assay sind vergleichbare Verfahren und beruhen auf der *in vivo*-Konversion von Sulfatasen durch das hFGE in Säugerzellen. Beim pNCS-Assay handelt es sich um die Arylsulfatase A (ASA), wohingegen beim STS-Assay die Steroidsulfatase (Arylsulfatase C, ASC) eingesetzt wird.

Die Aktivität der Sulfatase im Zelllysat wird mit einem (Pseudo-)Substrat bestimmt und mittels Western Blot-Signalintensitäten auf das jeweilige Expressionslevel angepasst. Die Detektion der Umsetzung geschieht für das Hydrolyseprodukt des pNCS (ASA-Assay) absorptionsspektrometrisch (Kapitel 4.5.5), die Menge an durch STS desulfatiertem ³H-DHEAS dagegen kann durch Messung der Szintillation detektiert werden (Kapitel 4.5.4). Als Kontrolle dienten jeweils untransfizierte Zellen. Zum Vergleich der hFGE-Aktivität aller Varianten wurden die stabilen CHO-Zellen transient mit pBI_STS bzw. pBI_ASA-RGSHis₆ transfiziert. Als zusätzliche Zelllinien ohne oder mit reduzierter endogener hFGE-Hintergrundaktivität konnten darüber hinaus ARPE19-Wildtypzellen (WT) mit den ARPE19 sumf1^{-/-} knock out (KO)-Zellen verglichen bzw. MSD-Patientenzellen (MSDi) transient mit den pcDNA5/FRT_hFGE-Plasmiden der Varianten kotransfiziert werden. Repräsentative Daten dieser Tests, welche mit mindestens zwei biologi-

schen Replikaten durchgeführt wurden, sind in den folgenden Abbildungen dargestellt (**Abb. 24** und **Abb. 25**).

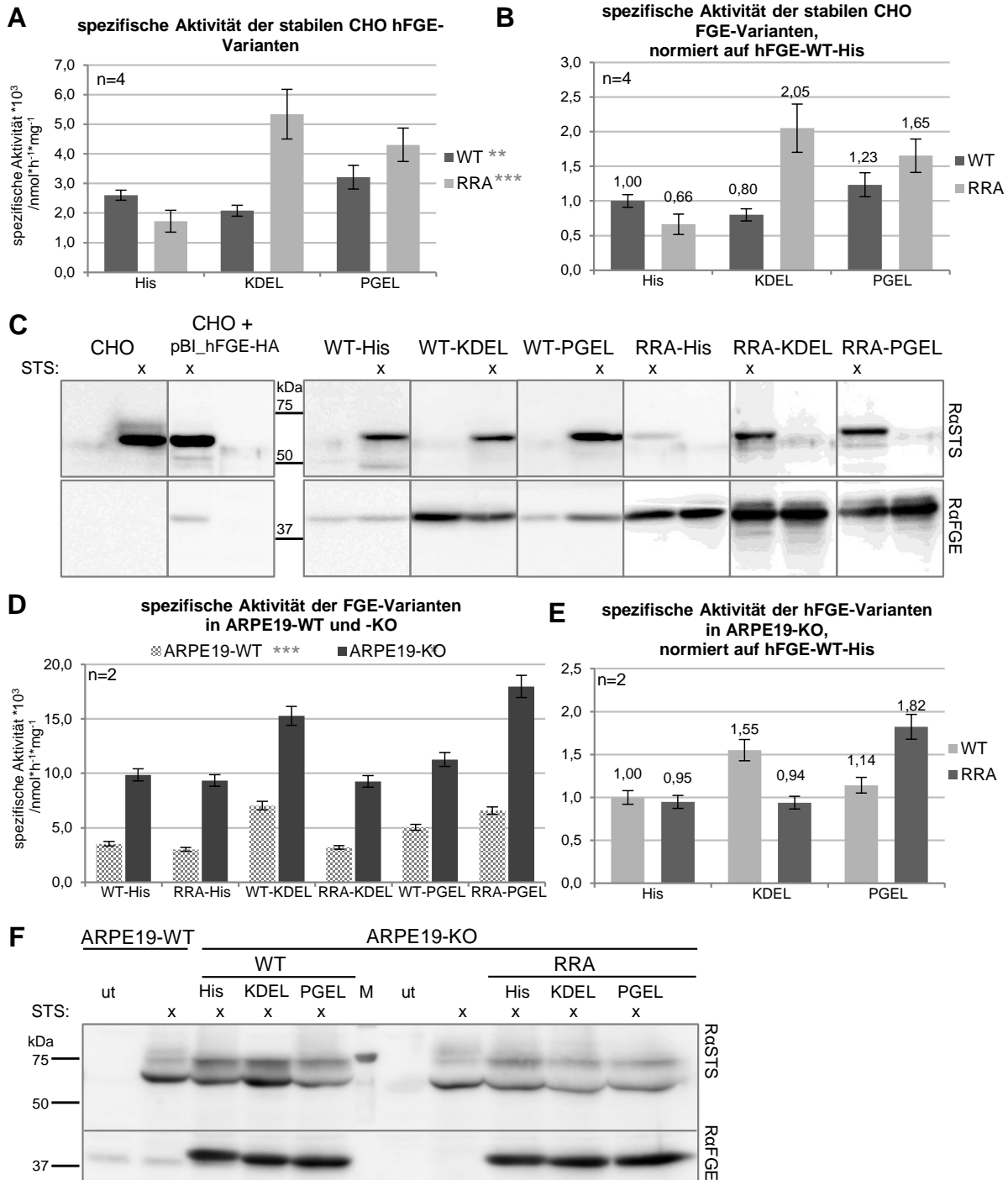


Abb. 24: STS-Aktivität der hFGE-Varianten. **A)** Spezifische Aktivität der CHO-Zellen mit stabiler hFGE-Expression. **B)** Spezifische Aktivität aus A), normiert auf die Aktivität der Variante WT-His. **C)** Western Blots der Zelllysate von CHO-Zellen mit stabiler hFGE-Expression, untransfiziertem CHO und CHO-Zellen mit transienter hFGE-HA-Expression. Alle Zellen wurden jeweils mit und ohne pBI_STS transfiziert. Die Detektion geschah mittels α FGE- bzw. α STS und α R-HRP-Antikörper. **D)** Spezifische Aktivität der hFGE-Varianten, transient in ARPE19-Wildtyp- (WT) und *sumf1*^{-/-} knock out-Zellen (KO) mit STS koexprimiert. **E)** Spezifische Aktivität der hFGE-Varianten in ARPE19-KO-Zellen aus D), normiert auf die Aktivität der Variante WT-His. **F)** Western Blots der Zelllysate von ARPE19-KO-Zellen untransfiziert (ut), transient transfiziert mit STS und hFGE-WT- bzw. -RRA-His, -WT/RRA-KDEL und -WT/RRA-PGEL, sowie zum Vergleich Lysate der Wildtypzelllinie ARPE19-WT untransfiziert (ut) oder transient transfiziert mit STS. Detektion mittels α FGE- bzw. α STS- und α R-HRP-Antikörpern. Signifikanz: * p <5%; ** p <1%; *** p <0,1%; n =Stichprobe; Fehlerbalken: Standardabweichung.

Um den Einfluss des Expressionslevels sowohl von hFGE als auch der Sulfatase STS zu eliminieren, wurden die ermittelten STS-Aktivitäten nach Abzug der Kontrollen mit den Intensitätsverhältnissen aus den Western Blots, wie beispielhaft in **Abb. 24 C** gezeigt, korrigiert. Die spezifischen Aktivitäten wurden als ein Substratumsatz (in nmol) pro Stunde und pro Milligramm Protein angegeben und in **Abb. 24 A** und **B** dargestellt. Die CHO-Zellen wiesen im Mittel (n=4) eine signifikante Erhöhung (p-Wert <0,1*** bzw. <1%**) der spezifischen Sulfataseaktivität in den Proben RRA-KDEL, WT-PGEL und RRA-PGEL von 23 bis zu 105% im Vergleich zum WT-His auf. Die geringsten spezifischen Aktivitäten wurden in RRA-His-Zelllysaten mit einer Reduktion von ca. 34% und in WT-KDEL-Zelllysaten mit einer 20%igen Repression gegenüber dem WT-His gemessen.

In **Abb. 24 D** sind die spezifischen Aktivitäten in den entsprechenden ARPE19-WT und -KO-Lysaten aus **Abb. 24 F**, jeweils korrigiert um die Hintergrundaktivität der Kontrollen, gegenübergestellt. Auffällig ist, dass durch die transiente, rekombinante Überexpression des hFGEs in den *knock out*-Zellen deutlich größere Effekte zu verzeichnen waren als in den WT-Zellen, was mit der Hintergrundaktivität des endogenen hFGEs im WT begründet werden kann. Da die Sulfatasen bereits durch das endogene System aktiviert werden, sorgt eine Überexpression des FGEs *in vivo* nur noch für den Umsatz relativ geringer Mengen an STS, die im ausgelasteten endogenen System noch nicht erfasst wurden. Im *knock out* hingegen wird eine deutlich größere Zahl an Sulfatasen posttranslational modifiziert. Die Expression des endogenen FGEs ist an den schwachen Banden bei ca. 37 kDa des α FGE-Western Blots (**Abb. 24 F**, ARPE19-WT untransfiziert) und STS) zu detektieren, wohingegen durch den KO des *sumf1*-Gens die Proteinexpression des endogenen hFGEs vollständig unterdrückt wird. Die Signale der STS wurden bei ca. 60 kDa mittels *Rabbit*-anti-STS-Antikörper (α STS) detektiert. Die innerhalb der WT-Zelllinie zu beobachtenden Tendenzen spiegeln sich ebenso in der KO-Zelllinie wider (**Abb. 24 D**). Die höchsten spezifischen Aktivitäten wurden für WT-KDEL und RRA-PGEL aufgezeichnet. So konnten für diese beiden hFGE-Varianten im ARPE19-KO gegenüber dem WT-His Aktivitätssteigerungen der Sulfatase von 55 bzw. 82% detektiert werden (**Abb. 24 E**). Die übrigen Isoformen schienen in ihrer enzymatischen Aktivität nicht signifikant von der hFGE-WT-His-Variante abzuweichen.

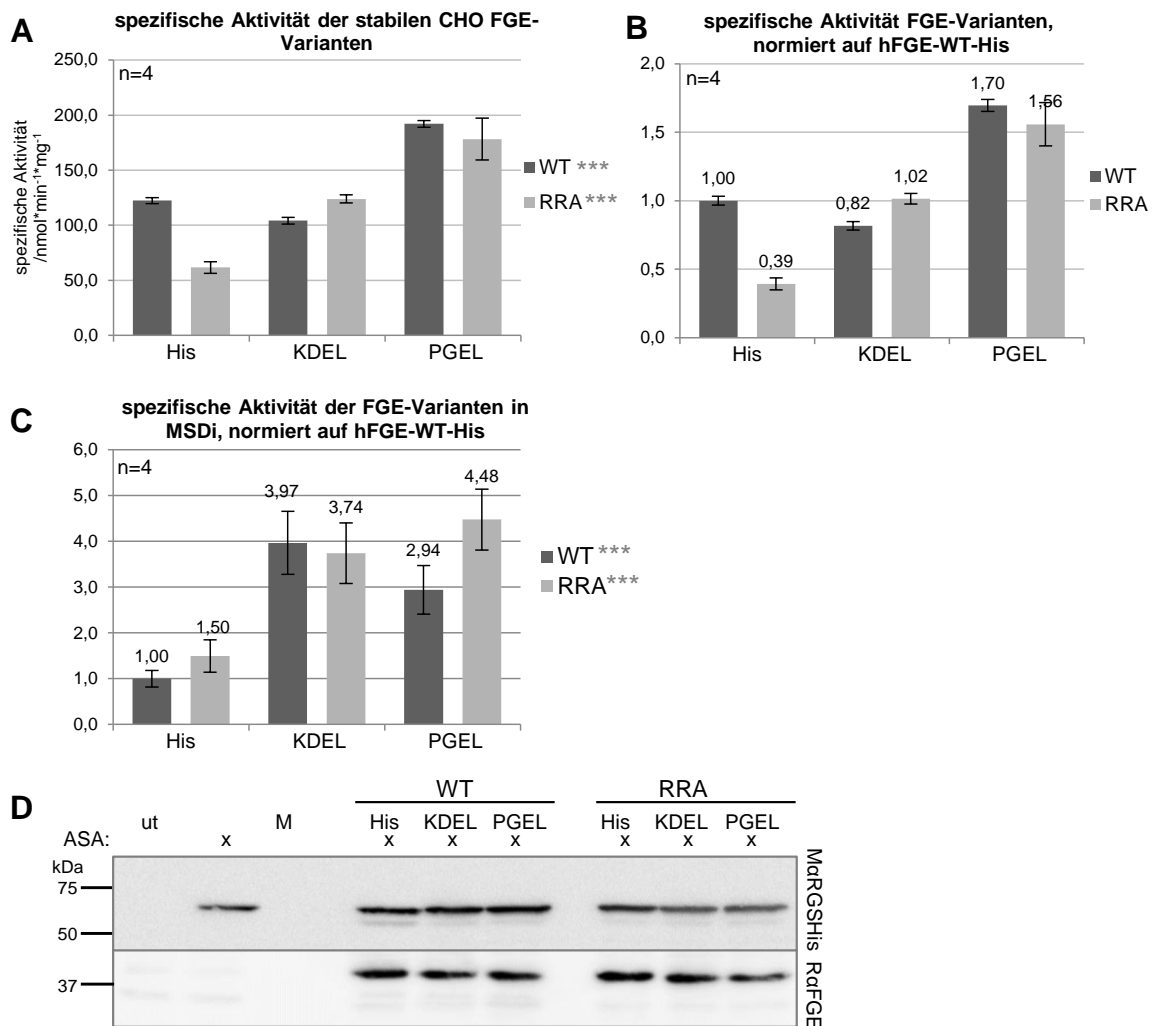


Abb. 25: pNCS-Aktivität der hFGE-Varianten. **A)** Spezifische Aktivität der CHO-Zellen mit stabiler hFGE-Expression. **B)** Spezifische Aktivität aus A), normiert auf die Aktivität der Variante WT-His. **C)** Spezifische Aktivität der hFGE-Varianten, transient in MSDi-Zellen mit STS koexprimiert und auf die Variante WT-His normiert. **D)** Western Blots der Zelllysate von MSDi-Zellen untransfiziert (ut), transient transfiziert mit STS oder mit STS und hFGE-WT- bzw. -RRA-His, -WT/RRA-KDEL und -WT/RRA-PGEL kotransfiziert. Die Detektion geschah mittels M α RGSHis- und G α M-HRP- bzw. R α FGE- und G α R-HRP-Antikörpern. Signifikanz * $p < 5\%$; ** $p < 1\%$; *** $p < 0,1\%$; n=Stichprobe; Fehlerbalken: Standardabweichung.

Im pNCS-Assay konnten in den stabilen CHO-Zellen ähnliche Aussagen über die Aktivität der hFGE-Varianten getroffen werden. Auch hier wurde die Aktivität der Sulfatase ASA bezogen auf Kontrollen bestimmt, mittels Western Blot auf die Expressionsverhältnisse angepasst und die resultierende spezifische Aktivität als Umsatz (in nmol) pro Minute und pro Milligramm Protein dargestellt (**Abb. 25 A und B**). Beide PGEL-Varianten zeigen im Mittel eine hochsignifikante Erhöhung der spezifischen Sulfatase-Aktivität im Vergleich zum WT-His von 70 und 56%. Eine Repression wurde bei RRA-His und WT-KDEL mit ca. 61 bzw. 18% ermittelt. Das Messergebnis der Probe RRA-KDEL hingegen wich nicht vom Standard WT-His ab.

In den MSD-Patientenzellen (MSDi) führt eine Mutation des *sumf1*-Gens zur Expression einer in ihrer Aktivität stark reprimierten hFGE-Mutante (S155P), weshalb kaum endogene Sulfatase-

aktivität vorliegt (Cosma *et al.*, 2004; Schlotawa *et al.*, 2018). Die Steigerung der spezifischen Sulfataseaktivität durch die transiente Expression der PGEL- und KDEL-Varianten des WT- und RRA-hFGEs wurde in **Abb. 25 C** und ein exemplarischer Western Blot eines solchen Experimentes in **Abb. 25 D** dargestellt. Normiert auf den WT-His zeigen alle im ER retardierten Varianten des humanen FGEs eine Steigerung der spezifischen Aktivität. Es konnte eine hochsignifikante, drei- bis 4,5-fach erhöhte Sulfataseaktivität ermittelt werden. Dagegen wurden jeweils sowohl unter den im ER zurückgehaltenen Enzymen als auch zwischen den RGSHis₆-getaggten hFGEs keine signifikanten Unterschiede ermittelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine ER-Retention mittels Retentionssignalpeptiden den Umsatz des humanen FGEs *in vivo* erhöht. Dieser Effekt ist unabhängig von der Tetrapeptidsequenz beobachtet worden, wodurch sich PGEL und auch das stärkere KDEL-Signal zur Modifizierung der hFGE-Aktivität auf Säugorzellebene anwenden lassen. Die Mutation der Furinspaltstelle hingegen führt zwar nachweislich zur Erhaltung der *full-length* Enzyme, sowohl intrazellulär als auch während der Sekretion. Eine gesteigerte ER-Retention und damit einhergehende Aktivitätssteigerung *in vivo* konnte durch das Vorhandensein des N-Terminus allerdings nicht forciert werden. Für die *in situ*-Produktion eines einfach FGly-tragenden Antikörperkonstruktes kann somit die Verwendung der hFGE-WT-KDEL oder hFGE-WT-PGEL-Zelllinie bzw. die Koexpression von Sc2 mit den analogen hFGE-Konstrukten verwendet werden, wobei ein Formylglycin-Gehalt von ca. 90% erreicht werden kann.

5.2.2 Aktivität des humanen FGEs in Abhängigkeit von Kupfer

Für die Aktivität als Monooxygenase benötigt aerobes FGE eine Elektronenquelle zur Aktivierung von molekularem Sauerstoff (siehe Kapitel 2.5). Ein Kupferion wurde als Kofaktor für diesen Reaktionstyp postuliert, da sich die FGE-Varianten aus *Thermomonospora curvata* (TcFGE), *Mycobacterium smegmatis* (MsFGE), *Streptomyces coelicolor* (ScFGE) und *Homo sapiens* (hFGE) durch ein Äquivalent Kupfer(I) *in vitro* in ihrer Aktivität um das 10- bis 20-fache steigern ließen (Holder *et al.*, 2015; Knop *et al.*, 2015). Auch York *et al.* beschrieb einen kupferabhängigen Anstieg der Ausbeuten an FGly-haltigen Antikörpern während der Produktion in CHO-Zellen (York *et al.*, 2016). Durch die Zugabe von Kupfersulfat konnte der FGly-Gehalt bei gleichbleibendem Titer auf bis zu 98% gesteigert werden. Im Gegensatz dazu konnte in unserem System in mit bis zu 50 μ M Kupfersulfat versetzten Suspensionszellkulturen kein signifikanter Effekt auf die Antikörper-Ausbeute der ScFv425-Fc-Proteine oder die Konversionsrate beobach-

tet werden. Daher sollte ebenfalls mittels indirekter Aktivitätsassays der Einfluss des Kofaktors Kupfer auf das humane Formylglycin-generierende Enzym ermittelt werden.

Säugerzellkultur mit Kupfer und Tetraethylenpentamin

Um einen Test auf Kupferabhängigkeit mittels Sulfataseaktivierung *in vivo* durchführen zu können, mussten zunächst Bedingungen etabliert werden, unter denen in verschiedensten Säugerzelllinien eine Kupfermangel- oder -überschusssituation simuliert werden konnte. Zu hohe intrazelluläre Kupferkonzentrationen üben einen toxischen Effekt auf die Zellen aus, da Kupferionen Nukleinsäuren binden, die DNA-Reparatur und die DNA- und RNA-Polymerisation stören, die Membranen destabilisieren und reaktive Sauerstoffspezies generieren können (Agarwal *et al.*, 1989). Die maximale CuSO_4 -Konzentration wurde aufgrund der Studien von York *et al.*, 2016. (50 μM), Birkaya und Aletta, 2005 (30 μM) und Percival und Layden-Patrice, 1992 (12-25 μM) mit maximal 50 μM gewählt und den Zellkulturmedien zugesetzt. Die Toleranz einer solchen Behandlung zeichnete sich durch gleichbleibende Morphologie und stabiles Wachstum sowie unveränderte Zellviabilität aus.

Ein Kupfermangel ist durch die Kultivierung adhärenter Säugerzellen in Vollmedien wie DMEM und PRMI mit 10% fötalem Kälberserum, das als Quelle für Spurenelemente und andere limitierende Faktoren dient und somit auch Kupfer enthält, nur durch die Chelation des vorhandenen Kupfers zu erreichen. Dazu wurde die Substanz TEPA (Tetraethylenpentamin; Tetren) verwendet, die als spezifischer Kupferchelator und funktioneller Nährmittelzusatz bekannt ist (Percival und Layden-Patrice, 1992). TEPA ist ein aminhaltiger Metallbinder, der durch seine in etlichen Titrationsexperimenten bestätigte Selektivität für Cu(II) gegenüber Zn(II) , Cd(II) , Pb(II) und Ni(II) sowohl in der Zellbiologie als auch in der Synthese von oxidationsanfälligen Kupferpartikeln Verwendung findet (Reilley und Vavoulis, 1959; Smeulders und Van de Geijn, 1983; Pulkkinen *et al.*, 2009). In vielen Studien führte der Zusatz von TEPA und ähnlichen Chelatoren wie BCS (Bathocuproindisulfonat) in Säugerzellkulturen zu einer zuverlässigen Senkung des Kupfergehalts um ca. 60%. Die Aktivität Cu-abhängiger Enzyme, wie die Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD) und Cytochrom c Oxidase (COX), konnte um bis zu 80% gesenkt werden (Percival und Layden-Patrice, 1992; Birkaya und Aletta, 2005; Chen *et al.*, 2005). Hierbei erwies sich die regelmäßige Gabe von TEPA gegenüber BCS und TETA (Tetraethylen-tetramin) als vorteilhaft, da Effekte der Kupferreduktion in vergleichbar geringen Dosen (50-120 μM) und bereits nach 24 h zu beobachten waren (Birkaya und Aletta, 2005; Ramos *et al.*, 2016). Eine Senkung der Enzymaktivitäten kupferabhängiger Proteine hingegen wurde nach ca. 48-96 h detektiert und führte letztendlich zu einer sieben bis zehn Tage anhaltenden Kupferdefizienz (Percival und Layden-Patrice, 1992; Chen *et al.*, 2005). Dass es sich hierbei nicht nur um die reine Chelation an freien Kupferionen, sondern auch um einen Verlust des proteingebunde-

nen Kupfers und somit einer erfolgreichen Simulation der Kupferdefizienzsituation handelt, konnte neben dem zeitabhängigen Verhalten auch am kompensatorischen Effekt einer erneuten Kupferzufuhr gesehen werden. Die durch den Mangel allmählich auftretenden Effekte konnten nach langer (>4 d) Inkubation mit TEPA zum Teil und nach kurzer TEPA-Behandlung vollständig durch die Zufuhr von Kupferionen aufgehoben werden (Percival und Layden-Patrice, 1992). Zusätzlich hat zumindest TcFGE mit $pK_D=17,1$ eine deutlich geringere Affinität zu Kupfer als TEPA, für das Bindekonstanten von bis zu 24,3 bekannt sind (Percival und Layden-Patrice, 1992; Knop *et al.*, 2016).

In Anbetracht dieser Befunde wurde die TEPA- und CuSO_4 -Behandlung mit Inkubationszeiten von minimal vier und maximal sieben Tage für die vorliegenden Säugerzellkulturen getestet. Zur Vorbereitung auf den STS-Assay wurden, wie in **Abb. 26 A** zu sehen, exemplarisch CHO-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von TEPA (0, 50 und 100 μM) kultiviert, anschließend je zwei biologische Replikate transient mit pBI_STS und dem reversen Transaktivator (rtTA) kotransfiziert, die Proteinexpression induziert, die Zellen nach 24 h geerntet und die Lysate mittels $\text{R}\alpha\text{STS-AK}$ im Western Blot analysiert. Die Bandenintensitäten zeigen, dass, abgesehen von der ersten 0 μM -Probe, die Proteinexpression bei 100 μM TEPA-Zugabe bis zu mehr als das zehnfache reduziert wurde, wohingegen ohne Chelator eine moderate und mit 50 μM TEPA eine gute Proteinexpression zu beobachten gewesen ist. Konzentrationen von bis zu 50 μM Chelator wirken sich also nicht negativ auf die Proteinexpression und Zellviabilität aus.

Ähnliche Beobachtungen sind für HT1080-N1-Zellen in **Abb. 26 B** dargestellt. Die transiente Transfektion des FGE-HAs in An- und Abwesenheit von TEPA wurde in einer reduzierenden (+SH) und nicht-reduzierenden (-SH) SDS-PAGE analysiert und mittels $\text{R}\alpha\text{FGE-AK}$ in einem Western Blot detektiert. In den Zellkulturüberständen wurden Doppelbanden für trunkiertes ΔhFGE auf der Höhe des Standardproteins (Std ΔhFGE) und fl-hFGE knapp darüber detektiert. In den Lysat-Proben zeigt sich sowohl auf der +SH- als auch auf der -SH-Seite eine deutliche Abschwächung der FGE-Banden bei ca. 37 kDa sobald TEPA hinzugesetzt wurde, obwohl identische Mengen an Gesamtprotein aufgetragen wurden. Die Bande bei ca. 75 kDa, die einem homooligomeren Zustand des humanen FGEs unter nicht-reduzierenden Bedingungen zugeordnet werden kann (Preusser-Kunze *et al.*, 2005; Ennemann *et al.*, 2013), verschwindet hingegen unter TEPA-Zugabe komplett. In analogen Experimenten (nicht gezeigt) wurden ebenfalls stark abgeschwächte Signale für die RRA-Mutante des transienten hFGEs im Western Blot detektiert, sobald die Zellen entweder mit TEPA oder mit Kupfer behandelt wurden. Die eingesetzte Gesamtproteinmenge wurde konstant gehalten. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde dementsprechend in beiden Fällen die Proteinmenge an ins Medium sezernierten Enzyms (RRA) deut-

lich als auch die Menge an FGE-Komplexe unter TEPA-Zusatz leicht (WT und RRA) reduziert. Gegebenenfalls ist dies auf eine abnehmende Proteinexpression durch Zellstress zurückzuführen.

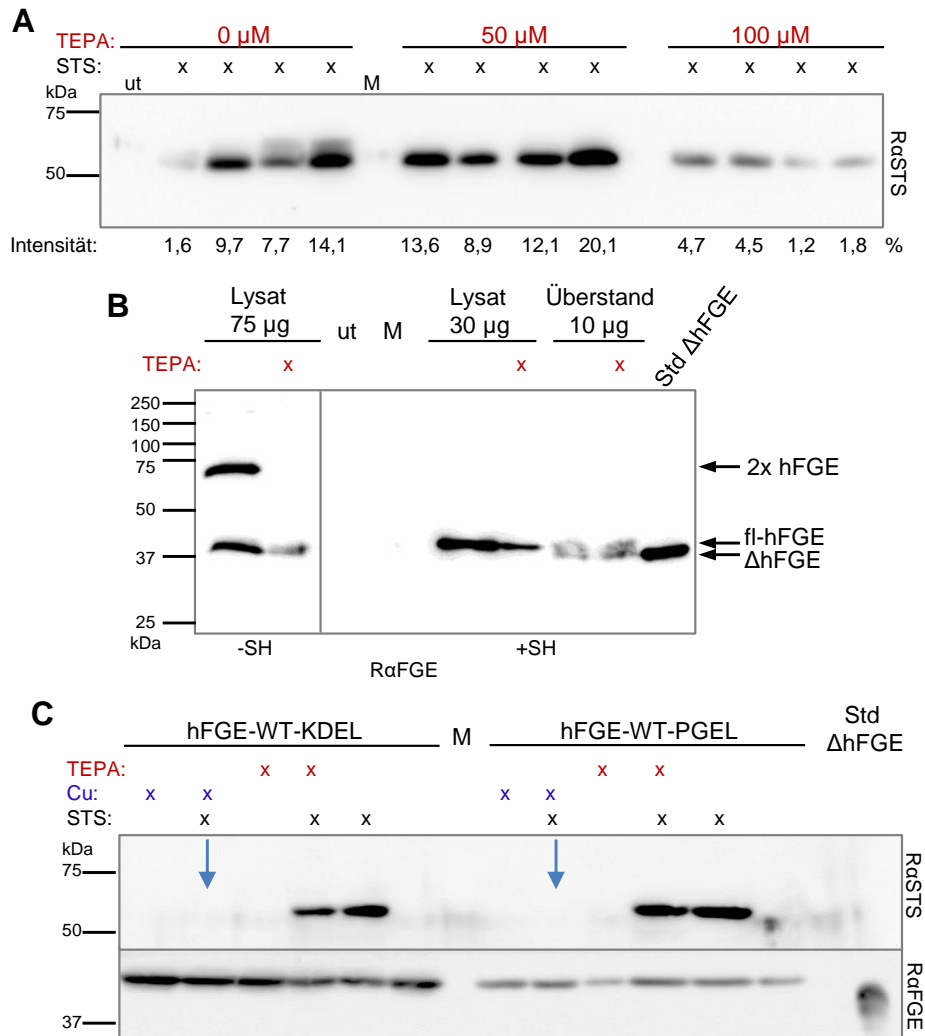


Abb. 26: Behandlung von Säugerzellen mit Kupfer und dem Kupfer-Chelator TEPA. **A)** Western Blot mit R α STS- und G α R-HRP-Antikörpern. Aufgetragen sind CHO-Zelllysate mit transienter STS-Transfektion oder STS- und hFGE-HA-Kotransfektion unter der Zugabe von 0, 50 oder 100 μ M TEPA. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen (ut). Die Bandenintensität verrät eine Reduzierung der Proteinexpression bei 100 μ M TEPA. **B)** Western Blot mit R α -FGE- und G α -R-HRP-Antikörpern zur Detektion des hFGEs unter reduzierenden (+SH) und nicht-reduzierenden (-SH) Bedingungen. Aufgetragen wurden Zelllysate (30 oder 75 μ g) und Zellüberstände (10 μ g), sowie aufgereinigtes Δ hFGE (Std). **C)** Western Blot mit R α -FGE- bzw. R α STS- und G α -R-HRP-Antikörpern. Aufgetragen wurden Zelllysate der stabilen CHOs mit hFGE-WT-KDEL und hFGE-WT-PGEL, transient transfiziert mit STS. Die Zellen wurden entweder nicht behandelt, mit 50 μ M TEPA oder mit 50 μ M CuSO₄ behandelt. Als Kontrolle diente aufgereinigtes Δ FGE (Std).

Behandlungen mit Kupfersulfat führten zum Teil ebenfalls zu einer fehlenden Proteinexpression. An dem Beispiel der Zelllysate stabil hFGE-exprimierender CHO-Zellen (**Abb. 26 C**) ist zu sehen, dass womöglich nicht die Genexpression selbst, sondern die transiente Transfektion in Anwesenheit großer Kupfermengen unterdrückt wird. Wie beispielhaft an WT-KDEL und WT-PGEL gezeigt ist die Expression der stabilen hFGE-Varianten, detektiert im R α FGE-Blot, unter TEPA- und auch Kupferzugabe vergleichbar mit unbehandelten Zellen. Die die transient exprimierte Sulfatase STS hingegen ist nur in Abwesenheit von Cu im R α STS-Blot bei knapp über

50 kDa zu detektieren. Die blauen Pfeile markieren die Positionen, wo Banden für das Protein STS zu erwarten gewesen wären. Ein Grund dafür könnte die durch hohe Mengen an Metallionen gestörte Komplexbildung zwischen DNA und Transfektionsreagenz (PEI oder LTX) sein. Tatsächlich ist über PEI bekannt, dass es, ähnlich wie TEPA, eine Metall-chelatisierende Wirkung mit hoher Selektivität für Cu^{2+} -Ionen ausübt (Pulkkinen *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2017). Darum galt es die Zellen und die zelleigenen Kupfervorräte sowohl vor als auch nach der Transfektion mit einem Überschuss an Kupferionen zu sättigen, aber die Anwesenheit hoher Konzentrationen an freiem Cu während des Transfektionsereignisses selbst zu vermeiden.

Auf Grundlage dieser initialen Experimente und in Hinblick auf die Zeitabhängigkeit der Kupferchelation durch TEPA wurde eine Strategie zur Behandlung von Säugerzellen mit Kupfersulfat und dem Chelator etabliert: Die Verabreichung von maximal 50 μM TEPA über vier bis sieben Tage simuliert eine Kupferdefizienz, welche sich durch erneute CuSO_4 -Zufuhr teilweise umkehren lässt (nicht gezeigt). Parallel dazu wurde der Kupferüberschuss ebenfalls durch vier- bis siebentägige Inkubation von 50 μM CuSO_4 vorbereitet und die Proteinexpression unter den entsprechenden Bedingungen für 24–42 h durchgeführt. Während der chemischen Transfektion darf kein Überschuss an Kupferionen vorliegen, weshalb in diesen Fällen die Zellen mehrmals gewaschen und in CuSO_4 - und FKS-freiem Medium transfiziert wurden und mindestens 4 h nach der Transfektion die Proteininduktion unter erneuter Zugabe von CuSO_4 stattfand.

Aktivitätsassays in MSDi-Zellen

Nach der Etablierung der Transfektions- und Kultivierungsbedingungen konnten hFGE-Aktivitätsbestimmungen durchgeführt werden. Für den pNCS-Assay in HT1080-Zellen mit einer recht hohen endogenen hFGE-Aktivität ließen sich nur inhomogene Datensätze produzieren (siehe Kapitel 8.1, **Abb. 45**). Demnach konnte in dem humanen Säugerzellmodell HT1080 keine Aussage über die Relevanz des Kofaktors Kupfer auf die Formylglycin-Generierung *in vivo* getroffen werden. Sinnvoller schienen Messungen in Zellen mit sehr geringer oder fehlender endogener FGE-Hintergrundaktivität. Dazu konnten die MSD-Patientenzellen MSDi und *sumf1*^{-/-} *knock out*-Zellen (ARPE19-KO) verwendet werden. Eine transiente Expression des humanen FGEs hat in diesen Zellsystemen aufgrund der sehr geringen endogenen Restaktivität eine starke Ausprägung, wodurch selbst geringe Veränderungen zuverlässiger detektiert werden können (Schlotawa *et al.*, 2011).

Wie am pNCS-Assays zu sehen (**Abb. 27 A**), konnte für MSDi-Zellen in Anwesenheit des Kupferchelators jedoch keine Bedingung gefunden werden, unter der sich mittels rekombinanter hFGE-Expression die erwartete Erhöhung der Sulfataseaktivität über die Restaktivität der endogenen hFGE-Mutante detektieren ließ. Unter TEPA-Zugabe konnten im *Mouse*-anti-RGSHis-Western Blot (**Abb. 27 C**) nur geringe Signale für die Sulfatase ASA detektiert werden. Zudem

schien das Verhältnis der hFGE-Doppelbande im R α FGE-Blot im Vergleich zur unbehandelten Probe verschoben. Die Intensität der Bande des größeren Molekulargewichts scheint abzunehmen, wohingegen in den unbehandelten und Cu-Proben die Intensitäten beider FGE-Formen nahezu identisch sind. In Anbetracht dessen lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die Kupferchelation mit TEPA eine Stresssituation in der Zelle auslöst. ER-Stress könnte ggf. dazu führen, dass die Sekretion des humanen FGEs gesteigert bzw. die ER-Retention herabgesenkt wird, was ein größeres Verhältnis an trunkiertem hFGE im Vergleich zum fl-hFGE zur Folge gehabt haben könnte. Sowohl am Proteinexpressionslevel als auch an dem fast komplett retardierten Zellwachstum war zu sehen, dass MSD-Patientenzellen, im Gegensatz zu den anderen Säugerszelllinien, deutlich negativer auf die Behandlung mit dem Kupferchelator reagierten, was die experimentellen Bedingungen erschwerte. Es wurden einerseits zum Teil gravierende morphologische Veränderungen, wie Granula-förmige Einschlüsse und das Zusammenziehen der Plasmamembran zur Verringerung der Kontaktfläche beobachtet. Andererseits konnten vereinzelt auftretende Rupturen der Zellmembran und untypisch stark ausgefranste Auswüchse detektiert werden. Aus den Experimenten von Chen *et al.* wurde lediglich eine TEPA-abhängige Verringerung des Wachstums auf C₂C₁₂-Zellen verzeichnet (Chen *et al.*, 2005). Aus früheren Studien ist hingegen bekannt, dass der Kupferchelator im Konzentrationsbereich von 50 μ M im Allgemeinen keinen negativen Einfluss auf die Zellviabilität und das Wachstum haben soll (Percival und Layden-Patrice, 1992; Birkaya und Aletta, 2005).

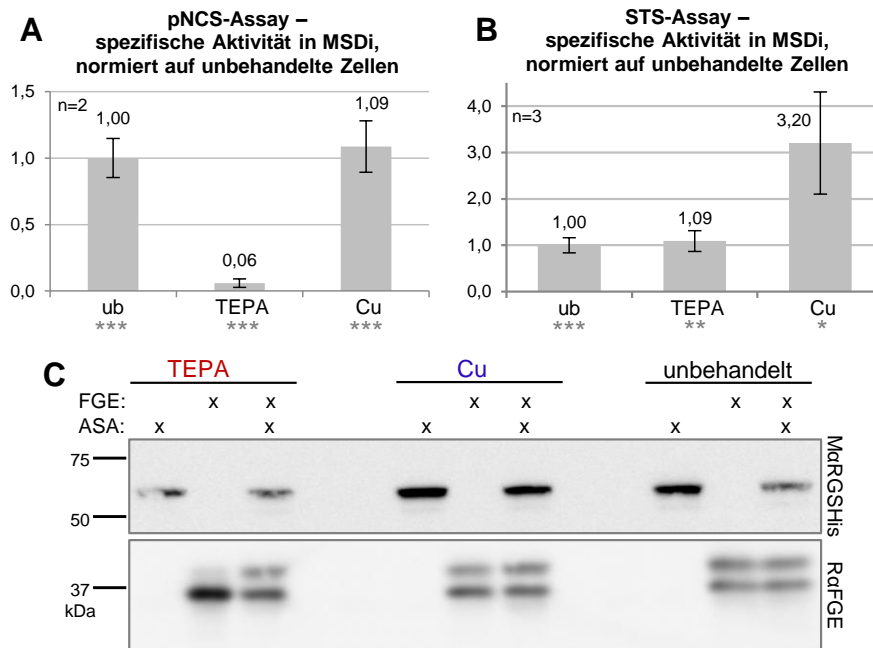


Abb. 27: Einfluss von Kupfer und TEPA in MSDi-Zellen. Ermittelt wurden die spezifischen Aktivitäten durch **A**) einen pNCS-Assay und **B**) einen STS-Assay der MSDi-Zellen mit transienter hFGE- und ASA-Expression unter der Zugabe von Cu (50 μ M CuSO₄) oder TEPA (50 μ M). Die Aktivität wurde auf unbehandelte Zellen normiert. **C**) Western Blots von Zelllysaten der unbehandelten, mit Kupfer (Cu) und mit TEPA behandelten MSDi-Zellen aus **A**), transient transfiziert mit ASA-RGSHis₆ und hFGE-HA. Die Detektion geschah mittels MaRGSHis- und GaM-HRP- bzw. RaFGE- und GaR-HRP-Antikörpern. Signifikanz * $p < 5\%$; ** $p < 1\%$; *** $p < 0,1\%$; n=Stichprobe; Fehlerbalken: Standardabweichung.

Unter Kupferzugabe hingegen verhielten sich die MSDi-Zellen analog zur unbehandelten Kontrolle. Sowohl endogen als auch während der hFGE-Überexpression konnten im pNCS-Assay keine signifikanten Unterschiede zwischen Kupfergabe (Cu) und unbehandelten Zellen (ub) gemessen werden (**Abb. 27 A**). Im STS-Assay hingegen wurde eine 3,2-fache Steigerung der spezifischen Aktivität verzeichnet, wohingegen TEPA keinen Einfluss ausübte (**Abb. 27 B**).

Aktivitätsassays in ARPE19-Zellen

Um ein klareres Bild über die Kupferabhängigkeit der Formylglycin-Generierung durch hFGE zu bekommen, wurden ebenfalls ASA-Aktivitäten für ARPE19-WT- und -KO-Zellen mit und ohne hFGE-Koexpression aufgenommen. Die Aktivitätssteigerung wurde durch die rekombinante Proteinexpression errechnet und die spezifische Sulfataseaktivität auf unbehandelte Zellen normiert dargestellt (**Abb. 28 A und B**). Daraus ergaben sich im Vergleich zwischen den Wildtyp- und *knock out*-Zelllinien analoge Tendenzen. Den Graphen in **Abb. 28 A und B** ist zu entnehmen, dass eine Behandlung mit Kupfer in beiden Zelllinien zu mehr als einer Verdoppelung der Sulfataseaktivität und damit auch der *in vivo*-Aktivität des hFGEs führt. Eine Chelation freier Kupferionen durch TEPA senkt die spezifische Aktivität signifikant um ca. 60%.

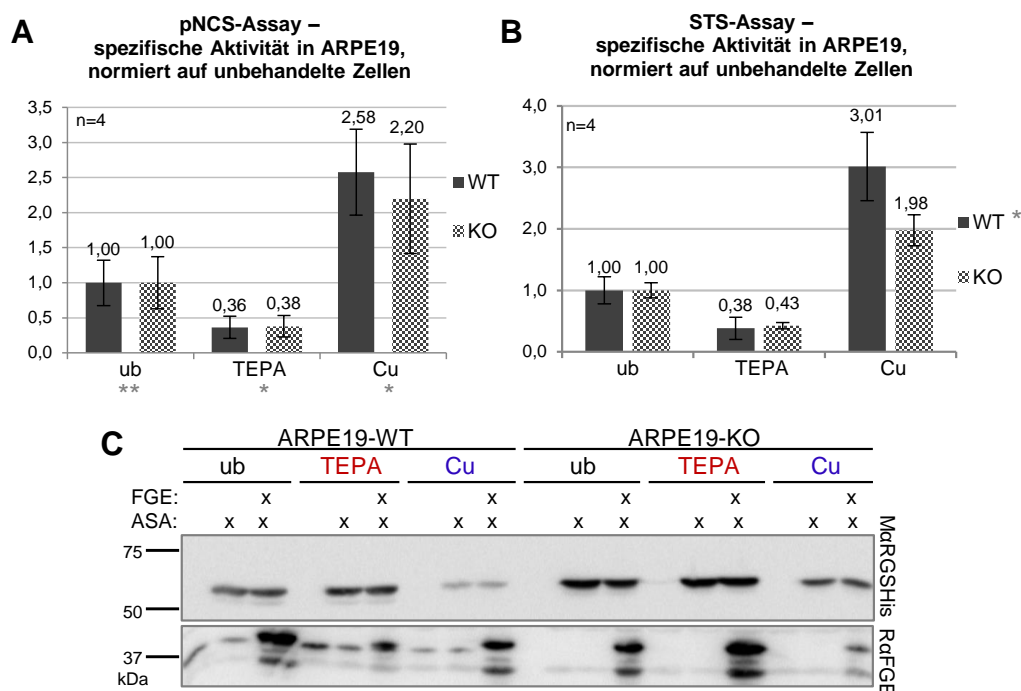


Abb. 28: Einfluss von Kupfer und TEPA in ARPE19-Zellen. Dargestellt sind die spezifischen Aktivitäten im **A)** pNCS-Assay und **B)** STS-Assay der ARPE19-WT- und sumf1-KO-Zellen mit transienter hFGE- und ASA-Expression unter der Zugabe von Cu (50 μ M CuSO₄) oder TEPA (50 μ M). Die Aktivität wurde auf unbehandelte Zellen (ub) normiert. **C)** Western Blots von Zelllysaten der unbehandelten, mit Kupfer (Cu) und mit TEPA behandelten ARPE19-WT- bzw. sumf1-KO-Zellen aus **A)**, transient transfiziert mit ASA-RGSHis₆ und hFGE-HA. Die Detektion geschah mittels MαRGSHis- und GαM-HRP- bzw. RαFGE- und GαR-HRP-Antikörpern. Signifikanz *p<5%; **p<1%; ***p<0,1%; n=Stichprobe; Fehlerbalken: Standardabweichung.

Ein exemplarischer Western Blot dieses pNCS-Assays ist in **Abb. 28 C** dargestellt und zeigt deutlich die fehlende endogene hFGE-Expression der KO-Zelllinie, die dagegen in etwa auf der Höhe des 37 kDa-Markerproteins in den ARPE19-WT-Proben mit fehlender hFGE-Transfektion zu detektieren ist. Die zweite, niedriger laufende FGE-Bande, welche sich im selben Maße durch transientes hFGE verstärken lässt wie die Hauptbande, gibt Hinweise auf die Anwesenheit eines recht ausgeprägten Anteils an intrazellulärem, trunkiertem hFGE. Die analogen Experimente im STS-Assay (**Abb. 28 B**) lassen vermuten, dass eine Reduktion des frei verfügbaren Kupferpools die hFGE-Aktivität ebenso wie die gemessene Sulfataseaktivität um ca. 60% senkt. Für die Zugabe von 50 μ M Kupfersulfat zu den Nährmedien beider ARPE19-Zelllinien ist dagegen eine zwei- bis dreifache Erhöhung der spezifischen Sulfataseaktivität zu beobachten.

Aktivitätsassays in HepG2-Zellen

Zum Verständnis der intrazellulären Kupferbeladung und der damit einhergehenden enzymatischen Aktivität des humanen FGEs wurde die Zugabe an Kupfer und dessen Reduktion zusätzlich in Hepatozyten untersucht. Die HepG2-Wildtypzellen besitzen im Gegensatz zu vielen anderen humanen Säugerzellen keinen Kupfertransporter vom Typ P-Typ-ATPase 7A (ATP7A), sondern nur den vornehmlich in Leberzellen exprimierten ATP7B-Transporter (Prohaska, 2008).

ATP7A und B sind für das Ausschleusen von Kupfer aus der Zelle und die Verteilung des Kupfers im intrazellulären Kupferpool verantwortlich. ATP7B ist ein Membranprotein des TGNs und ist dort unter anderem an der Beladung von Cu-Chelatoren und Metallothioninen des zellulären Kupferpools beteiligt. Bei erhöhter intrazellulärer Kupferkonzentration wird überschüssiges Cu durch ATP7B in Vesikel geschleust bzw. die P-Typ ATPase selbst zur Plasmamembran transportiert, wo sie die Ausscheidung überschüssigen Kupfers über die Galle katalysiert (Prohaska, 2008; Polishchuk *et al.*, 2014; Chandhok *et al.*, 2016). Bei der HepG2 *knock out*-Zelllinie von Dr. Andree Zibert (Universitätsklinikum Münster) wird durch die Mutation des Exons 8 der Transmembrandomäne TM3 des ATP7B-Gens kein funktionales Transporterprotein mehr gebildet (Chandhok *et al.*, 2014). Mutationen in der TM3 des ATP7Bs werden häufig mit schweren Formen der Wilson Krankheit in Verbindung gebracht, weshalb diese Zelllinie zur Untersuchung dieser Erkrankung generiert wurde. Da die bislang unbekannte Beladung des hFGEs mit seinem Kofaktor Kupfer durch das Fehlen eines wichtigen Bestandteils der intrazellulären Kupfertransportkette unterbrochen sein könnte, ist ein ATP7B-KO ebenfalls für die zelluläre Analyse des humanen FGEs interessant.

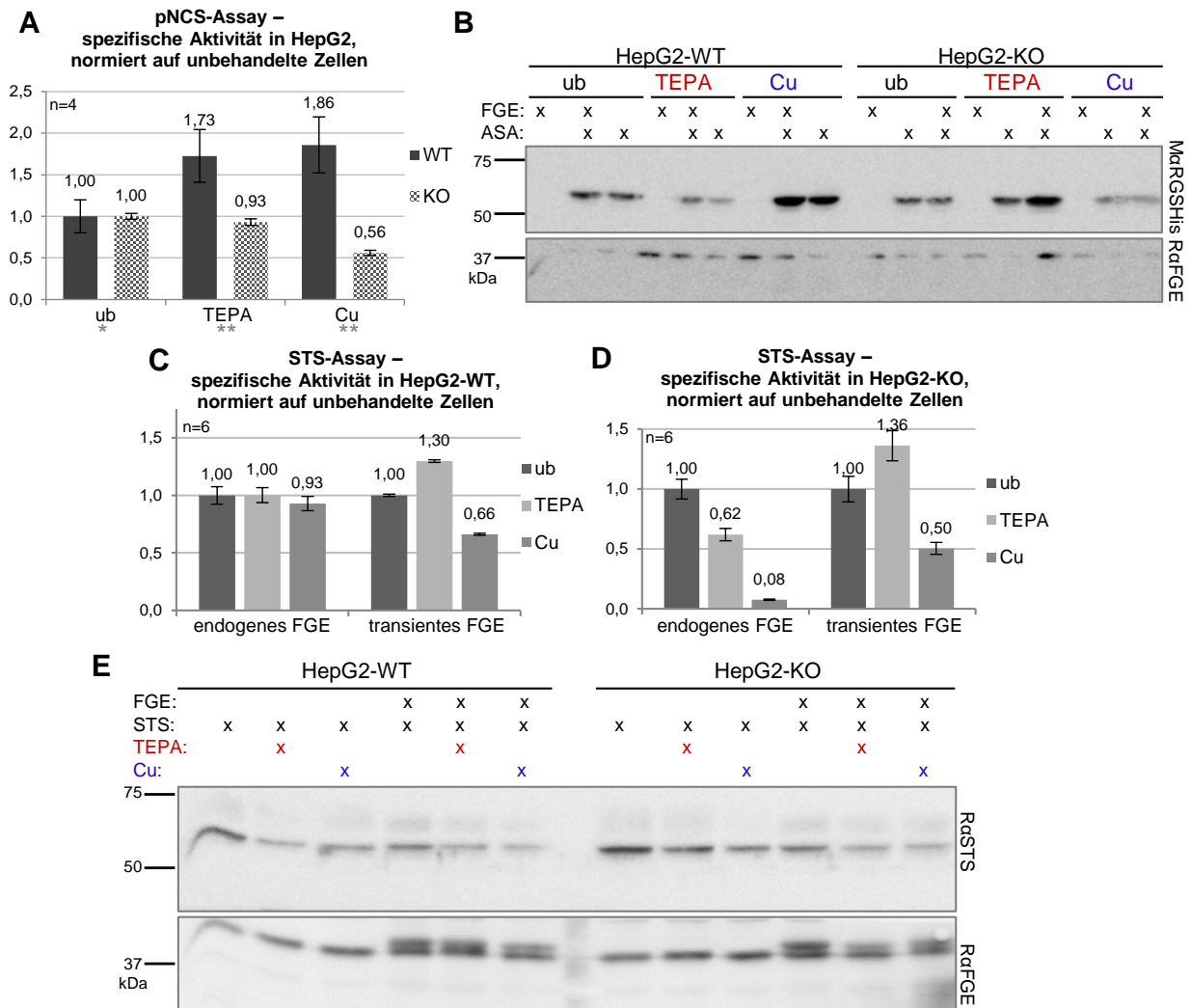


Abb. 29: Einfluss von Kupfer und TEPA in Hepatozyten. Dargestellt sind die spezifischen Aktivitäten im **A**) pNCS-Assay der HepG2-WT- und -KO-Zelllinien, **C**) STS-Assay der WT-Zellen und **D**) STS-Assay der HepG2-ATP7B-KO-Zellen mit transienter hFGE- und STS-Expression unter der Zugabe von Cu (50 μ M CuSO₄) oder TEPA (50 μ M). Die Aktivitäten wurden auf unbehandelte (ub) Zellen normiert. In **B**) und **E**) sind exemplarische Western Blots von Zelllysaten der unbehandelten, mit Kupfer (Cu) und mit TEPA behandelten HepG2-WT- und -KO-Zellen aus **A**) bzw. aus **C**) und **D**), transient transfiziert mit STS und hFGE-HA. Die Detektion geschah mittels MaRGSHis-, RaFGE- bzw. RaSTS- und GaR-HRP- sowie GaM-HRP-Antikörpern. Signifikanz * $p < 5\%$; ** $p < 1\%$; *** $p < 0,1\%$; n=Stichprobe; Fehlerbalken: Standardabweichung.

Im indirekten pNCS-Aktivitätsassay für das humane FGE wurde in transient transfizierten HepG2-WT-Hepatozyten eine signifikante Stimulation sowohl mit CuSO₄ als auch mit TEPA verzeichnet. Durch den *knock out* des ATP7Bs schien sich dieser Effekt umzukehren (**Abb. 29 A**). Die spezifische Aktivität der Cu-Proben betrug lediglich das 0,56-fache der unbehandelten Proben (ub) wohingegen TEPA keinen signifikanten Einfluss verzeichnen ließ. Ein dazugehöriger Western Blot ist in **Abb. 29 B** gezeigt. Werden die Ergebnisse des STS-Assays für den HepG2-Wildtyp (**Abb. 29 C**) mit dem des KO verglichen (**Abb. 29 D**), fällt auf, dass sich die normierten, spezifischen Aktivitäten nicht groß unterscheiden, sobald hFGE rekombinant überexprimiert wird (rechts). Hier kann ebenfalls eine Steigerung um ca. 30% beim Chelator und eine Repression um 34-50% für Kupfer beobachtet werden. Dagegen unterscheiden sich die

Werte der Kontrollproben mit endogenem FGE stark. In der Auftragung der spezifischen STS-Aktivitäten ohne transiente hFGE-Expression (**Abb. 29 C und D**, links) kann für den WT weder ein Effekt durch Kupferzugabe noch durch Kupferchelation ermittelt werden. Dagegen wurde im *knock out* eine signifikante Reduktion um ca. 40% durch TEPA und beim Kupfer nur ein marginaler Wert detektiert, der weniger als 10% der unbehandelten Probe (ub) maß. **Abb. 29 E** verdeutlicht, dass diese Diskrepanz sich nicht mit dem Expressionslevel des endogenen FGEs unter den gegebenen Bedingungen erklären lässt. Sowohl die Banden im R α FGE-Blot ohne als auch die mit transienter Transfektion sind in ihrer Intensität vergleichbar. Insgesamt entsteht der Eindruck, dass die FGE-Aktivität in HepG2-KO-Zellen durch die Erhöhung der Kupferlevel abnimmt.

Aktivitätsassays in stabilen CHO-Zellen

Auch die hFGE-Varianten mit und ohne ER-Retentionssignal, die für die *in situ*-Konversion der *single-chain* Antikörper generierten wurden, wurden auf ihre Empfindlichkeit dem Kupfergehalt gegenüber analysiert. Für die Expression des stabil-inserierten hFGE-Gens sind keine signifikanten Unterschiede unter dem Einfluss von TEPA oder Kupfersulfat detektiert worden. Wie in **Abb. 30 A** dargestellt, kann auch die transiente Transfektion und Expression der Sulfatase ASA, nach siebentägiger Kultivierung im entsprechenden Medium und durch die Reduktion des störenden Einflusses der Kupferchelation durch PEI auf den Transfektionserfolg (Vgl. **Abb. 26 C**), im ausreichenden Maße gewährleistet werden. Die Ergebnisse des pNCS- und des STS-Assays sind in **Abb. 30 B und C** gegenübergestellt. Wie durch die blaue Gerade verdeutlicht, wurde unter Kupferzugabe, neben der minimalen Erhöhung von 23% beim WT-His, lediglich für die Variante WT-KDEL eine markante Verbesserung der spezifischen Sulfataseaktivität in Bezug auf unbehandelte Zellen ermittelt. RRA-His zeigte keine signifikante Veränderung gegenüber unbehandelten Zellen, wohingegen alle anderen Varianten eine Reduktion der Aktivität aufwiesen. Für den Cu-Chelator wurden ebenfalls durchweg Aktivitätsreduktionen aufgezeichnet, wobei lediglich die WT-KDEL-Variante von TEPA unbeeinflusst zu sein schien. Im STS-Assay konnte, neben moderaten Aktivitätsverlusten bei RRA-KDEL und RRA-PGEL, ein leichter Anstieg für die restlichen mit TEPA-behandelten Proben verzeichnet werden. Dagegen schienen tendenziell die Varianten mit ER-Retentionssignal (WT-KDEL, RRA-KDEL und RRA-PGEL) einem positiven Effekt durch die Anwesenheit von Kupfer zu unterliegen. Die gemessene Sulfataseaktivität wurde im Schnitt um das Vierfache erhöht. RRA-His wurde durch 50 μ M Kupfersulfat nicht signifikant beeinträchtigt und WT-His sowie WT-PGEL wurden leicht in ihrer Aktivität eingeschränkt.

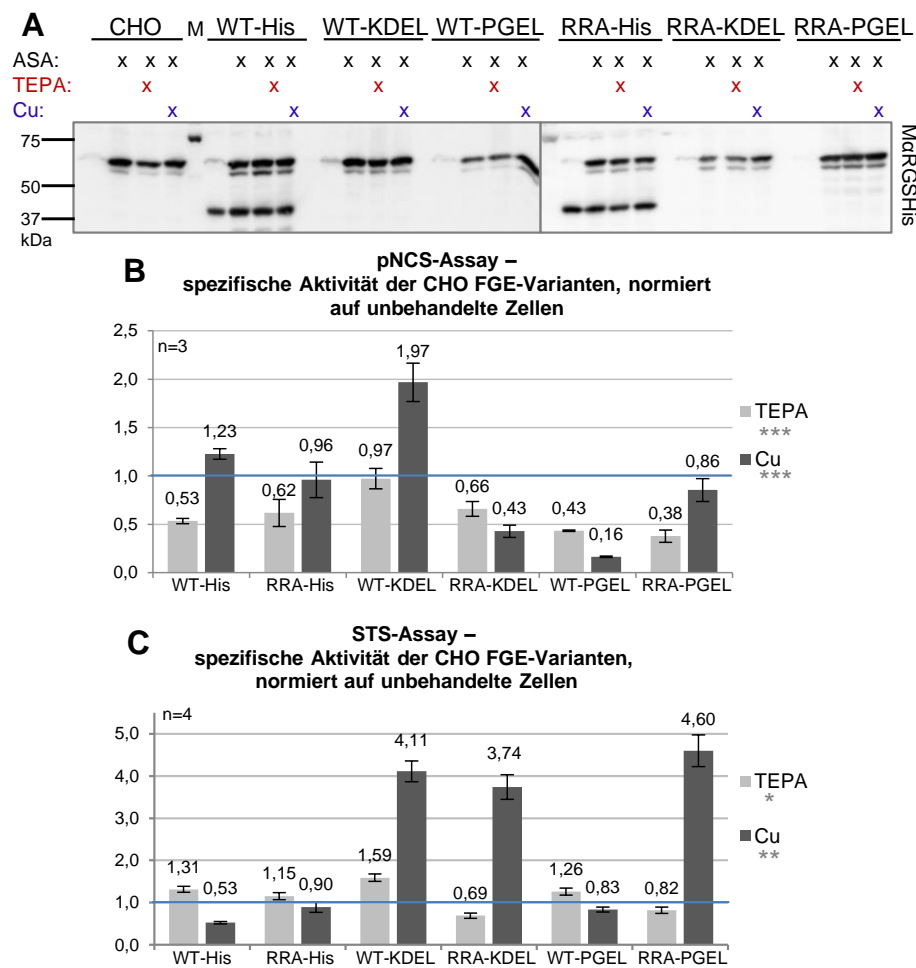


Abb. 30: Aktivitätsassays der hFGE-Varianten in Anwesenheit von Kupfer und TEPA. A) Western Blots von Zelllysaten der unbehandelten, mit Kupfer (Cu) und mit TEPA behandelten CHO-Zellen mit stabiler Expression der hFGE-Varianten hFGE-WT/RRA-His, -KDEL, oder -PGEL. ASA wurde transient transfiziert. Die Detektion geschah mittels M α RGSHis- und G α M-HRP-Antikörpern. Die entsprechenden spezifischer Aktivitäten im pNCS-Assay unter der Zugabe von Cu (50 μ M CuSO₄) oder TEPA (50 μ M) sind in B) gegeben. Die Aktivität wurde jeweils auf unbehandelte Zellen normiert (gekennzeichnet mit blauer Linie). C) Spezifische Aktivität der hFGE-Varianten stabiler CHOs im STS-Assay mit transienter STS-Expression unter der Zugabe von Cu (50 μ M CuSO₄) oder TEPA (50 μ M). Die Aktivität wurde jeweils auf unbehandelte Zellen normiert (gekennzeichnet mit blauer Linie). Signifikanz *p<5%; **p<1%; ***p<0,1%; n=Stichprobe; Fehlerbalken: Standardabweichung.

Fazit der Aktivitätsassays

Im Allgemeinen ließen sich aus den Sulfatase-Aktivitätsassays in Säugerzelllysaten Rückschlüsse auf die Aktivität des humanen FGEs *in vivo* schließen. Da Faktoren wie Kupfer und TEPA lediglich auf zellulärer Ebene, jedoch nicht während der *in vitro*-Substratumsetzung der Sulfatasen aus Zelllysaten anwesend waren, können diese Reagenzien allein auf die zelluläre Aktivität des hFGEs Einfluss genommen haben. Hierbei scheint eine hohe Hintergrundaktivität der Sulfatasen durch das zelleigene FGE, wie es in der humanen Fibroblastenzelllinie HT1080 der Fall ist, der Detektion und Auswertung reproduzierbarer Ergebnisse im Wege zu stehen. Dies könnte auch ein Effekt der Chelationsbedingung sein, bei der, wie bereits erwähnt, eine Kupferreduktion

nur zu 60% und eine Aktivitätssenkung von Kupferproteinen nur um bis zu 80% erzielt werden konnte (Percival und Layden-Patrice, 1992; Birkaya und Aletta, 2005; Chen *et al.*, 2005). Dies legt nahe, dass ein gewisser Pool an Cu-haltigen Enzymen verbleibt oder durch den Restkupfergehalt beladen wird. Dieser Effekt ist besonders bei hoher FGE-Hintergrundaktivität für eine konsequente Messung der Cu-Abhängigkeit limitierend.

Konsistentere Daten ließen sich mit der *sumf1^{-/-} knock out*-Zelllinie humaner Retinazellen erzeugen. In den STS- und pNCS-Assays der ARPE19-KO-Zellen wurden gesteigerte Sulfataseaktivitäten unter der Zugabe von Kupfersulfat detektiert (**Abb. 28**). Wie durch Holder *et al.* und Knop *et al.* postuliert, soll Kupfer ein essenzieller Kofaktor Formylglycin-generierender Enzyme sein (Holder *et al.*, 2015; Knop *et al.*, 2015). Eine entsprechende Abhängigkeit für die FGE-Aktivität *in vivo* konnte ebenfalls durch den stark reprimierenden Effekt des Kupferchelators auf die Sulfataseaktivitäten bekräftigt werden. Die in MSDi-Zellen getätigten Experimente (siehe **Abb. 27 B**) weisen ebenfalls auf eine Beladung des Formylglycin-generierenden Enzyms mit dem Kofaktor Kupfer hin, da durch Cu-Gabe augenscheinlich sowohl die Restaktivität sowohl des mutierten, endogenen als auch die Aktivität des transient exprimierten hFGEs *in vivo* gesteigert werden konnte. Dagegen wird bei Kupfermangel die Restaktivität des endogenen hFGEs zusätzlich herabgesetzt, sodass es der Zelle nicht mehr gelingt genügend Sulfatasen zu aktivieren. Das daraus resultierende retardierte Wachstum lässt sich vermutlich mit der einsetzenden Akkumulation von Speichermaterial, bestehend aus den natürlichen Substraten der lysosomalen Sulfatasen, sprich dem Ausbilden des MSD-Phänotyps, erklären. Die Überexpression des transienten hFGEs scheint diesen über siebentägiger TEPA-Behandlung induzierten Effekt allerdings nicht (nicht binnen 42 h) beheben zu können. Sollte die Kultivierung der MSD-Patientenzellen mit TEPA auf lange Sicht gelingen, könnten Langzeitexperimente über die Reversibilität dieses Effektes getätigt werden.

Besonders interessant sind die relativ starken Cu-bedingten Effekte auf Proteinebene sowie auf die Zellviabilität, welche in erster Linie in den MSDi-Zellen detektiert wurden. Sowohl die initialen Hinweise auf eine unter TEPA-Gabe veränderte Sekretion des hFGEs (**Abb. 26 B** und **Abb. 27 C**) als auch eine Reduktion der Oligomerisierung (**Abb. 26 B**) werfen Fragen über die Rolle der an beiden Prozessen beteiligten N-terminalen Domäne auf. Nicht zuletzt dadurch, dass die NTD aufgrund ihrer hohen Flexibilität in den Kristallstrukturen des hFGEs nicht analysiert werden konnte (Dierks *et al.*, 2005), wurde dessen Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt. Bei den prokaryotischen Verwandten des FGEs sind bislang keine N-Termini mit ähnlicher Struktur bekannt. Überdies ist bislang kein Mechanismus bekannt, bei dem ein ER-Protein mit einem Kupferkofaktor ausgestattet wird. In Anbetracht dieser Umstände wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei der Sekretion des hFGEs um einen Vorgang zur Kofaktorbeladung im

trans-Golgi-Netzwerk oder aus extrazellulären Kupferquellen handelt. Bakterielle Enzyme sind durch die geringere Kompartimentierung der prokaryotischen Zelle nicht auf eine entsprechende Technik angewiesen und könnten direkt in Kontakt mit cytosolischen Kupferchelatoren oder Kupfertransportern treten. Die höchstwahrscheinlich an der Kupferbindung beteiligten Cysteine C336 und C341 der aktiven Tasche (Vgl. Kofaktor-bindende Cysteinpaaare C274/C269 aus TcFGE und C272/C277 aus ScFGE; Meury *et al.*, 2017; Appel *et al.*, 2019; Miarzlou *et al.*, 2019) sind extrem oxidationsempfindlich (Dierks *et al.*, 2005). Daher lässt sich in weiterführenden Überlegungen vermuten, dass der N-Terminus im Apoenzym womöglich zunächst eine protektive Rolle des aktiven Zentrums einnimmt oder aber direkt an der Interaktion zum Kupferion während der Kofaktorbeladung beteiligt ist. Hierzu können ggf. die N-Terminalen Mutanten des hFGEs Aufschluss geben. Wie die Analyse der FGE-Varianten (Kapitel 5.2.1) und vergangene Studien (Mariappan *et al.*, 2008b; Ennemann *et al.*, 2013) zeigen, ist die *in vivo*-Aktivität der RRA-Mutante, bei der ein Abspalten der NTD verhindert wird, tatsächlich mit der des Wildtyps vergleichbar. Auch in den pNCS- und STS-Assays der stabilen hFGE-CHO-Zellen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und RRA-Formen des Enzyms unter Kupfer- oder TEPA-Zugabe detektiert (**Abb. 30 B und C**). Im Gegensatz dazu wird durch eine C50A/C52A-Mutation die enzymatische Aktivität des hFGEs deutlich reduziert (Mariappan *et al.*, 2008b; Ennemann *et al.*, 2013). Diese beiden Cysteine bilden das im N-Terminus befindliche C⁵⁰GC⁵²-Motiv, das aufgrund der Fähigkeit variable Disulfidbrücken einzugehen, kovalente Bindungen zu Interaktionspartnern wie ERp44 eingeht und an der Homooligomerisierung beteiligt ist (Preusser-Kunze *et al.*, 2005; Fraldi *et al.*, 2008; Mariappan *et al.*, 2008a). CXC-Motive kommen zum Beispiel in CXC-Chemokinen vor und können Heparinmoleküle binden (Belperio *et al.*, 2000; Woycechowsky und Raines, 2003), welche wiederum durch die extrazelluläre humane Sulfatase HSulf2 moduliert werden können (Uchimura *et al.*, 2006). Ähnliche CXXC-Motive sind in Oxidoreduktasen der Thioredoxinfamilie Trx, zu denen der hFGE-Interaktionspartner PDI gehört, maßgeblich an der Reduktion und Isomerisierung von Disulfiden (Chivers, *et al.*, 1996; Woycechowsky und Raines, 2003) und in Kupferchaperonen- und -transportern wie ATP7A und B in der Chelation des Metalls beteiligt (Voskoboinik *et al.*, 1999).

Vermutlich wird das FGE-Holoenzym im Golgi durch die Interaktion mit Metallochaperonen oder dem Golgi-ständigen Kupfertransporter ATP7B gebildet. Anschließend könnte der N-Terminus des hFGEs entweder zur ER-Retention durch die Interaktion mit ERp44 genutzt oder während der Sekretion abgespalten werden. Tatsächlich ist über ATP7B bekannt, dass es im Golgi die Beladung sekretorischer Kupferproteine wie die des Apoceruloplasmins übernimmt, wodurch das Cu-haltige Ceruloplasmin anschließend ins Blut sezerniert wird (Chandhok *et al.*, 2016). Die Analysen der ATP7B-*knock out*-Zelllinie (HepG2-KO) konnte keine eindeutigen

Hinweise liefern, die bestätigen würden, dass der Kupfertransporter in der Aktivierung des humanen FGEs beteiligt ist (siehe **Abb. 29**). Vom *knock out* dieser P-Typ ATPase wurden fatale Folgen für den intrazellulären Kupfergehalt und der potenziellen Holoenzymbildung des hFGEs auf der sekretorischen Route erwartet. Tatsächlich wurde bei dieser Wilson-Zelllinie weder eine höhere intrazelluläre Kupferkonzentration noch eine verminderte Cu-Ausscheidung oder ein retardiertes Wachstum aufgrund der Cu-Toxizität detektiert (Chandhok *et al.*, 2014). Es kann davon ausgegangen werden, dass der Zellstress proportional zur Kupferkonzentration zunimmt, da der detoxifizierende Mechanismus der Zellen massiv beeinträchtigt ist. Die Zelle kann dem Cu-induzierten Zelltod nur entgehen, indem bei hoher Cu-Konzentration Autophagosomen gebildet werden. Durch Autophagie des Kupfers und durch Exozytose der durch Kupferüberschuss geschädigten Mitochondrien, die lysosomal abgebaut werden, retteten Hepatocyten sich kurzzeitig vor Cu-induzierter Apoptose (Polishchuk *et al.*, 2018). Wahrscheinlich tragen hier die Artefakte der Kupfergehaltssteigerung auf die allgemeine Viabilität der KO-Zellen stärker als ein etwaiger positiver Effekt des Kupfers auf die hFGE-Aktivität zum Gesamtergebnis bei. Bei paralleler Überexpression des hFGEs und der Sulfatasen wurde dieser Stress ggf. noch verstärkt. Werden die indirekten *in vivo*-Aktivitäten des endogenen hFGEs ermittelt (**Abb. 29 C und D**), sind im WT keine Veränderungen, im KO dagegen deutliche Auswirkungen detektierbar. Vermutlich sind die schon mit geringen Mengen Cu beladenen Enzyme hier sensitiver gegenüber TEPA. Die Restaktivität des hFGE-Holoenzym wurde durch die Chelation der Cu-Ionen weiter herabgesetzt. Eine Erhöhung des Kupfergehaltes hingegen verstärkt wiederum vornehmlich die Cu-Toxizitätseffekte denn die Sulfataseaktivität.

Zusammenfassend zeigen die hier genannten Experimente, dass die Simulation einer Kupfermangel- und -überschussituation im zellulären System für den Großteil der betrachteten Zelllinien zumindest kurzzeitig möglich ist. Eine Cu-abhängige Aktivitätssteigerung der eu- und prokaryotischen FGE-Varianten ließe sich positiv auf die Generierung von Proteinkonjugaten mittels FGly-Technik anwenden. Kupfersulfat von bis zu 50 μM sollte demnach standardmäßig in der *in situ*-Antikörperproduktion angewandt und die Aktivität und Spezifität der bakteriellen, aeroben Enzyme *in vitro* unter Kupferzugabe oder post-chromatographischer Kofaktorbeladung mittels Rekonstitution getestet werden.

5.2.3 Der Einfluss von Kupfer auf die Substratspezifität prokaryotischer FGEs *in vitro*

Die Proteinkonjugation mittels FGly ist eine mehrstufige Technik, dessen Gesamtausbeute daher von der Vollständigkeit jedes einzelnen Reaktionsschrittes abhängig ist. Um in der Proteinkon-

jugation einen möglichst vollständigen Umsatz des Aldehyd-tags zu generieren, werden hochaktive Enzyme benötigt. Im vorangegangenen Kapitel konnte bereits gezeigt werden, dass *in vivo* eine Aktivitätssteigerung des hFGEs durch Kupfer zu detektieren war (Kapitel 5.2.2). Anschließend sollten nun auch die bakteriellen FGEs in Anwesenheit von Kupfer analysiert werden. Eine verbesserte Ausbeute an *in situ*-umgesetzten DARPin unter Cu-Zugabe konnte in *E. coli* jedoch nicht erreicht werden (nicht gezeigt). Wie allerdings bei der *in vitro*-Umsetzung der DARPin-Bibliothek mit den bakteriellen FGEs aus *S. coelicolor*, *T. curvata* und *M. tuberculosis* erwähnt (siehe Kapitel 5.1.2), konnten in Anwesenheit von Kupfer und bei hohen Enzym-Substrat-Verhältnissen auch geringe Modifikationen der CTAGR-Kernsequenz nachgewiesen werden. Diese Effekte wurden in erster Linie für das MtFGE beobachtet, wobei auch ScFGE eine zu bisherigen Veröffentlichungen abweichende Substratakzeptanz zeigt (Carlson *et al.*, 2008). Eine Formylglycin-Bildung in Prolin-freien Motiven durch FGE galt bisher als eher unwahrscheinlich. Auch die publizierte Konsensussequenzen für Tc-, Sc- und MtFGE beinhalteten bislang die Prolin-haltigen Kernmotive CSPTR, CTPSR und CTPAR, welche von den am stärksten konservierten Sequenzen der bakteriellen Sulfatasen abgeleitet wurden (Rush und Bertozzi, 2008; Holder *et al.*, 2015; Knop *et al.*, 2016). Dagegen wurden auch Prolin-freie Cysteinmotive durch das unbekannte, endogene System von *E. coli* nicht aber durch ScFGE und MtFGE konvertiert (LCTASR und LCTASA), was bislang für einen Hinweis auf ein Enzym der anSME-Familie gedeutet wurde (Rush und Bertozzi, 2008).

Nachdem in aus Zellkulturüberständen isoliertes, humanes FGE ca. 0,09 mol Kupfer pro mol Protein entdeckt wurde (Preusser-Kunze *et al.*, 2005), wurde der Effekt des Kupfers *in vitro* betrachtet. Dabei wurde eine inhibierende Wirkung durch die Anwesenheit von Cu^{2+} in der Reaktionslösung ermittelt (IC_{50} ca. 5 μM ; Preusser-Kunze *et al.*, 2005). Die prokaryotischen Enzyme ScFGE und MtFGE zeigten ebenfalls eine moderate enzymatische Aktivität *in vitro*, trotz dass hier die Abwesenheit jeglicher redoxaktiver Metalle publiziert wurde (Carlson *et al.*, 2008). Erst nachdem im Jahr 2015 bekannt wurde, dass sich die Enzymaktivität des Sc- und TcFGEs durch Kupfer, nicht aber durch andere Metalle wie Ag, Ca, Cd, Co, Fe, Hg, Mn, Ni, Pd oder Zn beeinflussen ließen (Holder *et al.*, 2015; Knop *et al.*, 2015), wurden erneut intensivere Forschungen zur *in vitro*-Aktivität der pro- und auch eukaryotischen Enzyme durchgeführt. Der vormals als inhibierend beschriebene Effekt des Kupfers in der *in vitro*-Reaktion des hFGEs wurde als Cu-katalysierte Oxidation des DTTs und einer starken Dimerisierung des Substratpeptides beschrieben (Holder *et al.*, 2015). DTT wird während der Konversion als Reduktionsäquivalent eingesetzt und sorgt für eine Reduktion der enzymatisch aktiven Cysteine, wobei Reaktionen mit dem humanen FGE auch in Gegenwart schwächerer Reduktionsmittel wie Glutathion (GSH) und β -Mercaptoethanol durchgeführt werden können (Holder *et al.*, 2015). Für die Aufreinigung von

rekombinantem hFGE aus Insektenzellkulturen kann zudem eine hochaktive Fraktion abgetrennt werden, in der die Anwesenheit des Kofaktors Kupfer und zweier Calciumionen mittels ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectrometry*) nachweisbar ist (Holder *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2015). Bei dem in *in vitro*-Experimenten eingesetzten hFGE handelt es sich daher bereits um die mit Kupfer beladene Holoenzympezies. Für das humane FGE-Apoenzym bzw. eine noch nicht separierte Mischung aus Apo- und Holoenzym wurde demnach ein positiver Einfluss des Kupfers auf den FGly-Gehalt der *in vitro* umgesetzten Peptid- und Proteinsubstrate festgestellt. Die Substratspezifität blieb allerdings von der Aktivitätssteigerung durch den Metallkofaktor unverändert (persönliche Kommunikation Dr. Tobias Krüger und Dr. Sarfaraz Alam). Das humane FGE zeigt eine der striktesten Spezifitäten im Hinblick auf die Kernsequenz CxPxR des Erkennungsmotivs.

Da bereits für das rekombinante ScFGE und TcFGE eine Methode zur postchromatographischen Rekonstitution mit Kupfer bekannt war (Holder *et al.*, 2015; Knop *et al.*, 2015), bei der Enzyme beladen mit stöchiometrischen Mengen an Kupfer erhalten werden, wurde diese Strategie mit Hilfe von Dr. Sarfaraz Alam ebenfalls auf MtFGE angewandt. Hierbei wird das prokaryotische Enzym in Anwesenheit von Kupfersulfat inkubiert. Es kommt häufig zur Präzipitation, die durch eine Abspaltung des His₆-tags reduziert werden kann. Überschüssige Kupferionen wurden anschließend durch die Zugabe des Chelators EDTA gebunden. Währenddessen ließen sich auch die Enzympräzipitate zum Großteil wieder resuspendieren. Ca. 60% des rekonstituierten FGEs wurden anschließend durch Umpufferung mittels PD10-Entsalzungssäulen zurückgewonnen. Somit konnten nachträglich mit ihrem Kofaktor beladene Enzyme ScFGE_{rek} und MtFGE_{rek} in einem Experiment eingesetzt werden, bei dem sowohl ein Peptid als auch ein DARPin mit beiden Cystein-haltigen Erkennungsmotiven durch das nicht-rekonstituierte oder das rekonstituierte Enzym oxidiert werden sollten. Zusätzlich wurde durch die Zugabe von freiem Kupfersulfat getestet, ob sich die Konversionsrate oder die Motivspezifität über dieses Maß hinaus verändern lässt. Ähnliche *in vitro*-Proteinkonversionen des TcFGEs in Anwesenheit von Kupfer (Reaktionsbedingungen aus Knop *et al.*, 2016) zeigten eine zum unbehandelten Enzym gesteigerte Aktivität aber unverändert strikte Spezifität (nicht gezeigt). Die Modellproteine und -peptide wurden anschließend massenspektrometrisch analysiert.

Peptidkonversionen mit Holoenzymen

Bei der Umsetzung von Peptiden mit zwei Cystein-Erkennungsmotiven, kann das Signal der (FGly)TPSR-Spezies zunächst nicht von dem der (FGly)TAGR-Spezies unterschieden werden (siehe **Abb. 32 A**). In solchen Fällen wurden die entsprechenden Peptide nochmals mittels MS/MS-LIFT-Verfahrens vermessen, bei dem es zu einer Fragmentierung der Peptidbindung zwischen dem Formylglycin und der C-terminal benachbarten AS kommt. Dadurch entstehen

charakteristische Signalverteilungen (Peng *et al.*, 2003; Krüger *et al.*, 2018, 2019). Beispielfhaft sind in **Abb. 32** die MALDI-ToF-MS-Spektren für das Peptid P3 mit der Sequenz GLCTPS-RAGPSGCTAGRAAFITGQ (synthetisiert durch Dr. Tobias Krüger) und in **Abb. 31** exemplarische MS/MS-Spektren samt Fragmentliste gezeigt. Da die Signale x_3 , y_3 , b_1 und a_1 von Peptiden mit zweifacher Konversion stammen, handelt es sich z.B. bei den Spektren in **Abb. 31 B** und **C** um Doppelkonversionen.

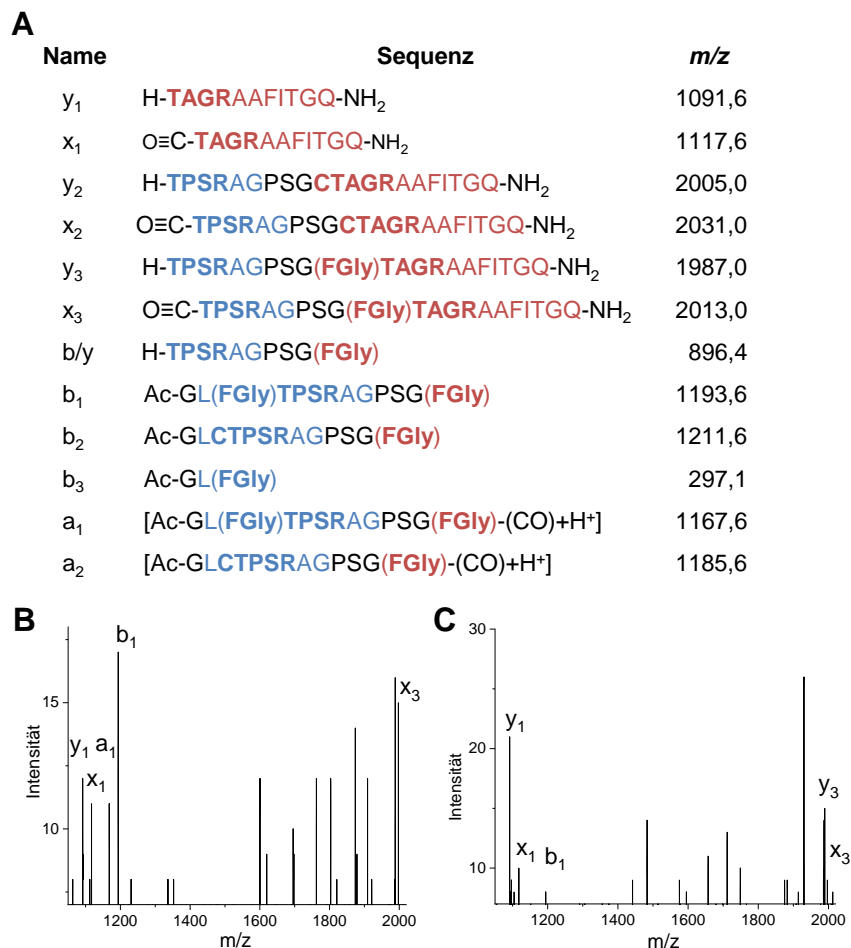


Abb. 31: MALDI-ToF-MS/MS-LIFT-Analyse der Peptidfragmente des Peptids P3. A) Übersicht über die mittels MALDI-ToF-MS/MS-LIFT zu erwartenden Fragmentmassen von P3. MS/MS-Messung von zweifach FGly-tragenden Peptiden (P3b) durch die Konversion mit **B**) MtFGE mit 50 μM CuSO₄ oder **C**) MtFGE_{rek}.

Im Vergleich zum P3-Referenzspektrum (**Abb. 32 B**) konnte für die *in vitro*-Umsetzung mit MtFGE (**C**) die Anwesenheit einer Spezies mit nur einem FGly detektiert werden. Die Anwesenheit des Kupfers, sowohl im rekonstituierten Enzym (**E**) als auch nach Zugabe von 12,5 μM CuSO₄ (**D**), resultiert in der zweifach FGly-tragenden Spezies P3b. Die Enzymfraktion des MtFGE_{rek} war offensichtlich nach der Rekonstitution nicht zu 100% mit dem Kofaktor beladen, da das Verhältnis zwischen den Signalintensitäten von P3, P3a bzw. P3c und P3b durch die Zugabe von Kupfer zur Reaktion noch weiter zugunsten des Produktes P3b hin verschoben werden konnte (**Abb. 32 F**). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für ScFGE und ScFGE_{rek} ermittelt. Die

hohe Aktivität des ScFGE allein sorgt bereits für einen vollständigen Umsatz des Eduktes P3, sodass eine Mischung aus P3b und P3a/c entstand (**Abb. 32 G**). Im Allgemeinen konnten auch hier die Intensitätsverhältnisse durch die Rekonstitution oder durch Kupferzugabe zur doppelt FGly-haltigen Spezies des Peptides P3 verschoben werden (**H-I**). Interessant ist zudem, dass die Konversion des CTAGR-Motivs im Peptid P3 auch ohne das N-terminale Hilfsmotiv EQS des MMAtsBs stattfindet, wohingegen in Abwesenheit der C-terminalen Hilfssequenz im Peptid P2 (**GCTAGRGLCTPSR**) keine Konversion dieses Prolin-freien Motivs mehr detektiert werden kann (unveröffentlichte Daten Boschanski *et al.*; Kapitel 8.1, **Abb. 46**).

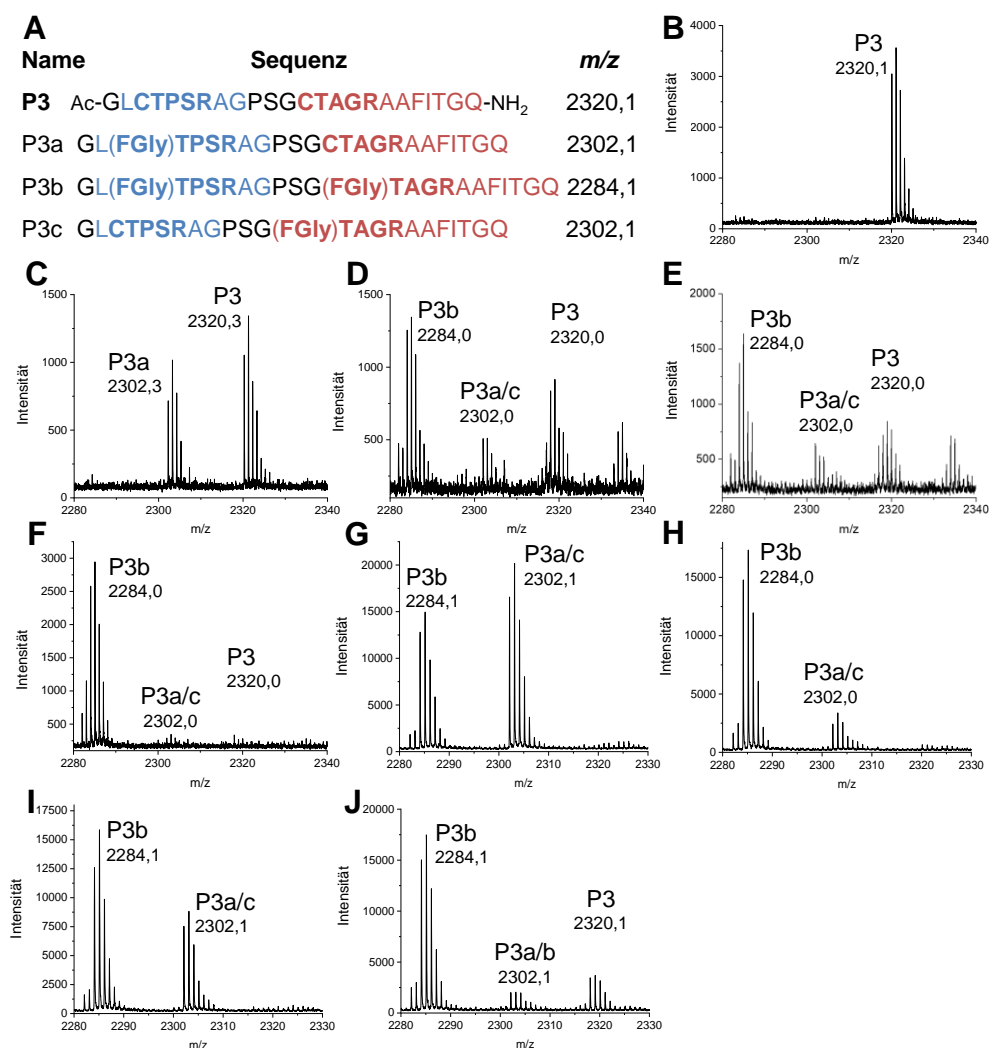


Abb. 32: Analyse der Substratspezifität der Enzyme MtFGE und ScFGE mit und ohne Kupferzugabe anhand des Peptides P3. **A**) Übersicht über das Peptid P3 und der im MALDI-ToF-MS zu erwartenden Masse-Ladungsverhältnisse (m/z). **B**) P3 Referenzspektrum. **C**) P3 mit MtFGE. **D**) P3 mit MtFGE und 12,5 μM CuSO₄. **E**) P3 mit MtFGE_{rek}. **F**) P3 mit MtFGE_{rek} und 12,5 μM CuSO₄. **G**) P3 mit ScFGE. **H**) P3 mit ScFGE und 12,5 μM CuSO₄. **I**) P3 mit ScFGE_{rek}. **J**) P3 mit ScFGE_{rek} und 12,5 μM CuSO₄. In allen Spektren wurden den MALDI-Signalen die möglichen Spezies (P3a-c) und die detektierten m/z -Werte zugeordnet. Das Enzym-Substrat-Verhältnis lag ca. bei 1:2.

DARPin-Konversionen mit Holoenzymen

Zu P3 analoge Ergebnisse für MtFGE (**Abb. 33**) und ScFGE (Kapitel 8.1, **Abb. 47**) konnten auch an DARPin 004 mit dem dualen Aldehyd-tag **GGEQSCTAGRAAFITGQGLCTPS-**

REASGADHHHHH erzeugt werden. Aufgrund der charakteristischen Peptide, die durch die proteolytische Spaltung durch Trypsin an distinkten Stellen des Proteins (Arginin- und Lysin-Bindungen) vorgenommen wurden, kann in diesem Fall jeweils eine klare Differenzierung zwischen den Fragmenten mit den (FGly)TPSR- und (FGly)TAGR-Sequenzen sowie zwischen den zweifachen FGly-Spezies (-36 Da) und Iminen der Spezies mit nur einem FGly vorgenommen werden. Imine entstehen durch die Reaktion des Aldehyds mit dem N-terminalen Imin, wobei zusätzlich zur FGly-Bildung (-18 Da) eine weitere Massenverringerng von 18 Da durch die Abspaltung von Wasser detektiert werden kann. Die entsprechenden Peptide und m/z -Werte können in **Abb. 33 A** abgelesen werden. In den Referenzspektren des DARPin 004 (**B**) kann für das CTPSR-Motiv bereits ein geringer Umsatz detektiert werden, welcher durch das bislang unbekannte, endogene System-X der *E. coli*-Expressionskultur hervorgerufen wurde. Im Vergleich von **Abb. 33 C** und **D** wird deutlich, dass der Umsatz des CTAGR-Motivs durch die Anwesenheit von Kupfer stark zunimmt. Derselbe Effekt kann auch durch die Rekonstitution des MtFGEs detektiert werden (**E**), der sich in diesem Fall durch die zusätzliche Kupfergabe nicht signifikant weiter steigern ließ (**F**).

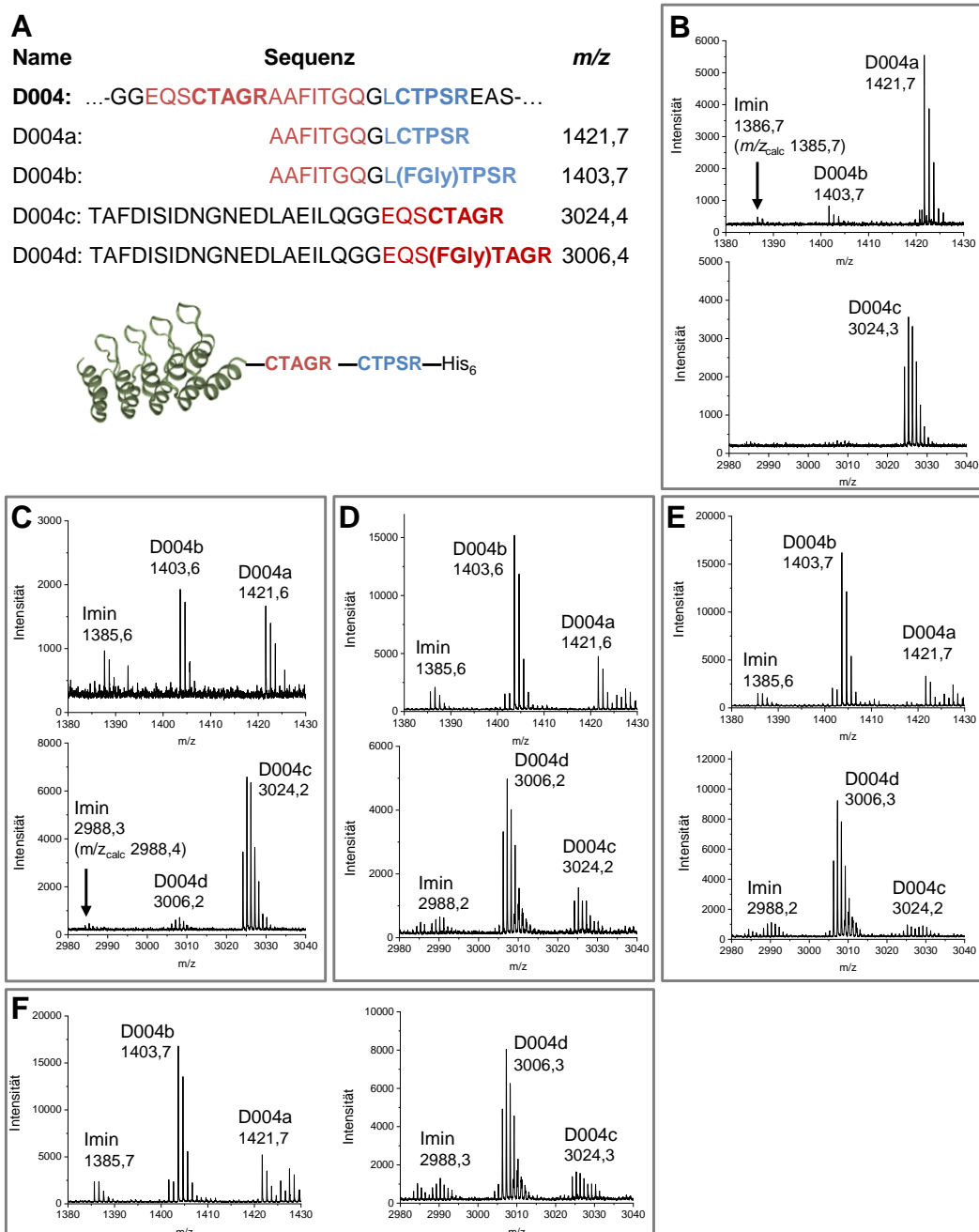


Abb. 33: Analyse der Substratspezifität des Enzyms MtFGE mit und ohne Kupferzugabe anhand des DARPins 004. **A**) Übersicht über den Aldehyd-tag des DARPins 004 und der im MALDI-ToF-MS zu erwartenden Masse-Ladungs-Verhältnisse (*m/z*) der tryptischen Peptide. **B**) D004 Referenzspektrum. **C**) D004 mit MtFGE. **D**) D004 mit MtFGE und 12,5 μM CuSO₄. **E**) D004 mit MtFGE_{rek}. **F**) D004 mit MtFGE_{rek} und 12,5 μM CuSO₄. In Allen Spektren wurden den MALDI-Signalen die möglichen Spezies (P3a-c) und die detektierten *m/z*-Werte zugeordnet.

Werden die Umsätze für P3 aus **Tab. 32** mit denen des DARPins 004 aus **Tab. 33** verglichen, wird deutlich, dass die Anwesenheit des Kofaktors Kupfer eine eindeutige Senkung der Substratspezifität prokaryotischer FGEs *in vitro* hervorruft. Die Akzeptanz des Prolin-freien Motivs war in dieser Versuchsreihe bei ScFGE signifikant höher ausgeprägt als bei MtFGE, was schon allein die Umsetzungen des CTAGR-Motivs durch nicht-rekonstituiertes Enzym mit 43,1% P3b (2xFGly) und 23,7% FGly-Anteil des CTAGRs im DARPIn deutlich macht.

Tab. 32: Umsätze der bakteriellen Enzyme MtFGE und ScFGE am Peptid P3. Die Enzyme wurden entweder in Gegenwart von Kupfersulfat (12,5 µM; +Cu), als rekonstituiertes Enzym (rek) oder ohne Behandlung für 1,5 h bei 37 °C und einem Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:2 in Bicinpuffer pH 9,0 eingesetzt. Die FGly-Konversion wurden mittels MALDI-ToF-MS-Signalintensitäten bestimmt.

Enzym	0x FGly (P3) /%	1x FGly (P3a/c) /%	2x FGly (P3b) /%
/	95,1-100,0	0-4,9	0,0
MtFGE	72,2	15,2	12,1
MtFGE + Cu	40,9	14,3	44,8
MtFGE _{rek}	31,0	8,0	61,0
MtFGE _{rek} + Cu	1,9	2,1	96,0
ScFGE	0,9	56,0	43,1
ScFGE + Cu	1,6	14,3	84,1
ScFGE _{rek}	1,1	36,1	62,8
ScFGE _{rek} + Cu	17,0	8,6	74,4

Tab. 33: Umsätze der bakteriellen Enzyme MtFGE und ScFGE am DARPIn 004. Die Enzyme wurden entweder in Gegenwart von Kupfersulfat (12,5 µM; +Cu), als rekonstituiertes Enzym (rek) oder ohne Behandlung für 1,5 h bei 37 °C und einem Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:2 in Bicinpuffer pH 9,0 eingesetzt. Der FGly-Gehalt wurde mittels MALDI-ToF-MS-Signalintensitäten des tryptischen DARPins 004 bestimmt.

Enzym	CTPSR (FGly)TPSR /%	(FGly)TPSR /%	CTAGR (FGly)TAGR /%	(FGly)TAGR /%
/	93,7	6,3	97,8	2,2
MtFGE	47,4	52,3	93,3	6,7
MtFGE + Cu	20,9	79,1	26,1	73,9
MtFGE _{rek}	14,9	85,1	4,7	95,3
MtFGE _{rek} + Cu	19,4	80,6	16,2	83,8
ScFGE	15,6	84,4	76,3	23,7
ScFGE + Cu	5,3	94,7	22,7	77,3
ScFGE _{rek}	10,8	89,2	60,8	39,2
ScFGE _{rek} + Cu	7,2	92,8	25,8	74,2

So konnte durch Kupfer die Steigerung des Umsatzes von einem jeweils ca. 50%igen Anteil an einfach und zweifach FGly-haltigem Peptid auf bis zu 96,0% doppelt umgesetztem Peptid ermöglicht werden. Für das mit MtFGE umgesetzte Peptid P3 konnte der prozentuale Gehalt an doppelt konvertiertem Produkt von 12,1% auf bis zu 96,0% gesteigert werden (Faktor 7,9). Bei der Auswertung der Daten des DARPins 004 wird klar, dass eine höhere Umsatzrate im CTAGR-Motiv nicht den Einbruch des CTPSR-Umsatzes zur Folge hat. Für das FGE-Motiv konnten die Enzymaktivität durch den Kofaktor um das ca. 1,6-fache gesteigert werden, was an der Steigerung der Konversionen von 52,3% auf bis zu 85,1% abzulesen ist. Der durch ScFGE erreichte FGly-Gehalt von 84,4% wurde dementsprechend auf 94,7% mit dem Faktor 1,1 erhöht.

Bei der MMAtsB-Erkennungssequenz stieg durch die Anwesenheit des Kupfers der FGly-Anteil um bis zu 50,5% und die Differenz zwischen CTAGR (D004c) und (FGly)TAGR (D004d) lag bei MtFGE sogar bei 88,6%.

Als Konsequenz aus den mittels der DARPin-Bibliothek und der Bandbreite an aeroben Enzymen ermittelten Substratspezifitäten ergaben sich für das gesamte Projekt neue Möglichkeiten hinsichtlich einer bioorthogonalen, zweifachen Konjugation von Proteinen. Die zu Beginn postulierte Reaktionsroute zur Generierung eines zweifach modifizierten ADCs (**Abb. 34 A**) basierte auf der hohen Substratspezifität des humanen FGEs für das CTPSR-Motiv und einer konsekutiven Umsetzung und Konjugation einzelner Motive (Krüger *et al.*, 2018). Dazu wurde das Modellprotein DARPin E01 und anschließend auch der Antikörper scFv425-Fc mit dem in Kapitel 5.1 beschriebenen dualen Aldehyd-tag ausgestattet. Durch die Nutzung der CHO-Säugerzelllinien und des *rational designs* des hFGEs konnte gezeigt werden, dass die erste Konversion *in situ* während der Antikörperproduktion (Kapitel 5.2.1) stattfinden kann. An die Aufreinigung des Antikörpers schließt sich die entsprechende Konjugationsreaktion an. Als Konjugationsstrategie wurde eine zweistufige Abfolge aus HIPS-Ligation und SPAAC-Click-Reaktion gewählt, welche in Kapitel 5.3 genauer beschrieben wird. Aufgrund seiner oxidationsempfindlichen Eisen-Schwefel-Cluster wird MMAtsB anschließend *in vitro* unter quasi-anaeroben Reaktionsbedingungen eingesetzt. Mit der Umsetzung des CTAGR-Motivs kann eine zweite Fracht an den ADC gekoppelt werden, wodurch formal pro Frachtmolekül jeweils eine DAR von zwei pro Antikörper bzw. eins pro DARPin erzielt werden kann. Bei der Verwendung nur eines Konjugationsreagenzes und einer vollständigen Umsetzung in jedem Schritt könnte mit diesem vier- bis fünfschrittigen Reaktionsschema eine maximale DAR von vier pro AK und zwei pro DARPin erzielt werden. Eine *in vivo*-Konversion im bakteriellen System hatte sich als unzureichend herausgestellt (Kapitel 5.1.2). Das analoge Schema mit umgekehrter enzymatischer Reihenfolge (**Abb. 34 B**) beschreibt dementsprechend den vorwiegend auf DARPins angewandten und ausschließlich *in vitro* stattfindenden Reaktionsweg.

Wie in Krüger *et al.* publiziert, wurde die Strategie der aeroben FGly-Generierung erweitert (**Abb. 34 C**). Sie basiert auf der Möglichkeit des Enzyms MMAtsB *in vitro* auch untypische, Serin-haltige Erkennungsmotive umzusetzen (Krüger *et al.*, 2019). Wie an den Peptid- und DARPin-Experimenten *in vitro* gezeigt, muss zur Erkennung der Ser-Motive durch MMAtsB der in KPAtsB-Substraten konservierte Prolinrest vorhanden sein (SAPAR; Kapitel 5.1.2). Da alle sauerstoffabhängigen Formylglycin-generierende Enzyme unfähig sind ein Aldehyd aus einem Serin anstelle eines Cysteins zu bilden, wird die Selektivität der Reaktion weiter verstärkt. Durch die Kombination von Cys- und Ser-Motiven kann eine komplette Orthogonalität im enzymati-

schen Schritt gewährleistet werden (C). Der konsekutive Ablauf und die theoretisch möglichen DARs entsprechen den Strategien A und B.

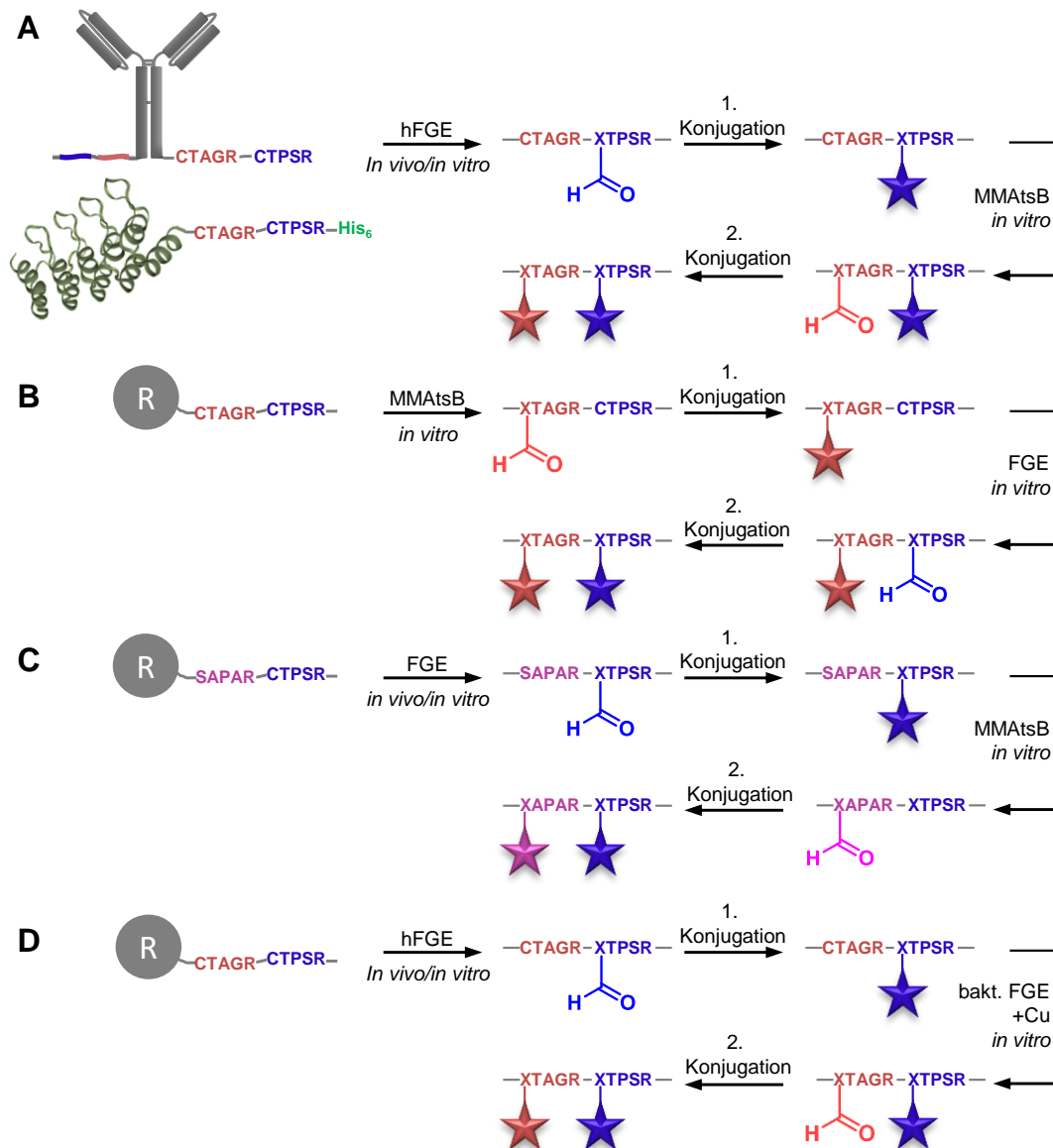


Abb. 34: Strategien zur dualen Proteinkonjugation mittels AtsB und FGE. A) Konversion des dualen Aldehydtags an einem *single-chain* Antikörper oder DARPin durch hFGE (CTPSR; blau), gefolgt von der 1. Konjugation (blauer Stern), der zweiten enzymatischen Umsetzung mittels MMAtsB (CTAGR; rot) und der zweiten Konjugation (roter Stern). B) Reaktionsschema aus A) mit vertauschter enzymatischer Reihenfolge. R= DARPin oder Antikörper. C) Duales Konjugationsschema mit erweitertem Motivrepertoire durch die Verwendung des SAPAR-Motivs (pink). D) Duale Konjugation allein durch Cu-beladene FGEs und Cys-Motive (rot und blau).

Erstmals in *in vitro*-Umsetzungen doppelt getaggtter Modellproteine der DARPin-Bibliothek beobachtet, konnte eine signifikante Senkung der Substratspezifität in Anwesenheit hoher Mengen Cu-beladener FGEs nachgewiesen werden (Kapitel 5.2.3). Dieser Effekt wurde sowohl bei Kupferzugabe als auch bei vorheriger Rekonstitution der Enzyme detektiert. Die hier gezeigte Rekonstitution erlaubt eine Umsetzung von Proteinen ohne die Gegenwart hoher Konzentrationen an redoxaktiven Metallen, womit sich diese Methodik auch auf Antikörper anwenden lässt. Die

Verschiebung der *in vitro*-bestimmten Substratspezifität prokaryotischer FGEs durch den Kofaktor Kupfer ermöglichte nun auf die Verwendung einer anaeroben Reaktion zu verzichten (**Abb. 34 D**). Die Unabhängigkeit einer dualen FGly-Konversionsmethode vom Eisen-Schwefel-Enzym AtsB vereinfacht die konsekutive Proteinkonjugation. Da das humane FGE *in vivo* und auch *in vitro* selbst unter Kupferzugabe eine stringente Prolinabhängigkeit zeigt (Kapitel 5.2.1), kann in einem ersten Konversionsschritt ausschließlich das CTPSR-Motiv eines dualen Aldehyd-tags umgesetzt werden. Nach vollendeter erster Konjugation wird nun ein zweites, Prolin-freies Cys-Motiv mittels rekonstituierter, bakterieller Enzyme adressiert und im Anschluss mit einem zweiten Konjugaten beladen (**D**). Pro Reaktion kann demnach eine DAR von zwei pro Antikörper (DAR= 1 pro DARPin) erreicht werden, wohingegen eine sofortige Umsetzung beider Cystein-Motive durch ScFGE_{rek} oder MtFGE_{rek} die Isolation eines homogen beladenen ADCs mit einer maximalen DAR von vier ermöglicht.

5.3 Antikörper-Wirkstoff-Konjugate

Die Generierung eines Formylglycins in den Modellpeptiden und -proteinen diente der Erzeugung einer reaktiven Gruppe, welche innerhalb der Aminosäurereste einzigartig ist. Somit kann eine zielgenaue Reaktion an einem Aldehyd ausgenutzt werden, um eine Fracht an Biomolekülen anzuhängen. Diese Technologie basiert auf der von Carrico *et al.* publizierten *aldehyde tag*- bzw. *SMARTag*-Strategie, bei der ein Protein mittels Formylglycin durch eine Aminoxy-funktionalisierte Substanz entweder mit einem AlexaFluor-Farbstoff markiert oder mit einem Polyethylenglycol (PEG) versehen wurde (Carrico *et al.*, 2007). Neben dem Einsatz des FGEs oder AtsBs kann ein Aldehyd als bioorthogonale, funktionelle Einheit auch durch andere Systeme in Proteinen oder Peptiden eingebracht werden. Darunter befinden sich sowohl enzymatische und chemische Verfahren als auch der Einsatz unnatürlicher Aminosäuren (siehe Kapitel 2.3; Spears und Fascione, 2016). In diesen und weiteren Proteinmodifikationen werden die Aldehydgruppen anschließend selektiv chemisch modifiziert bzw. mit einer Fracht beladen. Dazu zählen Pictet-Spengler-Ligationen, die Wittig-Reaktion, Knoevenagel-Reaktionen und Oxim- und Hydrazonligationen (Spears und Fascione, 2016).

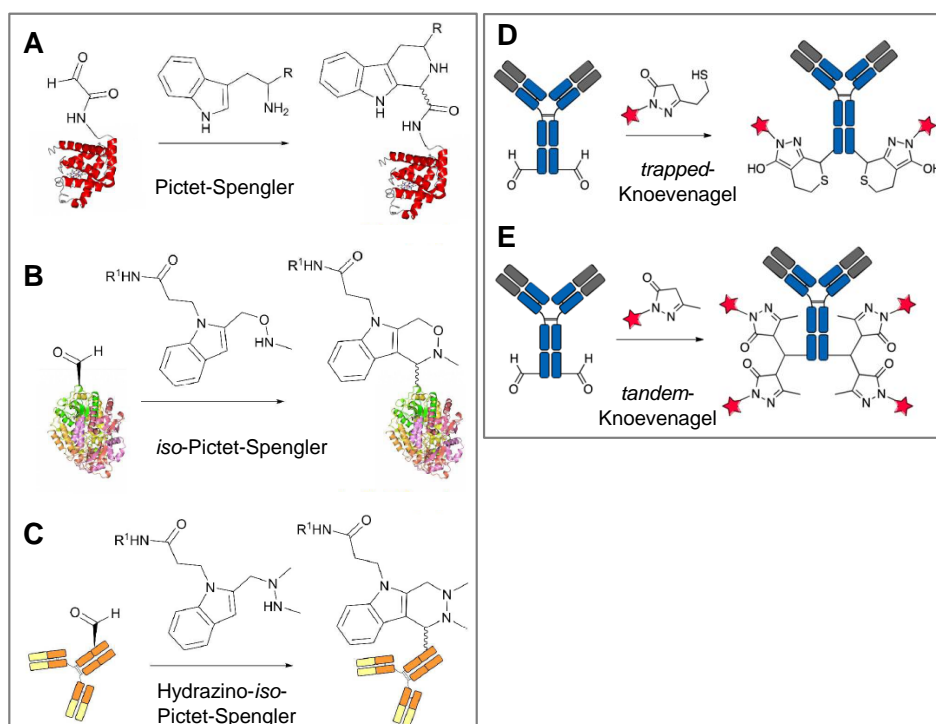


Abb. 35: Pictet-Spengler- und Knoevenagel-Ligationsschemen. Dargestellt sind Schemata von Proteinkonjugationsreaktionen an Aldehydresten, die entweder auf der Pictet-Spengler-Ligation (**A**) oder der Knoevenagel-Kondensation (**D**) beruhen. Die Fracht (R, R¹ oder roter Stern) kann in einer Zyklisierungsreaktion, **B**) der *iso*-Pictet-Spengler-Ligation oder **E**) der Hydrazino-*iso*-Pictet-Spengler-Ligation, kovalent an das Biomolekül gebunden werden. Durch eine **D**) *trapped*-Knoevenagel-Kondensation wird pro Aldehydfunktion je ein Frachtmolekül liegiert, bei der **H**) *tandem*-Knoevenagel-Kondensation dagegen werden jeweils zwei Frachtmoleküle angehängen. Verändert nach Spears und Fascione, 2016 und Kudirka *et al.*, 2016.

Wie bereits in Kapitel 2.3 erwähnt wird bei der Pictet-Spengler-Ligation (**Abb. 35 A**) der Aldehyd mit der Aminfunktion eines Tryptamins derivatisiert. In dessen Weiterentwicklung, die *iso*-Pictet-Spengler-Ligation (**Abb. 35 B**), wird ein Aminooxy-funktionalisiertes Reagenz eingesetzt, um anschließend eine Zyklisierung zum Indolring auszuüben (Stöckigt *et al.*, 2011; Agarwal *et al.*, 2013). Die darauf aufbauende Hydrazino-*iso*-Pictet-Spengler-Ligation (HIPS) ermöglicht durch die Verwendung einer N-Methylhydrazingruppe Ligrationsreaktionen bei pH 6 (**Abb. 35 C**), was biokompatibler ist als die unter deutlich saureren Bedingungen ablaufende Pictet-Spengler-Ligation (Agarwal *et al.*, 2013; Drake *et al.*, 2014; Krüger *et al.*, 2019). Auch die Wittig-Reaktion kann bei für Proteine geeigneten pH-Werten (pH 7-10) stattfinden (Kapitel 2.3; Lum *et al.*, 2013). Bei der Knoevenagel-Reaktion (**Abb. 35 D**) handelt es sich um eine Kondensationsreaktion zwischen Formylglycin und einem C-H-aciden Thiopyrazolon-Reagenz, gefolgt von einer intramolekularen Michael-Addition mit einer Thiolgruppe. Bei dieser sogenannten *trapped*-Knoevenagel-Ligation entsteht final eine kovalente Bindung zwischen Protein und Heterozyklus (Kudirka *et al.*, 2015). Alternativ kann bei der *tandem*-Knoevenagel-Ligation (**Abb. 35 E**) auch eine weitere Pyrazolon-Einheit in der nachfolgenden Michael-Addition eingesetzt werden (Kudirka *et al.*, 2016). Durch Knoevenagel-Reaktion und einer nachfolgenden Click-Reaktion an neu eingebrachten Azidgruppen, konnte bereits erfolgreich der DARPin 000 (CTPSR-His₆-tag) fluoreszenzmarkiert werden (Janson *et al.*, 2020). Das Einführen eines Azides, aufbauend auf der initialen Reaktion am Aldehyd (siehe Kapitel 2.3 und 2.6), ist eine gängige Technik um eine Click-Reaktion vom Typ Cu-katalysierte Zyklisierung oder SPAAC anschließen zu können (Kolb *et al.*, 2001; Agard *et al.*, 2004). Eine Verdoppelung der DAR wird dabei durch die *tandem*-Knoevenagel-Ligationstechnik ermöglicht (Janson *et al.*, 2020).

5.3.1 Konjugationschemie am Aldehyd oder Thiol

Selektive Proteinkonjugationen können in einer großen Bandbreite von proteinbiochemischen und biotechnologischen Fragestellungen Anwendung finden. Zum Beispiel werden präzise Markierungen mit Fluoreszenzfarbstoffen zur hochauflösenden Mikroskopie eingesetzt (Lotze *et al.*, 2018), Konjugationsreaktionen zur Synthese komplexer Biomoleküle, die sich nur schwer rekombinant isolieren lassen, verwendet (Zemella *et al.*, 2018) oder Protein-Protein- bzw. Protein-DNA-Interaktionen durch Photo-Crosslinker analysiert (Mayer und Lang, 2017). Auch das Formylglycin konnte bereits erfolgreich bei der Immobilisierung einer L-Aminosäureoxidase (Bloess *et al.*, 2019) oder dem Aufbau von Glykostrukturen eingesetzt werden (Smith *et al.*, 2014). Neben der Erzeugung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten wurden innerhalb des Projektes, dem die vorliegende Arbeit entspringt, Derivatisierungsreaktionen unter anderem auch zur Immobilisierung an Harzen oder zur Untersuchung der Konjugate und des FGE-

Konversions- bzw. Konjugationserfolges z.B. im Gel verwendet. Daher wurden nicht nur Reaktionen an Aldehyden sondern auch Experimente mit Cystein-Derivatisierungen durchgeführt. Aufgrund der Häufigkeit von Cysteinresten und der Wichtigkeit ihrer Beteiligung an Disulfiden für die Proteinestabilität ist eine ortsspezifische Konjugation allerdings mit größeren Schwierigkeiten verbunden. Dazu gehören eine selektive Reduktion und Oxidation und eine mögliche Beeinträchtigung der Proteinfaltung (Kapitel 2.3).

Die drei gängigen Konjugationsmethoden für Cysteine und Aldehyde, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit Anwendung fanden, sind im Folgenden aufgeführt. Wie in **Abb. 36** dargestellt, wird bei der Alkylierung von Cysteinen durch Maleimide ein Succinimid-Thioether als Produkt einer Michael-Addition gebildet (**Abb. 36**, links; Ravasco *et al.*, 2019). So kann ein Polyethylenglykol-tragendes Maleimid (Mal-PEG) zur Erhöhung des Molekulargewichtes konjugiert werden (**Abb. 37, 5**). Analog dazu kann auch Iodacetamid zur Alkylierung aller freien Cysteine eingesetzt werden, um den Redoxzustand eines Proteins zu fixieren. Bei der reduktiven Aminierung (**Abb. 36**, Mitte) wird das Formylglycin mit Aminen derivatisiert, indem die Aminogruppe die Carbonylgruppe des Aldehyds angreift und ein Imin als Zwischenstufe gebildet wird (Cho und Kang, 2005). Nach der Reduktion mittels Natriumcyanoborhydrid kann das Produktamin isoliert werden (Cho und Kang, 2005). Zur Aminierung wurden ein Amin-PEG (**Abb. 37, 6**) und ein Harz-gekoppeltes Hexylamin (**Abb. 37, 7**) verwendet.

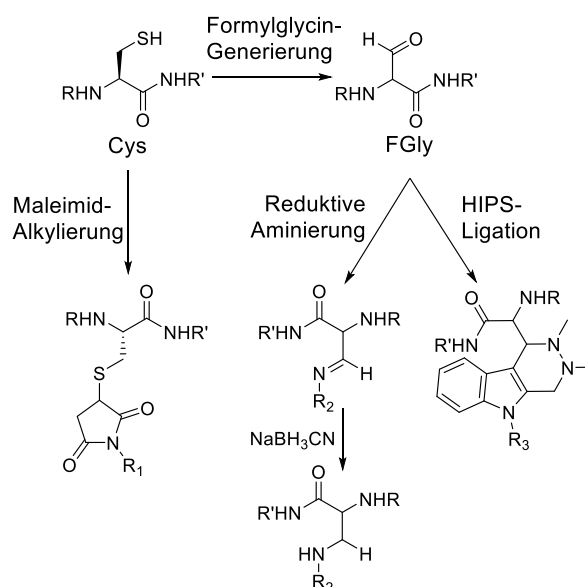


Abb. 36: Schema der Konjugationsmethoden von Cys- oder FGly-haltigen Proteinen. Die Thiole von Cysteinen können mittels Maleimiden alkyliert werden. Der Aldehyd des Formylglycins wird entweder durch reduktive Aminierung oder mittels HIPS-Ligation adressiert.

Ähnlich zur reduktiven Aminierung wird auch bei der HIPS-Ligation der Aldehyd durch die Reaktion mit Aminen zu einer Imin-Zwischenstufe funktionalisiert (Drake *et al.*, 2014). Allerdings wird durch eine intramolekulare Alkylierungsreaktion ein Heterozyklus gebildet. Da als Nukleo-

phil ein Alkylhydrazin verwendet wird, läuft die Reaktion, im Gegensatz zur zugrunde liegenden Pictet-Spengler-Ligation, bei milden pH-Bedingungen ab, was diese Methode besonders biokompatibel macht (Agarwal *et al.*, 2013; Pang *et al.*, 2016). Ebenfalls zur Kompatibilität mit Proteinen und anderen Biomolekülen trägt die Tatsache bei, dass die Reaktion in wässrigen Lösungen abläuft und auf die Anwesenheit organischer Lösemittel, hoher Temperaturen oder aggressiver Katalysatoren verzichtet werden kann, wenn auch die HIPS-Ligation einen hohen Ligandenüberschuss und relativ lange Inkubationszeiten benötigt (Janson *et al.*, 2020).

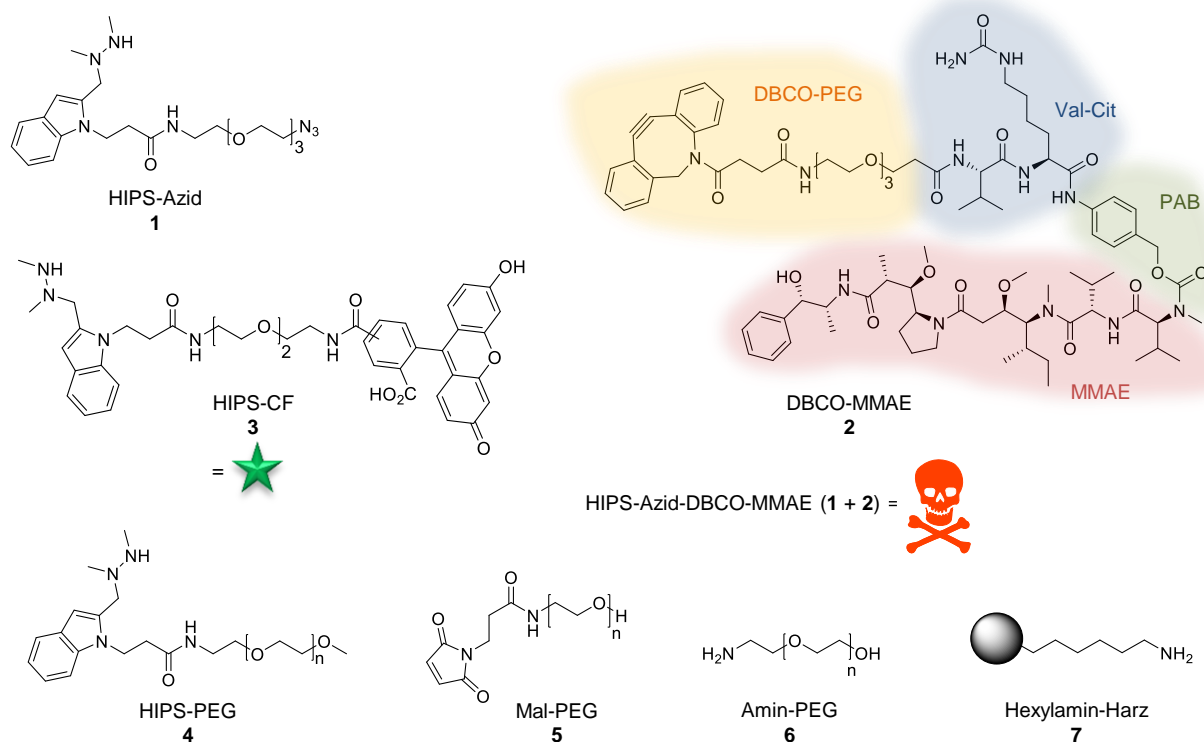


Abb. 37: Schema der zur Konjugation verwendeten Moleküle. Zur Bildung eines Antikörper-Wirkstoff-Konjugates wurde das HIPS-Azid (HIPS-PEG₃-Azid, **1**) gefolgt von einer SPAAC Click-Reaktion mit dem DBCO-MMAE (**2**) eingesetzt. Dies besteht aus dem Dibenzocyclooctin (DBCO), dem Valin-Citrullin-Linker (VC) mit der *para*-Aminobenzylgruppe (PAB) und dem Toxin Monomethylauristatin E (MMAE). Das über den Azid (**1**) an ein Protein gebundene **2** wird durch einen roten Totenkopf dargestellt. Zur HIPS-Ligation wurden darüber hinaus zudem ein HIPS-Glycin-PEG₂-Carboxyfluorescein (HIPS-CF, **3**) oder ein HIPS-Glycin-Polyethylenglykol (HIPS-PEG, **4**) verwendet. Mittels Maleimid-Polyethylenglykol (Mal-PEG, **5**) wurden Cysteine derivatisiert. In der reduktiven Aminierung von Aldehyden kamen Amin-PEG (**6**) und das Hexylamin-Harz (**7**) zum Einsatz.

Die durch Dr. Tobias Krüger entwickelten HIPS-Reagenzien **1**, **3** und **4** (**Abb. 37**) bestehen aus dem 1,2-Dimethylhydrazin-funktionalisiertem Indol, einem Glycin-PEG₃-Spacer und einer Azidgruppe (**1**), einem Carboxyfluoresceinmolekül (**3**) oder einem Polyethylenglycol (**4**) und wurden zu unterschiedlichen Zwecken eingesetzt (Krüger *et al.*, 2018, 2019). Durch die Derivatisierung mit HIPS-PEG (**4**) und HIPS-CF (**3**) konnten bei erfolgreicher Konversion und Konjugation während der Gelelektrophorese Bandenverschiebungen zu höheren Molekulargewichten beobachtet werden (nicht gezeigt). Zudem wurden CF-funktionalisierte Proteine durch in-Gel-Fluoreszenz und in *Live Cell* Fluoreszenz-Anwendungen detektiert (siehe Kapitel 5.3.3).

Bei der finalen Konjugationsstrategie zur Generierung einfach und zweifach beladener Antikörper- oder DARPin-Wirkstoff-Konjugate sollte zunächst durch **1** der Aldehyd mit einem Azid funktionalisiert werden, welches anschließend für die Reaktion mit einem gespannten Cyclooctin zur Verfügung steht. Die Kupfer-freie SPAAC Click-Reaktion (Agard *et al.*, 2004; Ozer und Chilkoti, 2017) wurde mit einem DBCO-Konstrukt des Toxins Monomethylauristatin E (MMAE) durchgeführt. Dieses kommerziell erhältliche DBCO-MMAE-Reagenz **2** besteht neben dem Toxin und der Dibenzocyclooctin-Einheit aus einem dreifachen Polyethylenglykol-*Spacer* (PEG₃) und dem spaltbaren Linker aus Valin, Citrullin und *para*-Aminobenzyl (VC-PAB). Zur Freisetzung des Toxins erkennen und spalten lysosomale Hydrolasen das Dipeptidmotiv proteolytisch (Dubowchik und Firestone, 1998). Zudem bietet dieser Linker den Vorteil, dass die Reversibilität der Reaktion unterdrückt wird. Dieser Linkertyp wird *self-immolative linker* genannt, da auf die enzymatische Proteolyse der Peptidbindung eine Abspaltung des PABs folgt (Zhang *et al.*, 2018; Costoplus *et al.*, 2019). Der duale, stufenweise Konjugationsmechanismus wurde durch Dr. Tobias Krüger etabliert und Proteinebene angewandt (Krüger, 2019).

5.3.2 Analyse der *single-chain*-Konstrukte und -Konjugate

Die Generierung eines Antikörper-Wirkstoff-Konjugats aus dem *single-chain* Antikörper scFv425-Fc und dem Toxin MMAE diente der Veranschaulichung der neuen Proteinkonjugation mit zwei aeroben, unterschiedlich spezifischen FGEs. Dazu wird zuerst die selektivere Konversion durch hFGE durchgeführt, das Konjugat erstellt und anschließend daran eine zweite Konjugation mittels MtFGE vorgenommen (max. DAR= 2 pro Fracht). In einem weiteren, verkürzten Ansatz kann eine direkte Mehrfachkonjugation mit nur einem Konversionsschritt durch das weniger selektive Enzym MtFGE durchgeführt werden (max. DAR= 4). Es sollte eine proteinbiochemische Analyse der Proteine während der Konjugationsreaktionen und der Nachweis der biologischen Funktionalität der Konjugate selbst erfolgen.

Im ersten Schritt wurde dazu das CTPSR-Motiv durch hFGE in einem DTT-haltigen Bicinpuffer bei pH 9 für ca. 2 h bei 37 °C umgesetzt und das FGE mittels Protein A-Aufreinigung aus der Reaktionslösung entfernt. Dies ist an den Banden des Sc2 zwischen 75 und 50 kDa und des hFGEs bei ca. 37 kDa (L1 und L2) in der **Abb. 38 A** zu sehen. Der pH-Wert des Eluats wurde mit Tris-Puffer auf pH 6,0-6,5 eingestellt und die HIPS-Konjugation mit 10 Äquivalenten HIPS-Azid (**1**) über Nacht bei 22 °C durchgeführt. Unkonjugiertes HIPS-Reagenz wurde mittels Protein A-Reinigung abgetrennt (**A**, L3). Für das Sc2-Azid konnte noch keine Verschiebung im Gel detektiert werden, da es sich hierbei um einen Größenunterschied von nur ca. 0,43 kDa handelt. Mit 1,1 Äquivalenten DBCO-MMAE (**2**) wurde anschließend die Click-Reaktion bei 22 °C für

2 h durchgeführt. In der dazugehörigen Probe im reduzierenden Coomassie-Gel (**Abb. 38 A**, L5) sind zwei Banden zu sehen, die leicht höher liegen, als die Bande des unbehandelten Sc2 (**A**, L4). Die Reaktionslösung wurde mittels hydrophober Interaktionschromatographie analysiert. In **Abb. 38 D** ist das entsprechende HIC-Chromatogramm (Sc2-1x) vergleichend zum unkonjugierten Sc2-Edukt dargestellt. Die Pfeile markieren die mittels 280 nm gemessenen UV-Signale der Konjugate, welche durch einen linearen Gradienten von Elutionspuffer mit 20% Isopropanol eluiert wurden. Der Hauptpeak bei ca. 30 mL Laufvolumen entspricht einem Anteil an Elutionspuffer B von ca. 45-50% (11,25-12,50% 2-Propanol). Die vereinten Elutionsfraktionen dieses Signals und des Konjugats bei ca. 70-75% B (aufkonzentriert via *SpeedVac*; 17,50-18,75% 2-Propanol) wurden in L6 und L7 zur Gelelektrophorese aufgetragen (**Abb. 38 A**). Die Hauptfraktion stellt unkonjugierten Antikörper dar, wohingegen die Doppelbanden in L7 aus Sc2 und Sc2-MMAE zu bestehen scheinen, da die Trennung zwischen Edukt und Produkt durch die HIC nicht vollständig gewährleistet werden konnte. Entsprechende Experimente mit dem DARPin 004 als dual getaggttes Modellprotein *in vitro* sind in dem bislang unveröffentlichten Manuskript zu finden (Boschanski *et al.*).

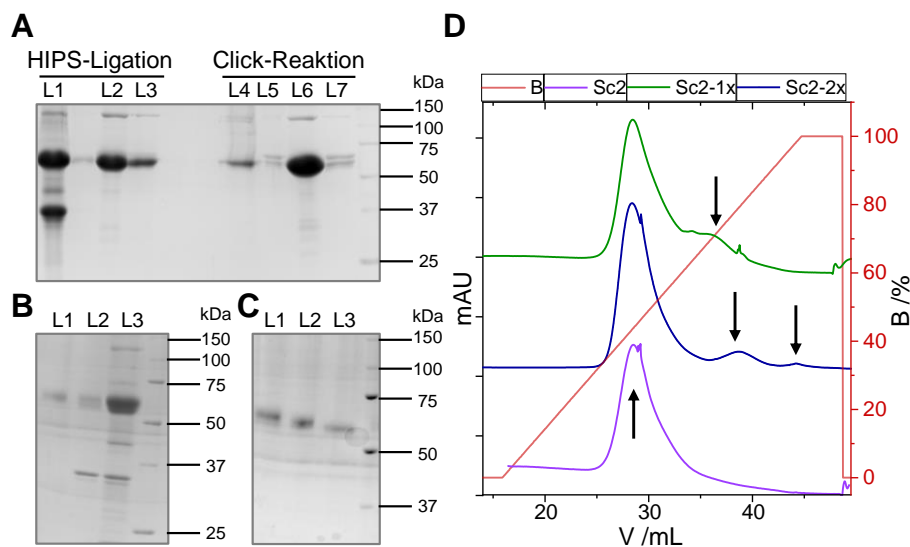


Abb. 38: Einfach- und Zweifachkonjugation des Sc2. **A)** Reduzierendes Coomassie-Gel (12,5%) der Sc2-Umsetzung mit hFGE (L1), der Rückgewinnung durch Protein A (L2), der Rückgewinnung des Sc2-Azids nach HIPS-Ligation (L3), des Sc2-Ausgangskonstruktes (L4), des Sc2-MMAEs nach der Click-Reaktion (L5) und die Proben der Sc2-1x-HIC aus D) mit L6: Eluat von 40-45% B und L7: aufkonzentriertes Eluat von 70-75% B. **B)** Reduzierendes Coomassie-Gel (12,5%) der vereinten HIC-Elutionen von Sc2-MMAE (L1), deren Umsetzung mit MtFGE + CuSO₄ (L2) und der Konversion des initialen Sc2 mit MtFGE + CuSO₄ (L3). **C)** Reduzierendes Coomassie (10%) der Sc2-2x-HIC-Proben aus D) mit L1: aufkonzentriertes Eluat von ca. 90-95% B, L2: aufkonzentriertes Eluat bei 70-75% B und L3: 1:20-Verdünnung des Eluats bei 40-45% B. **D)** Überlagerung von HIC-Elutionschromatogrammen des doppelt getaggtten scFv425-Fcs (Sc2), des Sc2-MMAE-Einfachkonjugates (Sc2-1x) aus A) und des Sc2-Doppelkonjugates (Sc2-2x) aus B).

Um aus einem Einfachkonjugat Sc2-MMAE (**Abb. 39 A**) einen dualen ADC zu erhalten, wurde eine weitere Umsetzung mit MtFGE in Anwesenheit von Kupfer durchgeführt, wodurch das

CTAGR-Motiv zu (FGly)TAGR konvertiert wurde. Die entsprechende, analytische Gelelektrophorese ist in **Abb. 38 B** zu sehen. Dieses Vorgehen zeigt anschaulich wofür eine Enzymvariante mit geringer Substratspezifität angewendet werden kann. Die hohe Selektivität im ersten Schritt ermöglicht eine orthogonale Biokonversion. Um die Verluste zu minimieren und die Reinigung der Zwischenschritte zu erleichtern, wurden die *single-chain* Konstrukte an Protein A-Sepharosekügelchen gebunden und mittels *spin*-Säulen umgepuffert. Sie wurden erneut durch eine HIPS-Ligation Azid-funktionalisiert, durch Click-Reaktion mit MMAE versehen und anschließend eluiert (Sc2-2xMMAE; **Abb. 39 B**). Parallel dazu wurde der Sc2-Antikörper direkt mit MtFGE und Kupfer doppelt konvertiert. Durch die gesteigerte Aktivität des Kofaktor-beladenen Holoenzym entstehen zwei Aldehyde pro scFv425-Fc-Kette. Durch die Konjugation mit einem Toxin kann in einem dimeren ADC insgesamt eine bis zu vierfache Beladung erzeugt werden (2x MMAE pro Monomer). Eine kleine Fraktion erneut mit MtFGE-umgesetztem MMAE-Antikörper wurde zusätzlich mittels HIPS-CF fluoreszenzmarkiert (Sc2-MMAE-CF; **Abb. 39 C**).

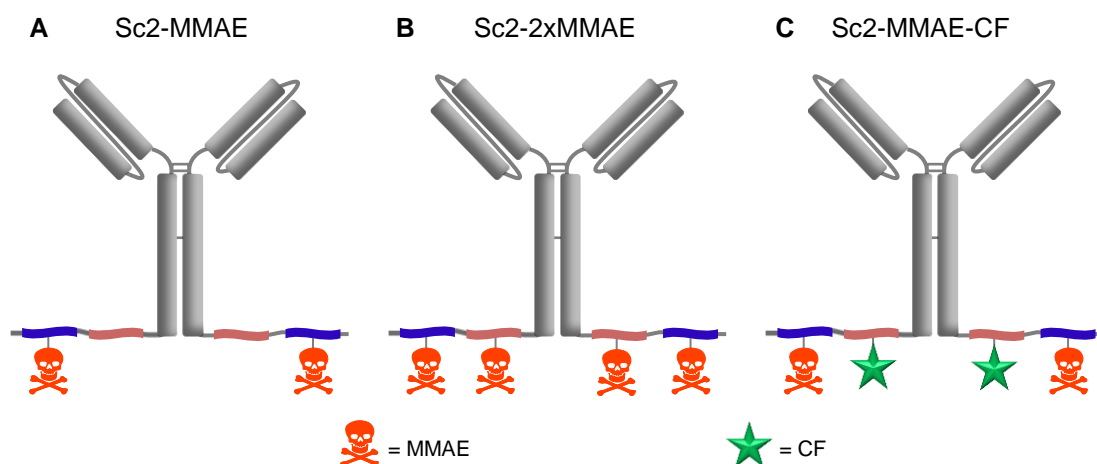


Abb. 39: Schema der scFv425-Fc-Konjugate. **A)** Sc2-MMAE wird durch die Konversion mit hFGE und die Konjugation von HIPS-Azid und DBCO-MMAE am (FGly)TPSR-Motiv (blau) des Sc2s gewonnen. **B)** Durch die Konversion des CTAGR-Motivs (rot) des Sc2-MMAE mit MtFGE (rekonstituiert oder +CuSO₄) und Konjugation analog zu A) wird Sc2-2xMMAE erstellt. Alternativ kann Sc2 auch direkt durch MtFGE (rekonstituiert oder +CuSO₄) umgesetzt und mit HIPS-Azid und DBCO-MMAE beladen werden. **C)** Eine Konversion des Sc2-MMAEs aus A) mit MtFGE (rekonstituiert oder +CuSO₄) und eine Ligation mit HIPS-CF resultiert in Sc2-MMAE-CF.

Das Chromatogramm des putativen Sc2-2xMMAE ist ebenfalls in **Abb. 38 D** zu sehen (Sc2-2x). Es konnten zwei weitere Signale neben dem des unkonjugierten Sc2 detektiert werden. Die aufkonzentrierten Elutionsfraktionen des Bereichs 70-75% Elutionspuffer B und ca. 90-95% B (22,50-23,75% 2-Propanol) wurden ebenfalls per SDS-PAGE analysiert (**Abb. 38 C**). In diesem 10%igen Coomassie-Gel ist in L3 eine 1:20-Verdünnung des Hauptpeaks aufgetragen worden. Das Protein mit einem Molekulargewicht von knapp über 50 kDa kann dem Sc2 zugeordnet werden. In L2 befindet sich das Einfachkonjugat (Probe 70-75% B) und in L1 das Doppelkonju-

gat (Probe 90-95% B). Auch wenn die Konjugationseffizienz sehr gering und die Trennung der Konjugate mittels HIC noch nicht zufriedenstellend verlaufen ist, konnten Einfach- und Doppelkonjugate des *single-chain* Antikörpers mit einem Toxin erzeugt werden. Bei beiden ADCs wurde jeweils eine Erhöhung des Molekulargewichts durch eine leichte Bandenverschiebung und eine retardierte Elution in der hydrophoben Interaktionschromatographie detektiert. Eine massenspektrometrische Analyse dieser Konjugate konnte aufgrund Zeitmangels und geringer Ausbeuten nicht vollzogen werden. Auf dieselbe Weise hergestellte Konjugate von Dr. Tobias Krüger wurden per ESI-MS mit Hilfe von Dr. Benjamin Müller, Biofidus AG vermessen und sind zur Veranschaulichung im Kapitel 8.1, **Abb. 48** sowie im unveröffentlichten Manuskript dargestellt (Boschanski *et al.*). Analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise wurden Sc2-MMAE-CF Konjugate erstellt, indem zuerst MMAE mittels hFGE und anschließend durch MtFGE und HIPS-CF an den Sc2 gekoppelt wurde. Die durch eine HIC aufgereinigten, fluoreszenzmarkierten Doppelkonjugate wurden vollständig zum *life cell imaging* eingesetzt (Kapitel 5.3.3).

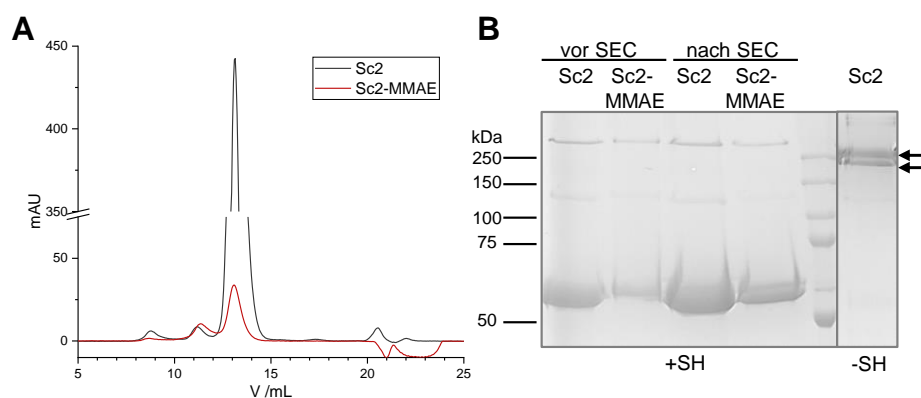


Abb. 40: Dimerisierung der *single-chain* Antikörper und ihrer Konjugate. **A)** Chromatogramm einer nativen Größenausschlusschromatographie (Superdex 200 *Increase* 10/300 GL) in Phosphatpuffer pH 7,5 bei einem Fluss von 0,3 mL/min, detektiert mit einer Absorption bei 280 nm. Analysiert wurde das mit PNGase F deglykosylierte Sc2-Protein (500 µg) und das Sc2-MMAE-Einfachkonjugat (ca. 50 µg). Letzteres durchlief die standardmäßige Konjugation durch Umsetzung mit hFGE, die HIPS-Ligation und SPAAC Click-Reaktion mit den dazugehörigen Reinigungsschritten. Durch einen Standardlauf mit Dextranblau, Ferritin, BSA, Ovalbumin, Cytochrom c und Aprotinin wurden Molekulargewichte der nativen Proteine ermittelt. Diese lagen für das Absorptionsmaximum des Sc2 (13,15 mL Elutionsvolumen) bei 111,35 kDa und für das Signal des Sc2-MMAEs (13,08 mL Elutionsvolumen) bei 115,13 kDa. **B)** +SH= reduzierende SDS-PAGE (10%, Coomassie) der Proben aus A), jeweils vor und nach der Chromatographie. -SH= nicht-reduzierende SDS-PAGE des Sc2-Konstruktes.

Das scFv425-Fc-Konstrukt wird während der Konversion durch FGE mit 2,5-5 mM DTT behandelt. Dies geschieht zum einen, weil FGE für seine *in vitro*-Katalyse ein Reduktionsäquivalent benötigt und zum anderen um die Zugänglichkeit der Cysteine des Aldehyd-tags als freie Thiole zu gewährleisten. Als Reduktionsäquivalente, zumindest für das humane FGE *in vitro*, können auch TCEP (Tris-2-carboxyethylphosphin), β -Mercaptoethanol oder GSH eingesetzt werden, wobei die beiden Letzteren zwar mildere, aber auch nicht-zyklisierende Reagenzien darstellen. Nicht-zyklisierende Reduktionsmittel binden nur eine Thiolgruppe, was zum Teil eine Freiset-

zung des reduzierten Substrates unterdrückt (Holder *et al.*, 2015). Bindungen zwischen dem Substratcystein und dem Reduktionsmittel können in zyklischen Reduktionsmitteln wie DTT leichter durch *disulfide shuffling* mit der zweiten Thiolgruppe aufgehoben werden. Dieser Effekt wird bei basischen pH-Werten beschleunigt (Holder *et al.*, 2015).

Da der Antikörper aus einem über Disulfide verbrückten Dimer besteht, dessen monomere Untereinheiten zusätzlich strukturelle, intramolekulare Disulfide aufweisen, führt eine Reduktion des Sc2 zur Monomerisierung ($M_w=55,46$ kDa), was ebenfalls in der reduzierenden Gelelektrophorese bei über 50 kDa zu detektieren ist (**Abb. 40 B**; Vgl. Kapitel 5.1.3, **Abb. 19 D** und **E**). Über Antikörper der Immunglobulinklasse IgG1 ist bekannt, dass die intramolekularen Disulfidbrückenbindungen sehr stabil sind und sogar einer Behandlung von bis zu 100 molaren Äquivalenten des Reduktionsmittels DTT standhalten. Intermolekulare Disulfide hingegen werden mit DTT-Konzentrationen bis zu 5 mM reduziert (Willner *et al.*, 1993; Abdollahpour-Alitappeh *et al.*, 2017). Viele Konjugationsstrategien basieren sogar auf der Umsetzung freier Cysteine, welche durch die systematische Reduktion von Antikörpern zugänglich gemacht werden (Sun *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2017). So wird in der THIOMAB-Strategie TCEP oder DTT zur Reduktion aller lösemittlexponierter Disulfidbindungen eingesetzt. Anschließend werden die nativen intermolekularen S-S-Brücken durch das milde Oxidationsmittel DHAA (Dehydroascorbinsäure) reoxidiert und die übrigen Cysteine mittels Maleimid-abhängiger Konjugationsreaktionen ligiert (Dickgiesser *et al.*, 2019; Adhikari *et al.*, 2020). Somit kann die ansonsten ortsunspezifische Reaktion zwischen Thiolen und Maleimiden zu einem gewissen Maß dirigiert werden. Infolgedessen wird ein biologisch funktioneller ADC erhalten.

Im Gegensatz dazu ist sowohl die Konversion durch FGE an den Erkennungssequenzen ortsspezifisch als auch die Chemie am einzigartigen Aminosäurerest Formylglycin sehr selektiv. Es bestünde auch für den scFv425-Fc die Möglichkeit eine Reoxidation gezielt durch DHAA-Behandlung herbeizuführen. Allerdings durchläuft der *single-chain* AK anschließend an die enzymatische Umsetzung direkt mehrere Umpufferungs- und Inkubationsschritte. Unter anderem werden die Proteine mittels Protein A-Material und HIC-Verfahren gereinigt. Dass dies bereits zuverlässig zu einer Redimerisierung des finalen Produktes führt, wurde mit einer nativen Größenausschlusschromatographie (SEC) gezeigt, welche in **Abb. 40 A** zu sehen ist. Das dualgetaggte Sc2 ist durch PNGase F-Behandlung deglykosyliert worden, um ein präziseres SEC-Signal zu produzieren. Wie ESI-MS-Messungen des Sc2 zeigen, trägt das Sc2 ein N-Glykan vom Typ G0F (Kapitel 8.1, **Abb. 48**), was in einem Massenunterschied von ca. 1044 Da resultiert. Die G0F-Glykosylierung ist eines der am häufigsten gefundenen N-Glykane an IgG1-Molekülen, welche in CHO-Säugerzelllinien produziert wurden und besteht aus einem Kern aus zwei N-Acetylglucosaminen (GlcNAc), drei Mannosen (Man) und zwei weiteren GlcNAcs, die zwei

Arme formen, die entweder in keiner weiteren (G0), einer (G1) oder zwei Galactosen (G2) enden können (Wuhrer *et al.*, 2007). Bei G0F besitzt das erste Saccharid des Kerngerüsts eine weitere Fucose (Fuc).

Das Maximum des Sc2-Absorptionssignals der SEC aus **Abb. 40 A** ist bei 13,15 mL Elutionsvolumen detektiert worden, wohingegen das Elutionsvolumen des Sc2-MMAEs 13,08 mL betrug. Durch den Vergleich mit einem Gemisch aus Standardproteinen konnten die molekularen Massen der Proteine berechnet werden. Hierbei handelt es sich um eine native Analysemethode, d.h. die detektierten Laufverhalten sind abhängig vom hydrodynamischen Radius und von der dreidimensionalen Struktur. Für die Sc2-Probe wurde eine Größe von 111,35 kDa errechnet. Der Wert des Sc2-MMAEs betrug 115,13 kDa. Durch die Konjugation des HIPS-Azids (**1**) und des DBCO-MMAEs (**2**) wird ein Massenunterschied von ca. 2470 Da pro Monomer erwartet. Die Dimere des Sc2s und des Sc2-Einfachkonjugates sollten dementsprechend eine rechnerische Masse von 110,92 kDa bzw. 115,85 kDa aufweisen, was einer Abweichung zu den SEC-Daten von lediglich 0,4 bzw. 0,6% entspricht. Eine durch Kupfer hervorgerufene Fragmentierung der *hinge*-Region, wie sie bereits in Kapitel 5.1.3 angesprochen wurde, konnte anhand der SEC-Daten nicht bestätigt werden. Dementsprechend sind sowohl das Sc2 vor als auch das Sc2-MMAE nach der Konjugation eindeutig Dimere.

Das SEC-Startmaterial und die Eluate wurden auch per SDS-PAGE analysiert (**Abb. 40 B**). Die Reduktion und Denaturierung durch 5% β -ME bei 95 °C für 5 min (+SH) erzeugt wiederum Banden zwischen 50 und 75 kDa, die den Monomeren entsprechen. Ohne vorherige Behandlung sollte die Dimerbande bei knapp über 100 kDa liegen. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen (-SH) konnten auf dieser Höhe Doppelbanden detektiert werden. Da es sich beim Sc2 um bereits gelagertes Protein handelte, konnten auch hier neben den bereits erwähnten Signalen im reduzierenden Coomassie-Gel zusätzliche Signale bei über 250 kDa beobachtet werden. Diese treten äquivalent zur Präzipitation nach Einfrier-Auftauzyklen auf und stellen wahrscheinlich höhere Aggregate dar, welche sich nicht vollständig denaturieren lassen (Vgl. Kapitel 5.1.3, **Abb. 19 D** und **E**). Entsprechende Signale sind auch in den SEC-Läufen des Sc2s und Sc2-MMAEs bei ca. 8,8 und 11,2 mL detektiert worden, jedoch im Vergleich zum Sc2-Dimersignal in viel geringerem Maße (ca. 2%). Die errechneten Molekulargewichte liegen bei 283-265 kDa und bei über 900 kDa. Dies unterstützt die Theorie, dass es sich hierbei um Oligomere aus vier oder mehr Untereinheiten handelt. In einer Studie der Firma BioPharm wurde die Tendenz von Antikörpern hochmolekulare Substanzen zu bilden untersucht. Es wurde ein Zusammenhang zwischen Oligomerisierung und Lagerungszeiten ermittelt (Sadineni *et al.*, 2014). Hierbei konnte eine Beschleunigung dieses Aggregationsverhaltens durch die Anwesenheit redoxaktiver Metalle ver-

zeichnet werden. Protektive Effekte wurden durch Lagerungszusätze wie EDTA erhalten (Sadineni *et al.*, 2014).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch den konsekutiven Einsatz der aeroben FGEs eine alternative Route zur dualen Proteinkonjugation etabliert wurde. Das Proteinkonjugat verhielt sich in gelelektrophoretischen Untersuchungen analog zum reinen Protein. Die Herstellung eines ADCs mit dem Toxin MMAE und die Analytik der Konjugate bestätigte die Reoxidation zu intakten AK-Dimeren. Die Tatsache, dass der *single-chain* Antikörper keine Redimerisierung zwischen leichter und schwerer Kette benötigt, wie es bei den klassischen, monoklonalen Antikörpern der Fall wäre, begünstigt den Erhalt eines Proteins mit nativer Dimerisierung und macht diese Methode der ADC-Herstellung für die pharmazeutische Anwendung besonders interessant.

5.3.3 Biologische Aktivität des ADCs

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit war neben der *in vivo*-Analyse des humanen FGEs samt Kupfer und die Erstellung einer Modellprotein-Bibliothek zur Identifikation geeigneter Aldehyd-*tags* bzw. orthogonaler Strategien, auch die Untersuchung fertiger Antikörper-Wirkstoff-Konjugate *in vivo*. Ein ADC muss nicht nur möglichst selektiv konjugiert werden, um ein homogenes Produkt zu liefern, sondern er muss auch eine hohe biologische Aktivität aufweisen. Das heißt im Falle der Trägermoleküle scFv425-Fc und DARPin E01, dass sie das Zielkonstrukt auf der Zelloberfläche binden und eine Internalisierung des EGFR-Komplexes auslösen müssen. Auf diesen Weg werden die Wirkstoff-Konjugate vorwiegend ins Lysosomen EGFR-überexprimierender Zellen transportiert. Das Sc2-MMAE-Konjugat ist ein *Prodrug*. Erst durch die hydrolytische Val-Cit-Spaltung im Lysosomen geschieht die Umwandlung zum aktiven Therapeutikum (Zhang *et al.*, 2018; Costoplus *et al.*, 2019). Die biologische Aktivität, zusammengesetzt aus erfolgreicher Antigenbindung und das Auslösen des Zelltods nach Freisetzung des Toxins, wurde durch einen Zellviabilitätsassay und durch *life cell imaging* (LCI) ermittelt.

Life Cell Imaging

Zur Untersuchung, ob der duale Aldehyd-*tag* am scFv425-Fc-Fusionsprotein samt FGE-abhängiger Konjugation einen Einfluss auf die Bindung zum EGFR hat, wurden Carboxyfluorescein-markierte Konstrukte mit Hilfe von Lennard Karsten in LCI-Experimenten eingesetzt. Verwendet wurde das mehrstufig mittels hFGE und MtFGE erzeugte Sc2-MMAE-CF (Kapitel 5.3.2). Allerdings lagen von dieser Spezies nur geringe Mengen vor, weshalb bis zu diesem Zeitpunkt keine weitere Analytik für ESI-MS oder Zytotoxizität durchgeführt werden konnte. Die

Brustkrebs-Zelllinie A431 mit einer hohen EGFR-Präsentation auf der Zelloberfläche, wurde als Positivkontrolle und die MCF7-Zelllinie mit sehr geringer EGFR-Expressionsrate als Negativkontrolle verwendet. In A431-Zellen konnte die Bindung des Zielproteins zunächst durch Sc2-MMAE-CF-Signale an der Plasmamembran (**Abb. 41**, 18 min) und anschließend ein Granula-ähnliches Signal im Zellinneren detektiert werden (97 min). In der Vergrößerung können durch die Überlagerung der CF-Signale und der des Lysosomenmarkers *LysoTracker Blue* DND-22 Hinweise auf eine Kolokalisation mit diesen Organellen detektiert werden. Im Vergleich dazu ließ sich in MCF7-Zellen keine CF-Färbung beobachten (**Abb. 41**, unten). Dies spricht für eine selektive Bindung des EGF-Rezeptors auf der Zelloberfläche von A431-Zellen und deutet zudem auf die erfolgreiche Internalisierung des EGFR-gebundenen Sc2-Doppelkonjugates hin.

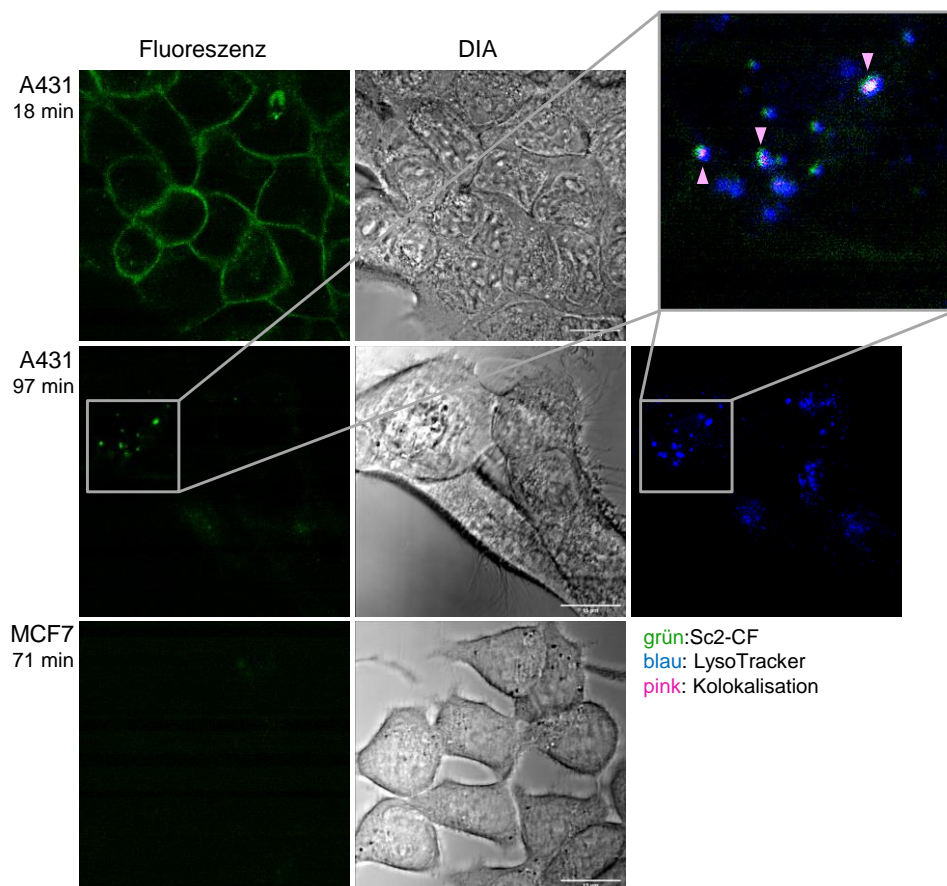


Abb. 41: Live Cell Imaging des Sc2-MMAE-CFs. Die A431- und MCF7-Zellen wurden bei 37 °C in *chamber slides* kultiviert. Das sowohl mit MMAE als auch Carboxyfluorescein gekoppelte Sc2 wurde für 10 min auf die Zellen gegeben und anschließend der ungebundene Antikörper durch PBS gewaschen. Die Lysosomen wurden durch *LysoTracker Blue* DND-22 (150 nM, 15 min) angefärbt. Nach dem Waschen wurden die Zellen im Durchlichtmodus (DIA) und die Fluoreszenzen des Sc2-MMAE-CFs (grün) und des *LysoTrackers* (blau) für bis zu 97 min detektiert. Überlagerungen der beiden Fluoreszenzkanäle wurden in rosa dargestellt. Die Maßstabsleiste entspricht 15 µm.

Sc2-MMAE-CF zeigte in LCI-Untersuchungen ein analoges Verhalten zum Einfachkonjugat Sc2-CF (Vgl. Kapitel 8.1, **Abb. 49**). Analoge Ergebnisse konnten ebenfalls mit dem DAR-Pin004-CF detektiert werden (Krüger *et al.*, 2018, SI). Zur Bestätigung der erfolgreichen Anti-

genbindung wurden durch Georg Falck und Lennard Karsten zusätzlich *Flow cytometry* (FC)-Analysen getätigt. Im Vergleich zu den MCF7-Zellen konnte auch hier ein klarer Zusammenhang zwischen Erhöhung der CF-Fluoreszenzintensität in A431-Zellen und steigender Sc2-CF-Konzentration detektiert werden, was die selektive Bindung des Konjugats an den Zielrezeptor unterstreicht (Kapitel 8.1, **Abb. 49**). Insgesamt kann demnach sowohl durch die einfache als auch durch die duale Konjugation des scFv425-Fcs ein funktioneller Antikörper erhalten werden, der eine Diskriminierung von EGFR-positiven gegenüber EGFR-negativen Zellen anhand der affinen Bindung zum Zielprotein auf Zelloberflächen ermöglicht. Durch die Verwendung der HIPS-Chemie kann am Aldehyd-*tag* eine einfache Beladung mit einem Fluoreszenzmolekül und somit einer Detektion im Säugerzellsystem durchgeführt werden.

Zytotoxizität

Neben der Oberflächenbindung und Internalisierung muss das *Prodrug*-Konstrukt aus Antikörper und Toxin auch intrazellulär gespalten werden. Dabei spielt die Funktionalität und die Zugänglichkeit des Linkers für die lysosomale Hydrolyse eine entscheidende Rolle. Im Allgemeinen wird bei ADC-Linkern zwischen spaltbar und nicht-spaltbar unterschieden (Zhao *et al.*, 2020) und unter den spaltbaren Linkern gibt es die Unterteilung in chemisch spaltbar und enzymatisch spaltbar. Zu chemischen Spaltungen gehören pH-Werterniedrigung oder Reduktion (Jiang *et al.*, 2015). Peptidlinker wie Val-Cit oder Phe-Lys (Dubowchik *et al.*, 2002) oder β -Glucuronidlinker, ein Kohlenhydratderivat, das durch die β -Glucuronidase attackiert wird und das Toxin durch eine darauffolgende Eliminierungsreaktion freisetzt (Jeffrey *et al.*, 2006), zählen zu den enzymatischen Konjugationslinkern. Die Nutzung eines nicht-spaltbaren Linkers ermöglicht zwar stabilere Konjugate und demnach einen geringeren *off-target*-Effekt, schränkt allerdings auch die Wahl an möglichen Toxinen, die selbst in derivatisierter und gebundener Form aktiv sind, ein. Chemisch spaltbare Linker setzen ihre Fracht im endosomal-lysosomalen System oder bei hoher zytosolischer Glutathion-konzentration frei. Nachteil bei einer Verlinkung, die im Sauren instabil oder reduktionsanfällig ist, ist eine hohe Rate an unkontrolliert freigesetztem Toxin, das im Blutkreislauf einen ungerichteten, systemischen Schaden hervorruft (Wu und Senter, 2005). Das Risiko einer solchen verfrühten Freisetzung ist bei Peptidlinkern aufgrund der Protease-Inhibitoren und des inhibierenden pH-Wertes des Bluts vergleichbar gering (Dubowchik *et al.*, 2002).

Aufschluss über die Freisetzung des Toxins gibt die Wirksamkeit der *drug*, die *in vitro* durch einen Zell-basierten Assay anhand der Reduktion der Proliferation bzw. dem Auslösen der Apoptose bestimmt wird. Der hier gewählte Wirkstoff Monomethylauristatin E gehört zur Klasse der Mikrotubuli-bindenden Zytostatika (Yaghoubi *et al.*, 2020). Mikrotubuli-binder werden häufig zur Herstellung von Antitumormitteln genutzt. Sie umfassen hauptsächlich die Klasse der

Maytansine und Auristatine (Yaghoubi *et al.*, 2020). Maytansine wurden erstmals vom äthiopischen Strauch (*Maytenus serrata*) isoliert (Kupchan *et al.*, 1972), kommen aber auch in einigen Bakterien, Moosen und anderen höheren Pflanzen vor (Anderl *et al.*, 2013). Sie inhibieren die Tubulinpolymerisation, indem sie die Ausbildung der dimeren Untereinheiten unterdrücken. Dieser Mechanismus löst einen mitotischen Stillstand aus und unterdrückt die Zellteilung (Oroudjev *et al.*, 2010). Auristatine sind synthetische Dolastatine, welche zuerst in Seepferdchen (*Dolabella auricularia*) entdeckt wurden (Pettit *et al.*, 1981). Sie wurden mit einer leicht abgeschwächten Hydrophobizität entwickelt, damit sie sich besser als pharmakologische Substanzen eignen (Anderl *et al.*, 2013). Auristatine binden die β -Untereinheit von Tubulin-Dimeren, wodurch eine unkontrollierte, kontinuierliche Polymerisation und Inhibierung der Tubulinverkürzung ausgelöst wird, was zu einem Arrestieren des Zellzyklus und zur Apoptose führt (Sapra und Shor, 2013).

Das synthetische, Peptid-ähnliche MMAE ist trotz seines hydrophoben Charakters relativ wasserlöslich und weist einige Vorteile für die Verwendung in eine ADC auf. So zeigt MMAE eine hohe Plasmastabilität, Stabilität im Lysosom und Proteasen gegenüber (Senter und Sievers, 2012; Chen *et al.*, 2017). Einige gegen den EGFR-gerichtete ADCs mit dem verwandten Wirkstoff MMAF zeigten in klinischen Studien zum Teil große Nebenwirkungen in Bezug auf die okulare Toxizität (Cleary *et al.*, 2020). Ein Beispiel dafür ist das Konstrukt Depatux-m (ABT-414; Parrozzani *et al.*, 2020). Die Verlinkung eines spaltbaren MMAEs in der Weiterentwicklung Losatuxizumab Vedotin wurde kürzlich in klinischen Studien eingesetzt, wo deutlich weniger bis keine okularen Nebenwirkungen verzeichnet werden konnten (Cleary *et al.*, 2020).

Zur Detektion der erfolgreichen Toxin-Freisetzung wurde die Zytotoxizität des Sc2-MMAE-ADCs durch einen Viabilitätsassay in Säugerzellen ermittelt. Beim alamarBlue[®]-Assay wird ein Resazurin-Farbstoff durch den Metabolismus viabler Zellen reduziert, wodurch eine Zunahme der Fluoreszenz des Reduktionsproduktes Resofurin und ein Farbumschlag detektiert werden können. Werden die Zellen mit einem Zytostatikum behandelt, sinkt die Zellviabilität und damit auch die metabolische Umsetzung des Reporters. Durch die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀-Wert), die Substanzkonzentration bei der eine 50%ige Reduktion der Viabilität der Testzelllinie vorliegt, kann die Toxizität von Substanzen miteinander verglichen werden.

Zunächst wurde dazu der Viabilitätsassay an den oben genannten Zellsystemen A431 (starke EGFR-Überexpression) und MCF7 (geringe EGFR-Expression) angepasst und etwaige Hintergrundeffekte durch Pufferbedingungen, wie die Anwesenheit geringer Mengen DMSO (Lösungsmittel des MMAE-Konstruktes) und des unkonjugierten Sc2s bzw. DARPin 004 ermittelt. Auch ohne eine Toxinbeladung können gegen den EGFR-gerichtete Proteine einen inhibitorischen Effekt auf die Zellviabilität haben, da eine Blockierung und Internalisierung des EGFRs eine

Wachstumsverringern auslösen kann (siehe Kapitel 2.2). Der Toxin-unabhängige Effekt des DARPin E01 als Bindeprotein des EGF-Rezeptors selbst liegt in einer millimolaren Größenordnung (Boersma *et al.*, 2011). Der IC_{50} -Wert des spezifischen EGFR-Antikörpers Cetuximab liegt z.B. bei ca. 6 μM (Bull Phelps *et al.*, 2008). Aus diesem Grund wurden die Zellen für 72 h mit steigenden Konzentrationen (0,01 nM - 2,5 μM) an Testsubstanz inkubiert, als Dreifachbestimmungen in 96-well-Platten bei 37 °C kultiviert und nach 2 und 3 h gegen unbehandelte Kontrollzellen sowie vollständig reduziertes alamarBlue[®]-Reagenz bei 590 nm vermessen. Für den ADC-Zytotoxizitätsassay wurde das Linker-Toxin-Konstrukt DBCO-MMAE (**Abb. 42 A**), das Konjugat Sc2-MMAE (**Abb. 42 B**) oder DARPin 004 beladen mit MMAE (**Abb. 42 C**) eingesetzt. Dieser Assay wurde in mindestens zwei bis vier unabhängigen Messungen wiederholt.

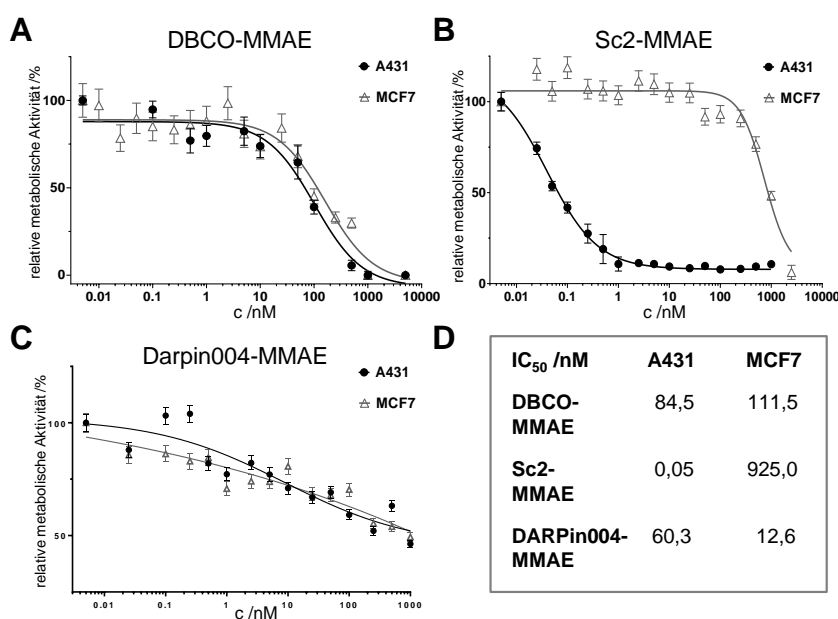


Abb. 42: Zytotoxizität des ADCs. Die metabolische Zellviabilität wurde mittels alamarBlue-Assay in A431- und MCF7-Zellen bestimmt, welche für 72 h bei 37 °C mit **A**) dem DBCO-MMAE-Reagenz (**B**) Sc2-MMAE oder **C**) Darpin004-MMAE behandelt worden waren. Die steigende Fluoreszenzintensität durch die Reduktion des Resazurin-Reagenzes wurde nach 2-4 h Inkubation bei 37 °C ($\lambda_{em}=560$ nm, $\lambda_{ex}=590$ nm) ermittelt und auf unbehandelte Zellen normalisiert. **D**) Übersicht über die mittels der Auftragungen der relativen metabolischen Aktivität (A-C) errechneten IC_{50} -Werte.

Die normalisierten, prozentualen Umsätze an alamarBlue-Reagenz ergeben eine sigmoidale Dosis-Wirkbeziehung zum Logarithmus der Wirkstoffkonzentration. Der IC_{50} -Wert wurde mittels *GraphPad Prism* ermittelt. Der IC_{50} -Wert für freies Monomethylauristatin E wurde für A431-Zellen mit ca. 0,0016 nM und für MCF7-Zellen mit ca. 0,714 nM bestimmt (Hu *et al.*, 2019). Die errechneten IC_{50} -Werte des DBCO-MMAEs von 84,5 nM für A431-Zellen und 111,5 nM für MCF7-Zellen (siehe **Abb. 42 A** und **D**) liegen um das 50 000-fache bzw. 150-fache höher. Dies spiegelt die Tatsache wider, dass das MMAE im Reagenz **2** als *Prodrug* gebunden und zudem deutlich größer ist als freies MMAE, was ein Diffundieren in die Zellen erschwert. Die Substan-

zen MMAE und MMAF können aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften einen sogenannten *bystander effect*, die Apoptose nahegelegener Zellen, auslösen, da eine Diffusion aus der Zelle in das umliegende Gewebe möglich ist (Chen *et al.*, 2017). Dies ist ein Grund für ihre hohe Toxizität aber dem kleinen therapeutischen Index. Wie erwartet senkt die Verbindung mit dem DBCO-Linker-Konstrukt die Potenz des MMAEs. Nur geringe Mengen werden durch endozytotische Transportwege ins Lysosom befördert und hydrolytisch freigesetzt. Durch die Konjugation an das dirigierende Trägermolekül wird das Toxin zielgerichteter eingesetzt. Anhand der für beide Zelllinien vergleichbaren Hemmkurven (**Abb. 42 A**) und IC_{50} -Werte wird deutlich, dass der zytotoxische Effekt des ungebundenen Reagenzes tatsächlich zellunspecific ist (Anderl *et al.*, 2013; Costoplus *et al.*, 2019). Durch die Konjugation des Wirkstoffes an das dirigierende Trägerprotein Sc2 bzw. 004 wurde der IC_{50} -Wert für die EGFR-präsentierenden Zellen herabgesetzt. Der errechnete IC_{50} -Wert für das DARPin004-MMAE betrug 60,3 nM auf A431-Zellen und 12,6 nM für die MCF7-Negativkontrolle. Ein DARPin gegen das epitheliale Adhäsionsmolekül erreichte durch die Konjugation mit MMAF mittlere Hemmkonzentrationen, die im Vergleich zum freien MMAF (6 nM) ebenfalls in derselben Größenordnung (0,6-1,6 nM) lagen (Simon *et al.*, 2013). Zu sehen an **Abb. 42 C**, konnte für das DARPin-Konjugat auf MCF7-Zellen allerdings keine eindeutig sigmoide Dosis-Wirkbeziehung aufgestellt werden. Dies wurde zusätzlich durch die Normierung auf die hohe Hintergrundaktivität des unkonjugierten DARPin-Konstruktes 004 hervorgerufen. Somit konnte zwar die halbmaximale Hemmkonzentration im Vergleich zum DBCO-MMAE herabgesetzt, allerdings ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle detektiert werden. Ein solches Verhalten wird bei einer unspezifischen Toxizität beobachtet. Gründe dafür könnten eine EGFR-unabhängige Aufnahme des relativ kleinen DARPin-Konjugates (ca. 22 kDa) durch beide Zelltypen oder eine verfrühte Freisetzung des MMAEs sein. Zudem konnte mittels hydrophober Interaktionschromatographie noch keine zufriedenstellende Trennung des MMAE-Konjugates von unbeladenen Protein erreicht werden. Sollten die DARPin-Konstrukte in Zukunft mit höherer Ausbeute und Reinheit dargestellt werden, könnten analytische Chromatographien und Stabilitätstests des finalen Konstruktes Aufschluss über eine eventuelle Labilität der Konjugate geben.

Der IC_{50} -Wert für das *single-chain* Antikörper-Wirkstoff-Konjugat Sc2-MMAE in A431-Zellen betrug 0,05 nM. Für die Negativkontrolle MCF7 wurde entsprechend eine inhibitorische Konzentration von 925,0 nM errechnet. Wie auch an den Dosis-Wirkkurven in **Abb. 42 B** deutlich zu sehen, werden A431-Zellen sehr viel stärker vom ADC adressiert. Der logarithmische Graph fällt bereits ab einer Konzentration von ca. 0,01 nM stark ab und erreicht ein Minimum bei etwas mehr als 1 nM. Die Zellviabilität der MCF7-Zellen hingegen bleibt bis zu einer Sc2-MMAE-Konzentration von 100 nM konstant und erreicht selbst bei der maximal eingesetzten Konzentra-

tion von 2,5 μM noch immer kein Minimum. Dies entspricht den Erwartungen für eine zielgerichtete Zytotoxizität an EGFR-überexprimierenden Zellen. Im Vergleich zum DBCO-MMAE wurde eine um mehr als 1700-fach verstärkte Wirksamkeit auf A431-Zellen detektiert. Der IC_{50} -Wert der Negativkontrolle wurde im Vergleich zum freien Reagenz ca. um das Achtfache gesteigert.

Die entsprechenden Werte vergleichbarer ADCs liegen ebenfalls im niedrigen nanomolaren bis picomolaren Bereich. So konnte Hu *et al.* mittels Reduktion der intermolekularen Disulfidbindungen und Cysteinkonjugation ein Konjugat aus MMAE und einem monoklonalen anti-EGFR-Antikörper generieren. Die IC_{50} -Werte lagen bei 0,019 nM für A431- und 2,935 nM für MCF7-Zellen (Hu *et al.*, 2019). Im Gegensatz dazu wurden mit einem MMAE-ADC von Li *et al.* IC_{50} -Werte von 5-65 ng/mL detektiert. Die Konjugation wurde in diesem Fall ebenfalls an einem freien Thiol vollzogen (Li *et al.*, 2019).

Ein vergleichbarer *single-chain* ADC des gegen den EGFR gerichteten scFv245s erreichte durch die Konjugation mit dem Pseudomonas Exotoxin A eine 50%ige Inhibierung der Zellproliferation mit einer Konzentration von ca. 50 pM (Bruell *et al.*, 2003; Niesen *et al.*, 2014). Aus dem scFv425 und einem über die SNAP-tag-Methode gekoppelten Photosensibilisator konnten Hussain *et al.* einen *single-chain* ADC erstellen, dessen zytotoxische Aktivität ebenfalls auf A431-Zellen getestet wurde (Hussain *et al.*, 2011). Der SNAP-tag basiert auf der spezifischen Bindung eines DNA-Reparaturenzyms (O^6 -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase) zu einem O^6 -Benzylguanin. Ein spezifisches Cystein des Fusionsproteins aus Antikörper und C-terminalem SNAP-tag wird durch nucleophile Substitution mit der derivatisierten Benzylgruppe beladen, wobei ein Guanin freigesetzt wird (Keppler *et al.*, 2004). Für den Photosensibilisator-ADC wurden IC_{50} -Werte von 48 nM (A431-Zellen) erreicht (Hussain *et al.*, 2011).

Durch die signifikante Steigerung der halbmaximalen Hemmkonzentration bei sehr geringem EGFR-Level und durch die starke Senkung in den pikomolaren Bereich bei hohem EGFR-Level ist deutlich die gewünschte Selektivität des Sc2-MMAEs zu erkennen. Für die DARPin-Konstrukte konnten bislang noch keine dementsprechenden Erfolge verzeichnet werden. Bis dato verspricht die Verwendung des scFv425-Fcs eine selektive Tumorthherapie. Für weiterführende Studien bedarf es einer deutlichen Verbesserung hinsichtlich der Ausbeute sowie der Isolierung der Konjugate. Eine präzisere Separation der unkonjugierten, einfach- und zweifach-beladenen Proteinspezies während der HIC sorgt für ein homogeneres Produkt mit einer definierteren DAR und dementsprechend auch einem verbesserten zytotoxischen Verhalten. Im Vergleich zum Sc2-MMAE könnte daraufhin die Zytotoxizität des doppelt beladenen Sc2-2xMMAEs bestimmt werden. Ein anti-HER2-ADC mit einer DAR von 3,8 wurde ebenfalls durch die Verwendung zweier CypK-Konjugationsstellen generiert (Oller-Salvia *et al.*, 2018). CypK ist eine unnatürli-

che Aminosäure, dessen Cyclopropen-Einheit mittels Diels-Alder Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf verlinkt werden kann. Die doppelte Beladung mit MMAE pro schwere Kette (Trastuzumab-MMAE₂) resultierte in einen ADC mit einem IC₅₀-Wert gegen humane Brustkrebszellen von 0,055 nM. Durch die Konjugation mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Trastuzumab-TAMRA₂) kann dieses Konstrukt ebenfalls in bildgebenden Methoden eingesetzt werden (Oller-Salvia *et al.*, 2018).

In diesen Experimenten wurde eine Reduktion der metabolischen Aktivität durch Sc2-MMAE, eine EGFR-abhängige Fluoreszenz der A431-Zellen in der *Flow cytometry* und die Fluoreszenzfärbung der Plasmamembran und Lysosomen durch den CF-gekoppelten Sc2 bzw. Sc2-MMAE beobachtet. Dies unterstreicht die biologische Funktionalität der mittels FGly-Methodik gewonnenen Proteinkonjugate, bestehend aus der zielgerichteten Oberflächenbindung, einer erfolgreichen Internalisierung und einer lysosomalen Freisetzung der toxischen Substanz. Folglich ist der ADC strukturell und biologisch funktional und erlaubt eine Differenzierung der therapeutischen Zielstrukturen auf zellulärer Ebene. Duale Konjugate liefern die Chance auf eine parallele Detektion der Tumorgewebe *in vivo* oder der Bekämpfung resistenter Tumorzellen durch eine kombinatorische Therapie zweier Wirkstoffe. Dabei können Proteinkonjugate *in vitro* und auch *in situ* enzymatisch konvertiert werden. Neben dem Anwendungsfeld der Antikörper-Wirkstoff-Konjugate lässt sich die simple Formylglycin-Generierung ebenfalls zur Herstellung vieler. Biotechnologischer Produkte anwenden.

6 Ausblick

Die Enzyme der Formylglycin-Generierung vereinen wichtige Eigenschaften, die dieses System als wertvolles, biotechnologisches Werkzeug zur Erstellung von Proteinkonjugaten auszeichnet. Zum einen kann auf eine Bandbreite an Aldehyd-*tags* und Enzymen, den prokaryotischen, anaeroben AtsBs und den aeroben, pro- und eukaryotischen FGEs, zurückgegriffen werden. Zum anderen ist die Aktivität und Spezifität der einzelnen Enzyme stark von ihrem jeweiligen Kofaktor abhängig. So wurde in Publikationen, die mit dieser Arbeit und dem übergeordneten Kooperationsprojekt in Verbindung stehen (Krüger *et al.*, 2018, 2019; Janson *et al.*, 2020; unveröffentlichtes Manuskript Boschanski 2020), anhand der Peptid- und DARPIn-Bibliothek neue bioorthogonale Strategien zur zweifachen Konjugation entwickelt. Das humane FGE konvertiert den Cysteinrest in der Kernsequenz CxPxR zu einem C^α-Formylglycin. Durch den Einsatz des SAM-abhängigen Eisen-Schwefel-Proteins MMAtsB werden neben Cys-haltigen Aldehyd-*tags* auch Serine zu FGly umgewandelt. Die Substraterkennung des AtsBs wird entscheidend durch die Anwesenheit des Prolins in SxPxR-Motiven und der C-terminalen Hilfssequenzen bestimmt. Die prokaryotischen FGEs hingegen setzen nur Cysteine um, zeigen allerdings ebenfalls die Möglichkeit, ihr Substratspektrum und ihre Aktivität *in vitro* mittels Kupferzugabe bzw. Rekonstitution zu modulieren. Mit dem signifikanten Umsatz eines CxAxR-Motivs durch MtFGE_{rek} und ScFGE_{rek} wird eine zusätzliche Ebene zur enzymatischen Orthogonalität hinzugefügt.

Der Vergleich zwischen der hochaktiven Variante des TcFGEs, dem Wildtypenzym und den Einzelmutanten nach (Knop *et al.*, 2017) mit und ohne Kupferrekonstitution, wird über darüber hinausgehende Fragestellungen Aufschluss geben: 1. Rührt die Beobachtung, dass TcFGE eine geringe Ausprägung der Spezifitätsverringern in Anwesenheit von Kupfer zeigt, von eben diesen Mutationen her? 2. Lässt sich die Spezifität durch weitere Mutationen verändern? 3. Können analoge Mutationen im humanen FGE oder den FGEs aus *S. coelicolor* und *M. tuberculosis* ebenfalls die Aktivität verbessern und die Substratspezifität dirigieren?

Unter den aeroben Enzymen eignet sich hFGE besonders für eine *in vivo*-Konversion von Proteinsubstraten. Humanes FGE zeigt die engste Substratspezifität für ausschließlich Prolin-haltige Erkennungsmotive, eine Abhängigkeit vom Kofaktor Kupfer für die Aldehyd-generierende Aktivität und die Möglichkeit mit *rational design* Ansätzen die *in vivo*-Konversionsraten noch zu steigern.

Zur Investigation der intrazellulären Systeme, welche an der Beladung des FGE-Apoenzym mit Kupfer beteiligt sind, ist eine Analyse des hFGE-Sekretionsweges bzw. der N-terminalen Domäne sowie der intrazellulären Interaktionspartner vielversprechend. Dies wird in Zukunft Einbli-

cke in die möglichen Zusammenhänge der Cu-Abhängigkeit dieser ER-ständigen Monooxygenase und der Ausprägung der multiplen Sulfatasedefizienz oder den Störungen des Kupfermetabolismus ermöglichen. Auf der Basis der in dieser Arbeit angeführten Experimente zur *in vivo*-Enzymaktivität sollten die indirekten Aktivitätsassays mit Mutanten des hFGEs, wie z.B. einer C50A/C52A- und einer C336A/C341A-Doppelmutante und ihrer Einzelmutanten, durchgeführt werden. Ersteres wird zur Analyse des CXC-Motivs im N-Terminus und Letzteres zur Untersuchung des aktiven Zentrums eingesetzt. Wie gezeigt wurde, wird eine Aktivitätsveränderung *in vivo* durch die Cu-Chelation mit TEPA bzw. Kupfersulfatgabe erreicht. Besonders eignet sich für eine *in vivo*-Analyse die FGE *knock out*-Zelllinie ARPE19-KO. Auch die MSDi-Patientenzellen können zu einem ganzheitlichen Verständnis beitragen. Wird die Kultivierung der MSDi-Zellen unter Kupfermangel verbessert, sollten auch weitere MSD-Mutanten und -Zelllinien vergleichend herangezogen werden. Die ATP7B-KO-Zelllinie der Hepatozyten HepG2 war ein vielversprechender Kandidat in der Ermittlung der am Kupferbeladungsprozess beteiligten Interaktionspartner des humanen Enzyms. Weitere Zelllinien mit fehlenden oder inaktiven Proteinen des Kupfermetabolismus, wie z.B. ATP7A, Atox1 und Ceruloplasmin, müssten in Hinblick auf die FGE-Aktivität untersucht werden, um einen umfassenden Einblick in die zellulären Cu-Systeme, die in einem Zusammenhang mit FGE stehen, zu erhalten. Die Untersuchung der analogen, bakteriellen Kupferproteine könnten Aufschluss über die Cu-Inkorporation in prokaryotische FGEs geben. Methoden wie Koimmunpräzipitationen und *crosslinking*-Experimente, sowie *Yeast-two-Hybrid*-Systeme bieten sich zur Identifizierung direkter und indirekter Interaktionspartner an. Die in dieser Fragestellung gewonnen Erkenntnisse werden nützlich für das *rational design* des FGEs für biotechnologische Anwendungen sowie zur Therapie der MSD-Patienten sein.

Durch die Verwendung von KDEL- und PGEL-Sequenzen wurden im ER zurückgehaltene FGE-Varianten in stabilen CHO-Zellen generiert. Dies ermöglichte die Produktion von *in situ*-konvertierten *single-chain* Antikörpern mit einer FGly-Konversion von bis zu 91%. Das hFGE eignet sich als Ausgangspunkt für weitere Modifikationen, die weniger auf die Aktivitätssteigerung als auf eine Verschiebung des Substratspektrums ausgerichtet sind. Bei der Konversion alternativer Erkennungsmotive mittels prokaryotischer FGEs war die Anwesenheit von Hilfssequenzen limitierend. Daher sollte die Substratspezifität des hFGEs zusätzlich in An- und Abwesenheit der für eukaryotische Sulfatasen hochkonservierten, C-terminalen Aminosäuresequenz xxxLTGR (Schmidt *et al.*, 1995; Dierks *et al.*, 1999) ermittelt werden. Mit einem Set an humanen, verschiedene Spezifitäten aufweisenden FGEs und deren Erkennungssequenzen wird in Zukunft eine breitere Möglichkeit für orthogonale Mehrfachkonjugationen in Säugerzellen angeboten.

Für die Entwicklung eines ADCs wird die Antikörperproduktion in CHO-Zellen mit stabiler scFv425-Fc- und hFGE-Expression hochskaliert. Dazu sollten die CHO-Zelllinien der aktivsten stabilen hFGE-Varianten zusätzlich mit einer stabilen AK-Expression ausgestattet und die Medienbedingungen, z.B. in einer *fed-batch* Kultivierung mit relativ hohem Kupfergehalt, etabliert werden. Höhere Ausbeuten an FGly-tragenden Antikörpern sind notwendig, um die Konjugationschemie weiter zu verfeinern, damit größere Mengen von den bislang verwendeten MMAE-Einfach- und MMAE-CF-Doppelkonjugaten erhalten werden. Hier muss die Analyse der biologischen Aktivitäten, besonders der Doppelkonjugate, weitergeführt werden. Die initialen LCI-Experimente mit den zweifach beladenen ADCs müssen reproduziert und parallel zu den Zytotoxizitätsassays in Säugerzellen ausgeweitet werden. Zudem sollte gleichzeitig mit der Ausbeutensteigerung auch die Präparationsleistung der Konjugate via HIC verbessert und die Analytik mittels ESI-MS und HPLC gewährleistet werden. Diese Techniken bringen einen wichtigen Aufschluss über Homogenität und DAR der mit der FGly-Technik und HIPS-Click-Ligationsstrategie erhaltenen Produkte.

Über die MMAE-ADCs hinaus werden in diesem Projekt Antikörperkonjugate mit alternativen Zytostatika angestrebt. So wird in Zukunft eine Konjugation des scFv425-Fc mit Cryptophycinen oder sogar eine kombinatorische Anwendung von zwei Toxinen auf einem dualen ADC ermöglicht. Mit einer größeren Bandbreite an ADCs lässt sich die Pharmakokinetik in einem direkten Vergleich ermitteln. Dazu dienen Messungen der Serumstabilität, der Zeitabhängigkeit von Internalisierung oder Linker-Spaltung ausgeweitet auf mehrere EGFR-abhängige Tumorzellen. Die biologische Effizienz wird im lebenden System durch *blood clearance* und Bestimmung von Tumorgrößen sowie Fluoreszenzanalytik in Geweben analysiert. Die finale Anwendung der ADCs ist die klinische Tumorthherapie EGFR-abhängiger Krebsarten.

Die Methodik der FGly-basierten Biokonjugation ermöglicht die mehrfache Beladung von Proteinen und Peptiden. Die ermittelten Orthogonalitäten auf enzymatischer Ebene lassen sich mit einer Vielzahl von Konjugationsreaktionen kombinieren und bieten eine selektive Alternative zu ortsunspezifischen Konjugationsmethoden. Die einfache und duale FGly-Konjugation lässt sich auf viele weitere Anwendungen übertragen und wird in Zukunft in Gebieten wie der *in vivo*-Proteinmarkierung und -detektion oder der Proteinimmobilisierung, z.B. zur Herstellung von Enzymkaskaden, verstärkt Aufmerksamkeit erhalten.

7 Literaturverzeichnis

- Abdollahpour-Alitappeh, M. *et al.* (2017) Evaluation of factors influencing antibody reduction for development of antibody drug conjugates, *Iranian Biomedical Journal*. Pasteur Institute of Iran, 21(4), pp. 270–274. doi: 10.18869/acadpub.ijb.21.4.270.
- Adams, G. P. *et al.* (2001) High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain Fv antibody molecules, *Cancer Research*, 61(12), pp. 4750–4755.
- Adhikari, P. *et al.* (2020) Site-Specific Conjugation to Cys-Engineered THIOMAB™ Antibodies, in *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 51–69. doi: 10.1007/978-1-4939-9929-3_4.
- Agard, N. J. *et al.* (2004). A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *Journal of the American Chemical Society*, 126, *Journal of the American Chemical Society*, 126(46), pp. 15046–15047. doi: 10.1021/ja044996f.
- Agarwal, K. *et al.* (1989) Effects of copper on mammalian cell components, *Chemico-Biological Interactions*, 69(1), pp. 1–16. doi: 10.1016/0009-2797(89)90094-X.
- Agarwal, P. *et al.* (2013)a A Pictet-Spengler ligation for protein chemical modification, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(1), pp. 46–51. doi: 10.1073/pnas.1213186110.
- Agarwal, P. *et al.* (2013)b Hydrazino-Pictet-Spengler Ligation as a Biocompatible Method for the Generation of Stable Protein Conjugates, *Bioconjugate Chem.*, 24, pp. 846–851. doi: 10.1021/bc400042a.
- Álvarez-Barcia, S. und Kästner, J. (2019) Copper coordination in formylglycine generating enzymes, *European Physical Journal: Special Topics*, 227(14), pp. 1657–1664. doi: 10.1140/epjst/e2019-800149-7.
- Anderl, J. *et al.* (2013) Antibody--Drug Conjugate Payloads, in Ducry, L. (ed.) *Antibody-Drug Conjugates*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 51–70. doi: 10.1007/978-1-62703-541-5_4.
- Appel, M. J. *et al.* (2019) Formylglycine-generating enzyme binds substrate directly at a mononuclear Cu(I) center to initiate O₂ activation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(12), pp. 5370–5375. doi: 10.1073/pnas.1818274116.
- Arakawa, T. *et al.* (2004) Elution of antibodies from a Protein-A column by aqueous arginine solutions, *Protein Expression and Purification*, 36(2), pp. 244–248. doi: 10.1016/j.pep.2004.04.009.
- Argos, P. *et al.* (1986) similarities and global diversity, 5(2), pp. 433–440. doi: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04229.x.
- Arndt, K. M. *et al.* (1998) Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment, *Biochemistry*, 37(37), pp. 12918–12926. doi: 10.1021/bi9810407.
- Axup, J. Y. *et al.* (2012) Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40), pp. 16101–16106. doi: 10.1073/pnas.1211023109.

- Baselga, J. und Albanell, J. (2002) Epithelial growth factor receptor interacting agents, *Hematology/Oncology Clinics of North America*. Elsevier, pp. 1041–1063. doi: 10.1016/S0889-8588(02)00055-2.
- Belperio, J. A. *et al.* (2000) CXC chemokines in angiogenesis, *Journal of Leukocyte Biology*, 68, pp. 593–609. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.04.007.
- Berteau, O. *et al.* (2006) A new type of bacterial sulfatase reveals a novel maturation pathway in prokaryotes, *Journal of Biological Chemistry*, 281(32), pp. 22464–22470. doi: 10.1074/jbc.M602504200.
- Binz, H. K. *et al.* (2003) Designing repeat proteins: Well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins, *Journal of Molecular Biology*, 332(2), pp. 489–503. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00896-9.
- Birkaya, B. und Aletta, J. M. (2005) NGF promotes copper accumulation required for optimum neurite outgrowth and protein methylation, *Journal of Neurobiology*, 63(1), pp. 49–61. doi: 10.1002/neu.20114.
- Bloess, S. *et al.* (2019) Expression, characterization, and site-specific covalent immobilization of an L-amino acid oxidase from the fungus *Hebeloma cylindrosporum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*. Applied Microbiology and Biotechnology, 103(5), pp. 2229–2241. doi: 10.1007/s00253-018-09609-7.
- Boersma, Y. L. *et al.* (2011) Bispecific Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs) targeting epidermal growth factor receptor inhibit A431 cell proliferation and receptor recycling, *Journal of Biological Chemistry*, 286(48), pp. 41273–41285. doi: 10.1074/jbc.M111.293266.
- Boersma, Y. L. und Plückthun, A. (2011) DARPs and other repeat protein scaffolds: Advances in engineering and applications, *Current Opinion in Biotechnology*, 22(6), pp. 849–857. doi: 10.1016/j.copbio.2011.06.004.
- Boni, V. *et al.* (2020) The Resurgence of Antibody Drug Conjugates in Cancer Therapeutics: Novel Targets and Payloads, *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, (40), pp. e58–e74. doi: 10.1200/edbk_281107.
- Bowman, T. *et al.* (2000) STATs in oncogenesis, *Oncogene*, 19(21), pp. 2474–2488. doi: 10.1038/sj.onc.1203527.
- Brandl, F. *et al.* (2020) Optimizing the anti-tumor efficacy of protein-drug conjugates by engineering the molecular size and half-life, *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V, p. 136126. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.136126.
- Broach, J. R. und Guarascio, V. R. (1982) within the Yeast Plasmid 2p Circle Is Site-Specific, 29(May), pp. 227–234.
- Broach, J. R. und Hickst, J. B. (1980) Associated and Recombination Functions with the Yeast Plasmid , 2 ~ Circle, 21(September), pp. 501–508.
- Bruell, D. *et al.* (2003) The recombinant anti-EGF receptor immunotoxin 425(scFv)-ETA suppresses growth of a highly metastatic pancreatic carcinoma cell line., *International journal of oncology*. Spandidos Publications, 23(4), pp. 1179–1186. doi: 10.3892/ijo.23.4.1179.
- Bruins, W. S. C. *et al.* (2020) Targeted Therapy With Immunoconjugates for Multiple Myeloma, *Frontiers in Immunology*, 11(June). doi: 10.3389/fimmu.2020.01155.

- Bull Phelps, S. L. *et al.* (2008) Implications of EGFR inhibition in ovarian cancer cell proliferation, *Gynecologic Oncology*, 109(3), pp. 411–417. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.02.030.
- Cal, P. M. S. D. *et al.* (2014) Cysteine-Selective Reactions for Antibody Conjugation **, pp. 10585–10587. doi: 10.1002/anie.201405702.
- Carlson, B. L. *et al.* (2008) Function and structure of a prokaryotic formylglycine-generating enzyme, *Journal of Biological Chemistry*, 283(29), pp. 20117–20125. doi: 10.1074/jbc.M800217200.
- Carrico, I. S. *et al.* (2007) Introducing genetically encoded aldehydes into proteins, *Nature Chemical Biology*, 3(6), pp. 321–322. doi: 10.1038/nchembio878.
- Chandhok, G. *et al.* (2014) The effect of zinc and D-penicillamine in a stable human hepatoma ATP7B knockout cell line, *PLoS ONE*, 9(6), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0098809.
- Chandhok, G. *et al.* (2016) Functional analysis and drug response to zinc and D-penicillamine in stable ATP7B mutant hepatic cell lines, *World Journal of Gastroenterology*, 22(16), pp. 4109–4119. doi: 10.3748/wjg.v22.i16.4109.
- Chang, B. S., *et al.* (1996) Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(12), pp. 1325–1330. doi: 10.1021/js960080y.
- Chapman, A. P. (2002) PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: A review, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(4), pp. 531–545. doi: 10.1016/S0169-409X(02)00026-1.
- Chen, H. *et al.* (2017) Tubulin inhibitor-based antibody-drug conjugates for cancer therapy, *Molecules*, 22(8). doi: 10.3390/molecules22081281.
- Chen, X. *et al.* (2005) Mitochondrial membrane potential is reduced in copper-deficient C 2C12 cells in the absence of apoptosis, *Biological Trace Element Research*, 106(1), pp. 51–63.
- Chivers, P. T. *et al.* (1996) The CXXC motif: Imperatives for the formation of native disulfide bonds in the cell, *EMBO Journal*, 15(11), pp. 2659–2667. doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00626.x.
- Cho, B. T. und Kang, S. K. (2005) Direct and indirect reductive amination of aldehydes and ketones with solid acid-activated sodium borohydride under solvent-free conditions, *Tetrahedron*, 61(24), pp. 5725–5734. doi: 10.1016/j.tet.2005.04.039.
- Chudasama, V. *et al.* (2016) Recent advances in the construction of antibody-drug conjugates, *Nature Chemistry*, 8(2), pp. 114–119. doi: 10.1038/nchem.2415.
- Citri, A. und Yarden, Y. (2006) EGF-ERBB signalling: Towards the systems level, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(7), pp. 505–516. doi: 10.1038/nrm1962.
- Clayton, A. H. A. *et al.* (2007) Unligated epidermal growth factor receptor forms higher order oligomers within microclusters on A431 cells that are sensitive to tyrosine kinase inhibitor binding, *Biochemistry*, 46(15), pp. 4589–4597. doi: 10.1021/bi700002b.
- Cleary, J. M. *et al.* (2020) A phase 1 study evaluating safety and pharmacokinetics of losatuxizumab vedotin (ABBV-221), an anti-EGFR antibody-drug conjugate carrying monomethyl auristatin E, in patients with solid tumors likely to overexpress EGFR, *Investigational New Drugs*. doi: 10.1007/s10637-020-00908-3.

- Cortez-Retamozo, V. *et al.* (2004) Efficient Cancer Therapy with a Nanobody-Based Conjugate, *Cancer Research*, 64(8), pp. 2853–2857. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3935.
- Cosma, M. P. *et al.* (2004) Molecular and functional analysis of SUMF1 mutations in multiple sulfatase deficiency, *Human Mutation*, 23(6), pp. 576–581. doi: 10.1002/humu.20040.
- Costoplus, J. A. *et al.* (2019) Peptide-Cleavable Self-immolative Maytansinoid Antibody-Drug Conjugates Designed to Provide Improved Bystander Killing, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 10(10), pp. 1393–1399. doi: 10.1021/acsmchemlett.9b00310.
- Crone, S. A. *et al.* (2002) ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy, *Nature Medicine*, 8(5), pp. 459–465. doi: 10.1038/nm0502-459.
- Dassonville, O. *et al.* (2007) EGFR targeting therapies: Monoclonal antibodies versus tyrosine kinase inhibitors. Similarities and differences, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier, pp. 53–61. doi: 10.1016/j.critrevonc.2006.12.008.
- Dawson, J. P. *et al.* (2005) Epidermal Growth Factor Receptor Dimerization and Activation Require Ligand-Induced Conformational Changes in the Dimer Interface, *molecular and cellular biology*, 25(17), pp. 7734–7742. doi: doi:10.1128/MCB.25.17.7734–7742.2005.
- Decker, S. J. (1990) Epidermal growth factor and transforming growth factor- α induce differential processing of the epidermal growth factor receptor, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 166(2), pp. 615–621. doi: 10.1016/0006-291X(90)90853-F.
- Dickgiesser, S. *et al.* (2019) Site-Specific Conjugation of Thiol-Reactive Cytotoxic Agents to Nonnative Cysteines of Engineered Monoclonal Antibodies, in *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 1–14. doi: 10.1007/978-1-4939-9654-4_1.
- Dickmanns, A. *et al.* (2005) Crystal structure of human pFGE, the paralog of the α -formylglycine-generating enzyme, *Journal of Biological Chemistry*, 280(15), pp. 15180–15187. doi: 10.1074/jbc.M414317200.
- Dierks, T. *et al.* (1999) Sequence determinants directing conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases, *EMBO Journal*, 18(8), pp. 2084–2091. doi: 10.1093/emboj/18.8.2084.
- Dierks, T. *et al.* (2003) Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human α -formylglycine generating enzyme, *Cell*, 113(4), pp. 435–444. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00347-7.
- Dierks, T. *et al.* (2005) Molecular basis for multiple sulfatase deficiency and mechanism for formylglycine generation of the human formylglycine-generating enzyme, *Cell*, 121(4), pp. 541–552. doi: 10.1016/j.cell.2005.03.001.
- Dodgson, K. S. *et al.* (1984) Utilization of sodium dodecyl sulphate by denitrifying bacteria under anaerobic conditions, *FEMS Microbiology Letters*, 24(1), pp. 53–56. doi: 10.1111/j.1574-6968.1984.tb01243.x.
- Drake, P. M. *et al.* (2014) Aldehyde tag coupled with HIPS chemistry enables the production of ADCs conjugated site-specifically to different antibody regions with distinct in vivo efficacy and PK outcomes, *Bioconjugate Chemistry*, 25(7), pp. 1331–1341. doi: 10.1021/bc500189z.

- Dubowchik, G. M. *et al.* (2002) Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: Model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity, *Bioconjugate Chemistry*, 13(4), pp. 855–869. doi: 10.1021/bc025536j.
- Dubowchik, G. M. und Firestone, R. A. (1998) Cathepsin B-sensitive Dipeptide Prodrugs. A Model Study of Structural Requirements for Efficient Release of Doxorubicin, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 8, pp. 3341–3346.
- Ejima, D. *et al.* (2005) Effective elution of antibodies by arginine and arginine derivatives in affinity column chromatography, *Analytical Biochemistry*, 345(2), pp. 250–257. doi: 10.1016/j.ab.2005.07.004.
- Ennemann, E. C. *et al.* (2013) Proprotein convertases process and thereby inactivate formylglycine-generating enzyme, *Journal of Biological Chemistry*, 288(8), pp. 5828–5839. doi: 10.1074/jbc.M112.405159.
- Ernst, L. K. *et al.* (2002) Allelic polymorphisms in the FcγRIIC gene can influence its function on normal human natural killer cells, *Journal of Molecular Medicine*, pp. 248–257. doi: 10.1007/s00109-001-0294-2.
- Eurofins. Site-directed mutagenesis. Available at: <https://www.eurofinsgenomics.eu/en/gene-synthesis-molecular-biology/molecular-biology-services/site-directed-mutagenesis/>.
- Falck, G. und Müller, K. M. (2018) Enzyme-Based Labeling Strategies for Antibody–Drug Conjugates and Antibody Mimetics, *Antibodies*, 7(4). doi: 10.3390/antib7010004.
- Fey, J. *et al.* (2001) Characterization of Posttranslational Formylglycine Formation by Luminal Components of the Endoplasmic Reticulum, *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), pp. 47021–47028. doi: 10.1074/jbc.M108943200.
- Von Figura, K. *et al.* (1998) A novel protein modification generating an aldehyde group in sulfatases: Its role in catalysis and disease, *BioEssays*, 20(6), pp. 505–510. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199806)20:6<505::AID-BIES9>3.0.CO;2-K.
- Flocco, M. M. und Mowbray, S. L. (1994) Planar stacking interactions of arginine and aromatic side-chains in proteins, *Journal of Molecular Biology*, pp. 709–717. doi: 10.1006/jmbi.1994.1022.
- Fraldi, A. *et al.* (2008) Multistep, sequential control of the trafficking and function of the multiple sulfatase deficiency gene product, SUMF1 by PDI, ERGIC-53 and ERp44, *Human Molecular Genetics*, 17(17), pp. 2610–2621. doi: 10.1093/hmg/ddn161.
- Gande, S. L. *et al.* (2008) Paralog of the formylglycine-generating enzyme - Retention in the endoplasmic reticulum by canonical and noncanonical signals, *FEBS Journal*, 275(6), pp. 1118–1130. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06271.x.
- Garrett, T. P. J. *et al.* (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor α , *Cell*, 110(6), pp. 763–773. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00940-6.
- Gauchet, C. *et al.* (2006) Regio- and chemoselective covalent immobilization of proteins through unnatural amino acids, *Journal of the American Chemical Society*, 128(29), pp. 9274–9275. doi: 10.1021/ja061131o.

- Gautier, A. *et al.* (2008) An Engineered Protein Tag for Multiprotein Labeling in Living Cells, *Chemistry and Biology*, 15(2), pp. 128–136. doi: 10.1016/j.chembiol.2008.01.007.
- Van Geel, R. *et al.* (2015) Chemoenzymatic Conjugation of Toxic Payloads to the Globally Conserved N-Glycan of Native mAbs Provides Homogeneous and Highly Efficacious Antibody-Drug Conjugates, *Bioconjugate Chemistry*, 26(11), pp. 2233–2242. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00224.
- Gekko, K. und Timasheff, S. N. (1981) Mechanism of Protein Stabilization by Glycerol: Preferential Hydration in Glycerol-Water Mixtures, *Biochemistry*, 20(16), pp. 4667–4676. doi: 10.1021/bi00519a023.
- Gelderman, K. A. *et al.* (2004) Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy, *Trends in Immunology*, 25(3), pp. 158–164. doi: 10.1016/j.it.2004.01.008.
- Gerlach, M. (2016) Bioorthogonale Reaktionen durch C α -Formylglycin-generierende Enzyme, *Dissertation, Universität Bielefeld*.
- Ghaderi, D. *et al.* (2010) Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins, *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 28(8), pp. 863–867. doi: 10.1038/nbt.1651.
- Goldman, P. J. *et al.* (2013) X-ray structure of an AdoMet radical activase reveals an anaerobic solution for formylglycine posttranslational modification, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(21), pp. 8519–8524. doi: 10.1073/pnas.1302417110.
- Goldstein, R. *et al.* (2015) Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 for HER2 molecular imaging, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 42(2), pp. 288–301. doi: 10.1007/s00259-014-2940-2.
- Grove, T. L. *et al.* (2008) In vitro characterization of AtsB, a radical SAM formylglycine-generating enzyme that contains three [4Fe-4S] clusters, *Biochemistry*, 47(28), pp. 7523–7538. doi: 10.1021/bi8004297.
- Hamada, H. *et al.* (2009) Effect of Additives on Protein Aggregation. Current Pharmaceutical Biotechnology, Volume 10, 4Bentham Science Publishers, pp. 400–407. Available at: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpb/2009/00000010/00000004/art00008>.
- Han, M. J. *et al.* (2012) Enabling Wittig reaction on site-specific protein modification, *Chemical Communications*, 48(90), pp. 11079–11081. doi: 10.1039/c2cc35738k.
- Hanson, S. R. *et al.* (2004) Sulfatases: Structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility, *Angewandte Chemie - International Edition*, 43(43), pp. 5736–5763. doi: 10.1002/anie.200300632.
- Himo, F. *et al.* (2005) Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates, *Journal of the American Chemical Society*, 127(1), pp. 210–216. doi: 10.1021/ja0471525.
- Hoffknecht, P. *et al.* (2015) Efficacy of the Irreversible ErbB Family Blocker Afatinib in Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) – Pretreated Non-Small-Cell Lung Cancer, *Journal of Thoracic Oncology*. International Association for the Study of Lung Cancer, 10(1), pp. 156–163. doi: 10.1097/JTO.0000000000000380.

- Holder, P. G. *et al.* (2015) Reconstitution of formylglycine-generating enzyme with copper(II) for aldehyde tag conversion, *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 290(25), pp. 15730–15745. doi: 10.1074/jbc.M115.652669.
- Hu, X. *et al.* (2019) An EGFR-targeting antibody–drug conjugate LR004-VC-MMAE: potential in esophageal squamous cell carcinoma and other malignancies, *Molecular Oncology*, 13(2), pp. 246–263. doi: 10.1002/1878-0261.12400.
- Hudak, J. E. *et al.* (2012) Synthesis of heterobifunctional protein fusions using copper-free click chemistry and the aldehyde tag, *Angewandte Chemie - International Edition*, 51(17), pp. 4161–4165. doi: 10.1002/anie.201108130.
- Hussain, A. F. *et al.* (2011) SNAP-tag technology mediates site specific conjugation of antibody fragments with a photosensitizer and improves target specific phototoxicity in tumor cells, *Bioconjugate Chemistry*, 22(12), pp. 2487–2495. doi: 10.1021/bc200304k.
- Iannello, A. und Ahmad, A. (2005) Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies, *Cancer and Metastasis Reviews*, 24(4), pp. 487–499. doi: 10.1007/s10555-005-6192-2.
- Iwakura, Y. *et al.* (2005) Influences of dopaminergic lesion on epidermal growth factor-ErbB signals in Parkinsons disease and its model: Neurotrophic implication in nigrostriatal neurons, *Journal of Neurochemistry*, 93(4), pp. 974–983. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03073.x.
- Janson, N. *et al.* (2020) Bifunctional Reagents for Formylglycine Conjugation: Pitfalls and Breakthroughs, *Chem Bio Chem*. doi: 10.1002/cbic.202000416.
- Jeffrey, S. C. *et al.* (2006) Development and properties of β -glucuronide linkers for monoclonal antibody-drug conjugates, *Bioconjugate Chemistry*, 17(3), pp. 831–840. doi: 10.1021/bc0600214.
- Jiang, F. *et al.* (2015) Progress and challenges in developing aptamer-functionalized targeted drug delivery systems, *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), pp. 23784–23822. doi: 10.3390/ijms161023784.
- Junutula, J. R. *et al.* (2008) Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index, *Nature Biotechnology*, 26(8), pp. 925–932. doi: 10.1038/nbt.1480.
- Kamat, V. *et al.* (2008) Enhanced EGFR inhibition and distinct epitope recognition by EGFR antagonistic mAbs C225 and 425, *Cancer Biology and Therapy*, 7(5), pp. 726–733. doi: 10.4161/cbt.7.5.6097.
- Kaushal, S. *et al.* (2008) Fluorophore-conjugated anti-CEA Antibody for the Intraoperative Imaging of Pancreatic and Colorectal Cancer, pp. 1938–1950. doi: 10.1007/s11605-008-0581-0.
- Keilholz, U. (2007) Antigen-Specific Cancer Vaccines, in *Targeted Therapies in Cancer*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 213–218. doi: 10.1007/978-3-540-46091-6_18.
- Keppeler, A. *et al.* (2004) Labeling of fusion proteins of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules in vivo and in vitro, *Methods*, 32(4), pp. 437–444. doi: 10.1016/j.ymeth.2003.10.007.

- Khan, F. *et al.* (2012) Histidine affinity tags affect MSP1 42 structural stability and immunodominance in mice, *Biotechnology Journal*, 7(1), pp. 133–147. doi: 10.1002/biot.201100331.
- Kim, E. und Koo, H. (2019) Biomedical applications of copper-free click chemistry: in vitro, in vivo, and ex vivo. Royal Society of Chemistry, 10, pp. 7835–7851. doi: 10.1039/c9sc03368h.
- Kim, M. T. *et al.* (2014) Statistical Modeling of the Drug Load Distribution on Trastuzumab Emtansine (Kadcyla), a Lysine-Linked Antibody Drug Conjugate. doi: 10.1021/bc5000109.
- Knop, M. *et al.* (2015) In Vitro Reconstitution of Formylglycine-Generating Enzymes Requires Copper(I), *ChemBioChem*, 16(15), pp. 2147–2150. doi: 10.1002/cbic.201500322.
- Knop, M. *et al.* (2016) Copper is a Cofactor of the Formylglycine-Generating Enzyme, *ChemBioChem*, 18(2), pp. 161–165. doi: 10.1002/cbic.201600359.
- Knop, M. *et al.* (2017) Mutation of Conserved Residues Increases in Vitro Activity of the Formylglycine-Generating Enzyme, *ChemBioChem*, 18(17), pp. 1755–1761. doi: 10.1002/cbic.201700174.
- Kolb, H. C. *et al.* (2001) Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, pp. 2004–2021. doi: 10.1002/anie.200100051.
- Krüger, T. *et al.* (2018) Two-fold Bioorthogonal Derivatization by Different Formylglycine-Generating Enzymes, *Angewandte Chemie - International Edition*, 57(24), pp. 7245–7249. doi: 10.1002/anie.201803183.
- Krüger, T. *et al.* (2019) Conversion of Serine-Type Aldehyde Tags by the Radical SAM Protein AtsB from *Methanosarcina mazei*, *ChemBioChem*, 20(16), pp. 2074–2078. doi: 10.1002/cbic.201900322.
- Krüger, T. (2019) Two-fold Bioorthogonal Derivatization by Different Formylglycine-Generating Enzymes, *Dissertation, Universität Bielefeld*.
- Krüger, T. *et al.* (2019) Formylglycine-Generating Enzymes for Site-Specific Bioconjugation, *Biol Chem*, 400, pp. 289–297.
- Kudirka, R. *et al.* (2015) Generating site-specifically modified proteins via a versatile and stable nucleophilic carbon ligation, *Chemistry and Biology*, 22(2), pp. 293–298. doi: 10.1016/j.chembiol.2014.11.019.
- Kudirka, R. A. *et al.* (2016) Site-Specific Tandem Knoevenagel Condensation-Michael Addition to Generate Antibody-Drug Conjugates, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, pp. 994–998. doi: 10.1021/acsmedchemlett.6b00253.
- Kupchan, S. M. *et al.* (1972) Maytansine, a Novel Antileukemic Ansa Macrolide from *Maytenus ovatus*, *Journal of the American Chemical Society*, 94(4), pp. 1354–1356. doi: 10.1021/ja00759a054.
- Lee, M. D. *et al.* (2019) Dual Site-Specific Labeling of an Antibody Fragment through Sortase A and π -Clamp Conjugation, *Bioconjugate Chemistry*, 30(10), pp. 2539–2543. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00639.
- Leu, T.-H. und Maa, M.-C. (2003) FUNCTIONAL IMPLICATION OF THE INTERACTION BETWEEN EGF RECEPTOR AND C-SRC, *Frontiers in Bioscience*, 8, pp. 28–38. doi: 10.2741/980.

- Levengood, M. R. *et al.* (2017) Orthogonal Cysteine Protection Enables Homogeneous Multi-Drug Antibody–Drug Conjugates, *Angewandte Chemie - International Edition*, 56(3), pp. 733–737. doi: 10.1002/anie.201608292.
- Lewis, M. J. und Pelham, H. R. B. (1992) Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum, *Cell*, 68(2), pp. 353–364. doi: 10.1016/0092-8674(92)90476-S.
- Li, Z. *et al.* (2019) Development of a Novel EGFR-Targeting Antibody-Drug Conjugate for Pancreatic Cancer Therapy, *Targeted Oncology*. Targeted Oncology, 14(1), pp. 93–105. doi: 10.1007/s11523-018-0616-8.
- Liebmann, C. (2001) Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: Paradigms of multiplicity, *Cellular Signalling*, 13(11), pp. 777–785. doi: 10.1016/S0898-6568(01)00192-9.
- Liu, H. *et al.* (2003) A method for the generation of glycoprotein mimetics, *Journal of the American Chemical Society*, 125(7), pp. 1702–1703. doi: 10.1021/ja029433n.
- Liu, H. *et al.* (2010) Ranking the susceptibility of disulfide bonds in human IgG1 antibodies by reduction, differential alkylation, and LC-MS analysis, *Analytical Chemistry*, 82(12), pp. 5219–5226. doi: 10.1021/ac100575n.
- Liu, J. *et al.* (2017) Soy protein-based polyethylenimine hydrogel and its high selectivity for copper ion removal in wastewater treatment, *Journal of Materials Chemistry A*. Royal Society of Chemistry, 5(8), pp. 4163–4171. doi: 10.1039/c6ta10814h.
- Liu, W. *et al.* (2007) Genetic incorporation of unnatural amino acids into proteins in mammalian cells, *Nature Methods*, 4(3), pp. 239–244. doi: 10.1038/nmeth1016.
- Lo, H. *et al.* (2006) EGFR signaling pathway in breast cancers: from traditional signal transduction to direct nuclear translocalization, pp. 211–218. doi: 10.1007/s10549-005-9011-0.
- Lotze, J. *et al.* (2018) Time-Resolved Tracking of Separately Internalized Neuropeptide Y 2 Receptors by Two-Color Pulse-Chase, *ACS Chemical Biology*, 13(3), pp. 618–627. doi: 10.1021/acscchembio.7b00999.
- Lowenstein, E. J. *et al.* (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling, *Cell*, 70(3), pp. 431–442. doi: 10.1016/0092-8674(92)90167-B.
- De Luca, A. *et al.* (2008) The role of the EGFR signaling in tumor microenvironment, *Journal of Cellular Physiology*, 214(3), pp. 559–567. doi: 10.1002/jcp.21260.
- Lum, K. M. *et al.* (2013) Stabilized Wittig olefination for bioconjugation, *Chemical Communications*, 49(95), pp. 11188–11190. doi: 10.1039/c3cc45961f.
- Luo, H. *et al.* (2014) Effects of salt-induced reversible self-association on the elution behavior of a monoclonal antibody in cation exchange chromatography, *Journal of Chromatography A*. Elsevier B.V., 1362, pp. 186–193. doi: 10.1016/j.chroma.2014.08.048.
- Lurje, G. und Lenz, H. (2010) EGFR Signaling and Drug Discovery, pp. 400–410. doi: 10.1159/000279388.

- Mariappan, M. (2005) Molecular Characterization of pFGE , the Paralog of the C α -Formylglycine-generating Enzyme, *Dissertation University Bielefeld*.
- Mariappan, M. *et al.* (2008a) The non-catalytic N-terminal extension of formylglycine-generating enzyme is required for its biological activity and retention in the endoplasmic reticulum, *Journal of Biological Chemistry*, 283(17), pp. 11556–11564. doi: 10.1074/jbc.M707858200.
- Mariappan, M. *et al.* (2008b) ERp44 mediates a thiol-independent retention of formylglycine-generating enzyme in the endoplasmic reticulum, *Journal of Biological Chemistry*, 283(10), pp. 6375–6383. doi: 10.1074/jbc.M709171200.
- Marquardt, C. *et al.* (2003) Posttranslational modification of serine to formylglycine in bacterial sulfatases: Recognition of the modification motif by the iron-sulfur protein AtsB, *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), pp. 2212–2218. doi: 10.1074/jbc.M209435200.
- Marti, U. *et al.* (1991) Localization of epidermal growth factor receptor in hepatocyte nuclei, *Hepatology*, 13(1), pp. 15–20. doi: 10.1002/hep.1840130104.
- Martin-Killias, P. *et al.* (2011) A novel fusion toxin derived from an EpCAM-specific designed ankyrin repeat protein has potent antitumor activity, *Clinical Cancer Research*, 17(1), pp. 100–110. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1303.
- Martin, G. S. (2003) Cell signaling and cancer, *Cancer Cell*, 4(3), pp. 167–174. doi: 10.1016/S1535-6108(03)00216-2.
- Maruani, A. *et al.* (2016) Dual modification of biomolecules, *Organic and Biomolecular Chemistry*. Royal Society of Chemistry, 14(26), pp. 6165–6178. doi: 10.1039/c6ob01010e.
- Matsuda, Y. *et al.* (2019) Comparison of Analytical Methods for Antibody-Drug Conjugates Produced by Chemical Site-Specific Conjugation: First-Generation AJICAP, *Analytical Chemistry*, 91(20), pp. 12724–12732. doi: 10.1021/acs.analchem.9b02192.
- Mayer, S. und Lang, K. (2017) Tetrazines in Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Cycloadditions and Their Use in Biology, *Synthesis (Germany)*, 49(4), pp. 830–848. doi: 10.1055/s-0036-1588682.
- Maza, J. C. *et al.* (2015) Employing Unnatural Amino Acids in the Preparation of Bioconjugates, *Synlett*, 2016(27), pp. 805–813. doi: 10.1055/s-0035-1560551.
- Mazmanian, S. K. *et al.* (2001) Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*, *Molecular Microbiology*, 40(5), pp. 1049–1057. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02411.x.
- Meury M. *et al.* (2017) Structural Basis for Copper-Oxygen Mediated C–H Bond Activation by the Formylglycine-Generating Enzyme, *Angewandte Chemie*, 129(28), pp. 8227–8231. doi: 10.1002/ange.201702901.
- Miarzlou, D. A. *et al.* (2019) Structure of formylglycine-generating enzyme in complex with copper and a substrate reveals an acidic pocket for binding and activation of molecular oxygen, *Chemical Science*, 10(29), pp. 7049–7058. doi: 10.1039/c9sc01723b.
- Miech, C. *et al.* (1998) Arylsulfatase from *Klebsiella pneumoniae* carries a formylglycine generated from a serine, *Journal of Biological Chemistry*, 273(9), pp. 4835–4837. doi: 10.1074/jbc.273.9.4835.

- Milas, L. *et al.* (2003) Epidermal growth factor receptor and its inhibition in radiotherapy: In vivo findings, *International Journal of Radiation Biology*, 79(7), pp. 539–545. doi: 10.1080/0955300031000114747.
- Moggridge, J. *et al.* (2017) Sensitive Detection of Immunoglobulin G Stability Using in Real-Time Isothermal Differential Scanning Fluorimetry: Determinants of Protein Stability for Antibody-Based Therapeutics, *Technology in Cancer Research and Treatment*, 16(6), pp. 997–1005. doi: 10.1177/1533034617714149.
- Müller, E. *et al.* (2020) Evaluation of hydrophobic-interaction chromatography resins for purification of antibody-drug conjugates using a mimetic model with adjustable hydrophobicity, *Journal of Separation Science*, pp. 1–26. doi: 10.1002/jssc.201900895.
- Müller, K. M. *et al.* (1998) The first constant domain (C(H)1 and C(L)) of an antibody used as heterodimerization domain for bispecific miniantibodies, *FEBS Letters*, 422(2), pp. 259–264. doi: 10.1016/S0014-5793(98)00021-0.
- Munro, S. und Pelham, H. R. B. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins, *Cell*, 48(5), pp. 899–907. doi: 10.1016/0092-8674(87)90086-9.
- Murooka, Y. *et al.* (1990) A sulfur- and tyramine-regulated *Klebsiella aerogenes* operon containing the arylsulfatase (*atsA*) gene and the *atsB* gene, *Journal of Bacteriology*, 172(4), pp. 2131–2140. doi: 10.1128/jb.172.4.2131-2140.1990.
- Murthy, U. *et al.* (1987) Binding of an antagonistic monoclonal antibody to an intact and fragmented EGF-receptor polypeptide, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 252(2), pp. 549–560. doi: 10.1016/0003-9861(87)90062-2.
- NEB, N.E.B. NEBuilder HIFI DNA Assembly Kit. Available at: <https://www.neb-online.de/klonierung-synthetische-biologie/cloning-2-dna-assembly/nebuilder-dna-assembly/>.
- Niesen, J. *et al.* (2014) In vitro effects and ex vivo binding of an EGFR-specific immunotoxin on rhabdomyosarcoma cells, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(6), pp. 1049–1061. doi: 10.1007/s00432-014-1884-z
- Nilchan, N. *et al.* (2019) Dual-mechanistic antibody-drug conjugate via site-specific selenocysteine/cysteine conjugation, *Antibody Therapeutics*, 2(4), pp. 71–78. doi: 10.1093/abt/tbz009.
- Nozaki, Y. und Tanford, C. (1970) The Solubility of Amino Acids, Diglycine, and Triglycine in Aqueous Guanidine Hydrochloride Solutions, *Journal of Biological Chemistry*, 245(7), pp. 1648–1652.
- Nunes, J. P. M. *et al.* (2017) Use of a next generation maleimide in combination with THIOMAB™ antibody technology delivers a highly stable, potent and near homogeneous THIOMAB™ antibody-drug conjugate (TDC), *RSC Advances*, 7(40), pp. 24828–24832. doi: 10.1039/c7ra04606e.
- Oller-Salvia, B. *et al.* (2018) Rapid and Efficient Generation of Stable Antibody–Drug Conjugates via an Encoded Cyclopropene and an Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Reaction, *Angewandte Chemie - International Edition*, 57(11), pp. 2831–2834. doi: 10.1002/anie.201712370.
- Oroudjev, E. *et al.* (2010) Maytansinoid-antibody conjugates induce mitotic arrest by suppressing microtubule dynamic instability, *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(10), pp. 2700–2713. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0645.

- Ozer, I. und Chilkoti, A. (2017) Site-Specific and Stoichiometric Stealth Polymer Conjugates of Therapeutic Peptides and Proteins, *Bioconjugate Chemistry*, 28(3), pp. 713–723. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00652.
- Pang, Y. *et al.* (2016) A Modular Method for the High-Yield Synthesis of Site-Specific Protein–Polymer Therapeutics, *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(35), pp. 10296–10300. doi: 10.1002/anie.201604661.
- Parrozzani, R. *et al.* (2020) Corneal side effects induced by EGFR-inhibitor antibody–drug conjugate ABT-414 in patients with recurrent glioblastoma: a prospective clinical and confocal microscopy study, *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 12, pp. 1–9. doi: 10.1177/1758835920907543.
- Patterson, D. M. *et al.* (2014) Finding the right (bioorthogonal) chemistry, *ACS Chemical Biology*, 9(3), pp. 592–605. doi: 10.1021/cb400828a.
- Peng, J. *et al.* (2003) Identification of formylglycine in sulfatases by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 38(1), pp. 80–86. doi: 10.1002/jms.404.
- Peng, J. *et al.* (2015) Eukaryotic formylglycine-generating enzyme catalyses a monooxygenase type of reaction, *FEBS Journal*, 282(17), pp. 3262–3274. doi: 10.1111/febs.13347.
- Percival, S. S. und Layden-Patrice, M. (1992) HL-60 cells can be made copper deficient by incubating with tetraethylenepentamine, *Journal of Nutrition*, 122(12), pp. 2424–2429. doi: 10.1093/jn/122.12.2424.
- Pettit, G. R. *et al.* (1981) Marine animal biosynthetic constituents for cancer chemotherapy, *Journal of Natural Products*, 44(4), pp. 482–485. doi: 10.1021/np50016a016.
- Plückthun, A. (2015a) Designed ankyrin repeat proteins (DARPs): Binding proteins for research, diagnostics, and therapy, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 55, pp. 489–511. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654.
- Plückthun, A. (2015b) Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs): Binding Proteins for Research, Diagnostics, and Therapy, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 55(1), pp. 489–511. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654.
- Polishchuk, E. V. *et al.* (2014) Wilson Disease Protein ATP7B Utilizes Lysosomal Exocytosis to Maintain Copper Homeostasis, *Developmental Cell*. The Authors, 29(6), pp. 686–700. doi: 10.1016/j.devcel.2014.04.033.
- Polishchuk, E. V. *et al.* (2018) Activation of Autophagy, Observed in Liver Tissues From Patients With Wilson Disease and From ATP7B-Deficient Animals, Protects Hepatocytes From Copper-Induced Apoptosis, *J. Gastro.* doi: 10.1053/j.gastro.2018.11.032.
- Prenen, H. *et al.* (2009) PIK3CA mutations are not a major determinant of resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab in metastatic colorectal cancer, *Clinical Cancer Research*, 15(9), pp. 3184–3188. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2961.
- Press, M. F. und Lenz, H. J. (2007) EGFR, HER2 and VEGF pathways: Validated targets for cancer treatment, *Drugs*, 67(14), pp. 2045–2075. doi: 10.2165/00003495-200767140-00006.
- Preusser-Kunze, A. *et al.* (2005) Molecular characterization of the human C α -formylglycine-generating enzyme, *Journal of Biological Chemistry*, 280(15), pp. 14900–14910. doi: 10.1074/jbc.M413383200.

- Prohaska, J. R. (2008) Role of copper transporters in copper homeostasis, *American Journal of Clinical Nutrition*, 88(3), pp. 826–829. doi: 10.1093/ajcn/88.3.826s.
- Pulkkinen, P. *et al.* (2009) Poly(ethylene imine) and tetraethylenepentamine as protecting agents for metallic copper nanoparticles, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 1(2), pp. 519–525. doi: 10.1021/am800177d.
- Quinlan, R. J. *et al.* (2011) Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(37), pp. 15079–15084. doi: 10.1073/pnas.1105776108.
- Rabuka, D. *et al.* (2012) Site-specific chemical protein conjugation using genetically encoded aldehyde tags, *Nature Protocols*. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nprot.2012.045.
- Ramos, D. *et al.* (2016) Mechanism of copper uptake from blood plasma ceruloplasmin by mammalian cells, *PLoS ONE*, 11(3), pp. 1–23. doi: 10.1371/journal.pone.0149516.
- Rashidian, M. *et al.* (2012) Chemoenzymatic reversible immobilization and labeling of proteins without prior purification, *Journal of the American Chemical Society*, 134(20), pp. 8455–8467. doi: 10.1021/ja211308s.
- Ravasco, J. M. J. M. *et al.* (2019) Bioconjugation with Maleimides: A Useful Tool for Chemical Biology, *Chemistry - A European Journal*, 25(1), pp. 43–59. doi: 10.1002/chem.201803174.
- Reilley, C. N. und Vavoulis, A. (1959) Tetraethylenepentamine, a Selective Titrant for Metal Ions: Potentiometric End Point Detection, *Analytical Chemistry*, 31(2), pp. 243–248. doi: 10.1021/ac60146a026.
- Roeser, D. *et al.* (2005) De novo calcium/sulfur SAD phasing of the human formylglycine-generating enzyme using in-house data, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 61(8), pp. 1057–1066. doi: 10.1107/S09074444905013831.
- Rush, J. S. und Bertozzi, C. R. (2008) New aldehyde tag sequences identified by screening formylglycine generating enzymes in vitro and in vivo, *Journal of the American Chemical Society*, 130(37), pp. 12240–12241. doi: 10.1021/ja804530w.
- Rustandi, R. R. und Wang, Y. (2011) Use of CE-SDS gel for characterization of monoclonal antibody hinge region clipping due to copper and high pH stress, *Electrophoresis*, 32(21), pp. 3078–3084. doi: 10.1002/elps.201100186.
- Sadineni, V. *et al.* (2014) Implications of Trace Levels of Redox-Active Metals in Drug-Product Formulation. BiopHarm International, Protein, Volume 27, 4.
- Salomon, D. S. *et al.* (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies, *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, 19(3), pp. 183–232. doi: 10.1016/1040-8428(94)00144-I.
- Sapra, P. und Shor, B. (2013) Monoclonal antibody-based therapies in cancer: Advances and challenges, *Pharmacology and Therapeutics*. Pergamon, pp. 452–469. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.03.004.
- Schirmer, A. und Kolter, R. (1998) Computational analysis of bacterial sulfatases and their modifying enzymes, *Chemistry and Biology*, 5(8), pp. 181–186. doi: 10.1016/S1074-5521(98)90154-5.

- Schlessinger, J. und Lemmon, M. A. (2006) Nuclear Signaling by Receptor Tyrosine Kinases: The First Robin of Spring, *Cell*, 127(1), pp. 45–48. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.013.
- Schlotawa, L. *et al.* (2011) SUMF1 mutations affecting stability and activity of formylglycine generating enzyme predict clinical outcome in multiple sulfatase deficiency, *European Journal of Human Genetics*, 19(3), pp. 253–261. doi: 10.1038/ejhg.2010.219.
- Schlotawa, L. *et al.* (2018) Recognition and ER Quality Control of Misfolded Formylglycine-Generating Enzyme by Protein Disulfide Isomerase, *Cell Reports*. ElsevierCompany., 24(1), pp. 27-37.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.016.
- Schmidt, B. *et al.* (1995) A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency, *Cell*, 82(2), pp. 271–278. doi: 10.1016/0092-8674(95)90314-3.
- Schumacher, D. *et al.* (2015) Versatile and Efficient Site-Specific Protein Functionalization by Tubulin Tyrosine Ligase, *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(46), pp. 13787–13791. doi: 10.1002/anie.201505456.
- Schumacher, D. *et al.* (2016) Current Status: Site-Specific Antibody Drug Conjugates, *Journal of Clinical Immunology*, 36, pp. 100–107. doi: 10.1007/s10875-016-0265-6.
- Senter, P. D. und Sievers, E. L. (2012) The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma, *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 30(7), pp. 631–637. doi: 10.1038/nbt.2289.
- Seshacharyulu, P. *et al.* (2012) Expert Opinion on Therapeutic Targets Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy, 8222. doi: 10.1517/14728222.2011.648617.
- Simon, M., *et al.* (2013) Orthogonal assembly of a designed ankyrin repeat protein-cytotoxin conjugate with a clickable serum albumin module for half-life extension, *Bioconjugate Chemistry*, 24(11), pp. 1955–1966. doi: 10.1021/bc4004102.
- Simon, M. *et al.* (2014) Increasing the Antitumor Effect of an EpCAM-Targeting Fusion Toxin by Facile Click PEGylation, *Molecular Cancer Therapeutics*, pp. 375–386. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0523.
- Singh, M. *et al.* (2020) Effect of N-terminal poly histidine-tag on immunogenicity of Streptococcus pneumoniae surface protein SP0845. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 163, pp. 1240–1248. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.056>.
- Slamon, D. J. *et al.* (1989) HER-2/neu Proto-oncogene in.
- Smeulders, F. und Van de Geijn, S. C. (1983) In situ immobilization of heavy metals with tetraethylenepentamine (tetren) in natural soils and its effect on toxicity and plant growth, *Plant and Soil*, 70, pp. 59–61. doi: 10.1007/BF02374749.
- Smith, E. L. *et al.* (2014) Chemoenzymatic Fc glycosylation via engineered aldehyde tags, *Bioconjugate Chemistry*, 25(4), pp. 788–795. doi: 10.1021/bc500061s.
- Solomon, E. I. *et al.* (2014) Copper active sites in biology, *Chemical Reviews*, 114(7), pp. 3659–3853. doi: 10.1021/cr400327t.

- Spears, R. J. und Fascione, M. A. (2016) Site-selective incorporation and ligation of protein aldehydes, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 14(32), pp. 7622–7638. doi: 10.1039/c6ob00778c.
- Steiner, D. *et al.* (2008) Efficient Selection of DARPins with Sub-nanomolar Affinities using SRP Phage Display, *Journal of Molecular Biology*, 382(5), pp. 1211–1227. doi: 10.1016/j.jmb.2008.07.085.
- Steiner, M. und Neri, D. (2011) Antibody-Radionuclide Conjugates for Cancer Therapy: Historical Considerations and New Trends, 17(2), pp. 6406–6417. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0483.
- Stöckigt, J. *et al.* (2011) The pictet-spengler reaction in nature and in organic chemistry, *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(37), pp. 8538–8564. doi: 10.1002/anie.201008071.
- Sun, M. M. C. *et al.* (2005) Reduction-alkylation strategies for the modification of specific monoclonal antibody bisulfides, *Bioconjugate Chemistry*, 16(5), pp. 1282–1290. doi: 10.1021/bc050201y.
- Szameit, C. *et al.* (1999) The iron sulfur protein AtsB is required for posttranslational formation of formylglycine in the Klebsiella sulfatase, *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), pp. 15375–15381. doi: 10.1074/jbc.274.22.15375.
- Takai, T. (2005) Fc Receptors and Their Role in Immune Regulation and Autoimmunity, *Journal of Clinical Immunology*, 25(1). doi: 10.1007/s10875-005-0353-5.
- Trill, J. J. *et al.* (1995) Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells, *Current Opinion in Biotechnology*, 6(5), pp. 553–560. doi: 10.1016/0958-1669(95)80092-1.
- Tsumoto, K. *et al.* (2004) Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification, *Biotechnology Progress*, 20(5), pp. 1301–1308. doi: 10.1021/bp0498793.
- Tuley, A. *et al.* (2014) A genetically encoded aldehyde for rapid protein labelling, *Chemical Communications*, 50(56), pp. 7424–7426. doi: 10.1039/c4cc02000f.
- Uchimura, K. *et al.* (2006) HSulf-2, an extracellular endoglucosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokines: Effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1, *BMC Biochemistry*, 7, pp. 1–13. doi: 10.1186/1471-2091-7-2.
- Ulrich, S. *et al.* (2014) Oxime Ligation: A Chemoselective Click-Type Reaction for Accessing Multifunctional Biomolecular Constructs, pp. 34–41. doi: 10.1002/chem.201302426.
- Verma, S. *et al.* (2012) Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer, *New England Journal of Medicine*, 367(19), pp. 1783–1791. doi: 10.1056/NEJMoa1209124.
- Vivanco, I. und Sawyers, C. L. (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in humancancer, *Nature Reviews Cancer*, 2(7), pp. 489–501. doi: 10.1038/nrc839.
- Vlasak, J. und Ionescu, R. (2011) Fragmentation of monoclonal antibodies, *mAbs*, 3(3), pp. 253–263. doi: 10.4161/mabs.3.3.15608.
- Voskoboinik, I. *et al.* (1999) Functional analysis of the N-terminal CXXC metal-binding motifs in the human Menkes copper-transporting P-type ATPase expressed in cultured mammalian cells, *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), pp. 22008–22012. doi: 10.1074/jbc.274.31.22008.

- Walker, J. A. *et al.* (2019) Hydrophilic Sequence-Defined Cross-Linkers for Antibody-Drug Conjugates, *Bioconjugate Chemistry*, 30(11), pp. 2982–2988. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00713.
- Wang, L. *et al.* (2001) Expanding the genetic code of *Escherichia coli* with phosphotyrosine, *FEBS Letters*, 292, pp. 3040–3047. doi: 10.1002/1873-3468.12333.
- Wang, L. *et al.* (2003) Addition of the keto functional group to the genetic code of *Escherichia coli*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(1), pp. 56–61. doi: 10.1073/pnas.0234824100.
- Wernimont, A. K. *et al.* (2000) Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes/Wilson disease proteins, *Nature Structural Biology*, 7(9), pp. 766–771. doi: 10.1038/78999.
- Willner, D. *et al.* (1993) (6-Maleimidocaproyl)hydrazone of Doxorubicin—A New Derivative for the Preparation of Immunoconjugates of Doxorubicin, *Bioconjugate Chemistry*, 4(6), pp. 521–527. doi: 10.1021/bc00024a015.
- Wilmot, C. M. *et al.* (1999) Visualization of dioxygen bound to copper during enzyme catalysis, *Chemtracts*, 286(5), pp. 1724–1728.
- Wollschlaeger, C. *et al.* (2018) Simultaneous and Independent Dual Site-Specific Self-Labeling of Recombinant Antibodies, *Bioconjugate Chemistry*, 29(11), pp. 3586–3594. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00545.
- Woycechowsky, K. J. und Raines, R. T. (2003) The CXC motif: A functional mimic of protein disulfide isomerase, *Biochemistry*, 42(18), pp. 5387–5394. doi: 10.1021/bi026993q.
- Wu, A. M. und Senter, P. D. (2005) Arming antibodies: Prospects and challenges for immunoconjugates, *Nature Biotechnology*, 23(9), pp. 1137–1146. doi: 10.1038/nbt1141.
- Wu, P. *et al.* (2009) Site-specific chemical modification of recombinant proteins produced in mammalian cells by using the genetically encoded aldehyde tag, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), pp. 3000–3005. doi: 10.1073/pnas.0807820106.
- Wuhrer, M. *et al.* (2007) Glycosylation profiling of immunoglobulin G (IgG) subclasses from human serum, *Proteomics*, 7(22), pp. 4070–4081. doi: 10.1002/pmic.200700289.
- Yaghoubi, S. *et al.* (2020) Potential drugs used in the antibody–drug conjugate (ADC) architecture for cancer therapy, *Journal of Cellular Physiology*, 235(1), pp. 31–64. doi: 10.1002/jcp.28967.
- Yarden, Y. (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer: Signalling mechanisms and therapeutic opportunities, *European Journal of Cancer*. Elsevier Ltd, 37(SUPPL. 4), pp. 3–8. doi: 10.1016/s0959-8049(01)00230-1.
- Yarden, Y. und Kelman, Z. (1991) Transmembrane signalling receptors for cytokines and growth factors, *Current Opinion in Structural Biology*, 1(4), pp. 582–589. doi: 10.1016/S0959-440X(05)80081-8.
- York, D. *et al.* (2016) Generating aldehyde-tagged antibodies with high titers and high formylglycine yields by supplementing culture media with copper(II), *BMC Biotechnology*. BioMed Central Ltd., 16(1), p. 23. doi: 10.1186/s12896-016-0254-0.

- Yu, H. A. *et al.* (2013) Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR -Mutant Lung Cancers, *19*(13), pp. 2240–2248. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2246.
- Zang, M. *et al.* (1995) Production of Recombinant Proteins in Chinese Hamster Ovary Cells Using A Protein-Free Cell Culture Medium, *13*(April), pp. 2–5. doi: 10.1038/nbt0495-389.
- Zemella, A. *et al.* (2018) Cell-free protein synthesis as a novel tool for directed glycoengineering of active erythropoietin, *Scientific Reports*, *8*(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-018-26936-x.
- Zhang, C. *et al.* (2016) π -Clamp-mediated cysteine conjugation, *Nature Chemistry*. Nature Publishing Group, *8*(2), pp. 120–128. doi: 10.1038/nchem.2413.
- Zhang, D. *et al.* (2018) Immobilization of p-Aminobenzyl Ether Linker and Payload Potency and Stability Determine the Cell-Killing Activity of Antibody-Drug Conjugates with Phenol-Containing Payloads, *Bioconjugate Chemistry*, *29*(2), pp. 267–274. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00576.
- Zhang, S. *et al.* (2018) Total Synthesis and Conformational Study of Callyaerin A: Anti-Tubercular Cyclic Peptide Bearing a Rare Rigidifying (Z)-2,3- Diaminoacrylamide Moiety, *Angewandte Chemie - International Edition*, *57*(14), pp. 3631–3635. doi: 10.1002/anie.201712792.
- Zhao, P. *et al.* (2020) Recent advances of antibody drug conjugates for clinical applications, *Acta Pharmaceutica Sinica B*. Elsevier Ltd, *10*(9), pp. 1589-1600. doi: 10.1016/j.apsb.2020.04.012.
- Zito, E. *et al.* (2005) Sulphatase activities are regulated by the interaction of sulphatase-modifying factor 1 with SUMF2, *EMBO Reports*, *6*(7), pp. 655–660. doi: 10.1038/sj.embor.7400454.
- Zito, E. *et al.* (2007) Sulfatase modifying factor 1 trafficking through the cells: From endoplasmic reticulum to the endoplasmic reticulum, *EMBO Journal*, *26*(10), pp. 2443–2453. doi: 10.1038/sj.emboj.7601695.

8 Anhang

8.1 weitere Abbildungen

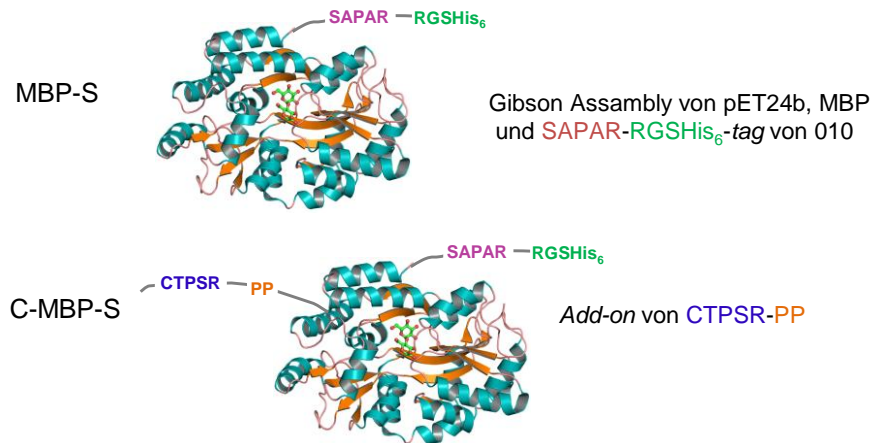


Abb. 43: MBP-Konstrukte. Das Maltose-bindende Protein (MBP) wurde in einer mehrstufigen Klonierung zunächst C-terminal mit einem SAPAR-Motiv und einem RGSHis₆-tag ausgestattet (MBP-S). Dazu wurde eine Gibson Assemblierung folgender Sequenzen durchgeführt: Vektor pET24b, MBP-Gensequenz aus pMAL-c5x_MBP samt Poly-N-*Spacer* und SAPAR-Motiv samt His₆-Affinitäts-tag von DARPin 010. Darüber hinaus wurde N-terminal eine FGE-Erkennungssequenz und eine PreScission-Protease-Spaltstelle (PP) angefügt (C-MBP-S). Dies geschah mittels *add-on*-PCR (siehe Kapitel 8.5).

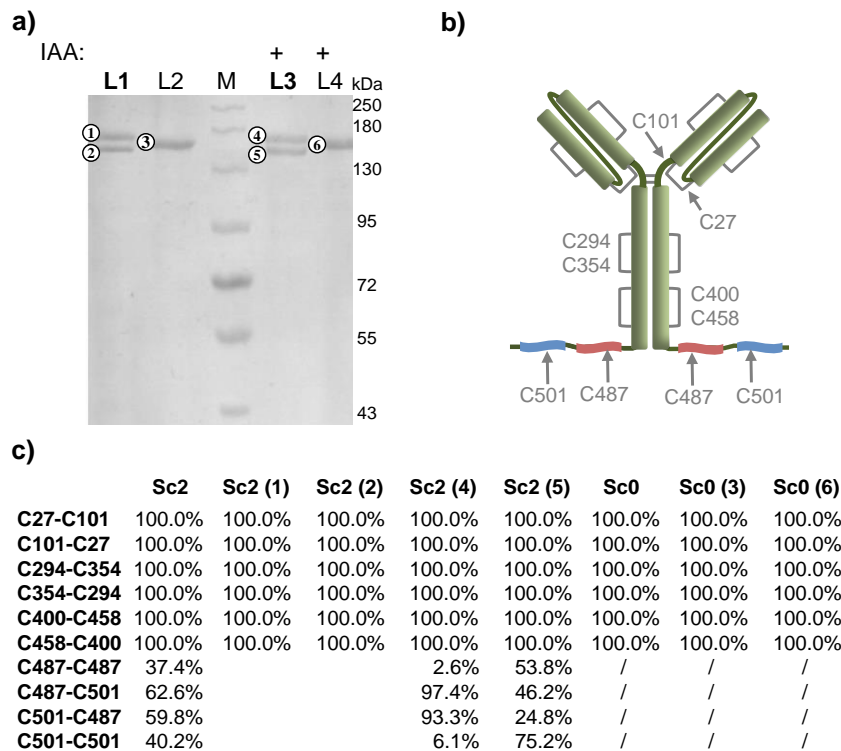


Abb. 44: Disulfidanalyse des ungetaggten (Sc0) und dual getaggten (Sc2) single-chain Antikörpers scFv425-Fc. a) Nicht-reduzierende SDS-PAGE (8,5%) des Sc2-Proteins (L1 und L3) und des Sc0-Proteins ohne Aldehyd-tag (L2 und L4). Sc0 zeigt nur eine Bande (3) bei über 130 kDa, die dem Dimer entspricht ($M_{w,calc}=108,36$ kDa). Sc2 dagegen zeigt eine Doppelbande, die leicht über (1) und leicht unter (2) der Bande des Sc0-Dimers liegen ($M_{w,calc}=110,92$ kDa) (Vgl. **Abb. 39 B**). Die Dimeren Antikörper wurden zusätzlich mit 50 mM IAA behandelt (L3-4), um den Redoxstatus zu analysieren. Hierbei konnte keine veränderte elektrophoretische Mobilität verzeichnet werden. **b)** Übersicht über die inter- und intramolekularen Disulfidbrücken des scFv425-Fcs. Bei einem dual Aldehyd-getaggten Sc2 wird die Antikörpersequenz C-terminal um jeweils zwei Cysteine pro Kette (C487 und C501) erweitert. **c)** Massenspektrometrische Disulfidanalyse des Sc0s und Sc2s. Die Proteine wurden in Lösung (Sc2; Sc0) oder aus dem unter a) gezeigten Gel ((1)-(6)) extrahiert und vermessen. Die Banden wurden mit Methanol und Acetonitril entfärbt, getrocknet und bei 4 °C für 30 min und anschließend über Nacht bei 37 °C mit einer Mischung aus Trypsin und LysC in Tris-Puffer verdaut. Proteine in Lösung wurden in Tris-Puffer analog verdaut. Anschließend wurden die Peptide mittels Acetonitril-Ameisensäure-Extraktion aus dem Gel gelöst bzw. vom Puffer getrennt und für die HPLC *reversed phase* Chromatographie eingesetzt. LC-ESI-MS- und MS/MS-Messungen ergaben sowohl bei Sc0 als auch bei Sc2 vollständig oxidierte intramolekulare Disulfide (C27-C101; C294-C354; C400-C458). Die einzigen Unterschiede wurden in den C-terminalen Cysteinen der *tags* festgestellt. Die prozentualen Häufigkeiten der gefundenen inter- und intramolekularen Disulfidverbrückungen zwischen C487 und C501 zeigen deutlich, dass mit IAA-Fixierung (Sc2(4)-(5); Sc0(6)) dieselben Tendenzen verzeichnet werden konnten wie ohne Fixierung (Sc2(1)-(2); Sc0(3)). In der oberen der beiden Gelbanden aus a) (1 und 4) liegen vorwiegend C487-C501-Verbrückungen vor (wahrscheinlich intramolekular). In der unteren Gelbande (2 und 5) hingegen wurde eine Mischung aus Disulfiden der Form C487-C501 und C487-C487 bzw. C501-C501 mit größerer Tendenz zu intermolekularen Disulfiden detektiert. Dadurch wurden eine kompaktere Form und ein schnelleres Laufverhalten im Gel erreicht. Freies Sc2 in Lösung zeigt ebenfalls eine Mischung aus inter- und intramolekularen Disulfidbrücken des C-terminalen *tags*, wobei hier das Verhältnis umgedreht ist. Diese Daten wurden mit Hilfe von Lennard Karsten, Sarfaraz Alam und Biofidus ermittelt und stammen aus den *Supporting Information* vom unveröffentlichten Manuskript Boschanski *et al.*

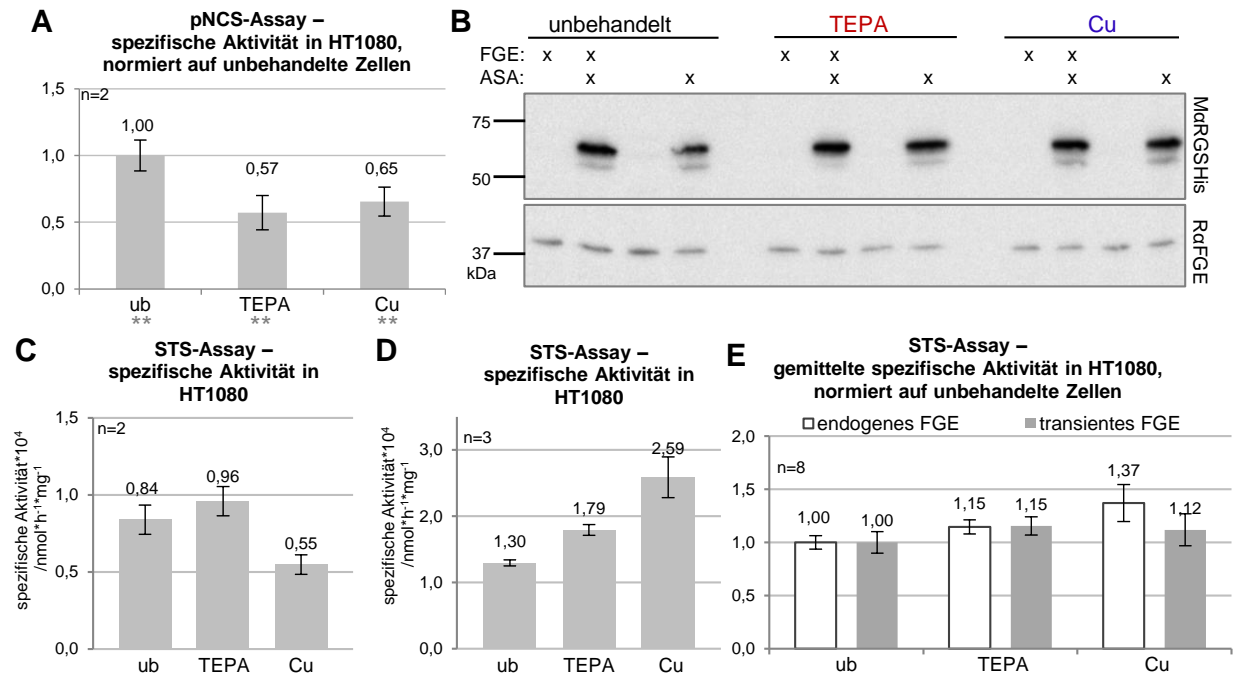


Abb. 45: Einfluss von Kupfer und TEPA in HT1080-Zellen. **A)** pNCS-Assay der HT1080-Zellen mit transienter hFGE- und ASA-Expression unter der Zugabe von Cu (50 μ M CuSO₄) oder TEPA (50 μ M). Die Aktivität wurde auf unbehandelte (ub) Zellen normiert und zeigt eine signifikante Repression durch TEPA (43%) als auch durch Cu (35%). **B)** Western Blots von Zelllysaten der unbehandelten, mit Kupfer (Cu) und mit TEPA behandelten HT1080-Zellen aus A), transient transfiziert mit ASA-RGSHis₆ und hFGE-HA. Die Detektion geschah mittels MαRGSHis- und GαM-HRP- bzw. RαFGE- und GαR-HRP-Antikörpern. In **C)** und **D)** sind Beispiele für ermittelte Daten im STS-Assay der HT1080-Zellen mit transienter hFGE- und STS-Expression unter der Zugabe von Cu (50 μ M CuSO₄) oder TEPA (50 μ M) gegeben. In **C)** konnte keine signifikante Erhöhung der Aktivität durch TEPA aber eine signifikante Repression durch Cu (ca. 34%) ermittelt werden, wohingegen bei **D)** die Zugabe von TEPA zu einer Aktivitätssteigerung um ca. 37% und die Behandlung mit Kupfer zu einer Verdoppelung der Aktivität geführt hatte. **E)** Gemittelte spezifische Aktivität im STS-Assay in HT1080-Zellen mit transienter hFGE- und STS-Expression unter der Zugabe von Cu (50 μ M CuSO₄) oder TEPA (50 μ M). Durch die Mittelung der STS-Assays (z.B. aus C) und D) wurde mit einem Stichprobenumfang von acht keine Signifikante Veränderung errechnet werden. Die Aktivität wurde jeweils auf unbehandelte (ub) Zellen normiert. Signifikanz *p<5%; **p<1%; ***p<0,1%; n=Stichprobe; Fehlerbalken: Standardabweichung.

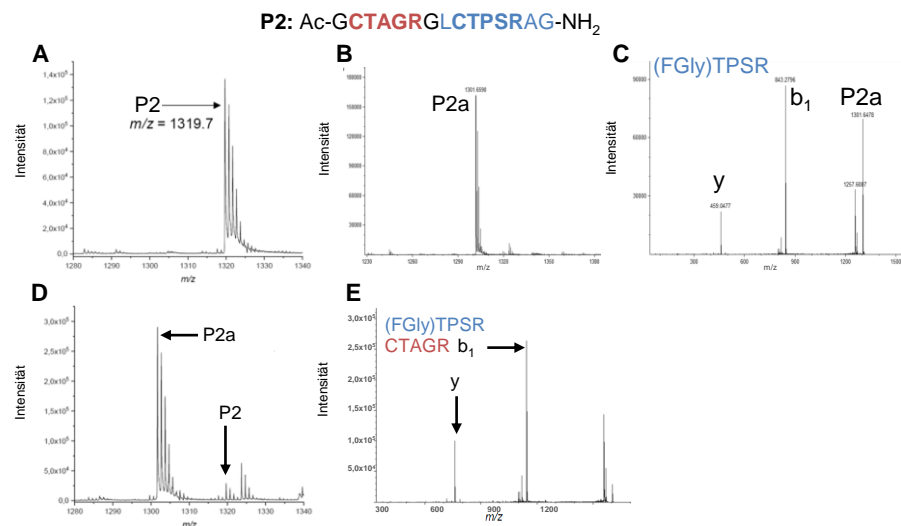


Abb. 46: Konversionen des Peptids P2. **A)** Referenzspektrum des Peptids P2 (m/z Ac-GCTAGRLCTPSRAG-NH₂ = 1319,6). **B)** Konversion von P2 durch hFGE erzeugt die mittels MS/MS-Analyse **(C)** nachgewiesene einfache (FGly)TPSR-Spezies (m/z P2a = 1301,6). **D)** In Anwesenheit von Kupfer konvertiert MtFGE das Peptid P2 ebenfalls zur einfach FGly-tragenden Spezies P2a. Das CTAGR-Motiv wurde nicht konvertiert. **E)** Die einfache Konversion des CTPSR-Motives von P2a aus D) wurde mittels MS/MS-Fragmentierungen nachgewiesen.

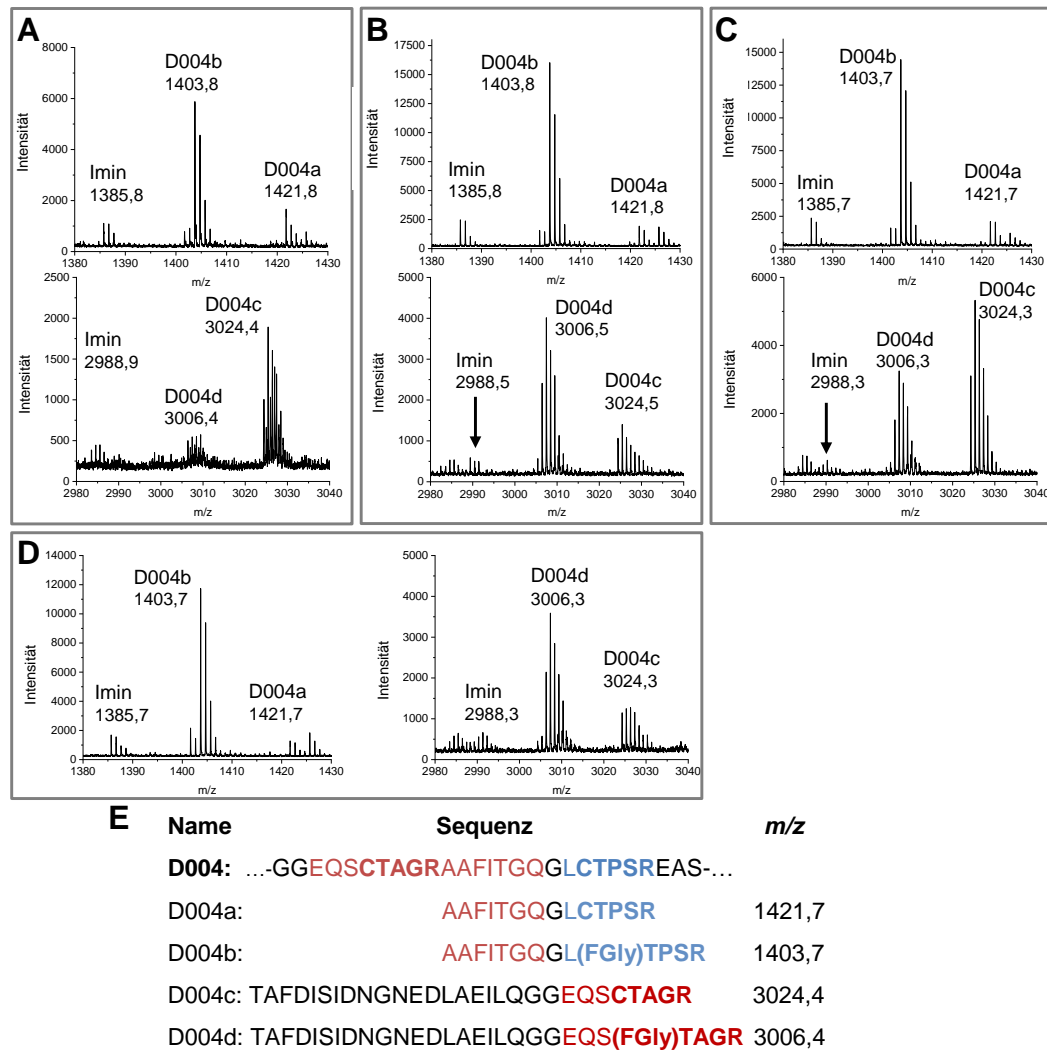


Abb. 47: Analyse der Substratspezifität des Enzyms ScFGE mit und ohne Kupferzugabe anhand des DARPins 004. A) D004 mit ScFGE. B) D004 mit ScFGE und 12,5 μM CuSO_4 . C) D004 mit ScFGE_{rek}. D) D004 mit ScFGE_{rek} und 12,5 μM CuSO_4 . In Allen Spektren wurden den MALDI-ToF-MS-Signalen der tryptisch verdauten Proteine die möglichen Spezies (P3a-c) und die detektierten m/z-Werte zugeordnet. E) Übersicht über den Aldehydtag des DARPins 004 und der im MALDI-ToF-MS zu erwartenden Masse-Ladungs-Verhältnisse (m/z) der tryptischen Peptide. Die Zugabe von Kupfer zur Reaktionslösung bzw. die Rekonstitution des Enzyms ScFGE mit dem Kofaktor Kupfer erhöht die Aktivität und verringert die Substratspezifität für das Motiv CTAGR. Die Daten stammen aus den *Supporting Information* des unveröffentlichten Manuskripts Boschanski *et al.*.

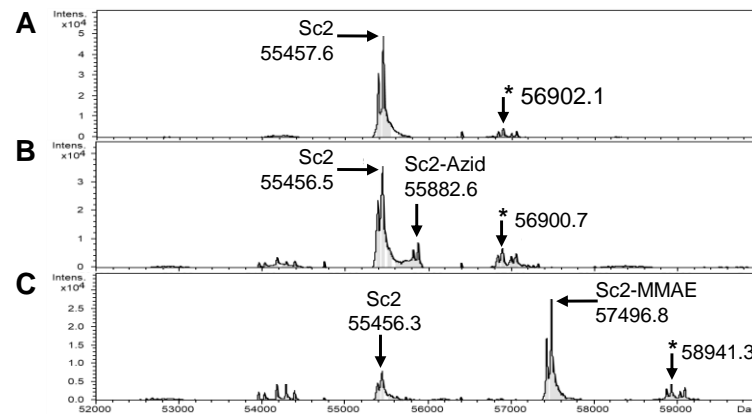


Abb. 48: ESI-MS-Spektren des *single-chain* Antikörpers Sc2, des Sc2-Azid-Intermediates und des Sc2-MMAE-Einfachkonjugates. Die Proteine wurden mittels PNGase F deglycosyliert mit 5 mM TCEP reduziert und per LC-ESI-MS analysiert. Die mit dem * markierten Signale entsprechen restlichem, noch glykosyliertem Antikörper. **A)** Die detektierte Masse von 55457,6 Da entspricht dem Molekulargewicht des unkonjugierten Sc2-Monomers ($M_{w,calc} = 55,46$ kDa). Die zu einem geringen Teil noch intakte Glykosylierung erzeugt ein Signal bei ca. 56902,1 Da (*). Die Massendifferenz von 1444,5 Da passt zu einer G0F-Glykosylierung, die häufig bei humanen, rekombinant in CHO-Zellen hergestellten Antikörpern vom IgG1-Typ detektiert wird. **B)** Der Sc2 wurde mittels hFGE umgesetzt und das (FGly)TPSR-Motiv mit einem HIPS-Azid konjugiert. Das entsprechende Signal des Sc2-Azids ist bei 55882,6 Da detektiert worden. Die Massendifferenz zum unkonjugierten Protein entspricht ca. 426 Da. **C)** Das Sc2-Azid aus B) wurde mittels DBCO-MMAE in einer Click-Reaktion derivatisiert. Das resultierende Sc2-MMAE ist bei 57496,8 Da per LC-ESI-ToF-MS verifiziert worden. Die Massendifferenz von insgesamt 2040,5 Da weicht um 0,05 % von der errechneten Verschiebung von 2039,5 Da ab. Die Daten wurden mit Hilfe von Biofidus erhoben und stammen aus dem unveröffentlichten Manuskript Boschanski *et al.*.

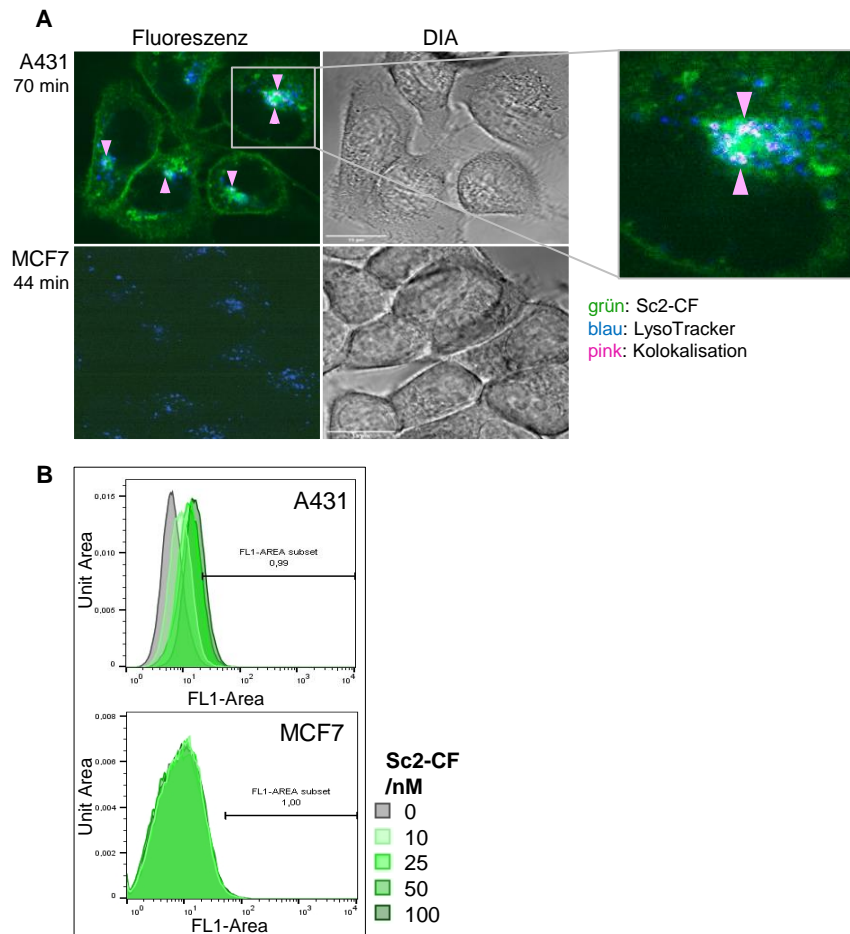


Abb. 49: Live Cell Imaging und Flow Cytometry des Sc2-CFs. **A)** LCI auf EGFR-positiven A431- und EGFR-negativen MCF7-Zellen. Die Zellen wurden bei 37 °C in *chamber slides* kultiviert. Das Carboxyfluorescein-gekoppelte Sc2 (100 nM Dimer) wurde für 10 min auf die Zellen gegeben und anschließend der ungebundene Antikörper durch PBS gewaschen. Die Lysosomen wurden durch *LysoTracker Blue DND-22* (150 nM; 15 min) angefärbt. Nach dem Waschen wurden die Zellen im Durchlichtmodus (DIA) und die Fluoreszenzen des Sc2-CFs (grün) und des *LysoTrackers* (blau) für bis zu 70 min detektiert. Überlagerungen der beiden Fluoreszenzkanäle wurden in rosa dargestellt. Die Maßstabsleiste entspricht 15 µm. Auf den Zelloberflächen der A431-Zellen wurde eine deutliche, Sc2-CF-abhängige Fluoreszenz detektiert. Zudem konnten intrazelluläre Signale in einer Kolokalisation mit dem Lysosomenmarker nachgewiesen werden, die auf eine erfolgreiche Internalisierung des Sc2-Konjugates hindeuten. Bei der Negativkontrolle wurde aufgrund der fehlenden EGFR-Präsentation auf der Zelloberfläche keine Sc2-CF-Fluoreszenz detektiert. **B)** Die Zellen A431 und MCF7 wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0-100 nM Dimer) an Sc2-CF-Konjugat inkubiert, mit PBS gewaschen und mittels FC analysiert. In dem Fluoreszenzsignal der A431-Zellsuspension wurde eine deutliche Verschiebung der mittleren Fluoreszenz mit steigender Sc2-CF-Konzentration detektiert werden, was auf die Bindung des Konjugats an die Zelloberflächen hindeutet. Bei der MCF7-Zelllinie wurde kein entsprechender Effekt beobachtet. Die Daten wurden mit Hilfe von Lennard Karsten erhoben und stammen aus dem unveröffentlichten Manuskript Boschanski *et al.*.

8.2 Abkürzungen

Tab. 34: Abkürzungsverzeichnis. Abkürzungen mit Ausnahme von Chemikaliennamen (siehe dazu Kapitel 3.3).

Abb.	Abbildung	ERGIC-53	<i>ER-Golgi intermediate compartment protein 53</i>
ADC	<i>antibody drug conjugate</i>	ERp44	<i>ER-resident protein 44</i>
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>	ET	Elektronentransfer
AG	Arbeitsgruppe	<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: und andere)
AGT	O ⁶ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase	Fc	<i>crystallizable fragment</i>
AK	Antikörper	FC	<i>Flow Cytometry</i>
Amp	Ampicillin	FGE	Formylglycin-generierendes Enzym
anSME	anaerobes Sulfatase-modifizierendes Enzym	FKS	fetales Kälberserum
AS	Aminosäure	fl	<i>full-length</i>
ASA	Arylsulfatase A	FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
ASC	Arylsulfatase C; STS	Fuc	Fucose
Atox1	Antioxidant 1	Fv	variables Fragment
ATP	Adenosyltriphosphat	HAT	<i>Hydrogen atom transfer</i>
ATP7A	P-Typ ATPase 7A	hc	<i>heavy chain</i>
ATP7B	P-Typ ATPase 7B	G0/1/2 F	Glykosylierung mit 0/1/2 Galactosen und einer Fucose
Az	Azid	GM130	Golgi-Membranprotein 130
β-Gal	β-Galactosidase	GlcNAc	N-Acetylglucosamin
BCS	Bathocuproindisulfonat	GSH	Glutathion
ca.	circa	HEK	<i>human embryonic kidney cells</i>
CCA	C50A/C52A-Mutante des hFGEs	HER1-4	humaner EGFR 1-4
CD	<i>Circular dichroism</i>	hFGE	humanes FGE
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i>	HIPS	Hydrazino-iso-Pictet-Spengler
CF	Carboxyfluorescein	HRP	<i>horse raddish peroxidase</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>	Hyg	Hygromycin
Cm	Chloramphenicol	IC ₅₀	<i>Inhibitory concentration 50</i>
COX	Cytochrom c Oxidase	IgG1	Immunglobulin G1
Ct	C-terminal	JAK	Januskinase
Cu	Kupfer (verwendet als 50 μM CuSO ₄)	Kan	Kanamycin
CuAO	Kupfer-Amin-Oxidase	KO	<i>knock out</i>
CypK	Cyclopropen-Aminosäure	KPAtsA	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Arylsulfatase
ΔFGE	trunkiertes FGE	KPAtsB	anSME von <i>Klebsiella pneumoniae</i>
D00X	DARPin Nr. 00X	lac	Laktose-Operator
DAR	<i>drug-to-antibody ratio</i>	LB	<i>Lysogeny broth</i>
DARPin	<i>Designed ankyrin repeat protein</i>	lc	<i>light chain</i>
DBCO	Dibenzocyclooctin	LCI	<i>Live cell imaging</i>
DIA	Durchlichtbild	mAK	monoklonaler Antikörper
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
DNA	Desoxyribonucleinsäure	MBP	Maltose-bindendes Protein
dNTPs	desoxy-Ribonucleintrisphosphate	MCS	<i>multiple cloning site</i>
DSF	<i>differential scanning fluorimetry</i>	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>	MMAE	Monomethylauristatin E
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>	MMAtsB	anSME von <i>Methanosarcina Mazei</i>
eGFP	<i>enhanced green-fluorescence protein</i>	MSD	Multiple Sulfatase Defizienz
EGFR	EGF-Rezeptor	MsFGE	<i>Mycobacterium smegmatis</i> FGE
ER	Endoplasmatisches Retikulum	NIR	nahes Infrarot

Fortsetzung Tab. 34: Abkürzungsverzeichnis.

NK	Natürliche Killerzelle	scFv	<i>single-chain variable fragment</i>
Nt	N-terminal	SH2	Src Homologie 2
NTD	N-terminale Domäne	SOD	Cu/Zn-Superoxiddismutase
o/n	<i>overnight</i>	SP	Signalpeptid
OD600	optische Dichte bei 600 nm	SPAAC	<i>strain-promoted azide-alkyne cycloaddition</i>
P2, P3	Peptid 2 oder 3	SrtA	<i>Staphylococcus aureus</i> Sortase A
PAB	<i>para</i> -Aminobenzyl linker	STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>	Std	Standard
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	STS	Steroidsulfatase; ASC
PDI	Proteindisulfidisomerase	sumf1	Gen: Sulfatase-modifizierender Faktor 1
PEG	Polyethylenglycol	sumf2	Gen: Sulfatase-modifizierender Faktor 2
PEI	Polyethylenimin	Tab.	Tabelle
pFGE	Paralog-FGE	TcFGE	<i>Thermomonospora curvata</i> FGE
pH	dekadischen Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität	TETA	Tetraethyltetramin
pI	Isoelektrischer Punkt	Tetren	Tetraethylenpentamin; TEPA
PI3K	Phosphoinosityl-3-Kinase	TGF- α	<i>transforming growth factor α</i>
pNCS	<i>para</i> -Nitrocatecholsulfat	TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F	TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
PVDF	Polyvinylidenfluorid	tRNA	<i>transfer</i> RNA
rek	rekonstituiert	Trx	Thioredoxin
RNA	Ribonucleinsäure	TTL	Tubulin-Tyrosin-Ligase
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>	AUS	Unnatürliche Aminosäure
RRA	R69A/R72A-Mutante des hFGEs	ut	untransfiziert
RT	Raumtemperatur	VC	Valin-Citrullin Dipeptid
SAM	S-Adenosylmethionin	VHH	<i>variable heavy-chain only domain</i>
Sc0,	scFv425-Fc ohne, mit einem oder mit	WT	Wildtyp
Sc1,	zwei Aldehyd-tags		
Sc2			
scAK	<i>single-chain</i> Antikörper	Xgal	synthetisches Substrat für β -Galactosidase
ScFGE	<i>Streptomyces coelicolor</i> FGE		

Tab. 35: Aminosäureverzeichnis.

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T

Fortsetzung Tab. 35: Aminosäureverzeichnis.

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
Citrullin	Cit	
Formylglycin	FGly	

8.3 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Geräte und Laborausstattungen	32
Tab. 2: Verwendete Laborverbrauchsmaterialien	35
Tab. 3: Chemikalien und Reagenzien.....	36
Tab. 4: Verwendete Kits samt Verwendungs- und Herstellerangaben	38
Tab. 5: Verwendete Antikörper.....	38
Tab. 6: Verwendete Enzyme und deren zugehörige Puffersysteme.....	39
Tab. 7: Verwendete Antibiotika und Nährmedienzusätze.....	39
Tab. 8: Größenstandards für DNA- und Protein-Gelelektrophoresen.....	40
Tab. 9: Standards für MALDI-ToF-MS-Messungen	40
Tab. 10: Verwendete Nährmedien	40
Tab. 11: Verwendete Puffer und Lösungen.....	41
Tab. 12: Verwendete Bakterienstämme	43
Tab. 13: Säugerzelllinien.....	44
Tab. 14: Vektoren zur pro- und eukaryotischen Genexpression	46
Tab. 15: Klonierungsprimer	47
Tab. 16: Sequenzierungsprimer.....	48
Tab. 17: Verwendete Software und Internetanwendungen	48
Tab. 18: PCR-Ansätze für Q5- und Taq-Polymerase sowie der KAPA HiFi <i>Ready Mix</i>	53
Tab. 19: PCR-Programme für Q5, Taq oder KAPA	53
Tab. 20: Zusammensetzung des Mastermix pro Reaktion einer <i>Colony-PCR</i>	57
Tab. 21: PCR-Programm der <i>Colony-PCR</i>	57
Tab. 22: Standardsubstanzen für die Größenausschlusschromatographie.	85
Tab. 23: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele	89
Tab. 24: Saurer DSF-Puffer- <i>Screen</i>	97
Tab. 25: Basischer DSF-Puffer- <i>Screen</i>	97
Tab. 26: Kupfer-Arginin-DSF- <i>Screen</i>	98
Tab. 27: Lagerpuffer.	99

Tab. 28: Gegenüberstellung der durchschnittlichen, prozentualen Umsätze in <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Ansätzen	121
Tab. 29: Puffer-Screen für die <i>single-chain</i> Antikörper.	129
Tab. 30: Tryptische Fragmente der Proteine Sc1 und Sc2.	140
Tab. 31: FGly-Umsätze der <i>single-chain</i> Konstrukte mittels <i>in vivo</i> -Konversion durch hFGE.	140
Tab. 32: Umsätze der bakteriellen Enzyme MtFGE und ScFGE am Peptid P3.	166
Tab. 33: Umsätze der bakteriellen Enzyme MtFGE und ScFGE am DARPin 004	166
Tab. 34: Abkürzungsverzeichnis	217
Tab. 35: Aminosäureverzeichnis	218
Abb. 1: Der humane EGFR.	15
Abb. 2: Zyklus des EGF-Rezeptors.....	17
Abb. 3: Effekt EGFR-abhängiger Tumorzellen auf umliegende Zellen.	18
Abb. 4: ADC-Wirkprinzip.....	19
Abb. 5: DARPin und <i>single-chain</i> Antikörper.	20
Abb. 6: Beispiele für Proteinkonjugationsmethoden.	22
Abb. 7: Alternative Aldehyd-Inkorporation in Proteine.	23
Abb. 8: Aldehyd-spezifische Ligationschemie.	24
Abb. 9: Schema der Reaktionen von FGE und AtsB.	26
Abb. 10: Konjugationsstrategien mit AtsB und FGE.....	27
Abb. 11: Postulierter Cu-Katalysemechanismus des FGEs.	29
Abb. 12: Konzept einer dualen FGly-Konjugationsstrategie.	30
Abb. 13: Schema der Mutagenesestrategien.	54
Abb. 14: Schema des <i>NEBuilder Assemblys</i> von <i>New England Biolabs</i>	56
Abb. 15: Modellprotein-Bibliothek.....	112
Abb. 16: Klonierung der DARPin-Bibliothek.....	113
Abb. 17: Expression und Aufreinigung der DARPins.	116
Abb. 18: Postulierter FGly-Spaltmechanismus.....	117
Abb. 19: Die Konstrukte des <i>single-chain</i> Antikörpers scFv425-Fc.	125
Abb. 20: <i>Heatmaps</i> der DSF-Puffer-Screens des <i>single-chain</i> Antikörpers.....	130
Abb. 21: Varianten des humanen FGEs.	135
Abb. 22: Die hFGE-eGFP-Fusionsproteine.	137
Abb. 23: MALDI-ToF-MS-Spektren der <i>in vivo</i> -Antikörperkonversionen.....	139
Abb. 24: STS-Aktivität der hFGE-Varianten.....	142
Abb. 25: pNCS-Aktivität der hFGE-Varianten.....	144

Abb. 26: Behandlung von Säugerzellen mit Kupfer und dem Kupfer-Chelator TEPA.	148
Abb. 27: Einfluss von Kupfer und TEPA in MSDi-Zellen.	151
Abb. 28: Einfluss von Kupfer und TEPA in ARPE19-Zellen.	152
Abb. 29: Einfluss von Kupfer und TEPA in Hepatozyten.	154
Abb. 30: Aktivitätsassays der hFGE-Varianten in Anwesenheit von Kupfer und TEPA.	156
Abb. 31: MALDI-ToF-MS/MS-LIFT-Analyse der Peptidfragmente des Peptids P3.	162
Abb. 32: Analyse der Substratspezifität der Enzyme MtFGE und ScFGE mit und ohne Kupferzugabe anhand des Peptids P3.	163
Abb. 33: Analyse der Substratspezifität des Enzyms MtFGE mit und ohne Kupferzugabe anhand des DARPins 004.	165
Abb. 34: Strategien zur dualen Proteinkonjugation mittels AtsB und FGE.	168
Abb. 35: Pictet-Spengler- und Knoevenagel-Ligationschemien.	170
Abb. 36: Schema der Konjugationsmethoden von Cys- oder FGly-haltigen Proteinen.	172
Abb. 37: Schema der zur Konjugation verwendeten Moleküle.	173
Abb. 38: Einfach- und Zweifachkonjugation des Sc2.	175
Abb. 39: Schema der scFv425-Fc-Konjugate.	176
Abb. 40: Dimerisierung der <i>single-chain</i> Antikörper und ihrer Konjugate.	177
Abb. 41: <i>Live Cell Imaging</i> des Sc2-MMAE-CFs.	181
Abb. 42: Zytotoxizität des ADCs.	184
Abb. 43: MBP-Konstrukte.	210
Abb. 44: Disulfidanalyse des ungetaggtten (Sc0) und dual getaggtten (Sc2) <i>single-chain</i> Antikörper scFv425-Fc.	211
Abb. 45: Einfluss von Kupfer und TEPA in HT1080-Zellen.	212
Abb. 46: Konversionen des Peptids P2.	213
Abb. 47: Analyse der Substratspezifität des Enzyms ScFGE mit und ohne Kupferzugabe anhand des DARPins 004.	214
Abb. 48: ESI-MS-Spektren des <i>single-chain</i> Antikörpers Sc2, des Sc2-Azid-Intermediates und des Sc2-MMAE-Einfachkonjugates.	215
Abb. 49: <i>Live Cell Imaging</i> und <i>Flow Cytometry</i> des Sc2-CFs.	216

8.4 DNA- und Aminosäuresequenzen

8.4.1 Enzyme

hFGE

A) in pBI mit HA-tag

WT:

ATGGCTGCGCCCGCACTAGGGCTGGTGTGTGGACGTTGCCCTGAGCTGGGTCTCGTCCTCTTGCTGCTGCTGCTCTC
GCTGCTGTGTGGAGCGGCAGGGAGCCAGGAGGCCGGGACCGGTGCGGGCGGGGTCCCTTGCGGGTCTTGCGGCT
GCGGCACGCCCCAGCGGCCTGGCGCCCATGGCAGTTCGGCAGCCGCTCACCGATACTCGCGGGGAGGCTAACGCTCCG
GGCCCCGTACCCGGAGAGCGGCAACTCGCGCACTCAAAGATGGTCCCCATCCCTGCTGGAGTATTTACAATGGGCAC
AGATGATCCTCAGATAAAGCAGGATGGGGAAGCACCTGCGAGGAGAGTTACTATTGATGCCTTTTACATGGATGCCT
ATGAAGTCAGTAATACTGAATTTGAGAAGTTTGTGAACCTCAACTGGCTATTTGACAGAGGCTGAGAAGTTTGCGC
TCCTTTGTCTTTGAAGGCATGTTGAGTGAGCAAGTGAAGACCAATATTCAACAGGCAGTTGCAGCTGCTCCCTGGTG
GTTACCTGTGAAAGGCCTAACTGGAGACACCCAGAAGGGCCTGACTCTACTATTCTGCACAGGCCGGATCATCCAG
TTCTCCATGTGTCCTGGAATGATGCGGTTGCCTACTGCACTTGGGCAGGGAAGCGGCTGCCACGGAAGCTGAGTGG
GAATACAGCTGTGAGGAGGCCTGCATAATAGACTTTTCCCTGGGGCAACAAACTGCAGCCCAAAGGCCAGCATTA
TGCCAACATTTGGCAGGGCGAGTTTCCGGTGACCAACACTGGTGAGGATGGCTTCCAAGGAACTGCGCCTGTTGATG
CCTTCCCTCCCAATGGTTATGGCTTATACAACATAGTGGGGAACGCATGGGAATGGACTTCAGACTGGTGGACTGTT
CATCATTCTGTTGAAGAAACGCTTAACCCAAAAGGTCCCCCTTCTGGGAAAGACCGAGTGAAGAAAGGTGGATCCTA
CATGTGCCATAGGTCTTATTGTTACAGGTATCGCTGTGCTGCTCGGAGCCAGAACACACCTGATAGCTCTGCTTCGA
ATCTGGGATTCGCTGTGCAGCCGACCGCCTGCCACTATGGAC

Furinspaltstelle

MAAPALGLVCGRCPELGLVLLLLLLLLLLCGAAGSQEAGTGAGAGSLAGSCGCGTPQRPGAHGSSAAAHRYSREANAP
GPVPPERQLAHSKMVPI PAGVFTMGTD^{DD}PQIKQDGEAPARRVTIDAFYMDAYEVSNT^{EF}EK^{FV}NSTGYL^{TE}A^EK^FGD
SFVFEGMLSEQVKTNIQQAVAAAPW^{LP}VKGANWRHPEGPDS^{TI}LHRPDH^{PV}LHVS^WND^{AV}AYCTWAGK^{RL}PTEA^EEW
EYSCRGGLHN^{RF}FPWGN^{LQ}PKGQHYANI^{WQ}GEFFV^TNTGED^{GF}OQTAP^{VD}AF^{FP}PN^{GY}GLYNIVGN^{AW}E^WTS^DW^WTV
HHSVEETLNP^KGPS^GKDRV^{KK}GGSY^MCHR^SYCY^RYRCA^{ARS}QNT^{PD}SSAS^NL^GFRCA^{AD}RL^{PT}MD^YP^YD^VPD^YA*

HA-tag

RRA: Furinspaltstelle mutiert

GCATACTCGGCG

AYSA

B) in pSB mit His₇-tag

C-terminal His₆-tag:

CATCACCATCACCATCAC

HHHHHH*

C) in pcDNA5/FRT mit His₆-tag oder ER-Retentionssignalen

C-terminal RGSHis₆-tag:

AGAGGATCACATCACCATCACCATCACTAG

RGSHHHHHH*

C-terminal KDEL:

GGATCGTCTAAGGACGAGCTG

GSSKDEL*

C-terminal PGEL:

GGATCGTCTCCAGGGGAGCTGTGA

GSSPGEL*

MtFGE

ATGCTGACCGAGTTGGTTGACCTGCCCGGCGGATCGTTCCGCATGGGCTCGACGCGCTTCTACCCCGAAGAAGCGCC
GATTCATAACCGTGACCGTGCAGCCTTTGCGGTAGAGCGACACCCGGTGACCAACGCGCAATTTGCCGAATTCGTCT
CCGCGACAGGCTATGTGACGGTTGCAGAACAACCCCTTGACCCCGGGCTCTACCCAGGAGTGACGCGACGACCTG
TGTCCCGGTGCGATGGTGTGTTTGTCCGACGGCCGGGCGGTCGACCTGCGTGACTGGCGGCAATGGTGGGACTGGGT
ACCTGGCGCCTGCTGGCGCCATCCGTTTGGCCGGGACAGCGATATCGCCGACCGAGCCGGCCACCCGGTCTGACAG

TGGCCTATCCGGACGCCGTGGCCTACGCACGATGGGCTGGTTCGACGCCCTACCGACCGAGGCCGAGTGGGAGTACGCG
 GCCCGTGGCGGAACCACGGCAACCTATGCGTGGGGCGACCAGGAGAAGCCGGGGGGCATGCTCATGGCGAACACCTG
 GCAGGGCCGGTTTCCTTACC GCAACGACGGTGCATTGGGCTGGGTGGGAACCTCCCCGGTGGGCAGGTTTCCGGCCA
 ACGGGTTTGGCTTGCTCGACATGATCGGAAACGTTTGGGAGTGGACCACCACCGAGTCTATCCACACCATCGCATC
 GATCCACCCTCGACGGCCTGCTGCGCACCGGTCAAGCTCGCTACAGCCGCCGACCCGACGATCAGCCAGACCCTCAA
 GGGCGGCTCGCACCTGTGCGCGCCGGAGTACTGCCACCCTACCGCCCCGGCGCGCTCGCCGAGTCCGAGGACA
 CCGCGACCACCATATCGGGTTCGGGTGCGTGGCCGACCCGGTGTCCGGGTAG

His₆-tag Thrombinspaltstelle (TS)

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMLTELVDLPGGFRMGSTRFYPEEAPIHTVTVRAFAVERHPVTNAQFAEFVSATGYV
 TVAEQPLDPLGLYPGVDAADLCPGAMVFCPTAGPVDLRDWRQWWDWVPGACWRHPFGRSDIADRAGHPVQVAYPDA
 VAYARWAGRRLPTEAEWEYAARGGTTATYAWGDQEKPGMLMANTWQGRFPYRNDGALGWVGTSPVGRFPANGFGLL
 DMIGNVWEWTTTEFYPHHRIDPPSTACCAPVKLATAADPTISQTLKGGSHLCAPEYCHRYRPAARSPQSQDTATTHI
 GFRCVADPVSG*

ScFGE

GAATTCGTGGCCGTGGCCGCCCGTCCCCCGGGCCGCCGGAGCCGGGGCCCGCCCGCCGTCCGCGCTCGACCCG
 CGGACAGGTGCGCCTGCCGGGCGGTGAGTTCGCGATGGGGGACGCCCTTCGGGGAGGGATATCCGGCCGACGGCGAGA
 CACCCGTGCACACGGTGC GCCTGCCGCCCTTCCACATCGACGAGACCGCCGTACCAACGCCCGGTTCGCCGCTTC
 GTCAAGCGACCGGCCATGTGACCGACGCCGAACGCTTCGGCTCCTCGGCCGTCTTCCACCTGGTTCGCGCCCGCC
 GGACGCCGACGTCCTCGGCAGCGCCGCCGCCCGCCCGCCCGTGGTGGATCAACGTGCGGGGCGCCACTGGCGCCGCCCG
 AGGGCGCCCGTCCGACATCACC GGCCGCCGAACCATCCGGTTCGTCACGTCTCCTGGAACGATGCCACCCGCTAC
 CGCGGTGGGCCGCAAGCGCCTGCCACCGAGGCCGAATGGGAGTACGCCGCCCGGGGGACTGGCCGGCCGCCG
 CTACGCCTGGGGCGACGAGCTGACCCCGGGCGGCCGGTGGCGCTGCAACATCTGGCAGGGCCGCTTCCCGCACGTCA
 ACACGGCCGAGGACGGGCACCTGAGCACCGCACCGGTCAAGTCTACCGGCCCAACGGCCACGGCCTGTGGAACACC
 GCGGGCAACGTGTGGGAATGGTGTCTCCGACTGGTTCTCGCCACCTACTACGCCGAATCACCCACCGTTCGACCCGCA
 CGGCCCGGGACCGGGCGGCACGGGTGCTGCGCGCGGCTCCTACCTGTGCCACGACTCCTACTGCAACCGCTACC
 GGGTCGCCGCCCGCTCCTCCAACACCCCGGACTCCTCGTCCGGCAACCTCGGATTCCGCTGCGCCAACGACGCGGAC
 CTCACGTCCGGATCAGCCGCTGAGTG

His₆-tag TS PreScission-Spaltstelle (PP)

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMLEVLFOGPEFVAVAAAPSAAAAEPGPAARPRSTRGQVRLPGGEFAMGDAFGEYPA
 DGETPVHTVRLRPFHIDETA VTNARFAAFVKATGHVTD AERFGSSAVFHLVVAAPDADVLGSAAGAPWWINVRGAHW
 RRPEGARSDITGRPNHPVVHVSWNDATAYARWAGKRLPTEAEWEYAARGGLAGRRYAWGDELTPGGRWRNCINWQGRF
 PHVNTAEDGHLSTAPVKSYRPNHGLWNTAGNVWEWCSDWFSPTYAESP TVDPHGPGTGAARVLRGGSYLCHDSYC
 NRYRVAARSSNTPDSSSGLGFRICANDADLTSGSAAE*

TcFGE (hochaktive Variante)

ATGCCGTGTTTTGACTTTGACATTCGCGCTCGCTCGCCGCAAGAAATCGCTAAGGGTATGGTTCGCAATTCGGGGTGG
 CACGTTCCGCATGGGCGGTGAAGATCCGGACGCGTTTTCCGGAAGATGGCGAAGGTCCGGTGCCTACCGTTTCGTCTGA
 GCCCGTTCCCTGATTGACCGCTATGCGGTGTCTAACCGTCAGTTTTGCGGCCCTTCGTGAAAGCAACCGGTTATGTTACG
 GATGCTGAACGCTACGGCTGGTCTTTGTTTTTACGCACATGTTGCACCGGGTACCCCGGTTATGGATGCCGTGGT
 TCCGGAAGCCCCGTGGTGGGTTGCGGTTCCGGGTGCCTACTGGAAAGCACCGGAAGGCCCGGGTAGCTCTATCACCG
 ATCGCCGAACCATCCGGTTCGTGCACGTCAGCTGGAATGACGCGGTGGCCTATGCAACCTGGGCCGGCAAGCGTCTG
 CCGACCGAAGCAGAATGGGAAATGGCAGCTCGCGCGGTCTGGATCAGGCACGTTACCCGTGGGGTAATGAACTGAC
 CCCGCGTGGCCGCCATCGTGCAAAATATTTGGCAAGGTACCTTTCCGGTTCACGATACGGGCGAAGACGGTTATACCG
 GTACCGCCCCGGTCAATGCTTTTGC CCGAATGGCTATGGTCTGTACAACGTCGCCGGCAATGTGTGGGAATGGGCG
 GCCGATTGGTGGTACGACGACTGGCATGCTACCGAAAGCCCGGCAACCCGTATTGATCCGCGTGGTCCGGAAACCGG
 TACCGCTCGCGTGACCAAGGGCGGTAGTTTTCTGTGCCACGAATCCTTTTGTAAATCGCTACCGTGTTCGAGCTCGTA
 CGTCAAATACGCCGACTCAAGTGCCGCCACACGGGTTTTTCGCGCTGCCGCCGATCCGCTGTAA

His₆-tag TS

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMPSFDFDI PRRSPOEIAKGMVAIPGGTFRMGGEDPDAFPEDGEGPVRTVRLSPFLID
 RYAVSNRQFAAFVKATGYVTDAERYGWSFVFHHAHVAPGTPVMDAVVPEAPWWVAVPGAYWKAPEGPGSSITDRPNHP
 VVHVSWNDAVAYATWAGKRLPTEAEWEMAARGGLDQARYPWGNELTPRGRHRANIWQGTFFVHDTGEDGYGTAPVN
 AFAPNGYGLYNVAGNVWEAADWWSADWHATESPATRIDPRGPETGTARVTKGGSFLCHESFCNRYRVAARTSNTPD
 SSAHTGFRAAADPL*

MMAtsB

ACAATACAAAACCGCCTTCCTCATCGCATTTCATGTTCTAGCAAAGCCAGCAGGGGCTATCTGCAACCTGGCCTGCAA
 ATACTGTTTTTTTTCTTGACAAGGAAGTCTCTATCCTGGCAGCAGGTTCCGCATGTTCAGATGAAATACTGGAGAAGT

ATATCCGGCAGCTCATCGCAGCCACAGCAGTCCGCAGGTGACCGTTGCCTGGCAGGGAGGTGAACCCACGCTTATG
 GCGTGCAGCTTTTACCAGCGTGAATGAGCTGCAAGAAAAACAGAAAAACAGGCATGAAAGTTCGAAAAACAAT
 GCAGACAAATGGCAGCTGCTGGACGACGAATGGTGCCGGTCTTTAAGGAAAAAATTTTCTAATCGGGATCAGTA
 TCGACGGCCCTCGCAACTGCACGACGCCTACCGTGTGGACAAAAAAGGGGAGGGAAGCTTCGATAGGGTTATGAAG
 GGGCTTCGCTGCTGCAAAAAACACGGGGTAGAATATAACGTCCTGACAAACAGTTAACCGCACCAACGCCGATTACCC
 GCTGGAAGTCTACCGCTTCTCGGGGACGAAGCAGGGACAGACTGGATTTCAGTTTATTCCGGTTGTTGAAAGGATCA
 ATGGGGGAGGACGTACCCCTTACCAGAAAGGGGATAGGGTCTCGGACCGTTCGTGAAGCCCGAGCAGTTTGGGAGT
 TTTCTGAGCTGCATTTTCGACGAATGGGTGAGAAATGATGTAGGTAGGATATTCGTGCAGACTTTTGAGCTTCTGC
 ACGCAGATGGATGGGATTGCCCTCAGGGATGTGCGTTTTTGAAGAAACATGCGGGATTGGGCTTGTCTTGGAGCATA
 ATGGAGATCTTTACTCATGTGACCATTTTGTGGAGCCGACTATCTGCTGGGCAATATTCTGGAAAACAGAGATAGGA
 GAGCTTGCAGCATCGGAAAAGCAATACAGGTTCCGGCAGGACAAACGTGATACTTACCGCAGGTATGCCGGGAATG
 CGAGGTGTTCTTTGCCCTGCAGGGGAGAATGTCCTAAAAACCGCTTCTGGCCACTCCTCAGGAGAATCCGGCCTGA
 ATTACCTCTGTAAGGGCTGGAAAGCTTTCTTCCAGCATGTCGATTATCCGATGCAGATAATGGCAGGATGATGCGC
 AGGGGTTACCCGGCATCAGAGGTGATGAGGATTCTGGCTCTTGATGAAGCTTTTCAAAGGACAGGACGCAACGAACC
 CTGTCCCTGTGGCAGCGGGCTCAAGTTCAAACGCTGCCACGGACGAAGGATACCAGGGTAAAGAAAGAGGAAATG
 GCATG

StrepII-tag FaktorXa-Spaltstelle

MASWSHPQFEKIEGRDRGTIQNRLPHRIHVLAKPAGAI CNLACKYCFFLDKELLYPGSRFRMSDEILENYIRQLIA
 AHSSPQVTVAWQGGIPTLMGVDFYRRAIELQEKHRKPKMKFENTMQTNGTLLDDEWCRFFKENNFLIGISIDGPREL
 HDAYRVDKKGEGSFDRVMKGLRLLQKHGVEYNVLTTVNRTNADYPLEVYRFLRDEAGTDWIQFIPVVERINGGGRTL
 YQKGRVSDRSVKPEQFGSFLSCIFDEWVRNDVGRI FVQTFEASARRWMGLPSGMCVFEETCGIGLALEHNGDLYSC
 DHFVEPDYLLGNILETEIGELAAASEKQYRFGQDKRDTLPQVCRECEVFFACRGECPKNRFLATPSGESGLNYLCKGW
 KAFFQHVDYPMQIMAGLMRRGYPASEVMRILALDEAFQRTGRNEPCPCGSLKFKRCHGRKDRVKKEEMGMGRGSHH
 HHHH*

RGSHis₆-tag

KPAtsB

ATGCTGAATATCGCCGCCCTGCGCCAGCAGCAAATTCGGCTGGCCGCTGAGCCGCGCTCGCCGGTGCCGTTTCATAT
 TCTGATGAAGCCGATTGGCCCCGCTGCAATCTCGCCTGCCGCTATTGCTATTACCCGCGAGGACGAAACGCCGGTCA
 ACAAGATGGATGACGCGCGGCTGGAGCAGTTTATCCGCCGCTATATTGCCGCCAGCCCGCCGGCGCGGGAAATC
 AACTTTGTCTGGCAGGGGGGCGAGCCGCTGCTAGCCGGCCTGAGCTTCTACAAAAAAGCGCTCGCCCTGCAGGCACG
 CTATGCCCCGACGGCGTGACTATCAGCAACAGCCTGCAGACCAACGGGACGCTGATCAACGACGCATGGTGCCGAC
 TGTTCCGCGAACATGGCTTTATTATCGGGTTGGGCTCGAAGGCAACGAAGCGCTGCAGGACTACCATCGTCCGGAT
 AAACGCGCGCGGTGACCTGGTCCGGCGGCGCTGCGCGGCATTGACCTGCTCCATCAGCATCAGGTGGACTTTAATCT
 GCTGGTGGTGGTGCATAACGAGATGGCGGCCACGCGCGGCGGATTTATGTCCGGCTGGTTCAGCCTCGGCGCGCGCT
 ATCTGCAGTTTACGCCGCTGATGAGCGAAGGCGCGGCCCTGCGCGAAGGATAACCAGCTCAGCGCCGATAACTGGGGA
 CGTTTTATGGTCGGCATCTGGCGACAGTGGCGGGAAGCGCTGCGATAGAGGGCGGGTGTTCGTATCAATATCGAACA
 GGCCTGGGCGCAGTATTCTACTCATAACCAGCGGCAGCTGCGTGCACAGCGCCCGCTCGCGGACCAACTGGTGTATG
 AGTCCGATGGACAGCTCTACGCCTGCGATCATCTGATCAACACCGAACATCGGCTGGGTTCGCTTGACGAGCAGACG
 CTTGCCCGCGGGTTCGACGCCTCGGTGCAACTGCCTTTTCGGTTCAGCAGAAAAGTCTGCGCCGCGAATGCCAGACTTG
 CTCGGTAAAAATGGTCTGCCAGGGCGGCTGCCCGGCGCATCTCAACGCCGAGGCAACAACCGCCTCTGCGGAGGCT
 ACTACCGCTTCTTTAGCGACATCCTCGCACCATTACGCCCTTTTCCCGGACCTTAATGGCCTGAAGGCCTGGCGG
 GCCGCGTTTGTGGGACTGCGCATACTGCGTAG

MLNIAALRQQQIPLAAEPRSPVPFHI LMKPIGPACNLACRYCYYPQDETPVNMDDARLEQFIRRYIAAQ PAGAREI
 NFWVQGGPELLLAGLSFYKKALALQARYAPDGVTSNSLQTNGLINDAWCRLFREHGFII GLGLEGNEALQDYHRPD
 KRGRSTWSAALRGIDLLHQHVDFNLLVVVHNEMAAHAAAIYVRLVSLGARYLQFQPLMSEGAALREGYQLSADNWG
 RFMVGIIWRQWRKRCDRGRVFINIEQAWAQYFTHTS GSCVHSARCGSNLVMESDGLYACDHLINTEHRLGRLDEQT
 LAAAVDASVQLPFGQKSLRRECQTSVKMVCQGGCPAHLNAAGNRLCGGYRFFSDILAPLRPF SRDLNGLKAWR
 AAFVGAHTA*

ASA

ATGGGGCACCGCGGTCCCTCCTCCTGGCCCTGGCTGCTGGCCTGGCCGTTGCCCGTCCGCCAACATCGTGCTGAT
 CTTTGCCGACGACCTCGGCTATGGGGACCTGGGCTGCTATGGGCACCCAGCTCTACCACTCCCAACCTGGACCAGC
 TGGCGCGGGAGGGCTGCGGTTACAGACTTCTACGTGCTGTGTCTCTGTGCACACCCTCTAGGGCCGCCCTCCTG
 ACCGGCCGGCTCCCGGTTCCGGATGGGCATGTACCCTGGCGTCTGGTGCCAGCTCCCGGGGGGGCCTGCCCTTGG
 GGAGGTGACCGTGGCCGAAGTCTGGCTGCCCGAGGCTACCTCACAGGAATGGCCGGCAAGTGGCACCTTGGGGTGG
 GGCCTGAGGGGGCCTTCTGCCCCCCCATCAGGGCTTCCATCGATTTCTAGGCATCCCGTACTCCACGACCAGGGC
 CCTGCCAGAACCTGACCTGCTTCCCGCCGGCCACTCCTTGCACGGTGGCTGTGACCAGGGCCTGGTCCCCATCCC
 ACTGTTGGCCAACTGTCCGTGGAGGCGCAGCCCCCTGGCTGCCCGGACTAGAGGCCCGCTACATGGCTTTCGCC
 ATGACCTCATGGCCGACGCCAGCGCCAGGATCGCCCTTCTTCTGTACTATGCCTCTCACCACACCCACTACCTT

CAGTTCAGTGGGCAGAGCTTTGCAGAGCGTTTCAGGCCGCGGGCCATTTGGGGACTCCCTGATGGAGCTGGATGCAGC
 TGTGGGGACCCTGATGACAGCCATAGGGGACCTGGGGCTGCTTGAAGAGACGCTGGTCATCTTCACTGCAGACAATG
 GACCTGAGACCATGCGTATGTCCCCGAGGCGGCTGCTCCGGTCTCTTGCCTGTGGAAAGGGAACGACCTACGAGGGC
 GGTGTCCGAGAGCCTGCCTTGGCCTTCTGGCCAGGTCATATCGCTCCCAGGCGTGACCCACGAGCTGGCCAGCTCCCT
 GGACCTGCTGCCTACCCTGGCAGCCCTGGCTGGGGCCCCACTGCCAATGTACCTTGGATGGCTTTGACCTCAGCC
 CCCTGCTGCTGGGCACAGGCAAGAGCCCTCGGCAGTCTCTCTTCTTCTACCCGTCCTACCCAGACGAGGTCCGTGGG
 GTTTTTGCTGTGCGGACTGGAAAGTACAAGGCTCACTTCTTACCCAGGCTCTGCCCCAGTGATACCACCTGCAGA
 CCCTGCCTGCCACGCCTCCAGCTCTCTGACTGCTCATGAGCCCCGCTGCTCTATGACCTGTCCAAGGACCTGGTG
 AGAACTACAACCTGCTGGGGGGTGTGGCCGGGGCCACCCAGAGGTGCTGCAAGCCCTGAAAACAGCTTTCAGCTGCTC
 AAGGCCAGTTAGACGCAGCTGTGACCTTCGGCCCCAGCCAGGTGGCCCGGGGCGAGGACCCCGCCCTGCAGATCTG
 CTGTCATCCTGGCTGCACCCCCGCCCAGCTTGTGCCATTGCCAGATCCCCATGCCCGTGGATCGCATCACCATC
 ACCATCATTGA

MGAPRSLLLALAAGLAVARPPNIVLIFADDLGYGDLGICYGHPSSTTPNLDQLAAGGLRFTDFYVPSLCTPSRAALL
 TGRLPVRMGMYPGVLVPSRRGLPLEEVTVAEVLAAARGYLTMAGKWHLGVGPEGAFPPHQGFHRFLGIPYSHDQG
 PCQNLTCFPPATPCDGGCDQGLVPIPLLANLSVEAQPPWLPGLEARYMAFAHDLMDAQRQDRPFLLYYASHHHTYP
 QFSGQSFAERSGRGPFGDSLMEELDAAVGTLMTAIGDLGLLEETLVI FTADNGPETMRMSRGGCSGLLRCKGKTTYEG
 GVREPALAFWPGHIAPGVTHELASSLDLLPTLAALAGAPLPNVTLDFDLSPLLLGTGKSPRQSLFFYPSYPDEVRG
 VFAVRTGKYKAHFFTQGSASDTTADPACHASSSLTAHEPPLLYDLSKDPGENYNLLGGVAGATPEVLQALKQLQLL
 KAQLDAAVTFGPSQVARGEDPALQICCHPGCTPRPACCHCPDPHARGSHHHHHH*

RGSHi₆-tag

STS

ATGCCTTTAAGGAAGATGAAGATCCCTTTTCTCTACTGTTCTTTCTGTGGGAAGCCGAGAGCCACGCAGCATCAAG
 GCCGAACATCATCCTGGTATGGCTGACGACCTCGGCATTGGAGATCCTGGGTGCTATGGGAACAAAACCTATCAGGA
 CTCCAATATCGACCGGTTGGCCAGTGGGGAGTGAACCTCACTCAGCACCTGGCAGCATCACCGCTGTGCACACCA
 AGCAGGGCAGCCTTCATGACTGGCCGGTACCCTGTCCGATCAGGAATGGCATCTTGGTCCCGCACTGGAGTTTCTCT
 CTTACAGCCTCTTCGGGAGGACTTCCCACCGATGAGATTACCTTTGCTAAGCTTCTGAAGGATCAAGGTTATTCAA
 CAGCACTGATAGGAAATGGCACCTTGGGATGAGCTGTACAGCAAGACTGACTTCTGTACCACCCTTTACATCAC
 GGCTTCAATTATTTCTATGGGATCTCTTTGACCAATCTGAGAGACTGCAAGCCCGGAGAGGGCAGTGTCTTACCAC
 GGGCTTCAAGAGGCTGGTCTTCTCCCTCCCTGCAGATCGTCGGGGTACCCTCCTTACCCTTGGCTGCACTCAATTGTC
 TGGGGCTACTCCACGTGCCTCTAGGCGTTTTTTTTTCAGCCTTCTCTTCTTAGCAGCCCTAATCCTGACCCCTTTTCTTG
 GGCTTCTTTCATTACTTCCGGCCCCCTGAACTGCTTTCATGATGAGGAACTACGAGATCATTACGAGCCCATGTCCCTA
 TGACAATCTCACCCAGAGGCTAACGGTGGAGGGCGGCCAGTTCATACAGCGGAACACTGAGACTCCGTTCTCTGCTTG
 TCTTGTCTTACCTCCACGTGCACACAGCCCTGTTCTCCAGCAAAGACTTTGCTGGCAAAAGTCAACACGGAGTCTAC
 GGGGATGCTGTTGAGGAAATGGACTGGAGTGTGGGGCAGATCTTGAACCTTCTGGATGAGCTGAGATTGGCTAATGA
 TACCCTCATCTACTTACATCGGACCAGGGAGCACATGTAGAAGAAGTGTCTTCAAAGGAGAAAATTCATGGCGGAA
 GTAATGGATCTATAAAGGAGGAAAAGCAAACAACCTGGGAAGGAGGTATCCGGGTTCCAGGCATCTTCTGTTGGCCC
 AGGTTGATACAGGCTGGCCAGAAGATTGATGAGCCACTAGCAACATGGACATATTTCTTACAGTAGCCAAGCTGGC
 TGGAGCTCCCTTGCCTGAGGACAGGATCATTGATGGACGTGATCTGATGCCCTGCTTGAAGGAAAAAGCCACCGCT
 CCGATCATGAGTTTCTTCTTCCATTACTGCAACGCCTACTTAAATGCTGTGCGCTGGCACCCCTCAGAACAGCACATCC
 ATCTGGAAGGCCTTTTTTCTTACCCCCAACTTCAACCCCGTGGGTTCCAACGGATGCTTTGCCACACACGTGTGCTT
 CTGTTTTCGGGAGTTATGTACCCATCACGACCCACCTTTACTCTTTGATATTTCAAAGATCCCAGAGAGAGAAACC
 CACTAACTCCAGCATCCGAGCCCCGGTTTTATGAAATCCTCAAAGTCATGCAGGAAGCTGCGGACAGACACACCCAG
 ACCCTGCCAGAGGTGCCCGATCAGTTTTTTCATGGAACAACCTTTCTTTGGAAGCCCTGGCTTACAGCTGTGCTGTCTTC
 CACCGGCCTGTCTTGCAGTGTGATAGAGAAAAACAGGATAAGAGACTGAGCCGC

MPLRKMKI PFLLLFFLWEAESHASRPNI IILVMADDLIGDPCYGNKTI RTPNIDRLASGGVKL TQHLAASPLCTP
 SRAAFMTGRYPVRSGLMASWSRTGVFLFTASSGGLPTDEITFAKLLKDQGYSTALIGKWHLGMSCSKTDFCHHPLHH
 GFNYFYGISLTLNRDCKPGEESVFTTGFKRLVFLPLQIVGVTLTLLTALNCLGLLHVPLGVFFSLLFLAALIILTLFL
 GFLHYFRPLNCFMNRNYEIIQQPMSYDNLTRQLTVEAAQFIQRNTEPTFLLVLSYLHVHTALFSSKDFAGKSQHG
 GDAVEEMDWSVGQIILNLLDELRLANDTLIYFTSDQGAHVEEVSSKGEIHHGNSNGIYKGGKANNWEGGIRVPGILRWP
 RVIQAGQKIDEPSTNMDIFPTVAKLAGAPLPEDRIIDGRDLMPLLEGKSQRSDEHFLFHYCNAYLNAVRWHPQNSTS
 IWKAFFFTPNFNPVGSNGCFATHVCFGFSYVTHDPLLFDIISKDPRERNPLTPASEPRFYEILKVMQEAADRHTQ
 TLPEVPDQFSWNNFLWKPLWLQLCCPSTGLSCQCDREKQDKRLSR*

8.4.2 DARPin

DARPin E01

GACCTGGGCAAGAAGCTGCTGGAAGCCGCCAGAGCCGGACAGGACGACGAAGTGCGGATCCTGATGGCCAACGGCGC
CGACGTGAACGCCGACGATACCTGGGGCTGGACCCCTCTGCACCTGGCCGCTATCAGGGCCACCTGGAAATCGTGG
AAGTGTGCTGAAGAACGGGGCCGATGTGAATGCCTACGACTACATCGGCTGGACACCCCTGCATCTCGCTGCCGAC
GGCCACCTCGAGATTGTCGAGGTCCTGCTGAAAAATGGCGCTGATGTGAACGCCAGCGATTATATCGGCGACACCCC
CCTCCATCTGGCCGCCACAACGGCCATCTGGAAATTGTGGAAGTCTCTCAAGCACGGCGCAGATGTCAACGCCC
AGGACAAGTTCGGCAAGACCGCCTTCGACATCAGCATCGACAACGGCAACGAGGACCTGGCCGAGATCCTCCAG

MDLGKKLLEAARAGQDDEVRIILMANGADVNADDTWGWTPLHLAAYQGHLEIVEVLLKNGADVNAYDYIGWTPHLHLAA
DGHLEIVEVLLKNGADVNASYIGDTPHLHLAAHNGHLEIVEVLLKHGADVNAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLAEILQ
HHHHHH*

His₆-tag

000

C-terminal:

TTGTGCACGCCGTCTCGCGGAGGTCACCATCATCACCATCATTAG

LCTPSRGGHHHHHH*

FGE-Motiv His₆-tag

001

C-terminal:

GGCTCGGGCGGTTTCGGCGCCGGCACGTTCAATGCTGTAAACGGGTAACGAGGCCTCGGGGGCCGATCACCATCATCA
CCATCATTAG

GSGGSAPARSMLLTGNEASGADHHHHHH*

KPAtsB-Motiv

His₆-tag

002

C-terminal:

GGCTCGGGCGAACAGAGCTGCACGGCAGGACGTGCGGCCTTTATTACCGGTCAGGAGGCCTCGGGGGCCGATCACCA
TCATCACCATCATTAG

GSGEQSCTAGRAAFITGQEASGADHHHHHH*

MMAtsB-Motiv

His₆-tag

003

C-terminal:

GGCGGTGGTTCGGCGCCGGCACGTTCAATGCTGTAAACGGGTAACGGTTTGTGCACGCCGTCTCGTGAGGCCTCGGG
GGCCGATCACCATCATCACCATCATTAG

GGGSAPARSMLLTGNGLCTPSREASGADHHHHHH*

KPAtsB-Motiv

FGE-Motiv

His₆-tag

004

C-terminal:

GGCGGCGAACAGAGCTGCACGGCAGGACGTGCGGCATTTATTACCGGTCAGGGATTGTGCACGCCGTCTCGTGAGGC
CTCGGGGGCCGATCACCATCATCACCATCATTAG

GGEQSCTAGRAAFITGQGLCTPSREASGADHHHHHH*

MMAtsB-Motiv

FGE-Motiv

His₆-tag

005

C-terminal:

GGCGGCGAACAGAGCTGCACGGCAGGACGTGCGGCATTTATTACCGGTCAGGGATTGTGCACGCCGTCTCGTGCTGG
GAGAGGATCACATCACCATCACCATCACTAGGGEQ**SCTAG**RAAFITGQGL**CTPSR**AGRGSSHHHHHH*
MMAtsB-Motiv FGE-Motiv RGSHis₆-tag**006**

C-terminal:

GGCGGCGAACAGAGCTGCACGGCAGGACGTGCGGCATTTATTACCGGTCAGAGAGGATCACATCACCATCACCATCA
CTAGGGEQ**SCTAG**RAAFITGO RGSSHHHHHH*
MMAtsB-Motiv RGSHis₆-tag**007**

N-terminal:

ATGAGAGGATCACATCACCATCACCATCAC

MRGSSHHHHHH
RGSHis₆-tag

C-terminal:

GGCGGCGAACAGAGCTGCACGGCAGGACGTGCGGCATTTATTACCGGTCAGGGATTGTGCACGCCGTCTCGTGCTGG
GTAGGGEQ**SCTAG**RAAFITGQGL**CTPSR**AG*
MMAtsB-Motiv FGE-Motiv**008**

N-terminal:

ATGAGAGGATCACATCACCATCACCATCAC

MRGSSHHHHHH
RGSHis₆-tag

C-terminal:

GGCGGCGAACAGAGCTGCACGGCAGGACGTGCGGCATTTATTACCGGTCAGTAG

GGEQ**SCTAG**RAAFITGO*
MMAtsB-Motiv**009**

C-terminal:

GGTGGTAGCCCGATGTCGGCGCCGGCACGTTCAATGCTGTTAACGGGTAACGGTTTTGTGCACGCCGTCTCGTGCTGG
GAGAGGATCACATCACCATCACCATCACTAGGGSP**MSAPAR**SMLLTGNGL**CTPSR**AG RGSSHHHHHH*
KPAtsB-Motiv FGE-Motiv RGSHis₆-tag**010**

C-terminal:

GGTGGTAGCCCGATGTCGGCGCCGGCACGTTCAATGCTGTTAACGGGTAACAGAGGATCACATCACCATCACCATCA
CTAG

GGSPMSAPARSMLLTGN RGSHHHHHH*
 KPAtsB-Motiv RGSHis₆-tag

011

N-terminal:
 ATGAGAGGATCACATCACCATCACCATCAC

MRGSHHHHHH
 RGSHis₆-tag

C-terminal:
 GGTGGTAGCCCGATGTCGGCGCCGGCACGTTCAATGCTGTTAACGGGTAACGGTTTGTGCACGCCGTCTCGTGCTGG
 GTAG

GGSPMSAPARSMLLTGNGLCTPSRAG*
 KPAtsB-Motiv RGSHis₆-tag

012

N-terminal:
 ATGAGAGGATCACATCACCATCACCATCAC

MRGSHHHHHH
 RGSHis₆-tag

C-terminal:
 GGTGGTAGCCCGATGTCGGCGCCGGCACGTTCAATGCTGTTAACGGGTAAGTAG

GGSPMSAPARSMLLTGN*
 KPAtsB-Motiv

013

C-terminal:
 GGCGGTGGTTCGGCGCCGGCACGTTCAATGCTGTTAACGGGTAACGGTTTGTGCACGCCGTCTCGTGAGGCCCTCGGG
 GGCCGATCACCATCATCACCATCATTAG

GGSPMSAPARSMLLTGNGLCTPSREASGADHHHHHH*
 KPAtsB-Motiv FGE-Motiv His₆-tag

016a

N-terminal:
 ATGGGCGGCGAACAGAGCTGCACGGCAGGACGTGCGGCATTTATTACCGGTCAG

MGGEQSCTAGRAAFITGQ
 MMAtsB-Motiv

C-terminal:
 GGTGGTAGCCCGATGTCGGCGCCGGCACGTTCAATGCTGTTAACGGGTAAGTAG

RGSHHHHHH*
 RGSHis₆-tag

016b

N-terminal:
 ATGGGCGGCGAACAGAGCTGCACGGCAGGACGTGCGGCATTTATTACCGGTCAG

MGGEQSCTAGRAAFITGQ
 MMAtsB-Motiv

C-terminal:

GGTGGTAGCCCGATGTCGGCGCCGGCACGTTCAATGCTGTTAACGGGTAAGTACTAG

GLCTPSRAG RGSHHHHHH*FGE-Motiv RGSHis₆-tag**021**

C-terminal:

GGCTCGGGCGAACAGAGCTCCACGGCAGGACGTGCGGCCTTTATTACCGGTCAGGAGGCCCTCGGGGGCCGATCACCA
TCATCACCATCATTAGGSGEQS STAGRAAFITGQEASGADHHHHHH*mutiertes MMAtsB-Motiv His₆-tag**022**

C-terminal:

TTGTGCACGCCGTCTCGCGGAGGTTTAGAAGTTTTATTTCAAGGTCCTCACCATCATCACCATCATTAG

PP

LCTPSRGGLEVLFOGPHHHHHH*FGE-Motiv His₆-tag**023**

N-terminal:

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGTTAGAAGTTTTATT
TCAAGGTCCTTTGTGCACGCCGTCTCGCGGAGGTMGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMLEVLFOGP LCTPSRGGHis₆-tag TS PP FGE-Motiv**025**

N-terminal:

ATGGCGGGCGCCGTGGGACTGTGTACCCCAAGCCGGGCAGGA

MAGAVGLLCTPSRAG

FGE-Motiv

C-terminal:

GGTGGTAGCCCGATGTCGGCGCCGGCACGTTCAATGCTGTTAACGGGTAAGTACTAG

LCTPSRGGHHHHHH*FGE-Motiv His₆-tag**026**

C-terminal:

CACCATCATCACCATCATTAG

LCTPSRGGLEVLFOGP HHHHHH*FGE-Motiv PP His₆-tag**027**

N-terminal:

ATGGCGGGCGCCGTGGGACTGTGTACCCCAAGCCGGGCAGGA

MAGAVGLLCTPSRAG

FGE-Motiv

C-terminal:

CACCATCATCACCATCATTAG

LCTPSRGGLEVLFOGP HHHHHH*FGE-Motiv PP His₆-tag**029 (GAGA1)**

C-terminal:

TTGTGCACGCCGTCTCGTGGTGCAGGTGCGTGACCCGACAGGACGTGCGGCCTTTATTACCGGTCAGGAGGCCCTCGGG
GGCCGATCACCATCATCACCATCATTAGLCTPSRGAGACTAGRAAFITGQEASGADHHHHHH*FGE-Motiv MMAtsB-Motiv His₆-tag**030 (GAGA2)**

C-terminal:

TTGTGCACGCCGTCTCGTGGTGCAGGTGCGAGCACGGCAGGACGTGCGGCCTTTATTACCGGTCAGGAGGCCCTTTT
TTCCTCGGGGGCCGATCACCATCATCACCATCATTAGLCTPSRGAGASTAGRAAFITGQEALFSSGADHHHHHH*FGE-Motiv mutiertes MMAtsB-Motiv His₆-tag**8.4.3 scFv425-Fc****Sc0**

ATGGCAGCCGGAACAGCAGTTGGAGCCTGGGTGCTGGTCTCAGTCTGTGGGGGGCAGTAGTAGGTGCTTCCGACTA
 CAAAGACGAAGTGAATTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCTGCAAGG
 CTTCCGGCTACACCTTACCAGCCACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGGCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGA
 GAGTTTAAATCCCAGCAACGGCCGTAATACTACAATGAGAAATTCAGAGCAAGGCCACCCTGACTGTAGACAAATC
 CTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCCAGTCGGGACT
 ATGATTACGACGGACGGTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCG
 GGCGGTGGTGGGTGGGTGGTGGCGGATCTGACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGG
 GGAGAAGGTCACTATGACTTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAACCTTACATGTATTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT
 CCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG
 ACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTCA
 CATATTCACGTTTCGGCTCGGGGACAGAAGTGGAGATCAAACGGGAACCTAAGTCTTGCGACAAGACCCACACCTGTC
 CCCCCTGTCTCTCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATG
 ATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTA
 CGTGGACGGCGTGAAGTGCACAACGCCAAGCAAGCCAGAGAGGAACAGTACAAGTGAAGGTGTTCAACAAGGCCCTGCCT
 CCGTGCTGACCGTGTGCAACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTTCAACAAGGCCCTGCCT
 GCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCTCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAG
 GGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGACATTGCCGTGGAAT
 GGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTCTG
 TACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCT
 GCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAG

Signalpeptid

scFv425

MAAGTAVGAWVLVLSLWGAVVGASDYKDEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRAGQGLEWIG
EFNPSNGRNTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASRDYDYGRIYFDYWGQGTTVTVSSGGGGS
GGGGSGGGSDIELTQSPAIMSASPGKVTMTCSASSSVTYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAGVPVRFSGSGS
TSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSHIFTFGSGTELEIKREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNQKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDIG*

Fc

Sc1

ATGGCAGCCGGAACAGCAGTTGGAGCCTGGGTGCTGGTCTCAGTCTGTGGGGGGCAGTAGTAGGTGCTTCCGACTA
 CAAAGACGAAGTGAATTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCTGCAAGG
 CTTCCGGCTACACCTTACCAGCCACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGGCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGA
 GAGTTTAATCCCAGCAACGGCCGTAATACTACAATGAGAAATCAAGAGCAAGGCCACCCTGACTGTAGACAAATC
 CTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCCAGTCCGGACT
 ATGATTACGACGGACGGTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCG
 GCGGTGGTGGGTGGGTGGTGGCGGATCTGACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGG
 GGAGAAGGTCACTATGACTTGCAGTGCAGCTCAAGTGTAACTTACATGTATTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT
 CCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG
 ACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTCA
 CATATTCACGTTCCGGCTCGGGGACAGAACTGGAGATCAAACGGGAACCTAAGTCTTGCGACAAGACCCACACCTGTC
 CCCCCTGTCTCTGCTCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCCAAGGCCAAGGACACCCTGATG
 ATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTA
 CGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGT
 CCGTGTGACCGTGTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCT
 GCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCTCAGGTGTACACCTGCCCCCTAGCAG
 GGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGACATTCGCCGTGGAAT
 GGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTTCTTCCCTG
 TACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCT
 GCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAGGATATCGGGCGGACTGTGCACCCCATCTCGGG
 CCGCACTGCTGACAGGCCGGGATATCATGCATCACCACCACCATCACACCGGTTGA

Signalpeptid scFv425
 MAAGTAVGAWVLVLSLWGAUVGASDYKDEVQLQOSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRAGQGLEWIG
 EFNPSNGRNTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASRDYDYGDFYWGQGTFTVTVSSGGGGS
 GGGGSGGGSDIELTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVTYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAGVPRVRFSGSGS
 TSYSLTI SRMEAEDAATYYCQWSSHI FTFGSGTELEIKREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALP
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKDIGGLCTPSRAALLTGRDIMHHHHHTG*

Fc

FGE-Motiv

His₆-tag**Sc2**

ATGGCAGCCGGAACAGCAGTTGGAGCCTGGGTGCTGGTCTCAGTCTGTGGGGGGCAGTAGTAGGTGCTTCCGACTA
 CAAAGACGAAGTGAATTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCTGCAAGG
 CTTCCGGCTACACCTTACCAGCCACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGGCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGA
 GAGTTTAATCCCAGCAACGGCCGTAATACTACAATGAGAAATCAAGAGCAAGGCCACCCTGACTGTAGACAAATC
 CTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCCAGTCCGGACT
 ATGATTACGACGGACGGTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCG
 GCGGTGGTGGGTGGGTGGTGGCGGATCTGACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGG
 GGAGAAGGTCACTATGACTTGCAGTGCAGCTCAAGTGTAACTTACATGTATTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT
 CCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG
 ACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTCA
 CATATTCACGTTCCGGCTCGGGGACAGAACTGGAGATCAAACGGGAACCTAAGTCTTGCGACAAGACCCACACCTGTC
 CCCCCTGTCTCTGCTCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCCAAGGCCAAGGACACCCTGATG
 ATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTA
 CGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGT
 CCGTGTGACCGTGTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCT
 GCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCTCAGGTGTACACCTGCCCCCTAGCAG
 GGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGACATTCGCCGTGGAAT
 GGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTTCTTCCCTG
 TACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCT
 GCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAGGATGGCGGGGAGCAAAGTTGTACCAGGCTC
 GTGCTGCATTATAACTGGGCAGGGTCTTTGCACACCATCACGTACCGGTTGA

Signalpeptid scFv425
 MAAGTAVGAWVLVLSLWGAUVGASDYKDEVQLQOSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRAGQGLEWIG
 EFNPSNGRNTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASRDYDYGDFYWGQGTFTVTVSSGGGGS
 GGGGSGGGSDIELTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVTYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAGVPRVRFSGSGS
 TSYSLTI SRMEAEDAATYYCQWSSHI FTFGSGTELEIKREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM

ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGKDGGEQSCTAGRAAFITGQGLCTPSRTG*
 Fc MMAtsB-Motiv FGE-Motiv

8.4.4 eGFP

ATGGCTGCGCCCCACTAGGGCTGGTGTGTGGACGTTGCCCTGAGCTGGGTCTCGTCCCTTGCTGCTGCTGCTCTC
 GCTGCTGTGTGGAGCGGCAGGGAGCCAGGAGGCCGGGACCGGTGCGGGCGCGGGTCCCTTGCGGGTCTTGCGGGCT
 GCGGCACGCCCCAGCGGCCTGGCGCCCATGGCAGTTCGGCAGCCGCTCACCGATACTCGCGGGAGGCTAACGCTCCG
 GGCCCCGTACCCGGAGAGCGGCAACTCGCGCACTCAAAGATGGTCCCCATCCCTGCTGGAGTATTTACAATGGGCAC
 AGATGATCCTCAGATAAAGCAGGATGGGGAAGCACCTGCGAGGAGAGTTACTATTGATGCCTTTTACATGGATGCCT
 ATGAAGTCAGTAATACTGAATTTGAGAAGTTTGTGAAGTCAACTGGCTATTTGACAGAGGCTGAGAAGTTTGGCGAC
 TCCTTTGTCTTTGAAGGCATGTTGAGTGAGCAAGTGAAGACCAATATTCAACAGGCAGTTGCAGCTGCTCCCTGGTG
 GTTACCTGTGAAAGGCCTAACTGGAGACACCCAGAAGGGCCTGACTCTACTATTCTGCACAGGCCGGATCATCCAG
 TTCTCCATGTGCTGGAATGATGCGGTTGCCTACTGCACCTGGGCAGGGAAGCGGCTGCCACCGGAAGCTGAGTGG
 GAATACAGCTGTCGAGGAGGCCTGCATAATAGACTTTTCCCTGGGGCAACAAACTGCAGCCCAAAGGCCAGCATTA
 TGCCAACATTTGGCAGGGCGAGTTTCCGGTGACCAACACTGGTGAGGATGGCTTCCAAGGAACTGCGCCTGTTGATG
 CCTTCCCTCCCAATGGTTATGGCTTATACAACATAGTGGGGAACGCATGGGAATGGACTTCAGACTGGTGGACTGTT
 CATCATTCTGTTGAAGAAACGCTTAACCCAAAAGGTCCCCCTTCTGGGAAAGACCGAGTGAAGAAAAGTTGGATCCTA
 CATGTGCCATAGGTCTTATTGTTACAGGTATCGCTGTGCTGCTCGGAGCCAGAACACACCTGATAGCTCTGCTTCGA
 ATCTGGGATTCGCTGTGCAGCCGACCGCCTGCCACTATGGACTATCCGTATGATGTGCCTGACTACGCAACCGCG
 GGCCCGGATCCGCCGCCACCATGACGCGTGATTACAAGGATGACGACGATAAGCCACCGGTGCCACCATGTTGAG
 CAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAACCGCCACAAGTTCA
 GCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTG
 CCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGAGTGCCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAA
 GCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCA
 ACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTC
 AAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAA
 GCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACT
 ACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTG
 AGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCAT
 GGACGAGCTGTACAAGTAA

hFGE

Furinspaltstelle

MAAPALGLVCGRCPELGLVLLLLLLLLSLLCGAAGSQEAGTGAGAGSLAGSCGCGTPQRPGAHGSSAAAHRYSREANAP
GPVPGERQLAHSKMVPIPAGVFTMGTDDDPQIKQDGEAPARRVTIDAFYMDAYEVSNTEFKFNSTGYLTEAEKFGD
SFVFEGMLSEQVKTNIQQAVAAAPWVLPVKGANWRHPEGPDSTILHRPDHPVLHVSWNDAVAYCTWAGKRLPTEAEW
EYSCRGGLHNRLFPWGNLQPKGQHYANIWQGEFFVTNTGEDGFQGTAPVDAFPPNGYGLYNIVGNAWEWTSSDWWTV
HHSVEETLNPKGPPSGKDRVKKGGSYMCHRSYCYRYRCAARSQNTPDSSASNLGFRCAADRLPTMDYPYDVPDYATA

HA-tag

GPGSAATMTRDYKDDDDKPPVATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTLKFICTTGKL
PVPWPTLVTTLYGVOCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDF
KEDGNILGHKLEYNNSHNVIIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHYLSTOSAL
SKDPNEKRDMVLLEFVTAAGITLGMDELYK*

eGFP

RRA und KDEL bzw. PGEL wie oben (Kapitel 8.4.1).

8.4.5 MBP

MBP-S

ATGAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAA
 GAAATTCGAGAAAGATAACCGAATTAAGTACCGTTGAGCATCCGGATAAAGTGAAGAGAAAATCCACAGGTTG
 CGGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTG
 GCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAA
 GCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAAAGATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAAA
 CCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTGGATAAAGAAGTAAAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAA
 CCGTACTTCACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGTACGACATTA

AGACGTGGGCGTGGATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCCTGGTTGACCTGATTAAAAACAAACACATGA
 ATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGG
 GCATGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAAACGGTACTGCCGACCTTCAAGGGTCAACCATCCAA
 ACCGTTTCGTTGGCGTGTGAGCGCAGGTATTAACGCCCGCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAAAAGAGTTTCCTCGAAA
 ACTATCTGCTGACTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTAC
 GAGGAAGAGTTGGTGAAGATCCGCGTATTGCGCCACTATGGAAAACGCCAGAAAGGTGAAATCATGCCGAACAT
 CCCGAGATGTCCGCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCCGCCAGCGGTCCGTAGACTGTGCGATG
 AAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTAATTCGAGCTCGAACAACAACAATAACAATAACAACAACCTCGGGATCGAG
 GGAAGGGGTGGTAGCCCGATGTGCGCGCCGGCACGTTCAATGCTGTTAACGGGTAACAGAGGATCACATCACCATCA
 CCATCACTAG

MBP

MKIEEGKLVIIWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLL
AEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSIIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQE
PYFTWPLIAADGGYAFKYENGGYDIKDVGVNDAGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPW
AWSNIDTSKVNIGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSY
EEELVKDPRIAATMENAQKGEIMPNI PQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSSNNNNNNNNNNLGIE
GRGGSPMSAPARSMLLTGN RGSHHHHHH*

KPAtsB-Motiv

RGSHis₆-tag

Faktor Xa-Spaltstelle

C-MBP-S

ATGGGATTGTGCACGCCGTCTCGTGTGGGGCATTAGAAGTTTTATTTCAAGGTCTTGCAAAAAATCGAAGAAGGTAA
 ACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAAAAGATACCG
 GAATTAAGTACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATTCACACAGGTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCT
 GACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCGGACAA
 AGCGTTCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCG
 CTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAAGATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAAACCTGGGAAGAGATCCCGGGC
 CTGGATAAAGAAGTGAAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAACCGTACTTACCTGGCCGCT
 GATTGCTGCTGACGGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGTACGACATTAAGACGTGGGCGTGGATAACG
 CTGGCGGAAAGCGGGTCTGACCTTCCTGGTTGACCTGATTAAAAACAAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCC
 ATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGGGCATGGTCCAACATCGACAC
 CAGCAAAGTGAATTATGGTGTAAACGGTACTGCCGACCTTCAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCGTGTGA
 GCGCAGGTATTAACGCCCGCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAAAAGAGTTCCCTCGAAAACATCTGCTGACTGATGAA
 GGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCCGTAGCGCTGAAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGTGAAAGA
 TCCGCGTATTGCCGCCACTATGAAAACGCCAGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCCGCTTTCT
 GGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCCGCCAGCGGTGCTGAGACTGTGATGAAGCCCTGAAAAGACGCGCAG
 ACTAATTCGAGCTCGAACAACAACAATAACAATAACAACAACCTCGGGATCGAGGGAAAGGGTGGTAGCCCGAT
 GTCGGCGCCGGCACGTTCAATGCTGTTAACGGGTAACAGAGGATCACATCACCATCACCATCACTAG

FGE-Motiv

PP

MBP

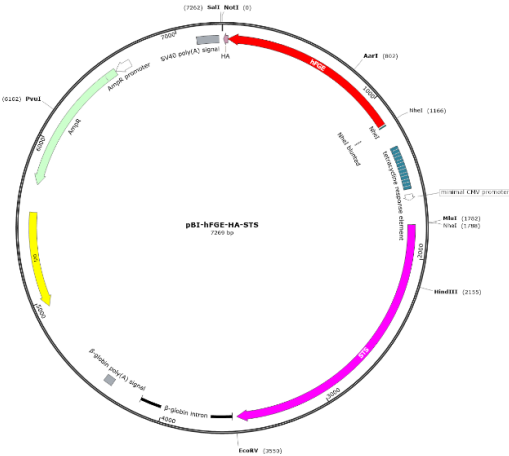
MGLCTPSRAGALEVLFQGPAKIEEGKLVIIWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGP
DIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSIIYNKDLLPNPPKTWEEIPA
LDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGGYDIKDVGVNDAGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYS
IAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNIGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDE
GLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELVKDPRIAATMENAQKGEIMPNI PQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQ
TNSSSNNNNNNNNNNLGIEGRGGSPMSAPARSMLLTGN RGSHHHHHH*

Faktor Xa-Spaltstelle

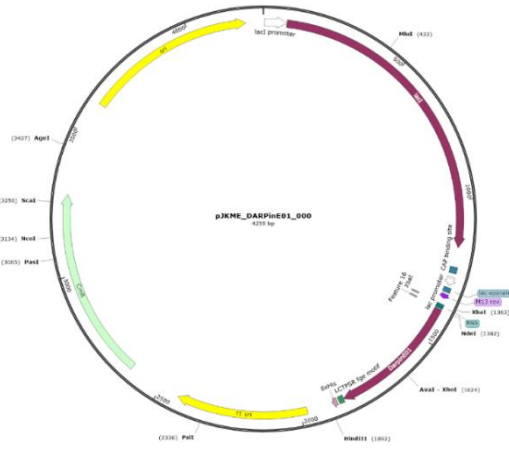
KPAtsB-Motiv

RGSHis₆-tag

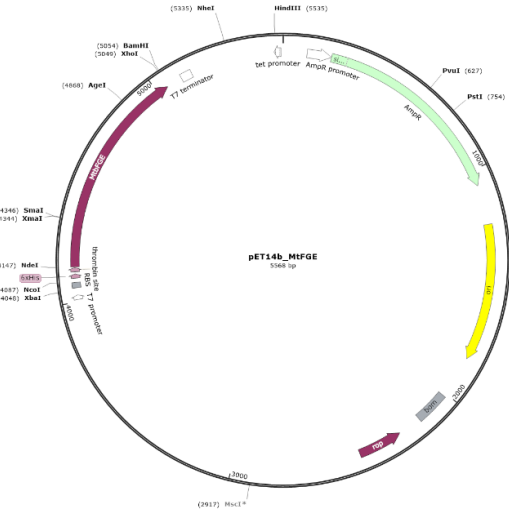
pBI



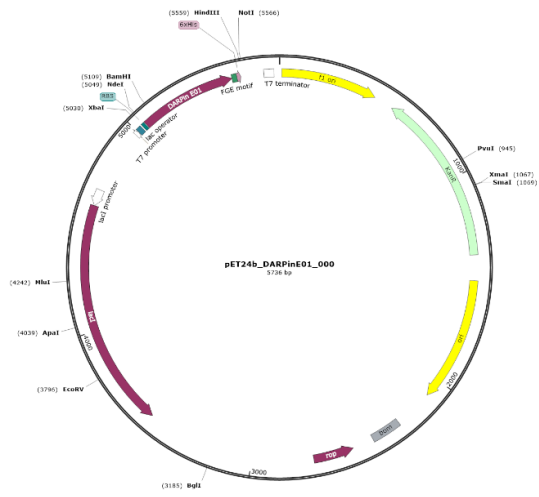
pJKME



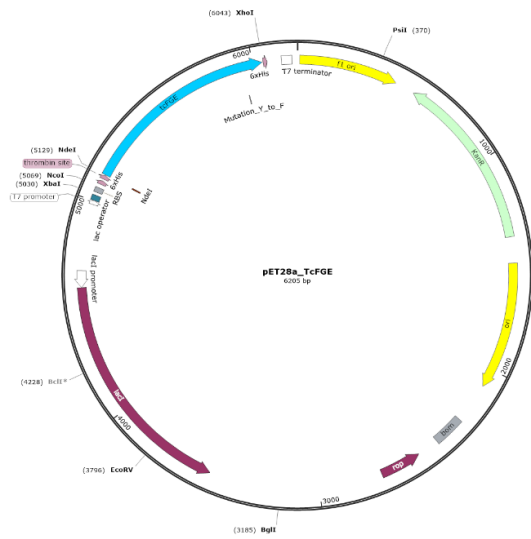
pET14b



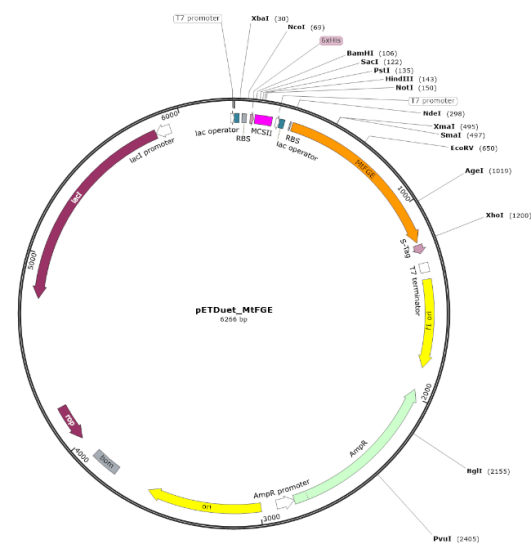
pET24b



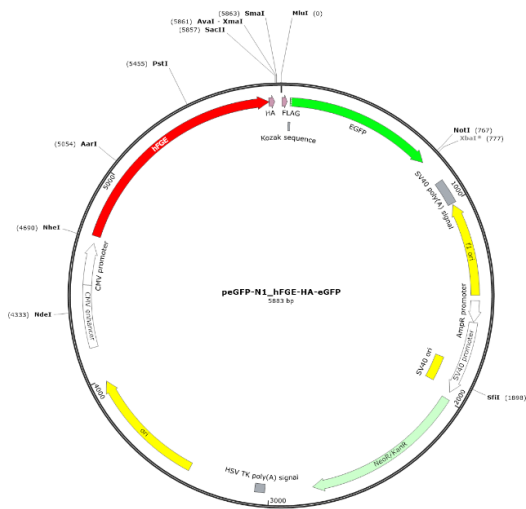
pET28a



pETDuet



peGFP-N1



pMAL-c5x



9 Danksagung

Viele Missverständnisse entstehen dadurch, dass ein Dank nicht ausgesprochen, sondern nur empfunden wird. – Ernst R. Hauschka

Zuallererst Danke an meinen Doktorvater Prof. Dr. Thomas Dierks. Leider bist du zu früh gegangen, um diese Schrift, den langersehnten Abschluss dieser intensiven Phase und auch die gemeinsame Fahrt mit dem Promotionswagen miterleben zu können, aber du warst und bist immer ein Teil dieses Lebenskapitels. Danke für den Platz in der Arbeitsgruppe, die Weitergabe von Wissen und vor allem für die Möglichkeit, viele Erfahrungen rund um die eigenständige Forschung im Labor, den wissenschaftlichen Austausch auf Konferenzen und das Anleiten des Nachwuchses sammeln zu können.

Die Wissenschaft entsteht im Gespräch. – Werner Heisenberg

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Norbert Sewald für das großzügige Angebot bedanken, die Betreuung und das Erstgutachten meiner Doktorarbeit zu übernehmen. Die Unterstützung, die ich nicht nur zum Ende meiner Promotion, sondern auch während des Verlaufes des SPP-Projektes erfahren habe, ist nicht selbstverständlich. Danke daher auch an Prof. Dr. Kristian M. Müller für die Übernahme meines Zweitgutachtens und als tatkräftiger Kooperationspartner.

Wissenschaftliche Forschung läuft immer darauf hinaus, dass es plötzlich mehrere Probleme gibt, wo es früher ein einziges gegeben hat. – Norman Mailer

Für den wissenschaftlichen Diskurs, viele Hilfestellungen und Erklärungen rund um das Formylglycin bedanke ich mich auch bei Dr. Karthikeyan Radhakrishnan und Dr. Sarfaraz Alam. Danke an Apl. Prof. Dr. Torben Lübke, Dr. Judith Koliwer und Dr. Björn Kowalewski für konstruktive Gespräche und an Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard für Ratschläge rund ums Isotopenlabor. Danke an Kerstin Böker, Mai-Britt Ilse, Dr. Christiane Wiegand und Sabine Klusmann. Ihr habt für unser leibliches Wohl durch Naschwerk und Koffein gesorgt, eure Praxiserfahrung weitergegeben, habt mich an verteuften Tagen sogar ganz abgelöst, zahlreiche Ausflüge und Feste geplant oder alles geregelt und geschaukelt wie es kein anderes Quartett tun könnte.

Das neue Windows kann einfach alles, Dank 32 Bit! Wenn ich 32 Bit getrunken habe, glaube ich auch immer, dass ich alles kann. – Harald Schmidt

Ich glaube es erklärt sich von selbst, dass ich dieses Zitat Rainer Beckmann und allen technischen Helferlein und Herlfers-Helfern widme. Isotopenlabor, Werkstätte befreundete Arbeitsgruppen und, und, und. Ihr habt den Betrieb am Laufen gehalten.

*Je größer das Vertrauen in die Wissenschaft gewesen war, umso bitterer war die Enttäuschung.
– Francesco de Sanctis*

Oder auch:

Die Arbeit ist immer mehr wert als der Preis, den man für sie zahlt. – Maxim Gorki

Dear Friends of FGE, mit diesen Zitaten möchte ich meinem Team danken, meinen Reisegefährten und Leidensgenossen, die bielesfelder Ausführung des SPP1623. Danke an Dr. Marcus Gerlach und Georg Falck für die Etablierung des Projektes rund um den ADC. Danke an Nils Günther Janson und Lennard Karsten für die harte Arbeit an mehr als einer Baustelle. Es war nicht immer leicht und selbsterklärend, aber in meinen Augen haben wir alle tapfer gekämpft und aus jeder Konferenz das Beste herausgeholt. Sowohl im Labor als auch auf dem Wasser oder beim Tischfußball, vor diversen Postern und auf vielen langen Stunden im deutschen Fernverkehr wart ihr mir tolle Kollegen. Besonders möchte ich dabei Dr. Tobias Krüger hervorheben, das Tobi-OD-Meter und der Master of (AtsB)-Desaster. Wer hätte gedacht, dass wir uns von Kommilitonen zu dicken Freunden und Hotel-Buddies weiterentwickeln? Im Labor war es noch nie so laut, ob vor Wut oder Freude, wie mit uns beiden in einem Raum.

Die Wissenschaft ist der Kapitän und die Praxis, das sind die Soldaten. – Leonardo da Vinci

Die BC13, die Fusion der wilden Kreativität der BCIII und der eisernen Rätselwütigkeit der BCI, war mir die letzten Jahre ein Zuhause. Für witzige Zeiten bei Bratwurst, Feierabendbier, Kreuzworträtseln, Frühstückskaffee und der Mensa bedanke ich mich bei aktuellen und ehemaligen Kollegen und Freunden: Dr. Arne Linhorst, Dr. Heike Wolf, Phillipp Neuhaus, Andrea Nolting, Marcel Freye, Tobias Beuel, Christian Bartz, Tobias Heinks, Hannah Bäumges, Dr. Christian Bollmann, Dr. Simone Schmücker, Dr. Thorsten Kunz, Dr. Katharina Hahn, Dr. Jörn Michael Völker, Dr. Rimma Bachmann, Dr. Susanne Schöning, Marli Morais Duarte, Dr. Svenja Bloess, Lara Petersen, Marc Heß, Julia Grosse, Niklas Krause, Sven Meinerz, Katharina Kotschnew und Simon Koopmeiners. Ihr habt mir nicht nur eine lange Liste an Spitznamen verpasst, sondern auch viele bleibende Erinnerungen geschaffen. Danke auch an alle, die ich zum Korrekturlesen einspannen konnte. Have Fun!

Denken ist oft schwerer als man denkt. – Werner Mitsch

Immer wenn ich mal wieder eine Pause brauchte, meine Reserven auffüllen oder mein Leid klagen musste wart ihr für mich da. Sandy Sontowski, Ann-Christin Moritzer, Dr. Hannah Minges, Dr. Rebecca Feiner. Danke, dass es euch gibt.

Jede Arbeit ist wichtig, auch die kleinste. – Robert Bosch

Auf Trapp haben mich auch unzählige Azubis und Studenten gehalten. Um ein paar zu nennen, an denen ich meine Lachmuskeln trainieren, meine Geduld verlieren oder einfach eine schöne Zusammenarbeit genießen durfte: Maren Lück, Lennart Korf, Maren Korf, Kerstin Fentker, Nils Berelsmann, Marijan Probst, Dominik Andrae, Annamaria Latus, Anna Zwafing, Karen Masch, Johanna Opgenoorth, Kirill Kuhlmann, Carmen Gelze, Franziska Wößmann, Lukas Franz und Philipp Borchert.

Nicht das Beginnen wird belohnt, sondern einzig und allein das Durchhalten.

– Katharina von Siena

Geholfen durchzuhalten hat mir meine Familie. Danke ihr grillwütigen Boschanskis und Uffmänner. Danke für alles Oma, Mama, Papa, Schwesterherz, Schwager und Lieblingsneffe. Dass ich immer einen Ort hatte, an den ich gehen konnte, ob zum Abreagieren, mal wieder richtig ausschlafen, Urlaub machen, durchgefüttert oder einfach nur abgelenkt zu werden, bedeutet mir sehr viel. Ich wollte immer nur eins, euch stolz machen und dabei bin ich so irre stolz auf jeden einzelnen von euch.

Studentinnen, die bis zum zehnten Semester noch keinen Doktor geangelt haben, müssen ihn selber machen. – Markus M. Ronner

Gerrit, du warst mein Ansporn und meine Ablenkung. Bei dir muss ich mich nicht nur unendlich viel bedanken, ich muss mich entschuldigen. Für die vielen Tiraden und Geschichten von der Arbeit, für die Stimmungen nach Feierabend und fürs häufige Einschlafen mitten im Film. Danke, dass du immer an meiner Seite bist.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät Chemie bekannt ist, die vorliegende Arbeit von mir selbst verfasst wurde, keine Textabschnitte von Dritten oder eigenen Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen wurden und alle benutzten Hilfsmittel und Quellen angegeben wurden. Des Weiteren haben Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Vermittlungstätigkeiten oder für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Diese Dissertation wurde von mir noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ich habe weder die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Datum

Unterschrift