

Technische Universität München
Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Lehrstuhl für Biologische Chemie



Studien zum biophysikalischen Verhalten von rekombinanten Aminosäurepolymeren definierter Zusammensetzung

Joscha Breibeck, M. Sc.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dieter Langosch

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Arne Skerra
2. Univ.-Prof. Dr. Christian F. W. Becker

Die Dissertation wurde am 02.02.2016 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt am 07.03.2016 angenommen.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Arne Skerra für seine richtungsweisenden Impulse und ständige Diskussionsbereitschaft während der kompetenten Betreuung dieser Arbeit, die hier als maßgeblicher Beitrag Anerkennung finden sollen. Er stellte eine ausgezeichnete Infrastruktur für die Forschung und seine reichen Erfahrungen zur Verfügung.

Allen Mitarbeitern der XL-protein GmbH möchte ich meinen Dank für ihre Kooperationsbereitschaft und den Ideenaustausch in mehreren Projekten aussprechen, die zu einem besseren Verständnis der Grundlagen beim Arbeiten mit PASylierten Proteinen führten. Besonders Herr M. Sc. Uli Binder leistete beständig wertvolle Hilfestellungen als Ansprechpartner, wofür ich mich ausdrücklich bedanken möchte. Unter den Mitarbeitern der Pieris AG danke ich Andrea Allersdorfer und Michaela Aloe für eine unkomplizierte Kooperation bei der Nutzung des Mikroviskosimeters.

Klaus Wachinger und Ina Theobald danke ich für ihre helfenden Hände bei arbeitsreichen Projekten wie der großtechnischen Proteinproduktion im Biotechnikum Garching und der Produktionsoptimierung PASylierter IL-1Ra-Varianten. In diesem Zusammenhang möchte ich auch dem Projektleiter des Technikums Dr.-Ing. Dominik Maslak meinen Dank aussprechen, der den Erfolg des Projekts durch großes Engagement und Einsatzbereitschaft ermöglichte. Meinen Dank möchte ich auch den Hilfskräften Therese Wiedemann und Martina Dotzauer für die herzliche Unterstützung im Laboralltag bekunden. Die wertvollen Beiträge meiner Studenten Adam Serafin, Xenia Priebe und Niko Stellner zu den anwendungsbezogenen PAS-Projekten sollen ebenso honoriert werden.

Bei allen Kollegen am Lehrstuhl für Biologische Chemie bedanke ich mich für ein wohlthuendes Arbeitsklima. Dabei gilt mein Dank für die fruchtbare projektbezogene Zusammenarbeit vor allem meiner Kollegin Nadine Kuhn sowie Herrn Dr. Martin Schlapschy, dessen Erfahrungen mit der PASylierung unser Arbeiten bereicherten. Auch die Arbeitserfahrung von Petra Kornberger und Lukas Eisoldt war immer wieder von großem Nutzen. An die auch über das Institut hinausgehenden gemeinsamen Erlebnisse mit Nadine und Sebastian Kuhn, Till Giese und meinem Laborpartner Simon Weiß werde ich immer gern zurückdenken.

Meiner Familie möchte ich meine größte Wertschätzung dafür bekunden, dass sie auch in turbulenten Phasen stets eine Quelle der Geborgenheit und Sicherheit für mich darstellte. Als großes Glück fasse ich die Möglichkeit auf, mich jederzeit meinen Großeltern Heinz und Irene, meinen Geschwistern Moritz, Frederic und Céline und meinen Eltern Wolfgang und Angelika anvertrauen zu können und auch an ihrem Leben teilzuhaben.

In meiner lieben Frau Felicitas habe ich eine verständnisvolle Partnerin gefunden und konnte stets Kraft aus unserer Beziehung schöpfen. Für die schönen Momente mit ihr bin ich ihr sehr verbunden und danke ihr dafür, endlich zuhause angekommen zu sein.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits bzw. werden in Kürze veröffentlicht:

- 1) **Breibeck, J., Serafin, A., Reichert, A., Maier, S., Küster, B. & Skerra, A.** (2014) PAS-cal: a Generic Recombinant Peptide Calibration Standard for Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 25, 1489-1497.

- 2) **Breibeck, J. & Skerra, A.** Insights into the polypeptide biophysics of proline/alanine-rich sequences (PAS): a PEG-like biomaterial. (Manuskript in Vorbereitung)

- 3) **Breibeck, J., Stellner, N., Friedrich, L. & Skerra, A.** Chemical PASylation – a biomimetic PEGylation approach based on recombinant proline/alanine-rich polypeptides. (Manuskript in Vorbereitung)

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Strategien zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit von Therapeutika	1
1.2	PEGylierung von Wirkstoffen und alternative Kopplung mit Biopolymeren	3
1.3	PASylierung von Therapeutika als innovative PEG-biomimetische Technologie	6
1.4	Expressionsstrategie zur Herstellung reiner PAS-Polypeptide	8
1.5	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1Ra) als Beispielkandidat für die PASylierung	11
1.6	Ziele der vorliegenden Arbeit	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Bakterienstämme und Vektoren	18
2.1.2	Oligodesoxynukleotide	18
2.1.3	Proteinreagenzien	21
2.1.4	Chemikalien	22
2.1.5	Standards und Kits	26
2.1.6	Geräte und Zubehör	27
2.1.7	Verbrauchsmaterial	32
2.1.8	Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen	34
2.2	Molekularbiologische Methoden	39
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	39
2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	40
2.2.3	Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA	40
2.2.4	Analytische Agarose-Gelelektrophorese	41
2.2.5	Präparative Gelelektrophorese	41
2.2.6	Reinigung von Oligodesoxynukleotiden	42
2.3	<i>In vitro</i> -Modifizierung von DNA	43
2.3.1	Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen	43
2.3.2	Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden und Dephosphorylierung	43
2.3.3	Ligierung von DNA-Fragmenten	44
2.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von Genen	44
2.3.5	Ortsgerichtete Mutagenese nach dem QuikChange-Verfahren	45
2.3.6	Gensynthese repetitiver PAS-Kassetten durch Assemblierung	46
2.4	Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	46
2.4.1	Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> -Kulturen im Schüttelkolben	46
2.4.2	Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> -Kulturen im Laborfermenter	48
2.4.3	Anzucht, Induktion und Ernte im TUM Forschungszentrum Weiße Biotechnologie	50
2.5	Proteinchemische Methoden	52
2.5.1	Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung	52
2.5.2	Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC)	53
2.5.3	Ionenaustauschchromatographie (IEX)	55

2.5.4	Hydrolytische Spaltung von PAS-Fusionsproteinen	56
2.5.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	58
2.5.6	<i>Western Blotting</i>	60
2.5.7	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	60
2.6	Biophysikalische Analysen	61
2.6.1	Größenausschlusschromatographie (SEC)	61
2.6.2	Viskosimetrie	63
2.6.3	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	65
2.6.4	Umkehrphasenchromatographie (RPC)	68
2.6.5	Löslichkeitsexperimente	69
2.6.6	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie	70
2.6.7	Massenspektrometrie: ESI- und MALDI-MS	71
2.7	Computerprogramme und Datenbanken	72
3	Ergebnisse	73
3.1	Biochemische und biophysikalische Charakterisierung von PAS-Polypeptiden	73
3.1.1	Design der PAS-Polypeptid-Sequenzen	73
3.1.2	Gentechnische Konstruktion der verwendeten PAS-Sequenzen	74
3.1.3	Konstruktion, Expression und Reinigung von PAS-IL-1Ra-Fusionsproteinen	78
3.1.4	Konstruktion von spaltbaren PAS-Fusionen mit SUMO	82
3.1.5	Konstruktion von spaltbaren PAS-Fusionen mit TrxA	84
3.1.6	Expression und präparative Reinigung von PAS-Polypeptiden	85
3.1.7	SDS-Laufverhalten von PAS-Polypeptiden	95
3.1.8	Löslichkeitseigenschaften von PAS-Polypeptiden	97
3.1.9	Konformationsanalysen von PAS-Polypeptiden	102
3.1.10	Hydrodynamische Charakterisierung von PAS-Polypeptiden	108
3.2	Entwicklung und Anwendung spezieller PAS-Polypeptide	121
3.2.1	Synthese und Einsatz von PAS-Kopplungsreagenzien	121
3.2.2	Eigenschaften von geladenen PAS-Sequenzen	134
3.2.3	Untersuchung Polypeptid-Sequenzen aus anderen Aminosäuren	145
3.2.4	PAS-cal: ein Peptid-Kalibrationsstandard für die Massenspektrometrie	151
4	Diskussion	162
4.1	Vergleichende biophysikalische Betrachtungen von PAS-Polypeptiden und PEG	162
4.1.1	Stand der PEGylierungs- und PASylierungstechnologie	162
4.1.2	Vorzugskonformationen und hydrodynamisches Volumen der Polymere in wässriger Lösung	164
4.1.3	Hydrodynamisches Volumen und Molekülform der Polymere	166
4.1.4	Viskosimetrische Untersuchungen der Polymere in wässriger Lösung	167
4.1.5	Hydrophiler Charakter der Polymere	168
4.1.6	SDS-PAGE-Analysen der Polymere	169
4.1.7	Löslichkeitsverhalten der Polymere in wässriger Lösung	170

4.1.8	Löslichkeitsverhalten in organischen Lösemitteln	173
4.1.9	Löslichkeitsverhalten bei erhöhten Temperaturen	174
4.1.10	Chemischer Aufbau der Polymere	175
4.2	Effekte von Sequenzveränderungen auf die Eigenschaften von PAS-Polypeptiden	176
4.2.1	Vorzugskonformationen von Poly- <i>L</i> -Prolin in Lösung	176
4.2.2	Konformationelle Betrachtungen Prolin-reicher Polypeptide	177
4.2.3	Konformationelle Betrachtungen von PAS-Polypeptiden	180
4.2.4	Temperaturabhängige Konformationsübergänge der PAS-Polypeptide	182
4.2.5	Auswirkungen von anderen Aminosäuren auf die Polypeptidkonformation	184
4.2.6	Ladungsbedingte Veränderungen in PAS-Polypeptiden	186
4.3	Chemische Kopplung von PAS-Polypeptiden als Alternative zur PEGylierung	189
4.3.1	Therapeutische Anwendungen von PEG-Konjugaten mit nicht Protein-basierten Wirkstoffen	189
4.3.2	Chemische Konjugationsmethoden für lineare Konjugate mit PAS-Polypeptiden ..	191
4.3.3	Chemische Konjugationsmethoden für PAS-Polypeptide zur Erzeugung einer Verzweigungsstelle	192
4.3.4	Reversible PEGylierung für pharmakologisches <i>Fine-Tuning</i>	193
4.4	Anwendung eines PAS-Polypeptids als Standard für die Massenspektrometrie	196
4.4.1	Stand der Technik von Standards zur MS-Kalibrierung	196
4.4.2	Rekombinante Polypeptide als MS-Standards	197
4.4.3	Ein Polypeptid-Standard auf Basis der PASylierungstechnologie	198
5	Zusammenfassung	201
6	Summary	203
7	Abkürzungsverzeichnis	205
8	Literaturverzeichnis	207
9	Anhang	227

1 Einleitung

1.1 Strategien zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit von Therapeutika

Ein bedeutender Nachteil für den Einsatz der meisten Pharmazeutika ist deren im Vergleich zu den Poren der Niere geringe Molekülgröße. Das macht die Wirkstoffe anfällig für eine rasche Filtration aus dem Blutstrom, führt damit zu einer unzureichenden Zirkulationsdauer und verhindert die volle Entfaltung des pharmakologischen Potentials. Um diesen Missstand zu beheben, sind mehrere Technologien verfügbar, die auf zwei unterschiedlichen Prinzipien beruhen: (1) dem Recycling von Pharmazeutika aus dem Blutstrom oder (2) einer Verzögerung der Nierenfiltration durch die Vergrößerung der Moleküldimensionen über eine Erhöhung des dynamischen Volumens (Binder & Skerra, 2015).

Die einzigen Biopharmazeutika, die auch ohne Modifikation eine lange Halbwertszeit von 1 bis 2 Wochen im Blutplasma zeigen, stellen monoklonale Antikörper dar. Diese glykosylierten Proteine mit Molekulargewichten um 150 kDa sind zum einen zu groß für die Filtration durch Nierenporen, zum anderen profitieren sie vom endosomalen Recycling durch den neonatalen Fc-Rezeptor FcRn (Kuo & Aveson, 2011). Dieser Rezeptor, der beispielsweise auf Gefäß-Endothelzellen vorkommt, wird neben Immunoglobulinen (IgG) auch von humanem Serumalbumin (HSA) angesteuert, dem häufigsten Plasma-Protein mit einer Konzentration von etwa 50 g/L (Yousefpour & Chilkoti, 2014), und ermöglicht die gezielte Nutzung für das Wirkstoff-Recycling. Die Fusion eines therapeutisch aktiven Proteins oder Peptids mit Albumin oder einer Fc-Domäne hat die Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit zur Folge, indem der Wirkstoff nach Aufnahme durch Endothelzellen vor endosomalem Abbau geschützt und zurück zur Plasmamembran geschleust wird (Anderson *et al.*, 2006; Lencer & Blumberg, 2005).

Der Wirkstoff Enbrel (Etanercept; Amgen; Kerensky *et al.*, 2012) ist ein Beispiel für ein erfolgreiches Fc-Fusionsprotein mit dem Rezeptor für den Tumor-Nekrose-Faktor TNF. Die Optimierung der Linkersequenz zwischen Fc-Domäne und therapeutischem Protein (z. B. PEG-Linker; LAPSCOVERY-Technologie, Hanmi Pharmaceuticals) und auch die Affinitätsmaturierung der verwendeten Fc-Domäne zum FcRn-Rezeptor (Zalevsky *et al.*, 2010) bilden die Basis neuer Technologie-Plattformen. Unter den therapeutischen Proteinen, die an Albumin fusioniert wurden, sind beispielsweise menschliches Wachstumshormon hGH (Albutropin; Osborn *et al.*, 2002) und der GLP-1-Agonist Tanzeum (GlaxoSmithKline; Poole & Nowlan, 2014) anzuführen.

Diesen Ansätzen gemein ist die Fusion des Biotherapeutikums mit einem großen Protein, das seine eigenen spezifischen Oberflächenstrukturen in das resultierende Fusionskonstrukt miteinbringt und dessen Eigenschaften prägt. So können Therapeutika in Fusion mit der sterisch anspruchsvollen und unflexiblen Fc-Domäne unbeabsichtigt in ihrem spezifischen Wirkverhalten beeinträchtigt werden (Glaesner *et al.*, 2010) und teilweise aufgrund unerwünschter Effektorfunktionen nicht einmal bis zu ihrem Wirkungsort vordringen (Czajkowsky *et al.*, 2012).

Zur Vermeidung der Fusion an große Proteine kann die FcRn-Rezeptor-Affinität zu Albumin auch indirekt durch Albumin-Bindungspartner genutzt werden. Zur Fusion an therapeutische Proteine und Peptide eignen sich Albumin-Bindedomänen (ABD), wie an einem 4D5-Fab-Fragment gezeigt wurde (Schlapschy *et al.*, 2007), und auch natürliche Albumin-Liganden wie Fettsäuren, angewandt im Insulin-Fettsäure-Konjugat Tresiba (Novo Nordisk; Kratz, 2014).

Die andere Strategie zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit basiert auf der Erhöhung des hydrodynamischen Volumens kleiner Moleküle durch Kopplung an Polymere, die selbst ein großes Volumen annehmen (Liechty *et al.*, 2010). Meist zeigen die hierfür verwendeten Makromoleküle eine *Random-Coil*-artige Sekundärstruktur, was ein (Bio)Molekül enormen apparenten Molekulargewichts simuliert, welches zu groß für die Filtration durch Nierenporen ist. Die zu diesem Zweck verwendeten Polymere erfordern in der Regel eine chemische Kopplung mit dem pharmakologischen Wirkstoff, die dessen Eigenschaften beeinträchtigen kann und vor allem bei therapeutischen Proteinen bezüglich der Kopplungsstelle und des Kopplungsgrads nur schwer zu kontrollieren ist. Zudem müssen die resultierenden Polymerkonjugate volle Biokompatibilität aufweisen (Twaites *et al.*, 2005). Damit der Einfluss des Polymers auf die Eigenschaften des Konjugats möglichst gering und die Plasma-Halbwertszeit möglichst lang ausfällt, sind hydrophile und neutrale Polymere zu bevorzugen (Haag & Kratz, 2006), die durch Erhöhung der Löslichkeit die Immunogenität und Toxizität des Wirkstoffs sogar herabsetzen können (Liu *et al.*, 2009). Das erste und bisher am erfolgreichsten eingesetzte Polymer zur Verbesserung der Pharmakokinetik und -dynamik von Wirkstoffen ist Polyethylenglykol (Markovsky *et al.*, 2012).

1.2 PEGylierung von Wirkstoffen und alternative Kopplung mit Biopolymeren

Die Technologie der PEGylierung basiert auf der Kopplung von Polyethylenglykol mit einem Biopharmazeutikum, um dessen hydrodynamisches Volumen zu erhöhen (Harris & Chess, 2003; Israelachvili, 1997). Für die PEGylierung stehen zahlreiche Reagenzien zur Verfügung, die die zielgerichtete chemische Kopplung von PEG-Molekülen an Wirkstoffe ermöglichen (Veronese & Pasut, 2005). PEG-Polymere können in diversen linearen und verzweigten Formen mit einstellbaren hydrodynamischen Eigenschaften hergestellt und chemisch so modifiziert werden, dass sie mittels unterschiedlicher chemischer Kopplungsreaktionen an dem Wirkstoff angebracht werden können.

Proteine und Peptide sind an den primären Aminogruppen des N-Terminus oder der Lysin-Seitenketten mittels Säureamid-Bindung modifizierbar. Die ersten zugelassenen PEG-Konjugate mit Adenosin-Deaminase (Pegademase bovine, Adagen; Enzon Pharmaceuticals; Booth & Gaspar, 2009) und Asparaginase (Pegaspargase, Oncaspar; Patel & Benfield, 1996) wurden durch die zufallsgesteuerte Kopplung mehrerer linearer, kurzer PEG-Ketten (5 - 10 kDa) an die Lysin-Seitenketten der Proteine hergestellt. Durch zufallsgerichtete Kopplung chemisch aktivierter verzweigter 40 kDa-PEG-Polymere an die Lys-Seitenketten des rekombinanten Interferon- α -2a wurde der Wirkstoff Pegasys erhalten (Reddy *et al.*, 2002). Später ging man zur Konjugation eines einzelnen längeren PEG-Moleküls (12 - 30 kDa) über, beispielsweise bei IFN- α -2b (PEG-Intron, Enzon Pharmaceuticals), dessen Histidin-Rest an Position 34 zur Ausbildung einer hydrolyseempfindlichen Urethanbindung mit einem 12 kDa-PEG-Polymer herangezogen wurde (Foster, 2010).

Aber auch die Thiol-Funktionen von freien Cysteinresten eignen sich zur spezifischen Kopplung mit thiolreaktiven chemischen Gruppen wie Iodacetamid oder Maleimid. Anhand des Wirkstoffs Cimzia (Blick & Curran, 2007) als Konjugat einer verzweigten 40 kDa-PEG-Kette an einen mittels Protein-Engineering eingeführten freien Cystein-Rest eines gegen Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) gerichteten Fab-Fragments ist der Trend zur ortsspezifischen chemischen Kopplung und zur Verwendung verzweigter PEG-Polymere auszumachen, die zu größeren hydrodynamischen Volumina bei verringerter Viskosität führen können (Kling, 2013). Die PEGylierung therapeutischer Proteine/Peptide mit Hilfe derartiger Kopplungsmethoden ist bereits etabliert und kann im Prinzip auf jede chemische Verbindung angewandt werden. Besonders interessante Kandidaten für die PEGylierung sind *Small-Molecule*-Wirkstoffe wie Camptothecin, Methotrexat und *cis*-Platin, deren pharmakologischer Effekt durch die extrem niedrige

Plasma-Halbwertszeit *in vivo* limitiert ist (Pasut *et al.*, 2004). Zur Konjugation mit PEG-Polymeren können auch Peptidyl- und Glykosyl-Transferasen eingesetzt werden. Dies wurde z. B. durch Transglutaminase-vermittelte Kopplung von Amino-PEGs an Glutamin-Reste (Sato, 2002) bzw. die Konjugation von Sialyl-PEGs durch Sialyltransferase (DeFrees *et al.*, 2006) gezeigt, welche die vorhergehende enzymatische Modifikation der zu koppelnden Proteine mit *N*-Acetylgalactosamin erforderte (Chen *et al.*, 2003). Die Kopplung über maßgeschneiderte spaltbare Linker erlaubt sogar die zeitlich und mitunter lokal regulierbare Abspaltung des Wirkstoffs vom PEG-Polymer (Filpula & Zhao, 2008).

Ein weiterer Vorteil, den die PEGylierung bietet, ist die sterische Abschirmung des Biotherapeutikums von Proteinen oder Antikörpern, was sich in verringerter Immunogenität bei Erstverabreichung des Wirkstoffs (Yang *et al.*, 2004) sowie einer reduzierten Immunantwort gegen das Antigen bei Vorimmunisierung (Yang *et al.*, 2003) äußert. Die PEGylierung der Adenosin-Deaminase (Pegademase bovine) z. B. bewirkte eine deutlich reduzierte Immunogenität in Mäusen (Davis *et al.*, 1981); PEG-modifizierte rekombinante Methioninase führte zu einer mindestens 100fach abgeschwächten Immunantwort gegenüber dem nicht PEGylierten Enzym in Makaken (Yang *et al.*, 2004). PEGylierte scFv-Antikörperfragmente gegen TNF α demonstrierten abhängig von der PEG-Kettenlänge einen maßgeblichen Rückgang der Reaktivität gegenüber einem Antiserum aus Kaninchen, welche mit dem nicht PEGylierten scFv-Fragment immunisiert waren (Yang *et al.*, 2003). Auch ein Rückgang der Zelltoxizität ist insbesondere bei PEGylierten Anti-Tumor-Therapeutika feststellbar. Die PEGylierung unter Verwendung spaltbarer Linker am Beispiel des *Pseudomonas*-Immunitoxins SSP1 (Enzon Pharmaceuticals) führte zu dessen vollständiger Inaktivierung in Cytotoxizitäts-Assays, aber zu einer erhöhten Bioaktivität *in vivo* (Filpula *et al.*, 2006). Die reversible Konjugation mit PEG ermöglichte die zeitlich kontrollierbare Freisetzung der toxischen Wirkung von SSP1 durch spontane Hydrolyse des Linkers. Zudem zeigt sich für PEGylierte Substanzen eine erhöhte Stabilität gegenüber enzymatischem Abbau (Pasut *et al.*, 2004).

Für viele Anwendungen ist eine hohe Probenhomogenität erforderlich, die jedoch durch die Kopplung mit chemischen Polymeren nicht gewährleistet werden kann. Diese fallen herstellungsbedingt nämlich als intrinsisch inhomogene Präparationen mit einer statistischen Molekulargewichtsverteilung an (Bagal *et al.*, 2008). Die Konjugation mit PEG-Polymeren im Bereich von 20 bis 200 kDa ermöglicht die Vergrößerung des hydrodynamischen Durchmessers von Wirkstoffen auf 20 bis 100 nm, wodurch diese

nicht nur zu groß für die Filtration durch die Basalmembran der Nieren-Glomeruli (Ausschlussgröße: 3,5 - 4 nm) werden (Haraldsson *et al.*, 2008), sondern auch vom Effekt erhöhter Permeabilität und Retention (EPR-Effekt) profitieren (Markovsky *et al.*, 2012). Dieser Effekt wird beim Tumor-*Targeting* genutzt und basiert auf der spontanen Diffusion von Makromolekülen in das poröse Tumorgewebe und deren Anreicherung aufgrund mangelhafter Lymphdrainage (Maeda *et al.*, 2000). Obwohl mittlerweile nahezu monodisperse PEG-Moleküle mit steigender Kettenlänge und Qualität produziert werden können, gestaltet sich deren Herstellung als enorm kostspielig. Tatsächlich monodisperse PEG-Präparationen in den pharmakodynamisch relevanten Kettenlängen (> 20 kDa) können mit der bisherigen Produktionsstrategie durch Epoxid-Polymerisation nicht erschlossen werden (Zacchigna *et al.*, 2011).

Dass vor allem die therapeutisch interessanten längeren PEG-Ketten (> 20 kDa) nicht bioabbaubar sind, stellt einen großen Nachteil dieser makromolekularen Verbindung dar. Nach der Abspaltung vom PEGylierten Wirkstoff reichern sich die PEG-Moleküle mit unvorhersehbaren, potentiell schädlichen Konsequenzen in verschiedenen Körperzellen an und verbleiben als Altlast der therapeutischen Behandlung im Organismus. In Tiermodellen wurden mit PEG angereicherte Vakuolen in Leber- und Nierenzellen (Bendele *et al.*, 1998), in Makrophagen (Young *et al.*, 2007) und sogar in den Ependymzellen der Blut-Hirn-Schranke im *Plexus choroideus* (EMA, 2010; 2012) nachgewiesen. Derartige PEG-Rückstände stehen als Ursache des makromolekularen Syndroms in Verdacht (Veronese & Pasut, 2005).

Daher sind derzeit verstärkt bioabbaubare Polymere, die keine Ablagerungen im Körper des Patienten hinterlassen, Gegenstand pharmazeutischer Entwicklungen (Godwin *et al.*, 2001). Lange Kohlenhydrat-Ketten wie Polysialinsäure (PolyXen, Xenetic Biosciences; Gregoriadis *et al.*, 2005), Heparosan (HEPtune, Caisson Biotech; DeAngelis, 2013) oder die Hydroxyethylstärke (HESylierung; Sommermeyer *et al.*, 2002) fanden bereits Anwendungen in den Konjugaten Polysialinsäure-L-Asparaginase (Fernandes & Gregoriadis, 2001), Heparosan-Insulin (Caisson Biotech) und HES-Kineret (Liebner *et al.*, 2014). Allerdings laden Polysialinsäure und Heparosan das Konjugat mit vielfachen negativen Zusatzladungen auf, mit dramatischen Auswirkungen auf den pI-Wert. Abgesehen davon involviert die Konjugation der Biopolymere an die Wirkstoffe immer noch die chemische Kopplung der synthetisierten Polymere oder einen zusätzlichen aufwendigen Mechanismus der post-translationalen Modifikation. Die Kohlenhydrat-Ketten erfordern komplexe Biosynthesen und teilweise aufwendige chemoenzymatische Modifikationen, die vor allem bei Polysialinsäure zu einer unver-

meidlichen Polydispersität führen (Zheng *et al.*, 2013). Für künftige Anwendungen wird ein erhöhter Bedarf an langkettigen bioabbaubaren Polymeren (> 30 kDa) geringer Polydispersität (Polydispersitätsindex < 1,5) erwartet (Haag & Kratz, 2006).

1.3 PASylierung von Therapeutika als innovative PEG-biomimetische Technologie

Eine aktuelle Innovation ist der Ansatz, Wirkstoffe auf genetischer Ebene mit strukturell ungeordneten löslichen Polypeptiden zu fusionieren, welche Eigenschaften von Polymeren wie PEG imitieren. Da die Biosynthese eines solchen Polypeptids direkt mit der des therapeutischen Proteins gekoppelt ist, stellen sich Fragen nach Homogenität, Kopplungseffizienz, Ortsspezifität und konstanter Probenqualität grundsätzlich nicht. Bei dieser Strategie zur hydrodynamischen Vergrößerung von injizierbaren Wirkstoffen sind Polypeptide wünschenswert, die einen möglichst geringen Einfluss auf den Fusionspartner ausüben.

Beispielsweise sind Peptidsequenzen mit einer hohen Dichte negativer Ladungen nur bedingt von Nutzen, auch wenn sie ungeordnete Strukturen aufweisen (Schellenberger *et al.*, 2009), da die elektrostatische Abstoßung von Membran-Phospholipiden und Glucosaminoglykanen die Passage durch biologische Membranen sowie die Diffusion in in die extrazelluläre Matrix erschwert (Markovsky *et al.*, 2012). Andere Polypeptide wie z. B. die NNT-Sequenzen (GlycoPolymer, Aequus Biopharma), basierend auf Wiederholungseinheiten dieses menschlichen Glykosylierungssequons, zeigen die gewünschten Volumeneffekte erst nach *N*-Glykosylierung und sind somit auf post-translationale Modifizierung in eukaryotischen Expressionssystemen angewiesen und auf diese beschränkt (Besman *et al.*, 2009).

Die Technologie der PASylierung wurde entwickelt, um die beschriebenen Anforderungen an ein rekombinantes Biopolymer zu erfüllen (Binder & Skerra, 2015; 2012; Schlapschy *et al.*, 2013). PAS-Polypeptide sind aus langen repetitiven Sequenzen der drei kleinen Aminosäuren Prolin, Alanin und Serin zusammengesetzt. Die Bezeichnung „PAS“ impliziert ursprünglich also diese Aminosäure-Zusammensetzung, kann aber auch als „Prolin-Alanin-reiche Sequenz“ verstanden werden. Die PAS-Polypeptidsequenzen wurden mit dem Ziel entwickelt, hydrophile Biopolymere zu erzeugen, die in wässriger Lösung unter physiologischen Bedingungen eine stabile *Random-Coil*-Konformation mit einem großen hydrodynamischen Volumen annehmen. Zur Vermeidung intermolekularer Wechselwirkungen wurden hydrophobe und geladene

Aminosäurereste als mögliche Bausteine ausgeschlossen, ebenso wie hydrophile Reste mit starken Tendenzen zur Bildung von Sekundärstrukturen. Die so ausgewählten Reste Prolin, Alanin und Serin nehmen bekannterweise als Homopolymere charakteristische Sekundärstrukturen an: α -Helix bei Poly-L-Alanin (Shental-Bechor *et al.*, 2005), β -Faltblatt bei Poly-L-Serin (Quadrioglio & Urry, 1968) und Polyprolin II-Helix bei Poly-L-Prolin (Stapley & Creamer, 1999). Allerdings wurde angenommen, dass durch die gezielte Abwechslung der drei verschiedenen Aminosäurereste in einem PAS-Polypeptid die intrinsischen strukturellen Tendenzen der einzelnen Aminosäuren einander entgegenwirken und so die erwartete *Random-Coil*-Struktur stabilisieren würden. Außerdem wurden längere regelmäßige Wiederholungseinheiten bei den klassischen PAS-Sequenzen vermieden (Schlapschy *et al.*, 2013).

Nach der Expression des Fusionskonstrukts ist keine weitere Modifikation nötig, und durch das Fehlen geladener Reste wird, analog zur PEGylierung, der pI-Wert von Therapeutika nicht verändert. Dadurch ist die PASylierung in vollem Maße kompatibel mit allen Arten von Transmembran-Transportprozessen, die bei der Herstellung von Proteinmedikamenten, welche oft mittels pro- oder eukaryotischer zellulärer Sekretionsysteme erfolgt, und auch bei deren Wirkungsweise involviert sind. Expressionsstrategien für Proteine mit mehreren konstitutiven Disulfidbrücken wie die Sekretion ins oxidierende Periplasma von *E. coli* (Skerra & Plückthun, 1988) oder die extrazelluläre Sekretion aus Säuger-Zellkultur (CHO, HEK, COS) bzw. Hefekultur (*P. pastoris*, *K. lactis*) werden durch PASylierung nicht beeinträchtigt. Auch die extrazelluläre Sekretion PASylierter Proteine aus *E. coli* in das Kulturmedium (EHETEC-Technologie, Wacker Biotech) ist mit hohen Proteinausbeuten möglich, wie mit hGH demonstriert (Di Cesare *et al.*, 2013). Vor allem Wirkstoff-Konjugate zur Tumorbekämpfung müssen auf dem Weg an ihren spezifischen Wirkungsort im Cytoplasma von Tumorzellen mehrere Membranen überwinden, und ungeladene Polymere erleichtern die Internalisierung durch Endocytose (Markovsky *et al.*, 2012).

Bisher wurden C- oder N-terminale Fusionsproteine mit PAS-Polypeptidsequenzen bis zu einer Länge von 1000 Aminosäuren hergestellt. Alle Fusionskonstrukte zeigten ein stark erhöhtes hydrodynamisches Volumen und eine verlängerte Plasma-Halbwertszeit in Tierstudien, ohne dabei die biologische Aktivität der therapeutischen Proteine signifikant herabzusetzen (Schlapschy *et al.*, 2013), wie bereits für PEG-Konjugate aufgrund eines Abschirmungseffekts beobachtet (Jevsevar *et al.*, 2010). Unabhängig von der Injektionsmethode (intramuskulär, subcutan, intravenös) wurde in zahlreichen Tiermodellen die hohe Bioverfügbarkeit PASylierter Wirkstoffe nachgewiesen (Binder &

Skerra, 2015). Mit variablen PAS-Kettenlängen sind die pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften auf die vorliegenden Erfordernisse einstellbar, wie PAS(200)-modifizierte Fab-Fragmente für einen optimalen Kontrast im *In vivo*-Imaging zeigten (Mendler *et al.*, 2015). Für therapeutische Proteine mit Langzeitwirkung im Menschen eignen sich längere PAS-Polypeptide mit 600 bis 1000 Aminosäureresten. Ein PASylierter Interferon-Superagonist führte zu einer 10fach verlängerten (Harari *et al.*, 2014) und das PAS(600)-hGH-Fusionsprotein zu einer 95fach (Schlapschy *et al.*, 2013) verlängerten pharmakodynamischen Halbwertszeit im Mausmodell. Das PASylierte Hormon PAS(600)-Leptin führte in Mäusen zu einer deutlichen Reduktion der Nahrungsaufnahme; bemerkenswert ist, dass die Rezeptor-vermittelte Passage des Hormons Leptin durch die Blut-Hirn-Schranke infolge der PASylierung nicht beeinträchtigt wurde (Morath *et al.*, 2015).

Eine Limitierung der PASylierung in der genetischen Form besteht darin, dass mindestens ein Terminus des Protein/Peptid-Therapeutikums nach Fusion mit einer PAS-Sequenz nicht mehr frei zur Verfügung steht und zudem die Methodik auf gentechnisch herstellbare Protein/Peptid-Wirkstoffe beschränkt ist.

1.4 Expressionsstrategie zur Herstellung reiner PAS-Polypeptide

Um isolierte PAS-Polypeptide für polymerwissenschaftliche Untersuchungen zu erhalten, können diese als Fusionspartner am C-Terminus kleiner löslicher Proteine hergestellt werden, von denen sie nach der Reinigung durch verschiedene Methoden abgespalten werden können. Diese Vorgehensweise hat folgende Vorteile:

- (1) Sicherstellung einer effektiven Translationsinitiation über das N-terminale Protein, ggf. mit einem Hexahistidinhängsel (Bosse-Doenecke *et al.*, 2008),
- (2) Erzeugung völlig unmodifizierter PAS-Polypeptide, d. h. ohne Affinitätsanhängsel oder andere zusätzliche Aminosäurereste, und
- (3) Möglichkeit zur effizienten Reinigung des Fusionsproteins mit proteinchemischen Standardmethoden (Chromatographie, SDS-PAGE) vor der Spaltung.

Das erste in dieser Arbeit angewandte Expressionssystem basiert auf einer Fusion der PAS-Sequenzen mit dem SUMO-Protein Smt3 aus *S. cerevisiae* (Wang *et al.*, 2010), welches anhand seiner charakteristischen Ubiquitin-Faltung aus zwei α -helicalen und fünf β -Faltblatt-Strängen von der konformationsspezifischen SUMO-Protease Ulp1 erkannt und hochspezifisch abgespalten werden kann (Mossessova & Lima, 2000; Bayer

et al., 1998). Durch Expression als SUMO-Fusionsproteine und anschließende Ulp1-Spaltung wurden beispielsweise katalytisch aktive Recombinase A aus *E. coli* (Lee *et al.*, 2008a) oder auch verschiedene Peptid-Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wie das humane Glucagon-ähnliche Peptid und Parathormon (Bosse-Doenecke *et al.*, 2008) in hohen Ausbeuten hergestellt. Allerdings setzt diese Strategie bei Anwendung im Großmaßstab die Herstellung der Protease in größeren Mengen voraus, und das SUMO-System ist infolge seines patentrechtlichen Schutzes (Wang, 2011; Lima & Mossessova, 2011) für industrielle Applikationen nur bedingt verfügbar. Kommerziell erhältlich sind fertige Expressionskits mit Vektoren zur Insertion beliebiger Gene und deren Expression als SUMO-Fusionsproteine, welche durch die mitgelieferte SUMO-Protease gespalten werden können (z. B. Champion pET SUMO Protein Expression System, Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt; Espresso T7 SUMO Cloning and Expression System, Lucigen, Middleton, WI, USA). Neben den genannten Kits zur Expression in prokaryotischen Systemen gibt es auch solche zur Anwendung in eukaryotischer Zellkultur (z. B. pI-Insect (BEVS) SUMOstar Intracellular Expression Kit, LifeSensors, Malvern, PA, USA).

Alternativ kann Thioredoxin A (TrxA) aus *E. coli* als Fusionspartner eingesetzt (McCoy & La Ville, 2001) und dazu je nach Spaltmethode mit verschiedenen C-terminalen Aminosäuren versehen werden, wie in Abbildung 1 zusammengestellt. TrxA weist eine sehr kompakte globuläre Struktur auf, die von fünf β -Faltblatt-Strängen und 4 α -Helices stabilisiert wird. Als Teil des wirtseigenen Redox-Systems von *E. coli* ist es im Cytoplasma und den Mitochondrien in größeren Mengen präsent und eignet sich daher hervorragend zur Überexpression (Roos *et al.*, 2007). Sogar Säugerproteine, deren native Disulfid-Bindungen bei cytosolischer Expression in *E. coli* nicht ausgebildet werden können und die normalerweise in *Inclusion Bodies* aggregieren, fallen als Fusionsproteine mit TrxA zum größten Teil in löslicher Form an, was anhand von Interleukinen wie IL-1 und Wachstumsfaktoren wie G-MCF demonstriert wurde (LaVallie *et al.*, 1993). Die Liganden-Bindedomäne des menschlichen Östrogen-Rezeptors α wurde als durch Thrombin spaltbares TrxA-Fusionsprotein in *E. coli* hergestellt und nach der Reinigung direkt aus dem Spaltreaktionsansatz kristallisiert, während TrxA in Lösung blieb (Cura *et al.*, 2008).

Die jeweils auf die PAS-Fusionsproteine anwendbaren Spaltungsmethoden müssen hinsichtlich der jeweiligen PAS-Sequenz abgestimmt werden. Beispielsweise ist die aggressive chemische BrCN-Methode zur Spaltung nach einem Methionin-Rest (Gross, 1967) zur Vermeidung störender Nebenreaktionen nur bei Abwesenheit von

nucleophilen Seitenketten zu empfehlen und wurde in dieser Arbeit daher lediglich für die Serin-freien P/A-Polypeptide eingesetzt.

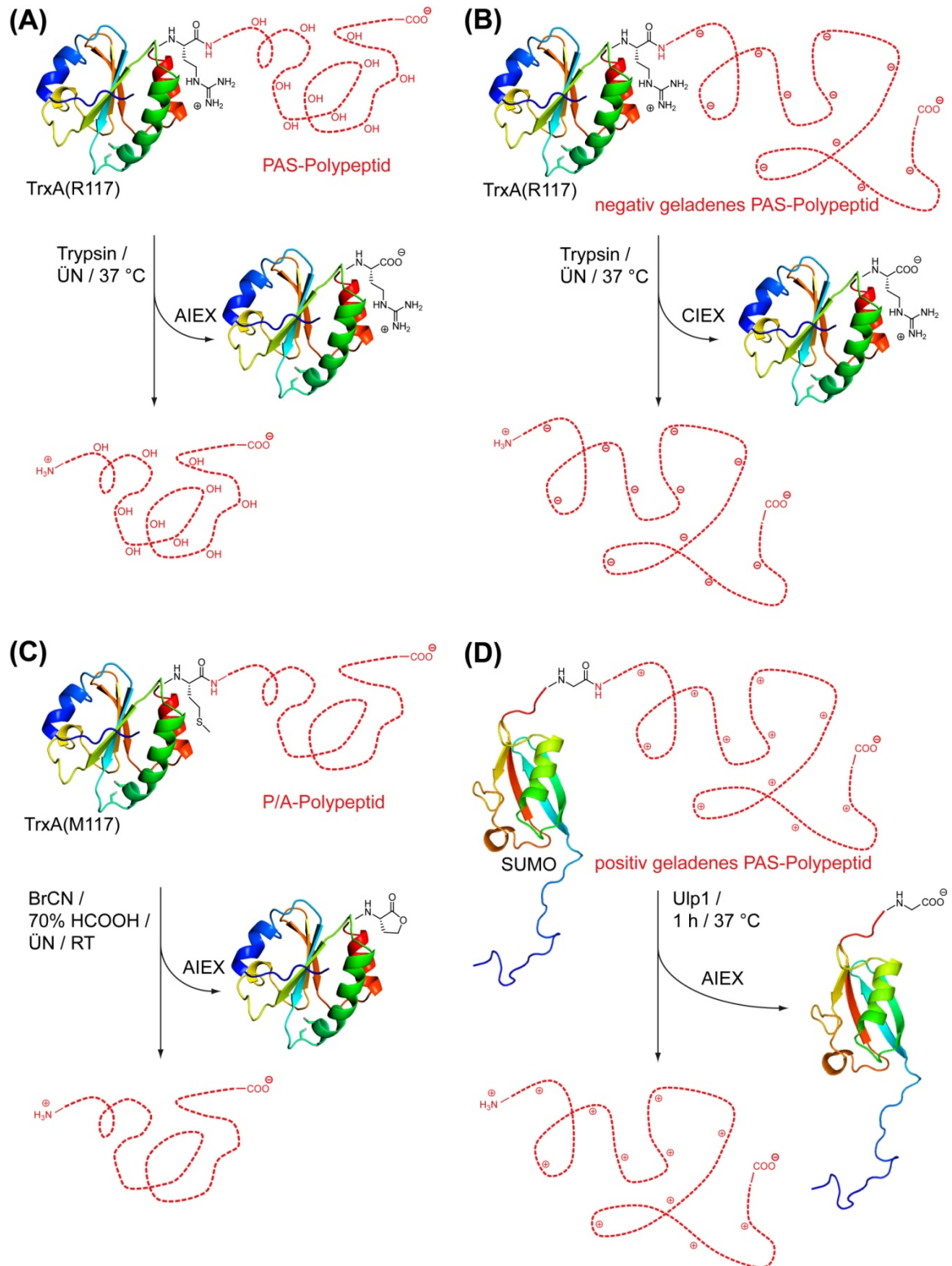


Abbildung 1: Expressionsstrategien zur Herstellung verschiedener PAS-Sequenzen als Fusionsproteine. Für die schematische Darstellung der Fusionsproteine mit TrxA (PDB 1T7P) bzw. SUMO (PDB 1A5R) (jeweils dargestellt mit PyMol, DeLano, 2002) wurden die PAS-Polypeptide als gestrichelte rote Linien stilisiert. Die in dieser Arbeit verwendeten TrxA-Proteine werden anhand der C-terminalen Aminosäure an der Spaltstelle (Position 117) als TrxA(R117) bzw. TrxA(M117) bezeichnet. Serin-Reste in den PAS-Polypeptiden sind durch „OH“ angedeutet und geladene Seitenketten durch das Vorzeichen ihrer Ladung. Geladene Sequenzen nehmen aufgrund elektrostatischer Abstoßung eine stärker elongierte Konformation ein. **(A)** Fusion von TrxA mit der PAS#1-Standardsequenz zur Trypsin-Spaltung am C-terminalen Arg-Rest. **(B)** Fusion von negativ geladenen PAS-Sequenzen mit TrxA. **(C)** Fusion von TrxA mit Serin-freien P/A-Polypeptiden zur Spaltung mit Bromcyan am Met-Rest. **(D)** Fusion von SUMO mit positiv geladenen PAS-Sequenzen zur Spaltung mittels Ulp1 am Gly-Rest.

Die klassischen PAS-Sequenzen erfordern eine mildere Vorgehensweise, die hier mit der enzymatischen Spaltung nach einem Arginin-Rest durch Trypsin (Olsen *et al.*, 2004) realisiert wurde. Während in die PAS-Sequenz eingebaute negative Ladungen diese Strategie nicht beeinträchtigen, musste für positive Ladungen ein alternativer Weg gewählt werden, da diese in Verbindung mit einem tryptischen Verdau zur Fragmentierung des PAS-Polypeptids führen würden. Daher wurde in diesen Fällen das ladungsunempfindliche SUMO-Fusionssystem herangezogen.

1.5 IL-1Ra (Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist) als Beispielkandidat für die PASylierung

Interleukine gehören zur Gruppe der Cytokine, die die akute Entzündungsreaktion des Organismus auf Verletzungen und vor allem virale Infektionen stimulieren. Besonders die Interleukin-1-Familie hat einen bedeutenden Anteil an der indirekten Regulierung der angeborenen Immunantwort (Dinarello, 2009). Durch biologische Regulationsprozesse wird dabei das Niveau der T-Helferzellen, Thrombocyten und anderer Blutzellen verstärkt (McInnes & Schett, 2007; Tewari *et al.*, 1990), aber es kommt auch zu physiologischen Auswirkungen in Form von gesteigertem Blutdruck, lokalen Schwellungen und erhöhter Körpertemperatur bis hin zum Fieber (Shaikh, 2011; Zhang & An, 2007; Dinarello & Thompson, 1991). Cytokine werden von spezifischen Oberflächenrezeptoren erkannt (Dinarello, 2007; Henderson & Blake, 1992).

In Säugetieren kennt man drei Hauptvertreter der Interleukin-1-Familie, von denen IL-1 α und IL-1 β als Cytokin-Agonisten wirken. IL-1Ra steht diesen Molekülen als Antagonist gegenüber, der ohne direkte zelluläre Folgereaktion an die Interleukin-Rezeptoren zu binden vermag und dabei die agonistischen Moleküle kompetitiv verdrängt. Interleukin-1

wird vor allem als Reaktion auf bakterielle Endotoxine ausgeschüttet (Arend, 2002; Hannum *et al.*, 1990).

Beide Interleukin-1-Varianten werden von zwei unterschiedlichen Rezeptor-Proteinen vom Typ I und Typ II (IL-1RI und IL-1RII) erkannt, die als membranintegrale Proteine jeweils eine extrazelluläre Domäne zur Erkennung von IL-1 und eine cytoplasmatische Domäne zur Signalweiterleitung aufweisen. Der Typ II-Rezeptor (60 kDa) mit seiner sehr kurzen cytoplasmatischen Domäne (29 Aminosäuren) ist biologisch inert und spricht nicht auf die Bindung an IL-1 an. IL-1RII reguliert kompetitiv gegenüber dem eigentlichen Typ I-Zielprotein die IL-1-Aktivität mit (Arend, 2002; Colotta *et al.*, 1993). Der funktionale Rezeptor-Typ I (80 kDa, cytoplasmatische Domäne: 215 Aminosäuren) bildet bei der Bindung von IL-1 ein Heterodimer mit dem Korezeptor IL-1RAcP (IL-1 *Receptor Accessory Protein*) aus, wodurch sich die cytoplasmatischen Domänen beider Rezeptor-Proteine räumlich annähern und die Signaltransduktion über eine Phosphorylierungskaskade einleiten. Die extrazellulären Domänen von IL-1RII und IL-1RAcP werden teilweise von Proteasen an der Zelloberfläche freigesetzt und können so als weitere Regulationselemente der IL-1-Aktivität freies IL-1, vor allem IL-1 β , abfangen (Dinarello, 2009). Es ist aber zu beachten, dass beide Rezeptor-Proteine in ihrer löslichen Form auch den Antagonisten IL-1Ra binden, welcher dann nicht mehr für eine Blockierung der funktionalen membranständigen Rezeptoren zur Verfügung steht (Arend *et al.*, 1998).

IL-1 α ist ein autokriner Wachstumsfaktor, der als Vorläufer-Verbindung exprimiert und von der Cystein-Protease Calpain prozessiert wird. Der IL-1 α -Vorläufer ist biologisch ebenso aktiv wie die prozessierte Form und reguliert wahrscheinlich die Zelldifferenzierung, vor allem im Epithel- und Ectodermalgewebe. Es gibt Hinweise, dass der IL-1 α -Vorläufer im Komplex mit dem HCLS1-assoziierten Protein X-1 (HAX-1) auch an DNA im Zellkern binden und so die regulatorische Funktion ausüben kann (Yin *et al.*, 2001). Eine membranssoziierte Form des Vorläufers ist bei Entzündungsreaktionen beteiligt (Dinarello, 2009).

Auch IL-1 β fällt als Vorläufer-Verbindung an, allerdings hauptsächlich in Blutzellen und Gewebsmakrophagen. Der Vorläufer ist vor seiner Prozessierung, die hauptsächlich mit Hilfe von Caspase-1 vonstatten geht, aber auch durch andere Proteasen wie Elastase und Matrix-Metalloproteasen erfolgen kann, biologisch inaktiv. Die Ausschüttung der aktiven prozessierten Form von IL-1 β hat mehrere entzündungsfördernde Effekte zur Folge, weshalb es als proinflammatorisches Cytokin bezeichnet wird. Diese Cytokine stimulieren einander wechselseitig, wodurch eine schnelle und effektive Reaktion auf Stressreize ermöglicht wird (Dinarello, 2009). IL-1 β bewirkt die gesteigerte Expression

von Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche von Endothelzellen und die Induktion von Chemokinen, die letztendlich zur Extravasation immunkompetenter Zellen aus dem Blutkreislauf in das umliegende Gewebe und dessen Schädigung führen.

Wenngleich die Interleukin-1-Agonisten einen wertvollen Schutzmechanismus gegen Pathogene darstellen, können Überregulierungen auftreten, die krankhafte Symptome nach sich ziehen. Unter den damit verbundenen Krankheitsbildern sind beispielsweise septische, rheumatische, arthritische sowie andere Autoimmunreaktionen anzuführen, welche fast alle Arten von Geweben betreffen können (Haut und Knochen, innere Organe, Zentrales Nervensystem) (Arend, 2002).

Für chronische Entzündungserscheinungen, die auf eine verstärkte Ausschüttung des proinflammatorischen Cytokins IL-1 β zurückgeführt und deswegen durch dessen Blockierung therapiert werden können, wurde die Klassifikation der autoinflammatorischen Erkrankung eingeführt (Dinarello, 2009). Die Blockierung der IL-1-Aktivität hat in solchen Fällen eine rasche und andauernde Linderung der Symptome sowie einen Rückgang der biochemischen und hämatologischen Kennzeichen der Erkrankung zur Folge. Von den Autoimmunerkrankungen grenzen sich autoinflammatorische Syndrome insofern ab, als sie, wie für Entzündungserscheinungen zu erwarten, zu periodisch auftretenden Beschwerden führen, stark auf externe Einflussfaktoren ansprechen und nicht in Verbindung mit der MHC-Klasse II-vermittelten Präsentation von Antigenen stehen. Klassische Autoimmunerkrankungen hingegen weisen eine starke Involvierung der MHC-Klasse II-regulierten Immunantwort auf und verursachen einen progressiven Krankheitsverlauf, zeigen sich aber weitgehend unabhängig von äußerlichen Stressfaktoren. Die Blockierung von IL-1, besonders von IL-1 β , ist daher eine wirkungsvolle Strategie zur Linderung autoinflammatorischer Syndrome (Dinarello, 2009).

IL-1Ra ist als Gegenspieler beider Interleukin-1-Spezies ein wichtiges konstitutives Regulationselement der IL-1-Aktivität im Organismus. Autosomal rezessiv vererbare Mutationen im IL-1Ra-Gen, die zu einer Defizienz an funktionalem Protein führen, wurden als autoinflammatorische Erkrankung klassifiziert (DIRA, *Deficiency of the Interleukin-1 Receptor Antagonist*). Als Symptome treten lebensbedrohliche systemische Entzündungen der Haut und der Knochen auf (Aksentijevich *et al.*, 2009). Der IL-1-Rezeptor-Antagonist tritt in verschiedenen Spleißformen auf, bei denen man zwischen der sekretierten Isoform (auch sIL-1Ra, 17 kDa) und mehreren intrazellulären Isoformen (z. B. icIL-1Ra, 18 kDa und icIL-1Ra3, 15 kDa) differenziert. In dieser Arbeit wurde mit der sekretierten Form von IL-1Ra gearbeitet, die hauptsächlich von der Leber als Akute-Phase-Protein ausgeschüttet wird (Arend, 2002; Arend *et al.*, 1998).

Die wohl bekannteste und am weitesten verbreitete autoinflammatorische Erkrankung ist RA (Rheumatoide Arthritis), welche durch einen fortschreitenden Abbau von Knorpel- und Knochensubstanz in den Gelenken und eine damit verbundene Verkleinerung betroffener Gelenkspalte charakterisiert ist. Die Synovialflüssigkeit entzündeter Gelenke beinhaltet stark erhöhte Mengen an Interleukin-1, von dem angenommen wird, dass es für die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen und von Matrix-Metalloproteasen verantwortlich ist (Cohen *et al.*, 2004). Auch beide Formen von Diabetes Mellitus (Typ I und Typ II) werden maßgeblich auf den IL-1-induzierten Abbau der Insulin sekretierenden β -Zellen der Bauchspeicheldrüse zurückgeführt (Mandrup-Poulsen, 1996; Larsen *et al.*, 2007), mit dem Unterschied, dass beim Typ I-Krankheitsbild die β -Zellen völlig inaktiviert sind, während beim Typ II die Schädigung kontinuierlich während des Krankheitsverlaufs erfolgt.

Da Entzündungserscheinungen die Ursache von 15 % aller Krebsfälle sind, findet die Rolle autoinflammatorischer Syndrome bei der Bildung und dem Krankheitsverlauf von Krebs zunehmend Beachtung. IL-1 fördert auf indirekte Weise das Tumorstadium, die Neubildung von Blutgefäßen und Metastasierung durch autokrine und parakrine Effekte, die sowohl auf die Tumorzellen als auch die zelluläre Umgebung wirken. Folglich stellt eine Blockierung der IL-1-Funktion auch einen vielversprechenden Ansatz zur Bekämpfung von Krebs dar (Lewis *et al.*, 2006).

Die IL-1-Signaltransduktion kann an mehreren Stellen inhibiert werden. So wurden gegen IL-1 β gerichtete Antikörper (CDP-484, PEGyliert, Celltech), die lösliche Version von IL-1RII sowie Inhibitoren des IL-1 β prozessierenden Enzyms Caspase-1 eingesetzt. „Cytokine Traps“ stellen neuartige Fusionskonstrukte der extrazellulären Domänen von IL-1RI und IL-1RAcP an ein IgG1-Fc-Fragment dar und nutzen, ähnlich Antikörpern, den Aviditätseffekt bei der Bindung an IL-1 β (Lewis *et al.*, 2006). Von besonders großem Interesse sind dennoch die Einsatzmöglichkeiten von IL-1Ra als körpereigenem Regulator der IL-1-Aktivität und bereits zugelassenem Wirkstoff.

Die rekombinante, nicht glykosylierte Version des humanen IL-1Ra-Proteins hat unter dem Handelsnamen Kineret (Swedish Orphan Biovitrum; Leader *et al.*, 2008) die klinische Zulassung zur Behandlung rheumatischer Erkrankungen wie RA (Cohen *et al.*, 2004; Fleischmann *et al.*, 2003) und des NOMID-Syndroms (*Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease*; Aksentijevich *et al.*, 2002) erreicht und statistisch signifikante therapeutische Erfolge bewiesen. RA-Patienten wurden vor der Zulassung von Anakinra mit DMARDs (*Disease-Modifying Antirheumatic Drugs*) therapiert, die noch immer die Basistherapie bei rheumatischen Erkrankungen darstellen. Der bedeutendste

DMARD-Wirkstoff ist das Folsäure-Analogon Methotrexat, das allerdings oft nur eine geringe therapeutische Effizienz zeigt (Cohen *et al.*, 2004). DMARDs verlieren über einen Behandlungszeitraum von einigen Jahren hin oft ihre Wirksamkeit oder weisen zu hohe Toxizität auf. Zur Langzeitbehandlung von RA ist Anakinra, wahlweise in Kombination mit geringen Dosen DMARDs, aufgrund seiner hervorragenden Verträglichkeit eindeutig die bessere Wahl (Fleischmann *et al.*, 2003). Studien zur Behandlung von SJIA (Systemische Juvenile Idiopathische Arthritis) mit Anakinra (Quartier *et al.*, 2011) zeigen eine Normalisierung des Genexpressionsmusters in den Patienten, das krankheitsbedingt anomal hohe Mengen an Cytokinen und anderen Immuneffektoren beinhaltet. In klinischen Studien mit Patienten von Diabetes Mellitus Typ II wirkt sich Anakinra nachweislich positiv auf die Stabilisierung eines gesunden Blutzuckerspiegels sowie die Insulinausschüttung durch die β -Zellen der Bauchspeicheldrüse aus (Larsen *et al.*, 2007). Auch die Symptome von DIRA lassen sich durch regelmäßige Verabreichung von Anakinra lindern (Aksentijevich *et al.*, 2009). Anakinra birgt also ein enormes therapeutisches Potential, das noch längst nicht ausgeschöpft ist.

IL-1Ra zeigt die typische β -Fass-Struktur der Interleukin-1-Faltung (auch Kunitz-Faltung genannt) und weist eine *cis*-Prolyl-Bindung (Pro53) sowie vier Cystein-Reste auf, von denen aber nur zwei (Cys69 und Cys116) zu einer Disulfidbindung verbrückt sind (Schreuder *et al.*, 1995). Als kleines Protein mit einer Länge von 152 AS und einem Molekulargewicht von 17,1 kDa beträgt bei therapeutischer Verabreichung dessen Plasma-Halbwertszeit im Blutkreislauf nur 6 bis 8 h (Dinarello, 2005). Die klinischen Studien mit Anakinra wie auch die therapeutische Behandlung erfordern in der Regel über einen Zeitraum von mehreren Monaten hin die tägliche subkutane Injektion einer Dosis von 1 mg (Aksentijevich *et al.*, 2009) bis 2 mg (Quartier *et al.*, 2011) Wirkstoff pro kg Körpergewicht des Patienten bzw. 100 mg Wirkstoff pro Patient (Cohen *et al.*, 2004; Fleischmann *et al.*, 2003; Larsen *et al.*, 2007). Mit den häufigen Injektionen gehen typische Nebeneffekte wie lokale Schmerzen, Infektionen und Unverträglichkeiten einher. Somit eignet sich IL-1Ra als Modell-Wirkstoff, dessen hydrodynamische und damit pharmakokinetische und -dynamische Eigenschaften durch PASylierung verbessert werden können, um die Zahl der erforderlichen Injektionen deutlich zu verringern. Die Anwendung eines solchen modifizierten Wirkstoffs in der Therapie von Diabetes Mellitus Typ II könnte die fortwährende Zerstörung von β -Zellen aufhalten und die Regeneration beschädigter Zellen erleichtern (Larsen *et al.*, 2007). Abbildung 2 zeigt schematisch die Struktur eines PAS-IL-1Ra-Fusionsproteins.

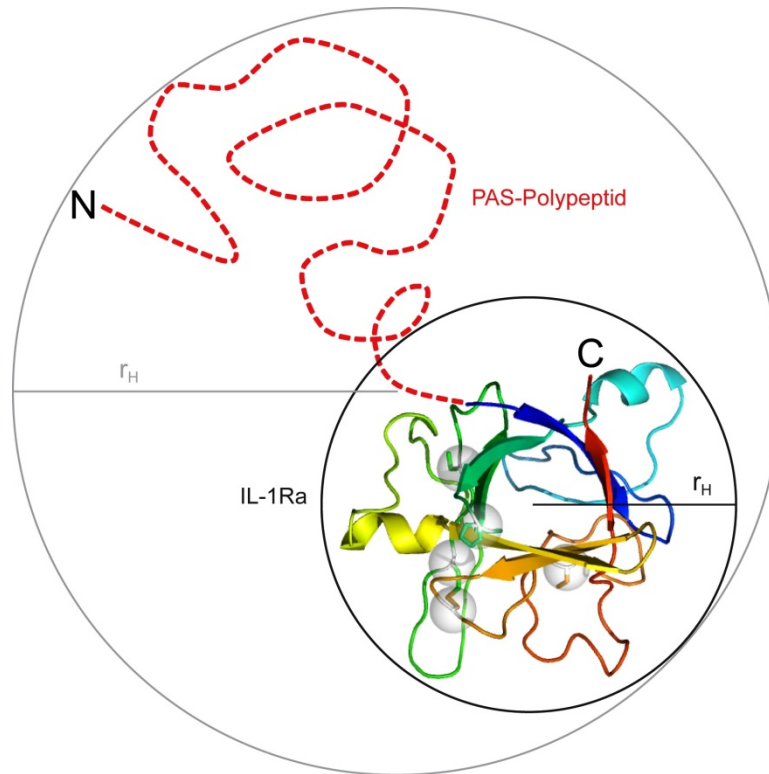


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines PAS-IL-1Ra-Fusionsproteins. Die beiden freien Cystein-Reste Cys66 und Cys122, die Disulfidbrücke zwischen Cys69 und Cys116 sowie der *cis*-Prolyl-Rest an Position 53 sind in der Proteinstruktur von IL-1Ra (PDB 1ILR, dargestellt mit PyMol, DeLano, 2002) durch weiße Sphären um die α -C-Atome markiert. Das N-terminale PAS-Polypeptid ist als gestrichelte rote Linie stilisiert. Die Vergrößerung des hydrodynamischen Radius vom unmodifizierten (schwarz) zum PASylierten (hellgrau) IL-1Ra-Protein ist mit Kreisen veranschaulicht.

1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit sollen PAS-Polypeptide hinsichtlich ihres Einsatzes als biologische PEG-Biomimetika anhand des direkten Vergleichs charakteristischer Eigenschaften der beiden Polymerspezies validiert werden. Die PAS-Polypeptide sollen sowohl als freie Biopolymere als auch als Fusionsproteine mit dem Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist studiert werden. Besonderes Augenmerk gilt hierbei den neuartigen Serin-freien P/A-Sequenzen. Zusätzlich zu der hydrodynamischen Charakterisierung mittels Größenausschlusschromatographie sowie Dynamischer Lichtstreuung ist eine systematische viskosimetrische Analyse der Polymere, die strukturelle Charakterisierung durch Circular dichroismus-Spektroskopie und die Untersuchung der hydrophilen Eigenschaften durch *Reversed-Phase*-Chromatographie geplant. Dadurch ist ein besseres Verständnis der Sequenz/Struktur-Beziehungen unterschiedlicher PAS-Polypeptide zu erwarten, was

man sich für maßgeschneiderte Eigenschaften derartiger Biopolymere zunutze machen kann. Im selben Zusammenhang sollen auch die Einflüsse von Sequenzveränderungen auf die Eigenschaften von PAS-Polypeptiden untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme und Vektoren

Escherichia coli-Stämme:

BL21(DE3)	<i>F</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3) (Studier & Moffatt, 1986)
BLR(DE3)	<i>F</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , Δ (<i>srl</i> , <i>recA</i>)306:: <i>Tn10</i> (<i>tet^R</i>), (DE3) (Kurnit, 1989; Studier, 1991)
Origami B	<i>F</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lacY1</i> , <i>ahpC</i> , <i>gor522</i> :: <i>Tn10</i> <i>trxB</i> (<i>kan^R</i> , <i>tet^R</i>) (Bessette <i>et al.</i> , 1999; Ritz <i>et al.</i> , 2001)
KS272	<i>F</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>thi</i> , <i>rpsL</i> (<i>strA</i>), Δ <i>PhoA</i> (<i>Pvull</i>) (Strauch & Beckwith, 1988)
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁺</i>), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i> [<i>F</i> ': <i>proAB⁺</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , <i>Tn10</i> (<i>tet^R</i>)] (Bullock <i>et al.</i> , 1987)

Vektoren:

pRSET5a	(Schmidt & Skerra, 1994; Schoepfer, 1993)
pLysE	(Studier, 1991)
pASK37	(Skerra & Plückthun, 1991)
pASK75	(Skerra, 1994)
pUC19	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)

2.1.2 Oligodesoxynukleotide

Zur Konstruktion von PAS-Genkassetten:

PA#1for	5' - GCC GCT CCA GCT GCA CCT GCT CCA GCA GCA CCT GCT GCA CCA GCT CCG GCT GCT CCT GCT -3'	(PA#1)
PA#1rev	5' - GGC AGC AGG AGC AGC CGG AGC TGG TGC AGC AGG TGC TGC TGG AGC AGG TGC AGC TGG AGC -3'	
PAS#5for	5' - GCC GCT TCT CCA GCA GCT CCT TCT GCT CCA CCA GCA GCT GCA AGC CCT GCT GCA CCA AGC GCA CCT CCT GCT -3'	(PAS#5)

PAS#5rev	5' - GGC ACG AGC AGG AGG TGC GCT TGG TGC AGC AGG GCT TGC AGC TGC TGG TGG AGC AGA AGG AGC TGC TGG AGA -3'	
JB-17	5' - GCC GCT TCT CCA GCA GCT CCT TCT GCT CCA CCA GCA GCT GCA AGC CCT GCT GCA CCA AGC GCA CCT CCT GCT CGT -3'	(PAS#5 mit Arg)
JB-18	5' - GGC ACG AGC AGG AGG TGC GCT TGG TGC AGC AGG GCT TGC AGC TGC TGG TGG AGC AGA AGG AGC TGC TGG AGA AGC -3'	
JB-26	5' - GGC CCA GGC GGT GGC CCT GGC GGT GGA CCT GGC GGT GGT CCA GGT GGC GGT CCA GGT GGT -3'	(P1G3)
JB-27	5' - GCC ACC ACC TGG ACC GCC ACC TGG ACC ACC GCC AGG TCC ACC GCC AGG GCC ACC GCC TGG -3'	
JB-28	5' - GCC CCA GCA CCG GCA GCT GCT GCC CCT GCA CCA GCT GCA GCC GCA CCT GCT CCA GCC GCT GCA -3'	(P1A1P1A4)
JB-29	5' - GGC TGC AGC GGC TGG AGC AGG TGC GGC TGC AGC TGG TGC AGG GGC AGC AGC TGC CGG TGC TGG -3'	
JB-30	5' - AAC ACG AAC AAT ACC AAT AAC ACG AAT AAC ACG AAC AAC ACC AAC AAT ACC AAC AAC ACC AAT AAC ACC AAC -3'	(NNT)
JB-31	5' - GTT GTT GGT GTT ATT GGT GTT GTT GGT ATT GTT GGT GTT GTT CGT GTT ATT CGT GTT ATT GGT ATT GTT CGT -3'	
JB-34	5' - CAG CAC CAG CAA CAC CAG CAG CAT CAA CAA CAC CAA CAA CAT CAG CAA CAT CAG CAG CAC CAA CAG CAT CAA -3'	(QQH)
JB-35	5' - CTG TTG ATG CTG TTG GTG CTG CTG ATG TTG CTG ATG TTG TTG GTG TTG TTG ATG CTG CTG GTG TTG CTG GTG -3'	
XP-1	5' - GCC TCT CCA GCT GCA CCT GCT CCA GCA GAA CCT GCT GCA CCA GCT CCG TCT GCT CCT GCT -3'	(PAS#1-E1)
XP-2	5' - GGC AGC AGG AGC AGA CGG AGC TGG TGC AGC AGG TTC TGC TGG AGC AGG TGC AGC TGG AGA -3'	
XP-3	5' - GCC GAA CCA GCT GCA CCT GCT CCA GCA GAA CCT GCT GCA CCA GCT CCG TCT GCT CCT GCT -3'	(PAS#1-E2)
XP-4	5' - GGC AGC AGG AGC AGA CGG AGC TGG TGC AGC AGG TTC TGC TGG AGC AGG TGC AGC TGG TTC -3'	
XP-5	5' - GCC GAA CCA GCT GCA CCT GCT CCA GCA GAA CCT GCT GCA CCA GCT CCG GAA GCT CCT GCT -3'	(PAS#1-E3)
XP-6	5' - GGC AGC AGG AGC TTC CGG AGC TGG TGC AGC AGG TTC TGC TGG AGC AGG TGC AGC TGG TTC -3'	
XP-7	5' - GCC TCT CCA GCT GCA CCT GCT CCA GCA AAA CCT GCT GCA CCA GCT CCG AAA GCT CCT GCT -3'	(PAS#1-K2)
XP-8	5' - GGC AGC AGG AGC TTT CGG AGC TGG TGC AGC AGG TTT TGC TGG AGC AGG TGC AGC TGG AGA -3'	
JB-40	5' - GCC TCT CCA GCT GCA CCT GCT CCA GCA AAA CCT GCT GCA CCA GCT CCG TCT GCT CCT GCT -3'	(PAS#1-K1)

JB-41 5' - GGC AGC AGG AGC AGA CGG AGC TGG TGC AGC AGG TTT TGC TGG AGC AGG
TGC AGC TGG AGA -3'

Zur Konstruktion von pUC19-Hilfsvektoren:

JB-15 5' - AGC TTG GCT CTT CAG GCA GAA GAG CAG -3' (pUC19-duoSapI)

JB-16 5' - AAT TCT GCT CTT CTG CCT GAA GAG CCA -3'

JB-44 5' - GCC GGA GGT GGT GGC TGT GGT GGT GGT GGC -3' (G₄CG₄-Kassette)

JB-45 5' - GGC GCC ACC ACC ACC ACA GCC ACC ACC TCC -3'

JB-48 5' - GCC GGA GGT GGC GGC AAA GGC GGT GGT GGC -3' (G₄KG₄-Kassette)

JB-49 5' - GGC GCC ACC ACC GCC TTT GCC GCC ACC TCC -3'

JB-52 5' - AGC TTG GCT CTT CTG CCT GCG CCA GAA GAG TAG -3' (pUC19-Cys)

JB-53 5' - AAT TCT ACT CTT CTG GCG CAG GCA GAA GAG CCA -3'

(Uli Binder) 5' - AGC TTG GCT CTT CTG CCA GAA GAG TAG -3' (pUC19-Earl/SapI)

(Uli Binder) 5' - AAT TCT ACT CTT CTG GCT GAA GAG CCA -3'

Zur PCR-Amplifizierung von Strukturgenen:

JB-1 5' - ATC TAG CAT ATG AAA CAT CAC CAC CAT CAC CAT TCG GAC TCA GAA GTC
AAT CAA G -3' (MKH₆-SUMO)

JB-2 5' - CCT CAT AAG CTT GCT CTT CAG GCG CCA CCA ATC TGT TC -3'

JB-7 5' - ATC TAG CAT ATG AAA CAT CAC CAC CAT CAC CAT CTT GTT CCT GAA TTA
AAT GAA AAA GAC G -3' (MKH₆-Ulp1(403-621))

JB-8 5' - CTT CAT AAG CTT ATT TTA AAG CGT CGG TTA AAA TCA AAT GGG -3'

UB-3 5' - AAG GTG AAG CTT GCT CTT CAG GCC TGC ATG GCA AGG TTA GCG TCG
AG -3' (MKH₆-TrxA(Q118))

Zur QuikChange-Mutagenese:

JB-3 5' - GTG AGC GAG GAA GCG GAG AAG CGC CCA ATA CGC -3' (pSA1→pSA1*)

JB-4 5' - GCG TAT TGG GCG CTT CTC CGC TTC CTC GCT CAC -3'

JB-21 5' - CGA GGA AGC GGA GAA GCG CCC AAT ACG -3' (pUC19→pUC19*)

JB-22 5' - CGT ATT GGG GCG TTC TCC GCT TCC TCG -3'

JB-24 5' - CCT GGC CAT GGG CTG AAG AGC AAG C -3' (pTrxA→pTrxA(G118))

JB-25 5' - GCT TGC TCT TCA GCC CAT GGC CAG G -3'

JB-32 5' - CAG ATT GGT GGC AAC TGA AGA GCA AGC -3' (pSUMO→pSUMO(N106))

JB-33 5' - GCT TGC TCT TCA GTT GCC ACC AAT CTG -3'

JB-36 5' - CAG ATT GGT GGC CAG TGA AGA GCA AGC TTG -3' (pSUMO→pSUMO(Q106))

JB-37 5' - CAA GCT TGC TCT TCA CTG GCC ACC AAT CTG -3'

JB-46 5' - GCT AAC CTG GCC CGT GCC TGA AGA GCA AG -3' (pTrxA→pTrxA(R117))
JB-47 5' - CTT GCT CTT CAG GCA CGG GCC AGG TTA GC -3'

Zur DNA-Sequenzierung:

JB-6 5' - CGG TGA TAC CTG CTT CCA -3' (pSA1→pSA1*)
JB-9 5' - ACC ACA ACG GTT TCC CTC -3' (MCS pRSET5a vorwärts)
JB-10 5' - AGC AGC CAA CTC AGC TTC -3' (MCS pRSET5a rückwärts)
JB-23 5' - GTA AAA CGA CGG CCA GT -3' (MCS pUC19 vorwärts)
PR1 5' - CGC AGT AGC GGT AAA CG -3' (MCS pASK37 rückwärts)
M13-RP1 5' - TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC -3' (MCS pASK37 vorwärts und MCS pUC19 rückwärts)

2.1.3 Proteinreagenzien

Enzyme

Benzonase, Endonuclease	E. Merck KGaA, Darmstadt
FastAP Thermosensitive Alkalische Phosphatase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Lyticase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Pfu Ultra II</i> -DNA-Polymerase	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn
Restriktionsendonukleasen	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot oder New England Biolabs GmbH, Schwalbach
T4-DNA-Ligase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T4-DNA-Polynukleotidkinase (PNK)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Antikörper

Anti-His ₆ IgG2a (Maus)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Anti-Maus-IgG-AP-Konjugat (Fc-spezifisch)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Größenmarker zur Kalibrierung der Größenausschlusschromatographiesäulen

Alkoholdehydrogenase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Apoferritin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β-Amylase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Blue Dextran	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Carboanhydrase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cytochrom C	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ovalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Sonstige Proteine

SUMO-Protease (# 12588-018)	Invitrogen™/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Trypsin (modifiziert, <i>sequencing grade</i> , für MS)	Promega, Madison, WI, USA
Trypsin TripLE™ Select Enzyme (rekombinant, 10x)	Gibco™/Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.1.4 Chemikalien

Acetonitril, <i>HPLC grade</i> (ACN)	VWR International GmbH, Darmstadt
Acetonitril, <i>LC-MS grade</i> (ACN)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Acrylamid-Stammlösung, 30 %ig, mit 2,6 % Bisacrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Adenosin-5'-triphosphorsäure-Dinatriumsalz (ATP)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose für die Gelelektrophorese	Bio&SELL GmbH, Feucht bei Nürnberg
Agarose, <i>Low Melting Point</i>	Invitrogen™/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ameisensäure, <i>LC-MS grade</i>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ameisensäure, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniak, 25 %ige (w/v) Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniak, 25 %ige (w/v) Lösung, technisch (Biotechnikum)	CLN Laborgroßhandel GmbH, Niederhummel
Ammoniumacetat (NH ₄ OAc)	AppliChem GmbH, Darmstadt

Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumhydrogencarbonat (NH ₄ HCO ₃)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniummolybdat, Tetrahydrat (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄)	Fluka Analytical/Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin, Natriumsalz (Amp)	Formedium Ltd, Hunstanton, UK
Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc)	Acros Organics, Geel, Belgien
Antifoam A-Stammlösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Antifoam 204-Stammlösung (Biotechnikum)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aquet [®] , Detergens	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bacto Agar	Difco Laboratories Inc, Detroit, MI, USA
Bacto Tryptone	Difco Laboratories Inc, Detroit, MI, USA
Bacto Yeast Extract (Hefeextrakt)	Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA
Bariumiodid, Dihydrat (BaI ₂)	Aldrich/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Borsäure (H ₃ BO ₃)	AppliChem GmbH, Darmstadt
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-4- Toluidinsalz (BCIP)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bromcyan, purum, 5 M in DMF (BrCN)	Fluka AG, St. Gallen, Schweiz
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt
BSA (Bovine Serum Albumin), Fraktion IV	AppliChem GmbH, Darmstadt
Butan-1-ol	E. Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid, Dihydrat (CaCl ₂)	AppliChem GmbH, Darmstadt
5/6-Carboxyfluorescein-NHS-Ester (5/6-CF-NHS)	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Chloramphenicol (Cam)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau R-250	AppliChem GmbH, Darmstadt
Diethylether	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin (DIPEA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dikaliumhydrogenphosphat, wasserfrei, technisch (K ₂ HPO ₄ , Biotechnikum)	neoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH, Heidelberg
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat, Dihydrat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2,2'-Dithiodipyridin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Eisen(III)chlorid (FeCl ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Electrospray Calibrant Solution</i> (#63606-10ML)	Fluka Analytical/Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure, 99,9 % (AcOH)	Honeywell Riedel-de Haën AG, Seelze-Hannover
Essigsäure, <i>LC-MS grade</i> (AcOH)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ethanol, p.a.	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethanol, technisch, 96 % DAB	CLN GmbH, Niederhummel
Ethidiumbromid, 1 %ige (w/v) Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Formamid, deionisiert	AppliChem GmbH, Darmstadt
D(+)-Glucose, Monohydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glucose (Dextrose), Monohydrat, technisch (Biotechnikum)	CLN Laborgroßhandel GmbH, Niederhummel
Glycerin, 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
7-Glycylamido-4-methylcoumarin, Hydrobromid (G-AMC)	Bachem Holding AG, Bubendorf, Schweiz
Imidazol	E. Merck KGaA, Darmstadt
Iod, doppelt sublimiert, p.a. (I ₂)	Honeywell Riedel de Haen AG, Seelze-Hannover
5-Iodacetamidofluorescein (5-IAF)	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Iodessigsäure-NHS-Ester (I-Ac-NHS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol, technisch	CLN GmbH, Niederhummel
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Formedium Ltd, Hunstanton, UK
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, reinst, Ph. Eur. (KH ₂ PO ₄ , Biotechnikum)	neoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH, Heidelberg
Kaliumiodid, p.a. (KI)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumsulfat, p.a. (K ₂ SO ₄)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kobalt(II)chlorid, Hexahydrat (CoCl ₂)	E. Merck KgaA, Darmstadt
Kupfer(II)chlorid, Hexahydrat (CuCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Magnesiumchlorid, Hexahydrat (MgCl ₂)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumsulfat, Hydrat (MgSO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mangan(II)chlorid, Tetrahydrat (MnCl ₂)	E. Merck KGaA, Darmstadt
2-Mercaptoethanol (BME)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
7-Mercapto-4-methylcoumarin (MMC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol, <i>LC-MS grade</i>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Methanol, technisch	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumacetat (NaOAc)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid, p.a. (NaCl, Biotechnikum)	CLN Laborgroßhandel GmbH, Niederhummel
Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat (NaH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat, p.a. (NaHCO ₃)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid, p.a. (NaOH, Biotechnikum)	CLN Laborgroßhandel GmbH, Niederhummel
Natriumhypochlorit, technisch, 13 %ige (w/v) Lösung (NaOCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Nickelsulfat (NiSO ₄)	AppliChem GmbH, Darmstadt
<i>Nitro Blue Tetrazolium</i> (NBT)	AppliChem GmbH, Darmstadt
PEG als α -Aminoethyl- ω -methoxypolyoxy- ethylene (<i>Sunbright ME-100EA, -200EA,</i> <i>-300EA, -400EA</i>)	NOF Corporation, Tokyo, Japan
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Prolin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Referenzlösungen für pH-Meter	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese [®] Sequenziergel-Konzentrat (25 %ige (w/v) Acrylamid-Bisacrylamid- Stammlösung im Verhältnis 19:1, mit 50 % (w/v) Harnstoff (8,3 M))	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese [®] Sequenziergel-Verdünner (50 % (w/v) Harnstoff in Wasser (8,3 M))	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Salzsäure, konz. 37 %ige (w/v) Lösung (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
D-Sorbitol, ≥ 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Thiamin, Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trinatriumcitrat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP)	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Ultra Qualität	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Xylencyanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Zinkacetat (Zn(OAc) ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.1.5 Standards und Kits

DNA- und Protein-Größenstandards

1 kb GeneRuler	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
100 bp GeneRuler	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PageRuler Unstained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Kits zur DNA-Isolierung

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden

Kit zur DNA-Sequenzierung

SmartSeq Kit	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
--------------	-----------------------------------

2.1.6 Geräte und Zubehör

Pipetten und Pipettierhilfen

Gilson Pipetten P20 bis P1000	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Accu-jet	Brand GmbH & Co., Wertheim
Pipetboy acu	Integra Bioscience GmbH, Fernwald

Schüttelapparate

Typ 3012 und Typ 3016 (SDS-PAGE-Färbung)	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Rollmischer IDL TRM-V	Kühn & Bayer, Nidderau-Heldenbergen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA

Elektrophorese

HE33 Submarine (DNA-Auftrennung)	Hoefer Inc., Holliston, MA, USA
Minigel-Twin (Protein-Auftrennung)	Biometra GmbH, Göttingen
Gelapparatur zur Reinigung von Oligodesoxynukleotiden	Eigenbau
Niedrigspannungsquelle Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen
Hochspannungsquelle PS3003	Biometra GmbH, Göttingen
Elektroblot-Apparatur	Eigenbau, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
UV-Transilluminator TI 3 (254 nm)	Biometra GmbH, Göttingen
Dünnschichtchromatographie-Platte, Kieselgel 60 F254 20 x 20 Alufolien (Reinigung von Oligodesoxynukleotiden)	E. Merck KGaA, Darmstadt

Brutschränke

Friocell Typ 55	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg
Incucell Typ LSIS-B2V/IC 111	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg

Schüttelinkubatoren

ITE, Multitron, Multitron II

Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Innova[®] 43New Brunswick[™]/ Eppendorf AG,
HamburgInnova[®]44 (Biotechnikum)New Brunswick[™]/ Eppendorf AG,
HamburgFermentation

10 L-Fermentersystem mit Umwurfzylinder

Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen

C Flow Durchfluß-Regelmodul

BCC Spezialgeräte GmbH, Göttingen

C pH Meß- und Regelmodul

BCC Spezialgeräte GmbH, Göttingen

C pO₂ Meß- und Regelmodul

BCC Spezialgeräte GmbH, Göttingen

C Pump D Schlauchpumpen-Modul

BCC Spezialgeräte GmbH, Göttingen

O₂-Sensor (12/320 A-Type)

Mettler-Toledo GmbH, Steinbach

pH-Elektrode (Typ 465)

Ingold Messtechnik GmbH, Steinbach

Wasserbad Haake F6/C25

Thermo Haake GmbH, Karlsruhe

Fermenter LP75 (Biotechnikum)

Bioengineering AG, Wald, Schweiz

200 L-Tanks (Biotechnikum)

Rüttgen Engineering AG, Stäfa, Schweiz

Blutzucker-Messgerät Accu-Chek[®] Comfort
mit Teststäbchen (Biotechnikum)Roche Diagnostics Deutschland GmbH,
MannheimZellaufschluss

Hochdruckhomogenisator

GEA Niro Soavi, Lübeck

PANDA Plus 2000

Hochdruckhomogenisator Ariete NS3015
(Biotechnikum)

GEA Niro Soavi, Lübeck

SLM-Aminco French Press

SLM Instruments Inc., Schwäbisch Gmünd

Ultraschallhomogenisator S250D

Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT,
USA

Konzentrierung (Biotechnikum)

Sartoflow® Beta plus	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Pumpe Sartojet mit Sartocon Slice Filterhalter	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Sartocon Slice Cassette Hydrosart 10 kDa	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Sartocon Cassette Hydrosart 0.45 µm	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen

Proteinreinigung

Chromatographieanlage ÄKTA Purifier P-10	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Chromatographieanlage ÄKTA Explorer P-100	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Fraktionssammler RediFrac	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Fraktionssammler Multirac und Superrac	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Peristaltische Pumpe P-1	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Signalschreiber REC 112	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Signalschreiber SE120	ABB Goerz AG, Mannheim
Chromatographieanlage ÄKTApilot (Biotechnikum)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Nalgene Ballonflaschen (PP, LDPE) Carboy 10/20/50 L	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm

Lyophilisierung

Labor-Gefriertrockner ALPHA1-2 LD plus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode
Rotations-Vakuumkonzentrator Speedvac RVC2-18CD plus HCL	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode

Säulenmaterial und Chromatographiesäulen

Ni-Sepharose High Performance™ (IMAC)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Ni-Sepharose Fast Flow™ (IMAC, Biotechnikum)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
IDA-Sepharose Fast Flow™ (IMAC)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Resource™S / Q, 1 mL und 6 mL Bettvolumen (IEX)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Source™15S / Q (IEX)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Resource™RPC, 1 mL Bettvolumen (RPC)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Superdex 200 10/300 GL (Tricorn S200), 24 mL Bettvolumen (SEC)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
HiLoad 26/60 Superdex 200, prep grade, 320 mL Bettvolumen (SEC)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
HiLoad 16/60 Superdex 75, prep grade, 120 mL Bettvolumen (SEC)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

Massenspektrometer

Modell maXis Q-TOF (ESI-MS) mit Software Compass Data Analysis 4.0	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Modell 6210 Time-of-Flight LC/MS (ESI-MS) mit Software MassHunter BioConfirm B.03.01	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn
Modell UltrafleXtreme (MALDI-MS) mit Software Compass Isotope Pattern 1.3	Bruker Daltonik GmbH, Bremen

Spektroskopie und Analytik

CD-Spectropolarimeter Jasco J-810 mit Spectra Manager Software 1.00.00 (CD-Spektroskopie)	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
Photodiodenarray Scinco S-3100 mit Peltier-Element (UV/Vis)	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
Spektrophotometer NanoDrop 2000 (UV/Vis)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm
Spektrophotometer Ultrospec 2000 pro (UV/Vis)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Spektrophotometer Ultrospec 2100 pro (UV/Vis)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
UV/Vis-Photometer Genesys 10S (Biotechnikum)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm
Zetasizer Nano-S (DLS-Messung) mit Zetasizer Software 6.32	Malvern Instruments GmbH, Herrenberg
μ VISC™ <i>m</i> -VROC Mikroviskosimeter mit mVROC2.5-GA05-Flusszelle und Software mVROC_Control_v3.0_AutoTemp (Pieris AG)	Collotec Messtechnik GmbH, Niddatal RheoSense, Inc., San Ramon, CA, USA

Sterilisierung und steriles Arbeiten

Autoklav Varioklav Typ 500	H&P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Autoklav Laboklav 160 MSL (Biotechnikum)	SHP Steriltechnik AG, Dessel Schloss/Satuelle
Bi-Destillierapparat aus Glas 2304	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Reinstwasseranlage Purelab ultra CleanBench Laminar Flow SK1800 (Biotechnikum)	ELGA LabWater Holding GmbH, Celle BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl

Temperaturregulierung

F12-ED Kälte-Umwälzthermostat	JULABO GmbH, Seelbach
Metallblockthermostat Techne Dri-Block DB-2A	Thermodux GmbH, Wertheim
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler T-Personal	Biometra GmbH, Göttingen
Wasserbad Haake K15/K20	Thermo Electron GmbH, Karlsruhe

Waagen

Feinwaage 125A	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon Schweiz
Laborwaage XB22C	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon Schweiz
Laborwaage PE620	Gebr. Bosch, Jungingen
Bodenwaage DE60K1P (Biotechnikum)	Kern & Sohn GmbH, Balingen

Zentrifugen

Tischzentrifuge Heraeus Biofuge Pico	Heraeus Christ GmbH, Osterode
Tischzentrifugen Eppendorf 5415R und 5415C	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5810R (Biotechnikum)	Eppendorf AG, Hamburg
Sigma 4K15 und 4-16KS	Sigma GmbH, Osterode
Sorvall RC6+ mit den Rotoren SS-34, SLA1500, SLA3000, F10-4x1000LEX	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm
Sorvall RC 12BP+ mit dem Rotor H-12000	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm

2.1.7 Verbrauchsmaterial

Dialyseschläuche und Konzentratoren

Slide-A-Lyzer 0,5 ml Mini, MWCO 10 kDa und 3,5 kDa	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA
Dialyseschlauch Typ 27, MWCO 12-16 kDa	Biomol GmbH, Hamburg
Konzentrator-Einheiten Millipore Amicon Ultra-4 bzw. -15 (MWCO 3, 10 oder 30 kDa)	Merck Millipore, Billerica, MA, USA

Folien und Membranen

Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel
OHP-Folienrolle (klar), 29,7 cm breit	Stabilo International GmbH, Heroldsberg
Whatman-Filterpapier 3MM	VWR International GmbH, Darmstadt

Kunststoffröhrchen

Kulturröhrchen mit Deckel, 13 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
PP-Schraubbecher mit Deckel, 100 mL	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
PP-Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PP-Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Petrischalen

Petrischalen, Ø 94 mm, PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Petrischalen, Ø 150 mm, PS	Sarstedt AG & Co., Nürnberg

Pipettenspitzen

Kristallklar (0,5 bis 10 µl)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Gelb (5 bis 200 µl)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Blau (200 bis 1000 µl)	Gilson International B.V., Limburg-Offheim

Küvetten

Quarz, Typ 108.002-QS (UV/Vis-Absorption; 10 mm)	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Baden
Quarz, Typ 110-QS mit Deckel (CD; 2 mm)	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Baden
Quarz, Typ 106-QS (CD; 0,1 mm)	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Baden
Quarz, Typ 105.251-QS (DLS; 3 mm)	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Baden
Quarz, Typ 100-QS mit Deckel (Diodenarray; 5 mm)	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Baden
Halb-Mikro-Kunststoffküvetten, PS (10 mm)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Küvette, 2x Optisch, PS (10 mm)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg

Reaktionsgefäße

Reaktionsgefäß (dünnwandig) 0,1 und 0,2 ml	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Reaktionsgefäß Safe-Lock 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäß Safe-Lock 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg

Sterilfilter und Spritzen

Spritzenfilter Filtropur, PES, steril, Ø 26 mm (0,45 und 0,2 µm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Microsart Membranfilter, CN, steril, Ø 50 mm (0,45 µm)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Zentrifugationseinheit Spin-X (0,45 µm)	Corning Inc. Life Science, Tewksbury, MA, USA
Einwegspritzen „Injekt“, verschiedene Größen	B. Braun AG, Melsungen
Hamilton-Spritzen aus Glas, 100 und 500 µL (Viskosimetrie bei Pieris AG)	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
PD-10 Gelfiltrationssäule	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

2.1.8 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

Alle hier aufgeführten wässrigen Lösungen wurden durch Autoklavieren oder Filtration durch eine 0,45 µm-Membran sterilisiert. Antibiotika und Induktoren wurden bei -20 °C gelagert.

Antibiotika-Stammlösungen

Ampicillin (Amp)	100 mg/mL in Wasser (1:1000 zum Medium)
Chloramphenicol (Cam)	30 mg/mL in 70 % (v/v) Ethanol (1:1000 zum Medium)

Induktor-Stammlösungen

Anhydrotetracyclin (aTc)	2 mg/mL in DMG (1:10000 zum Medium)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	1 M in Wasser (1:2000 zum Medium)

LB-Medium (*Lysogeny Broth*) (Bertani, 1951)

Bacto Tryptone	10 g/L
Bacto Yeast Extract	5 g/L
NaCl	5 g/L
Bacto Agar	15 g/L (nur für Kulturplatten)

Der pH-Wert des Mediums wird vor Sterilisierung im Autoklaven mit NaOH auf 7,5 eingestellt.

Lösungen für die Fermentation

Mineralsalzlösung:

Na ₂ HPO ₄ bzw. K ₂ HPO ₄ (Biotechnikum)	31 mM
KH ₂ PO ₄	19 mM
NH ₄ Cl	25 mM
Trinatriumcitrat	5 mM

Glucose-Lösungen:

20 % (w/v) Glucose	(separat autoklaviert)
50 % (w/v) Glucose	(separat autoklaviert)

MgSO₄-Lösung:

1 M MgSO ₄	(separat autoklaviert)
-----------------------	------------------------

Thiamin-Stammlösung:

10 mg/mL Thiamin-Hydrochlorid	(sterilfiltriert)
-------------------------------	-------------------

FeCl₃-Stammlösung:

35 g/L FeCl ₃ · 6 H ₂ O	(sterilfiltriert)
---	-------------------

Die Lösung wurde zur vollständigen Komplexbildung der Fe³⁺-Ionen mit HCl bis zur kräftigen Gelbfärbung angesäuert.

Zn(OAc)₂-Stammlösung:

8 g/L Zn(OAc) ₂ · 2 H ₂ O	(sterilfiltriert)
---	-------------------

Spurenelement-Stammlösung:

MnCl ₂ · 4 H ₂ O	3,0 g/L	
CuCl ₂ · 6 H ₂ O	0,3 g/L	
H ₃ BO ₃	0,6 g/L	
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,5 g/L	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	1,2 g/L	
EDTA	4 mM	(sterilfiltriert)

Puffer zur Elektrophorese und ProbenvorbereitungTAE-Puffer (zur Agarose-Gelelektrophorese):

Tris	40 mM
AcOH	20 mM

TE-Puffer (zur Elution von gereinigter DNA):

Tris/HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

DNA Gel Loading Dye (6X) (Life Technologies GmbH, Darmstadt):

Tris/HCl pH 7,6	10 mM
Bromphenolblau	0,03 % (w/v)
Xylencyanol	0,03 % (w/v)
Glycerin	60 % (v/v)
EDTA	60 mM

TBE-Puffer (zur Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese):

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM

2 x Formamid-Auftragspuffer:

Formamid	98 % (v/v)
EDTA	10 mM
Bromphenolblau	2 % (w/v)

SDS-Laufpuffer (zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese; Fling & Gregerson, 1986):

Tris	50 mM	(pH = 8,8 stellt sich ein)
Glycin	190 mM	
SDS	1 g/L	

4 x Lower-Tris-Puffer:

Tris/HCl pH 8,85	3 M
SDS	4 g/L

4 x Upper-Tris-Puffer:

Tris/HCl pH 6,8	0,5 M
SDS	4 g/L

5 x SDS-Auftragspuffer (reduzierend):

Tris/HCl pH 8,0	250 mM
SDS	7,5 % (w/v)
Glycerin	25 % (v/v)
Bromphenolblau	0,25 mg/mL
BME	12,5 % (v/v)

Benzonase-Aufschlusspuffer:

Tris/HCl pH 8,0	100 mM
MgCl ₂	5 mM

Coomassie-Färbelösung:

AcOH	10 % (v/v)
Isopropanol	25 % (v/v)
Coomassie Brilliantblau R-250	1 % (w/v)

Entfärbe-Lösung I: nur ungefähr 20 min einwirken lassen!

Zusammensetzung wie bei der Färbelösung, aber ohne Coomassie-Farbstoff

Entfärbe-Lösung II:

AcOH	10 % (v/v)
------	------------

Aufbewahrungs-Lösung:

AcOH	7 % (v/v)
Glycerin	2 % (v/v)

BaI₂-Lösung (zur Ba-I₂-Färbung):

BaI ₂ · 2 H ₂ O	2,5 % (w/v)
---------------------------------------	-------------

Lugol-Lösung (zur Ba-I₂-Färbung):

KI	10 % (w/v)
----	------------

I ₂	5 % (w/v)
----------------	-----------

Puffer für das Western Blotting**Transfer-Puffer:**

SDS-Laufpuffer, frisch komplementiert mit 20 % (v/v) Methanol

PBS(/T)-Puffer:

KH ₂ PO ₄	4 mM	
Na ₂ HPO ₄	16 mM	(pH = 7,4 stellt sich ein)
NaCl	115 mM	
(Tween 20	0,1 % (v/v))	

AP-Puffer:

Tris/HCl pH 8,8	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

Chromatographie-Puffer**IMAC-Laufpuffer:**

NaP _i pH 7,5	40 mM
NaCl	500 mM (Elution mittels Imidazol-Konzentrationsgradient)

AEX-Laufpuffer:

Tris/HCl pH 9,5	20 mM (Elution mittels NaCl-Konzentrationsgradient)
-----------------	---

CEX-Laufpuffer:

NH ₄ OAc/AcOH pH 6,5	40 mM (Elution mittels NaCl-Konzentrationsgradient)
---------------------------------	---

RPC-Laufpuffer:

ACN	2 % (v/v)
Ameisensäure	0,1 % (v/v)

RPC-Elutionspuffer:

ACN	80 % (v/v)
Ameisensäure	0,1 % (v/v)

SEC-Laufpuffer:

NH ₄ HCO ₃	50 mM
NaCl	500 mM

Spektroskopie-Puffer (Scopes, 1974)

KP _i pH 7,5	5 mM
K ₂ SO ₄	50 mM

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

(nach Schlapschy, 2004)

Einzelne *E. coli*-Kolonien zur Inokulierung von Flüssigkulturen wurden auf LB-Agar-Platten kultiviert, auf die die Bakterienzellen ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Hierbei wurde die Selektion auf Plasmide durch die Zugabe entsprechender Antibiotika gewährleistet. Die bei 4 °C gelagerten Kulturplatten wurden stets frisch angesetzt und nur zwei Wochen lang verwendet.

Flüssigkulturen wurden in LB-Medium zusammen mit den erforderlichen Antibiotika angesetzt. Hierfür wurden je nach Verwendungszweck und Expressionsmaßstab 4 mL im 13 mL-Kulturröhrchen oder 50 mL und 2 L in 100 mL- bzw. 5 L-Schüttelkolben mit Aluminiumverschluss benutzt. Volumina unter 2 L wurden jeweils mit einer Kolonie direkt von der Anzuchtplatte angeimpft, 2 L-Schüttelkulturen dagegen mit einer stationären Übernachtkultur im Verhältnis 1:40 (v/v). Die Inkubation von Flüssigkulturen fand routinemäßig bei einer Temperatur von 30 °C im Schüttelinkubator statt. Die optischen Dichten der Zellsuspensionen wurden als OD₅₅₀-Wert in Kunststoffküvetten bei 550 nm in einem UV-Vis-Spektralphotometer kontrolliert, wobei das entsprechende Medium als Referenzabgleich diente und ab einem OD-Messwert von 1,0 Verdünnungen eingesetzt wurden.

Transformierte Stämme von *E. coli* wurden zur dauerhaften Lagerung bei -20 °C konserviert, indem 0,5 mL einer stationären Übernachtskultur im Selektionsmedium mit 1 mL steriler 87 % (v/v)-Glycerinlösung komplementiert wurden.

2.2.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

(nach Schlapschy, 2004)

Zur Präparation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde die CaCl_2 -Methode nach Cohen *et al.* (1972) verwendet, für die alle eingesetzten Lösungen im Vorfeld dampfsterilisiert und auf Eis gekühlt wurden. Hierzu wurden 50 mL zusatzfreies LB-Medium im Verhältnis 1:100 (v/v) mit einer stationären Übernachtskultur des zur Transformation vorgesehenen Bakterienstammes inokuliert und bei 37 °C bis zum Erreichen eines OD_{550} -Werts zwischen 0,5 und 1,0 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 rpm, 4 °C , 10 min) in einem 50 mL-Röhrchen sedimentiert. Nach Resuspension in 40 mL eiskalter 0,1 M- MgCl_2 -Lösung wurden sie wie zuvor zentrifugiert, in 20 mL eiskalter 50 mM- CaCl_2 -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis gelagert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das erhaltene Zellsediment in 2 mL 50 mM- CaCl_2 -Lösung mit 15 % (v/v) Glycerin wiederaufgenommen und dann zur Verwahrung bei -80 °C in Aliquots zu 200 μL portioniert.

Für die eigentliche Transformation wurden 200 μL der Zellsuspension üblicherweise mit 1 ng Plasmid-DNA aus einer Präparation oder einem Ligierungsansatz gemischt und 30 min lang auf Eis inkubiert. Darauf folgte eine fünfminütige Erwärmung bei 37 °C , bevor die Zellen in 2 mL zusatzfreiem LB-Medium aufgenommen und für weitere 45 min bei 37 °C im Schüttelinkubator temperiert wurden. Zur Ausplattierung auf selektiven LB-Agar-Platten wurden davon 100 μL eingesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.3 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA

(nach Gebauer, 2013)

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde unter Verwendung von Qiagen-Kits isoliert. Dabei wird die durch alkalische Zell-Lyse freigesetzte DNA (Birnboim & Doly, 1979) an einem Trägermaterial selektiv immobilisiert und nach mehrmaligem Waschen in reiner Form in TE-Puffer eluiert. Das QIAprep Spin Plasmid Mini Kit wurde zur Plasmid-Präparation aus 4 mL-Übernachtskulturen im analytischen Maßstab benutzt, um neue Plasmid-Konstrukte vor der Weiterverwendung zu verifizieren, wobei hier in der Regel um die 20 μg DNA anfielen. Waren größere Mengen an Plasmid-DNA vonnöten, wurde das QIAprep Plasmid Midi Kit herangezogen, mit Hilfe dessen etwa 200 μg DNA aus einer stationären

50 mL-Kultur gewonnen werden konnten. Die so präparierten Plasmide wurden bei 4 oder -20 °C gelagert.

2.2.4 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

(nach Schlapschy, 2004)

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid wurde zur Auftrennung von DNA-Doppelstrangfragmenten nach deren Größe verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Analyse von Plasmiden nach einem analytischen Restriktionsverdau wurde standardmäßig eine 1 % (w/v)-Agarosesuspension in TAE-Puffer angesetzt, durch Erhitzung homogenisiert und nach Abkühlung auf Handwärme im Verhältnis 1:10000 (v/v) mit einer 1 % (w/v)-Ethidiumbromidlösung versetzt. Zur Aushärtung bei Raumtemperatur wurde die Lösung in eine horizontale Gelkammer (10,5 x 7,5 x 0,5 cm) mit Geltaschenformer für jeweils bis zu 20 µL Probelösung gegeben. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer in geeigneten Kammern für 60 min mit einer angelegten Spannung von 90 V, nachdem die DNA-Proben mit einem 6 x Auftragspuffer versetzt worden waren. Die DNA-Fragmente konnten nach der Elektrophorese infolge der Interkalation von Ethidiumbromid mit UV-Licht bei 312 nm visualisiert und photographisch mit einem Rotfilter festgehalten werden.

2.2.5 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

(nach Schlapschy, 2004)

Für die Präparation von DNA-Fragmenten zur Konstruktion neuer Vektoren wurden 1 % (w/v)- bis 2 % (w/v)-Agarose-Gele aus *Low Melting Point*-Agarose in TAE-Puffer hergestellt. Das Verfahren war dasselbe wie für Gele im analytischen Maßstab, nur wurden größere Geltaschenformer für bis zu 100 µL Probenvolumen verwendet. Zugunsten einer stabileren Konsistenz vor dem Beladen und nach Abschluss der Elektrophorese, die bei 70 V für 90 bis 120 min betrieben wurde, wurden die Gele 30 min bei 4 °C inkubiert. Die DNA-Banden wurden mit UV-Licht geringerer Intensität bestrahlt, um Schäden an den Proben zu vermeiden, wenn die gewünschten DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten wurden. Die verwendete Agarose eignete sich speziell zur effizienten Resolubilisierung und Abtrennung von der DNA über vorübergehende selektive Bindung an ein Trägermaterial mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits. Die DNA-Proben wurden in 20 µL TE-Puffer eluiert, vor der Lagerung bei -20 °C wurde die Konzentration mit dem NanoDrop 2000-Spektrophotometer bestimmt.

2.2.6 Reinigung von Oligodesoxynukleotiden

(nach Gebauer, 2013)

Bestellte Oligodesoxynukleotide wurden ab einer Länge von 30 Basen vor ihrem Einsatz als PCR- und Mutagenese-Primer oder zur Synthese der repetitiven PAS-Genkassetten über präparative Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese nach dem von Skerra (1989) entwickelten Protokoll gereinigt. Dazu wurde ein 1,5 mm starkes 12 %iges (w/v)-Acrylamid-Gel mit 7,5 M Harnstoff in TBE-Puffer aus Fertiglösungen für Sequenzier-Gel-Konzentrat und -Verdünner sowie 10fach-TBE-Puffer hergestellt, dessen Polymerisation mit 40 µL TEMED und 1 mL 10 % (w/v) APS eingeleitet wurde. Die Gel-Lösung wurde zwischen zwei Glasplatten (20 x 40 cm) gegossen, die mit Abstandshaltern und einem Geltaschenformer für bis zu 40 µL Auftragsvolumen mit Hilfe von Klammern befestigt wurden.

20 nmol des Oligonukleotids wurden zur vollständigen Denaturierung in 20 µL H₂O mit 20 µL Formamid-Auftragspuffer für 5 min auf 80 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Die erhaltene Lösung wurde auf zwei Taschen des Gels verteilt und bei konstanter Leistung von 40 W bis zum gewünschten Auftrennungsgrad der vertikalen Elektrophorese in TBE als Laufpuffer unterzogen, wobei der Fortschritt der Elektrophorese anhand des Bromphenolblaus verfolgt werden konnte. Danach wurde das Gel auf UV-durchlässiger Klarsichtfolie vor dem Hintergrund einer DC-Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator (Kieselgel 60 F₂₅₄) mit einer UV-Handlampe bei 254 nm bestrahlt. So konnten die DNA-Proben über *UV-Shadowing* als dunkel kontrastierte Banden sichtbar gemacht und mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten werden. Die Gelstücke wurden in eine zuvor zugeschmolzene und mit einer Kanüle durchbohrte 1 mL-Einwegspritze überführt und mit einem Gesamtvolumen von 1 mL TE-Puffer schrittweise durch die Spritze gedrückt, um eine Suspension von Gelstückchen zu erhalten, aus denen die DNA über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator herausgelöst werden konnte. Nach Filtration über eine Spin-X-Filtereinheit (13000 rpm, RT, 5 min) wurde die DNA-Lösung dreimal mit je 1 mL 1-Butanol unter Einengung der wässrigen Phase auf etwa 400 µL extrahiert. Der Lösung wurden 40 µL 3 M NaOAc, pH = 4,8 sowie 4 µL 1 M MgCl₂ und 1 mL Ethanol, p. a. zugesetzt und sie wurde zur Fällung der DNA mindestens 1 h bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 4 °C, 30 min) wurde das Präzipitat mit 500 µL 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurde in H₂O wiederaufgenommen und bei -20 °C verwahrt. Die molare Konzentrationsbestimmung erfolgte über eine 1:200-Verdünnung in TE-Puffer durch Absorptionsmessung bei 260 nm am NanoDrop 2000-Spektrophotometer unter Verwendung eines aus den spezifischen Ab-

sorptionen der Nukleobasen abgeschätzten Extinktionskoeffizienten (A: $15,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; C: $7,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; G: $11,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; T: $8,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.3 *In vitro*-Modifizierung von DNA

2.3.1 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

(nach Gebauer, 2013)

Bei der Plasmid-Analyse durch Restriktionsverdau und der Präparation von DNA-Fragmenten zur Ligierung wurden DNA-Moleküle mit Restriktionsenzymen unter Erzeugung spezifischer *Sticky-End*-Überhänge geschnitten. Die Spaltreaktion wurde jeweils in dem für die beteiligten Enzyme empfohlenen Puffer angesetzt, der die maximale Aktivität der beteiligten Nucleasen sicherstellte. Dazu wurden PCR-Amplifikate mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits umgepuffert oder, wie alle anderen durch Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente, über präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Im analytischen Maßstab wurden üblicherweise um die 500 ng Plasmid-DNA mit 5 U des Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 20 μL für 2 h bei 37 °C behandelt. Für präparative Ansätze wurden etwa 2 μg Plasmid bzw. PCR-Amplifikat mit jeweils 20 U der eingesetzten Enzyme verdaut.

2.3.2 Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden und Dephosphorylierung

(nach Gebauer, 2013)

Waren Oligodesoxynukleotide zur Hybridisierung mit komplementären Sequenzen und anschließenden Kassetten-Insertion in Plasmide vorgesehen, mussten diese zuvor an ihrem 5'-Ende mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (PNK) phosphoryliert werden. Hierfür wurden DNA-Proben im 200 pmol-Ansatz mit 10 U des Enzyms sowie 5 μL frischer 1 mM-ATP-Lösung in T4-Polynukleotidkinase-Puffer A (700 mM Tris/HCl pH 7,6; 100 mM MgCl_2 ; 50 mM Dithiothreitol) in einem Gesamtvolumen von 50 μL 30 min lang auf 37 °C temperiert. Danach wurde die PNK für 10 min bei 80 °C inaktiviert und die DNA-Probe bei -20 °C verwahrt.

Zur Erhöhung der Insertionseffizienz von DNA-Fragmenten in linearisierte Plasmide durch Verhinderung deren Religierung wurden die Vektoren an ihren 5'-Enden mit Hilfe einer thermosensitiven alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Die Reaktion wurde direkt im vorausgehenden Restriktionsansatz durchgeführt und 30 min lang bei 37 °C

inkubiert. Das Enzym wurde durch Einsatz des QIAquick PCR Purification Kits oder präparative Agarose-Gelelektrophorese abgetrennt.

2.3.3 Ligierung von DNA-Fragmenten

(nach Gebauer, 2013)

Nach Insertion doppelsträngiger DNA-Fragmente in Plasmide wurden die unverknüpften DNA-Einzelstränge mittels T4-DNA-Ligase kovalent zusammengefügt. Standardmäßig wurden dazu nach Umpufferung über das QIAquick PCR Purification Kit etwa 200 ng der für die Ligierung vorgesehenen DNA-Fragmente in T4-Ligase-Puffer (300 mM Tris/HCl pH 7,8; 100 mM MgCl₂; 100 mM Dithiothreitol; 10 mM ATP) mit 1 µL der Ligase in einem Volumen von 10 µL inkubiert. Dieser Schritt erfolgte über Nacht bei 16 °C oder für 30 min bei Raumtemperatur. Eine Kontrollreaktion mit dem Vektorfragment ohne Zugabe eines Inserts ermöglichte die Abschätzung der Ligierungseffizienz und der Probenqualität. Kompetente *E. coli*-Zellen des Stamms XL-1 blue wurden mit je 1 µL eines Ligierungsansatzes transformiert.

2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von Genen

(nach Gebauer, 2013)

Zur Amplifikation von Genen aus Plasmiden oder chromosomaler DNA wurde die PCR-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction*) eingesetzt (Saiki et al., 1988). Der zu vervielfältigende Genabschnitt wurde dabei von einem Primer-Paar aus Oligodesoxynukleotiden flankiert, die an ihrem 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange Komplementärsequenz mit einem GC-Mindestgehalt von 55 % zur Hybridisierung an die DNA-Matrize aufwiesen.

Im PCR-Standardverfahren mit der *Taq*-DNA-Polymerase (Chien et al., 1976) setzte sich der Ansatz in einem Gesamtvolumen von 50 µL aus 10 bis 100 ng Matrizen-DNA, je 25 pmol der Primer, 3 µL 25 mM-MgCl₂-Lösung und 4 µL dNTP-Lösung (jeweils 2,5 mM der einzelnen Nukleotide) im entsprechenden Polymerase-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 1 % (v/v) Triton X-100) zusammen. Nach zweiminütiger Erhitzung dieses Ansatzes auf 95 °C im Thermocycler wurden 2,5 U der Polymerase zugegeben (*Hot-Start*-Verfahren) und 30 Zyklen durchlaufen, die folgende Schritte beinhalteten:

1. Aufschmelzung der Doppelstrang-DNA bei 95 °C für 1 min;
2. Hybridisierung der Primer an die DNA-Matrize bei 50 °C für 1 min;
3. DNA-Synthese durch die Polymerase bei 72 °C für 1 min pro kb der Matrize.

Zuletzt stellte eine Inkubation bei 72 °C für 5 min den erfolgreichen Abschluss der DNA-Polymerisation sicher.

Für die Amplifikation des Ulp1-Gens aus chromosomaler DNA von *S. cerevisiae* wurde ein abgewandeltes Protokoll nach Ling *et al.* (1995) befolgt. Eine kleine Menge handelsüblicher Frischhefe wurde in 10 µL Aufschlusspuffer (1,2 M Sorbitol, 80 mM NaP_i, pH 7,4) resuspendiert und die enthaltene DNA durch Zell-Lyse infolge des Zusatzes von 1 U Lyticase freigesetzt. Nach einem Verdau für 30 min bei 37 °C im Thermocycler wurde der Ansatz in einer 1:10-Verdünnung als DNA-Matrize für eine PCR-Reaktion mit der *Pfu Ultra II*-Polymerase im zugehörigen Puffer gemäß dem obenstehenden Verfahren verwendet.

PCR-Amplifikate wurden nach Pufferwechsel mit dem QIAquick PCR Purification Kit mit Restriktionsenzymen behandelt, um die passenden Überhänge für die Insertion in ein Plasmid zu erhalten.

2.3.5 Ortsgerichtete Mutagenese nach dem QuikChange-Verfahren

Der zielgerichtete Austausch einzelner oder mehrerer Nukleotide in Plasmiden, deren Insertion oder Deletion wurde mit Hilfe eines Paares komplementärer Mutagenese-Primer bewerkstelligt, sofern sich die zu mutierende Position nicht an einem Ende des Gens befand und über eine mutagene PCR-Reaktion verändert werden konnte. Die zur Mutagenese nach der QuikChange-Methode (Papworth *et al.*, 1996) eingesetzten Oligodesoxynukleotide wurden derart entworfen, dass die neu einzuführende Mutationsstelle zu beiden Seiten von hybridisierenden Abschnitten ungefähr gleicher Länge flankiert war. Nach einer vereinfachten Regel (4 °C pro G/C-Paar, 2 °C pro A/T-Paar) wurde die Länge dieser flankierenden Bereiche auf eine geschätzte Schmelztemperatur um 80 °C angepasst. Die Mutagenese-PCR-Reaktion fand wie eine gewöhnliche PCR statt, allerdings bei einer herabgesetzten Hybridisierungstemperatur von 45 °C und mit der Besonderheit, dass zunächst zwei getrennte Ansätze mit dem jeweils halben Reaktionsvolumen über 10 Zyklen mit nur einem der beiden Primer gestartet wurden, um je einen mutierten DNA-Einzelstrang gegenüber der Matrize stark anzureichern. Dieser konnte dann nach Vereinigung der beiden Ansätze dem jeweils anderen Primer als Matrize dienen und den Anteil an erfolgreich mutierter DNA im Gesamtansatz erhöhen, der dann für 18 weitere Zyklen amplifiziert wurde. Die neu entstandenen beiden komplementären Plasmid-Einzelstränge konnten so als stabil hybridisiertes doppelsträngiges Plasmid transformiert werden, dessen Einzelstrangbruchstellen in *E. coli* repariert wurden. Das Amplifikat wurde zum spezifischen Verdau

der methylierten Matrizen-DNA vor der Transformation mit 30 U der Endonuclease *DpnI*, welche nur die neu synthetisierte DNA in intakter Form beließ, 1 h lang bei 37 °C inkubiert.

2.3.6 Gensynthese repetitiver PAS-Kassetten durch Assemblierung (nach Schlapschy *et al.*, 2007)

Bei der Konstruktion repetitiver Gen-Kassetten für die PAS-Polypeptide wurden Minimaleinheiten aus einem Paar hybridisierter komplementärer Oligodesoxynukleotide zu größeren Genabschnitten verbunden. Nach präparativer Reinigung über Acrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese, Phosphorylierung der 5'-Enden durch PNK und deren Denaturierung wurden die kodierenden Oligodesoxynukleotide mit einer Länge von 60 bis 72 Basen allmählich über Nacht von 80 °C auf Raumtemperatur abgekühlt, um die korrekte Hybridisierung zu kurzen PAS-Genkassetten zu erreichen. Der komplette Hybridisierungsansatz wurde daraufhin auf T4-DNA-Ligase-Puffer eingestellt und mit 1 µL T4-DNA-Ligase versetzt, deren Aktivität durch Inkubation auf Eis herabgesetzt wurde. Nach 1 h wurde die Ligierungsreaktion beendet, indem die Ligase entweder bei 70 °C 10 min lang inaktiviert oder der Ansatz direkt über präparative Agarose-Gelelektrophorese für 2 h bei einer Spannung von 70 V aufgetrennt wurde. Die Ligierung der Minimaleinheiten lief bewusst nicht bis zur Vollständigkeit ab, damit sich Mischungen oligomerer DNA-Konkatamere bilden konnten. Aus dem Agarose-Gel wurden dann gezielt die Banden geeigneter Größe mit einer Länge von etwa 600 bp extrahiert, die durch eine Assemblierung von 9 oder 10 Minimaleinheiten entstanden waren. Die PAS-Gene wurden zur Sequenzverifikation und Amplifikation auf Hilfsvektoren kloniert.

2.4 Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

2.4.1 Proteinexpression in *E. coli*-Kulturen im Schüttelkolben (nach Schlapschy, 2004)

Je nach Expressionssystem des verwendeten Plasmids erforderte die Proteinproduktion in *E. coli* variierte Bedingungen. Im präparativen Maßstab erfolgte die Expression in 2 L-Kulturen, während für den analytischen Maßstab 50 mL-Kulturen angesetzt wurden.

Der Vektor pRSET5a mit T7-Promotor (Schoepfer, 1993) wurde stets in *E. coli* B-Stämmen mit dem *DE3*-Helferphagengenom eingesetzt, welches die nötige T7-RNA-Polymerase bereitstellte, und zusammen mit pLysE (Studier, 1991) kotransformiert, das

für eine konstante Repression der Basalexpression durch Bereitstellung von Lysozym als Inhibitor der T7-RNA-Polymerase sorgte (Studier & Moffatt, 1986). Die Vorkulturen von BL21(DE3) oder BLR(DE3) wurden für 14 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert, bevor die Hauptkultur damit im Verhältnis 1:40 (v/v) angeimpft und bei 37 °C bis zu einem OD₅₅₀-Wert von 0,5 bis 1,0 angezogen wurde. Die Zellen wurden mit 0,5 mM IPTG für 3 bis 4 h induziert.

Das Expressionsplasmid pASK37 (Skerra & Plückthun, 1991) weist einen *lacUV5*-Promotor auf, dessen Basalexpression durch einen Gehalt von 1% (w/v) Glucose im Nährmedium fast vollständig unterdrückt werden konnte (Plückthun & Skerra, 1989). Vor- und Hauptkulturen im Expressionsstamm *E. coli* KS272 (Meerman & Georgiou, 1994) wurden behandelt wie für die B-Stämme beschrieben, die Hauptkultur wurde aber zugunsten erhöhter Proteinausbeuten bei 30 °C temperiert.

Im Vektor pASK75 (Skerra, 1994) lag ein *tet*-Promotor-Operator-System vor, das die Induktion mit 200 µg/L aTc verlangte, aber keine Basalexpression zeigte. Die Vorgehensweise für die Anzucht und Induktion war dieselbe wie beim pASK37-Vektor, allerdings wurde der *E. coli*-Stamm Origami B mit seinem weniger reduzierenden Cytosol (Bessette *et al.*, 1999) zur Expression des IL-1Ra-Gens gewählt.

Die Zellen aus jeder Expression wurden bei 5000 rpm und 4 °C für 15 min sedimentiert und meist bei -20 °C eingefroren, bevor die Resuspendierung in etwa 20 mL IMAC-Laufpuffer pro Zellsediment aus 2 L Kulturmedium erfolgte.

Zur präparativen Proteinexpression von IL-1Ra-Fusionsproteinen kultivierte *E. coli*-Zellen wurden unter Kühlung auf 4 °C in der French Press mit Hochdruck aufgeschlossen. Die resultierende Aufschluss-Lösung mit löslichem Zielprotein wurde vor dem Auftrag auf eine Chromatographiesäule bei 17000 rpm und 4 °C für 25 min zur Abtrennung von Zelltrümmern zentrifugiert und durch eine 0,45 µm-Membran sterilfiltriert. Die stabileren und strukturell unempfindlicheren TrxA- und SUMO-Fusionsproteine zur Präparation der PAS-Sequenzen erlaubten die Nutzung der Aufschlusshitze und eines Wasserbads zur Erwärmung des Zellaufschlusses auf 70 °C für 15 min, die zur Präzipitation vieler *E. coli*-eigener Proteine führte. Ein Gehalt von jeweils 1 mM EDTA und Dithiodipyridin diente dabei dem Schutz des Zielproteins vor Proteolyse. Nach Abkühlung der Suspension und Abtrennung der unlöslichen Bestandteile über Zentrifugation (4 °C, 17000 rpm, 1 h) wurde das Zielprotein durch portionierte Zugabe gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung ausgefällt (siehe Abschnitt 2.5.2).

Zellen zur Expressionsanalyse von Proteinen wurden vor und nach der Induktion sowie getrennt in die lösliche und unlösliche Zellfraktion auf den Gehalt an Zielprotein untersucht. Dafür wurden jeweils direkt vor Induktion und zum Zeitpunkt der Ernte 1 mL der Zellsuspension abzentrifugiert (13200 rpm, 4 °C, 3 min), das Zellsediment in 80 µL Benzonsaselösung (12,5 U/ml in Benzonsasepuffer) resuspendiert und mit 20 µL 5fach-SDS-Auftragspuffer komplementiert, um dann 1 h bei 4 °C zur Zell-Lyse und DNA-Hydrolyse inkubiert zu werden. Zusätzlich wurden in einigen Fällen 5 mL der Zellbrühe geerntet, in 2 mL der Benzonsase-Lösung wiederaufgenommen und mit dem Ultraschall-Homogenisator S250D unter Eiskühlung in 36 Zyklen (5 s Pulsdauer, 59 s Pause, 50 % Pulsamplitude) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (13200 rpm, 4 °C, 10 min) wurden die löslichen Bestandteile von den unlöslichen getrennt und zur einstündigen Inkubation bei 4 °C mit 5fach-SDS-Auftragspuffer versetzt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden SDS-Proben für die Expressionsanalyse in auf die Zelldichte normierten Mengen aufgetragen.

2.4.2 Anzucht, Induktion und Ernte von *E. coli*-Kulturen im Laborfermenter

(nach Schlapschy, 2004)

Da zumeist größere Mengen an PAS-Polypeptiden mit dem Ziel umfassender Charakterisierung benötigt wurden, wurden die PAS-Fusionsproteine durch Fermentation in *E. coli* KS272 nach einem Protokoll von Schiweck und Skerra (1995) produziert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem 10 L-Glasgefäß in M9-Minimalmedium (Miller, 1972) unter Zuführung von Ammoniak zur pH-Regulierung und als Quelle für Stickstoff sowie von Glucose als Kohlenstoffquelle. Eine konstante Temperatur von 25 °C, ein neutraler pH-Wert und die Begasung mit Sauerstoff wurden über den gesamten Kultivierungsprozess durch entsprechende Regeleinheiten der Firma Schütt Labortechnik sichergestellt. Aufgrund eines ständigen Überschusses an Glucose im Nährmedium war die Unterdrückung der Basalexpression des verwendeten *lacUV5*-Promotors vor der Induktion gegeben.

Eine Vorvorkultur aus 2 mL selektivem LB-Medium (100 mg/L Amp) wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und für 8 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Als Vorkultur für den Fermentationsprozess wurden 360 mL Mineralsalzlösung mit 40 mL 20 % (w/v) Glucose, 4 mL 1 M MgSO₄ sowie den Stammlösungen (siehe Abschnitt 2.1.8) für Thiamin und das Antibiotikum Ampicillin ergänzt. Diese Nährlösung wurde im Verhältnis 1:1000 (v/v) mit der Vorvorkultur angeimpft und für etwa 26 h bei 30 °C und 200 rpm bis zum Erreichen eines üblichen OD-Werts von ungefähr 1,5 angezogen. Die optische

Dichte der Zellen wurde als OD_{550} -Wert anhand geeigneter Verdünnungen in Minimalmedium gemessen, um Messwerte kleiner als 1,0 zu erhalten. Das Kulturgefäß wurde mit 7 L Mineralsalzlösung befüllt, dampfsterilisiert und auf dem Magnetrührer befestigt, bevor die Lösung auf 25 °C temperiert wurde. Das Medium wurde mit 800 mL 20 % (w/v) Glucose, 80 mL 1 M $MgSO_4$, den Antibiotika- und Thiamin-Stammlösungen, jeweils 4 mL $FeCl_3$ - und $Zn(OAc)_2$ -Lösung, 10 mL Spurenelement-Lösung sowie 1 mL 30 %iger Antifoam-A-Lösung versetzt, bevor die Hauptkultur mit der Vorkultur angeimpft wurde.

Die Belüftung mit Druckluft erlaubte in der Anfangsphase eine ausreichende Sauerstoffversorgung und dem dabei anfänglichen Sauerstoffpartialdruck wurde ein Wert von 100 % zugeordnet. Im weiteren Prozessverlauf wurde ein Partialdruck von ≥ 30 % des anfänglichen Sättigungswerts durch automatische Zudosierung von reinem Sauerstoff aufrechterhalten. Durch laufende Titration mit 12,5 % (w/v) Ammoniaklösung wurde der pH-Wert konstant bei 7,0 gehalten. Mit einer Rührgeschwindigkeit von 470 rpm wurden die Bakterienzellen bis zu einer Zelldichte von $OD_{550} \approx 30$ über etwa 20 h kultiviert. Daraufhin erfolgte die Induktion (siehe unten) und weitere Inkubation für 4 h bis zur Zellernte.

Die Kohlenstoff-Versorgung wurde mit 50 % (w/v) Glucoselösung bereitgestellt, welche nach folgendem Schema mit steigenden Flussraten dosiert wurde:

14 mL/h ab $OD_{550} \approx 7,5$;
20 mL/h ab $OD_{550} \approx 12,5$;
30 mL/h ab $OD_{550} \approx 18,5$;
40 mL/h ab $OD_{550} \approx 22,5$.

Bei $OD_{550} \approx 13$ wurden weitere 4 mL der $FeCl_3$ - und $Zn(OAc)_2$ -Lösung sowie 10 mL der Spurenelement-Lösung zugegeben. Zur Induktion wurde schließlich eine Konzentration von 0,5 mM IPTG eingestellt und 5 g vorgelöstes *L*-Prolin sowie 1 mL 30 %ige Antifoam-A-Lösung zugesetzt.

Die Bakterien wurden bei der Ernte zügig für 20 min bei 4 °C und 5000 rpm in einer Zentrifuge des Modells Sorvall RC 12BP+ abzentrifugiert und bei -20 °C eingefroren. Die Zellen aus einer Fermentation wurden in einem Gesamtvolumen von etwa 1 L IMAC-Laufpuffer mit je 1 mM EDTA und Dithiodipyridin resuspendiert und daraufhin mit einem PANDA-Hochdruck-Homogenisator bei 400 bar aufgeschlossen. Dabei wurde bewusst auf Wasserkühlung verzichtet, da der Gesamtzellaufschluss ohnehin direkt zur

Präzipitation eines Großteils der *E. coli*-Proteine erhitzt werden sollte. Der bereits durch die Prozesshitze erwärmte Gesamtzellaufschluss wurde im Wasserbad auf eine Temperatur von 70 °C erhitzt, die für 15 min aufrechterhalten wurde. Zur Abkühlung auf Raumtemperatur wurde der Zellaufschluss 1 h einer Umgebungstemperatur von 4 °C im Kühlraum ausgesetzt. Zelltrümmer und Proteinpräzipitat wurden durch einstündige Zentrifugation bei 4 °C und 10000 rpm in einer Zentrifuge des Modells Sorvall RC6+ vom löslichen Zellextrakt mit dem Zielprotein separiert. Aus jeder Fermentation von TrxA-PAS-Fusionsproteinen wurden etwa 400 mL Überstand mit rekombinantem Protein erhalten, der daraufhin der Ammoniumsulfat-Fällung unterzogen wurde (siehe Abschnitt 2.5.1).

2.4.3 Anzucht, Induktion und Ernte im TUM Forschungszentrum Weiße Biotechnologie

Das Fusionsprotein TrxA-PA#1(600) wurde zudem in einem 50 L-Bioreaktor im Biotechnikum in Garching produziert (siehe Abbildung 3). Mit wenigen durch die Infrastruktur bedingten Abweichungen wurde dabei grundsätzlich dasselbe Protokoll wie bei der Fermentation im Labormaßstab befolgt. Allerdings wurden zur Vermeidung störender Stoffwechselnebenprodukte und der damit einhergehenden Übersäuerung und Herabsetzung der Expressionseffizienz die Zellen mit limitierter Kohlenstoffquelle – d. h. Glucose-Gehalt im Medium unterhalb von 1 % (w/v) – mit einem kontrollierten Feed-Programm kultiviert. Damit wurde eine exponentielle Wachstumsrate erreicht, jedoch wurde so die Basalexpression des *lacUV5*-Promotors in der Hauptkultur nicht mehr durch einen ausreichenden Glucosegehalt unterdrückt, so dass das TrxA-Fusionsprotein von Beginn des Fermentationsprozesses an in geringen Mengen exprimiert wurde.

Als Vorvorkulturen dienten Glycerin-Kulturen des transformierten Stammes KS272, mit denen im ungefähren Verhältnis von 1:150 (v/v) je zwei Vorkulturen zu 200 bzw. 250 mL in LB-Selektivmedium (100 mg/L Amp) mit 1 % (w/v) Glucose inokuliert wurden. Nach einer Inkubationsdauer von 15 h bei 37 °C und 180 rpm erreichten diese eine Zelldichte um $OD_{550} \approx 2,0$ und alle vier Vorkulturen (1,8 L) wurden in das im Bioreaktor vorbereitete *Batch*-Medium (34,3 L) im Verhältnis 1:20 (v/v) überimpft, welches die Hälfte der geplanten Gesamtmenge an $FeCl_3$, $Zn(OAc)_2$ und Spurenelementen sowie 80 % des Gesamtzusatzes an $MgSO_4$ enthielt. Bei einer Rührleistung von 550 rpm wurde die Hauptkultur bei 37 °C bis zu einer $OD_{550} \approx 45$ über etwa 27 h angezogen.

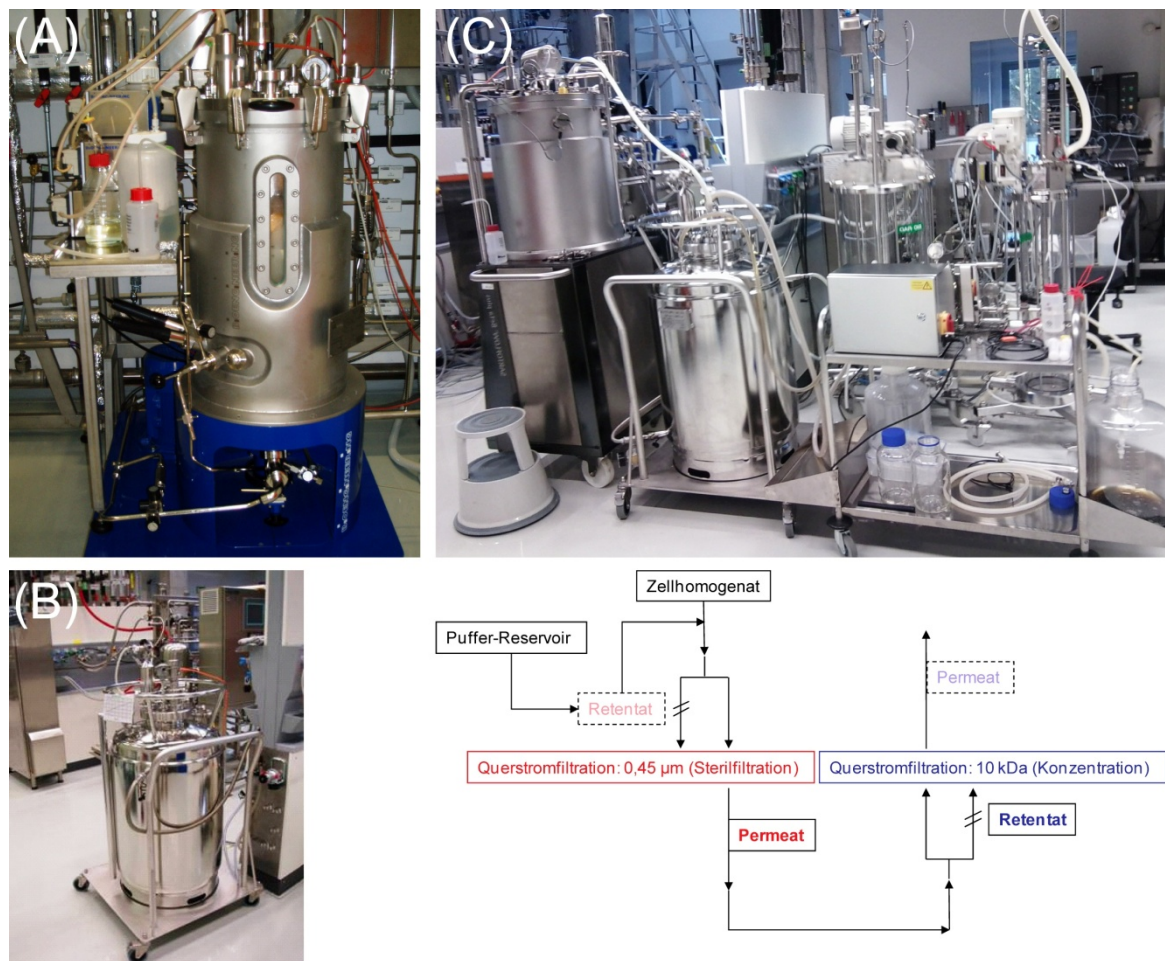


Abbildung 3: Infrastruktur im Forschungszentrum Weiße Biotechnologie Garching. (A) 50 L-Bioreaktor zur Fermentation. (B) 200 L-Tank für die Vorbereitung, den Transport und die Lagerung von Suspensionen und Lösungen. (C) Serienschaltung aus zwei Querstromfiltrations-Einheiten zur Sterifiltration und Konzentrierung des löslichen Zellextrakts mit dem rekombinanten Protein. Die Fraktionen mit dem Zielprotein TrxA-PA#1(600) sind fett hervorgehoben, wohingegen die verworfenen Fraktionen blass dargestellt und mit unterbrochenen Linien umrahmt sind. In den Retentat-Fraktionen werden Bestandteile des Aufschlusses, deren Größe die Ausschlussgröße der Membrankassetten übersteigt, zurückgehalten, was mit doppelt durchgestrichenen Pfeilen angedeutet ist.

Jeweils die andere Hälfte des Gesamtzusatzes an FeCl_3 , Zn(OAc)_2 und Spurenelementen und ein Fünftel des MgSO_4 -Gehalts wurden der Kultur zur kontinuierlichen Nährstoffversorgung zusammen mit der 50 % (w/v)-Glucoselösung zugefüttert. Sauerstoff wurde über Druckluft bei einem Überdruck von 0,1 bar und einer Flussrate von 25 NL/min zugeführt. Der neutrale pH-Wert wurde durch Nachtitration mit 25 % (w/v)-Ammoniaklösung reguliert und die Schaumbildung über sensorabhängige Zuführung von Antifoam-A-Lösung unterdrückt. Bei Probenentnahmen zur Überwachung des OD_{550} -Werts und der Proteinbiosynthese wurde meist zusätzlich der Glucosegehalt mit Hilfe von Teststäbchen und dem zugehörigen Blutzucker-Messgerät Accu-Chek Comfort der

Firma Roche Diagnostics bestimmt. Zum Induktionszeitpunkt wurde ein Gehalt von 0,5 mM IPTG (als 0,5 M-Stammlösung) und 625 mg/L L-Prolin (als 625 g/L-Stammlösung) im Medium eingestellt und die Überexpression des Zielproteins bei 30 °C für 6 h aufrechterhalten.

Zur Zellernte wurde das gesamte Kulturvolumen (etwa 50 L) unter Kaltwasserkühlung auf etwa 18 °C in einen 200 L-Tank überführt und mit Hilfe einer Stammlösung von 2,2'-Dithiodipyridin (1 M in DMF) auf einen Gehalt von etwa 1 mM dieses Cysteinproteaseinhibitors eingestellt. Die Zellsuspension durchlief beim Aufschluss in drei Kreislaufpassagen einen Ariete-Hochdruckhomogenisator mit einer Pumprate von 150 L/h und einem Druck von 800 bar und wurde dann mit Hilfe von Wasserdampf für 30 min auf 75 °C erhitzt.

Nach diesem Hitzedenaturierungsschritt wurde der Zellaufschluss durch zwei in Serie geschaltete Querstromfiltrations-Anlagen geleitet (Abbildung 3C). Die erste Einheit übernahm dabei die Funktion der Abtrennung von Zelltrümmern und Proteinpräzipitat mittels Sterilfiltration durch 0,45 µm-Membrankassetten. Das filtrierte Permeat mit dem löslichen Zielprotein wurde direkt über die 10 kDa-Membranen in der zweiten Filtrationseinheit um den Faktor 15 konzentriert, um dann portioniert und bei -20 °C gelagert zu werden.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung

(nach Scopes, 1994)

Fusionsproteine zur Präparation von PAS-Polypeptiden wurden aus der hitzebehandelten löslichen Fraktion des *E. coli*-Gesamtzellaufschlusses (siehe Abschnitt 2.4) mit Hilfe gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung bei 4 °C gefällt. Die Fällung wurde mit jeweils etwa 100 mL des Überstands aus der Fermentation von TrxA-PAS-Fusionsproteinen (siehe Abschnitt 2.4.2) bzw. mit 60 mL des Überstands aus der Expression von Fusionsproteinen mit geladenen PAS-Polypeptiden in 4 x 2 L Schüttelkultur (siehe Abschnitt 2.4.1) durchgeführt. Die gesättigte Ammoniumsulfat-Stammlösung (100 % Sättigung: ca. 4,1 M) wurde aus 550 g festem Ammoniumsulfat in einem Gesamtvolumen von 1 L entionisiertem Wasser hergestellt. Die Berechnung der jeweils nötigen Zugabevolumina zur Einstellung des gewünschten Ammoniumsulfat-Gehalts in der Zellextrakt-Lösung erfolgte nach dem Tabellenwerk von Scopes (1994). Der

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gehalt wurde ausgehend von 15 % der Sättigungskonzentration schrittweise um 5 % erhöht, wobei die neue Konzentration des Fällungsmittels über einen Zeitraum von etwa 15 min langsam unter Rühren eingestellt wurde, um eine lokale Präzipitation infolge von Konzentrationsgradienten zu vermeiden. Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation mit einer Zentrifuge des Modells Sorvall RC6+ bei 15000 rpm und 4 °C für 15 min abgetrennt. Zwischen 15 und 25 % der Sättigungskonzentration präzipitierten die TrxA-PAS-Fusionsproteine aus den Fermentationen fast quantitativ und konnten so von Verunreinigungen weitgehend befreit werden. Die Fusionsproteine mit geladenen PAS-Polypeptiden wurden bei 35 bis 40 % der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigungskonzentration unlöslich. Die mittels SDS-PAGE ausgewählten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitatfraktionen wurden in hochkonzentrierter Form in jeweils 5 mL des gewünschten Puffers für die anschließende Ionenaustauschchromatographie (siehe Abschnitt 2.5.3) unter Verwendung eines Vortex-Genie 2-Schüttelapparats resolubilisiert und vereinigt. Der Fällungsschritt ermöglichte nach Dialyse zur vollständigen Entsalzung (siehe Abschnitt 2.5.3) die IEX-Reinigung des resolubilisierten Präzipitats bis zur Homogenität.

2.5.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

(nach Schlapschy, 2004)

Als schonender erster Reinigungsschritt aus dem löslichen Zellextrakt wird für viele Proteine die Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC) genutzt (Porath *et al.*, 1975). Die Bindung von Proteinen am Säulenmaterial erfolgt hierbei über die Komplexierung freier Valenzen von Übergangsmetall-Ionen durch kumulierte Cystein- und Histidin-Reste des Proteins, während die Metallionen an der Säulenmatrix über chelatisierende Liganden verankert sind. In der vorliegenden Arbeit wurden Ni^{2+} -Ionen an einem Nitrilotriessigsäure (NTA)-modifizierten High Performance-Sepharose-Material feiner Korngröße immobilisiert und zur Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine mit Hexahistidin-Anhängsel (Hochuli, 1988) in einem Imidazol-Gradienten eingesetzt. Zur Reinigung der SUMO-Protease Ulp1 wurde Iminodiessigsäure (IDA)-Sepharose High Performance mit komplexierten Zn^{2+} -Ionen verwendet.

Die chromatographische Reinigung erfolgte mittels peristaltischer Pumpen und zur Schonung des zu reinigenden Proteins vor Proteolyse und Denaturierung bei einer Umgebungstemperatur von 4 °C. Nach dem Beladen der IMAC-Säule mit Ni^{2+} - bzw. Zn^{2+} -Ionen durch Beschicken mit einem Säulenvolumen 100 mM NiSO_4 bzw. ZnSO_4 und Nachspülen mit Wasser erfolgte die Aquilibrierung mit Laufpuffer bis zum Erreichen der

Basislinie. Der filtrierte Zellextrakt mit rekombinantem Protein wurde jeweils mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Der Zellextrakt aus einer bis zwei 2 L-Schüttelkulturen wurde auf IMAC-Säulenvolumina zu 4 mL Zn-IDA-Sepharose (für Ulp1) bzw. 7 mL Ni-NTA-Sepharose (für SUMO-PAS#1(200), SUMO-PA#1(200), SUMO-PAScal und SUMO-QQH(96)) aufgetragen. Zur IMAC-Reinigung der IL-1Ra-Proteine aus jeweils vier 2 L-Expressionskulturen sowie zur Reinigung von TrxA-PA#1(600) aus der 8 L-Fermentation wurden Ni-NTA-Säulen mit 20 mL Bettvolumen verwendet.

Nach Waschen mit etwa dem zehnfachen Auftragsvolumen an IMAC-Laufpuffer und erneutem Erreichen der Basislinie wurden ein Imidazol-Konzentrationsgradient von 0 bis 100 mM (für PAS(600)-Fusionsproteine) oder 150 mM (für PAS(200)- und PAS(400)-Fusionsproteine) über 12 Säulenvolumina bei 2 mL/min angelegt und Elutionsfraktionen mit etwa dem halben Säulenvolumen gesammelt. Nicht PASylierte Proteine wie die SUMO-Protease Ulp1 sowie IL-1Ra wurden in einem Gradienten von 0 bis 300 mM Imidazol eluiert. Durch Spülen mit 50 mM EDTA in IMAC-Laufpuffer wurde das Säulenmaterial nach der Reinigung von den komplexierten Metall-Ionen mitsamt nicht eluierbarem Protein befreit und stand so für ein erneutes Beladen zur Verfügung.

Ein erster Reinigungsschritt des Fusionsproteins TrxA-PA#1(600) aus der 50 L-Fermentation im Forschungszentrum Weiße Biotechnologie fand an 600 mL eines für technische Anwendungen optimierten IMAC-Materials (Ni-Sepharose Fast Flow) statt, welches zwar geringere Protein-Bindekapazität aufweist als das High-Performance-Material, aber die Verwendung wesentlich höherer Flussraten um 50 mL/min erlaubt. Zur Elution des Fusionsproteins mit einem Stufengradienten wurden jeweils 2 L 25, 55 und 100 mM Imidazol in Laufpuffer verwendet.

Trotz der höheren Bindekapazität des Ni-Sepharose High Performance-Materials reichte die Interaktion PASylierter Proteine mit dem Säulenmaterial generell für die effiziente Trennung von unspezifisch gebundenen Wirtszellproteinen nicht aus. Nach dieser Erkenntnis wurden nur die IL-1Ra-Proteine und die SUMO-Protease Ulp1 weiterhin mit dieser Methode gereinigt, wohingegen die strukturelle Stabilität der TrxA- und SUMO-Fusionsproteine einen alternativen Reinigungsschritt durch Hitzeinkubation erlaubte. Eine Vorelution mit 15 mM Imidazol während der IMAC-Reinigung führte für die IL-1Ra-Proteine und Ulp1 zu einer Erhöhung der Proteinreinheit in den IMAC-Elutionsfraktionen. Nach Zugabe von EDTA bis zu einer Gesamtkonzentration von 1 mM und Überprüfung mittels SDS-PAGE wurden die vereinigten IMAC-Fractionen in der Regel für die Ionenaustauschchromatographie (siehe Abschnitt 2.5.3) vorbereitet.

2.5.3 Ionenaustauschchromatographie (IEX)

Die Ionenaustauschchromatographie stellte den jeweils letzten Reinigungsschritt der PASylierten Proteine in dieser Arbeit dar und fand an den ÄKTA-Chromatographie-Systemen statt. Je nach vom ProtParam-Programm (Gasteiger *et al.*, 2005) berechneten pI-Wert wurde Anionenaustausch- (AEX) oder Kationenaustauschchromatographie (CEX) eingesetzt, um die Proteine über ihre pH-abhängige Oberflächenladung an geeigneten Säulenmaterialien zu immobilisieren und mittels eines NaCl-Konzentrationsgradienten möglichst selektiv zu eluieren.

Bei der Präparation PASylierter Proteine wurden immer Bedingungen gewählt, die eine Bindung des Fusionsproteins an die Säule erlaubten. Dagegen wurde bei der Reinigung der freien PAS-Polypeptide aus den Spaltansätzen eine subtraktive Chromatographie durchgeführt, bei der die PAS-Sequenzen die Säule möglichst ohne Interaktion durchwanderten und nur die abgespaltenen Fusionspartner sowie ungespaltenes Ausgangsprotein an das Säulenmaterial gebunden wurden. Zur Vorbereitung der IEX-Chromatographie wurden vereinigte Fraktionen aus vorhergehenden Reinigungsschritten durch IMAC bzw. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung dreimal (davon mindestens einmal über Nacht) gegen das 100fache Volumen des vorgesehenen Laufpuffers dialysiert, um eine optimale Bindung an das IEX-Material durch geringstmögliche Ionenstärke in den Proben zu gewährleisten. Meist hatte die Dialyse gegen einen IEX-Laufpuffer mit niedrigem Salzgehalt die Präzipitation von *E. coli*-eigenen Proteinen und damit einen weiteren Reinigungsschritt zur Folge, da sie die Abtrennung der Proteinaggregate mittels Zentrifugation und Sterilfiltration durch eine 0,45 μm -Membran ermöglichte. Die Proteinlösungen wurden je nach Proteingehalt und Auftragsvolumen in konzentrierter Form mit langsamen Flussraten um 1 mL/min auf IEX-Säulen mit 1, 6 oder 20 mL Bettvolumen appliziert. Zur Elution wurde die Flussrate auf 2 mL/min erhöht und es wurden ungefähr 35 Fraktionen mit einer Größe von jeweils 1 bis 12 mL (ein halbes bis ein ganzes Säulenvolumen) gesammelt.

Für PAS-Fusionsproteine mit SUMO (pI \approx 5,87) und TrxA (pI \approx 5,92) wurde die Resource Q- Säule bzw. das Source 15Q-Material zur AEX-Reinigung gewählt, welches über seine quartären Ammonium-Gruppen die negativen Ladungen entsprechender Fusionsproteine im AEX-Laufpuffer (20 mM Tris/HCl pH = 9,5) zu binden vermag. Ein flacher Gradient von 0 bis 100 oder 200 mM NaCl sorgte für die Elution der PASylierten Proteine in reiner Form bei etwa 50 mM NaCl und die effiziente Abtrennung unerwünschter Probenbestandteile. Zur AEX-Reinigung der SUMO-Fusionsproteine mit PA#1(200), PAS#1(200) und PAS-cal aus der Produktion in 2 L Schüttelkultur wurde

eine Resource Q-Säule mit 1 mL Bettvolumen verwendet und für TrxA-PA#1(600) aus der 50 L-Fermentation zunächst eine solche Säule mit 6 mL Bettvolumen, bevor größere Mengen dieses und anderer TrxA-PAS-Fusionsproteine aus der Ammoniumsulfat-Präzipitation an 20 mL Source 15Q gereinigt wurden. Auch die TrxA-Fusionsproteine mit Glu-haltigen PAS-Polypeptiden wurden an Resource Q (6 mL) gereinigt. Freie PAS-Polypeptide wurden, mit Ausnahme der negativ geladenen PAS-Sequenzen (siehe nächster Absatz), aus den Spaltungsreaktionen der zugrunde liegenden Fusionsproteine stets durch subtraktive AEX-Chromatographie an 20 mL Source 15Q abgetrennt.

Die IL-1Ra-Fusionsproteine ($pI \approx 6,44$) sowie die SUMO-Fusionsproteine mit Lys-haltigen PAS-Polypeptiden aus jeweils 2 x 2 L *E. coli*-Schüttelkultur eigneten sich besser zur Bindung an eine Resource S-Säule bzw. Source 15S-Matrix bei der CEX-Reinigung. Die chromatographische Reinigung der IL-1Ra-Proteine fand in CEX-Laufpuffer (40 mM $NH_4OAc/AcOH$ pH = 6,5) unter Immobilisierung der rekombinanten Proteine mittels ihrer positiven Oberflächenladungen an Sulfonat-Gruppen des Säulenmaterials von Resource S (1 mL) statt. Ein NaCl-Gradient von 0 bis 300 mM führte zur Elution der Proteine in reiner Form bei etwa 150 mM NaCl. Für die Reinigung der SUMO-Fusionsproteine mit positiv geladenen PAS-Sequenzen kamen eine Resource S-Säule mit 6 mL Bettvolumen sowie CEX-Laufpuffer mit pH 4,5 und einem NaCl-Konzentrationsgradienten von 0 bis 500 mM zum Einsatz. Auch die subtraktive CEX-Chromatographie zur Abtrennung der negativ geladenen PAS-Polypeptide aus dem tryptischen Spaltansatz der entsprechenden TrxA-Fusionsproteine erfolgte in eben diesem Laufpuffer mit Hilfe von 20 mL Source 15S.

Wie bei der Affinitätschromatographie war auch für die IEX-Reinigungsschritte beim Vergleich mit den Bindungseigenschaften unmodifizierter Proteine grundsätzlich eine schwächere Säuleninteraktion und frühere Elution PASylierter Proteine zu beobachten, was jedoch bei der Abtrennung nicht PASylierter Spezies von Vorteil war.

2.5.4 Spaltung von PAS-Fusionsproteinen

Die PASylierten Fusionsproteine wurden zur Herstellung freier PAS-Sequenzen mittels verschiedener Techniken gespalten, wobei der Reaktionsverlauf bzw. Umsatz in den Spaltansätzen jeweils durch SDS-PAGE-Analyse überprüft wurde.

Zur direkten Spaltung von SUMO-Fusionsproteinen, erhalten aus der Expression in 2 L-Schüttelkulturen, nach der AEX-Chromatographie (siehe Abschnitt 2.5.3; in 20 mM Tris/HCl pH 9,5 mit etwa 50 mM NaCl) oder nach der Dialyse in diesen Puffer wurde den

Proteinlösungen die ebenfalls in vorliegender Arbeit gereinigte rekombinante SUMO-Protease Ulp1 im Substrat-Verhältnis von 1:1000 (w/w) in einem Gesamtvolumen von etwa 20 mL zugesetzt. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Auch die Trypsin-Spaltung von TrxA(R117)-PAS-Fusionsproteinen ließ sich direkt unter den nach der AEX-Elution vorherrschenden Pufferbedingungen durchführen. Nach Zugabe von 5 mg rekombinatem Trypsin (TripLE Select Enzyme) pro 100 mg Fusionsprotein wurde der Spaltansatz (etwa 20 mL Gesamtvolumen) bei 37 °C über Nacht inkubiert.

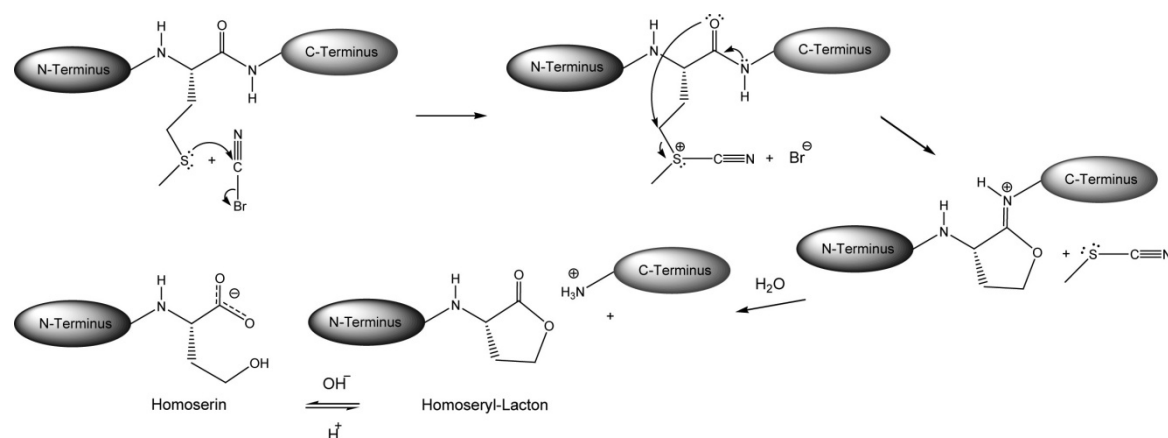


Abbildung 4: Mechanismus der Bromcyan-Spaltung. N- und C-terminale Peptidfragmente sind als Ellipsen schematisiert. Das stark elektrophile Kohlenstoffatom im Bromcyan wird zuerst vom Methionin-Schwefelatom unter Bildung eines Sulfoniumions angegriffen. Als neues Elektrophil induziert dieses den nukleophilen Angriff des Carbonyl-Sauerstoffs der benachbarten Peptidbindung an der schwefelgebundenen Methylengruppe und ermöglicht so die Zyklisierung zum Fünfring und Abspaltung von Methylthiocyanat. Das entstandene Imidolacton hydrolysiert spontan zum Homoseryl-Lacton unter Freisetzung des unmodifizierten C-terminalen Fragments, wohingegen das ursprüngliche N-terminale Methionin als Homoserin-Rest aus der Reaktion hervorgeht.

Zur Abspaltung der Serin-freien P/A-Polypeptide aus Fusionsproteinen mit TrxA und C-terminalem Methioninrest mittels Bromcyan (Gross, 1967) wurden die AEX-Eluatate zunächst lyophilisiert. Dafür wurde die Proteinlösung gegen 50 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{NH}_3$ pH 8,5 dialysiert (dreimal, davon mindestens einmal über Nacht) und in einem Labor-Gefriertrockner ALPHA1-2 LD plus vollständig getrocknet. Das Lyophilisat wurde in 70 % (v/v) Ameisensäure mit einer Proteinkonzentration um 5 mg/mL gelöst, und daraufhin wurde ein 100facher molarer Überschuss an Bromcyan (5 M-Lösung in ACN) über die vorhandenen Methionin-Reste zugegeben. Der chemische Mechanismus dieser Reaktion ist in Abbildung 4 dargestellt. Nach ein bis zwei Tagen Inkubationsdauer bei Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz im Rotations-Vakuum-Verdampfer getrocknet und anschließend im Ultraschallbad für 15 min in AEX-Laufpuffer

resolubilisiert. Die Pyroglutamat-Zyklisierung von PA#1-Polypeptiden mit N-terminalem Glutamin-Rest wurde direkt nach der BrCN-Inkubation der entsprechenden TrxA-Fusionsproteine, welche nach dem C-terminalen Met-Rest ein zusätzliches Glutamin trugen, durch zweistündige Erwärmung des Spaltansatzes auf 50 °C im Wasserbad herbeigeführt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur für 30 min wurden auch solche BrCN-Spaltansätze im Rotations-Vakuum-Verdampfer getrocknet. Alle mit Bromcyan kontaminierten Reaktionsgefäße und Verbrauchsmaterialien wurden zur Neutralisierung von BrCN-Resten mit 13 %iger (w/v) Natriumhypochlorit-Lösung behandelt.

2.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(nach Gebauer, 2013)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Lämmli, 1970) mit dem Puffersystem nach Fling und Gregerson (1986) diente der Analyse von Proteinproben durch deren Auftrennung nach der Größe. Dabei wird die elektrophoretische Mobilität der Proteine durch die Anlagerung negativ geladener Dodecylsulfat-Reste an die Proteinoberfläche aufgrund hydrophober Wechselwirkungen und somit durch die jeweils proteintypische Größe, Eigenladung und Hydrophobie bestimmt. In der Regel ist die Laufstrecke in der SDS-PAGE indirekt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts.

Standardmäßig kamen Gele vom Format 8,6 x 7,7 cm mit einer Schichtdicke von 1 mm und einem Polyacrylamid-Gehalt von 12 % (w/v) für die Proteinanalyse zum Einsatz. Um die bestmögliche Auftrennung PASylierter Proteine zu gewährleisten, wurde, wenn nicht anders beschrieben, ein sehr kleines Sammelgel mit 0,5 cm Länge in Kombination mit einem möglichst großen Trenngel-Bereich verwendet. Die Gel-Lösungen für die Polymerisation setzten sich folgendermaßen zusammen:

Trenngel (pro 10 mL):

Acrylamid-Stammlösung: 4,0 mL

4 x Lower-Tris-Puffer: 2,5 mL

H₂O: 3,5 mL

TEMED: 8 µL

10 % APS (w/v): 80 µL

Sammelgel (pro 6 mL):

Acrylamid-Stammlösung: 1,0 mL

4 x Upper-Tris-Puffer: 1,5 mL

H₂O: 3,5 mL

TEMED: 8 µL

10 % APS (w/v): 80 µL

Zur Herstellung der Gele wurden entsprechend den Herstellerangaben jeweils zwei Glasplatten mit einer Silikonabdichtung zusammengesetzt und zwischen Klammern

befestigt. Die frisch angesetzte Trenngel-Lösung wurde zwischen die Platten pipettiert und mit etwa 1 mL 70 % (v/v) Isopropanol zur Vermeidung von Bläschenbildung und Luftabgrenzung überschichtet. Nach einer Polymerisationsdauer von 30 min wurde die überstehende Lösung abgenommen und die Sammelgel-Lösung aufgegossen, in die der Gel-Taschenformer eingesetzt wurde. Nach weiteren 30 min wurde das polymerisierte Gel luftblasenfrei in die mit SDS-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Proteinproben wurden zum Auftrag auf die SDS-PAGE mit 5fach-Auftragspuffer gemischt und 5 min lang bei 95 °C im Metallblockthermostat denaturiert. Die Geltaschen wurden mit maximal 20 µL Probe befüllt, die Elektrophorese erfolgte bei 130 V für etwa 2 h, bis der Bromphenolblau-Marker das Gel vollständig passiert hatte.

Zur Färbung mit Coomassie Brilliantblau R-250 (De St. Groth *et al.*, 1963) wurde das Gel für mindestens 1 h in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Danach wurde es für 20 min mit Entfärber-Lösung I und meist über Nacht mit Entfärber-Lösung II behandelt, bis sich die Proteinbanden in der gewünschten Intensität vor dem farblosen Hintergrund abzeichneten. Bis zur Photographie konnte das Gel in Aufbewahrungslösung konserviert werden.

Reine PAS-Polypeptide und PEG-Polymere wurden mithilfe der BaI_2 -Färbemethode (Skoog, 1979) sichtbar gemacht, wobei ein modifiziertes Protokoll nach Kurfürst (1992) verwendet wurde. Das beste Auftrennungsergebnis wurde mit Gelen bewerkstelligt, deren Trenngel-Bereich einen Gehalt von 20 % (w/v) Polyacrylamid aufwies und ungefähr zwei Drittel der zur Verfügung stehenden Laufstrecke umfasste, das übrige Drittel wurde vom Sammelgel eingenommen und enthielt nur 7 % (w/v) Polyacrylamid. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für 3 h. Nach Abspülen von überschüssigem SDS mit Wasser wurde das Gel 5 min lang in 2,5 % (w/v) BaI_2 inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift in Wasser und die eigentliche Färbung in Lugol-Lösung (10 % (w/v) KI, 5 % (w/v) I_2) für 5 min. In Wasser ließ sich das nun rot-braune Gel rapide bis zum Erscheinen von tiefroten Banden vor einem gelb-orangen Hintergrund entfärben und musste zeitnah photographisch dokumentiert werden. Nur mit hochkonzentrierten PAS-Proben (10 mg/mL) kam es zu einer deutlichen Färbung, während bei den PEG-Proben geringere Konzentrationen (0,1 mg/mL) ausreichend waren.

2.5.6 Western Blotting

(nach Schlapschy, 2004)

Für die eindeutige Identifizierung und Zuordnung von Proteinbanden in der SDS-PAGE wurde das *Western-Blotting*-Verfahren angewendet. Die betreffenden SUMO- und TrxA-PAS-Fusionsproteine wurden immunchemisch über ihr N-terminales Hexahistidin-Anhängsel nachgewiesen, indem die Proteinbanden im elektrischen Spannungsfeld von einem Gel aus der SDS-PAGE auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen wurden.

Das Gel wurde direkt nach der Elektrophorese für 20 min in Transfer-Puffer inkubiert und entsprechend der *Semi-Dry*-Methode auf die ebenso befeuchtete Nitrozellulose-Membran zwischen Stapeln aus jeweils 3 Lagen puffergetränktem Whatman-Filterpapiers (8,5 x 5,5 cm) geschichtet. Zur Kompensierung der herabgesetzten elektrophoretischen Mobilität PASylierter Proteine wurde für den Elektrotransfer über eine Dauer von 2 h eine Stromstärke von 60 mA angelegt. Nach kurzem Waschen der Membran in PBS/T-Puffer wurden freie Bindungsstellen mithilfe von 3 % (w/v) BSA in PBS/T für 1 h bei Raumtemperatur oder 4 °C über Nacht blockiert. Die Membran wurde dreimal jeweils 10 min mit PBS/T-Puffer gespült, bevor sie 1 h lang mit einer 1:1000-Verdünnung des Primärantikörpers gegen das Hexahistidin-Anhängsel inkubiert wurde. Es folgten erneut drei zehnmütige Waschschrte in PBS/T und die einstündige Inkubation mit einer 1:1000-Verdünnung des Sekundärantikörpers, einem Konjugat mit Alkalischer Phosphatase. Die Membran wurde nun jeweils zweimal 10 min lang in PBS/T und danach in PBS gespült, woraufhin sie in AP-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) äquilibriert wurde. Die Zugabe von 7,5 µL NBT-Lösung (75 mg/mL in 70 % (v/v) DMF) und 45 µL BCIP-Lösung (50 mg/mL in DMF) führte in Verbindung mit der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Blake *et al.*, 1984) zu einer selektiven Anfärbung des Hexahistidin-Anhängsel bei nur wenig unspezifischen Nebenreaktionen. Durch Abgießen der Reaktionslösung und Waschen mit Wasser konnte die Farbreaktion zum gewünschten Zeitpunkt beendet werden. Die Membran wurde zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet und zur Dokumentation verwahrt.

2.5.7 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte über die Extinktionsmessung bei 280 nm (E_{280}) in einer Quarzküvette der Schichtdicke $d = 1$ cm mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ($E_{280} = \epsilon \cdot c \cdot d$). Als Referenz diente immer die jeweils vorliegende Pufferlösung, bei Überschreitung eines Extinktionsmesswerts von 1,0 wurden Verdünnungen der Probe gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ der

Proteine wurde anhand der Primärsequenz aus den einzelnen Absorptionsbeiträgen von Tryptophan, Tyrosin und Cystin (Gill & von Hippel, 1989) mit dem ProtParam-Algorithmus (www.expasy.org; Gasteiger *et al.*, 2005) berechnet. Da keine PAS-Sequenz aufgrund des Fehlens entsprechender Seitenketten einen Beitrag zur Absorption bei 280 nm liefert, konnten für alle PASylierten Proteine die Koeffizienten der unmodifizierten Versionen verwendet werden. Diese beliefen sich bei SUMO auf $\epsilon = 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, bei Ulp1 auf $29910 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, bei TrxA auf $13980 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und bei IL-1Ra auf $15470 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, jeweils unter der vereinfachenden Annahme vollständig reduzierter Cystein-Reste.

Bei freien PAS-Polypeptiden wurde die Konzentration in Spektroskopie-Puffer durch Extinktionsmessung bei 205 nm (E_{205}) gemäß einer von Scopes (1994) entwickelten Methode abgeschätzt. Der experimentell ermittelte Extinktionskoeffizient bei 205 nm (Scopes, 1974) ergibt sich danach wie folgt:

$$\epsilon_{205}^{\text{mg/mL}} = 27 + 120 \cdot \frac{E_{280}}{E_{205}} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Für die PAS-Sequenzen kann also ein Wert von 27 angenommen werden, da bei 280 nm keine Extinktion zu beobachten ist. Bei der Präparation freier PAS-Polypeptide wurde deren Konzentration im Durchlauf der subtraktiven AEX-Reinigung anhand verdünnter Proben in Spektroskopie-Puffer bestimmt. Konzentrierte PAS-Polypeptid-Proben für die Viskositätsmessungen wurden durch sequentielle 1:10-Verdünnung auf eine Verdünnung von 1:10000 gebracht. Der letzte Verdünnungsschritt erfolgte jeweils mit Hilfe von PD-10-Säulen unter Pufferwechsel in den Spektroskopie-Puffer.

2.6 Biophysikalische Analysen

2.6.1 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Gelfiltration bzw. Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) wurde hauptsächlich als analytische Methode zur hydrodynamischen Charakterisierung von Proteinen unter Einsatz eines ÄKTA-Chromatographie-Systems verwendet. Zudem wurde die SEC im präparativen Maßstab als zweiter Reinigungsschritt für die rekombinante SUMO-Protease Ulp1 nach der IMAC-Chromatographie (siehe Abschnitt 2.5.2) bzw. zur Reinigung des MS-Standards „PAS-cal“ nach Freisetzung aus dem SUMO-Fusionsprotein herangezogen.

In der SEC werden an einer Schüttung aus porösen Körnchen die Moleküle in einer Probe nach der Größe getrennt, da sie Zugang zu unterschiedlichen Porengrößen haben und somit spezifische Verweilzeiten im Säulenbett zeigen. Zur Vermeidung von Interaktionen mit der Säulenmatrix werden meist eine modifizierte Sepharose mit inerten Endgruppen und ein Laufpuffer mit hinreichendem Salzgehalt eingesetzt (Mori & Barth, 1999).

Die analytische Säule Superdex S200 10/300 GL mit einem Bettvolumen von 24 mL wurde mit sterilfiltriertem und entgastem SEC-Laufpuffer (50 mM NH_4HCO_3 , 500 mM NaCl) äquilibriert, bevor eine Protein- oder Polypeptid-Probe mit 300 μL Volumen und einer Konzentration von 15 μM über eine Probenauftragsschleife aufgetragen wurde. Bei einer Flussrate von 0,5 mL/min wurde die Absorption der Proteine bei 280 nm verfolgt. Mangels anderer Chromophore wurden die Peptidbindungen von PAS-Polypeptiden zusätzlich bei 225 nm nachgewiesen, was kompatibel mit der zunehmenden Eigenabsorption von Puffersubstanzen und gelöstem Sauerstoff bei kürzeren UV-Wellenlängen war. Die Kalibrierung der SEC-Säule mit zertifizierten Standardproteinen (Cytochrom C: 12,4 kDa; Carboanhydrase: 29 kDa; Ovalbumin: 43 kDa; Rinderserumalbumin: 66 kDa; Alkoholdehydrogenase: 150 kDa; β -Amylase: 200 kDa; Apoferritin: 443 kDa) erlaubte die Korrelation der jeweils gemessenen Elutionsvolumina V mit dem bekannten Molekulargewicht M durch folgende Beziehung:

$$\log M = -A \cdot K_{av} + B \quad (\text{Gleichung 2})$$

Hierin stellen A und B säulespezifische Konstanten dar. Genau genommen müsste die intrinsische Viskosität $[\eta]$ des untersuchten Polymers/Proteins in diese Beziehung mit einbezogen werden ($\log([\eta]M) = -A \cdot K_{av} + B$). Allerdings wird für alle globulären Proteine ein konstanter Wert von $[\eta]$ angenommen, welcher bei graphischer Auftragung von $\log M$ gegen K_{av} nur zu einer Verschiebung der resultierenden Geraden entlang der Ordinate führen würde und somit ignoriert werden kann. Der K_{av} -Parameter ergibt sich aus dem Elutionsvolumen V (Callec *et al.*, 1984):

$$K_{av} = (V - V_0)/(V_t - V_0) \quad (\text{Gleichung 3})$$

Hierbei ist V_0 das Säulenausschlussvolumen (bestimmt mit Blue Dextran zu 7,62 mL) und V_t das Bettvolumen (angegeben mit 24 mL). Umgekehrt wurde mit diesen Gleichungen die apparente Molekülgröße des analysierten Polypeptids anhand seines Elutionsvolumens ermittelt.

Zur präparativen SEC-Reinigung der SUMO-Protease Ulp1 wurde das rekombinante Protein nach der IMAC-Chromatographie (siehe Abschnitt 2.5.2) mittels einer Amicon Ultra-15-Konzentrator-Einheit (10 kDa MWCO) konzentriert und in 3 Aliquots zu je 1,8 mL bei einer Proteinkonzentration um 1 mg/mL auf eine HiLoad 16/60 Superdex 75-Säule (120 mL Bettvolumen) aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte in PBS pH 8,0 bei 1 mL/min Flussrate und es wurden Fraktionen zu 1,5 mL gesammelt. Die nach SDS-PAGE-Analyse vereinigten SEC-Fractionen wurden auf 1 mM BME, 50 % (v/v) Glycerin, 0,2% (v/v) Triton X-100 eingestellt und mit einer Endkonzentration von 0,67 mg/mL bei -20 °C gelagert.

Das „PAS-cal“-Polypeptid wurde nach Freisetzung aus dem SUMO-Fusionsprotein durch Ulp1-Verdau (siehe Abschnitt 2.5.4) bei einer Polypeptidkonzentration von etwa 2 mg/mL in einem Volumen von 6 mL auf eine HiLoad 26/60 Superdex 200-Säule (320 mL Bettvolumen) aufgetragen. Die SEC fand bei einer Flussrate von 3,5 mL/min unter Pufferwechsel von „PAS-cal“ in 50 mM NH_4HCO_3 statt. Polypeptid-Fractionen zu 8 mL wurden gesammelt und nach Umpufferung in 5 mM KP_i pH = 7,5, 50 mM K_2SO_4 mit Hilfe einer PD-10-Säule erfolgte die Konzentrationsbestimmung nach Scopes (1974; siehe Abschnitt 2.5.7). Der „PAS-cal“-Standard wurde bei einer Konzentration von etwa 0,28 mg/mL in 50 mM NH_4HCO_3 oder nach vollständiger Trocknung im Rotations-Vakuum-Verdampfer bei -20 °C verwahrt.

2.6.2 Viskosimetrie

Zur Charakterisierung mittels Mikroviskosimetrie wurden Proben der zu untersuchenden PAS- und PEG-Polymere in Puffern mit niedriger Ionenstärke vorbereitet, damit die hydrodynamischen Eigenschaften in quasi salzfreier wässriger Lösung ermittelt werden konnten. Die PAS-Polypeptide wurden direkt nach der subtraktiven AEX-Reinigung in 20 mM Tris/HCl pH 9,5 mit Amicon Ultra-Konzentrator-Einheiten einer Ausschussgröße von 3 kDa (für Polypeptide einer Länge von 200 Resten) bzw. 10 kDa (für Polypeptide einer Länge von 400 oder 600 Resten) bis auf über 100 mg/mL konzentriert. Die PEG-Proben wurden als Feststoffe direkt in 50 mM NaHCO_3 pH 8,0 gelöst.

Von jedem Polymer wurde eine Verdünnungsreihe von 1 bis 100 mg/mL hergestellt und die Viskosität der Proben wurde bei 25 °C mit einem *m*-VROC-Mikroviskosimeter mit *m*VROC2.5-GA05-Flusszelle und angeschlossenenem Wasserthermostat ermittelt. Hierfür wurden die Probenlösungen jeweils luftblasenfrei in eine 100 μL -Hamilton-Spritze gefüllt, die in das Viskosimeter eingespannt wurde. Mit einer kontrollierten Flussrate von

100 $\mu\text{L}/\text{min}$ wurden die Flusszelle und das Kapillarsystem zunächst für 6 s vollständig mit der Probe gefüllt, bevor die Viskositätsmessungen jeweils in Dreifachbestimmung mit einer Messdauer von 3 s erfolgten. Hierfür wurde das in den Proben vorherrschende Druckgefälle von drei Sensoren im Messchip der Flusszelle registriert und daraus automatisch durch die Gerätesoftware mVROC Control 3.0 die dynamische Viskosität berechnet. Vor und nach der Benutzung wurde das Gerät mit Hilfe von 500 μL -Hamilton-Spritzen mit 1 % (w/v) Aquet-Detergenzlösung und 70 % (v/v) Ethanol gereinigt und schließlich mit Wasser gespült. Die Messungen wurden erst gestartet, nachdem für reines Wasser der Referenzwert von 0,89 cP bei 25 °C erreicht worden war.

Generell kann die Abhängigkeit der Viskosität von der Polymerkonzentration als Taylor-Reihe formuliert werden (Pamies *et al.*, 2008):

$$\eta = A_0 + A_1c + A_2c^2 + A_3c^3 \dots \quad (\text{Gleichung 4})$$

Bei verhältnismäßig geringen Probenkonzentrationen sind höhere Ordnungen dieser Polynomial-Darstellung vernachlässigbar und die Konzentrationsabhängigkeit muss nur bis zum quadratischen Term berücksichtigt werden. Die resultierende quadratische Beziehung lässt sich durch Umstellung als lineare Funktion der Polymerkonzentration c ausdrücken. Die empirischen Methoden nach Huggins (1942) und nach Krämer (1938) sind am bekanntesten und liefern folgende Zusammenhänge:

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = k_H[\eta]^2 \cdot c + [\eta] \quad \text{„nach Huggins“ (Gleichung 5)}$$

$$\frac{\ln(\eta_{rel})}{c} = -k_K[\eta]^2 \cdot c + [\eta] \quad \text{„nach Krämer“ (Gleichung 6)}$$

Diese Beziehungen beinhalten die spezifische Viskosität $\eta_{sp} = (\eta - \eta_0)/\eta_0$ und die relative Viskosität $\eta_{rel} = \eta/\eta_0$, die sich aus den Werten für die apparente Probenviskosität η und die Viskosität η_0 des Solvens selbst herleiten. Beide Formeln (Gleichungen 5 und 6) ermöglichen die Herleitung der intrinsischen Viskosität $[\eta]$ durch Extrapolation auf infinitesimale Konzentration:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{rel} - 1}{c} \quad (\text{Gleichung 7})$$

Werte für die intrinsische Viskosität $[\eta]$ wurden für jedes Polymer anhand der Messdaten bei Konzentrationen von 10, 20, 30, 40 und 50 mg/mL ausgewertet. Dabei wurde $[\eta]$ jeweils als das mathematische Mittel aus den beiden Achsenschnittpunkten berechnet, die aus den Graphen bei einer Probenkonzentration von 0 resultierten.

Die intrinsische Viskosität kann empirisch mit dem durchschnittlichen Molekulargewicht M eines Polymers über die Mark-Houwink-Sakurada-Gleichung in Beziehung gesetzt werden (Sakurada *et al.*, 1962):

$$[\eta] = K \cdot M^a \quad (\text{Gleichung 8})$$

Die Parameter $[\eta]$ und K werden meist mit der Einheit mL/g angegeben. Der dimensionslose Formfaktor a nimmt für *Random-Coil*-strukturierte Polymere üblicherweise Werte zwischen 0,5 und 1,0 an. Eine Umstellung der Gleichung 8 liefert folgende Darstellung:

$$\log M = \frac{\log[\eta] - \log K}{a} \quad (\text{Gleichung 9})$$

Die Gleichsetzung dieses Ausdrucks mit der Gleichung 2 zur SEC-Kalibrierung (siehe Abschnitt 2.6.1) liefert nach Umstellung eine neue Beziehung zwischen $[\eta]$ und den SEC-Elutionsvolumina in Form des K_{av} -Parameters:

$$\log[\eta] = -aA \cdot K_{av} + aB + \log K = -C \cdot K_{av} + D \quad (\text{Gleichung 10})$$

mit den Konstanten C und D . Somit können aus linearen Auftragungen von $\log M$ bzw. $\log[\eta]$ gegen K_{av} (nach Gleichung 2, Abschnitt 2.6.1 bzw. Gleichung 10) die Werte für die Konstanten A , B , C und D ermittelt und die Mark-Houwink-Parameter neben der direkten Auftragung von $[\eta]$ gegen M nach Gleichung 8 zusätzlich auch anhand der SEC-Daten durch eine unabhängige Methode bestimmt werden.

2.6.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die hydrodynamischen Dimensionen von IL-1Ra-PAS-Fusionsproteinen, freien PAS-Polypeptiden und PEG-Polymeren wurden mittels der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) vermessen. Diese Messtechnik beruht auf der Interferenz der Rayleigh-Streuung von langwelligem monochromatischem Licht ($\lambda \approx 600$ nm) an gelösten Partikeln, welche aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung der einzelnen Streuzentren fluktuiert. Die auftretenden Intensitätsfluktuationen können auf das Diffusionsverhalten und damit auf die hydrodynamische Ausdehnung eines Teilchens zurückgeführt werden, sofern reine monodisperse Proben vorliegen. Die einfache Rayleigh-Streuung tritt nur für Partikel auf, deren Größe die Laser-Wellenlänge nicht überschreitet, da sonst mehrere Streuzentren innerhalb eines Teilchens vorliegen können, was eine mathematische Auswertung der Korrelationsfunktionen erschwert.

Polymer-Proben zu 45 μL mit einer Konzentration von etwa 1 mg/mL wurden direkt nach der Mikrofiltration durch eine 0,2 μm -Membran in einer Quarzküvette mit 3 mm Schichtdicke bei einer Temperatur von 25 $^{\circ}\text{C}$ mit einem temperierten Zetasizer Nano-S-Instrument und der zugehörigen Software (Zetasizer Software 6.32) analysiert. Die hydrodynamischen Radien wurden als Mittelwerte aus Dreifachmessungen berechnet. Um den Einfluss der Temperatur auf die Struktur von PAS-Polypeptiden zu studieren, wurde eine PA#1(600)-Probe direkt im Gerät in 10 $^{\circ}\text{C}$ -Schritten von 20 auf 90 $^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Nach fünfminütiger Temperaturstabilisierung wurde bei jedem Temperaturwert der hydrodynamische Radius in Dreifachbestimmung gemessen.

Unter Voraussetzung der Betrachtung von Polymer-Molekülen als sphärische Partikel kann die Einstein-Simha-Beziehung (Einstein, 1906; Simha, 1940) zur Abschätzung des hydrodynamischen Radius r_H benutzt werden:

$$r_H^{Visc} = \left(\frac{3}{4\pi} \cdot \frac{[\eta]M}{2.5N_A} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (\text{Gleichung 11})$$

In dieser Gleichung ist mit N_A die Avogadro-Zahl benannt. Mit bekannter intrinsischer Viskosität $[\eta]$ aus den entsprechenden Messungen (siehe Abschnitt 2.6.2) können Erwartungswerte für r_H für jedes Polymer der Masse M unter Annahme der Kugelform berechnet werden. Bei der Berechnung von r_H in nm ist zu beachten, dass $[\eta]$ meist in der Einheit mL/g angegeben wird.

Eine präzisere Abschätzung der Molekülform aus den Daten für die hydrodynamischen Radien ist laut dem Stokes-Einstein-Modell (Einstein, 1905) über den Diffusionskoeffizienten D (ermittelt aus der Korrelationsfunktion im DLS-Experiment) und den darin enthaltenen translationalen Friktionsfaktor f möglich:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{f} \quad (\text{Gleichung 12}) \quad \text{mit} \quad f = 6\pi\eta r_H^{DLS} \quad (\text{Gleichung 13})$$

Die Gleichung 13 enthält den durch DLS bestimmten hydrodynamischen Radius r_H und die Viskosität η der verdünnten Polymerlösung, für die hier der Wert von reinem Wasser (1,00 cP bei 20 $^{\circ}\text{C}$) angenommen wird. Gleichung 13 geht in dieser Form von sphärischen Molekülen aus, was aber für andere Molekülformen zu einer Abweichung führt. Perrin (1934) zeigte einen Weg auf, die Form von Ellipsoiden durch Berechnung des Perrin-Friktionsfaktors f_P aus dem Verhältnis der durch DLS ermittelten zu den erwarteten hydrodynamischen Radien, berechnet aus der intrinsischen Viskosität $[\eta]$, herzuleiten:

$$f_P = \frac{f_{\text{Ellipsoid}}}{f_{\text{Kugel}}} = \frac{f_{\text{DLS}}}{f_{\text{Visc}}} = \frac{r_H^{\text{DLS}}}{r_H^{\text{Visc}}} \quad (\text{Gleichung 14})$$

Perrin liefert zwei finale Ausdrücke für f_P für den Fall eines prolaten oder eines oblaten Ellipsoids (Perrin, 1934; König, 1975). Nur das prolate Ellipsoid erscheint aber plausibel zur Formabschätzung einer linearen Polymer-Kette mit ihrer eindimensionalen räumlichen Vorzugsrichtung und kann folgendermaßen über das prolate Achsenverhältnis p beschrieben werden:

$$f_{p,\text{prolat}} = p^{\frac{2}{3}} \cdot \frac{\frac{\sqrt{p^2-1}}{p}}{\text{atanh}\frac{\sqrt{p^2-1}}{p}} \quad (\text{Gleichung 15})$$

Ein Algorithmus der verwendeten DLS-Software (Zetasizer Software 6.32) ermöglichte die Ermittlung von Lösungen für Achsenverhältnisse von prolaten Ellipsoiden aus den eingegebenen f_P -Werten. Die Berechnungen erfolgten auf Grundlage des spezifischen Molekylvolumens v (anstelle der intrinsischen Viskosität), welches durch einfache Umstellung der Einstein-Simha-Beziehung erhalten wird:

$$v = \frac{V_H \cdot N_A}{M} = \frac{[\eta]}{2,5} \quad (\text{Gleichung 16}) \quad \text{mit } V_H = \frac{4}{3}(r_H)^3\pi$$

V_H bezeichnet hier das Kugelvolumen. Die Gleichung 11 liefert auch eine Korrelation von $[\eta]$ mit dem zugehörigen hydrodynamischen Radius eines Polymers. Einfache Umstellung ergibt eine kubische Beziehung für r_H :

$$[\eta] \cdot M = E \cdot (r_H)^3 \quad (\text{Gleichung 17}) \quad \text{mit } E = \frac{10 \cdot \pi \cdot N_A}{3}$$

E stellt eine Konstante dar. Allerdings beinhaltet diese Beziehung mit dem Molekulargewicht M eine weitere Variable, die sich für unterschiedliche Polymer-Proben ändert. Die Abhängigkeit von M kann eliminiert werden, indem die Mark-Houwink-Sakurada-Beziehung (Gleichung 8, Abschnitt 2.6.2) nach M aufgelöst und in Gleichung 17 substituiert wird:

$$[\eta] \cdot \left(\frac{[\eta]}{K}\right)^{\frac{1}{a}} = E \cdot (r_H)^3 \quad (\text{Gleichung 18})$$

Die Umstellung nach $[\eta]$ ergibt den finalen Ausdruck:

$$[\eta] = F \cdot (r_H)^G \quad (\text{Gleichung 19})$$

$$\text{mit } G = \frac{3a}{a+1} \quad (\text{Gleichung 20})$$

$$\text{und } F = E^{\frac{a}{a+1}} \cdot K^{\frac{1}{a+1}} \quad (\text{Gleichung 21})$$

F und G bezeichnen nun Parameter, die lediglich von der Art der Polymere, aber nicht mehr von deren Masse bzw. Kettenlänge abhängen. Diese können aus der Auftragung von $[\eta]$ gegen r_H gemäß Gleichung 19 bestimmt werden. Da F und G die charakteristischen Mark-Houwink-Parameter a und K beinhalten, gestatten sie deren Berechnung.

2.6.4 Umkehrphasenchromatographie (RPC)

Die Umkehrphasenchromatographie (*Reversed Phase Chromatography*, RPC) kann zur Untersuchung der hydrophilen Eigenschaften von Molekülen herangezogen werden, indem diese an eine hydrophobe stationäre Phase adsorbiert und mit steigendem Acetonitril-Gehalt im Laufpuffer eluiert werden (Horvath & Melander, 1977). In dieser Arbeit wurde eine Resource RPC-Säule mit 1 mL Bettvolumen, enthaltend eine Polystyrol-Matrix, eingesetzt und mit einer Flussrate von 2 mL/min an einem ÄKTA-Chromatographie-System betrieben. Polymer-Proben mit einer Konzentration von 1 mg/mL wurden auf den RPC-Laufpuffer (2 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) Ameisensäure) eingestellt, bevor je 500 μ L über eine Probenschleife auf die in RPC-Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen wurden. Ein Gradient von 0 bis 100 % RPC-Elutionspuffer (80 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) Ameisensäure) über 20 Säulenvolumina führte zur Elution der Proben, die anhand ihrer Absorption bei 225 nm verfolgt wurden. Bei dieser Wellenlänge wurde sowohl die Absorption der Peptidbindungen der PAS-Polypeptide und IL-1Ra-PAS-Fusionsproteine als auch die des aromatischen π -Systems im Fall der PEG-Fluorescein-Konjugate detektiert. Zum chromatographischen Nachweis wurden die hier untersuchten Amino-PEG-Polymere nämlich im 200 nmol-Ansatz in 50 mM NaHCO₃ pH 8,0 in einem Gesamtvolumen von 200 μ L mit 5/6-Carboxyfluorescein-NHS-Ester modifiziert, indem der Reaktionsansatz nach Zugabe des fünffachen molaren Überschusses an NHS-Ester (gelöst in DMF) 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

2.6.5 Löslichkeitsexperimente

Die PAS-Polypeptide wurden mit dem Polymer PEG hinsichtlich der Löslichkeit unter verschiedenen Bedingungen verglichen. Lyophilisierte PAS-Biopolymere wurden dazu in verschiedenen Lösungsmitteln resolubilisiert oder mit Fällungsreagenzien versetzt. Außerdem wurde der Einfluss der Temperatur auf die Löslichkeit geprüft. Ungelöste Polypeptide oder Präzipitate wurden jeweils durch Zentrifugation (13200 rpm, 4 °C, 5 min) separiert.

Je 1 mg PA#1(200) in 50 mM NH_4HCO_3 pH 8,5 wurde im Labor-Gefriertrockner ALPHA1-2 LD plus in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß gefriergetrocknet und bei Raumtemperatur in jeweils 200 μL eines organischen Lösungsmittels (DMF, DMSO, ACN, Aceton, Dioxan, Tetramethylharnstoff, Ethanol) aufgenommen. Die Resolubilisierung der Proben wurde, falls nötig, durch Temperaturerhöhung auf 50 °C, Agitation mit dem Vortex-Genie 2-Schüttelapparat und Ultraschalleinwirkung unterstützt. Zur vollständigen Fällung aus organischer Lösung (in DMF oder DMSO) wurde den PAS-Polypeptiden 3:1 (v/v) eiskalter Diethylether zugegeben.

Für Fällungsversuche aus wässriger Lösung wurde die Methanol/Chloroform-Methode nach Wessel und Flügge (1984) laut Protokoll verwendet. Die konzentrierte Lösung eines PAS-Fusionsproteins (2 mL 12,1 mg/mL SUMO-PA#1(200) in 100 mM NH_4HCO_3 pH 8,5) wurde in einem 15 mL-Reaktionsgefäß im ersten Arbeitsschritt nacheinander mit 4:1 (v/v) Methanol und 1:1 (v/v) Chloroform gemischt, bevor durch Zugabe von 3:1 (v/v) H_2O und Zentrifugation eine erste Phasentrennung in die Chloroform-Phase (unten), die Zwischenphase mit präzipitiertem Protein und die wässrige Methanol-Phase (oben) herbeigeführt wurde. Die obere wässrige Phase wurde verworfen und die untere Phase mit 3:1 (v/v) Methanol gemischt, worauf nach abschließender Zentrifugation ein deutlich sichtbares Protein-Sediment erhalten werden sollte. Allerdings schwamm das unlösliche PAS-Fusionsprotein weiterhin auf der organischen Phase auf, was die Isolierung erschwerte.

Um eine effiziente Methode zur Isolierung von PAS-Fusionsproteinen aus wässriger Lösung zu finden, wurden weitere Fällungsreagenzien am Beispiel von 0,5 mg/mL TrxA-PA#1(600) in PBS getestet. Das Fusionsprotein wurde dazu einmal mit gesättigter Trichloressigsäure-Lösung (TCA; 100 % Sättigung entspricht 1 g TCA auf 454 μL H_2O) bis zu 13 % der Sättigungskonzentration und in einem anderen Ansatz mit 10 % (w/v) konz. HCl versetzt. Ein anderer Fällungsversuch bestand in der Zugabe von 4:1 (v/v) Aceton unter zweistündiger Inkubation bei -20 °C.

Für temperaturabhängige Trübungsmessungen wurden PAS-Polypeptidlösungen (5 mg/mL PA#1(200) bzw. PA#1(600) in 20 mM Tris/HCl pH 9,5) in einer Quarz-Küvette des Typs 100-QS (5 mm Schichtdicke) mit Deckel im Photodiodenarray-Spektrometer Scinco S-3100 mit Hilfe des integrierten Peltier-Temperatur-Elements kontinuierlich bei einer Heizrate 1 °C/min von 10 auf 90 °C erhitzt. Während des gesamten Heizvorgangs wurden Spektren über einen Wellenlängenbereich von 200 bis 1000 nm aufgenommen, so dass die kritische Lösungstemperatur der Polypeptide als Veränderung der optischen Dichte bei 600 nm beobachtet werden konnte (Exler *et al.*, 2007).

2.6.6 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Die Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) erlaubt die Analyse von Polypeptiden hinsichtlich der Ausprägung verschiedener Sekundärstrukturanteile (Greenfield, 2006). Diese spezielle Form der Absorptionsspektroskopie wird hauptsächlich für Polypeptide genutzt, indem die Absorption von circular polarisiertem Licht durch die Peptidbindung als Chromophor beobachtet wird, und basiert auf der Chiralität einer jeden Sekundärstruktur als Folge der Zusammensetzung aus chiralen Einzelbausteinen und der sich daraus ergebenden Polarisierungsrichtung. Je nach deren räumlicher Umgebung ergeben sich für die Peptidbindungen konformationsspezifische Muster bei den $\pi \rightarrow \pi^*$ - (um 190 nm) und $n \rightarrow \pi^*$ -Übergängen (um 220 nm) im CD-Spektrum, so dass die Art einer Sekundärstruktur und deren relativer Anteil an der Gesamtstruktur des Polypeptids durch Vergleich mit Referenzspektren abgeschätzt werden kann. Infolge von Unterschieden in der Polarisierbarkeit in Abhängigkeit von der Konformation einer Peptidbindung werden die Anteile an rechts- und links-circular polarisiertem Licht in verschiedenem Maße absorbiert und führen so zu der beobachteten Elliptizität θ . Die Signalintensität ist abhängig von der Anzahl der Peptidbindungen, bei gleichartigen Aminosäure-Sequenzen also von der Kettenlänge der Polypeptide.

Die Aufnahme der in dieser Arbeit gezeigten Spektren erfolgte mit Hilfe eines Jasco J-810 CD-Spectropolarimeters bei 20 °C über einen Wellenlängenbereich von 190 bis 250 nm. Die Probenlösungen wurden mit Konzentrationen um 10 μ M in Spektroskopie-Puffer (5 mM KP_i pH 7,5, 50 mM K_2SO_4) in einer Quarz-Filmküvette der Schichtdicke 0,1 mm unter Aufnahme von 15 akkumulierten Einzelmessungen analysiert. Dabei war die Bandbreite auf 1 nm eingestellt, die Scan-Geschwindigkeit auf 100 nm/s und die Reaktionszeit auf 4 s. Die erhaltenen Spektren wurden mit Pufferspektren als Referenz korrigiert und unter Verwendung der Geräte-Software (Spectra Manager Software

1.00.00) geglättet und ausgewertet. Die molare Elliptizität θ_M in [mdeg · M⁻¹cm⁻¹] wurde gemäß folgender Gleichung berechnet:

$$\theta_M = \frac{\theta_{obs}}{c \cdot d} \quad (\text{Gleichung 22})$$

Die gemessene Elliptizität ist hier mit θ_{obs} in [mdeg] bezeichnet, die Polypeptid-Konzentration mit c in [M] und die Schichtdicke der Küvette mit d in [cm]. Bei den IL-1Ra-Fusionsproteinen wurden Differenzspektren für die reinen PAS-Anteile gebildet, indem das Spektrum des nicht PASylierten Proteins von den Spektren der Fusionskonstrukte subtrahiert wurde.

Ein anderer Messmodus der PAS-Polypeptide erlaubte die Beobachtung der Elliptizitätsänderung bei 195 nm in einem linearen Temperaturgradienten von 20 bis 90 °C und wieder zurück zur Ausgangstemperatur unter Verwendung verschiedener Heizraten (0,5 bzw. 1 °C/min), die vom Gerätethermostat reguliert wurden. Hierfür wurde eine Küvette mit 2 mm Schichtdicke und Teflon-Stopfen benutzt. Die Differenzspektren der Polypeptide aus den Spektren bei 90 und 20 °C gaben über temperaturbedingte strukturelle Veränderungen Aufschluss.

2.6.7 Massenspektrometrie: ESI- und MALDI-MS

Zur Analyse mittels Massenspektrometrie wurden Protein- und Polypeptid-Proben mit einer Konzentration von etwa 15 µM durch mehrmalige Dialyse in 10 mM NH₄OAc vorbereitet, um den Grad der Adduktbildung mit Metall- oder Ammoniumionen so gering wie möglich zu halten.

Für ESI-MS-Messungen am institutseigenen maXis Q-TOF-Instrument mit ESI-Quelle (Kapillarspannung: 4,5 kV; *End Plate Offset*: -500 V; Zerstäuber-Druck: 0,4 bar; Trockengas-Fluss: 4,0 L/min; Trockentemperatur: 180 °C) wurden die Proben auf 20 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure (v/v) gebracht. Die Analysen am 6210-Time-of-Flight-LC/MS-Gerät erfolgten mit einer Probenzusammensetzung von 60 % (v/v) Methanol und 1 % (v/v) AcOH. Zur MALDI-Analyse mit dem Modell UltrafleXtreme wurden PAS-cal-Polypeptid-Proben mit dem gleichen Volumen an 2,5-Dihydroxybenzoesäure (10 µg/mL in 30 % (v/v) Acetonitril in Wasser, 0,2 % (v/v) Trifluoressigsäure) versetzt und nach Trocknung auf einer Probenplatte mit 1000 Pulsen pro Spektrum im linearen Positiv-Modus gemessen.

2.7 Computer-Programme und Datenbanken

Für Sequenzanalysen von DNA und Proteinen und die Planung von Oligodesoxynukleotiden zur Klonierung wurden die Programme MAP, BESTFIT, REPEAT, STEMLOOP, TRANSLATE und PEPTIDESORT des Programmpakets UWGCG (Devereux *et al.*, 1984) genutzt.

Dreidimensionale Proteinstrukturen wurden mit Hilfe des Programms PyMOL (DeLano, 2002) aus frei zugänglichen Strukturdatensätzen der *Protein Data Bank* (PDB) erstellt. Chemische Strukturformeln wurden mittels des Programms ChemDraw Ultra 8.0 (CambridgeSoft Corporation, Cambridge, MA, USA) dargestellt.

Graphische Auftragungen und Auswertungen wurden mit dem Programm Kaleidagraph 4.03 (Synergy Software Inc., Reading, PA, USA) vorgenommen.

Die Ermittlung proteinspezifischer Parameter wie der exakten Molekülmasse, des pI-Werts und des molaren Extinktionskoeffizienten erfolgte über den ProtParam-Algorithmus (Gasteiger *et al.*, 2005). Gen- und Proteinsequenzen wurden bei Bedarf vom ExPASy Molecular Biology Server (www.expasy.org) bezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Biochemische und biophysikalische Charakterisierung von PAS-Polypeptiden

3.1.1 Design der PAS-Polypeptid-Sequenzen

Aus Vorexperimenten am Lehrstuhl für Biologische Chemie war bekannt, dass auch PAS-Sequenzen ohne Serin in Fusionsproteinen die gewünschten Effekte auf die Löslichkeit und das hydrodynamische Volumen ausprägten, und zwar in vergleichbarem Maße wie die ursprünglichen Serin-haltigen PAS-Polypeptide (Schlapschy *et al.*, 2013). Daher wurde ausgehend von der PAS#1-Standardsequenz das PA#1-Polypeptid mittels Substitution aller drei Serin-Reste innerhalb der 20mer-Kassette durch Alanin erzeugt, wobei der Gehalt an der Iminosäure Prolin unverändert belassen wurde. Dies war der Ausgangspunkt für eine neue Sequenzserie, die lediglich auf Prolin und Alanin basiert. Tabelle 1 zeigt eine Zusammenstellung der PAS-Sequenzen, die in dieser Arbeit charakterisiert wurden. Das Prolin:Alanin-Verhältnis der Standardsequenz PA#1 wurde bei einigen P/A-Polypeptiden stark verändert mit dem Ziel, die daraus resultierenden Auswirkungen auf deren Eigenschaften in Lösung zu charakterisieren.

Tabelle 1: Auflistung der in dieser Arbeit analysierten PAS-Sequenzen. Neben der repetitiven Minimaleinheit ist für jede Sequenz auch ein repräsentativer längerer Ausschnitt mit 20-24 Resten gezeigt.

Sequenz	Minimaleinheit	Sequenzausschnitt	Wiederholungen pro 20 AS	Prolingehalt [%]
PAS#1	(ASPAAPAPASPAAPAPSAPA) _n	ASPAAPAPASPAAPAPSAPA	1	35
PA#1	(AAPAAPAPAAPAAPAAPAA) _n	AAPAAPAPAAPAAPAAPAA	1	35
P1A1	(PA) _n	APAPAPAPAPAPAPAPAP	10	50
P1A3	(PAAA) _n	AAAPAAAAPAAAAPAAAP	4	25
P1A5	(PAAAA) _n	AAAAAPAAAAAPAAAAAP	3,3	16,7
P1A1P1A4	(PAPAAAA) _n	APAPAAAAAPAAAAAPAAAA	2,9	28,6

Um den Einfluss der Aminosäure-Zusammensetzung (Verhältnis Pro:Ala) wie auch der Sequenzrepetitivität auf die Konformation von P/A-Polypeptiden in wässriger Lösung systematisch zu untersuchen, wurden zunächst reguläre Aminosäure-Abfolgen aus Prolin und Alanin mit unterschiedlichen Prolin-Anteilen studiert.

Während das Design der PAS#1- und PA#1-Standardsequenzen eine scheinbar zufällige Aminosäure-Anordnung mit einer langen minimalen Wiederholungseinheit von 20 AS und einem Anteil von 35 % Pro repräsentiert, wurde die hochrepetitive P1A1-Sequenz ausgehend von einer sehr kurzen Minimaleinheit aus nur 2 AS und mit einem

stark erhöhten Gehalt von 50 % Pro geplant. Durch Verlängerung dieser P1A1-Minimaleinheit um jeweils zwei Alanin-Reste wurden die Sequenzen P1A3 (Minimaleinheit: 4 AS) und P1A5 (Minimaleinheit: 6 AS) erhalten, in denen der Anteil an Prolin auf 25 bzw. 16,7 % Pro schrittweise herabgesetzt war und damit jeweils unter dem Prolin-Gehalt der Standardsequenzen liegt. Die Repetitivität einer PAS-Sequenz wird jeweils als die Anzahl der Wiederholungen des Minimalmotivs innerhalb eines Sequenzausschnitts einer konstanten Bezugslänge (hier 20 AS) ausgedrückt. Eine Verlängerung der Minimaleinheit bringt also stets auch eine Verminderung der Sequenzrepetitivität mit sich, da sich dann die Anzahl der sich wiederholenden Minimaleinheiten pro repräsentativem Sequenzausschnitt verringert (siehe Tabelle 1).

Die Auswirkungen einer veränderten Aminosäure-Anordnung bei annähernd konstantem Pro:Ala-Verhältnis wurden anhand der Sequenz P1A1P1A4 untersucht. Diese wurde mit einer Minimaleinheit von 7 AS entworfen und weist bezogen auf die Standardsequenzen eine gesteigerte Repetitivität auf, dabei aber mit 28,6 % Pro einen sehr ähnlichen Gehalt an Prolin wie PA#1 mit 35 % Pro. Hinsichtlich seiner Sequenzrepetitivität kommt das P1A1P1A4-Polypeptid der P1A5-Sequenz am nächsten, hebt sich von dieser jedoch durch seinen viel höheren Prolin-Anteil, welcher für P1A5 nur bei 16,7 % Pro liegt, deutlich ab. Im folgenden wurde untersucht, welche Trends in den Eigenschaften der Sequenzen in Lösung zu Tage treten, die mit unterschiedlichen Aminosäure-Zusammensetzungen und -Anordnungen der PAS-Polypeptide einhergehen.

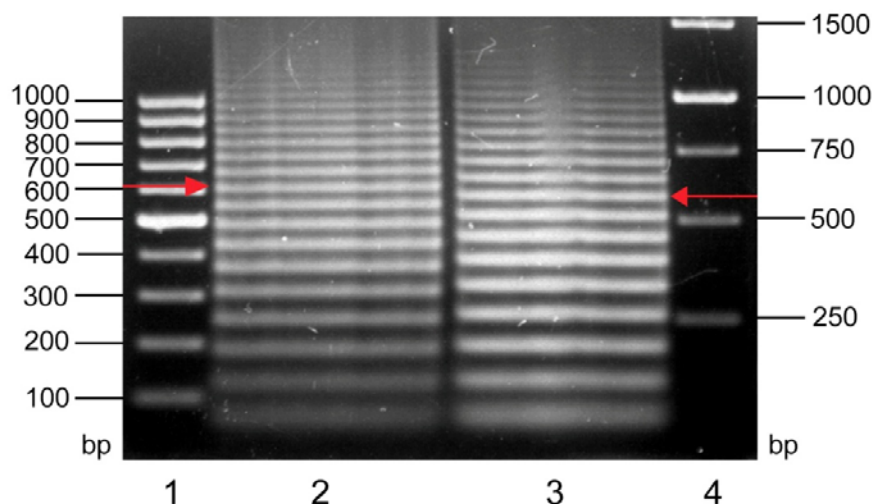
3.1.2 Gentechnische Konstruktion der verwendeten PAS-Sequenzen

Vorversuche am Lehrstuhl für Biologische Chemie hatten gezeigt, dass die PAS-Sequenzen bereits ab einer Länge von etwa 200 AS, entsprechend einer Masse von etwa 16 kDa, in Fusion mit Proteinwirkstoffen wie dem menschlichen Wachstumshormon hGH deutlich messbare Auswirkungen auf die Plasma-Halbwertszeit *in vivo* zeigen (Schlapschy *et al.*, 2013). Daher wurden PAS-Genkassetten einer Länge von 600 bp konstruiert, die für 200 AS codieren. Eine Länge von 200 AS war abhängig von der Sequenzrepetitivität nicht immer exakt erreichbar, so dass im Fall von P1A5 zunächst eine 576 bp-Genkassette (codierend für 192 AS) und für P1A1P1A4 eine 567 bp-Kassette (codierend für 189 AS) synthetisiert wurde.

Diese langen PAS-Genkassetten wurden durch unvollständige Ligierung von Minimalkassetten aus zwei hybridisierten komplementären Oligodesoxynukleotiden erhalten, welche über ihre 5'-GCC-Überhänge assemblieren konnten (siehe Abschnitt 2.3.6). Je nach Art der PAS-Sequenz wurden hierzu Oligonukleotide beispielsweise

einer Länge von 60 b, codierend für 20 AS, geplant; aus zehn solcher Sequenzabschnitte setzt sich u. a. die finale 200 bp-Genkassette von PA#1 zusammen. Für P1A5 bzw. P1A1P1A4 wurden 72 b-Oligonukleotide (codierend für 24 AS) bzw. 63 b-Oligonukleotide (codierend für 21 AS) eingesetzt und jeweils 9 Minimalkassetten zum finalen Genkonstrukt ligiert.

(A)



(B)

```

PA#1      gccGCTCCAGCTGCACCTGCTCCAGCAGCACCTGCTGCACCAGCTCCGGCTGCTCCTGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          CGAGGTCGACGTGGACGAGGTCGTCGTTGGACGACGTGGTCGAGGCCGACGAGGACGAcgg
(20 AS)   AlaAlaProAlaAlaProAlaProAlaAlaProAlaAlaProAlaProAlaAlaProAla

P1A1P1A4 gccCCAGCACCGGCAGCTGCTGCCCTGCACCAGCTGCAGCCGCACCTGCTCCAGCCGCTGCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          GGTCGTGGCCGTCGACGACGGGACGTCGTCGACGTCGGCGTGGACGAGGTCGGCGACGTCcgg
(21 AS)   AlaProAlaProAlaAlaAlaAlaProAlaProAlaAlaAlaAlaProAlaProAlaAlaAla

P1A1      gccCCTGCTCCTGCTCCAGCACCTGCACCAGCACCTGCTCCAGCACCGCTCCTGCACCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          GGACGAGGACGAGGTCGTTGGACGTCGTTGGACGAGGTCGTTGGTCGAGGACGTCGGTcgg
(20 AS)   AlaProAlaProAlaProAlaProAlaProAlaProAlaProAlaProAlaPro

```

Abbildung 5: Konstruktion von PAS-Genen aus Oligodesoxynukleotiden. (A) Präparative Agarose-Gelelektrophorese von PAS-Genkassetten unterschiedlicher Länge, die durch partielle Ligierung hybridisierter komplementärer Oligodesoxynukleotid-Paare erhalten wurden. Spur 1: 100 bp-Marker; Spur 2: repräsentativer Ansatz für die Assemblierung von 60 b-Oligodesoxynukleotiden (hier: P1G3, siehe Abschnitt 3.2.3); Spur 3: repräsentativer Ansatz für die Assemblierung von P1A1P1A4 (63 b-Oligodesoxynukleotide); Spur 4: 1 kbp-Marker. Die mit rotem Pfeil markierten DNA-Banden (ca. 600 bp) wurden extrahiert und zur weiteren Analyse in pUC19-Derivate inseriert. (B) Oligodesoxynukleotid-Paare zur Assemblierung relevanter PAS-Sequenzen für diese Arbeit.

Das Design der Oligodesoxynukleotide folgte immer dem Ziel, unter Berücksichtigung der Codon-Frequenz in *E. coli* die größtmögliche Codon-Abwechslung innerhalb der Minimalsequenz zu erreichen. In Abbildung 5A ist exemplarisch eine präparative Agarose-Gelelektrophorese zur Isolierung geeigneter PAS-Genkassetten gezeigt; die zur Genassemblierung der Sequenzen PA#1, P1A1 und P1A1P1A4 verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Abbildung 5B dargestellt.

PAS#1, P1A3 und P1A5 zeigten eine im Vergleich zu diesen Sequenzen reduzierte genetische Stabilität, die sich in Rekombination und teilweiser Deletion der codierenden Genabschnitte bei Expressionsexperimenten äußerte. Aus diesem Grunde wurden entsprechende Gensynthesen für PAS#1.2(200)-, P1A3(200)- und P1A5(198)-Kassetten in Auftrag gegeben, die durch geeignete Abwechslung in der Codon-Verwendung eine erheblich geringere Repetitivität auf genetischer Ebene aufweisen, als über die Assemblierungsstrategie zugänglich ist. Für die hier beschriebenen Experimente mit PAS#1, P1A3 und P1A5 wurden nur die Kassetten aus der Gensynthese verwendet (siehe Anhang, Abbildung A1).

Zur Verifizierung der PAS-Gensequenzen mittels DNA-Sequenzierung wurden alle Genkassetten in Derivate von pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) ligiert, welche nachfolgend in Abbildung 6 dargestellt sind. Die bestehende *Multiple Cloning Site* (MCS) von pUC19, die von *EcoRI* und *HindIII*-Restriktionsschnittstellen flankiert ist, wurde je nach Konstrukt durch eine entsprechende DNA-Kassette mit Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *SapI* bzw. *EatI*, beide vom Typ IIa, ersetzt. Diese Kassetten wurden jeweils als Paar hybridisierter Oligodesoxynukleotide in das präparierte pUC19*-Plasmidrückgrat ligiert, das unter Entfernung einer *SapI*-Erkennungssequenz aus dem pUC19-Rückgrat durch ortsgerichtete Mutagenese mit den Primern JB-21 und JB-22 hergestellt wurde. Alle so konstruierten pUC19-Derivate ermöglichen eine präzise Insertion und Excision der PAS-Kassetten über deren 5'-GCC-Überhänge, welche für die Aminosäure Alanin codieren.

Zur Einführung reaktiver Reste in PAS-Polypeptidsequenzen als interne Kopplungsstellen für die chemische Konjugation wurden Glycin-Linkersequenzen (Abbildung 7) verwendet, die über ihre 5'-GCC-Überhänge zwischen zwei PAS-Kassetten inseriert werden können.

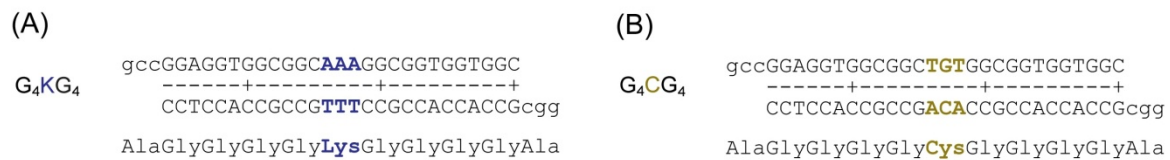


Abbildung 7: Glycin-Kassetten mit internen Kopplungsstellen. Die reaktiven Seitenketten für eine spätere Kopplung des Polypeptids sind farblich hervorgehoben. **(A)** Gen-Kassette für die Insertion eines Lysin-Rests. **(B)** Gen-Kassette zur Einführung eines internen Cystein-Rests.

3.1.3 Konstruktion, Produktion und Reinigung von PAS-IL-1Ra-Fusionsproteinen

Der Expressionsvektor pASK75his-dKas1-IL1Ra mit dem Strukturgen von IL-1Ra wurde freundlicherweise von Ina Theobald zur Verfügung gestellt. Da IL-1Ra bei insgesamt vier enthaltenen Cystein-Resten eine strukturelle Disulfidbrücke aufweist (Schreuder *et al.*, 1995), musste die Proteinproduktion unter weniger stark reduzierenden Bedingungen erfolgen, als sie im Cytoplasma herkömmlicher *E. coli*-Stämme vorherrschen. Hierzu wurde zunächst ein periplasmatischer Ansatz verfolgt, bei dem das Zielprotein mittels der OmpA-Signalsequenz (*Outer membrane protein A*) in das oxidierende Milieu des periplasmatischen Raums von *E. coli* K12 KS272 sekretiert wurde, um dort die native Faltung zu erfahren (Skerra & Plückthun, 1988). Allerdings interferierten offenbar die beiden freien Cysteinreste mit dem Faltungsprozess unter Bildung von Disulfidisomeren und -oligomeren, und die Ausbeute an löslichem intaktem Protein war sehr gering.

Eine neue Strategie sah die Produktion im Cytoplasma von *E. coli* Origami B (Bessette *et al.*, 1999) vor, in dem die korrekte Ausbildung energetisch begünstigter Disulfidbindungen ermöglicht wird, da die reduzierende Wirkung des intrazellulären Milieus herabgesetzt ist. Origami-Derivate von *E. coli*-Stämmen tragen Mutationen in den Genen *trxB* für Thioredoxin-Reduktase und *gor* für Glutathion-Reduktase, so dass die Regenerierung von Thioredoxinen und Glutathion in deren reduzierter Form stark beeinträchtigt ist (Ritz *et al.*, 2001). Diese für den bakteriellen Redox-Haushalt wichtigen Verbindungen üben normalerweise eine reduzierende Wirkung auf Proteine aus, katalysieren aber in ihrer oxidierten Form effektiv die Ausbildung von Disulfidbrücken. Eine weitere Mutation in Origami-Stämmen tritt im *ahpC*-Gen auf und bewirkt einen funktionalen Wechsel des kodierten Peroxiredoxins zu einer Disulfid-Reduktase-Aktivität, welche die Deletionen im Redox-System teilweise ausgleicht. Das stark verlangsamte Wachstumsverhalten der Reduktase-defizienten Origami-Stämme wird damit wieder normalisiert (Ritz *et al.*, 2001).

IL-1Ra sowie sechs verschiedene PAS-IL-1Ra-Fusionsproteine wurden mit N-terminalem Hexahistidin-Anhängsel mit Hilfe des Expressionsvektors pASK75-T7RBS (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Nadine Kuhn und dargestellt in Abbildung 8A) hergestellt. Das Expressionsplasmid ist ein Derivat des Vektors pASK75 (Skerra, 1994) mit der ribosomalen Bindestelle des Gens 10 aus dem T7-Phagen zur Erhöhung der Translationseffizienz (Olins *et al.*, 1988). Die auf pASK75 codierte, der *Multiple Cloning Site* (MCS) vorangestellte OmpA-Signalsequenz und der *Strep*-tag am Ende der MCS wurden im hier verwendeten T7-RBS-Derivat entfernt. Vom Plasmid pASK75 unterscheidet sich der Expressionsvektor in der von *Xba*I und *Hind*III flankierten Nukleotidsequenz, welche in Abbildung 8B gezeigt ist. Die PAS-Genkassetten wurden über eine *Sap*I-Restriktionsstelle am N-Terminus von IL-1Ra eingefügt. Das Expressionsplasmid basiert auf einem *tet*-Promotor-Operator-System, so dass die Genexpression mit Anhydrotetracyclin induzierbar ist.

Die IL-1Ra-Proteine wurden im 2 L-Kulturmaßstab in Schüttelkolben bei 30 °C produziert. Nach dem Zellaufschluss mittels French Press und Sterilfiltration des durch Zentrifugation geklärten Überstands mit löslichem Zielprotein erfolgte für jede IL-1Ra-Variante ein erster Reinigungsschritt durch Metallchelate-Affinitätschromatographie mit Ni-Sepharose (siehe Abschnitt 2.5.2). Den zweiten Reinigungsschritt stellte eine CEX-Chromatographie an einer Resource S-Säule dar (siehe Abschnitt 2.5.3). Die Dialyse gegen CEX-Laufpuffer (40 mM NH₄OAc/AcOH pH = 6,5) resultierte in der Präzipitation des Großteils der verbliebenen *E. coli*-Proteine und gestattete deren Abtrennung durch Zentrifugation, sodass diese Chromatographie in effizienter Weise zu homogenem Zielprotein führte. Dieses Reinigungsverfahren ist in Abbildung 9 für das Konstrukt PA#1(200)-IL-1Ra exemplarisch illustriert. Alle IL-1Ra-Proteine konnten mit Ausbeuten um die 10 mg gereinigten Proteins pro L Kulturmedium hergestellt werden. In der Effizienz steht die IMAC-Chromatographie der Ionenaustauschchromatographie für PASylierte Proteine nach, da das His₆-Anhängsel im Fall PASylierter Proteine weniger gut als in Abwesenheit des PAS-Abstandshalters an das IMAC-Säulenmaterial bindet und PASylierte Proteine schlechter von unspezifisch gebundenem Wirtszellprotein zu trennen sind. Offenbar ist das sterisch isolierte His₆-Tag wenig bindungsaktiv, wohingegen die Adsorption an die IMAC-Säule üblicherweise durch Metall-Bindungsaktive Aminosäureseitenketten des Zielproteins in dessen Umgebung gefördert wird. Bei der IEX-Chromatographie spielt hingegen vor allem die Oberfläche des Zielproteins für die Interaktion mit dem Säulenmaterial eine Rolle, was durch das PAS-Polypeptid nur wenig abgeschirmt wird.

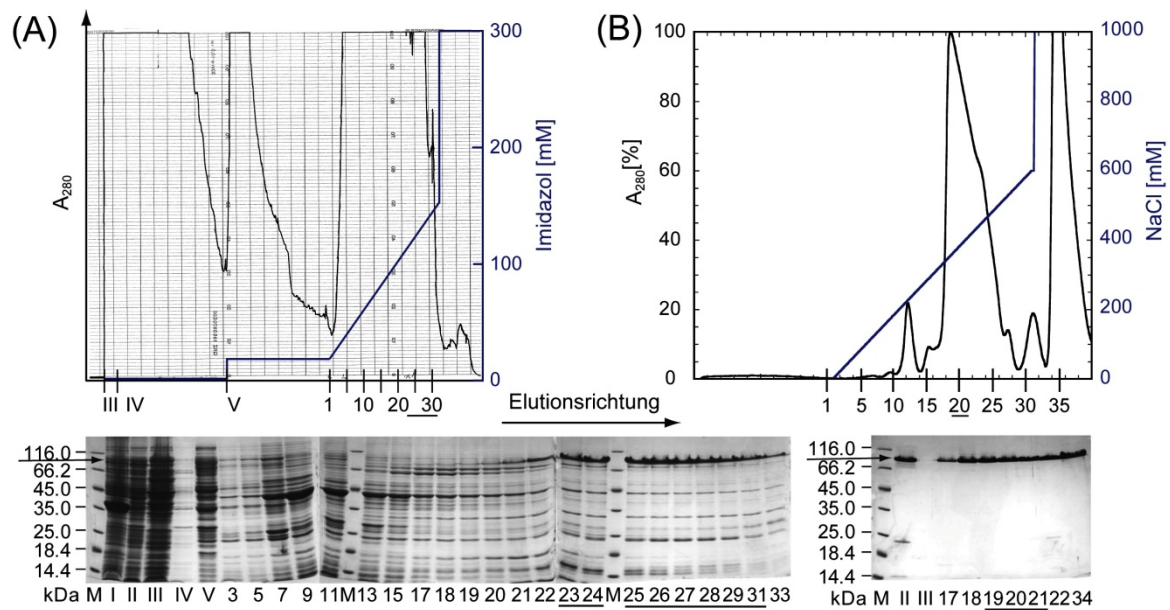


Abbildung 9: Chromatographische Reinigung von PA#1(200)-IL-1Ra aus dem bakteriellen Gesamtzellextrakt (*E. coli* Origami B/pASK75-T7-PA#1(200)-IL-1Ra). M: LMW-Proteinmarker, I: unlösliche Zellbestandteile nach Aufschluss, II: löslicher Proteinextrakt für die Chromatographie (IMAC bzw. CEX), III: Durchlauf der Chromatographie (IMAC bzw. CEX), IV: IMAC-Waschfraktion, V: IMAC-Vorelution mit 15 mM Imidazol. Alle arabischen Nummern beziehen sich auf gesammelte Fraktionen im Imidazol- (IMAC) bzw. NaCl- (AEX) Konzentrationsgradienten, vereinigte Fraktionen mit dem Zielprotein sind durch Unterstreichung und die Bande für das Zielprotein in der SDS-PAGE mit einem Pfeil markiert. **(A)** Chromatogramm und SDS-PAGE-Analyse der IMAC-Reinigung an 20 mL Ni-Sepharose High Performance. Das Zielprotein konnte in löslicher Form aus dem Zellextrakt über einen flachen Gradienten angereichert werden. **(B)** Nach Dialyse in den CEX-Puffer und Abtrennung des Präzipitats aus *E. coli*-Proteinen wurde das Zielprotein erfolgreich in hoher Reinheit durch CEX-Chromatographie an einer Resource S 1 mL-Säule isoliert.

Tabelle 2: Bestätigung der PAS-IL-1Ra-Konstrukte durch ESI-MS-Messungen. Die korrekte Expression des intakten rekombinanten Proteins und die Ausbildung der einzelnen Disulfidbrücke im IL-1Ra-Protein wurde für alle Konstrukte im Rahmen der Messgenauigkeit des Instruments von ± 1 Da nachgewiesen.

Protein	berechnete Masse ^a [Da]	gemessene Masse ^b [Da]	Abweichung [Da]
MKH ₆ -IL-1Ra	18538,9	18538,5	0,4
MKH ₆ -PAS#1(200)-IL-1Ra	35057,3	35056,3	1,0
MKH ₆ -PA#1(200)-IL-1Ra	34577,3	34577,8	-0,5
MKH ₆ -P1A1P1A4(189)-IL-1Ra	33378,8	33377,8	1,0
MKH ₆ -P1A1(200)-IL-1Ra	35358,5	35359,2	-0,7
MKH ₆ -P1A3(200)-IL-1Ra	34056,6	34056,6	0
MKH ₆ -P1A5(198)-IL-1Ra	33471,8	33470,8	1,0

^a berechnet mithilfe des Programms ProtParam (www.expasy.org) unter Berücksichtigung eines Verlusts von 2 Da durch Ausbildung der Disulfid-Bindung

^b durch ESI-MS bestimmt mit maXis Q-TOF

Das auch hier zu beobachtende anomale Laufverhalten PASylierter Proteine in der SDS-PAGE bei einem stark erhöhten apparenten Molekulargewicht (Schlapschy *et al.*, 2013) ist auf die geringe Bindekapazität der PAS-Sequenzen für SDS zurückzuführen. Bei der Produktion und Reinigung der unterschiedlichen PAS-IL-1Ra-Varianten zeigte sich bereits, dass die Löslichkeit und damit auch verbundene Proteinausbeute durch verringerten Prolingehalt der PAS-Sequenzen von P1A1 über P1A3 nach P1A5 drastisch beeinträchtigt wurde. Die Identität und Homogenität aller IL-1Ra-Fusionsproteine wurde mittels ESI-MS-Analyse bestätigt, wie Tabelle 2 zu entnehmen ist.

3.1.4 Konstruktion von spaltbaren PAS-Fusionen mit SUMO

Im einer ersten Strategie zur Produktion freier PAS-Polypeptide mittels selektiver Spaltung von Fusionsproteinen wurde das SUMO-Protein Smt3 zusammen mit der korrespondierenden SUMO-Protease Ulp1 aus *Saccharomyces cerevisiae* angewandt (Bayer *et al.*, 1998). Deren Strukturgene wurden durch PCR aus dem Plasmid pIL4R-3-SUMO (Dr. Michael Schneider) mit den Primern JB-1 und JB-2 für das SUMO-Protein bzw. aus chromosomaler Hefe-DNA mit den Primern JB-7 und JB-8 für die SUMO-Protease amplifiziert (Ling *et al.*, 1995).

Beiden Genen wurde dabei ein N-terminales Hexahistidin-Anhängsel zur Affinitätsreinigung vorangestellt. Die resultierenden beiden Proteinsequenzen entsprachen damit exakt den Aminosäuresequenzen 2 bis 99 des SUMO-Proteins Smt3 (Datenbankeintrag UniProtKB - Q12306) bzw. 403-621 der Protease Ulp1 (Datenbankeintrag UniProtKB - Q02724) mit jeweils N-terminaler Erweiterung um den Sequenzabschnitt MKH₆. Die Strukturgene wurden über *Nde*I- und *Hind*III-Restriktionsstellen in ein pRSET5a-Expressionsplasmid mit T7-Promotor (Schoepfer, 1993) inseriert, welches als pSA1 bereits erfolgreiche Anwendung zur Produktion von *Core*-Streptavidin gefunden hatte (Schmidt & Skerra, 1994). Die Genexpression durch den T7-Promotor auf diesem Plasmid wird indirekt durch Induktion des T7-RNA-Polymerase-Gens (als Bestandteil des integrierten Phagengenoms *DE3*) in geeigneten Expressionsstämmen durch IPTG kontrolliert (Studier & Moffatt, 1986). Zur Kompensation der Basalexpression der RNA-Polymerase wurde das Hilfsplasmid pLysE eingesetzt, welches die konstitutive Koexpression geringer Mengen an T7-Lysozym bewirkt, eines natürlichen kompetitiven Inhibitors des Enzyms (Studier, 1991).

Zunächst wurde durch ortsgerichtete Mutagenese zu pSA1* mit den Primern JB-3 und JB-4 eine *Sap*I-Erkennungsstelle aus dem Plasmidrückgrat entfernt, so dass die dem SUMO-Gen bei der Amplifizierung hinzugefügte C-terminale *Sap*I-Erkennungssequenz

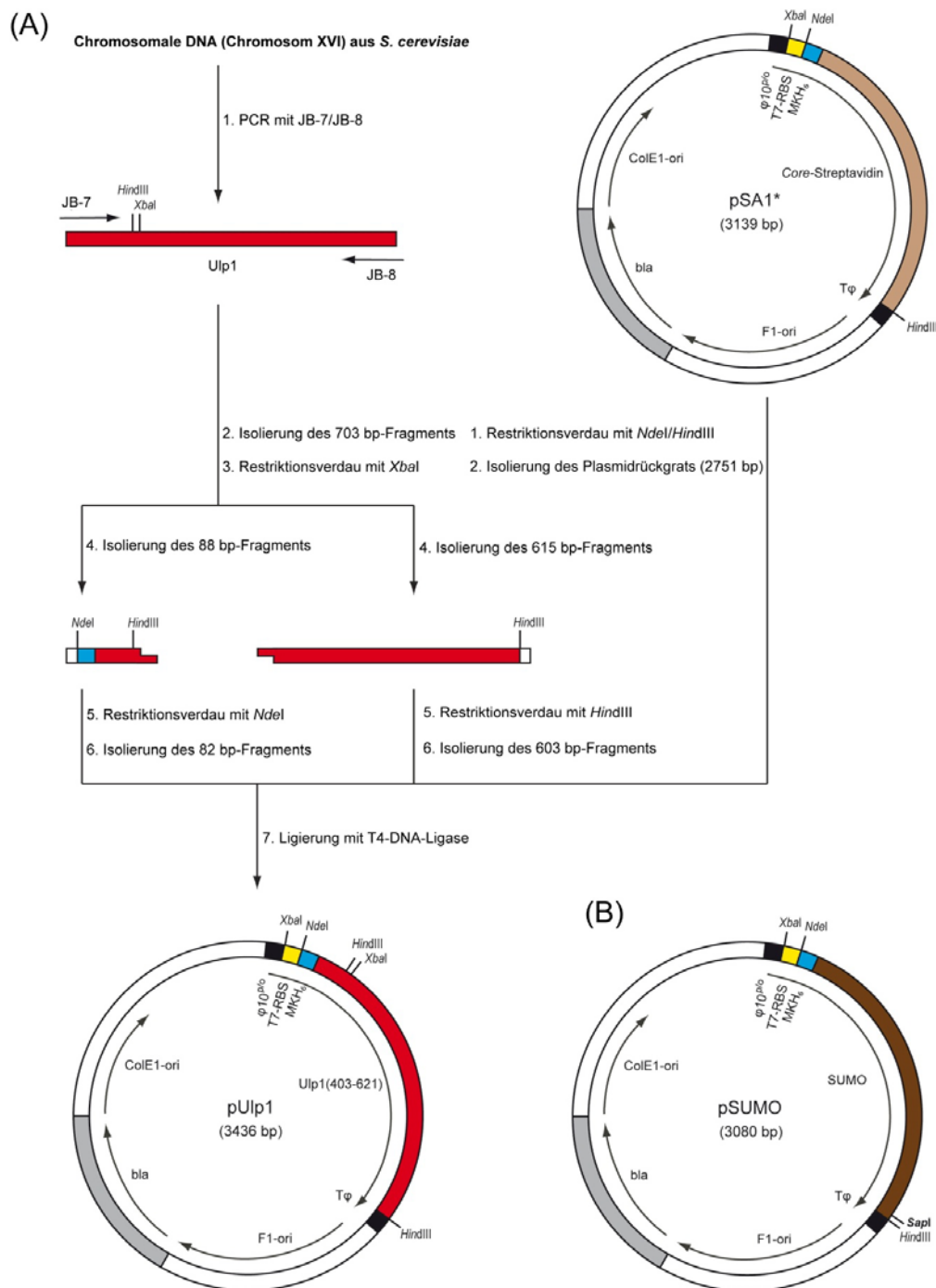


Abbildung 10: Konstruktion der Expressionsvektoren für das SUMO-Fusionssystem. Als Plasmidrückgrat diente pRSET5a mit einem T7-Promotor. **(A)** Konstruktion von pUlp1. Das Gen des katalytisch aktiven Fragments der SUMO-Protease weist eine interne *HindIII*-Schnittstelle auf. Um einen partiellen *HindIII*-Verdau mit potentiell schlecht kontrollierbarer Genfragmentierung und fehlerhafter Religierung zu vermeiden, wurde das PCR-Produkt unter Ausnutzung einer ebenfalls internen *XbaI*-Restriktionsstelle in zwei Fragmente gespalten, die getrennt mit *NdeI* bzw. *HindIII* geschnitten wurden. Über die so resultierenden drei verschiedenartigen *Sticky-End*-Überhänge erfolgte die gezielte Drei-Fragment-Ligierung mit dem Rückgrat des Expressionsvektors. **(B)** Der hier abgebildete Expressionsvektor pSUMO kann über die einmalige *SapI*-Restriktionsschnittstelle am C-Terminus des SUMO-Gens PAS-Genkassetten im fortlaufenden Leserahmen aufnehmen und ermöglicht so die Produktion von gezielt spaltbaren SUMO-PAS-Fusionsproteinen.

im resultierenden Expressionsvektor pSUMO einmalig auftrat (Abbildung 10B). Diese Restriktionsstelle ermöglichte die darauffolgende Insertion von beliebigen PAS-Sequenzen über deren 5'-GCC-Überhänge.

Da das C-terminale Fragment von Ulp1(403-621) volle katalytische Aktivität zeigt (Mossessova & Lima, 2000), wurde nur dieser Teil der Protease amplifiziert und gentechnisch in *E. coli* hergestellt. Der entsprechende Genabschnitt wurde aufgrund einer internen *HindIII*-Restriktionsstelle mittels Drei-Fragment-Ligierung in das Rückgrat des Expressionsvektors pSA1* inseriert, wie in Abbildung 10A veranschaulicht.

3.1.5 Konstruktion von spaltbaren PAS-Fusionen mit TrxA

Das zweite Expressionssystem für PAS-Polypeptide basiert auf der Fusion mit dem Protein Thioredoxin A (TrxA) aus *Escherichia coli*. Der Expressionsvektor pTrxA mit dem *trxA*-Strukturgen wurde freundlicherweise von Ina Theobald kloniert und basiert auf dem Plasmid pASK37, dessen Genexpression unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors (Skerra & Plückthun, 1991) steht. Das *trxA*-Gen wurde um ein N-terminales Hexahistidin-Anhängsel sowie eine C-terminale *SapI*-Erkennungssequenz erweitert. Außerdem wurde ebenfalls ein Methioninrest direkt vor der *SapI*-Schnittstelle am C-Terminus von TrxA eingeführt, der die spätere Freisetzung von PAS-Polypeptiden aus TrxA-PAS-Fusionsproteinen mit Hilfe der chemischen Bromcyanspaltung (Gross, 1967) ermöglicht (siehe Abschnitt 2.5.4). Ein internes Methionin an Position 38 der nativen Proteinsequenz wurde durch ortsgerichtete Mutagenese zu Glutamin mutiert, damit das TrxA-Protein als ein einziges intaktes Fragment aus dem PAS-Fusionsprotein abgespalten werden konnte. Mit Ausnahme dieser Veränderung entsprach die resultierende Proteinsequenz für TrxA (118 AS in dieser Arbeit) der vollständigen Aminosäuresequenz 2 - 109 des Datenbankeintrags UniProtKB - P0AA25 für TrxA aus *E. coli* K12, welche N-terminal um die Sequenz MKH₆ und C-terminal um die Aminosäuren MA erweitert war.

Der Vektor pTrxA kann analog zu pSUMO über die C-terminale *SapI*-Restriktionsschnittstelle PAS-Genkassetten aufnehmen und zur Produktion entsprechender Fusionsproteine verwendet werden (Abbildung 11). Der *lacUV5*-Promotor ist mit IPTG induzierbar, und seine Basalexpression kann bei Abwesenheit des Induktors effektiv durch 1 % (m/v) Glucose im Kulturmedium unterdrückt werden (Plückthun & Skerra, 1989). Die Bromcyanspaltung wurde hier nur für die Freisetzung Serin-freier PAS-Polypeptide verwendet.

Zur Etablierung einer alternativen schonenden Spaltungsstrategie für TrxA-PAS-Fusionsproteine wurde das Methionin 117 am C-Terminus des Thioredoxins durch ortsgerichtete Mutagenese mit den Primern JB-46 und JB-47 zu einem Argininrest mutiert, welcher in den PAS-Fusionskonstrukten als Spaltstelle für Trypsin diente. Vorversuche ergaben, dass sich die Arginin-Seitenkette vermutlich aufgrund höherer Basizität im direkten Vergleich zu einem Lysin-Rest besser für die Spaltung mit Trypsin eignete.

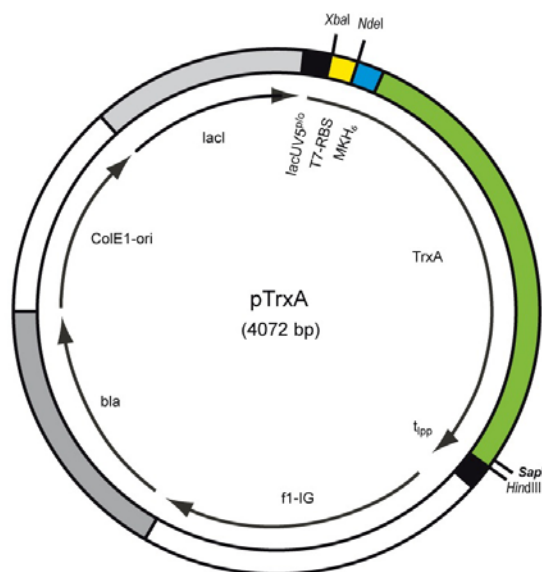


Abbildung 11: Expressionsplasmid pTrxA. Auch dieser Vektor dient der Insertion von PAS-Kassetten über eine C-terminale SapI-Schnittstelle und der anschließenden Expression von PAS-Fusionsproteinen zur Präparation der PAS-Polypeptide. Die Genexpression wird von dem lacUV5-Promotor reguliert, der mit IPTG induziert werden kann.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden hauptsächlich TrxA-PAS-Fusionsproteine zur Herstellung von PAS-Polypeptiden eingesetzt. Das SUMO-System wurde im präparativen Maßstab nur für die Produktion spezieller PAS-Polypeptide genutzt, die aufgrund mehrfacher positiver Ladungen keine Bromcyan- oder Trypsin-Spaltung zuließen, ohne das Polypeptid selbst zu spalten oder chemisch zu modifizieren.

3.1.6 Expression und präparative Reinigung von PAS-Polypeptiden

Die PAS-Polypeptid-Sequenzen wurden in einem ersten Ansatz als SUMO-Fusionsproteine in 2 L-Schüttelkolben bei 37 °C produziert. Hierzu wurde der Stamm *E.coli* BL21(DE3) mit den Expressionsplasmiden pSUMO-PAS#1(200) bzw. pSUMO-PA#1(200) sowie dem Hilfsvektor pLysE transformiert, welcher durch konstitutive Expression von T7-Lysozym die Basalexpression des T7-Promotors der Expressions-

plasmide unterdrückte (Studier, 1991). Nach Induktion mit IPTG für 4 h wurden die Zellen geerntet und an der French Press unter Hochdruck aufgeschlossen. Durch Zentrifugation und darauffolgende Sterilfiltration wurde der Gesamtzellextrakt von Zelltrümmern befreit und zur IMAC-Reinigung auf eine Säule mit Ni-Sepharose aufgetragen. In einem flachen Imidazol-Konzentrationsgradienten von 0 bis 150 mM wurden die SUMO-PAS-Fusionsproteine allerdings zusammen mit größeren Mengen unspezifisch gebundener Wirtszellproteine eluiert, so dass ein zweiter Reinigungsschritt durch AEX-Chromatographie durchgeführt wurde. Die Dialyse gegen den AEX-Laufpuffer 20 mM Tris/HCl pH 9,5 führte zur Präzipitation eines Großteil der *E. coli*-Proteine und gestattete deren Abtrennung mittels Zentrifugation. Die anschließende AEX-Reinigung erfolgte an einer Resource Q-Säule und erbrachte Ausbeuten an SUMO-PAS#1(200) bzw. SUMO-PA#1(200) um 10 mg pro L Kulturmedium.

Zur Präparation der freien PAS-Polypeptide durch enzymatische Spaltung der SUMO-Fusionsproteine war die SUMO-Protease Ulp1 erforderlich, deren katalytisch aktives C-terminales Fragment Ulp1(403-621) (siehe Abschnitt 3.1.4) mit N-terminalem His₆-Tag gentechnisch hergestellt wurde. Das resultierende Protein wies 227 Aminosäurereste und eine Masse von 26555,3 kDa auf (berechnet mit Hilfe des ProtParam-Programms, www.expasy.org). Die cytoplasmatische Biosynthese erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)/pLysE/pUlp1 bei 30 °C für 4 h, nachdem Expressionsanalysen bei verschiedenen Temperaturen unter diesen Bedingungen den größten Anteil der SUMO-Protease in der löslichen Zellfraktion nachgewiesen hatten. Da auch das Expressionsplasmid pUlp1 auf dem mit IPTG induzierbaren T7-Expressionssystem basiert, wurden exakt dieselben Expressionsbedingungen gewählt wie bei den SUMO-Fusionsproteinen.

Der Gesamtzellaufschluss erfolgte an der French Press, und nach Klärung durch Zentrifugation und Filtration wurde die SUMO-Protease aus dem löslichen Zellextrakt mittels Zn²⁺-IMAC an IDA-Sepharose gereinigt, wobei ein Imidazol-Gradient von 0 bis 300 mM angelegt wurde. Dieser Reinigungsschritt ermöglichte die effektive Abtrennung der Protease vom größten Teil der Wirtszellproteine, welche unspezifisch an die Säule gebunden hatten. Für die weitere Reinigung bis zur Homogenität wurde die präparative Größenausschlusschromatographie in PBS-Puffer an einer HiLoad 16/60 Superdex 75-Säule mit 120 mL Bettvolumen (*prep grade*) herangezogen. Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Fraktionen mit reinem Ulp1-Protein ergab eine Gesamtausbeute von 2,7 mg/L Kulturmedium. Die SUMO-Protease wurde mit einer Konzentration von 0,67 mg/mL in PBS pH = 8,0, 1 mM BME, 50 % (v/v) Glycerin, 0,2 % (v/v) Triton X-

100 bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Sehr ähnliche Pufferbedingungen werden für die kommerziell erhältliche Version (SUMO Protease; Invitrogen/Life Technologies) empfohlen.

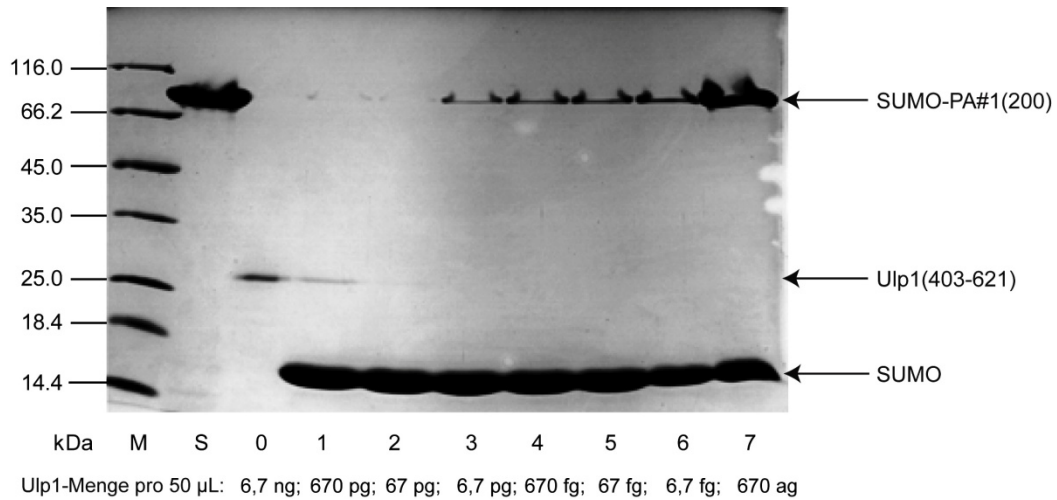


Abbildung 12: SDS-PAGE zur Aktivitätsbestimmung der rekombinanten SUMO-Protease. Das SDS-Gel zeigt 7 Inkubationsansätze (50 μL Gesamtvolumen) in PBS pH 8,0, 1 mM BME, 5 % (v/v) Glycerin, 0,2 % (v/v) Triton X-100 über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Als Substrat dienten jeweils 83 μg des Fusionsproteins SUMO-PA#1(200) in einer Gesamtkonzentration von 1,7 mg/mL. Das Gel wurde mit Proben zu je 20 μL beladen. Spur M: Proteinmarker; S: intaktes Fusionsprotein vor Proteasezugabe; 0: Protease-Verdünnung einer Konzentration von 6,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (entspricht 6,7 ng Ulp1 im 50 μL -Ansatz). In den Spuren 1 bis 7 sind Verdauansätze mit jeweils 1 μL einer Ulp1-Verdünnungsreihe dargestellt, welche ausgehend von der 6,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -Protease-Lösung (Spur 0) durch sequentielle 1:10-Verdünnung erstellt wurde. Ansatz 1 enthält somit die größte Protease-Menge (670 pg Ulp1), die folgenden Ansätze enthalten jeweils ein Zehntel der Protease-Menge des vorhergehenden Ansatzes bis hin zu Ansatz 7 mit der geringsten Menge (670 ag Ulp1). Die optimale Protease-Menge zum vollständigen Verdau von 83 μg SUMO-PA#1(200) weist Ansatz 2 auf mit 67 pg Ulp1 (Spur 2).

Als SUMO-Fusionsprotein zur Analyse der Spalteffizienz der SUMO-Protease wurde SUMO-PA#1(200) verwendet, dem in separaten Ansätzen schrittweise reduzierte Mengen der rekombinanten SUMO-Protease zum enzymatischen Verdau zugegeben wurden. Jeder Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 49 μL je 83 μg des Substrats SUMO-PA#1(200) (Gesamtkonzentration 1,7 mg/mL) in 1 x Reaktionspuffer (PBS pH 8,0, 1 mM BME, 5 % (v/v) Glycerin, 0,2 % (v/v) Triton X-100), welcher mit Hilfe einer 10 x Puffer-Stammlösung eingestellt wurde. Im gleichen Reaktionspuffer wurde eine 1:100-Verdünnung der Ulp1-Stammlösung (0,67 mg/mL) und ausgehend von dieser 6,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -Lösung durch sequentielle 1:10-Verdünnung eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Reaktionsansätze wurden mit jeweils 1 μL der so erhaltenen Protease-Verdünnungen komplementiert und anschließend unter Variation der Reaktionstemperatur und -dauer inkubiert. Durch Zugabe von 5 x SDS-Auftragspuffer und Erhitzen der Proben auf $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Proteolyse-Reaktionen gestoppt und zur Analyse auf SDS-

Gele aufgetragen. In Abbildung 12 ist exemplarisch die SDS-PAGE-Analyse eines solchen Experiments zur Aktivitätsbestimmung veranschaulicht.

Das SUMO-PA#1(200)-Fusionsprotein (28,3 kDa) migrierte bei einem anomal vergrößerten apparenten Molekulargewicht, wie es für PASylierte Proteine aufgrund herabgesetzter SDS-Bindekapazität charakteristisch ist, doch die Banden der rekombinanten SUMO-Protease Ulp1 (26,6 kDa) und des abgespaltenen SUMO-Fusionpartners (12,2 kDa) zeigten ein typisches SDS-Laufverhalten. Das freigesetzte PA#1(200)-Polypeptid war mit Coomassie-Brilliantblau nicht anfärbbar. Mit der schrittweise verringerten Protease-Menge in den Spaltungsansätzen erhöhte sich erwartungsgemäß der Anteil des ungespaltenen Substrats, während die relative Menge an freigesetztem SUMO-Protein abnahm. Die Aktivitätsexperimente ergaben, dass für einen vollständigen Verdau von 83 µg des Fusionsproteins SUMO-PA#1(200) 67 µg Ulp1 sowie eine Inkubationsdauer von 1 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C ausreichend waren. In den folgenden präparativen Spaltungsreaktionen in dieser Arbeit wurden SUMO-Fusionsproteine dennoch unter Zusatz einer stark erhöhten Protease-Menge von 1000:1 (w/w) Ulp1 gespalten, um die Vollständigkeit des proteolytischen Verdau sicherzustellen.

Da das SUMO-Fusionssystem unter patentrechtlichem Schutz steht (Lima & Mossessova, 2011; Wang, 2011), der zukünftige industrielle Anwendungsmöglichkeiten limitiert, wurden die PAS-Polypeptide im Folgenden in Fusion mit Thioredoxin A hergestellt. So konnte außerdem auch die Produktion der SUMO-Protease eingespart werden, da die TrxA-Fusionsproteine derart konzipiert waren, dass P/A-Polypeptide aus diesen durch die chemische Bromcyan-Spaltung (Gross, 1967) nach dem C-terminalen Methionin des TrxA bzw. PAS-Polypeptide durch tryptischen Verdau (Olsen *et al.*, 2004) nach dem Arginin-Rest am TrxA-C-Terminus freigesetzt werden konnten (siehe Abschnitt 1.4). Beide Spaltungsmethoden stellten kostengünstige Alternativen zum SUMO-Fusionssystem dar. Um zusätzlich auch die Ausbeute an freien Polypeptiden zu steigern, welche für die geplante biochemische und biophysikalische Charakterisierung in großen Mengen benötigt wurden, wurden die TrxA-PAS-Fusionsproteine schließlich durch Fermentation bei hohen Zelldichten produziert.

Die Herstellung der TrxA-Fusionsproteine erfolgte jeweils in einem 8 L-Tischfermenter im Cytosol von *E. coli* KS272, transformiert mit dem jeweiligen pTrxA-Expressionsplasmid, nach einem etablierten Protokoll (Schiweck & Skerra, 1995; siehe Abschnitt 2.4.2). Als Kulturmedium kam eine Mineralsalz-Lösung mit 20 % (w/v) Glucose, Spurenelementen und Ampicillin als selektivem Antibiotikum zum Einsatz. Die

Sensortechnik gewährleistete konstante Bedingungen während des gesamten Kultivierungsvorgangs, indem ein pH-Wert von 7,5 sowie ein minimaler Sauerstoffsättigungsdruck von 30 % und eine Temperatur von 25 °C aufrechterhalten wurden. Als einzige Kohlenstoffquelle diente Glucose, deren Zudosierung anhand der regelmäßig überprüften OD_{550} -Werte nachgeregelt wurde, während die zur pH-Regulierung verwendete Ammoniak-Lösung die Stickstoffversorgung der Bakterienkultur gewährleistete. Die Basalexpression durch den *lacUV5*-Promotor des Expressionsplasmids pTrxA konnte während des gesamten Fermentationsprozesses durch die Aufrechterhaltung einer hinreichenden Glucose-Konzentration im Medium (Plückthun & Skerra, 1989) bis zur Induktion mit IPTG unterdrückt werden. Diese erfolgte nach etwa 19 h, als eine Zelldichte von $OD_{550} \approx 30$ erreicht war, und die Biosynthese der TrxA-Fusionsproteine wurde 4 h lang bis $OD_{550} \approx 45$ fortgesetzt.

Der Zellaufschluss wurde mittels eines PANDA-Hochdruck-Homogenisators unter Zusatz von jeweils 1 mM der Protease-Inhibitoren EDTA und Dithiodipyridin vorgenommen. Der Gesamtzellextrakt wurde durch Zentrifugation und Sterilfiltration geklärt und zur IMAC-Reinigung gegen IMAC-Laufpuffer dialysiert. Der Rohextrakt wurde portionsweise auf Ni-Sepharose High Performance aufgetragen und es wurde ein Imidazol-Konzentrationsgradient von 0 bis 100 mM angelegt (siehe Abschnitt 2.5.2). Die IMAC-Reinigung führte zu einer unzureichenden Abtrennung der PASylierten Proteine von Wirtszellproteinen. Der durch das ProtParam-Programm (www.expasy.org) abgeschätzte pI-Wert des TrxA von etwa 5,92 versprach eine gute Bindung der TrxA-Fusionsproteine an das AEX-Säulenmaterial einer Resource Q-Säule mit 6 mL Bettvolumen. TrxA-PA#1(600) beispielsweise wurde auf diese Säule in 20 mM Tris/HCl pH 9,5 aufgetragen und in einem Gradienten von 0 bis 200 mM NaCl in hoher Reinheit eluiert (siehe Abschnitt 2.5.3). Obwohl diese Reinigungsstrategie zielführend war, setzte sie im Hinblick auf die erforderlichen Mengen an spaltbaren TrxA-PAS-Fusionsproteinen einen zu großen Zeit- und Arbeitsaufwand voraus. Daher wurde nach alternativen Möglichkeiten zur Reinigung der Fusionsproteine aus dem Gesamtzellextrakt gesucht.

Eine letztlich effizientere Reinigungsstrategie sah eine direkte Hitzebehandlung des Gesamtzellaufschlusses bei 70 °C vor, um möglichst viele Wirtszellproteine durch Hitzedenaturierung zur Aggregation und anschließenden Präzipitation aus der Aufschlusslösung zu bringen, während die TrxA-Fusionsproteine in Lösung blieben. Die PAS-Polypeptide vermitteln eine erhöhte Löslichkeit der Fusionsproteine und vermögen diese in Lösung zu stabilisieren; zudem widersteht der Fusionspartner TrxA (und auch das hier nicht eingesetzte SUMO-Protein) durch seine stabile Faltung der Hitzedenaturierung bis

zu einer Temperatur von 80 °C (Jeng *et al.*, 1994). Somit präzipitierte ein großer Teil der *E. coli*-Proteine bei Erhitzen auf 70 °C für 15 min bereits im Rohzelleextrakt und es ergab sich nach Abtrennung der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation ein vorgereinigter Zelleextrakt mit einem hohen Anteil an dem rekombinanten Protein.

Mittels fraktionierter Ammoniumsulfat-Fällung sollten die TrxA-Fusionsproteine selektiv durch Präzipitation aus dem Zelleextrakt angereichert werden (siehe Abschnitt 2.5.1). Die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration wurde schrittweise erhöht, wobei die erhaltenen Protein-Präzipitate abzentrifugiert und mittels SDS-PAGE auf ihren Gehalt an PASyliertem Protein untersucht wurden. Die PAS-Fusionsproteine konnten bei Ammoniumsulfat-Konzentrationen zwischen 15 und 25 % ausgefällt werden, wohingegen die verbliebenen Wirtszellproteine größtenteils gelöst blieben. So konnte das jeweilige rekombinante Protein in konzentrierter Form resolubilisiert und gegen Puffer für die Ionenaustausch-Chromatographie dialysiert werden, was eine IMAC-Reinigung überflüssig machte. Ein einziger chromatographischer Schritt reichte also zur Anreicherung des Fusionsproteins in hoher Reinheit und Menge aus.

Für die Reinigung der TrxA-Fusionsproteine zur Homogenität hatte sich ja bereits die AEX-Chromatographie als geeignet erwiesen. Diese erfolgte an Source 15Q; nach diesem letzten Reinigungsschritt lagen, bezogen auf die Fermentation im 8 L-Maßstab, Gesamtausbeuten von jeweils etwa 1 g des betreffenden rekombinanten Proteins in hochreiner Form vor. Wie schon bei den PAS-IL-1Ra-Konstrukten erschwerte die verringerte Löslichkeit der P1A3-Sequenz die Produktion und Reinigung des entsprechenden TrxA-Fusionsproteins und führte zu verminderten Ausbeuten.

Zur Freisetzung der Serin-freien P/A-Polypeptide aus entsprechenden TrxA-Fusionsproteinen folgte nun die BrCN-Spaltung (Gross, 1967; siehe Abschnitt 2.5.4). Die gereinigten rekombinanten Proteine wurden dazu jeweils lyophilisiert und dann in einer Konzentration von 5 mg/mL in 70 % (v/v) Ameisensäure wiederaufgenommen. Nach Zugabe von BrCN im 100fachen molaren Überschuss über die vorhandenen Met-Reste (in diesem Fall zwei Met-Reste pro TrxA-Protein) erfolgte die chemische Spaltung der Fusionsproteine über Nacht bei Raumtemperatur. Der durch erneute Lyophilisierung erhaltene Rückstand wurde in AEX-Laufpuffer (20 mM Tris/HCl pH = 9,5) resolubilisiert.

Die enzymatische Spaltung der TrxA-Fusionsproteine mit PAS#1-Polypeptidsequenzen wurde durch die Zugabe von 20:1 (w/w) rekombinantem Trypsin (TripLE Select Enzyme) zu den vereinigten AEX-Eluatfraktionen und Inkubation bei 37 °C über Nacht bewerkstelligt.

Die Spaltung der Fusionsproteine verlief durch beide Methoden nahezu vollständig. Die Isolierung freier PAS-Polypeptide aus jedweden Spaltansätzen wurde schließlich durch subtraktive AEX-Chromatographie erreicht. Nach Dialyse gegen 20 mM Tris/HCl pH 9,5 wurden die Spaltansätze auf eine Source 15Q-Säule aufgetragen. Nur das abgespaltene TrxA-Protein sowie verbliebenes Fusionsprotein konnten durch die Oberflächenladungen von TrxA vom Säulematerial gebunden werden, während das freigesetzte ungeladene PAS-Polypeptid im Durchlauf der Chromatographie anfiel. UV/Vis-Spektren in 5 mM KPi pH 7,5, 50 mM K_2SO_4 bestätigten den gewünschten Reinheitsgrad der PAS-Lösungen und ermöglichten die Konzentrationsbestimmung der Polypeptide nach Scopes (1974; siehe Abschnitt 2.5.7), bevor sie konzentriert und weiteren Analysen unterzogen wurden. Mittels ESI-MS-Analyse wurden alle freien PAS-Polypeptide zusätzlich verifiziert (Tabelle 3).

Tabelle 3: ESI-MS-Messungen der freien PAS-Polypeptide. Innerhalb der Messgenauigkeit des Instruments von ± 2 Da wurden alle erwarteten Peptidmassen bestätigt.

Polypeptid	berechnete Masse ^a [Da]	gemessene Masse ^b [Da]	Abweichung [Da]
PAS#1(200)	16607,4	16607,3	0,1
PAS#1(400)	33125,8	33125,7	0,1
PAS#1(600)	49644,2	49645,1	-0,9
PA#1(200)	16127,5	16127,5	0
PA#1(400)	32165,9	32165,2	0,7
PA#1(600)	48204,3	48202,3	2,0
P1A1(200)	16908,6	16908,5	0,1
P1A3(200)	15606,7	15606,6	0,1

^a berechnet mithilfe des Programms ProtParam (www.expasy.org)

^b durch ESI-MS bestimmt mit 6210 Time-of-Flight LC/MS

Als einzige Polypeptidspezies wurde PA#1(600) als TrxA-Fusionsprotein sogar im technischen Maßstab (50 L-Fermenter) im TUM Forschungszentrum Weiße Biotechnologie produziert. Die Fermentation von *E. coli* K12 KS272/pTrxA-PA#1(600) (siehe Abschnitt 2.4.3) folgte prinzipiell dem bereits für den 8 L-Laborfermenter etablierten Protokoll (Schiweck & Skerra, 1995). Das Minimal-Medium enthielt zwar beim Animpfen mit der Vorkultur 5 % statt nur 2 % (w/v) Glucose, jedoch wurde die Kohlenstoffzufuhr durch Glucose bereits nach etwa 9 h bei $\text{OD} \approx 4,0$ durch ein anhand der OD_{550} -Werte berechnetes Feed-Programm gesteuert.

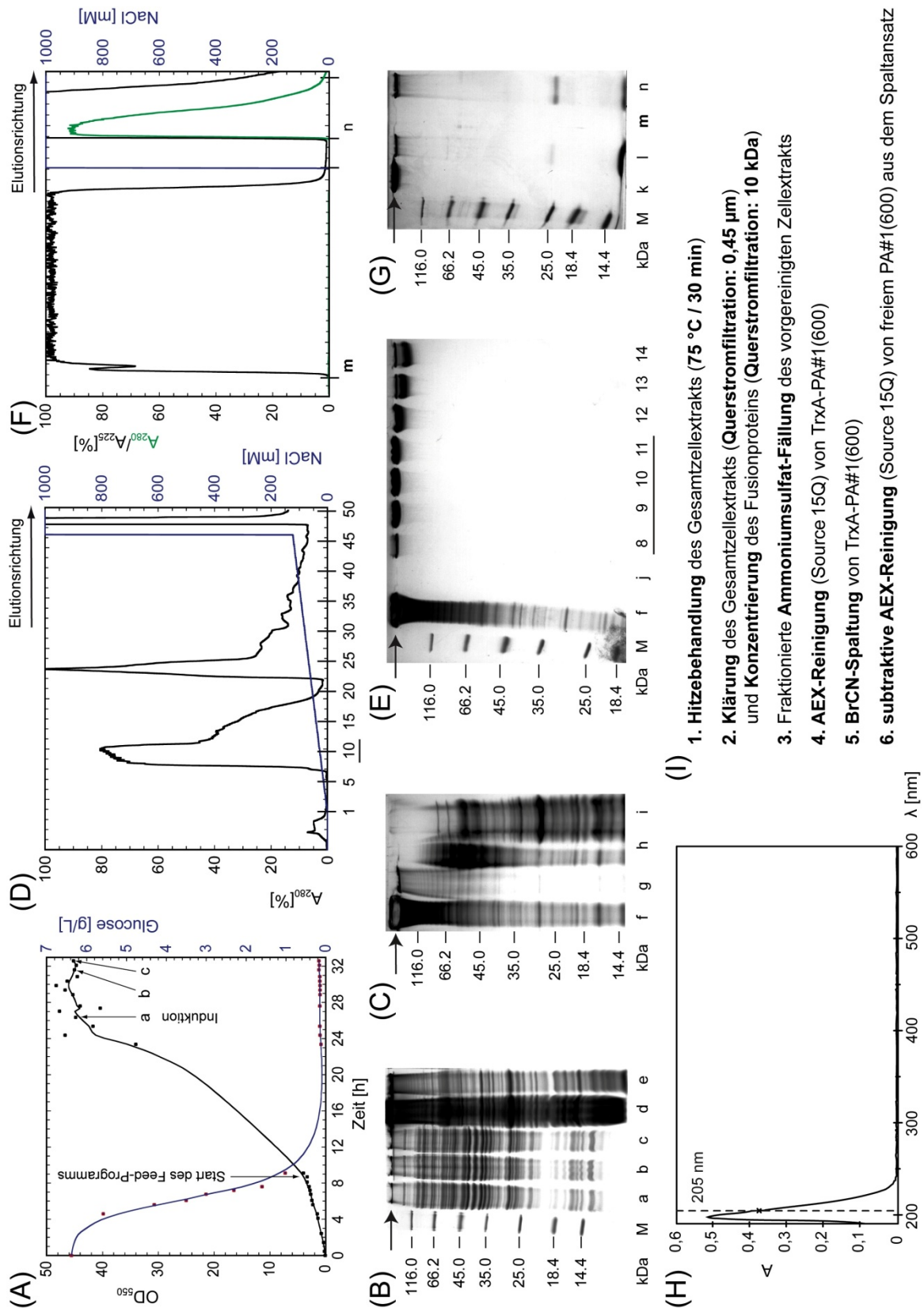


Abbildung 13: Produktion und präparative Reinigung von PAS-Polypeptiden am Beispiel von TrxA-PA#1(600). In SDS-Gelen ist TrxA-PA#1(600) mit einem Pfeil gekennzeichnet, M bezeichnet den Proteinmarker. Bezeichnungen von Proben mit Kleinbuchstaben und von mit arabischen Zahlen nummerierten Fraktionen werden konsistent in den Abbildungsteilen verwendet. **(A)** Wachstumskurven zur Proteinproduktion im 50 L-Fermenter. Die geglättete Kurve veranschaulicht die *Lag*-Phase, das exponentielle Wachstum und die stationäre Phase nach Induktion der Bakterienkultur von *E. coli* K12 KS272/pTrxA-PA#1(600) sowie den gegenläufigen Trend der Glucosekonzentration im Medium, die mit Hilfe eines Blutzucker-Messgeräts (Accu-Chek Comfort, Roche Diagnostics) mit Teststäbchen erfolgte. a: Kultur zum Zeitpunkt der Induktion, b: Kultur nach 5,25 h Expression, c: Kultur zum Zeitpunkt der Ernte nach 6,25 h Expression. **(B)** SDS-PAGE-Analyse der Fermentation. Die Spuren a bis c stehen für dieselben Proben wie in (A); die Spuren d und e zeigen in unverdünnter und fünffach verdünnter Form den Zellextrakt mit löslichem Protein, der nach dem Zellaufschluss und der Konzentration über Querstromfiltration erhalten wurde. Trotz einer gewissen Basalexpression des *lacUV5*-Promotors bei Glucosemangel ist eine Steigerung der Proteinproduktion nach Induktion (Spuren b und c) deutlich erkennbar. Der Zellextrakt ist durch Hitzebehandlung bereits von einigen *E. coli*-Proteinen befreit (Spuren d und e). **(C)** SDS-PAGE der Ammoniumsulfat-Fällung. Spur f: Präzipitat bei 10 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, g: Präzipitat bei 20 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, h: Präzipitat bei 25 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, i: Überstand nach der Fällung. Bereits bei einer geringen Ammoniumsulfat-Konzentration fällt das Fusionsprotein annähernd quantitativ aus, wobei der Anteil an *E. coli*-Proteinen reduziert wird. **(D)** AEX-Chromatogramm zur Reinigung des Fusionsproteins. In einem flachen NaCl-Gradienten eluiert das Zielprotein früher von der Säule als die Wirtszellproteine. **(E)** SDS-PAGE der AEX-Reinigung. Spur f: Zum Probenauftrag resolubilisiertes Präzipitat aus der vorhergehenden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung, j: Durchlauf der Säule. Das PAS-Fusionsprotein bindet vollständig an die Säule und kann in hochreiner Form unter Abtrennung von Proteinspezies niedrigeren Molekulargewichts eluiert werden. Die Spuren 12 bis 14 zeigen Fusionsproteine mit verkürzter PAS-Polypeptid-Sequenz, die durch vorzeitige Translationsabbrüche während der Proteinbiosynthese oder proteolytischen Abbau nach der Biosynthese entstanden sein können. **(F)** AEX-Chromatogramm nach der präparativen hydrolytischen Spaltung des Fusionsproteins durch BrCN und **(G)** SDS-PAGE-Analyse des Spaltansatzes. k: Intaktes Fusionsprotein vor der Spaltung, l: Spaltansatz nach Inkubation über Nacht, m: Durchlauf der Chromatographie, n: Eluat von der Säule. Die starke Absorption bei 225 nm (schwarz) und das Fehlen einer Absorption bei 280 nm (grün) im Chromatogramm weisen auf freies PAS-Polypeptid im Säulendurchlauf hin. Dies wird durch SDS-PAGE bestätigt, da die korrespondierende Spur m frei von mit Coomassie färbbarem Protein ist. Das Eluat n enthält in konzentrierter Form das abgespaltene TrxA und verbliebenes Fusionsprotein, die beide bei 280 nm detektiert werden können und durch Coomassie anfärbbar sind. **(H)** UV-Vis-Spektrum des PAS-Polypeptids. Die hohe Reinheit der Probe ist dadurch erwiesen, dass ausschließlich die charakteristische Absorption der Peptidbindung mit einem Maximum um 195 nm im Spektrum erkennbar ist und keine bei höheren Wellenlängen absorbierenden Komponenten auftreten. Die Probenkonzentration wurde bei der gestrichelt markierten Wellenlänge von 205 nm nach dem Verfahren von Scopes (Scopes, 1974) abgeschätzt. **(I)** Schema der Reinigungsstrategie für das freie PA#1(600)-Polypeptid aus dem Gesamtzellextrakt der 50 L-Fermentation.

So war das Kulturwachstum durch die Kohlenstoffquelle limitiert, um einer möglichen Übersäuerung des Zellstoffwechsels durch Glucoseüberschuss und der damit einhergehenden reduzierten Expressionseffizienz vorzubeugen. Das Glucose-Feed-Programm gewährleistete eine konstante Wachstumsrate der Kultur, allerdings konnte

die Basalexpression des *lacUV5*-Promotors auf dem Expressionsplasmid nicht durch einen ausreichenden Glucose-Gehalt im Medium unterdrückt werden, der stets unterhalb von 1 % (w/v) lag. Die zur pH-Regulierung verwendete Ammoniak-Lösung fungierte zugleich als Stickstoffquelle für die *E. coli*-Zellen. Während des gesamten Fermentationsprozesses wurden der pH-Wert bei 7,5 und die Temperatur bei 37 °C konstant gehalten. Die Sauerstoffsättigung der Kultur wurde durch konstante Druckluftzufuhr mit einer Flussrate von 25 L/min bei einem Überdruck von 0,1 bar aufrechterhalten. Nach etwa 27 h war eine Zelldichte von $OD_{550} \approx 45$ erreicht und die Kultivierungstemperatur wurde auf 30 °C gesenkt, bevor die Zellen mit IPTG induziert und für weitere 6 h kultiviert wurden. Der OD_{550} -Wert war zum Zeitpunkt der Ernte nicht weiter angestiegen.

Zum Gesamtzellaufschluss wurde die gesamte Kulturbrühe mit 1 mM des Proteaseinhibitors Dithiodipyridin versetzt und bei 180 bar durch einen Ariete-Hochdruck-Homogenisator gepumpt, bevor durch Hitzedenaturierung für 30 min bei 75 °C der Großteil an Wirtszellproteinen präzipitiert wurde. Durch zwei in Serie geschaltete Querstrom-Filtrationseinheiten wurde der Zellextrakt sterilfiltriert und konzentriert. Die Passage der 0,45 µm-Membran der ersten Einheit hatte die Abtrennung von Zelltrümmern und Proteinaggregaten zur Folge, woraufhin der geklärte Zellextrakt unter Konzentrierung des TrxA-PA#1(600)-Fusionsproteins durch die 10 kDa-Membran der zweiten Einheit stark eingengt wurde.

Zunächst wurde TrxA-PA#1(600) aus dem so vorbereiteten Zellextrakt mittels IMAC an Ni-Sepharose Fast Flow immobilisiert und durch Elution in einem Stufengradienten mit Konzentrationsstufen von 25, 55 und 100 mM Imidazol in der Fraktion mit 55 mM Imidazol angereichert. Diese chromatographische Reinigung stellte sich aufgrund der zu geringen Bindekapazität des Säulenmaterials als ineffizient heraus, wobei ein beträchtlicher Teil des Fusionsproteins in den Säulendurchlauf gelangte und die Elutionsfraktionen große Anteile unspezifisch gebundener Wirtszellproteine aufwiesen. Außerdem konnten die Spezies des Fusionsproteins mit verkürzten PAS-Polypeptiden nur unzureichend abgetrennt werden.

Daher wurde der konzentrierte Zellextrakt aus einer zweiten 50 L-Fermentation von TrxA-PA#1(600) an den Lehrstuhl für Biologische Chemie überführt, wo die weiteren Reinigungsschritte durch Ammoniumsulfat-Präzipitation und AEX-Chromatographie analog zu den Proteinpräparationen aus dem 8 L-Tischfermenter durchgeführt wurden. Die Gesamtausbeute aus der technischen 50 L-Fermentation wurde auf ungefähr 15 g

geschätzt. In der Abbildung 13 ist die Prozedur zur Herstellung isolierter PAS-Polypeptide am Beispiel der Sequenz PA#1(600) demonstriert.

3.1.7 SDS-Laufverhalten von PAS-Polypeptiden

Während PASylierte Proteine in der SDS-PAGE standardmäßig mit Coomassie R-250 angefärbt werden können, erwies sich diese Methode für freie PAS-Polypeptide als ungeeignet. Daher wurde eine Reihe von Färbemethoden für die SDS-PAGE auf ihre Eignung geprüft, freie PAS-Polypeptide durch Farbkomplexe sichtbar zu machen. Die Polypeptide sprachen nur auf die Bal₂-Färbung (Skoog, 1979; siehe Abschnitt 2.5.5) an, die fortan zu deren Nachweis in der SDS-PAGE herangezogen wurde.

Bei den mit den freien PAS-Polypeptiden getesteten Färbemethoden ist zwischen direkten und indirekten Färbungen zu unterscheiden. Direkte Verfahren wie die gängige Coomassie-Färbung (De St. Groth *et al.*, 1963), die Silber-Färbung (Heukeshoven & Dernick, 1985) und die Bal₂-Färbung (Skoog, 1979) führen zu einem sichtbaren Farbkomplex für die Probenbande vor einem entfärbten Hintergrund. Indirekte Methoden dagegen präzipitieren die freien Dodecylsulfat-Anionen im Gel als schwerlösliche Salze geeigneter Kationen und sorgen so für eine trübe Hintergrundfärbung, wohinegen die Proteinbanden das von ihnen koordinierte SDS vor Ausfällung schützen und daher klar bleiben. Beispiele hierfür sind die Kupfer-Färbung (Lee *et al.*, 1987), die Zink-Färbung (Ortiz *et al.*, 1992) und die Methoden mit Kaliumchlorid (Prussak *et al.*, 1989) oder Natriumacetat (Higgins & Dahmus, 1979).

Auch Nachweismethoden für Proteine in Lösung wurden mit freien PAS-Polypeptiden getestet. Weder die auf der Bindung von Coomassie beruhende Proteinbestimmung nach Bradford (1976) noch die Biuret-Methode zur Proteinfärbung (Gornall *et al.*, 1949) und die davon abgeleitete Methode nach Lowry *et al.* (1951) bzw. der Bicinchoninsäure-Assay (Smith *et al.*, 1985) führten zur nachweisbaren Bildung von Farbkomplexen. Im Vergleich zu Polypeptiden durchschnittlicher Zusammensetzung enthalten PAS-Sequenzen große Anteile an Säureimid-Bindungen mit der Iminosäure Prolin. Dies beeinträchtigte vermutlich die colorimetrischen Protein-Assays, die auf dem Nachweis durch Reduktion von Cu²⁺-Ionen bei gleichzeitiger Oxidation der Peptidbindung beruhen (Gornall *et al.*, 1949) und daher vorzugsweise mit Säureamid-Bindungen funktionieren.

Die PAS-IL-1Ra-Fusionsproteine (Abbildung 14A) und die zur Herstellung freier PAS-Polypeptide vorgesehenen TrxA-Fusionsproteine (Abbildung 14B) wurden zur vergleichenden Analyse auf 12 %ige SDS-Gele aufgetragen und durch Färbung mit

Coomassie sichtbar gemacht. Die isolierten PAS-Polypeptide wurden zusammen mit vier Amino-PEG-Polymeren eines Molekulargewichts von 10, 20, 30 und 40 kDa (NOF Corporation) aufgetragen und mit der Bal₂-Methode (Skoog, 1979) angefärbt (Abbildung 14C). Die optimale Gelzusammensetzung wurde durch Variation des Acrylamidgehalts und der Anteile von Trenn- und Sammelgel empirisch so bestimmt, dass alle untersuchten Proben auf demselben Gel zu sehen waren.

Der Vergleich der PAS-IL-1Ra-Fusionsproteine mit der nicht PASylierten Version zeigt ein charakteristisches Laufverhalten in der SDS-PAGE auf. Alle PASylierten Proteine migrieren bei einem unerwartet hohen apparenten Molekulargewicht, was durch deren ungewöhnlich niedrige elektrophoretische Mobilität hervorgerufen wird. Die im Vergleich zu durchschnittlichen Proteinen stark herabgesetzte Bindekapazität der hydrophilen PAS-Sequenzen für SDS bewirkt einen Mangel an negativen Ladungen pro Masseneinheit und erklärt das anomale Laufverhalten (Schlapschy *et al.*, 2013).

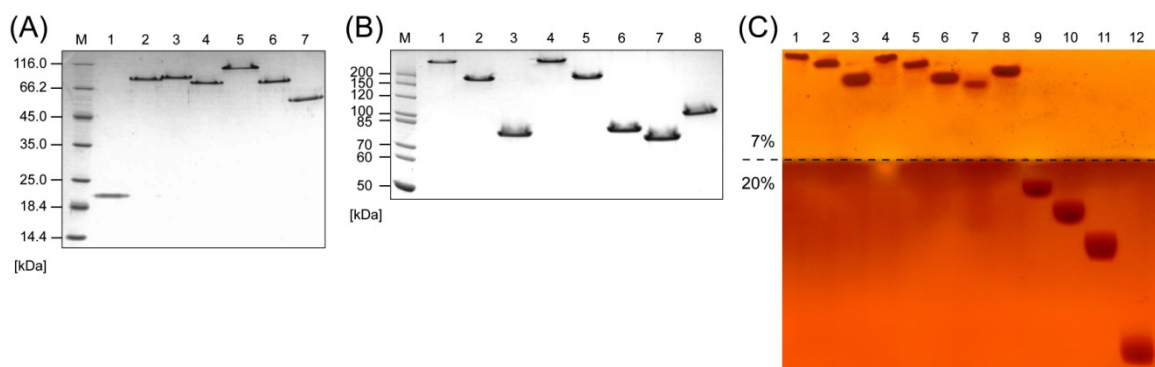


Abbildung 14: SDS-PAGE-Analyse der PAS-Sequenzen als Fusionsproteine und in Reinform. Die Spur M enthält den verwendeten Proteinmarker. **(A)** PAS-IL-1Ra-Fusionsproteine. Spur 1: IL-1Ra; 2: PAS#1(200)-IL-1Ra; 3: PA#1(200)-IL-1Ra; 4: P1A1P1A4(189)-IL-1Ra; 5: P1A1(200)-IL-1Ra; 6: P1A3(200)-IL-1Ra; 7: P1A5(198)-IL-1Ra. **(B)** TrxA-Fusionsproteine zur Präparation freier PAS-Polypeptide. Spur 1: TrxA(R117)-PAS#1(600); 2: TrxA(R117)-PAS#1(400); 3: TrxA(R117)-PAS#1(200); 4: TrxA-PA#1(600); 5: TrxA-PA#1(400); 6: TrxA-PA#1(200); 7: TrxA-P1A3(200); 8: TrxA-P1A1(200). **(C)** Bal₂-gefärbtes Gel mit freien PAS-Polypeptiden und PEG-Polymeren zum Vergleich. Das SDS-Gel besteht aus dem Sammelgel mit 7 % (w/v) Acrylamid und dem Trenngel mit 20 % (w/v) Acrylamid; die Grenze ist mit einer gestrichelten Linie angedeutet. Während die Laufgeschwindigkeit der PEG-Proben zwecks Detektion in einem engmaschigen SDS-Gelbereich verlangsamt werden musste, war die Mobilität der PAS-Polypeptide nur in dem großporigen Bereich ausreichend, um alle Polymer-Proben auf demselben Gel vergleichen zu können. Spur 1: PAS#1(600); 2: PAS#1(400); 3: PAS#1(200); 4: PA#1(600); 5: PA#1(400); 6: PA#1(200); 7: P1A3(200); 8: P1A1(200); 9: Amino-PEG(40 kDa); 10: Amino-PEG(30 kDa); 11: Amino-PEG(20 kDa); 12: Amino-PEG(10 kDa).

An den PAS-IL-1Ra- und TrxA-PAS-Fusionsproteinen waren sequenzabhängige Trends auszumachen. Die elektrophoretische Mobilität der TrxA-Fusionsproteine mit steigender

Länge der PAS-Polypeptidkette innerhalb jeweils einer PAS-Sequenz PAS#1 bzw. PA#1 verringert sich aufgrund des vergrößerten hydrodynamischen Volumens. Vergleicht man die verschiedenen Sequenztypen der gleichen Länge von etwa 200 AS, so entsteht der Eindruck, dass die SDS-Bindung eher vom Prolin-Gehalt der entsprechenden PAS-Sequenz bestimmt wird als vom Serin-Gehalt oder der Sequenzregularität. Das Konstrukt mit dem höchsten Prolin-Anteil, die P1A1-Sequenz, zeigt das schlechteste Laufverhalten, während das mit dem geringsten Prolin-Gehalt, das P1A5-Polypeptid, die höchste Mobilität mit sich bringt (siehe Abbildung 14C). Diese Befunde stimmen mit dem Bal₂-gefärbten Gel der freien PAS-Polypeptide und PEG-Proben überein, anhand dessen zudem deutlich wird, dass PEG in Reinform offenbar deutlich mehr SDS zu binden vermag als die PAS-Polypeptide mit ihrer nur sehr geringen Migrationsstrecke im Gel.

3.1.8 Löslichkeitseigenschaften von PAS-Polypeptiden

Die hydrophilen Eigenschaften der verschiedenen PAS-Polypeptide wurden im Vergleich zu den PEG-Polymeren mit Hilfe der *Reversed-Phase*-Chromatographie (RPC) an einer Polystyrol-Matrix untersucht (siehe Abschnitt 2.6.4). Zum spektroskopischen Nachweis der Amino-PEG-Polymere wurde davon zunächst jeweils 200 nmol der Polymere in 50 mM NaHCO₃ pH 8,0 mit 5/6-Carboxyfluorescein-NHS-Ester modifiziert. Aus dem Reaktionsgemisch wurde das PEG-Kopplungsprodukt mittels Gelfiltration an einer PD-10-Säule in 50 mM NaHCO₃ pH 8,0 abgetrennt.

Da die Kopplung mit dem hydrophoben Fluorescyl-Rest die Hydrophilie der PEG-Polymere vermutlich beeinflusste, wurden zum Vergleich die PA#1-Polypeptide mit einer Länge von 200, 400 und 600 AS auf die gleiche Weise an ihren N-terminalen Aminogruppen mit 5/6-Carboxyfluorescein markiert (je 2 mg Polypeptid).

Daraufhin wurden Probenmengen von jeweils 500 µg der fluoreszenzmarkierten Polypeptide und PEG-Polymere wie auch der PAS-IL-1Ra-Fusionsproteine auf 2 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) Ameisensäure eingestellt und nach Adsorption an eine Resource RPC-Säule mit 1 mL Bettvolumen in einem Gradienten von 2 bis 80 % (v/v) Acetonitril über 20 Säulenvolumina eluiert. Dies ist beispielhaft anhand des Polypeptids PA#1(600) in Abbildung 15 verdeutlicht; alle weiteren Daten sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

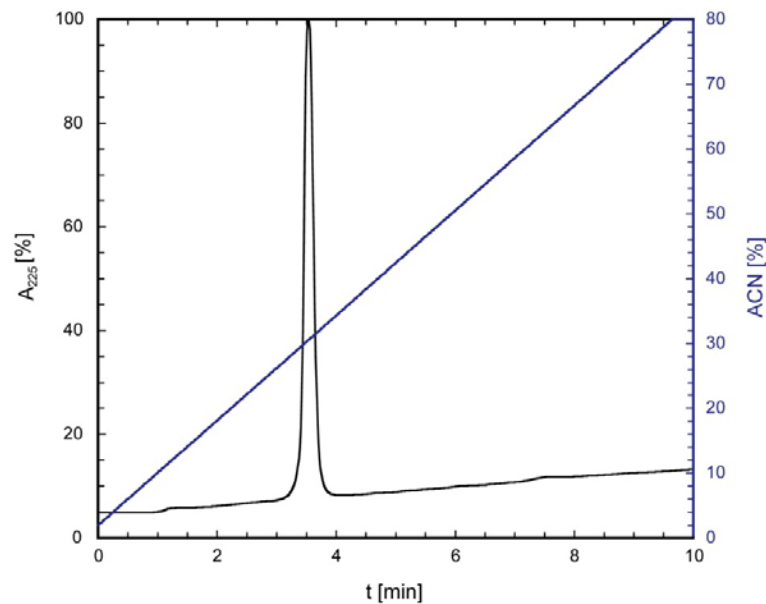


Abbildung 15: RPC-Analyse von PA#1(600) an Resource RPC. Das Bettvolumen der Säule betrug 1 mL, und es wurde ein Konzentrationsgradient von 2 bis 80 % (v/v) ACN (dargestellt in blauer Farbe) über 20 Säulenvolumina bei einer Flussrate von 2 mL/min angelegt. Die Polypeptide und Fusionsproteine erschienen als einzelne definierte Peaks im Chromatogramm, mit untereinander ähnlichen Retentionszeiten (siehe Tabelle 4).

Alle PAS-Polypeptide eluierten bei einer ACN-Konzentration um 30 % (v/v) mit der kürzesten Retentionszeit von der RPC-Säule. Darauf folgten die IL-1Ra-Proteine bei etwa 40 % (v/v) und schließlich erst die PEG-Polymere bei etwa 50 % (v/v) ACN. Je länger die Retentionszeit an der Säule und je mehr ACN zur Elution erforderlich ist, desto stärker ist der hydrophobe Charakter einer Substanz ausgeprägt, welcher für die Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial verantwortlich ist.

Die Hydrophilie des IL-1Ra-Proteins blieb nach der PASylierung für alle hier untersuchten Sequenzen außer P1A5 praktisch unverändert. Letztere vermittelte signifikant erhöhte Hydrophobie. Da IL-1Ra als gut lösliches hydrophiles Protein bekannt ist, weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die PAS-Polypeptide die polaren Eigenschaften des Fusionspartners nicht nachweisbar beeinträchtigen. Zudem führten die hier gewonnenen Messwerte vor Augen, dass keine signifikanten Unterschiede in den polaren Eigenschaften zwischen PAS#1- und PA#1-Polypeptiden bestehen. Die hohe Hydrophilie der PAS-Sequenzen rührt also nicht von den Serin-Seitenketten, sondern ausschließlich vom Peptidrückgrat her (Schlapschy *et al.*, 2013).

Tabelle 4: Hydrophobe Wechselwirkungen von PAS-Polypeptiden im Vergleich zu PEG mit einer Polystyrolmatrix in der RPC. Die RPC-Chromatographie erfolgte an Resource RPC (1 mL Bettvolumen) mit einem ACN-Gradienten von 2 bis 80 % (v/v) über 20 Säulenvolumina bei einer Flussrate von 2 mL/min. Der durch Fluorescein-Markierung der PA#1-Polypeptide hervorgerufene Unterschied in der Retentionszeit im Vergleich zum jeweiligen freien Polypeptid ist als Δt in Klammern angegeben.

Konstrukt	Retentionszeit [min]	ACN-Gehalt bei Elution [%]	Prolin-Gehalt [%]
IL-1Ra	4.46	38.04	–
PAS#1(200)-IL-1Ra	4.53	38.58	35
PA#1(200)-IL-1Ra	4.43	37.80	35
P1A1P1A4(189)-IL-1Ra	4.45	37.96	28.6
P1A1(200)-IL-1Ra	4.56	38.74	50
P1A3(200)-IL-1Ra	4.44	37.80	25
P1A5(198)-IL-1Ra	5.22	43.81	16.7
PAS#1(200)	3.27	28.36	35
PAS#1(400)	3.37	29.14	35
PAS#1(600)	3.54	30.55	35
PA#1(200)	3.31	28.68	35
PA#1(400)	3.48	30.16	35
PA#1(600)	3.55	30.56	35
P1A3(200)	3.27	28.36	25
P1A1(200)	3.37	29.14	50
Fluorescein-PA#1(200)	3.94 ($\Delta = 0.63$)	33.75	35
Fluorescein-PA#1(400)	3.93 ($\Delta = 0.45$)	33.67	35
Fluorescein-PA#1(600)	3.91 ($\Delta = 0.36$)	33.43	35
Fluorescein-PEG(10000)	5.49	47.32	–
Fluorescein-PEG(20000)	5.71	48.18	–
Fluorescein-PEG(30000)	5.82	48.96	–
Fluorescein-PEG(40000)	5.89	49.50	–

Die Retentionszeit an der RPC-Säule nahm mit der Kettenlänge aller analysierten Polymere nur geringfügig zu. Bemerkenswerterweise zeigten die PEG-Spezies viel stärkere hydrophobe Interaktionen als die PAS-Polypeptide. Um den hydrophoben Beitrag der zum chromatographischen Nachweis notwendigen Fluorescein-Markierung der PEG-Polymere zu bewerten, wurden auch mit Fluorescein gekoppelte PA#1-Polypeptide analysiert. So konnte nachgewiesen werden, dass die Anwesenheit eines Fluorescein-Rests generell die Hydrophobie des Polymerkonjugats erhöht, was sich in einer Verlängerung der Retentionszeit um 19 % für PA#1(200), um 13 % für PA#1(400) und um 10 % für PA#1(600) äußerte. Hierbei wurde deutlich, dass mit steigender PAS-Kettenlänge der vom Fluorescein stammende (konstante) Beitrag zur Hydrophobie zunehmend kompensiert wurde. Die Kopplung von Fluorescein an längere PA#1-Polypeptide führte sogar zu einer leichten Verkürzung der Retentionszeit im Vergleich zum PA#1(200)-Konjugat, und zwar um 0,3 % für PA#1(400) bzw. 0,5 % für PA#1(600), was auf den hydrophilen Beitrag der PA#1-Polypeptidkette hinweist. Die erstaunlich langen Retentionszeiten der PEG-Polymere sind nicht auf den hydrophoben Fluorescein-Rest zurückzuführen, der ja auch in den PA#1-Konjugaten vorlag. Das Fluorescein-

PEG(30 kDa)-Konjugat zeigte beispielsweise eine um 34 % längere Retentionszeit an der RPC-Säule als das Fluorescein-markierte PA#1(400)-Polypeptid mit vergleichbarer Molekülmasse. Vielmehr ist der Hauptteil der Hydrophobie der Fluorescein-PEG-Konjugate dem PEG-Polymer zuzuordnen, was sich auch in der Beobachtung bemerkbar machte, dass eine Verlängerung der PEG-Polymere erhöhte Retentionszeiten der entsprechenden PEG-Konjugate zur Folge hatte. Die Retentionszeiten wurden ausgehend vom PEG(10 kDa)-Konjugat schrittweise um 4 % für Fluorescyl-PEG(20 kDa), 1,9 % für Fluorescyl-PEG(30 kDa) und 1,2 % für Fluorescyl-PEG(40 kDa) verlängert. Auch wenn mit steigender PEG-Kettenlänge die relative Erhöhung des hydrophoben Charakters der PEG-Konjugate weniger deutlich ausgeprägt war, war dennoch die eindeutige Verstärkung der Gesamthydrophobie festzustellen.

Im nächsten Schritt wurde die Löslichkeit von PAS-Polypeptiden in verschiedenen organischen Lösungsmitteln mit dem Ziel charakterisiert, geeignete aprotische Lösemittel für chemische Kopplungsreaktionen zu finden (siehe Abschnitt 2.6.5). Hierzu wurden lyophilisierte Proben von je 1 mg PA#1(200) bei Raumtemperatur in 200 μ L des jeweiligen Lösungsmittels aufgenommen, so dass sich eine Konzentration von 5 mg/mL einstellte. In Dimethylsulfoxid (DMSO) löste sich das Lyophilisat ebenso schnell und vollständig wie in destilliertem H₂O. Auch in DMSO mit einem Gehalt von 50 % (v/v) Acetonitril (ACN) ließ sich das Polypeptid in Lösung bringen, während reines ACN als Lösungsmittel ungeeignet war. Als zweites geeignetes organisches Lösungsmittel erwies sich Dimethylformamid (DMF), in dem sich das PA#1-Lyophilisat bei Raumtemperatur zwar nur langsam löste, was aber bei Erwärmen auf 50 °C in wenigen Minuten vervollständigt war. Das Polypeptid zeigte sogar eine Löslichkeit von mindestens 10 mg/mL in DMF. Dahingegen versagten Dioxan und Tetramethylharnstoff als Lösungsmittel für das PA#1-Polypeptid. Auch gegenüber teilpolaren organischen Lösungsmitteln wie Ethanol und auch Aceton zeigte das Polypeptid keine Löslichkeit. Die vollständige Präzipitation von PA#1-Polypeptiden aus organischen Lösungsmitteln war – in Analogie zu PEG (Harris *et al.*, 1984) – durch Zusatz von 3:1 (v/v) eiskaltem Diethylether möglich.

Um die Effizienz des Reinigungsprozesses für zur Spaltung vorgesehene PAS-Fusionsproteine mit TrxA bzw. SUMO zu erhöhen, wurde anhand verschiedener Fusionsproteine nach einer geeigneten Fällungsmethode aus wässriger Lösung gesucht, welche deren gezielte Isolierung in konzentrierter Form ermöglichen sollte. Hierbei wurden vor allem Methoden getestet, die auf der Fällung durch organische Lösungsmittel beruhten, in welchen sich das PA#1(200)-Polypeptid unlöslich gezeigt hatte.

Zunächst wurde SUMO-PA#1(200) (12,1 mg/mL in 100 mM NH_4HCO_3 pH 8,5) der Methanol/Chloroform-Fällung nach Wessel & Flügge (1984) auf Eis unterzogen (siehe Abschnitt 2.6.5). Bei dieser Fällungsmethode dient Methanol als Vermittler zwischen der wässrigen Phase und der organischen Chloroform-Phase, wobei das Protein durch Kontakt mit Chloroform chemisch denaturiert und aggregiert, was die Isolierung als deutlich sichtbares Protein-Sediment mittels Zentrifugation ermöglicht. Das SUMO-PA#1(200)-Fusionsprotein schied sich zwar wie gewünscht beim ersten Schritt der Fällungsmethode an der Grenzfläche der beiden Phasen ab, ließ sich im zweiten Schritt aber nicht mit Methanol in die Chloroform-Phase extrahieren und sedimentieren, sondern schamm oben auf der organischen Phase auf, was die Isolierung erschwerte. Das Fusionsprotein erwies sich als völlig unlöslich in dem organischen Lösungsmittelgemisch, vermutlich aufgrund seiner ausgeprägten Hydrophilie, die wie oben beschrieben zumindest teilweise von der PA#1-Polypeptidsequenz stammt.

Das Fusionsprotein TrxA-PA#1(600) (0,5 mg/mL in PBS) wurde versuchsweise unter Kühlung auf Eis mit gängigen Fällungsreagenzien auf Säuregrundlage versetzt, welche zur Präzipitation von Proteinen infolge saurer Denaturierung gebräuchlich sind (Scopes, 1994). Weder der Zusatz von Trichloressigsäure bis zu 13 % der Sättigungskonzentration (70 % (w/v)) noch das Ansäuern mit 10 % (w/v) konz. HCl konnten die Präzipitation des PASylierten Proteins induzieren. Die lange PA#1(600)-Polypeptidsequenz stabilisierte offenbar das TrxA-Fusionsprotein in Lösung. Dagegen gelang durch Zugabe von 4:1 (v/v) des organischen Lösemittels Aceton und zweistündige Inkubation bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ die vollständige Fällung des Fusionsproteins. Das war zu erwarten, nachdem das PA#1(200)-Polypeptid wie oben beschrieben völlig unlöslich in Aceton war.

Als effizienter Reinigungsschritt der zur Spaltung vorgesehenen PAS-Fusionsproteine mit TrxA bzw. SUMO erwies sich letztendlich die Ammoniumsulfat-Fällung (siehe Abschnitt 2.5.1). Aus dem Gesamtzellextrakt von *E. coli* in 40 mM NaP_i pH 7,5, 500 mM NaCl konnten die Fusionsproteine (etwa 10 mg/mL) bei ungefähr 20 % der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigungskonzentration bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ präzipitiert werden. Geringere Konzentrationen der PAS-Fusionsproteine um 1 mg/mL erforderten eine höhere Ammoniumsulfat-Konzentration von etwa 40 % der Sättigungskonzentration.

Um den Einfluss der Temperatur auf die Löslichkeit von PAS-Polypeptiden in wässrigem Puffer zu untersuchen, wurden Trübungsmessungen von P/A-Polypeptiden durchgeführt (siehe Abschnitt 2.6.5). Polymere in Lösung zeichnen sich üblicherweise durch kritische Lösungstemperaturen aus, bei denen eine Phasentrennung zu beobachten ist. Oberhalb

der unteren (LCST) und unterhalb der oberen kritischen Lösungstemperatur (UCST) liegen zwei Phasen vor. Die kritischen Lösungstemperaturen sind von der Art, Kettenlänge und Konzentration des Polymers sowie dem Lösemittel abhängig (Seuring & Agarwal, 2012b). Die beginnende Phasentrennung kann anhand der optischen Dichte bei 600 nm in einem Photometer verfolgt werden (Exler *et al.*, 2007).

Die Turbiditätsmessungen wurden mit PA#1(200) und PA#1(600) (jeweils 5 mg/mL) in 20 mM Tris/HCl pH 9,5 vorgenommen. Die Polypeptide wurden dazu in einem UV/Vis-Spektrometer mit 1 °C/min Heizrate von 10 auf 90 °C erhitzt. Während des gesamten Heizvorgangs wurden UV/Vis-Spektren im Wellenlängenbereich von 200 bis 1000 nm aufgenommen, ohne dass Veränderungen in der Absorption festgestellt werden konnten. Die möglicherweise einsetzende Phasentrennung hätte zu einer signifikanten Extinktion bei 600 nm aufgrund von Lichtstreuung führen sollen. Für PEG-Polymere von 3 bis 600 kDa werden bis zu einer Konzentration von 500 mg/mL untere und obere kritische Lösungstemperaturen über 100 °C ($0^{\circ}\text{C} < 100^{\circ}\text{C} < \text{LCST} < \text{UCST}$) angegeben (Seuring & Agarwal, 2012a; Bae *et al.*, 1991), was bedeutet, dass für PEG keine Phasentrennung bei gewöhnlichen Temperaturen unterhalb von 100 °C erfolgt. Anhand der Messergebnisse ist zu erwarten, dass auch die PAS-Polypeptide bis zu hohen Konzentrationen im Temperaturbereich von 10 bis 90 °C vollständig löslich sind. Aufgrund dieser Turbiditätsmessungen konnte die Beeinträchtigung geplanter CD- und DLS-Experimente der PAS-Polypeptide durch reduzierte Löslichkeit bei erhöhten Temperaturen ausgeschlossen werden.

3.1.9 Konformationsanalysen von PAS-Polypeptiden

Mittels CD-Spektroskopie wurden die konformationellen Eigenschaften und gegebenenfalls ausgebildete Sekundärstrukturen der PAS-Polypeptide untersucht (siehe Abschnitt 2.6.6). Von Proben des nicht PASylierten IL-1Ra, der IL-1Ra-Fusionsproteine sowie der freien PAS-Polypeptide in 5 mM KP_i pH 7,5, 50 mM K_2SO_4 wurden mittels eines CD-Spectropolarimeters bei 20 °C Fern-UV-CD-Spektren im Bereich 190 bis 250 nm aufgenommen. Die erhaltenen Spektren wurden mit Hilfe der Geräte-Software Spectra Manager 1.00.00 jeweils auf die molare Elliptizität Θ_M normiert. Durch Subtraktion des IL-1Ra-Spektrums von den Spektren der IL-1Ra-PAS-Fusionsproteine wurden Differenzspektren erhalten, die nur die strukturellen Charakteristika der entsprechenden PAS-Polypeptide widerspiegeln.

Die CD-Spektren aller PAS-Polypeptide wiesen ein charakteristisches, stark ausgeprägtes Minimum um 200 nm und kein Maximum im Bereich von 210 bis 235 nm auf,

wie es für die *Random-Coil*-Modellpeptide Poly-L-Glutaminsäure und Poly-L-Lysin bei 195 nm bestimmt wurde (Tiffany & Krimm, 1969). Ein derartiges CD-Maximum scheint kein notwendiges Kriterium für die *Random-Coil*-Konformation von Polypeptiden zu sein. Die CD-Signalintensität innerhalb einer Polypeptidsequenz war proportional zur Anzahl der Peptidbindungen und damit zur Kettenlänge, wie die Spektren der PAS#1- und PA#1-Polypeptide unterschiedlicher Länge zeigten (Abbildung 16B und Tabelle 5).

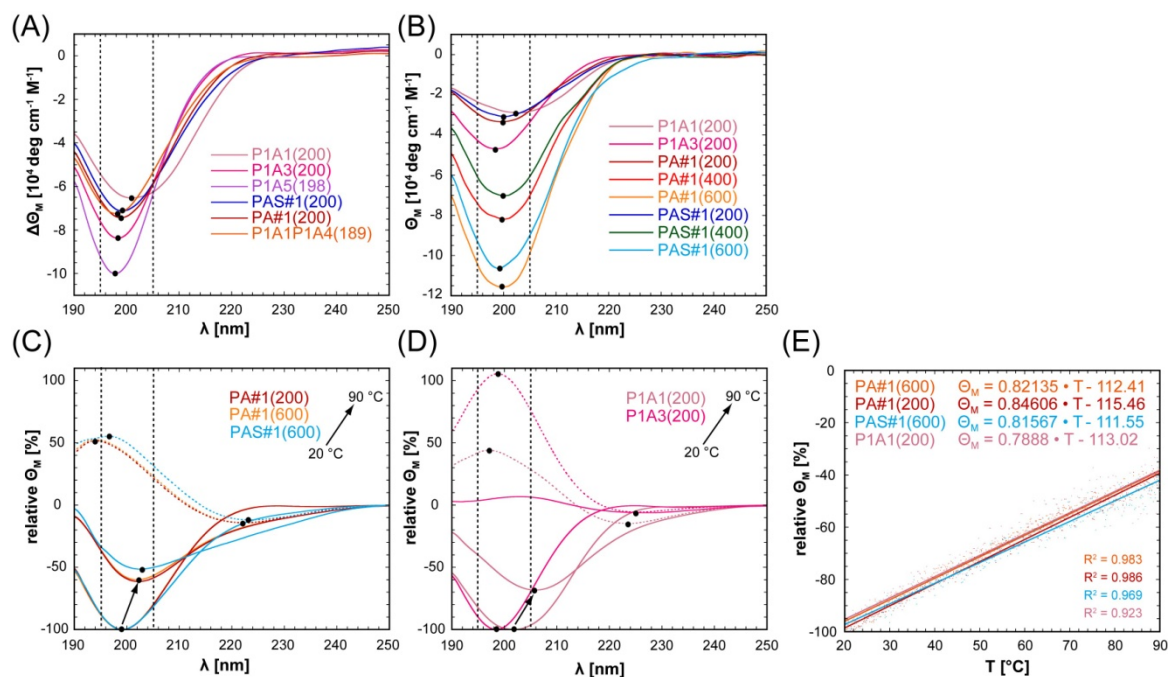


Abbildung 16: CD-Spektren und Strukturübergänge der PAS-Polypeptide. Die Spektren der PAS#1-Polypeptide verschiedener Länge sind in bläulichen Farbtönen wiedergegeben, die Spektren der unterschiedlichen P/A-Polypeptide im rötlichen Farbbereich. Die charakteristischen Wellenlängen 195 (*Random Coil*) und 205 nm (PPII-Helix) sind gestrichelt angezeigt, Minima und Maxima mit schwarzen Punkten markiert. **(A)** Differenzspektren aus der Subtraktion des IL-1Ra-Spektrums von den entsprechenden CD-Spektren der PASylierten Fusionsproteine. **(B)** CD-Spektren der gereinigten freien PAS-Polypeptide. **(C)** und **(D)** CD-Spektren ausgewählter PAS-Polypeptide bei jeweils 20 und 90 °C (durchgezogene Linien) sowie Differenzspektren (gestrichelte Linien) aus der Subtraktion des 90 °C-Spektrums vom 20 °C-Spektrum. Pfeile indizieren die durch Erhitzung verursachte Verschiebung der spektralen Minima. **(E)** Relative Änderung der molaren Elliptizität für ausgewählte Polypeptide, gemessen bei einer Wellenlänge von 195 nm und einem Temperaturgradienten von 1 °C/min von 20 bis 90 °C. Gezeigt ist jeweils eine lineare Regression durch die Datenpunkte.

Die Differenzspektren der PASylierten IL-1Ra-Varianten (Abbildung 16A) zeigten ebenso wie die Spektren der freien PAS-Polypeptide (Abbildung 16B) für die vier Polypeptide PAS#1(200), PA#1(200), P1A1P1A4(189) und P1A3(200) mit ungefähr gleichem Prolin-Gehalt fast identische CD-Spektren (vergleiche Tabelle 5). Daraus lässt sich schließen,

dass der Prolin-Gehalt der PAS-Sequenzen für die ausgebildete Sekundärstruktur maßgeblich ist.

Von P1A1 über P1A3 zu P1A5 nahmen die ungeordneten *Random-Coil*-Strukturanteile zu, wobei die Signalminima in Richtung des charakteristischen *Random-Coil*-Minimums um 195 nm verschoben wurden (Tiffany & Krimm, 1969). Das verbreiterte Minimum für P1A1 mit einer Verschiebung hin zu 205 nm zeigte Ähnlichkeiten zu einer Polyprolin(II)-Helix-Struktur (PPII; Kakinoki *et al.*, 2005).

Tabelle 5: Lokalisierung der charakteristischen Minima von CD-Spektren der PAS-Polypeptide. Aufgeführt sind Angaben für freie Polypeptide sowie aus Differenzspektren von PAS-IL-1Ra-Fusionsproteinen ($\Delta\Theta_M$).

Polypeptid		λ_{\min} [nm]	Θ_M [$10^4 \text{ deg M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]	Prolin-Gehalt [%]
PAS#1(200)	(frei)	200.1	-3.077	35
PAS#1(400)	(frei)	200.2	-7.018	35
PAS#1(600)	(frei)	199.7	-11.676	35
PA#1(200)	(frei)	199.6	-3.336	35
PA#1(400)	(frei)	199.4	-8.189	35
PA#1(600)	(frei)	199.7	-11.567	35
P1A3(200)	(frei)	198.7	-3.341	25
P1A1(200)	(frei)	202.6	-2.893	50
PAS#1(200)	($\Delta\Theta_M$)	199.4	-7.122	35
PA#1(200)	($\Delta\Theta_M$)	199.3	-7.431	35
P1A1P1A4(189)	($\Delta\Theta_M$)	198.0	-7.239	28.6
P1A5(198)	($\Delta\Theta_M$)	197.9	-10.003	16.6
P1A3(200)	($\Delta\Theta_M$)	198.4	-8.376	25
P1A1(200)	($\Delta\Theta_M$)	201.7	-6.515	50

Da native Proteinstrukturen bekannterweise bei Erwärmung denaturieren, wurde der Einfluss erhöhter Temperaturen auf die CD-spektroskopischen Charakteristika von PAS-Polypeptiden studiert. Die Temperatur der Proben wurde mittels eines Peltier-Elements kontrolliert, wobei zuerst CD-Spektren des Polypeptids PA#1(600) bei 20 °C und 90 °C aufgenommen wurden, deren Differenzspektrum ein Maximum bei 195 nm aufwies. Die Änderung der CD-Signalintensität wurde also bei dieser Wellenlänge beobachtet, während PA#1(600) in einem Temperaturgradienten von 1 °C/min von 20 auf 90 °C erhitzt wurde. Dasselbe Vorgehen erfolgte auch mit einem flacheren Temperaturgradienten von 0,5 °C/min, damit die Beteiligung von *cis/trans*-Isomerisierungen der Prolyl-Peptidbindungen an den beobachteten Konformationsänderungen besser beurteilt

werden konnte. Die unkatalysierte *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Bindungen läuft nämlich nur langsam mit einer Halbwertszeit von etwa 1 min bei 25 °C ab (Creighton, 1992). Um Aussagen über die Reversibilität der im Temperaturgradienten beobachteten spektralen Veränderungen für PA#1(600) treffen zu können, wurde die Temperatur der Probe nach Erreichen von 90 °C wieder auf die Ausgangstemperatur 20 °C abgesenkt, wobei der jeweils zur Erhitzung verwendete Temperaturgradient und die Beobachtung des CD-Signals bei 195 nm fortgesetzt wurden. Auch die Polypeptide PAS#1(600), PA#1(200), P1A1(200) und P1A3(200) wurden im CD-Spectropolarimeter unter Verfolgung der CD-Absorptionsintensität bei 195 nm mit 1 °C min von 20 auf 90 °C erhitzt und wieder zurück auf 20 °C abgekühlt mit dem Ziel, Abhängigkeiten der Konformationsänderungen von der Art der Polypeptid-Sequenz und der Kettenlänge zu charakterisieren.

Zumal die signifikantesten Veränderungen in den CD-Spektren der PAS-Polypeptide bei 195 nm zu erwarten waren, wurde auf den Zusatz von Salzen und Denaturierungsmitteln wie Harnstoff oder Guanidiniumchlorid zur Induktion konformationeller Veränderungen verzichtet. Die starke Eigenabsorption dieser Verbindungen im Fern-UV-Bereich verhinderte nämlich die Detektion der konformationsspezifischen Änderungen in den CD-Spektren von PAS-Polypeptiden im Bereich um 200 nm.

Zur Auswertung der Messdaten wurden für jedes Polypeptid das CD-Spektrum bei 20 °C, 90 °C sowie das Differenzspektrum aus diesen beiden auf die maximale Signalintensität des 20 °C-Spektrums normiert, was für alle Polypeptide unabhängig von der Kettenlänge und absoluten Signalintensität den direkten Vergleich der relativen Veränderungen mit der Temperaturerhöhung ermöglichte (siehe Abbildung 16C). Auch die bei 195 nm im Temperaturgradienten ermittelten CD-Signale wurden jeweils auf die maximale Signalintensität bei 20 °C normiert, und die relativen molaren Elliptizitäten wurden gegen die Temperatur aufgetragen. Die Abhängigkeit der Elliptizitätswerte von der Temperatur war linear und wurde mit Hilfe von Geraden veranschaulicht, die durch die Datenwerte gelegt wurden (siehe Abbildung 16E).

Mit Ausnahme von P1A3(200) zeigten die CD-Spektren aller untersuchten PAS-Polypeptide bei Erwärmung auf 90 °C eine Verschiebung des charakteristischen Minimums nahe 200 nm zu höheren Wellenlängen in Richtung des charakteristischen PPII-Minimums bei 205 nm (Kakinoki *et al.*, 2005) unter Verminderung der Signalintensität (Abbildungen 16C und D). Die Differenzspektren aus den Spektren bei 20 und 90 °C ähnelten invertierten *Random-Coil*-Spektren und illustrierten so den partiellen Verlust an dieser Strukturform bei Erhitzen. Interessanterweise war der relative Verlust

an *Random-Coil*-Strukturanteilen unabhängig von der Kettenlänge und vom Prolin-Gehalt der PAS-Sequenz; selbst das P1A1(200)-Polypeptid, welches bereits bei Raumtemperatur deutlich erkennbare PPII-Strukturanteile aufwies, erfuhr eine Verschiebung des charakteristischen CD-Minimums hin zu 205 nm und eine mit den PAS#1- und PA#1-Sequenzen vergleichbare Reduzierung der Signalintensität (vergleiche Tabelle 6). Als einziges Polypeptid während des Erwärmungsprozesses aggregierte P1A3(200) irreversibel und ergab ein CD-Spektrum mit einem Maximum um 200 und einem Minimum um 225 nm, das auf β -Schleifen (Bush *et al.*, 1978) hinweisen könnte.

Tabelle 6: Effekt der Temperaturerhöhung auf die CD-Charakteristika von PAS-Polypeptiden. Die Position von Minima und Maxima ist für die Spektren bei 20 °C und 90 °C und auch für die Differenzspektren (ΔT) angegeben, die durch Subtraktion des 90 °C-Spektrums vom 20 °C-Spektrum erhalten wurden. Bei Erwärmung wurde anhand der Verschiebung der charakteristischen Minima in Richtung von 205 nm eine leichte Verminderung des *Random-Coil*-Charakters zugunsten des PPII-Charakters deutlich; die Differenzspektren entsprechen dem Verlust an *Random-Coil*-Strukturanteilen mit charakteristischen Intensitätsmaxima um 195 und 225 nm.

Polypeptid	PAS#1(600)	PA#1(600)	PA#1(200)	P1A1(200)	P1A3(200)
$\lambda_{\min}(20\text{ °C})$ [nm]	199.1	199.1	199.2	201.8	198.5
$\lambda_{\min}(90\text{ °C})$ [nm]	202.7	202.0	202.2	205.9	-
$\lambda_{\min}(\Delta T)$ [nm]	196.5	193.9	194.1	197.0	198.7
$\lambda_{\max}(\Delta T)$ [nm]	223.4	222.4	222.3	223.7	225.7

Die im Temperaturgradienten beobachteten Konformationsänderungen der PAS-Polypeptide, welche anhand des CD-Signals bei 195 nm verfolgt wurden, waren für beide Gradienten (1 und 0,5 °C/min) identisch und vollkommen reversibel, weshalb in Abbildung 16E nur der Gradient mit einer Heizrate von 1 °C/min von 20 bis 90 °C dargestellt ist. Das negative Signal der relativen molaren Elliptizität bei 195 nm, wo auch das charakteristische CD-Minimum der *Random-Coil*-Struktur liegt (Tiffany & Krimm, 1969), wurde für PAS#1(600), PA#1(600), PA#1(200) und P1A1(200) bei Wärmezufuhr linear um denselben Betrag abgeschwächt. Das bedeutet, dass die Konformationsänderungen mit steigender Temperatur weder von der Kettenlänge noch vom Prolin-Anteil der Polypeptide beeinflusst wurden, sofern der Prolin-Gehalt nicht – wie bei der P1A3-Sequenz – unterhalb dem der klassischen PAS-Sequenzen (35 % Pro) lag. Die Unabhängigkeit der Konformationsänderungen von der Heizrate weist darauf hin, dass zumindest in den PPII-Segmenten mit *trans*-Prolyl-Peptidbindungen vermutlich keine *cis/trans*-Isomerisierungen der Prolyl-Peptidbindungen involviert waren, da diese mit einer Halbwertszeit um 1 min als geschwindigkeitsbestimmender Schritt die strukturellen

Übergangsprozesse derart limitieren müssten, dass kein direktes lineares Ansprechverhalten auf die Temperatur feststellbar wäre.

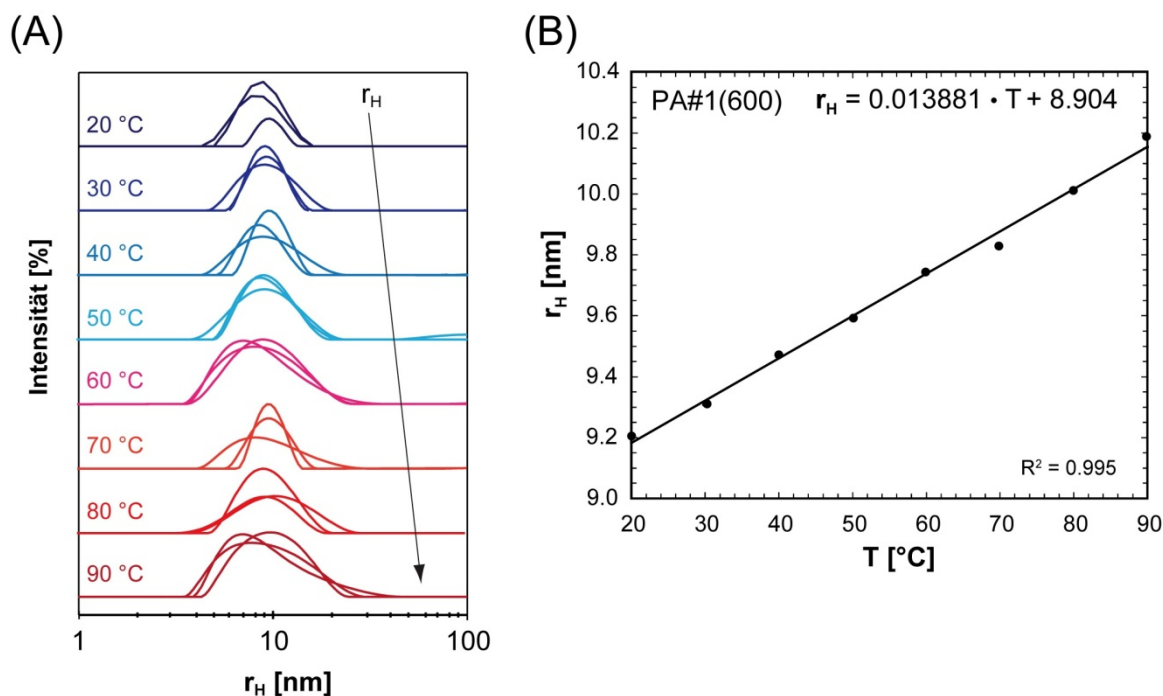


Abbildung 17: Änderung des hydrodynamischen Radius von PA#1(600) mit der Temperatur. Die DLS-Messungen erfolgten bei einer Probenkonzentration von 1 mg/mL in 5 mM KP_i pH 7,5, 50 mM K_2SO_4 mit Hilfe eines Zetasizer Nano-S-Geräts. **(A)** DLS-Korrelogramme von PA#1(600) bei verschiedenen Temperaturen, angedeutet durch Farbabstufungen von dunkelblau (20 °C) nach dunkelrot (90 °C). Der hydrodynamische Radius wurde jeweils in Dreifachbestimmung ermittelt und erhöhte sich mit steigender Temperatur. **(B)** Auftragung des durch DLS-Messungen bestimmten hydrodynamischen Radius (Mittelwerte aus der Dreifachbestimmung) von PA#1(600) gegen die Temperatur mit Ausgleichsgerade durch lineare Regression.

Um den in der CD-Spektroskopie beobachteten thermisch induzierten Strukturübergang der PAS-Polypeptide zu einer verstärkten PPII-Konformation mit den erwarteten veränderten Moleküldimensionen in Beziehung zu setzen, wurden am Beispiel von PA#1(600) DLS-Messungen in 5 mM KP_i pH 7,5, 50 mM K_2SO_4 bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt (siehe Abschnitt 2.6.3). Die Proben wurden in 10 °C-Schritten von 20 auf 90 °C erhitzt, wobei bei jeder Temperatur nach 5 min Äquilibrierungsdauer der hydrodynamische Radius mit Dreifachbestimmung gemessen wurde. Die Erwärmung von PA#1(600) korrelierte linear mit der Vergrößerung des beobachteten hydrodynamischen Radius (Abbildung 17), was mit der in der CD-Spektroskopie beobachteten Erhöhung des Anteils an elongierten PPII-Strukturelementen gut im Einklang steht.

3.1.10 Hydrodynamische Charakterisierung von PAS-Polypeptiden

Mit Hilfe der Mikroviskosimetrie wurden wichtige hydrodynamische Kenngrößen der untersuchten Biopolymere bestimmt (siehe Abschnitt 2.6.2). Die PAS- und PEG-Proben zur viskosimetrischen Charakterisierung wurden in Puffern geringer Ionenstärke vorbereitet, um die hydrodynamischen Eigenschaften in wässriger Lösung möglichst unbeeinflusst von weiteren Substanzen bewerten zu können. Dazu wurden die PAS-Polypeptide direkt nach der subtraktiven AEX-Reinigung aus den Spaltungsansätzen der TrxA-Fusionsproteine in 20 mM Tris/HCl pH 9,5 mit Hilfe von Konzentrationseinheiten einer Ausschlussgröße von 3 bzw. 10 kDa bis auf über 100 mg/mL konzentriert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde durch sequentielle 1:10-Verdünnung jeweils eine 1:10000-Verdünnung der konzentrierten PAS-Polypeptid-Lösungen in 5 mM KPi pH 7,5, 50 mM K_2SO_4 hergestellt (siehe Abschnitt 2.5.7). Die Polypeptid-Konzentration wurde dann anhand der Absorption bei 205 nm ermittelt (Scopes, 1974). Die kommerziell bezogenen synthetischen Amino-PEG-Polymere wurden direkt als Feststoffe in 50 mM NaHCO_3 pH = 8,0 gelöst, um die gewünschten Konzentrationen über 100 mg/mL zu erreichen. Von jedem Polymer wurde eine Verdünnungsreihe von 1 bis 100 mg/mL in seinem entsprechenden Puffer hergestellt. Aufgrund des erforderlichen Probenvolumens von etwa 10 μL pro Einzelmessung wurde für jede Polymer-Konzentration eine Probe von 100 μL vorbereitet, die insgesamt benötigte Menge eines jeden Polymers belief sich auf mindestens 40 mg.

Die Viskositätsmessungen erfolgten durch Dreifachbestimmung in einem μVISC *m*-VROC Mikroviskosimeter mit *m*VROC2.5-GA05-Flusszelle und Thermostat bei 25 °C. Nach Anlegen einer konstanten Flussrate herrschte in den Proben ein Druckgefälle über die Flusszelle vor, welches von drei Sensoren im Messchip der Flusszelle registriert wurde. Die Evaluierung der dynamischen Viskositätsdaten erfolgte automatisch durch die Geräte-Software *m*VROC Control 3.0.

Die so ermittelten Viskositätswerte wurden für jedes Polymer gegen die Probenkonzentration aufgetragen. Die klassischen PAS-Sequenzen PAS#1 und PA#1 wie auch die PEG-Polymere lagen in verschiedenen Längen vor, was den direkten Vergleich der Viskositätswerte innerhalb eines Polymer-Typs ermöglichte. Die resultierenden Viskositätskurven der unterschiedlichen Polymere wurden mit Polynomen höherer Ordnung (Gleichung 4; Pamies *et al.*, 2008) angepasst.

Erwartungsgemäß nahm die Viskosität innerhalb einer Polymer-Reihe mit steigender Kettenlänge zu, was sich in steiler ansteigenden Messkurven niederschlug

Abbildung 18A). Bemerkenswert war die Erkenntnis, dass die Viskositätswerte des 30 kDa-PEG-Polymers bereits signifikant höher waren, als für PAS#1(400) bzw. PA#1(400) mit vergleichbaren Molekulargewichten von ca. 33 und 32 kDa bestimmt wurde. Besonders deutlich wurde am Vergleich des 40 kDa-PEG-Polymers mit PAS#1(600) (ca. 50 kDa) und PA#1(600) (ca. 48 kDa), dass die Zunahme der Viskosität mit steigender Kettenlänge für PEG viel stärker ausgeprägt ist als für die PAS-Polypeptide. Bei vergleichsweise geringerem Molekulargewicht zeigten beide PAS(600)-Spezies selbst in hohen Konzentrationen deutlich niedrigere Viskositäten als das PEG-Polymer.

Bei den PAS-Polypeptiden einer Länge von 200 Resten (Abbildung 18B) erreichten sowohl P1A1 als auch P1A3 höhere Viskositätswerte als die klassischen PAS-Polypeptide PAS#1 und PA#1. Für P1A1 könnte diese Beobachtung auf eine stärker elongierte Molekülform infolge erhöhter Anteile an der starrereren, eher stäbchenförmigen PPII-Struktur hinweisen (Brouwers, 2010; Lauffer, 1942). Die P1A3-Sequenz mit dem vermutlich ausgeprägtesten *Random-Coil*-Charakter zeigte, wie zuvor die ebenfalls *Random-Coil*-strukturierten PEG-Polymere, die höchsten Viskositätswerte.

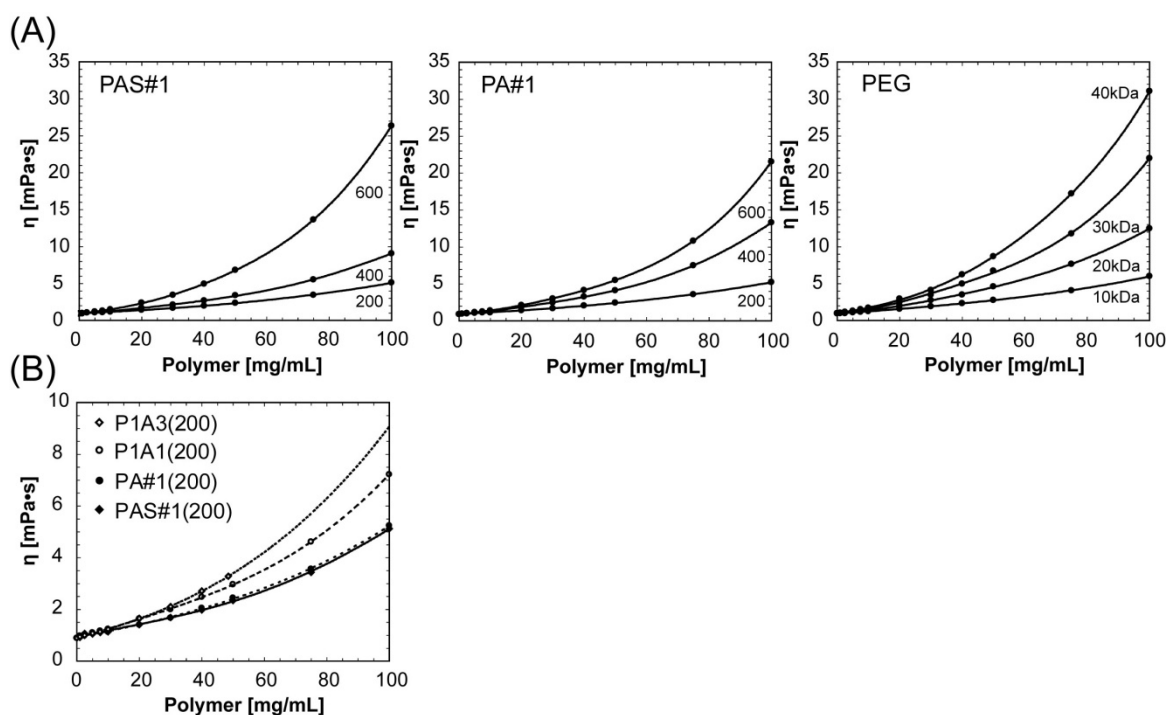


Abbildung 18: Viskositätskurven der PAS-Polypeptide und PEG-Polymere. Die Viskositätsmessung erfolgte in einem μ VISC *m*-VROC Mikroviskosimeter mit mVROC2.5-GA05-Flusszelle bei 25 °C in wässrigem Puffer (PAS-Polypeptide: 20 mM Tris/HCl pH 9,5; PEG-Polymere: 50 mM NaHCO₃ pH 8,0). Die Konzentrationsabhängigkeit der Probenviskosität lässt sich durch ein Polynom höherer Ordnung (Gleichung 4) anpassen. **(A)** Auftragung der gemessenen Viskosität gegen die Probenkonzentration für die Polymere PAS#1, PA#1 und PEG verschiedener Länge. **(B)** Vergleich der Viskositäten der verschiedenen PAS-Sequenzen bei einheitlicher Länge von etwa 200 AS.

Im Bereich geringer Probenkonzentrationen sind die höheren Ordnungen der Polynomial-Darstellung (Gleichung 4) vernachlässigbar. Die resultierende Beziehung zwischen Viskosität und Polymerkonzentration wird oft durch die Formeln nach Huggins (1942; Gleichung 5) und Krämer (1938; Gleichung 6) ausgedrückt. Für die hier benötigten Solvensviskositäten der niedrig konzentrierten wässrigen Puffer wurden die Werte von reinem H₂O (89 cP bei 25 °C) durch Messung bestätigt.

Durch Extrapolation gegen eine infinitesimale Probenkonzentration kann die intrinsische Viskosität $[\eta]$ als spezifischer Parameter eines Polymers erhalten werden. Auftragungen der Messdaten nach Huggins (Gleichung 5) und Krämer (Gleichung 6) wurden für jedes Polymer bei Konzentrationen von 10, 20, 30, 40 und 50 mg/mL ausgewertet (siehe dazu Anhang, Abbildung A2). Dabei wurde $[\eta]$ als Mittelwert der beiden Achsenschnittpunkte bei einer Polymerkonzentration von 0 aus den unterschiedlichen Auftragungen berechnet.

Die intrinsische Viskosität korreliert mit dem durchschnittlichen Molekulargewicht eines Polymers über die empirische Mark-Houwink-Sakurada-Beziehung (Sakurada *et al.*, 1962; Gleichung 8), deren Exponent eine Abschätzung der Molekülform bzw. -Konformation erlaubt (Masuelli, 2014). Die Auftragung der ermittelten intrinsischen Viskositäten $[\eta]$ gegen das präzise Molekulargewicht M wurde für jeden Polymer-Typ separat vorgenommen und mit der exponentiellen Beziehung aus Gleichung 8 angepasst, um die polymerspezifischen Mark-Houwink-Sakurada-Parameter K und a zu bestimmen (Abbildung 19).

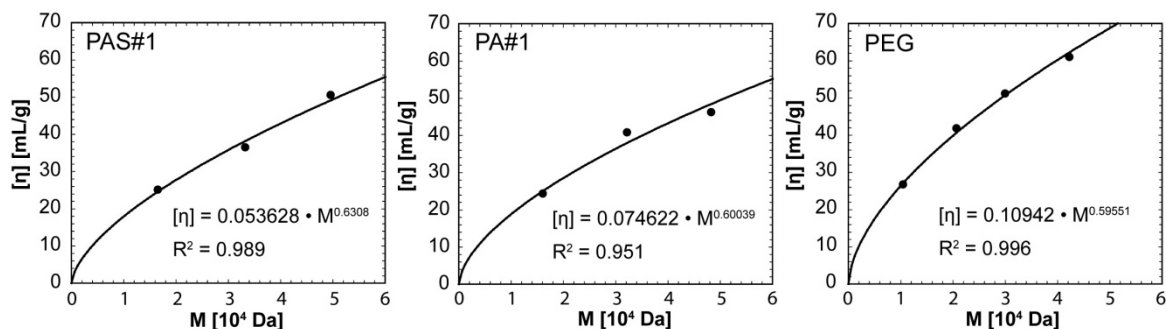


Abbildung 19: Auswertung polymerspezifischer Parameter nach Mark-Houwink-Sakurada. Für die drei verschiedenen Polymere PAS#1, PA#1 und PEG wurden die Werte der intrinsischen Viskosität gegen die Molekülmasse aufgetragen. Der Kurvenverlauf entspricht der erwarteten Exponentialfunktion (Gleichung 8), wobei der Anstieg der Kurve für PEG viel stärker ausfällt als für die Polypeptide.

Die ermittelten Parameter-Werte der PEG-Polymere für K und a bei 25 °C (zusammengestellt auch in Tabelle 9 am Ende dieses Abschnitts) liegen im erwarteten

Bereich, der für a etwa zwischen 0,5 und 0,7 und für K zwischen 0,05 und 0,125 mL/g angegeben ist (Vergleichswerte der American Polymer Standard Corporation, siehe <http://www.ampolymer.com/Mark-HouwinkParameters.html>; Gregory & Huglin, 1986; Bailey *et al.*, 1958). Interessanterweise sind die a -Werte für die Polypeptide etwas höher als für PEG, liegen aber nahe beieinander und stehen im Einklang mit der *Random-Coil*-Struktur, bei der sich a typischerweise zwischen 0,5 und 0,8 bewegt (Masuelli, 2014). Für die K -Werte der analysierten Polymere ist ein gegenläufiger Effekt zu beobachten; hier zeigt das PEG-Polymer den größten Wert, was sich in der stärker ausgeprägten Viskositätssteigerung mit steigender Polymerlänge äußert.

Die hydrodynamischen Proportionen der PAS- und PEG-Polymere wurden mittels SEC-Chromatographie an einer Superdex 200 10/30 GL-Säule mit 24 mL Bettvolumen in 50 mM NH_4HCO_3 , 500 mM NaCl charakterisiert. Die freien PAS-Polypeptide wurden chromatographisch anhand der Absorption der Peptidbindung bei 225 nm verfolgt. Um auch die Amino-PEG-Polymere in der Chromatographie detektieren zu können, wurden diese – wie bereits für die RPC-Experimente beschrieben (siehe Abschnitt 3.1.7) – mit Hilfe von 5/6-Carboxyfluorescein-NHS-Ester mit einem Fluorescyl-Chromophor markiert. Auch die Polypeptide PA#1(200), PA#1(400) und PA#1(600) wurden N-terminal mit dem Fluorescyl-Rest modifiziert, um den Einfluss des hydrophoben Chromophors auf das beobachtete SEC-Elutionsvolumen zu untersuchen. Das Probenvolumen der analysierten Polymere betrug jeweils 300 μL bei einer Konzentration von etwa 15 μM .

Mit den globulären Standardproteinen Cytochrom C, Carboanhydrase, Ovalbumin, Rinderserumalbumin, Alkoholdehydrogenase, β -Amylase und Apoferritin wurde eine Kalibrierung der SEC-Säule vorgenommen, und das Ausschlussvolumen wurde durch Blue Dextran zu 7,62 mL bestimmt. Die gemessenen SEC-Elutionsvolumina der Standardproteine wurden mit dem bekannten Molekulargewicht unter Verwendung der Gleichungen 2 und 3 (siehe Abschnitt 2.6.1; Callec *et al.*, 1984) in Beziehung gesetzt. Nach Auftragung der K_{av} -Werte (berechnet mittels Gleichung 3) gegen $\log M$ wurde mittels linearer Regression durch die Datenpunkte eine Kalibriergerade erstellt (Abbildung 20), mit deren Hilfe die gemessenen Elutionsvolumina der unterschiedlichen Polymere apparenten Molekulargewichten zugeordnet werden konnten.

Die Kalibrierung von SEC-Säulen mit gleichartigen Polymeren unterschiedlicher Länge erlaubt grundsätzlich die Korrelation des beobachteten Elutionsvolumens von SEC-Analyten mit deren apparentem Molekulargewicht. Bei elongierten, stäbchenförmigen Molekülen ergibt sich jedoch eine andere mathematische Beziehung als bei globulären Proteinen und *Random-Coil*-Polymeren (Dubin & Principi, 1989). Die beim Auftrag von

$\log[M]$ gegen den K_{av} -Parameter resultierende Kalibriergerade weist für elongierte Molekülformen eine deutlich flachere Steigung und generell im Vergleich mit globulären Molekülen niedrigere $\log[M]$ -Werte bei gleichen K_{av} -Werten auf (Mori & Barth, 1999). Das bedeutet, dass die Kalibrierung mit globulären Standardproteinen zu einer deutlichen Überschätzung des apparenten Molekulargewichts elongierter Moleküle führt, die stärker ausgeprägt ist als bei *Random-Coil*-Polymeren, welche im Mittel eine sphärische Molekülform annehmen.

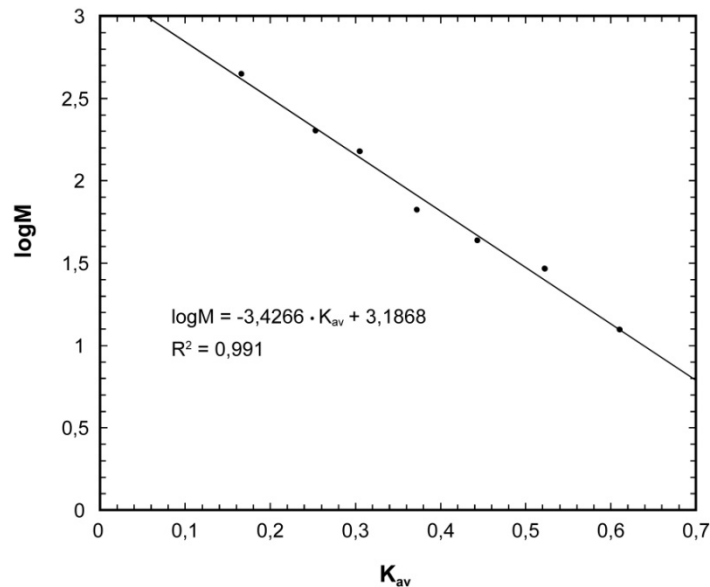


Abbildung 20: Kalibrierung der SEC-Säule Superdex 200 10/30 GL (24 mL Bettvolumen) mit Standard-Proteinen. Die SEC-Kalibrierung durch die globulären Standardproteine Cytochrom C (12,4 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), β -Amylase (200 kDa) und Apoferritin (443 kDa) erfolgte in 50 mM NH_4HCO_3 , 500 mM NaCl. Die Auftragung der experimentell ermittelten Elutionsvolumina in Form des K_{av} -Parameters (Gleichung 3) gegen den Logarithmus des Molekulargewichts der Standardproteine ergab eine Kalibriergerade durch lineare Regression unter Verwendung von Gleichung 2.

Aus dem Verhältnis des beobachteten zum erwarteten Molekulargewicht wurden jeweils apparente „Vergrößerungsfaktoren“ für die untersuchten Moleküle ermittelt. Für die IL-1Ra-Fusionsproteine wurden sowohl für die apparenten als auch für die berechneten Molekülmassen die Differenzen aus den Molekulargewichten der PASylierten und nicht PASylierten Form des Proteins berechnet. Das Verhältnis der apparenten zur berechneten Massendifferenz wurde als Maß für den additiven Effekt herangezogen, den die verschiedenen PAS-Sequenzen zum hydrodynamischen Volumen der IL-1Ra-Fusionsproteine beitragen.

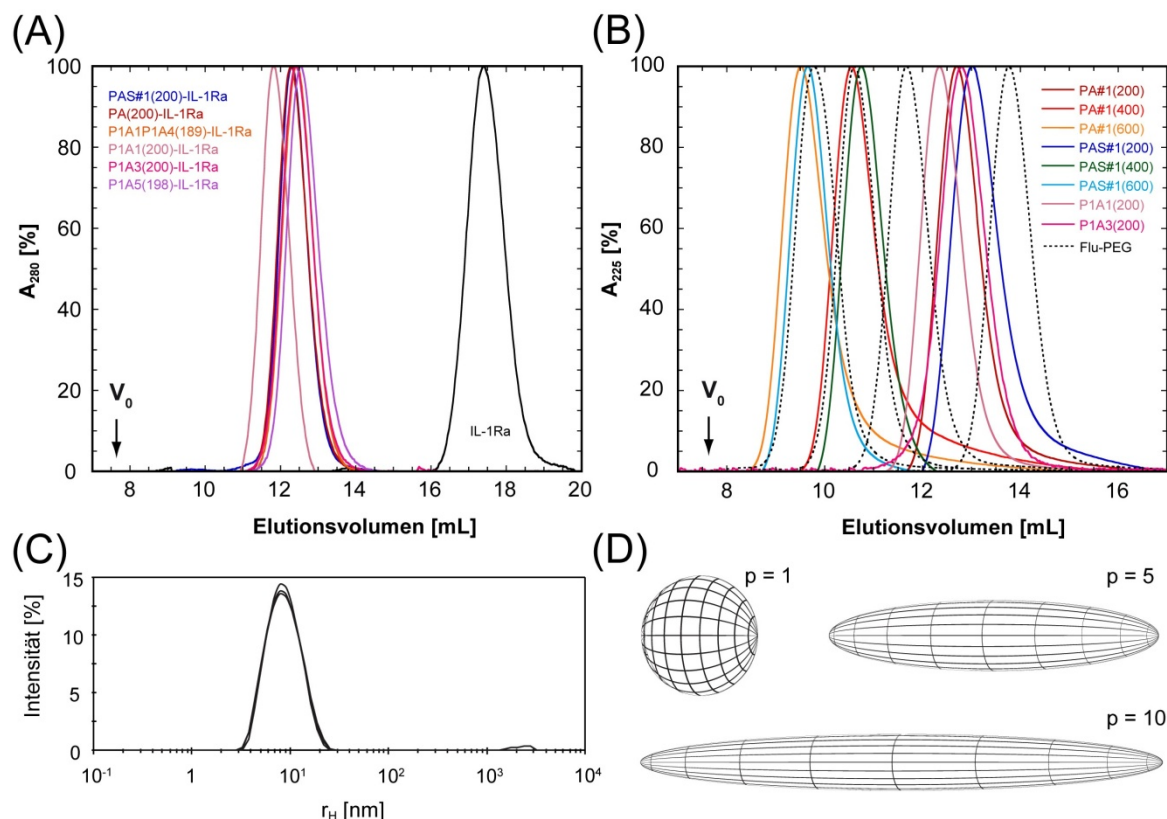


Abbildung 21: SEC-Chromatogramme von PAS-IL-1Ra-Fusionsproteinen, freien PAS-Polypeptiden und PEG-Polymeren sowie DLS-Analyse. Die SEC-Analysen wurden an Superdex 200 10/30 GL (24 mL Bettvolumen) in 50 mM NH_4HCO_3 , 500 mM NaCl mit jeweils 300 μL Probenlösung (15 μM) durchgeführt. Das SEC-Ausschlussvolumen V_0 ist markiert. Die SEC-Chromatogramme der PAS#1-Polypeptide verschiedener Länge sind in bläulichen Farbtönen wiedergegeben, die Chromatogramme der unterschiedlichen P/A-Polypeptide im rötlichen Farbbereich. **(A)** Chromatogramm von IL-1Ra und den entsprechenden PAS-Fusionsproteinen. Die Fusion mit einer PAS-Sequenz führt in jedem Fall zu einer Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens, ablesbar am erhöhten apparenten Molekulargewicht. **(B)** Chromatogramm der gereinigten PAS-Polypeptide und der Fluorescein-markierten Amino-PEGs. Die PEG-Spezies wurden zur Detektion bei 225 nm mit Fluorescein modifiziert und ihre Kurven sind gestrichelt gezeichnet. **(C)** DLS-Messungen der Polymere (1 mg/mL) erfolgten mit Hilfe eines Zetasizer Nano-S-Geräts in 5 mM KPi pH 7,5, 50 mM K_2SO_4 bei 20 °C. Die Abbildung zeigt ein DLS-Korrelogramm der r_H -Verteilung für PA#1(600) als Triplikatmessung. Die Probe verhält sich monodispers und hochrein. **(D)** Formsimulation von PAS-Polypeptiden aufgrund der viskosimetrischen und DLS-Daten. Die Abweichung von der Kugelform kann als prolates oder oblates Ellipsoid interpretiert werden, wobei die prolate Form plausibler für eine molekular eindimensionale Polypeptidkette mit nur einer Vorzugsrichtung ist. Alle drei dargestellten geometrischen Körper schließen dasselbe Volumen ein. Die Kugelform ($p = 1$) trifft nur auf P1A3 und die PEG-Polymere annähernd zu, die elongierte Struktur mit einem prolates Achsenverhältnis um 5 ($p = 5$) für die Sequenzen PAS#1 und PA#1 wird von der noch stärker gestreckten P1A1-Sequenz mit einem Wert um 10 ($p = 10$) übertroffen.

Die Fusion mit jeder der unterschiedlichen PAS-Sequenzen hatte für IL-1Ra eine enorme Zunahme des hydrodynamischen Volumens und des apparenten Molekulargewichts um einen Faktor von etwa 4,5 zur Folge (Abbildung 21A und Tabelle 7).

Tabelle 7: SEC-Elutionsvolumina und Abschätzung der Molmasse für die untersuchten PAS-Konstrukte. Die letzte Spalte verdeutlicht mit dem differentiellen Verhältnis der apparenten zu den berechneten Molekülmassen den additiven Effekt, den die PAS-Polypeptide bei Fusion für IL-1Ra für die apparente Gesamtmasse vermitteln.

Konstrukt	Elutionsvolumen [mL]	Berechnetes M ^a [kDa]	Apparentes M ^b [kDa]	Vergrößerungsfaktor ^c für M	$\Delta M_{app} / \Delta M_{calc}^d$
IL-1Ra	17.41	18.5	13.8	0.7	–
PAS#1(200)-IL-1Ra	12.29	35.1	162.1	4.6	8.9
PA#1(200)-IL-1Ra	12.29	34.6	162.1	4.7	9.2
P1A1P1A4(189)-IL-1Ra	12.44	33.4	150.8	4.5	9.2
P1A1(200)-IL-1Ra	11.81	35.3	204.3	5.8	11.3
P1A3(200)-IL-1Ra	12.40	34.1	153.8	4.5	9.0
P1A5(198)-IL-1Ra	12.54	33.5	143.7	4.3	8.7
PAS#1(200)	13.02	16.6	114.1	6.9	–
PAS#1(400)	10.75	33.1	340.4	10.3	–
PAS#1(600)	9.65	49.6	578.3	11.7	–
PA#1(200)	12.69	16.1	133.7	8.3	–
PA#1(400)	10.55	32.2	374.9	11.6	–
PA#1(600)	9.51	48.2	618.6	12.8	–
P1A3(200)	12.86	15.6	123.2	7.9	–
P1A1(200)	12.34	16.9	158.3	9.4	–
Fluorescein-PEG(10000)	13.77	10.9	79.5	7.3	–
Fluorescein-PEG(20000)	11.67	21.1	218.6	10.4	–
Fluorescein-PEG(30000)	10.61	30.4	364.2	12.0	–
Fluorescein-PEG(40000)	9.78	42.6	543.2	12.8	–

^a berechnet mit Hilfe des Programms ProtParam (www.expasy.org) unter Berücksichtigung der Masse von Fluorescein

^b experimentell durch SEC bestimmt

^c Verhältnis der apparenten zur berechneten Molekülmasse

^d berechnet als Verhältnis der Differenz der apparenten Molekülmassen von IL-1Ra in PASylierter und nicht PASylierter Form zur Differenz der berechneten Molmassen für PASyliertes und nicht PASyliertes IL-1Ra

Obwohl die Fusion verschiedener PAS-Sequenzen gleicher Länge an IL-1Ra zu sehr ähnlichen Volumenvergrößerungen führte, ließen sich doch feine Unterschiede erkennen. Die P1A1-Polypeptidsequenz verursachte die am stärksten ausgeprägte Vergrößerung mit dem größten additiven Volumeneffekt. Die klassischen PAS#1- und PA#1-Sequenzen zeigten geringere Effekte auf die Vergrößerung des apparenten Molekulargewichts, und die P1A5-Sequenz zeichnete sich durch den schwächsten Vergrößerungseffekt aus. Die hydrodynamischen Volumina der Fusionsproteine nahmen offenbar mit dem Prolin-Gehalt der PAS-Sequenzen zu.

Dieser Effekt ließ sich auch an den freien PAS-Polypeptiden (Abbildung 21B) nachvollziehen. Unter den Polypeptiden gleicher Länge von etwa 200 Aminosäuren zeigte das P1A1-Polypeptid – bezogen auf die klassischen Sequenzen PAS#1 und PA#1 – ein leicht vermindertes Elutionsvolumen, korrespondierend mit einem erhöhten apparenten Molekulargewicht. Dagegen wies die P1A3-Polypeptidsequenz das größte Elutionsvolumen und damit kleinste hydrodynamische Volumen auf. Die PAS#1-

Sequenzen nahmen in allen untersuchten Längen verglichen mit den PA#1-Polypeptiden ein leicht reduziertes hydrodynamisches Volumen ein.

Bemerkenswert ist, dass die klassischen PAS#1- und PA#1-Polypeptidsequenzen mit einer Länge von 600 AS selbst das größte PEG-Polymer mit 40 kDa im hydrodynamischen Volumen übertrafen. Dass diese Beobachtung ausschließlich auf die hydrodynamischen Eigenschaften der Fluorescein-markierten Amino-PEG-Polymere zurückzuführen war, wurde nachgewiesen, indem auch die Polypeptide PA#1(200), PA#1(400) und PA#1(600) mit Fluorescyl-Resten modifiziert (siehe Abschnitt 3.1.8) und SEC-chromatographisch analysiert wurden. Da keine signifikanten Unterschiede in den SEC-Elutionsvolumina verglichen mit den unmodifizierten PA#1-Polypeptiden zu bemerken waren, konnten hydrophobe Interaktionen der Fluorescyl-Gruppe mit der SEC-Säulenmatrix ausgeschlossen werden, welche andernfalls zu einer Vergrößerung der beobachteten Elutionsvolumina geführt hätten.

Auf Grundlage der SEC-Kalibrierung wurde eine Korrelation zwischen den SEC-Elutionsvolumina und den Viskositätsdaten für die PAS#1- und PA#1-Polypeptide und die PEG-Proben hergeleitet (siehe Abschnitt 2.6.2, Gleichung 10). Auftragungen von $\log M$ bzw. $\log[\eta]$ gegen K_{av} erlaubten durch lineare Regression anhand der Gleichung 2 (siehe Abschnitt 2.6.1) bzw. der Gleichung 10 (siehe Abschnitt 2.6.2) die Bestimmung der Werte für die Geradenkonstanten A , B , C und D für die untersuchten Polymere (siehe Anhang, Abbildung A3). Da die Mark-Houwink-Parameter a und K in den unter Verwendung der gewonnenen SEC-Daten ermittelten Konstanten C und D enthalten sind, konnten diese Parameter mit Hilfe von Gleichung 10 (Abschnitt 2.6.2) berechnet werden (zusammengestellt in Tabelle 9 am Ende dieses Abschnitts).

Mittels dynamischer Lichtstreuung wurden Größeninformationen über die unterschiedlichen IL-1Ra-Fusionsproteine, freien PAS-Polypeptide und PEG-Polymere in Lösung ermittelt (siehe Abschnitt 2.6.3), um diese mit den anderen bereits erhobenen hydrodynamischen Daten zu korrelieren. Allgemein wird bei Lichtstreuungsexperimenten zwischen statischer und dynamischer Lichtstreuung unterschieden. Beide Methoden beruhen auf der Messung von Interferenzen der Rayleigh-Streuung langwelligem monochromatischem Lichts ($\lambda \approx 600$ nm) an Teilchen in Lösung, wobei die Intensität dieser Interferenzen aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung der einzelnen Streuzentren fluktuiert. Während bei der statischen Lichtstreuung (SLS) zeitlich gemittelte Streulichtintensitäten gemessen werden, verfolgt die dynamische Lichtstreuung die zeitabhängigen Intensitätsfluktuationen des Streulichts. DLS-Experimente lassen somit Rückschlüsse auf das Diffusionsverhalten und damit auf die

hydrodynamische Größe und teilweise die Form eines Teilchens zu (Schurr & Schmitz, 1986). SLS-Messungen hingegen ermöglichen die Bestimmung absoluter Molekülmassen und des zweiten osmotischen Virialkoeffizienten als Maß für die Wechselwirkung von gelösten Partikeln mit dem Solvens aus dem sogenannten Debye-Plot, welcher die graphische Auftragung des gemessenen Streulichtanteils gegen die bekannte Probenkonzentration gemäß der Rayleigh-Gleichung darstellt (Debye, 1947). Derartige SLS-Analysen erfordern in der Praxis allerdings Konzentrationsreihen von Polymeren höherer Kettenlänge, deren hydrodynamischer Radius über 10 nm liegen sollte, sowie größere Probenmengen, als im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung standen.

Mit Hilfe eines Zetasizer Nano-S-Geräts wurden die hydrodynamischen Radien der untersuchten Makromoleküle bei einer Konzentration von etwa 1 mg/mL in 5 mM KP_i pH 7,5, 50 mM K_2SO_4 bei 20 °C in Dreifachbestimmung experimentell bestimmt. Anhand der gemessenen r_H -Werte wurden mittels der Zetasizer Software 6.32 jeweils apparente Molmassen abgeschätzt und Vergrößerungsfaktoren aus dem Verhältnis von apparterer zur erwarteten Masse berechnet. Außerdem wurden die aus den SEC-Analysen erhaltenen Vergrößerungsfaktoren mit den durch DLS-Experimente bestimmten Faktoren ins Verhältnis gesetzt, um Abweichungen zwischen diesen beiden unabhängigen hydrodynamischen Methoden zu analysieren. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Mit der idealisierten Modellvorstellung von Polymer-Molekülen als harten Kugeln ermöglichte die Einstein-Simha-Beziehung (Einstein, 1906; Simha, 1940; Gleichung 11) die Abschätzung von Erwartungswerten für den hydrodynamischen Radius r_H aus den bereits ermittelten intrinsischen Viskositäten $[\eta]$ (siehe Tabelle 8 in diesem Abschnitt). Eine präzisere Abschätzung der Molekülform aus den Daten für die hydrodynamischen Radien ist anhand des Stokes-Einstein-Modells (Einstein, 1905) möglich, indem der Diffusionskoeffizient und der darin enthaltene translationale Friktionsfaktor (Gleichung 13) ausgewertet werden. Der Diffusionskoeffizient wird im DLS-Experiment aus den Lichtstreuungsmessdaten durch eine Korrelationsfunktion abgeleitet. Die Gleichung 13 für den Friktionsfaktor trifft in dieser Form jedoch nur auf sphärische Molekülformen zu, bei denen sich die messbaren Fluktuationen des Streulichts ausschließlich auf die Translation der Teilchen im Raum zurückführen lassen.

Im Friktionsfaktor für elongierte Moleküle mit reduzierter Symmetrie muss neben der translationalen Diffusionskomponente jedoch auch der Beitrag durch Rotation der Teilchen berücksichtigt werden, der zu einer zusätzlichen Relaxierung der Streulicht-

intensität in der Korrelationsfunktion führt (Schurr & Schmitz, 1986). Dieser Effekt hat für elongierte Molekülformen eine Vergrößerung des experimentellen Friktionsfaktors und damit auch des daraus abgeleiteten hydrodynamischen Radius zur Folge. Aus diesen Gründen können durch DLS-Messungen feine Unterschiede im Ausprägungsgrad der elongierten Molekülform festgestellt werden.

Die Form von Ellipsoiden mit Abweichung von der regulären Kugelform kann durch Berechnung des Perrin-Friktionsfaktors f_p aus dem Verhältnis der beobachteten hydrodynamischen Radien zu den erwarteten idealen Kugelradien abgeschätzt werden (Gleichung 14). Die experimentellen r_H -Werte aus der DLS-Messung wurden also mit den aus den Viskositätsdaten unter Betrachtung der Moleküle als Kugeln berechneten Werten verglichen.

Der Friktionsfaktor kann im Prinzip sowohl für den Fall eines prolaten als auch eines oblaten Ellipsoids als Molekülform ausgewertet werden (Perrin, 1934; König, 1975). Das prolate Ellipsoid stellt aber die plausiblere Lösung zur Formabschätzung einer linearen Polymer-Kette mit einer einzigen räumlichen Vorzugsrichtung dar. Mittels der DLS-Software wurden mögliche Achsenverhältnisse p (Tabelle 8) von prolaten Ellipsoiden aus den ermittelten f_p -Werten unter Verwendung von Gleichung 15 berechnet.

Der Vergleich der apparenten „Vergrößerungsfaktoren“ aus zwei verschiedenen Methoden (DLS und SEC) lieferte einen Verhältnisfaktor, der als empirisches Maß dafür benutzt wurde, inwiefern die Charakterisierung der hydrodynamischen Proportionen eines untersuchten Moleküls nach beiden Analysemethoden zum selben Ergebnis führte (zusammengestellt in Tabelle 8). Ein Verhältnisfaktor von ungefähr 1, wie er für das P1A5(198)-IL-1Ra-Fusionsprotein, die PEG-Polymere sowie alle freien PAS-Polypeptide mit Ausnahme von P1A1(200) ermittelt wurde, weist darauf hin, dass deren Molekülformen in DLS- und SEC-Messungen zu konsistenten Vergrößerungsfaktoren der apparenten Molmasse führten.

Da die apparente DLS-Molmasse aus den gemessenen hydrodynamischen Radien abgeschätzt wurde, kann die Diskrepanz im Fall des P1A1(200)-Polypeptids auf eine Molekülform zurückgeführt werden, die deutlich stärker elongiert ist als bei Molekülen mit einem Verhältnisfaktor von 1.

Der DLS/SEC-Verhältnisfaktor des IL-1Ra von 1,9 ließ eine unsymmetrische Molekülform des Proteins vermuten. Interessanterweise wirkte sich die Fusion der Sequenzen P1A1P1A4, P1A3 und P1A5 an IL-1Ra in einer Verminderung des unsymmetrischen

Tabelle 8: Hydrodynamische Dimensionen der PAS-Konstrukte aus DLS-Experimenten. Die hydrodynamischen Radien wurden zur Abschätzung von Molmassen und Molekülformen ausgewertet

Konstrukt	Berechnetes M^a [kDa]	Apparentes M^b [kDa]	Vergrößerungs- faktor ^c für M	Effekt ^d DLS/SEC	r_H^{DLS} * [nm]	$[\eta]^{**}$ [ml/g]	r_H^{Visc} *** [nm]	f_p + (nach Perrin)	prolates Achsenverhältnis p ‡
IL-1Ra	18.5	25.6	1.4	1.9	2.4	–	–	–	–
PAS#1(200)-IL-1Ra	35.1	368.5	10.5	2.3	7.4	–	–	–	–
PA#1(200)-IL-1Ra	34.6	303.8	8.8	1.9	6.9	–	–	–	–
P1A1P1A4(189)-IL-1Ra	33.4	224.5	6.7	1.5	6.0	–	–	–	–
P1A1(200)-IL-1Ra	35.3	746.5	21.1	3.7	10.1	–	–	–	–
P1A3(200)-IL-1Ra	34.1	228.0	6.7	1.5	6.1	–	–	–	–
P1A5(198)-IL-1Ra	33.5	122.7	3.7	0.9	4.7	–	–	–	–
PAS#1(200)	16.6	138.7	8.4	1.2	4.9	25.0	4.0	1.2	4.3
PAS#1(400)	33.1	341.3	10.3	1.0	7.2	36.6	5.8	1.2	4.8
PAS#1(600)	49.6	605.7	12.2	1.0	9.2	50.4	7.3	1.3	4.9
PA#1(200)	16.1	138.7	8.6	1.0	4.9	24.3	4.0	1.2	4.7
PA#1(400)	32.2	375.5	11.7	1.0	7.5	40.8	5.9	1.3	5.1
PA#1(600)	48.2	605.7	12.6	1.0	9.2	46.2	7.1	1.3	5.7
P1A3(200)	15.6	86.3	5.5	0.7	4.0	33.4	4.3	0.9	–
P1A1(200)	16.9	341.3	20.2	2.1	7.2	35.4	4.6	1.6	10.8
PEG(10000)	10.6	91.4	8.7	1.2	4.1	26.8	3.5	1.2	3.4
PEG(20000)	20.7	138.7	6.7	0.6	4.9	41.8	5.1	1.0	–
PEG(30000)	30.0	278.5	9.3	0.8	6.6	51.2	6.2	1.1	2.0
PEG(40000)	42.2	489.6	11.6	0.9	8.4	61.0	7.4	1.1	3.0

^a berechnet mithilfe des Programms ProtParam (www.expasy.org)

^b mit der DLS-Software (Zetaser Software 6.32) aus den r_H -Messwerten ermittelt

^c Verhältnis der apparenten zur berechneten Molekülmasse

^d Verhältnis der experimentellen Vergrößerungsfaktoren aus DLS- (diese Tabelle) und SEC-Analysen (Tabelle 7) durch DLS-Messung experimentell bestimmt

** intrinsische Viskosität, ermittelt aus den Viskositätswerten (siehe Anhang, Abbildung A2)

*** berechnet aus der intrinsischen Viskosität unter Annahme der Kugelform nach Einstein-Simha (Gleichung 11)

+ translationaler Friktionsfaktor nach Perrin, berechnet aus dem Verhältnis von r_H^{DLS} zu r_H^{Visc} (Gleichung 14)

‡ berechnet mit der DLS-Software (Zetaser Software 6.32) aus f_p (Gleichung 15)

Molekülcharakters in Form verkleinerter Verhältnisfaktoren aus, wohingegen die Fusion mit PAS#1, PA#1 und P1A1 die Unsymmetrie in der Molekülform von IL-1Ra kaum beeinflusste oder gar verstärkte. Die P1A1-Sequenz führte zum größten hydrodynamischen Radius des entsprechenden Fusionsproteins, aber auch zum größten Verhältnisfaktor mit 3,7. Beides spricht für eine stark elongierte Molekülform des P1A1(200)-IL-1Ra. Das Fusionsprotein mit der P1A5-Sequenz zeigte dagegen den kleinsten hydrodynamischen Radius und mit einem Verhältnisfaktor von 0,9 eine nahezu perfekte Übereinstimmung des durch SEC und DLS ermittelten hydrodynamischen Vergrößerungseffekts. Im Vergleich zu allen anderen IL-1Ra-Fusionproteinen schien also bei P1A5(198)-IL-1Ra die gestreckte Molekülform am schwächsten ausgeprägt. Die DLS/SEC-Verhältnisfaktoren für die Fusionsproteine mit den übrigen PAS-Sequenzen lagen zwischen 1,5 und 2,3, was wiederum auf eine stärker elongierte Molekülform deutete. Die Ausprägung der gestreckten Form für die PAS-IL-1Ra-Fusionsproteine verstärkte sich offenbar mit steigendem Prolin-Gehalt der PAS-Sequenzen.

Die DLS-Daten der freien PAS-Polypeptide zeigten analoge Tendenzen. Von allen anderen untersuchten PAS-Polypeptiden hob sich P1A1(200) durch einen DLS/SEC-Verhältnisfaktor von 2,1 ab, was eine deutlich elongierte Molekülstruktur vermuten ließ; gleichzeitig zeichnete sich diese Sequenz durch den größten Perrin-Friktionsfaktor 1,6 aus. Das daraus berechnete prolate Achsenverhältnis von etwa 10 lässt sich als stark elongiertes Ellipsoid simulieren (siehe Abbildung 21D). Als einzige der analysierten PAS-Sequenzen ergab P1A3(200) dagegen einen f_p -Wert von etwa 1, was einer sphärischen Molekülstruktur zuzuordnen ist, wie sie für das ideale *Random-Coil*-Polymer erwartet wird (Cantor & Schimmel, 1980). Auch für die PEG-Polymere wurden f_p -Werte nahe 1,0 bis maximal 1,2 und kleine p -Werte ermittelt, welche die Formabschätzung als leicht elongierten Sphären nahelegten. Die klassischen PAS#1- und PA#1-Polypeptide zeigten Perrin-Faktoren von etwa 1,2, aus denen prolate Achsenverhältnisse um 5 abgeleitet wurden, entsprechend einem gestreckten Ellipsoid (Abbildung 21D). Die experimentellen Perrin-Friktionsfaktoren waren für beide PAS-Sequenzen PAS#1 und PA#1 und in allen untersuchten Polypeptid-Längen identisch. Als Gemeinsamkeit der sechs PAS#1- und PA#1-Polypeptide scheint der Prolin-Gehalt von jeweils 35 % maßgeblich für die gleichermaßen elongierte Molekülform zu sein.

Durch Kombination der Einstein-Simha-Beziehung (Gleichung 11) mit der Mark-Houwink-Sakurada-Beziehung (Gleichung 8) erhält man für jeden der untersuchten Polymertypen eine Korrelation zwischen der intrinsischen Viskosität $[\eta]$ und dem jeweiligen hydrodynamischen Radius bei variierender Länge, die jedoch unabhängig von

der Molmasse des einzelnen Polymers ist (Gleichung 19). Aus der Auftragung von $[\eta]$ gegen r_H (Abbildung 22) konnten damit die charakteristischen Mark-Houwink-Parameter a und K unter Verwendung der Gleichungen 20 und 21 reevaluiert werden (Tabelle 9).

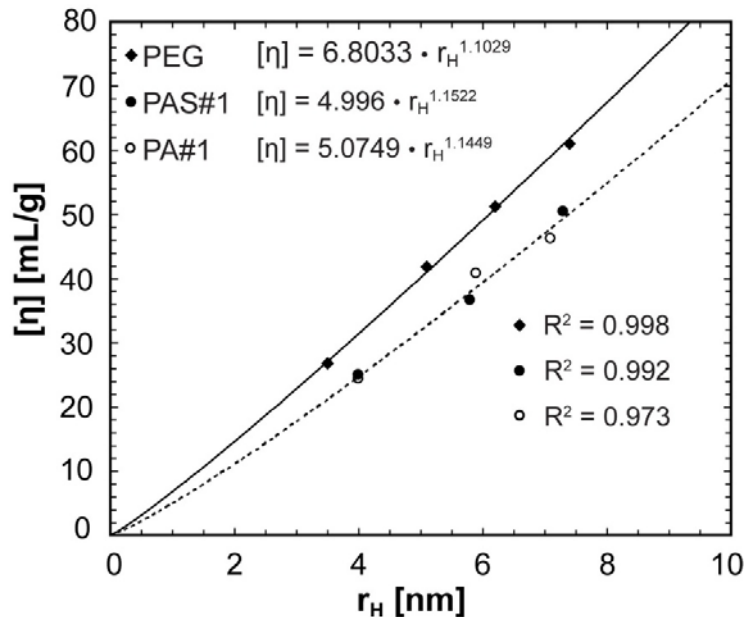


Abbildung 22: Auftragung von $[\eta]$ gegen die berechneten r_H -Werte für die untersuchten Polymere PAS#1, PA#1 und PEG. Als mathematisches Modell für die Anpassung der Daten wurde die Gleichung 19 zugrundegelegt, die den Kurvenverlauf für jede der Spezies adäquat beschreibt.

Die Auftragung der intrinsischen Viskosität gegen den berechneten hydrodynamischen Radius (Abbildung 22) führt vor Augen, dass bei gleicher Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens (in Form von r_H) die Viskosität des Polymers PEG deutlich stärker ansteigt, als für die Biopolymere PAS#1 und PA#1 ermittelt wurde. Die Kurven beider Polypeptid-Sequenzen liegen perfekt übereinander und veranschaulichen so die biophysikalisch fast ununterscheidbaren Eigenschaften dieser PAS-Sequenzen.

Die polymer-spezifischen Parameter K und a wurden mit insgesamt drei verschiedenen Methoden mathematisch ermittelt. Sowohl die direkte Auftragung der experimentellen intrinsischen Viskosität gegen das Molekulargewicht nach Mark-Houwink-Sakurada (gemäß Gleichung 8 in Abschnitt 2.6.2; siehe Abbildung 19) als auch die Extraktion der Parameter aus der Beziehung zwischen $\log[\eta]$ und den SEC-Elutionsvolumina in Form des K_{av} -Werts (gemäß Gleichung 10 in Abschnitt 2.6.2; siehe Anhang, Abbildung A3) sowie aus der direkten Korrelation zwischen $[\eta]$ und den berechneten hydrodynamischen Radien (gemäß Gleichung 19 in Abschnitt 2.6.3; siehe Abbildung 22) erbrachten konsistente Werte der Mark-Houwink-Parameter (Tabelle 9). Die unabhängig ermittelten hydrodynamischen Daten der Polymere aus Mikroviskosimetrie, SEC und DLS konnten

somit jeweils auf dieselben Polymereigenschaften zurückgeführt werden und bestätigen einander in einer plausiblen hydrodynamischen Gesamtbetrachtung.

Tabelle 9: Bestimmung der Mark-Houwink-Parameter K und a der Polymere PAS#1, PA#1 und PEG anhand verschiedener Methoden. Die Auftragung von $[\eta]$ gegen die Molmasse M erfolgte gemäß der exponentiellen Mark-Houwink-Sakurada-Beziehung (Gleichung 8) und lieferte direkt die Parameter K und a für die untersuchten Polymere. Die zweite Auswertungsmethode bestand in der Korrelation von $\log[\eta]$ mit dem K_{av} -Wert aus der SEC-Analyse (gemäß Gleichung 10); durch lineare Regression wurden die Geradenkonstanten erhalten, aus denen sich die Mark-Houwink-Parameter berechnen ließen. Bei der dritten Methode wurde die intrinsische Viskosität der Polymere gegen den berechneten hydrodynamischen Radius r_H (gemäß Gleichung 19) aufgetragen. Diese exponentielle Beziehung erlaubte die Bestimmung der Mark-Houwink-Parameter aus den Werten für die Kurvenkonstanten.

Auftragung	$[\eta]$ vs. M		$\log[\eta]$ vs. K_{av}		$[\eta]$ vs. r_H	
	K	a	K	a	K	a
PAS#1	0.054	0.63	0.054	0.63	0.058	0.62
PA#1	0.075	0.60	0.071	0.61	0.062	0.62
PEG	0.109	0.60	0.104	0.60	0.128	0.58

3.2 Entwicklung und Anwendung spezieller PAS-Polypeptide

3.2.1 Synthese und Einsatz von PAS-Kopplungsreagenzien

Bisher konzentrierte sich die Anwendung der PASylierung auf die genetische Ebene durch Fusion mit einem der Termini eines zu modifizierenden pharmazeutischen Proteins oder Peptids. Um PAS-Polypeptide als PEG-Biomimetika allgemein verfügbar zu machen, sollten hier weitere Einsatzmöglichkeiten für die PASylierung erschlossen werden. Die chemische Modifizierung mit PAS-Polypeptiden gestattet die Anwendung auf Moleküle jeglicher Art an gezielter Position durch Wahl der geeigneten Kopplungschemie und unter Einführung funktioneller Gruppen. Damit ist im Prinzip auch die PASylierung mit verzweigten Polypeptid-Ketten möglich. Vor diesem Hintergrund wurden PAS-Polypeptide mit speziellen Kopplungsstellen zur ortsgerichteten chemischen Modifizierung hergestellt. Um mögliche Nebenreaktionen der in PAS#1 enthaltenen nucleophilen Serin-Reste bei der Kopplung zu vermeiden, wurde die Serin-freie PA#1-Polypeptidsequenz als Grundlage für die neuen PAS-Polypeptide gewählt, in die an ausgewählten Positionen funktionelle Aminosäureseitenketten eingeführt wurden.

Zur Kopplung des konventionellen PA#1-Polypeptids mittels Säureamid-Chemie kann die Aminogruppe des N-Terminus herangezogen werden.

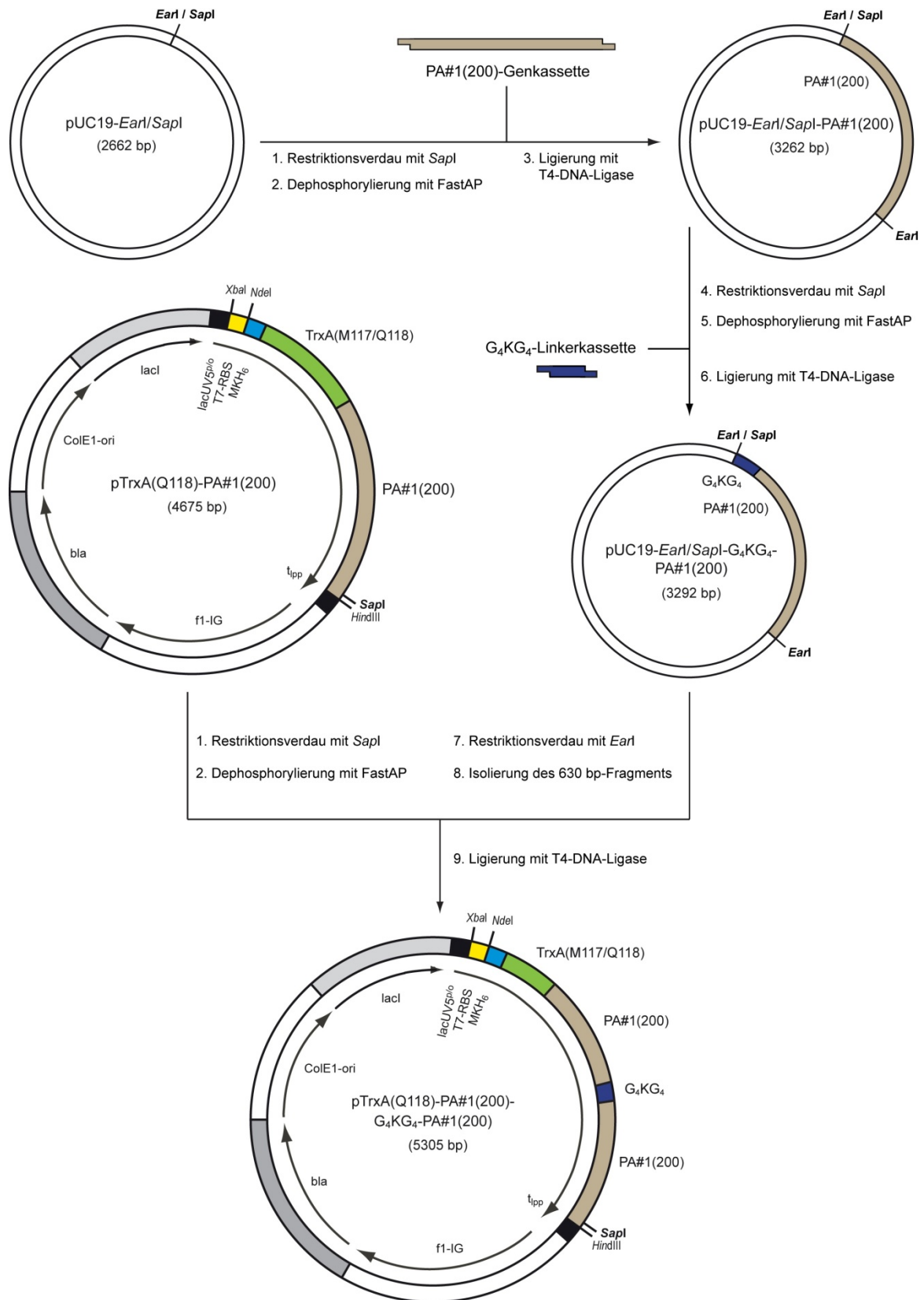


Abbildung 23: Klonierungsstrategie für TrxA-Fusionsproteine mit PA#1-Polypeptiden mit interner Kopplungsstelle. Beispielhaft ist die Konstruktion von pTrxA(Q118)-PA#1(200)-G₄KG₄-PA#1(200) dargestellt. Der Hilfsvektor pUC19-*EarI/SapI* wurde durch Linearisierung mit *SapI* zur konsekutiven Aufnahme einer PA#1(200)-Genkassette sowie einer Glycin-Linkersequenz mit reaktiver Seitenkette genutzt. Mittels *EarI*-Verdau wurde die resultierende modifizierte PA#1-Kassette isoliert und in den mit *SapI* linearisierten pTrxA-Expressionsvektor inseriert. Die Klonierung von pTrxA(R117)-PA#1(200)-G₄CG₄-PA#1(200) erfolgte analog unter Verwendung des G₄CG₄-Linkers und des Expressionsvektors pTrxA(R117)-PA#1(200).

Hierzu wurde in dieser Arbeit das bereits produzierte Polypeptid PA#1(200) verwendet und mit verschiedenen NHS-Estern zur Reaktion gebracht. Jedes Polypeptid verfügt aber mit der Carboxyl-Gruppe des C-Terminus über eine weitere zur Reaktion geeignete Funktion. Die chemische Aktivierung des C-Terminus zur Kopplung an die Aminogruppe eines Zielmoleküls oder -proteins hätte allerdings neben der erwünschten Kopplungsreaktion auch die inter- bzw. intramolekulare Kondensation des Polypeptids unter Kettenverlängerung bzw. Ringbildung als mögliche Nebenreaktionen zur Folge. Aus diesem Grund wurde eine Strategie zur Blockierung der freien Aminogruppe des N-Terminus von PA#1-Polypeptiden entwickelt, welche die spontane Zyklisierung eines N-terminalen Glutaminrests zu Pyroglutamat (Pga) involviert (Sanger & Thompson, 1953).

Zu diesem Zweck wurde der Expressionsvektor pTrxA(Q118) konstruiert, dessen TrxA-Gen im Vergleich zu pTrxA einen zusätzlichen C-terminalen Gln-Rest direkt nach dem Methionin-Rest zur BrCN-Spaltung aufweist. Durch eine mutagene PCR-Reaktion mit dem Sequenzier-Primer M13-RP1 (vorwärts) und dem Primer UB-3 (rückwärts), welcher den Gln-Rest an Position 118 einführte, wurde das Strukturgen für TrxA(Q118) von der Matrize pTrxA amplifiziert und mit Hilfe der *NdeI*- und *HindIII*-Schnittstellen in die Klonierungsstelle des pASK37-Rückgrats eingefügt. Auch der so erhaltene Vektor pTrxA(Q118) trägt eine *SapI*-Erkennungssequenz am C-Terminus von TrxA, mittels derer u. a. PA#1-Genkassetten zur Expression als Fusionsproteine eingefügt werden können. Die BrCN-Spaltung von TrxA(Q118)-PA#1-Fusionsproteinen hinter Met(117) setzt ein N-terminal um Glutamin erweitertes PA#1-Polypeptid frei, dessen N-Terminus durch spontane Pyroglutamat-Zyklisierung blockiert wird (vergleiche Abbildung 25C später in diesem Abschnitt).

Weitere gentechnische Modifikationen an den PA#1-Polypeptiden wurden unter Verwendung von pUC19-Hilfsvektoren vorgenommen. Zur Einführung interner reaktiver Seitenketten in PA#1-Polypeptide wurden zusätzlich kurze Glycin-Linker-Sequenzen G₄KG₄ mit internem Lys-Rest bzw. G₄CG₄ mit internem Cys-Rest (siehe Abschnitt 3.1.2) zwischen zwei PA#1(200)-Genkassetten eingefügt. Damit die Lys-Seitenkette als einzige

verfügbare Aminogruppe im entsprechenden PA#1-Polypeptid vorlag, wurde dieses wiederum als TrxA(Q118)-Fusionsprotein hergestellt, welches die BrCN-Spaltung mit anschließender N-terminaler Pyroglutamat-Zyklisierung des PA#1-Polypeptids gestattete. Zur Expression der Polypeptidsequenz mit internem Cys-Rest wurde als Spaltungsmethode dagegen die mildere Trypsin-Spaltung gewählt, um chemische Modifikationen der empfindlichen Thiol-Gruppe des Cysteins unter den harschen Bedingungen der BrCN-Spaltung zu vermeiden. Daher wurde diese Variante des PA#1-Polypeptids als TrxA(R117)-Fusionsprotein hergestellt.

Zur Klonierung der benötigten PA#1-Genkassetten wurde der Vektor pUC19-*Earl/SapI* verwendet (siehe Abbildung 6B, Abschnitt 3.1.2). Dieser ermöglichte durch Linearisierung mit *SapI* zunächst die Aufnahme einer PA#1(200)-Kassette und anschließend deren Verlängerung um jeweils eine der kurzen Glycin-Linker-Kassetten G_4KG_4 bzw. G_4CG_4 . Die resultierenden G_4KG_4 -PA#1(200)- bzw. G_4CG_4 -PA#1(200)-Genkassetten wurden durch doppelten Schnitt mit *Earl* aus dem pUC19-Vektor isoliert und in die Expressionsvektoren pTrxA(Q118)-PA#1(200) bzw. pTrxA(R117)-PA#1(200) inseriert, welche zuvor mit *SapI* linearisiert worden waren. Das Vorgehen ist schematisch für das Konstrukt mit dem G_4KG_4 -Linker in Abbildung 23 illustriert. So ergaben sich die Expressionsplasmide pTrxA(Q118)-PA#1(200)- G_4KG_4 -PA#1(200) bzw. pTrxA(R117)-PA#1(200)- G_4CG_4 -PA#1(200), welche durch Expression und darauffolgende Spaltung der TrxA-Fusionsproteine die Herstellung von PA#1-Polypeptiden mit den internen reaktiven Seitenketten von Lys bzw. Cys erlauben. Die chemische Kopplung eines Wirkstoffs mit diesen reaktiven Resten erzeugt quasi eine Verzweigungsstelle im PAS-Polypeptid.

Alternativ zu dieser Strategie wurde mit Hilfe des Vektors pUC19-Cys (siehe Abbildung 6C, Abschnitt 3.1.2) ein C-terminaler Cys-Rest an eine PA#1(200)-Kassette angehängt. Hierzu wurde die PA#1(200)-Genkassette in den mit *SapI* linearisierten Vektor inseriert; mittels *Earl*-Restriktionsverdau wurde die verlängerte PA#1(200)-Cys-Kassette daraufhin präzise herausgeschnitten und zur Expression als TrxA(R117)-Fusionsprotein in den Expressionsvektor pTrxA(R117) eingefügt (siehe Abbildung 24). Durch schonende Trypsinspaltung des resultierenden Fusionsproteins TrxA(R117)-PA#1-Cys wurde auch hier der empfindliche Cys-Rest vor chemischer Modifikation geschützt.

Die Biosynthese der Fusionsproteine TrxA(Q118)-PA#1(200), TrxA(Q118)-PA#1(200)- G_4KG_4 -PA#1(200), TrxA(R117)-PA#1-Cys und pTrxA(R117)-PA#1(200)- G_4CG_4 -PA#1(200) erfolgte in *E. coli* KS272 nach Transformation mit dem entsprechenden

Expressionsplasmid in 2 L-Schüttelkolben bei 30 °C. Das Kulturmedium enthielt 1 % (w/v) Glucose zur Unterdrückung der Basalexpression des *lacUV5*-Promotors der Expressionsplasmide (Plückthun & Skerra, 1989) und die Induktion fand mit IPTG statt. Zur Proteinreinigung wurde die schon zuvor für TrxA-PAS-Fusionsproteine optimierte Strategie angewandt.

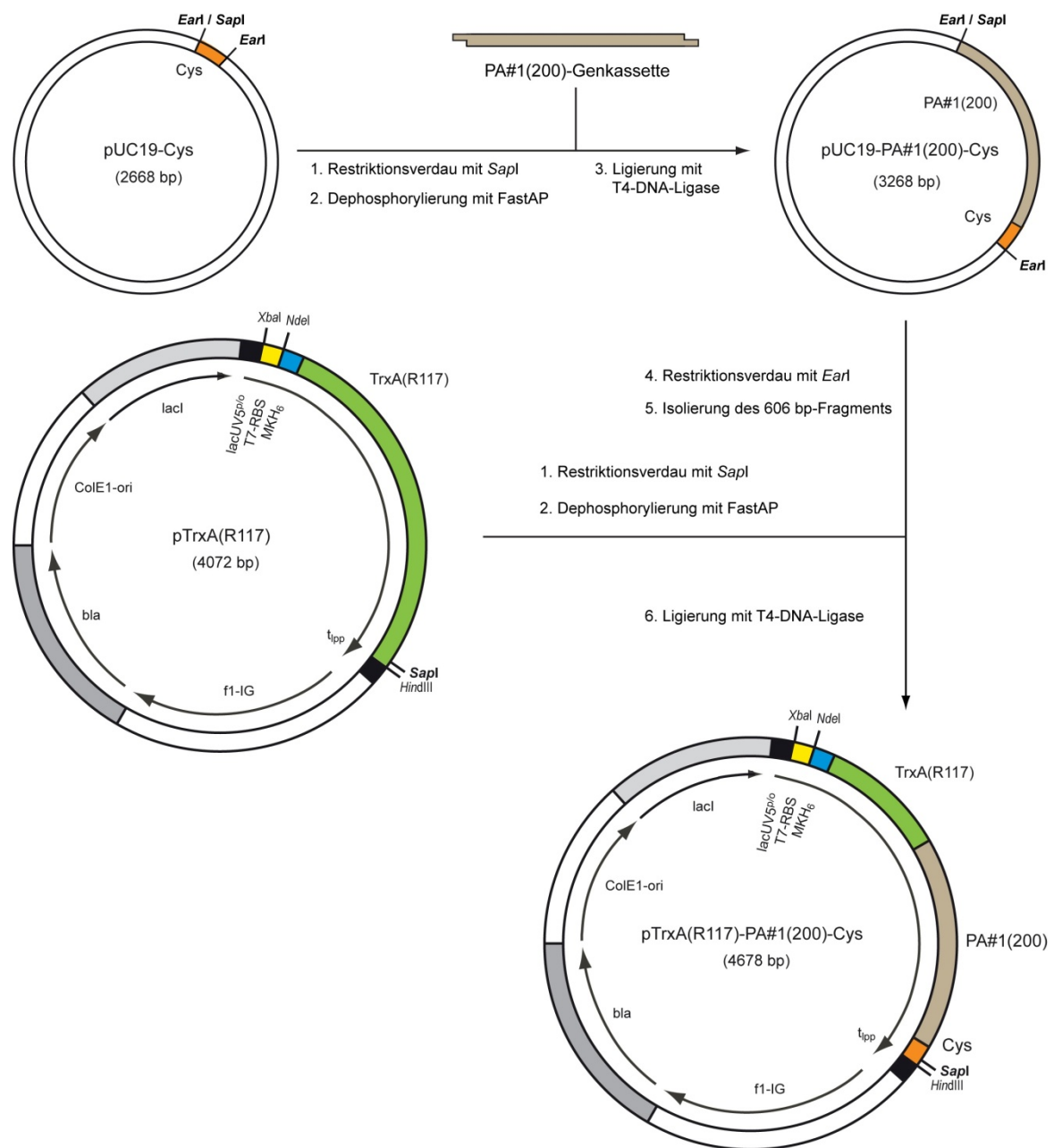


Abbildung 24: Klonierung des Expressionsplasmids pTrxA(R117)-PA#1(200)-Cys. Der Hilfsvektor pUC19-Cys wurde zur Insertion einer PA#1(200)-Genkassette mit *SapI* linearisiert; die um Cys verlängerte PA#1-Kassette wurde durch doppelten Schnitt mit *EarI* isoliert und in den zuvor mittels *SapI*-Restriktionsverdau linearisierten Expressionsvektor pTrxA(R117) eingefügt.

Nach der Ernte und dem Zellaufschluss mittels French Press wurde der Gesamtzellextrakt im Wasserbad für 15 min auf 70 °C erhitzt, was die Präzipitation eines Großteils der *E. coli*-Proteine bewirkte. Der Zellextrakt wurde durch Zentrifugation geklärt, und mittels fraktionierter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung wurden die PASylierten Proteine selektiv angereichert, in AEX-Laufpuffer (20 mM Tris/HCl pH 9,5) aufgenommen und gegen denselben Puffer dialysiert.

Mit einer AEX-Chromatographie an 20 mL Source 15Q wurden die Fusionsproteine in einem NaCl-Gradienten von 0 bis 100 mM eluiert. Die vereinigten Fraktionen mit dem jeweiligen TrxA-Fusionsprotein ergaben jeweils Ausbeuten um 5 mg/L Kulturmedium. Die SDS-PAGE-Analyse der gereinigten Fusionsproteine ist in Abbildung 25A gezeigt.

Die Spaltung der TrxA(R117)-Fusionsproteine mit den Cys-haltigen PA#1-Polypeptiden erfolgte in AEX-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 9,5) bei 37 °C über Nacht nach Zugabe von 20:1 (w/w) rekombinantem Trypsin (TripLE Select Enzyme) in einem Gesamtvolumen von 20 mL (siehe Abbildung 25B). Der Reaktionsansatz wurde danach jeweils mit 1 mM 2-Mercaptoethanol (BME) versetzt, um Disulfidbrücken zu reduzieren, die sich möglicherweise zwischen TrxA und dem Cys-haltigen Polypeptid gebildet hatten. Um die Thiolreste in den freigesetzten PA#1-Polypeptiden durch Protonierung gegenüber Lufoxidation und erneuter Ausbildung unerwünschter Disulfid-Bindungen mit anderen Komponenten zu stabilisieren, wurde der Reaktionsansatz gegen sauren CEX-Laufpuffer ($\text{NH}_4\text{OAc}/\text{AcOH}$ pH 4,5) mit 1 mM BME dialysiert, bevor ein finaler subtraktiver CEX-Schritt an einer Resource S-Säule mit 6 mL Bettvolumen die Isolierung des PA#1-Polypeptids im Säulendurchlauf ermöglichte.

Die chemische Spaltung der zuvor lyophilisierten TrxA(Q118)-Fusionsproteine wurde mit der BrCN-Methode bei einer Proteinkonzentration von 5 mg/mL in 70 % (v/v) Ameisensäure über Nacht durchgeführt, wobei der 100fache molare Überschuss an BrCN gegenüber den vorhandenen Met-Resten eingesetzt wurde (Gross, 1967). Das stark saure Reaktionsmilieu und die zweistündige Erwärmung auf 50 °C ermöglichten direkt nach der Spaltungsreaktion die spontane Zyklisierung des freien Glutamins am N-Terminus zu einem Pyroglutamat-Rest und somit die dauerhafte Blockierung der N-terminalen Aminogruppe (vergleiche Abbildung 25C). Mittels subtraktiver AEX-Chromatographie an einer Resource Q-Säule mit 6 mL Bettvolumen zur Abtrennung des freigesetzten TrxA wurden Pga-PA#1-Polypeptide in reiner Form erhalten.

Nach der Konzentrationsbestimmung der PA#1-Polypeptide anhand der Absorption bei 205 nm (Scopes, 1974) und Bestätigung der Probenreinheit durch UV-Vis-Spektroskopie

wurden die erwarteten Molekülmassen durch ESI-MS-Messungen nachgewiesen (siehe Abbildung 26 und Tabelle 10). Die Polypeptid-Präparationen zeichneten sich durch einen hohen Grad an Monodispersität aus.

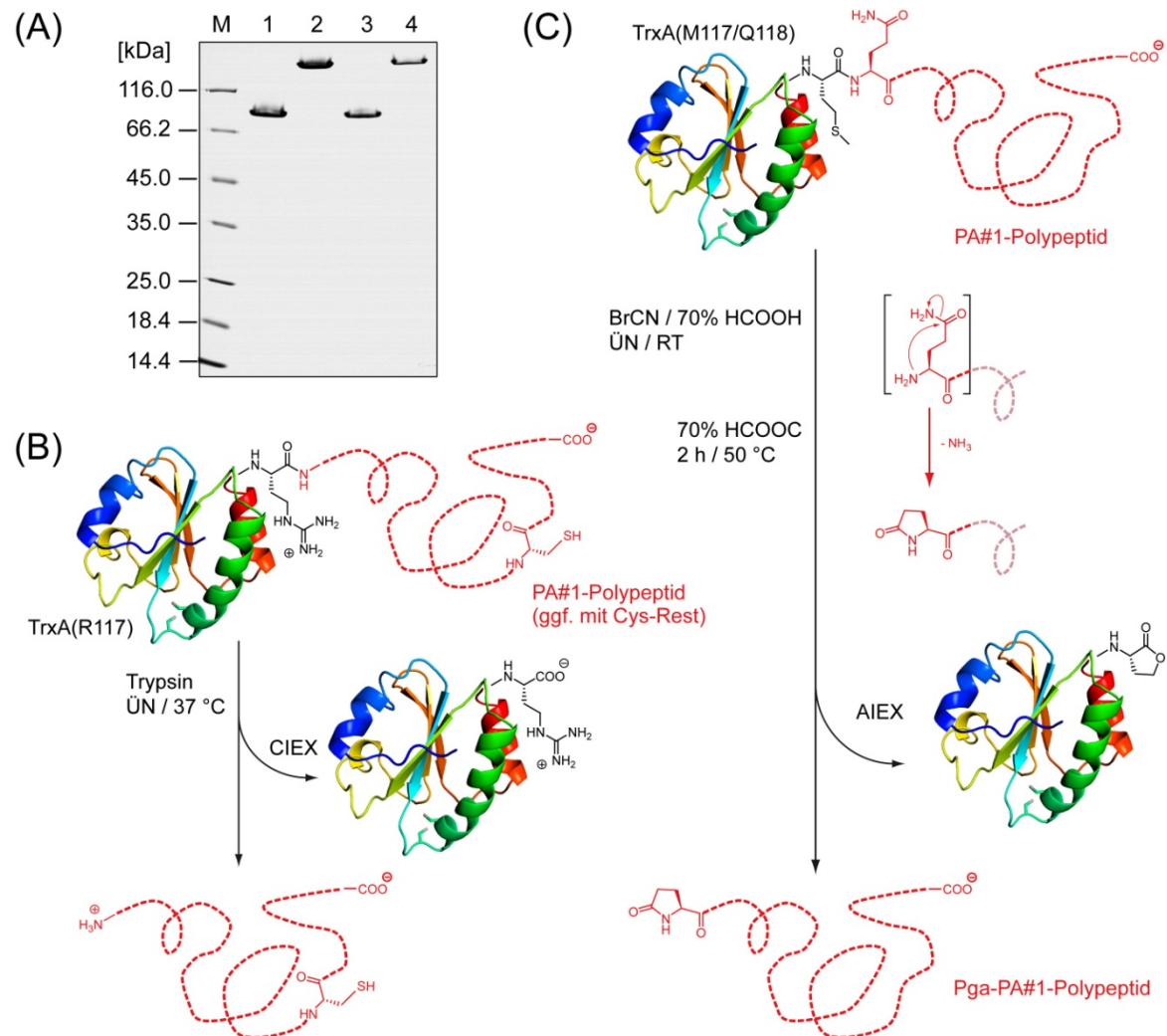


Abbildung 25: Produktion von N-terminal geschützten und Cys-haltigen PA#1-Polypeptiden. (A) SDS-PAGE der gereinigten TrxA-Fusionsproteine. Die Spur M bezeichnet den Protein-Marker. Spur 1: TrxA(Q118)-PA#1(200); 2: TrxA(Q118)-PA#1(200)-G₄KG₄-PA#1(200); 3: TrxA(R117)-PA#1(200)-Cys; 4: TrxA(R117)-PA#1(200)-G₄CG₄-PA#1(200). Die Banden der Fusionsproteine erscheinen im Gel bei stark erhöhten apparenten Molekulargewichten in dem ansonsten für TrxA-PAS(200)- und -PAS(400)-Konstrukte erwarteten Bereich. (B) Die PA#1-Polypeptide mit einem einzelnen Cys-Rest wurden mittels tryptischer Spaltung von TrxA(R117)-Fusionsproteinen erhalten. (C) Nach der Freisetzung des PA#1-Polypeptids von seinem TrxA(Q118)-Fusionspartner durch Bromcyan-Spaltung kann die spontane Pyroglutamat-Zyklisierung des N-terminalen Glutamins direkt durch Erwärmen in der sauren Spallösung erreicht werden.

Jeweils 60 nmol der PA#1-Polypeptid-Sequenzen wurden unter Verwendung geläufiger Methoden der Säureamid-Chemie zur Konjugation von Aminogruppen an aktivierte Carboxylgruppen bzw. durch Thiol-Chemie mittels thiol-reaktiver Gruppen an die photometrisch gut nachweisbaren Chromophore von Fluorescein- und Coumarin-

derivaten als Modellverbindungen für *Small-Molecule-Drugs* gekoppelt. Die verschiedenen Kopplungsreaktionen sind in Abbildung 27 illustriert. Alle beschriebenen Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

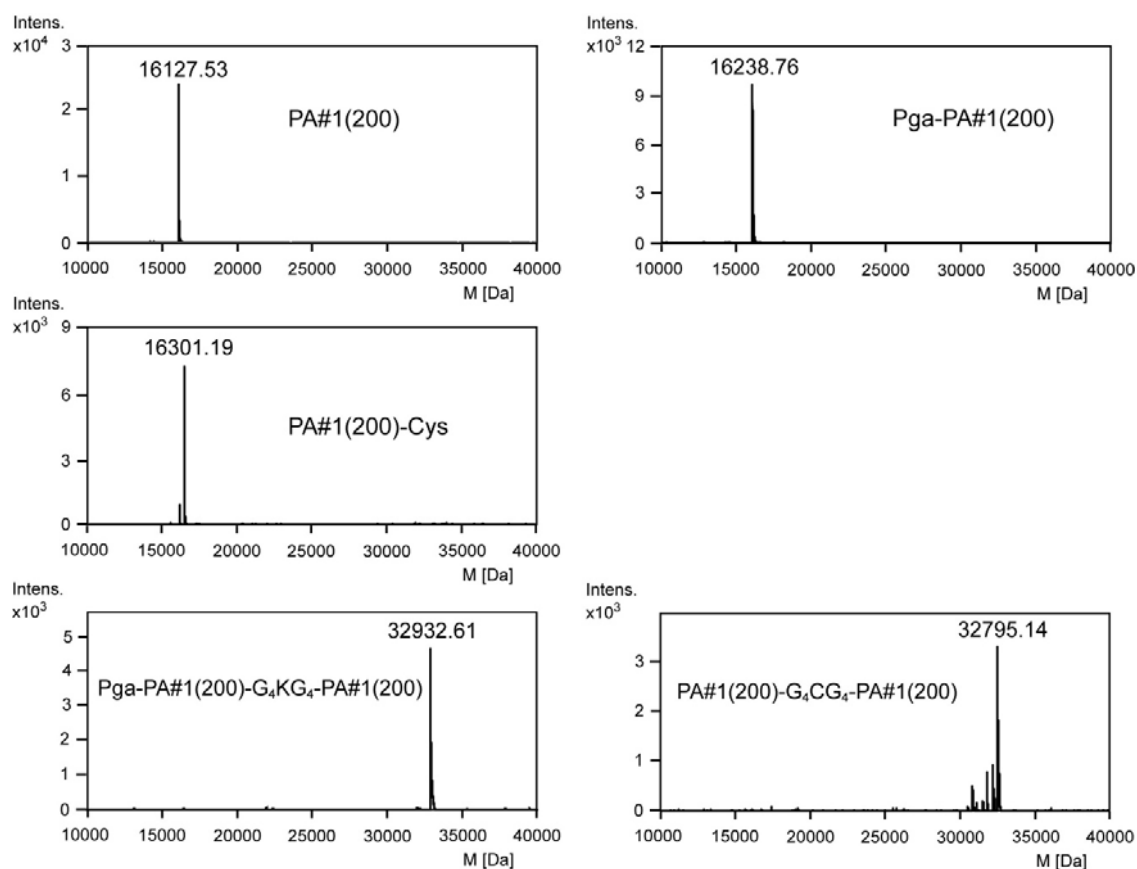


Abbildung 26: Dekonvolvierte ESI-MS-Spektren der modifizierten PA#1-Polypeptide. Die erwarteten Molekulargewichte (siehe Tabelle 9) wurden innerhalb der Messtoleranz des verwendeten 6210 Time-of-Flight LC/MS-Massenspektrometers von ± 2 Da nachgewiesen.

Die Aminogruppen des N-Terminus von PA#1(200) sowie der Lysin-Seitenkette von Pga-PA#1(200)-G₄KG₄-PA#1(200) wurden mit 5/6-Carboxyfluorescein-NHS-Ester (5/6-CF-NHS) in 50 mM NaHCO₃ pH 8,0 zur Reaktion gebracht. Weiterhin wurde PA#1(200) unter Einsatz von Iodessigsäure-NHS-Ester (I-Ac-NHS) mit einer N-terminalen Iodacetyl-Gruppe modifiziert. Der NHS-Ester wurde dazu jeweils in wasserfreiem DMF vorgelöst und im fünffachen molaren Überschuss für 1 h mit dem Polypeptid inkubiert.

Sowohl die chemische Kopplung als auch die Charakterisierung von Cystein-haltigen PA#1-Polypeptiden mit ESI-MS und SEC-Chromatographie erforderten zunächst die Reduktion in 100 mM NaP_i pH 4,5 mit jeweils 1 mM TCEP und EDTA für 1 h, damit die Thiol-Gruppen vollständig in ihrer aktiven reduzierten Form vorlagen. Zur Reaktion mit 5-Iodacetamido-Fluorescein (5-IAF) wurde die thiol-reaktive Verbindung in wasserfreiem

DMF gelöst und direkt dem Reduktionsansatz im siebenfachen molaren Überschuss zugegeben. Zur Vermeidung der Reoxidation der empfindlichen Thiol-Gruppen wurde erst danach der pH-Wert durch Titration mit einem zuvor bestimmten Volumen an 500 mM Na₂HPO₄ pH 12,5 auf 7,5 angehoben, um durch Deprotonierung die Thiolat-Nucleophile bereitzustellen, und die Kopplungsreaktion wurde für 1 h fortgesetzt.

Tabelle 10: ESI-MS-Messungen der PA#1-Polypeptide und ihrer Kopplungsprodukte. Im Rahmen der Messgenauigkeit von ±2 Da wurde die korrekte Masse aller Moleküle bestätigt.

Polypeptid	berechnete Masse ^a [Da]	gemessene Masse ^b [Da]	Abweichung [Da]
PA#1(200)	16127,5	16127,5	0
Pga-PA#1(200)	16238,6	16238,8	-0,2
PA#1(200)-Cys	16301,7	16301,2	0,5
I-Ac-PA#1(200)	16295,5	16295,1	0,4
Pga-PA#1(200)-G ₄ KG ₄ -PA#1(200)	32932,7	32932,6	0,1
PA#1(200)-G ₄ CG ₄ -PA#1(200)	32796,6	32795,1	1,5
Flu-PA#1(200)	16485,8	16485,3	0,5
Pga-PA#1(200)-G-AMC	16452,8	16452,7	0,1
PA#1(200)-Cys(Flu)	16689,0	16689,2	-0,2
MMC-Ac-PA#1(200)	16359,7	16359,4	0,3
Pga-PA#1(200)-G ₄ K(Flu)G ₄ -PA#1(200)	33291,0	33291,1	-0,1
PA#1(200)-G ₄ C(Flu)G ₄ -PA#1(200)	33183,8	33184,3	-0,5

^a berechnet mit Hilfe des Programms ProtParam (www.expasy.org) sowie der Massen der Kopplungsreagenzien laut Herstellerangaben

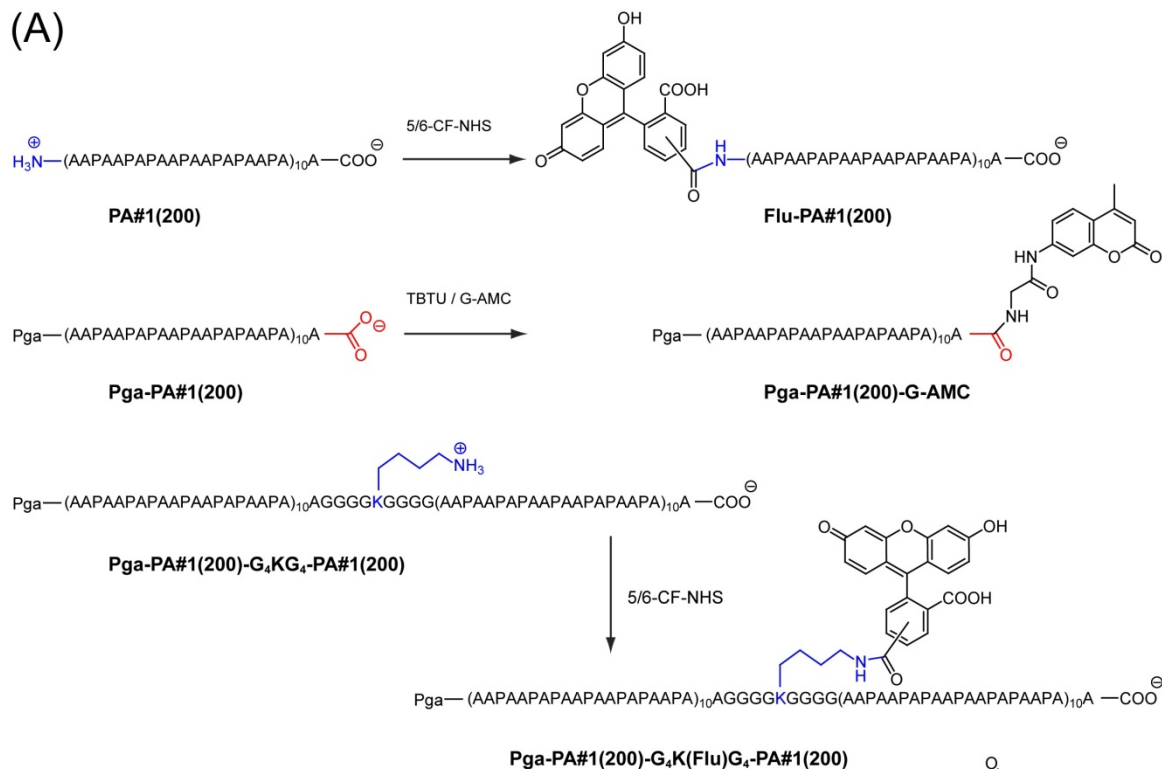
^b durch ESI-MS bestimmt mit 6210 Time-of-Flight LC/MS

Die Coumarin-Derivate 7-Mercapto-4-methylcoumarin (MMC) und 7-Glycylamido-4-methylcoumarin (G-AMC) wurden in wasserfreiem DMSO gelöst. Das mit Iodessigsäure modifizierte I-Ac-PA#1(200) wurde durch zweistündige Reaktion mit dem fünffachen molaren Überschuss an MMC in 50 mM NaHCO₃ pH 8,0 gekoppelt. Die gleichzeitige Aktivierung und Modifizierung der C-terminalen Carboxylgruppe in Pga-PA#1(200) fand in wasserfreiem DMSO statt, indem dem darin gelösten Polypeptid die Base *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA), das Aktivierungsreagenz *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU) und G-AMC im jeweils fünffachen molaren Überschuss vor der dreistündigen Inkubation zugesetzt wurden. Durch Zugabe von 3:1 (v/v) eiskaltem Diethylether wurde das modifizierte PA#1-Polypeptid aus der Reaktionslösung präzipitiert, abzentrifugiert und nach Abnehmen des Überstands an der Luft getrocknet.

Überschüssige Reagenzien wurden immer nach jeder Kopplungsreaktion vor der weiteren Charakterisierung der Kopplungsprodukte durch Gelfiltration mit PD-10-Säulen

unter Pufferwechsel in 5 mM KPi pH 7,5, 50 mM K_2SO_4 abgetrennt. Der getrocknete Rückstand aus dem Kopplungsansatz mit G-AMC wurde in demselben Puffer aufgenommen und ebenfalls durch PD-10-Filtration von Resten der Kopplungsreagenzien befreit.

(A)



(B)

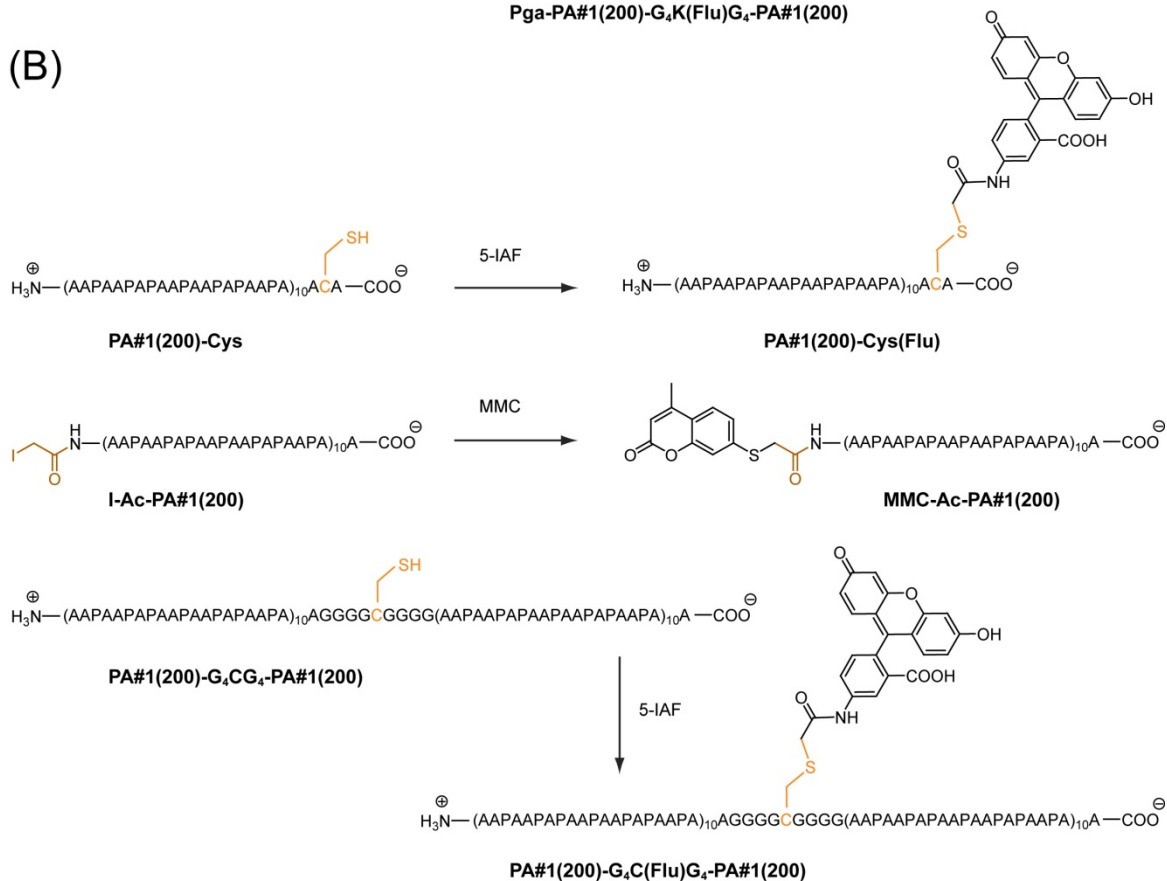


Abbildung 27: Kopplungschemie der PA#1-Polypeptide. Die PA#1-Aminosäuresequenzen sind der Übersichtlichkeit halber im Ein-Buchstaben-Code wiedergegeben, und die Bezeichnungen für die Polypeptide und deren Kopplungsprodukte sind fett gedruckt. **(A)** Säureamid-Chemie. Der N-Terminus und Lysin-Reste sind blau markiert, der C-Terminus in roter Farbe. Von oben nach unten: Markierung des N-Terminus mit Fluorescein-NHS-Ester; C-terminale Aktivierung des Pga-Konstrukts mit TBTU und Kopplung an Glycyl-AMC; selektive Kopplung eines internen Lysin-Rests mit Fluorescein-NHS-Ester. **(B)** Thiol-Chemie. Cystein ist orange dargestellt und die Iodacetamid-Gruppe braun. Von oben nach unten: Kopplung eines einzelnen terminalen Cysteinrests mit Iodacetamido-Fluorescein; Markierung eines Iodacetamid-modifizierten Polypeptids mit MMC; Reaktion eines einzelnen internen Cysteins mit Iodacetamido-Fluorescein. Für Abkürzungen siehe Text.

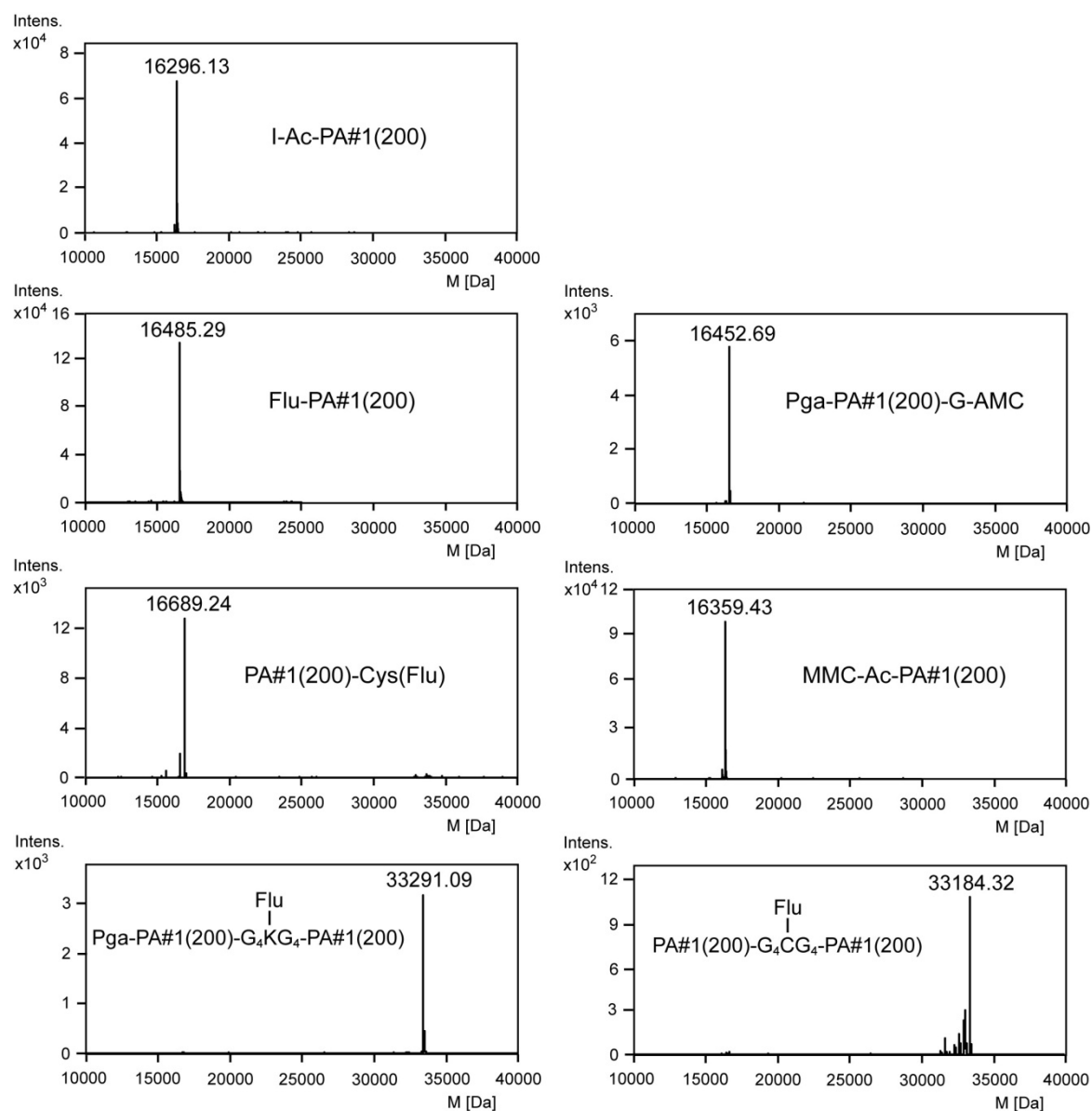


Abbildung 28: Dekonvolvierte ESI-MS-Spektren der Kopplungsprodukte mit modifizierten PA#1-Polypeptiden. Die erwarteten Molekulargewichte (siehe Tabelle 10) wurden innerhalb der Messtoleranz des verwendeten 6210 Time-of-Flight LC/MS-Massenspektrometers von ± 2 Da nachgewiesen.

Die gekoppelten PA#1-Polypeptide fanden sich aufgrund ihres großen hydrodynamischen Volumens ausschließlich im Ausschlussvolumen der PD-10-Säulen, wohingegen kleine Moleküle die gesamte Säulenmatrix durchwanderten.

Mit UV/Vis-Spektroskopie wurden Proben des PD-10-Durchlaufs hinsichtlich des Gehalts der chromophoren Kopplungsprodukte überprüft, bevor durch ESI-MS-Messungen (Abbildung 28) die Molekülmassen und die Monodispersität aller erwarteten Kopplungsprodukte bestätigt wurden (siehe auch Tabelle 10).

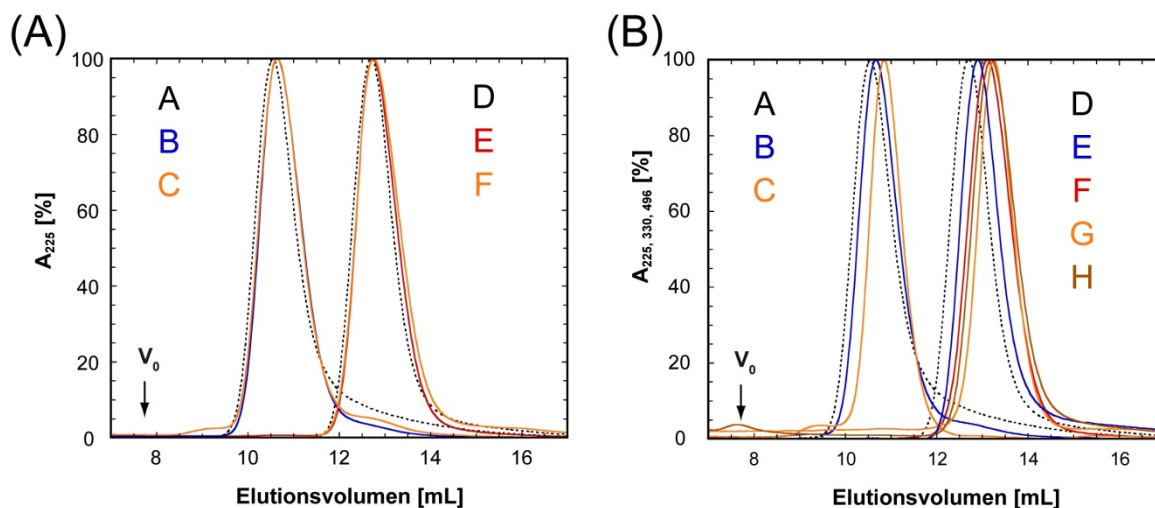


Abbildung 29: SEC-Profile der PA#1-Polypeptide und ihrer Kopplungsprodukte an Superdex 200 10/30 GL. Das SEC-Ausschlussvolumen V_0 ist markiert (24 mL Bettvolumen). Die Polypeptid-Spezies sind mit Buchstaben in den zuvor für die Kopplungschemie verwendeten Farben benannt (vergleiche Abbildung 20; blau: Kopplung über Amino-Gruppe; rot: Kopplung über Carboxyl-Gruppe; orange: Kopplung über Thiol-Gruppe; braun: Kopplung über Iodacetamid-Gruppe); zum Vergleich sind PA#1(200) und PA#1(400) schwarz gestrichelt dargestellt. **(A)** Chromatogramm der freien PA#1-Polypeptide. Die Absorption der Peptidbindung wird bei 225 nm verfolgt. Spezies A: PA#1(400); B: Pga-PA#1(200)-G₄KG₄-PA#1(200); C: PA#1(200)-G₄CG₄-PA#1(200); D: PA#1(200); E: Pga-PA#1(200); F: PA#1(200)-Cys. Der Vergleich mit den konventionellen Sequenzen PA#1(200) und PA#1(400) bringt keine nennenswerten Unterschiede im hydrodynamischen Volumen ans Licht. **(B)** Chromatogramm der mit PA#1-Polypeptiden gekoppelten Chromophore. Die Absorption von Fluorescein und Coumarin wurde bei deren charakteristischen Absorptionsmaxima von 496 bzw. 330 nm verfolgt. Spezies A: PA#1(400); B: Pga-PA#1(200)-G₄K(Flu)G₄-PA#1(200); C: PA#1(200)-G₄C(Flu)G₄-PA#1(200); D: PA#1(200); E: Flu-PA#1(200); F: Pga-PA#1(200)-G-AMC; G: PA#1(200)-Cys(Flu); H: MMC-Ac-PA#1(200). Minimale Verschiebungen der Elutionsvolumina sind auf schwache hydrophobe Interaktionen der Farbstoffe mit der Säule zurückzuführen.

Um die spezifischen Absorptionseigenschaften der Fluorescyl- und Coumaryl-Reste mit dem großen hydrodynamischen Volumen der PA#1-Polypeptide und ihrem charakteristischen chromatographischen Laufverhalten experimentell zu korrelieren, wurden alle Ausgangsverbindungen und Kopplungsprodukte mittels analytischer SEC in

50 mM NH_4HCO_3 , 500 mM NaCl an einer Superdex 200 10/30 GL-Säule mit 24 mL Bettvolumen analysiert. Die Absorption der Peptidbindung wurde bei 225 nm detektiert, ebenso wie die spezifischen Absorptionsmaxima von Fluorescein bei 496 nm (Sjöback *et al.*, 1995) und des substituierten Coumarins bei 330 nm (Reddy *et al.*, 1986).

Die modifizierten (noch ungekoppelten) PA#1-Polypeptide nehmen erwartungsgemäß dasselbe hydrodynamische Volumen ein wie die konventionellen PA#1(200)- und PA#1(400)-Polypeptide (siehe Abbildung 29A), da sie sich nur um einige wenige Aminosäurereste unterscheiden. Die Kopplungsprodukte der PA#1-Polypeptide zeigen dagegen eine leichte Verschiebung hin zu größeren Elutionsvolumina (siehe Abbildung 29B). Dieser Effekt ist nicht auf die tatsächlichen Molekülmassen der Polypeptide zurückzuführen, die sich ja durch die Kopplung eines Chromophors leicht erhöhen. Vielmehr muss die verlängerte Retentionszeit die Folge reversibler hydrophober Interaktionen der gekoppelten Fluorescyl- und Coumaryl-Gruppen mit der SEC-Säulenmatrix sein. Bei der hier gezeigten SEC-Charakterisierung konnten durch Kalibrierung der SEC-Säule die beobachteten Elutionsvolumina apparenten Molekulargewichten zugeordnet werden (zusammengestellt in Tabelle 11).

Tabelle 11: SEC-Elutionsvolumina und apparente Molekulargewichte der PA#1-Polypeptide und ihrer Kopplungsprodukte. Eine Kalibrierung der SEC-Säule (an Superdex 200 10/30 GL, 24 mL Bettvolumen) erlaubte die Abschätzung apparter Molekülmassen sowie des hydrodynamischen Vergrößerungseffekts.

Polypeptid	Elutionsvolumen [mL]	Berechnetes M^a [kDa]	Apparentes M^b [kDa]	Vergrößerungsfaktor ^c für M
PA#1(200)	12,69	16,1	133,7	8,3
Pga-PA#1(200)	12,74	16,2	130,5	8,1
PA#1(200)-Cys	12,74	16,3	130,5	8,0
PA#1(400)	10,55	32,2	374,9	11,6
Pga-PA#1(200)-G ₄ KG ₄ -PA#1(200)	10,65	32,9	357,2	10,9
PA#1(200)-G ₄ CG ₄ -PA#1(200)	10,65	32,8	357,2	10,9
Flu-PA#1(200)	12,88	16,5	122,0	7,4
Pga-PA#1(200)-G-AMC	13,07	16,5	111,4	6,8
PA#1(200)-Cys(Flu)	13,22	16,7	103,6	6,2
MMC-Ac-PA#1(200)	13,16	16,4	106,6	6,5
Pga-PA#1(200)-G ₄ K(Flu)G ₄ -PA#1(200)	10,65	33,3	357,2	10,7
PA#1(200)-G ₄ C(Flu)G ₄ -PA#1(200)	10,83	33,2	327,6	9,9

^a berechnet mit Hilfe des Programms ProtParam (www.expasy.org) sowie der Massen der Kopplungsreagenzien laut Herstellerangaben

^b experimentell durch SEC bestimmt

^c Verhältnis des apparenten zum berechneten Molekülgewicht

Die PA#1-Kopplungsprodukte aller durchgeführten Reaktionen zeigten hydrodynamische Volumina in derselben Größenordnung wie die PA#1-Ausgangspolypeptide und zugleich die charakteristische Absorption des jeweils gekoppelten Chromophors. Außerdem wurde anhand der nur sehr schwach ausgeprägten Wechselwirkungen der hydrophoben aromatischen Verbindungen mit der SEC-Säulenmatrix die hohe Hydrophilie deutlich, welche den Kopplungsprodukten durch die PA#1-Polypeptide vermittelt wird.

3.2.2 Eigenschaften von geladenen PAS-Sequenzen

Generell finden sich unter den Polymeren, die derzeit zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit *in vivo* an pharmakologische Wirkstoffe gekoppelt werden, zahlreiche makromolekulare Verbindungen mit Eigenladungen. Der Einsatz negativ geladener Polypeptid-Sequenzen hat beispielsweise in Form von Polyglutamat-modifizierten Cytostatika wie Taxol (Paclitaxel polyglumex, CTI Biopharma; Langer *et al.*, 2008) und Camptothecin (CTI Biopharma; Homsy *et al.*, 2007) klinische Testphasen erreicht, ebenso wie ein Konjugat des menschlichen Wachstumshormons hGH mit dem XTEN-Polypeptid (Versartis; Yuen *et al.*, 2013), bei dem etwa jeder sechste Aminosäurerest Glutaminsäure ist. Auch Konjugate von Biopolymeren auf der Grundlage negativ geladener Kohlenhydrate wie Polysialinsäure (SuliXen, Xenetic Biosciences; Zhang *et al.*, 2010) oder Heparosan (HEPtune-Technologie, Caisson Biotech; DeAngelis, 2013), u. a. mit Insulin, befinden sich in der präklinischen Entwicklung.

Es lag daher nahe, den Einfluss intrinsischer Ladungen auf die ansonsten gut charakterisierten Eigenschaften des PAS-Biopolymers durch die gezielte Einführung von Lysin- bzw. Glutaminsäure-Resten zu untersuchen. Da Polypeptide mit hoher gleichnamiger Ladungsdichte wie Poly-L-Lysin und Poly-L-Glutaminsäure aufgrund elektrostatischer Abstoßung der Seitenketten in wässriger Lösung bei neutralem pH-Wert eine gestreckte PPII-ähnliche Konformation annehmen (Tiffany & Krimm, 1968b), war die Veränderung des hydrodynamischen Volumens der PAS-Polypeptide infolge des Einbaus geladener Seitenketten von besonderem Interesse.

Zur Charakterisierung des Einflusses von Ladungen auf die Eigenschaften von PAS-Polypeptiden wurde die PAS#1-Sequenz als Modell herangezogen. Durch die graduelle Substitution der drei Serin-Reste pro 20mer-Genkassette gegen Glutaminsäure bzw. Lysin wurden systematisch negative bzw. positive Ladungen in das Polypeptid eingeführt, wobei jedoch die Position und Häufigkeit hydrophiler Seitenketten innerhalb der Sequenz beibehalten wurde (siehe Abbildung 30). Auf diese Weise sollten

beobachtete Veränderungen der hydrodynamischen und konformationellen Eigenschaften primär auf die Auswirkungen der Ladungen beschränkt sein. Die Assemblierung der PAS#1-basierten Genkassetten aus 60 bp-Minimaleinheiten paarweise hybridisierter Oligodesoxynukleotide erfolgte nach dem bereits für die klassischen Sequenzen beschriebenen Verfahren (siehe Abschnitt 3.1.2).

PAS#1	gcc TCT CCAGCTGCACCTGCTCCAGCA TCT CCTGCTGCACCAGCTCCG TCT GCTCCTGCT -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ AGAGGTCGACGTGGACGAGGTCGTCTTGACGACGTGGTCGAGGCAGACGAGGACGAcgg
(20 AS)	Ala Ser ProAlaAlaProAlaProAla Ser ProAlaAlaProAlaPro Ser AlaProAla
PAS#1-E1	gcc TCT CCAGCTGCACCTGCTCCAGCA GAA CCTGCTGCACCAGCTCCG TCT GCTCCTGCT -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ AGAGGTCGACGTGGACGAGGTCGTCTTGACGACGTGGTCGAGGCAGACGAGGACGAcgg
(20 AS)	Ala Ser ProAlaAlaProAlaProAla Glu ProAlaAlaProAlaPro Ser AlaProAla
PAS#1-E2	gcc GAA CCAGCTGCACCTGCTCCAGCA GAA CCTGCTGCACCAGCTCCG TCT GCTCCTGCT -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ CTTGGTCGACGTGGACGAGGTCGTCTTGACGACGTGGTCGAGGCAGACGAGGACGAcgg
(20 AS)	Ala Glu ProAlaAlaProAlaProAla Glu ProAlaAlaProAlaPro Ser AlaProAla
PAS#1-E3	gcc GAA CCAGCTGCACCTGCTCCAGCA GAA CCTGCTGCACCAGCTCCG GAA GCTCCTGCT -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ CTTGGTCGACGTGGACGAGGTCGTCTTGACGACGTGGTCGAGGCCTTCGAGGACGAcgg
(20 AS)	Ala Glu ProAlaAlaProAlaProAla Glu ProAlaAlaProAlaPro Glu AlaProAla
PAS#1-K1	gcc TCT CCAGCTGCACCTGCTCCAGCA AAA CCTGCTGCACCAGCTCCG TCT GCTCCTGCT -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ AGAGGTCGACGTGGACGAGGTCGTTTTGGACGACGTGGTCGAGGCAGCGAGGACGAcgg
(20 AS)	Ala Ser ProAlaAlaProAlaProAla Lys ProAlaAlaProAlaPro Ser AlaProAla
PAS#1-K2	gcc TCT CCAGCTGCACCTGCTCCAGCA AAA CCTGCTGCACCAGCTCCG AAA GCTCCTGCT -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ AGAGGTCGACGTGGACGAGGTCGTTTTGGACGACGTGGTCGAGGCAGCGAGGACGAcgg
(20 AS)	Ala Ser ProAlaAlaProAlaProAla Lys ProAlaAlaProAlaPro Lys AlaProAla

Abbildung 30: Zusammensetzung der geladenen PAS#1-Sequenzen. Dargestellt sind die zur Gen-Assemblierung verwendeten 60 bp-Minimaleinheiten aus komplementären Oligodesoxynukleotiden, jeweils mit einem Standard-DNA-Überhang. Die hydrophilen Aminosäuren sind farbig fett hervorgehoben.

Nach der Assemblierung entsprechender Gen-Kassetten für Polypeptide einer Länge von 200 AS und deren Sequenzbestätigung im Hilfsvektor pUC19-duo*Earl/SapI* wurden diese zur Expression als Fusionsproteine in die Expressionsvektoren pSUMO bzw.

pTrxA(R117) inseriert. Entsprechend der dargelegten Expressionsstrategie für verschiedene Typen von PAS-Polypeptiden (siehe Abschnitt 1.4) wurde TrxA(R117) mit dem C-terminalen Arg-Rest als Fusionspartner für die negativ geladenen PAS#1-Sequenzen gewählt. Diese konnten mit Hilfe der milden Trypsin-Spaltung aus den Fusionsproteinen freigesetzt werden, wobei die potentiell reaktiven Ser- und Glu-Reste vor chemischer Modifikation geschützt wurden. Da ein tryptischer Verdau aber zur Fragmentierung der PAS#1-Polypeptide mit positiven Ladungen geführt hätte, wurden diese Sequenzen in Fusion mit SUMO hergestellt. Die SUMO-Fusionsproteine erlaubten die Abspaltung des SUMO-Fusionspartners durch die konformationsspezifische SUMO-Protease Ulp1 ohne negative Auswirkungen auf das freigesetzte PAS#1-Polypeptid.

Die gentechnische Herstellung der Fusionsproteine mit den geladenen PAS#1-Polypeptiden erfolgte in 2 L-Schüttelkolben in *E. coli* BL21(DE3)/pLysE/pSUMO-PAS bei 37 °C für SUMO-Fusionsproteine bzw. in *E. coli* KS272/pTrxA(R117)-PAS bei 30 °C für TrxA-Fusionsproteine. Sowohl der T7-Promotor von pSUMO als auch der *lacUV5*-Promotor von pTrxA(R117) wurden mit IPTG induziert, allerdings wurde die Basalexpression der Promotoren auf unterschiedliche Weise unterdrückt. Der Stamm BL21(DE3) zur Expression der SUMO-Fusionsproteine war mit dem Hilfsplasmid pLysE kotransformiert, welches konstitutiv T7-Lysozym als kompetitiven Inhibitor der T7-RNA-Polymerase bereitstellt (Studier, 1991). Der *lacUV5*-Promotor von pTrxA(R117) wurde durch Zusatz von 1 % (w/v) Glucose zum Kulturmedium durch Katabolit-Repression kontrolliert (Plückthun & Skerra, 1989).

Die Reinigung aller Fusionsproteine mit geladenen PAS#1-Sequenzen erfolgte analog zu dem Verfahren zur Herstellung neutraler PAS-Polypeptide (siehe Abschnitt 3.1.6). Die geernteten Zellen wurden an der French Press aufgeschlossen, und der Gesamtzellextrakt wurde anschließend für 15 min auf 70 °C erhitzt, was die Präzipitation der meisten Wirtszellproteine zur Folge hatte und deren Abtrennung durch Zentrifugation ermöglichte. Die fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung des geklärten Überstands ermöglichte die Isolierung der PAS#1-Fusionsproteine bei 35 bis 40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung in hoher Reinheit. Auf diese Weise führte jeweils ein einziger chromatographischer Reinigungsschritt durch Ionenaustauschchromatographie zu homogenem Fusionsprotein.

Bei der IEX-Reinigung wurden die zusätzlichen Ladungen der PAS#1-Polypeptide für eine verstärkte Bindung an die verwendete Ionenaustauscher-Säule ausgenutzt. Daher fand die Reinigung der TrxA(R117)-Fusionsproteine mit negativ geladenen PAS#1-Polypeptiden durch AEX-Chromatographie (in 20 mM Tris/HCl pH 9,5) an einer

Resource Q-Säule mit 6 mL Bettvolumen mit einem NaCl-Konzentrationsgradienten von 0 bis 100 mM statt. Die SUMO-Fusionsproteine mit positiven Ladungen im PAS#1-Polypeptid wurden mittels CEX-Chromatographie (in 40 mM NH₄OAc/AcOH pH 4,5) an einer Resource S-Säule mit 6 mL Bettvolumen unter Verwendung eines NaCl-Konzentrationsgradienten von 0 bis 500 mM gereinigt. Die Fraktionen der IEX-Eluate wurden vor der Protein-Konzentrationsbestimmung jeweils mit SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft. Alle Fusionsproteine ergaben Ausbeuten um die 10 mg/L Kulturmedium, wobei die graduelle Einführung gleichnamiger Ladungen in das PAS#1-Polypeptid keine nennenswerte Auswirkung auf die Ausbeuten zur Folge hatte.

Zur Spaltung der TrxA(R117)-Fusionsproteine wurde den gereinigten AEX-Eluaten im Verhältnis 20:1 (w/w) rekombinantes Trypsin (TripLE Select Enzyme) zugegeben (Gesamtvolumen 20 mL), und der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die CEX-Eluate der SUMO-Fusionsproteine wurden gegen 20 mM Tris/HCl pH 9,5, 50 mM NaCl dialysiert und zur enzymatischen Spaltung mit 1:1000 (w/w) Ulp1 in einem Gesamtvolumen von 20 mL für 1 h bei 37 °C versetzt.

Tabelle 12: ESI-MS-Messungen der geladenen PAS#1-Polypeptide. Innerhalb der Messgenauigkeit von ± 2 Da wurde die Molmasse aller Polypeptide verifiziert.

Polypeptid	berechnete Masse ^a [Da]	gemessene Masse ^b [Da]	Abweichung [Da]
PAS#1-E1(200)	17027,8	17027,6	0,2
PAS#1-E2(200)	17448,2	17448,0	0,2
PAS#1-E3(200)	17868,6	17868,6	0
PAS#1-K1(200)	17018,4	17018,0	0,4
PAS#1-K2(200)	17429,4	17429,0	0,4

^a berechnet mit Hilfe des Programms ProtParam (www.expasy.org)

^b durch ESI-MS bestimmt mit 6210 Time-of-Flight LC/MS

Für die anschließende subtraktive Chromatographie wurde jeweils ein IEX-Chromatographiematerial gewählt, welches die Bindungswechselwirkungen der freigesetzten geladenen PAS#1-Sequenzen mit der Säule durch elektrostatische Abstoßung gleichnamiger Ladungen minimierte. So wurde für die Spaltansätze der Glu-haltigen Sequenzen in CEX-Laufpuffer (40 mM NH₄OAc/AcOH pH 4,5) eine Source 15S-Säule verwendet, wobei die negativ geladenen Sulfonat-Gruppen des Säulenmaterials den Durchlauf des freigesetzten Polypeptids begünstigten. Die Lys-haltigen Polypeptide

passierten zur Reinigung aus dem Ansatz der Spaltungsreaktion in AEX-Laufpuffer (20 mM Tris/HCl pH 9,5) eine Source 15Q-Säule. Hier förderten die positiven Ladungen der quartären Ammonium-Gruppen der Säulenmatrix den Durchlauf des Polypeptids. Der abgespaltene Fusionspartner TrxA bzw. SUMO sowie Reste des ungespaltenen Fusionsproteins blieben jeweils am IEX-Säulenmaterial gebunden und konnten so vom PAS#1-Polypeptid abgetrennt werden. Nachdem die spektroskopische Reinheit der isolierten Polypeptide mit Hilfe von UV/Vis-Spektroskopie bestätigt und deren Konzentration anhand der Absorption bei 205 nm (in 5 mM KP_i pH 7,5, 50 mM K_2SO_4) bestimmt worden war (Scopes, 1974), wurden die erwarteten Massen aller geladenen PAS#1-Polypeptide mittels ESI-MS-Analyse ermittelt (Tabelle 12).

Zunächst wurde der Einfluss der eingebauten Ladungen in den PAS#1-Sequenzen auf die elektrophoretische Mobilität in der SDS-PAGE sowie auf deren Färbeverhalten untersucht. Dazu wurden alle geladenen PAS#1-Polypeptide sowohl als Fusionsproteine mit TrxA bzw. SUMO (Abbildung 31A) als auch in Form der freien Polypeptide (Abbildung 31B) auf ein SDS-Gel geladen, wobei das neutrale PAS#1-Polypeptid zum Vergleich diente. Die Fusionsproteine wurden mit Coomassie Brilliant-Blau R-250 gefärbt (De St. Groth *et al.*, 1963), während für die freien Polypeptide wieder die BaI_2 -Methode herangezogen wurde (Skoog, 1979).

Bei dieser vergleichenden Analyse fiel zunächst die erhöhte elektrophoretische Mobilität auf, die alle geladenen PAS#1-Polypeptide in Abhängigkeit von ihrer Ladungsdichte zeigen. Diese ist für die positiv geladenen Varianten deutlich stärker ausgeprägt und lässt eine erhöhte SDS-Bindekapazität vermuten, welche im Zusammenhang mit der Bindung negativ geladener SDS-Mizellen durch die Lys-Reste stehen könnte. Die intrinsischen negativen Ladungen der Glu-haltigen PAS#1-Sequenzen führen dagegen zu keiner zusätzlichen Mobilität im elektrischen Feld der Elektrophorese. Die Lys-haltigen Polypeptide sind als einzige PAS-Polypeptide auch in isolierter Form (ohne Fusionspartner) der – wenn auch schwach ausgeprägten – Färbung mit Coomassie Brilliant-Blau R-250 zugänglich und ergeben zudem intensivere Banden bei der BaI_2 -Methode. Auch diese Effekte können durch die ionischen Wechselwirkungen der protonierten Lys-Seitenketten mit den Sulfonat-Gruppen des Coomassie-Farbstoffs bzw. den Polyiodid-Ionenkomplexen der BaI_2 -Färbung erklärt werden. Die Färbefizienz letzterer Methode ist für die negativ geladenen PAS#1-Polypeptide hingegen deutlich herabgesetzt, vermutlich aufgrund der Abstoßung der anionischen farbgebenden Komplexe von den gleichnamigen Ladungen im Polypeptid.

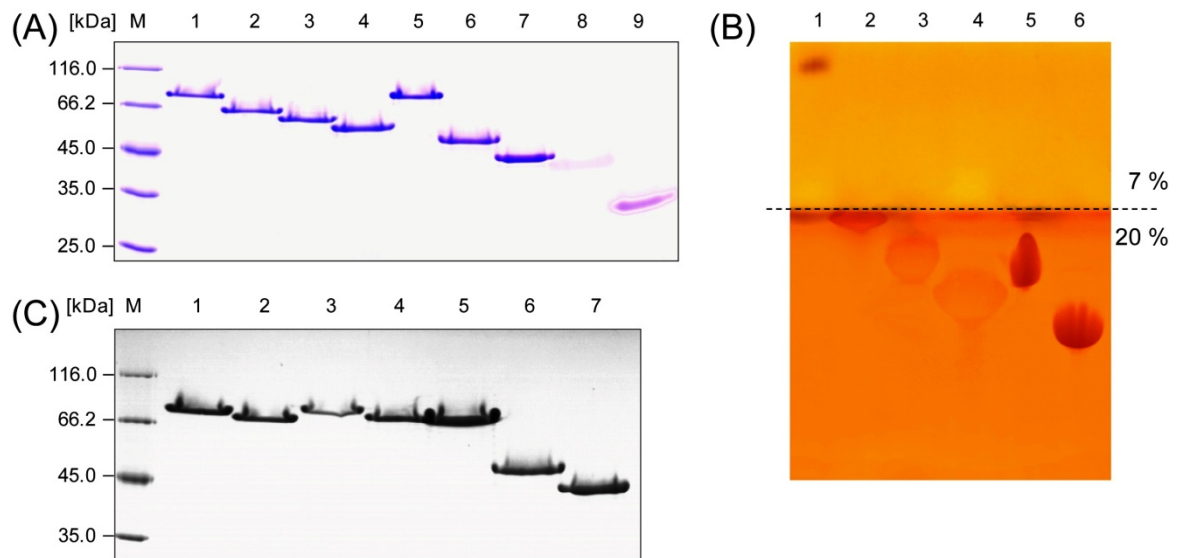


Abbildung 31: SDS-PAGE-Analyse der geladenen PAS#1-Polypeptide als Fusionsproteine und in freier Form. Die Spur M trägt den verwendeten Proteinmarker. **(A)** Coomassie-gefärbtes Gel mit TrxA- und SUMO-Fusionsproteinen (jeweils 3,6 ng) und freie Lys-haltige PAS#1-Polypeptide (jeweils 24 ng). Spur 1: TrxA(R117)-PAS#1(200); 2: TrxA(R117)-PAS#1-E1(200); 3: TrxA(R117)-PAS#1-E2(200); 4: TrxA(R117)-PAS#1-E3(200); 5: SUMO-PAS#1(200); 6: SUMO-PAS#1-K1(200); 7: SUMO-PAS#1-K2(200); 8: PAS#1-K1(200); 9: PAS#1-K2(200). **(B)** Bal₂-gefärbtes Gel mit freien PAS-Polypeptiden (jeweils 120 ng; Lys-haltige Polypeptide: 24 ng). Das SDS-Gel besteht aus einem Sammelgel mit 7 % (w/v) Acrylamid und einem Trenngel mit 20 % (w/v) Acrylamid; die Grenze ist mit einer gestrichelten Linie angedeutet. Während die Laufgeschwindigkeit der geladenen PAS-Spezies in einem engmaschigen SDS-Gelbereich gut sichtbar verlangsamt wurde, war aufgrund der Mobilität des neutralen PAS-Polypeptids die Verwendung eines großporigen Bereichs erforderlich, um alle Polypeptide auf demselben Gel zu vergleichen. Spur 1: PAS#1(200); 2: PAS#1-E1(200); 3: PAS#1-E2(200); 4: PAS#1-E3(200); 5: PAS#1-K1(200); 6: PAS#1-K2(200). **(C)** Gegenüberstellung verschiedener SUMO-PAS-Fusionsproteine und TrxA-Fusionsproteine mit neutralen PAS-Polypeptiden (jeweils 3,6 ng) auf einem Coomassie-gefärbten Gel. Spur 1: TrxA(R117)-PAS#1(200); 2: TrxA-PA#1(200); 3: SUMO-PAS#1(200); 4: SUMO-PA#1(200); 5: SUMO-PAS-cal (siehe Abschnitt 3.2.4); 6: SUMO-PAS#1-K1(200); 7: SUMO-PAS#1-K2(200).

Auch die Gegenüberstellung der in dieser Arbeit hergestellten SUMO-PAS-Fusionsproteine (siehe Abbildung 31C) verdeutlicht anhand des Proteins SUMO-PAS-cal (Spur 5, siehe Abschnitt 3.2.4), dass bereits wenige in das PAS-Polypeptid eingebaute positive Ladungen (in diesem Fall Arginin-Reste) die elektrophoretische Mobilität erhöhen können. Das PAS-cal-Polypeptid ist mit 245 Aminosäureresten (20,5 kDa) deutlich länger als die PAS#1(200)-Sequenz (16,6 kDa). Dennoch bewirken die positiven Ladungen von nur vier Arg-Resten innerhalb der PAS-cal-Sequenz, dass die Bande des SUMO-PAS-cal-Fusionsproteins in der SDS-PAGE sogar signifikant unterhalb der von SUMO-PAS#1(200) läuft. Durch den direkten Vergleich der neutralen PAS#1- und PA#1-Polypeptide in Fusion mit TrxA bzw. SUMO in Abbildung 23C wird klar, dass das SDS-

PAGE-Laufverhalten dieser PAS-Fusionsproteine zwar leicht von der verwendeten PAS-Sequenz abhängt, weniger aber von der Art des Fusionspartners.

Die hydrodynamischen Proportionen der geladenen PAS#1-Polypeptide (in 5 mM KP_i , pH 7,5, 50 mM K_2SO_4) wurden zuerst mittels DLS-Messungen bei 25 °C untersucht. Aus den so ermittelten hydrodynamischen Radien der PAS#1-Polypeptide (Tabelle 13) wurden apparente Molekulargewichte ermittelt und mit den berechneten Molekülmassen verglichen.

Tabelle 13: DLS-Messungen der geladenen PAS#1-Polypeptide. Der apparente Vergrößerungsfaktor des Molekulargewichts nimmt mit der Ladungsdichte der Polypeptide zu.

Polypeptid	berechnetes M^a [kDa]	r_H (beobachtet) ^b [nm]	apparentes M^c [kDa]	Vergrößerungsfaktor ^d für M
PAS#1(200)	16,6	4,9	138,7	8,4
PAS#1-E1(200)	17,0	5,0	145,4	8,6
PAS#1-E2(200)	17,4	5,2	159,4	9,2
PAS#1-E3(200)	17,9	5,6	189,6	10,6
PAS#1-K1(200)	17,0	5,6	189,6	11,2
PAS#1-K2(200)	17,4	5,8	205,8	11,8

^a berechnet mit Hilfe des Programms ProtParam (www.expasy.org)

^b durch DLS-Messung experimentell bestimmt

^c mit der Zetasizer Software 6.32 aus den r_H -Messwerten ermittelt

^d Verhältnis der apparenten zur berechneten Molekülmasse

Der hydrodynamische Radius des PAS#1(200)-Polypeptids wurde durch Einführung geladener Reste nur leicht verändert. Dennoch ist der Trend zu erkennen, dass das Polypeptid mit zunehmender Dichte gleichnamiger Ladungen einen vergrößerten hydrodynamischen Radius zeigt. Eine Erklärung hierfür ist die elektrostatische Abstoßung der gleichnamigen Ladungen, welche zu einer stärker gestreckten Konformation des Peptid-Rückgrats führt. Der Vergrößerungseffekt ist offenbar für die Lysin-haltigen Polypeptide ausgeprägter als für die negativ geladenen Glu-haltigen Varianten. Da alle Messungen in einem Puffer bei mittlerem pH 7,5 im Verhältnis zu den pK_S -Werten stattfanden, waren die Glutaminsäure- ($pK_S = 4,1$) und Lysin-Seitenketten ($pK_S = 10,8$) gleichermaßen ionisiert, so dass bei den PAS#1-Polypeptiden mit gleicher Ladungsdichte eigentlich ähnliche Moleküldimensionen zu erwarten gewesen wären.

Auch mittels SEC wurden die hydrodynamischen Eigenschaften der geladenen PAS#1-Polypeptide im Vergleich zur neutralen Version analysiert. In SEC-Laufpuffer (50 mM NH_4HCO_3 , 500 mM NaCl) wurden an der kalibrierten Superdex 200 10/30 GL-Säule

SEC-Profile der Polypeptide unter Beobachtung der Absorption der Peptidbindung bei 225 nm aufgenommen (Abbildung 32).

In der SEC-Analyse wurden feine Unterschiede in den Elutionsvolumina der geladenen PAS#1-Sequenzen ersichtlich. Mit steigender Zahl gleichnamiger Ladungen innerhalb des Polypeptids kam es zu einer leichten Verringerung der Elutionsvolumina, was einem erhöhten hydrodynamischen Volumen entspricht. Dabei zeigten die jeweiligen PAS#1-Polypeptide mit gleicher Ladungsdichte (PAS#1-E1/-K1 bzw. -E2/-K2) sehr ähnliche Elutionsvolumina und daraus abgeleitete apparente Molekulgewichte (Tabelle 14).

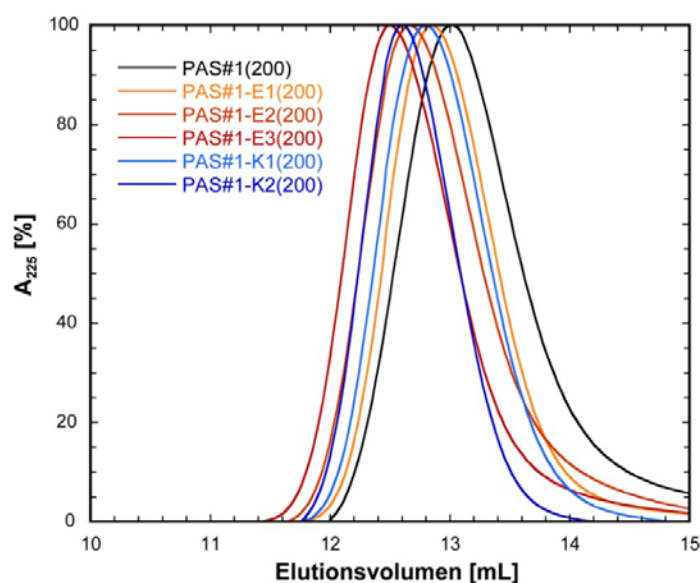


Abbildung 32: SEC-Chromatogramme der geladenen PAS#1-Polypeptide an Superdex 200 10/30 GL. Das SEC-Ausschlussvolumen V_0 betrug 7,6 mL (24 mL Bettvolumen). Negativ geladene Sequenzen sind in rötlichen Farbtönen dargestellt und positiv geladene Spezies in Blautönen.

Tabelle 14: SEC-Daten der geladenen PAS#1-Sequenzen (an Superdex 200 10/30 GL, 24 mL Bettvolumen). Apparente Molekülmassen und der hydrodynamische Vergrößerungseffekt der modifizierten PAS#1-Polypeptide wurden auf Basis der SEC-Kalibrierung der verwendeten Säule abgeschätzt.

Polypeptid	Elutionsvolumen [mL]	berechnetes M^a [kDa]	apparentes M^b [kDa]	Vergrößerungsfaktor ^c für M	Effekt ^d DLS/SEC
PAS#1(200)	13,02	16,6	114,1	6,9	1,2
PAS#1-E1(200)	12,86	17,0	123,2	7,2	1,2
PAS#1-E2(200)	12,65	17,4	136,3	7,8	1,2
PAS#1-E3(200)	12,50	17,9	146,5	8,2	1,3
PAS#1-K1(200)	12,80	17,0	126,8	7,5	1,5
PAS#1-K2(200)	12,59	17,4	140,3	8,1	1,5

^a berechnet mit Hilfe des Programms ProtParam (www.expasy.org)

^b durch SEC-Kalibrierung ermittelt

^c Verhältnis der apparenten zur berechneten Molekülmasse

^d Verhältnis der experimentellen Vergrößerungsfaktoren aus DLS- (Tabelle 13) und SEC-Experimenten (diese Tabelle)

Das Verhältnis der durch DLS und SEC ermittelten hydrodynamischen Vergrößerungsfaktoren (siehe Abschnitt 3.1.10) blieb für alle geladenen PAS#1-Polypeptide annähernd konstant beim Wert des neutralen PAS#1(200)-Polypeptids. Es ergeben sich also keine auffälligen Formveränderungen durch die Einführung von Ladungen, da alle untersuchten Polypeptide dieselben hydrodynamischen Charakteristika zeigen.

Durch CD-spektroskopische Messungen der PAS#1-Polypeptide (in 5 mM KP_i pH 7,5, 50 mM K_2SO_4) wurden die Auswirkungen der eingebauten Ladungen auf die konformationellen Eigenschaften untersucht. Von jedem Polypeptid wurde ein Fern-UV-CD-Spektrum von 190 bis 250 nm aufgenommen. Der Vergleich der CD-Spektren (Abbildung 33) zeigte keine signifikanten Veränderungen infolge der eingeführten Ladungen, lediglich eine Intensitätszunahme des für PAS-Polypeptide charakteristischen Signalminimums bei 200 nm. Die Polypeptide gleicher Ladungsdichte (PAS#1-E1/-K1 bzw. -E2/-K2) zeichneten sich durch annähernd identische CD-Spektren aus. Diese Daten legen nahe, dass die Einführung von Ladungen in die PAS-Sequenzen keine Erhöhung des *Random-Coil*- oder ggf. PPII-Strukturanteils zur Folge hat, zumal das charakteristische Signalminimum bei 200 nm weder signifikant in Richtung des *Random-Coil*-charakteristischen Minimums von 195 nm (Tiffany & Krimm, 1969) noch in Richtung des PPII-Minimums bei 205 nm (Kakinoki *et al.*, 2005) verschoben ist.

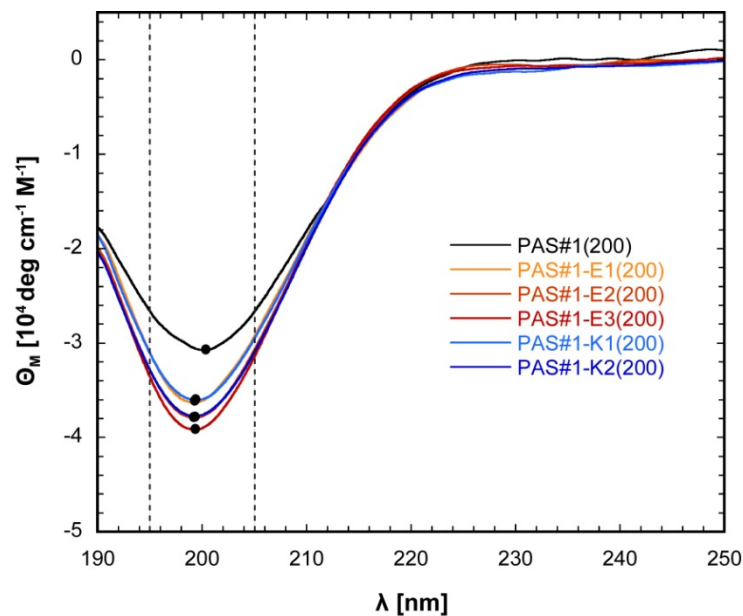


Abbildung 33: CD-Spektren der geladenen PAS#1-Polypeptide. Negativ geladene Sequenzen sind in rötlichen Farbtönen dargestellt und positiv geladene Spezies in Blautönen. Die gemäß Literaturwerten charakteristischen Wellenlängen der *Random-Coil*-Struktur (195 nm) und der PPII-Struktur (205 nm) sind mit gestrichelten Linien markiert, die Signalminima mit schwarzen Punkten.

Da der Prolinanteil in allen PAS#1-Polypeptiden identisch ist, kommt als Ursache für die gesteigerte Signalintensität bei 200 nm (vergleiche dazu auch Tabelle 15) nur die erhöhte Ladungsdichte in den Polypeptiden in Frage, die sich zudem in stark veränderten pI-Werten niederschlägt. Die stärker elongierte Konformation, die die Polypeptide im statistischen Mittel als Folge elektrostatischer Abstoßung annehmen, bringt einen größeren Abstand der Peptidbindungen innerhalb einer Polypeptid-Kette mit sich. Außerdem verursacht die Abstoßung der gleichnamigen Ladungen auch einen gegenseitig erhöhten mittleren Abstand der Polypeptid-Moleküle in Lösung. Beide Effekte könnten die intra- und intermolekularen π -Wechselwirkungen der Peptidbindungen leicht verringern und so die CD-Absorptionsintensität erhöhen (Tiffany & Krimm, 1969).

Tabelle 15: Charakteristische CD-Signalminima der geladenen PAS#1-Sequenzen. Die Spektren der Polypeptide mit gleicher Ladungsdichte haben nahezu dieselben Charakteristika.

Polypeptid	λ_{\min} [nm]	Θ_M [$10^4 \text{ deg M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]	Mol % Prolin	pI ^a
PAS#1(200)	200.2	-3.077	35	5.57
PAS#1-E1(200)	199.3	-3.632	35	3.29
PAS#1-E2(200)	199.3	-3.796	35	3.05
PAS#1-E3(200)	199.4	-3.920	35	2.90
PAS#1-K1(200)	199.4	-3.606	35	10.95
PAS#1-K2(200)	199.2	-3.777	35	11.28

^a berechnet mit Hilfe des Programms ProtParam (www.expasy.org)

Der Effekt der eingeführten Ladungen auf die hydrophoben Wechselwirkungen der geladenen PAS#1-Sequenzen wurde anhand von RPC-Chromatographie mit einer Polystyrol-Matrix untersucht. Hierfür kam eine Resource RPC-Säule mit 1 mL Bettvolumen in Gegenwart von RPC-Laufpuffer (2 % (v/v) ACN; 0,1 % (v/v) Ameisensäure) zum Einsatz. An die Säule gebundene Polypeptide wurden in einem Acetonitril-Konzentrationsgradienten von 2 bis 80 % (v/v) eluiert. Die ermittelten Retentionszeiten im ACN-Gradienten sind in Tabelle 16 zusammengestellt.

Die Lys-haltigen PAS#1-Polypeptide zeigten in Form verkürzter Retentionszeiten an der RPC-Säule ein abgeschwächtes hydrophobes Interaktionsverhalten verglichen mit dem neutralen PAS#1-Polypeptid, vermutlich da die basischen Lysin-Seitenketten im stark sauren Milieu des RPC-Puffers vollständig protoniert sind und das Polypeptid positiv aufladen. Dahingegen waren die Retentionszeiten der Glu-haltigen Polypeptide im Vergleich zu PAS#1(200) nahezu unverändert. Die Glutaminsäure-Seitenketten liegen

unter den vorherrschenden Versuchsbedingungen weitgehend protoniert vor und die Polypeptide tragen keine weitere Ladung außer am protonierten N-Terminus.

Tabelle 16: Hydrophobe Interaktionen der geladenen PAS#1-Polypeptide mit Resource RPC. Das Bettvolumen der Säule betrug 1 mL, die Elution der Polypeptide erfolgte in einem Gradienten von 2 bis 80 % ACN (v/v) über 20 Säulenvolumina bei 2 mL/min Flussrate. Im stark sauren Milieu des verwendeten Puffers sind die Glu-Seitenketten ungeladen, wohingegen die Lys-Reste in protonierter Form vorliegen.

Polypeptid	Retentionszeit [min]	ACN [%]	pI ^a
PAS#1(200)	3,27	28,36	5,57
PAS#1-E1(200)	3,15	27,35	3,29
PAS#1-E2(200)	3,19	27,66	3,05
PAS#1-E3(200)	3,36	29,14	2,90
PAS#1-K1(200)	2,72	23,84	10,95
PAS#1-K2(200)	2,42	21,50	11,28

^a berechnet mit Hilfe des Programms ProtParam (www.expasy.org)

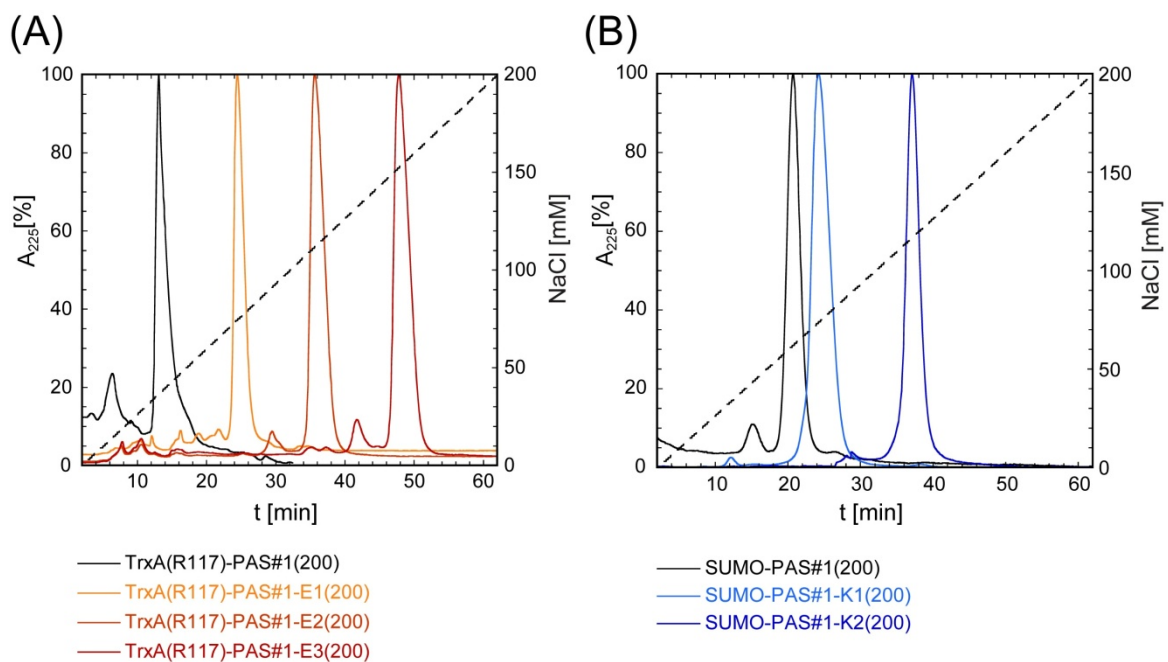


Abbildung 34: Ionische Wechselwirkungen der geladenen PAS#1-Sequenzen in Form von Fusionsproteinen in der IEX-Chromatographie. Negativ geladene Sequenzen sind durch rötliche Farbtöne angedeutet und positiv geladene Polypeptide mit Blautönen. Die gestrichelte schwarze Linie stellt den verwendeten NaCl-Konzentrationsgradienten von 0 bis 200 mM über 60 min dar (Resource Q bzw. Resource S, 1 mL Bettvolumen, Flussrate 1 mL/min). **(A)** AEX-Chromatographie der TrxA-Varianten mit negativ geladenen Polypeptiden in 20 mM Tris/HCl pH 9,5. **(B)** CEX-Chromatographie der SUMO-Fusionsproteine mit positiv geladenen PAS-Sequenzen in 40 mM NH₄OAc/AcOH pH 6,5.

Um den Einfluss der Ladungen in den modifizierten PAS#1-Polypeptiden auf den pI-Wert zu veranschaulichen, wurde analytische Ionenaustauschchromatographie mit den

Fusionsproteinen durchgeführt. Die zur Präparation der geladenen Polypeptide hergestellten TrxA- und SUMO-Fusionproteine wurden dazu jeweils zusammen mit dem entsprechenden konventionellen PAS#1-Protein auf geeignete IEX-Säulen aufgetragen und mit einem Konzentrationsgradienten von 0 bis 200 mM NaCl eluiert (Abbildung 34). Für die TrxA-Fusionsproteine mit negativ geladenen Sequenzen wurde eine AEX-Chromatographie an einer Resource Q-Säule in AEX-Laufpuffer (20 mM Tris/HCl pH 9,5) durchgeführt, während die SUMO-Fusionsproteine mit den positiv geladenen PAS#1-Polypeptiden mittels CEX-Chromatographie an einer Resource S-Säule in CEX-Laufpuffer (40 mM NH₄OAc/AcOH pH 6,5) analysiert wurden.

Tabelle 17: IEX-chromatographische Daten von Fusionsproteinen mit geladenen PAS#1-Sequenzen.

Die Retentionszeiten und NaCl-Konzentrationen wurden an Resource Q bzw. Resource S (1 mL Bettvolumen, Flussrate 1 mL/min, 0 - 200 mM NaCl über 60 Säulenvolumina) ermittelt.

Fusionsprotein	Retentionszeit [min]	NaCl [mM]	pI ^a
TrxA(R117)-PAS#1(200)	13,90	47	6,12
TrxA(R117)-PAS#1-E1(200)	22,16	74	4,79
TrxA(R117)-PAS#1-E2(200)	33,42	112	4,43
TrxA(R117)-PAS#1-E3(200)	45,61	152	4,24
SUMO-PAS#1(200)	18,48	62	5,87
SUMO-PAS#1-K1(200)	22,03	74	9,37
SUMO-PAS#1-K2(200)	34,85	117	9,91

^a berechnet mit Hilfe des Programms ProtParam (www.expasy.org)

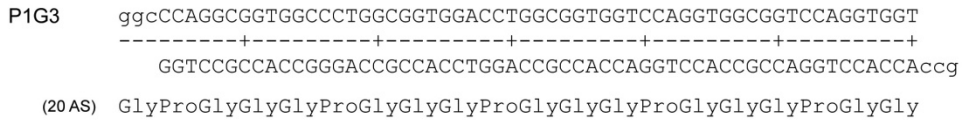
Die Einführung gleichnamiger Ladungen in das PAS#1-Polypeptid resultierte in schrittweise verlängerten Retentionszeiten der Fusionsproteine. Diese Beobachtung ist auf die Verstärkung der ionischen Wechselwirkung mit dem jeweiligen Säulenmaterial, das die entgegengesetzten Oberflächenladungen trägt, zurückzuführen. Die theoretischen Auswirkungen der Ladungen im Polypeptid auf den berechneten pI-Wert des Fusionsproteins wurden experimentell durch die verlängerten Retentionszeiten an den IEX-Säulen nachgewiesen (Tabelle 17).

3.2.3 Untersuchung repetitiver Polypeptid-Sequenzen aus anderen Aminosäuren

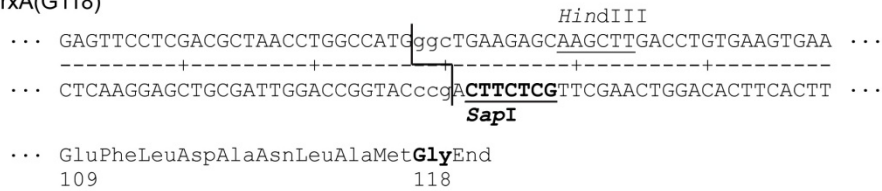
Um den Einfluss der spezifischen Aminosäure-Zusammensetzung der PAS-Polypeptide auf die resultierenden biophysikalischen Eigenschaften besser verstehen zu können, wurden repetitive Polypeptid-Abfolgen konstruiert, welche aus anderen Aminosäuren als den für PAS-Sequenzen charakteristischen Resten Prolin, Alanin und Serin aufgebaut waren. Die Polypeptid-Sequenz P1G3 entstand aus der Hypothese, dass ein Grundgerüst aus der konformationell flexibelsten Aminosäure Glycin eine erhöhte

Flexibilität des Polypeptidrückgrats zur Folge hat (Cantor & Schimmel, 1980). Der Einbau von Prolin an definiert wiederkehrenden Positionen sollte, wie bei PAS-Polypeptiden, der Ausbildung regulärer Sekundärstrukturen sowie unlöslicher Polyglycin-Aggregate entgegenwirken.

(A)



(B) pTrxA(G118)



(C)

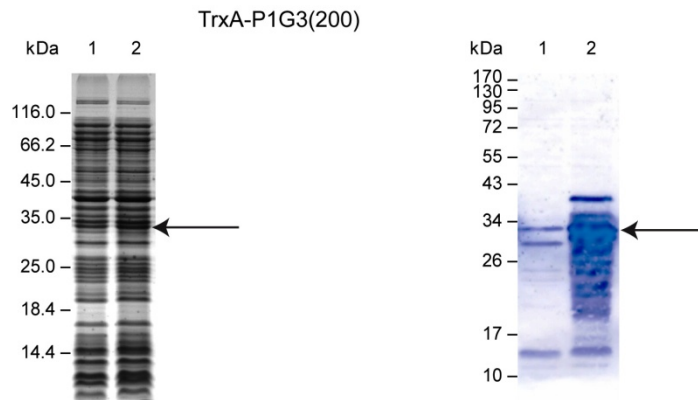


Abbildung 35: Untersuchung der P1G3-Sequenz als TrxA(G118)-P1G3(200)-Fusionsprotein. (A) Assemblierung der P1G3-Genkassetten aus Oligodesoxynukleotiden. **(B)** Sequenzausschnitt von pTrxA(G118) mit der *SspI*-Klonierungsstelle sowie der Translation der Aminosäuren 109 bis 118 von TrxA(G118). Die inverse *SspI*-Erkennungssequenz (fett gedruckt) ermöglicht die Insertion der P1G3-Genkassette mit Hilfe der 5'-GGC-Überhänge. **(C)** Expressionsanalyse von TrxA-P1G3(200) in *E. coli* K12 KS272 nach Induktion bei 37 °C für 3 h. 1: Gesamtzellen vor Induktion; 2: Gesamtzellen nach 3 h Induktion. Links, SDS-PAGE-Analyse; rechts, Identifizierung des Fusionsproteins durch *Western Blotting* gegen das Hexahistidin-Anhängsel mit murinem Anti-His₆ IgG2a. Das Fusionsprotein ist mit einem Pfeil markiert. Das apparente Molekulargewicht des Fusionsproteins ist im Vergleich zum berechneten Wert von 26,4 kDa (ProtParam, www.expasy.org) kaum erhöht. Auf dem Western-Blot sind zusätzlich eine Reihe weiterer Proteinspezies unter der Hauptbande zu erkennen, die vermutlich verkürzte P1G3-Abschnitte enthalten.

Die P1G3-Genkassette wurde analog zu den PAS-Polypeptiden durch Assemblierung und partielle Ligierung von 60 bp-Minimalkassetten aus hybridisierten komplementären Oligodesoxynukleotiden (siehe Abbildung 35A) erhalten. Nach Sequenzbestätigung der Genkassette für P1G3(200), kloniert auf dem Hilfsvektor pUC19-duoSapI, wurde diese zur Expression in Form eines Fusionsproteins mit TrxA in den Expressionsvektor pTrxA(G118) inseriert, wozu die SapI-Schnittstelle am C-Terminus von TrxA genutzt wurde. Dieses pTrxA-Derivat wurde zuvor durch einen Austausch des Alanin-Codons im Überhang der SapI-Schnittstelle gegen ein Glycin-Codon mit Hilfe der Mutagenese-Primer JB-24 und JB-25 erhalten. Der C-terminale Methionin-Rest des TrxA ermöglichte die proteolytische Spaltung des P1G3-Fusionsproteins mit Bromcyan (Gross, 1967).

Die Expression des Fusionsproteins TrxA-P1G3(200) erfolgte im analytischen 50 mL-Kulturmaßstab in Schüttelkolben mit Hilfe des Stamms *E. coli* K12 KS272. Die SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 35) erlaubte keine eindeutige Zuordnung des Fusionsproteins in Gesamtzellproben zu einer der Proteinbanden. Daher wurde ein zusätzliches *Western Blotting*-Experiment gegen das His₆-Tag mit denselben Proben hinzugezogen, wobei die signifikante Überexpression von TrxA-P1G3(200) nachweisbar war. Auffallend ist die große Zahl an Proteinbanden unterhalb des Zielproteins, die das Ergebnis eines schrittweise erfolgenden proteolytischen Abbaus des P1G3(200)-Polypeptids darstellen könnte.

Die stark beeinträchtigte Färbung des TrxA-P1G3(200)-Fusionsproteins mit Coomassie-Brilliantblau lässt auf eine noch schlechtere Bindung des hydrophoben Farbstoffs durch die P1G3-Sequenz als bei den PAS-Polypeptiden schließen. Dagegen zeigt das im Vergleich zur berechneten Masse von 26,4 kDa kaum erhöhte apparente Molekulargewicht eine wesentlich gesteigerte elektrophoretische Mobilität des P1G3-Fusionsproteins im Vergleich zur Mobilität von entsprechenden PAS(200)-Fusionsproteinen. Eine erhöhte Bindung von SDS ist als Ursache hierfür unwahrscheinlich, da dieses aufgrund fehlender Seitenketten im Glycin in ähnlich geringem Maß gebunden werden dürfte. Der beobachtete Effekt kann vielmehr als Folge eines verringerten hydrodynamischen Volumens des P1G3-Polypeptids interpretiert werden, wie eine gewisse Analogie zur P1A3-Sequenz vermuten lässt.

Weitere repetitive Polypeptide, die in dieser Arbeit untersucht wurden, beruhten auf den Sequenzeinheiten NNT und QQH als ausgewählte Beispiele aus dem Polypeptidkonzept der Genetic Polymers (Besman *et al.*, 2009). Diese Genetic Polymers wurden zur Fusion mit therapeutischen Proteinen wie G-CSF (Granulocyten-Kolonie-stimulierender Faktor) vorgeschlagen. Einige dieser Sequenzen sind aus Erkennungsstellen für die N-Glyco-

sylierung zusammengesetzt, welche in Eukaryonten an der Asparagin-Seitenkette zu Beginn des Aminosäuremotivs „N-X-S/T“ erfolgt. Darin kann die zweite Position von jedem Rest mit Ausnahme von Prolin eingenommen werden, und die dritte ist in der Regel mit Serin oder Threonin besetzt. Bei Expression in eukaryotischer Zellkultur profitieren solche Genetic Polymers also insbesondere von dem enormen hydrodynamischen Volumen, das die posttranslational angebrachten Oligosaccharidketten vermitteln. Von Interesse war daher, ob derartige Polypeptidsequenzen auch bei einer Produktion in *E. coli* ohne die Glykosylierung eine ungeordnete und expandierte Sekundärstruktur in Lösung aufweisen.

Die Genkassetten für NNT(96) und QQH(96) wurden gemäß der bereits dargelegten Synthesestrategie von PAS-Kassetten aus kurzen 72 bp-Minimalkassetten assembliert, welche durch Hybridisierung komplementärer Oligodesoxynukleotide erhalten wurden (Abbildung 36). Zur Expression als SUMO-Fusionsprotein wurde die NNT(96)- bzw. QQH(96)-Kassette mit Hilfe der *SapI*-Restriktionsstelle am C-Terminus des SUMO-Gens in die Vektoren pSUMO(N106) bzw. pSUMO(Q106) inseriert. Bei diesen Vektoren handelte es sich um Derivate des T7-Expressionsvektors pSUMO, dessen Alanin-Codon in der *SapI*-Erkennungssequenz zur Aufnahme der entsprechenden Genkassetten mit den Mutagenese-Primerpaaren JB-32/JB-33 zu einem Asparagin-Codon bzw. mit JB-36/JB-37 zu einem Glutamin-Codon verändert wurde.

Da die Genkassetten von NNT(96) und QQH(96) aufgrund der wenigen zur Auswahl stehenden Aminosäure-Codons sehr A/T-reich waren und kaum Spielraum für eine Abwechslung der Codons boten, wurde als Expressionsstamm anstelle von BL21(DE3) der Stamm BLR(DE3) (Studier, 1991) gewählt. Dieser weist eine Deletion des Gens für die Rekombinase RecA auf, wodurch Plasmide mit hochrepetitiven Gensequenzen stabilisiert sind (Kurnit, 1989). Die Fusionsproteine SUMO-NNT(96) und SUMO-QQH(96) wurden schließlich im Cytoplasma von *E. coli* BLR(DE3) durch Induktion mit IPTG für 3,5 h produziert. Die Basalexpression des T7-Promotors der Expressionsplasmide wurde durch konstitutive Koexpression von T7-Lysozym als kompetitivem Inhibitor der T7-RNA-Polymerase mit Hilfe des Plasmids pLysE unterdrückt (Studier, 1991).

Zunächst wurden Expressionsanalysen bei 30 und 37 °C im 50 mL-Maßstab in Schüttelkolben durchgeführt. Vor Induktion und zum Zeitpunkt der Ernte wurde den Kulturen jeweils eine Gesamtzellprobe entnommen. Zusätzlich wurden 5 mL-Aliquots der Zellen aus den Flüssigkulturen abzentrifugiert und mit Ultraschall aufgeschlossen. Durch Zentrifugation wurden unlösliche Zellbestandteile abgetrennt, und zur Analyse mittels SDS-PAGE wurden jeweils auf den OD₅₅₀-Wert normierte Probenmengen aufgetragen,

um den quantitativen Vergleich der in den Fraktionen enthaltenen Proteinmengen zu ermöglichen.

Die SDS-PAGE-Analysen der Expression von SUMO-NNT(96) (Abbildung 36B) und SUMO-QQH(96) (Abbildung 36C) bei 37 °C erbrachten jeweils höhere Ausbeuten der Fusionsproteine als bei 30 °C, daher sind nur diese Bedingungen gezeigt. Trotz der guten Löslichkeit des SUMO-Fusionspartners fielen beide SUMO-Fusionsproteine, unabhängig von der verwendeten Expressionstemperatur, ausschließlich in der unlöslichen Zellfraktion an, wie durch *Western Blotting* gegen das Hexahistidin-Tag bestätigt wurde. Das *Western Blotting* ermöglichte auch die eindeutige Zuordnung der Proteinbande für SUMO-NNT(96) (siehe Abbildung 36B), dessen Ausbeute erheblich unter der des QQH-Fusionsproteins lag.

Das verzögerte Laufverhalten beider SUMO-Fusionsproteine in der SDS-PAGE ließ auf eine verminderte SDS-Bindekapazität schließen. Im Vergleich zu PASylierten Proteinen war aber der vergrößernde Effekt der hier untersuchten Polypeptid-Sequenzen auf die apparente Molekülmasse der SUMO-Fusionsproteine deutlich geringer. Beide SUMO-Fusionsproteine sprachen jedoch gut auf die Coomassie-Färbung an, die hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Protein und Farbstoff basiert, was insgesamt ein differenziertes Polymerverhalten gegenüber den PAS-Polypeptiden erkennen ließ.

Zur näheren Charakterisierung der Sekundärstruktur des QQH-Polypeptids wurde aufgrund der höheren Ausbeuten das Fusionsprotein SUMO-QQH(96) präparativ in *E. coli* BL21(DE3)/pLysE in der 2 L-Schüttelkolbenkultur bei 37 °C in Form von Einschlusskörpern produziert. Nach Zellernte und Aufschluss in der French Press wurde die unlösliche Zellfraktion durch Zentrifugation abgetrennt. Membranbestandteile wurden durch Zusatz von Triton-X 100 solubilisiert und chromosomale DNA mit DNase I verdaut, bevor in einem weiteren Zentrifugationsschritt die Einschlusskörper in gereinigter Form isoliert wurden. Das aggregierte Protein wurde durch Zugabe von 6 M Gdn · HCl in Lösung gebracht und unter Aufrechterhaltung dieser denaturierenden Bedingungen mittels IMAC an Ni-Sepharose unter Verwendung eines Imidazol-Konzentrationsgradienten von 0 bis 300 mM gereinigt (freundlicherweise durchgeführt von Klaus Wachinger). Nach Dialyse des SUMO-Fusionproteins gegen 10 mM NH₄OAc wurde durch ESI-MS-Messung die erwartete korrekte Masse von SUMO-QQH(96) (24929,7 Da) nachgewiesen (Abbildung 36D).

Abbildung 36: Untersuchung der NNT- und QQH-Sequenzen in Form der SUMO-Fusionsproteine. (A) Assemblierung der NNT/QQH-Genkassetten aus komplementären Oligodesoxynukleotiden. **(B)** Sequenzausschnitte mit der *SapI*-Klonierungsstelle in den modifizierten pSUMO-Expressionsvektoren sowie der Translation der Aminosäuren 97 bis 106 von SUMO(N106) bzw. SUMO(Q106). Die inverse *SapI*-Erkennungssequenz (fett gedruckt) ermöglicht die Insertion der NNT- bzw. QQH-Genkassette mit Hilfe von deren 5'-Überhängen. **(C)** Expressionsanalyse von SUMO-NNT(96) in *E. coli* BLR(DE3)/pLysE/pSUMO(N106)-NNT(96) bei 37 °C für 3,5 h. Das Fusionsprotein ist mit einem Pfeil markiert. Links: Spur M, Proteinmarker; 1, Gesamtzellen vor Induktion; 2, Gesamtzellen zum Zeitpunkt der Ernte; 3, lösliche Zellfraktion; 4, unlösliche Zellfraktion. Rechts: Identifizierung des Fusionsproteins in der unlöslichen Zellfraktion durch *Western Blotting* und Nachweis des Hexahistidin-Anhängsels mit einem Anti-His₆ IgG2a. **(D)** Expressionsanalyse von SUMO(Q106)-QQH(96) unter den gleichen Bedingungen wie in **(C)**. Beide Fusionsproteine, die vollständig in unlöslicher Form anfallen, zeigen ein erhöhtes apparentes Molekulargewicht verglichen mit den berechneten Proteinmassen von 22,9 kDa für NNT bzw. 24,9 kDa für QQH. **(E)** ESI-MS-Messung von SUMO-QQH(96). Das dekonvolvierte Spektrum bestätigt die berechnete Molekülmasse von 24929,7 Da im Rahmen der Messgenauigkeit. **(F)** CD-Spektrum von SUMO-QQH(96) in 20 mM KP_i pH 7,5, 50 mM K₂SO₄ bei 25 °C. Die Form des Spektrums weist auf α -Helix als Hauptsekundärstruktur hin, die Signalminima sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Eine Probe des gereinigten SUMO-QQH(96)-Proteinaggregats aus den Einschlusskörpern wurde dazu in CD-Puffer (20 mM KP_i pH 7,5, 50 mM K₂SO₄) resuspendiert, wobei die in Lösung befindlichen Protein-Mikroaggregate dennoch die Messung durch CD-Spektroskopie zuließen (Wang *et al.*, 2008). Das Spektrum des Fusionsproteins wies mit den beiden Minima um 209 nm und 232 nm die Charakteristika einer α -helikalen Struktur auf, welche charakteristische Minima bei 208 und 222 nm zeigt (Greenfield & Fasman, 1969). Die beobachtete Rotverschiebung des zweiten Signals um etwa 10 nm kann auf aromatische Wechselwirkungen in den dicht gepackten Proteinaggregaten zurückgeführt werden (Nyrkova *et al.*, 2000; Dasari *et al.*, 2011). Mit der Software des Jasco-CD-Spektropolarimeters wurde für das QQH-Fusionsprotein ein α -helicaler Strukturanteil von 56,7 % abgeschätzt, wobei laut dem DSSP-Algorithmus (Kabsch & Sander, 1983) die Kristallstruktur des SUMO-Proteins (PDB 1EUU, Kette B) nur 26,5 % α -helicale Strukturanteile aufwies. Da SUMO nur 49 % der Masse des gesamten Fusionsproteins ausmachte (12,2 von 24,9 kDa), mussten daher mindestens 85 % der QQH-Sequenz als α -Helix vorliegen, womit eine ungeordnete *Random-Coil*-Struktur für dieses Polypeptid offensichtlich nicht vorliegt.

3.2.4 PAS-cal: ein Peptid-Kalibrationsstandard für die Massenspektrometrie

Neben der Anwendung als Fusionspartner für therapeutische Proteine ergeben sich aufgrund der hohen biochemischen Homogenität der PAS-Polypeptide auch Einsatzmöglichkeiten in der biomolekularen Spektroskopie. Ein Peptidstandard mit

variabler Länge, aber homogener Zusammensetzung, der idealerweise als rekombinantes Polypeptid aus repetitiven Sequenzen einer kleinen definierten Auswahl von chemisch stabilen Aminosäuren hergestellt werden kann, ist zur Kalibrierung von Massenspektrometern wünschenswert. Die intrinsischen Eigenschaften der PAS-Polypeptide entsprachen grundsätzlich diesen Anforderungen. Das Fehlen einer geordneten Sekundärstruktur und die nur auf chemisch robuste Aminosäuren beschränkte Zusammensetzung ohne reaktive Seitenketten sollten ein einheitliches Ionisierungs- und Protonierungsmuster des Peptidrückgrats mit sich bringen, was die Bildung mehrfach geladener Ionen gewährleistet.

Das hier konstruierte, sogenannte „PAS-cal“-Polypeptid basiert auf der PAS#5-Sequenz (Schlapschy *et al.*, 2013) und wurde derart modifiziert, dass ein tryptischer Verdau des gereinigten Polypeptids an gezielt eingeführten Arginin-Resten in einer regelmäßigen Fragmentierung zu vier Peptiden exakter Zusammensetzung im Größenbereich von 2 bis 8 kDa resultiert. Arginin wurde Lysin als Spaltstelle für Trypsin vorgezogen, da aufgrund höherer Basizität der Guanidin-Gruppe eine stabilere Protonierung zu erwarten war. Somit war nicht nur mit erhöhter Effizienz des Trypsin-Verdaus, sondern auch mit gesteigerter Signalintensität der resultierenden Peptid-Fragmente in MS-Experimenten zu rechnen (Krause *et al.*, 1999).

Entsprechend der bereits erläuterten Methodik zur Konstruktion von PAS-Sequenzen (siehe Abschnitt 3.1.2) wurden für PAS#5 kodierende Genkassetten durch partielle Ligierung mit Hilfe ihrer 5'-GCC-Überhänge aus hybridisierten Oligodesoxynukleotiden assembliert. Zum Einsatz kam hier neben der klassischen 72 bp-PAS#5-Minimaleinheit (24 AS) auch die modifizierte Version PAS#5(Arg) (75 bp, 25 AS), welche um ein zusätzliches Arg-Codon am 3'-Ende der Genkassette erweitert war (Abbildung 37). Die partielle Ligierung der beiden unterschiedlichen Minimal-Einheiten erfolgte in getrennten Ansätzen in den PAS#5: PAS#5(Arg)-Verhältnissen 1:1 wie auch 2:1 mit dem Ziel, passende Konkatomere zu erzeugen, aus denen letztendlich das gewünschte „PAS-cal“-Gen zusammengesetzt werden konnte.

Die so erhaltenen Monomere sowie di- und trimeren Ligierungsprodukte wurden mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese isoliert und nach Gel-Extraktion auf dem Hilfsvektor pUC19-duo*SapI* zwischenkloniert und sequenziert. Danach war die präzise Excision geeigneter identifizierter PAS-cal-Genabschnitte durch *SapI*-Restriktionsverdau möglich. Da der „PAS-cal“-Größenstandard mit Ser und Arg nucleophile Seitenketten sowie intrinsische positive Ladungen trug, fiel die Wahl des Fusionspartners zu dessen Expression auf SUMO. Die Spaltung des SUMO-PAS-cal-Fusionsproteins durch die

Hierbei ermöglichte eine 15-minütige Hitzebehandlung des Gesamtzellaufschlusses bei 70 °C und anschließende Zentrifugation die Abtrennung eines Großteils der präzipitierten Wirtszellproteine. Aus dem so vorgereinigten Zellextrakt konnte das SUMO-PAScal-Fusionsprotein durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung angereichert und in einer Stufe mittels AEX-Chromatographie bis zur Homogenität gereinigt werden.

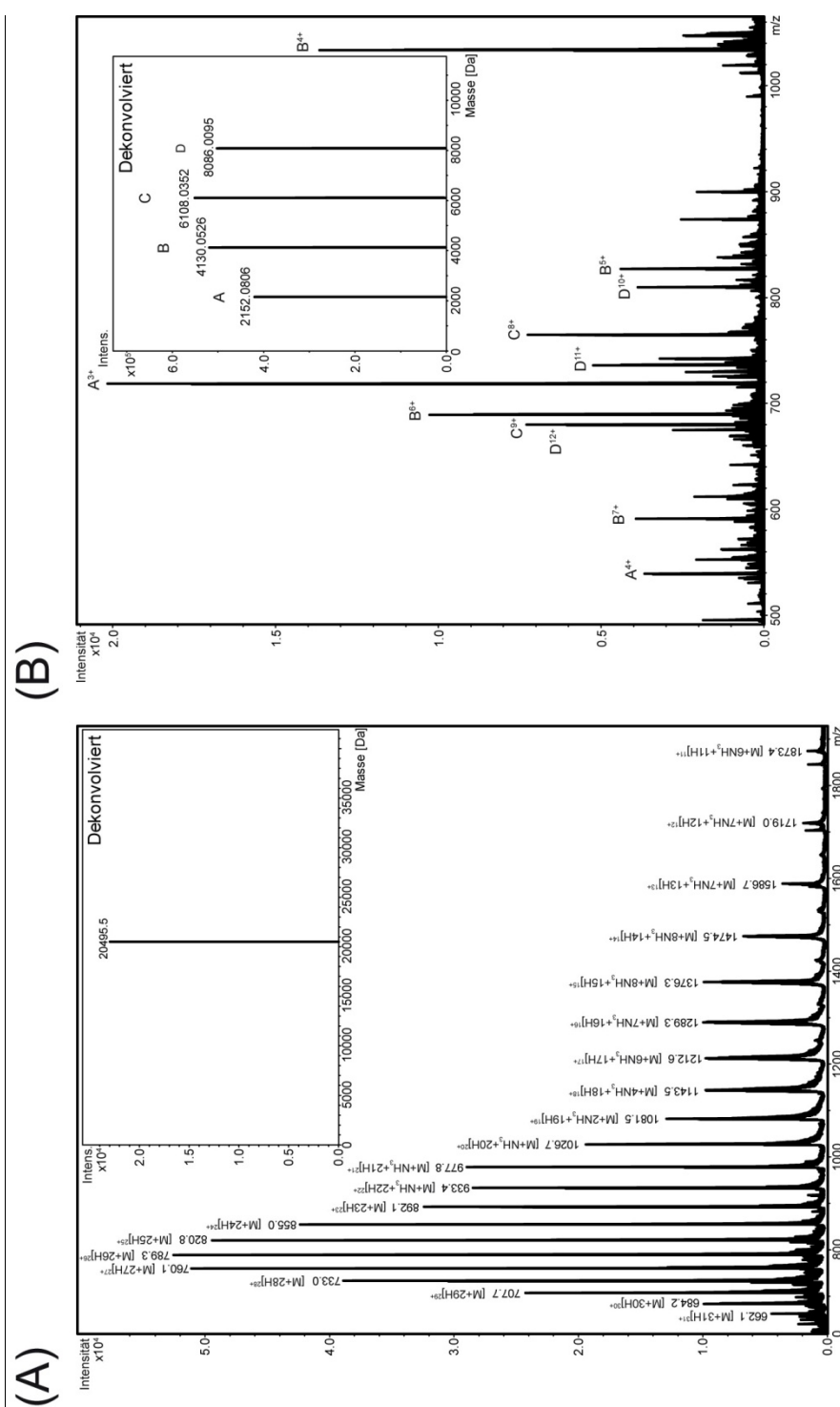


Abbildung 39: ESI-MS-Rohspektren von „PAS-cal“ und seinen Peptidfragmenten sowie dekonvolvierte Spektren. (A) ESI-MS-Spektrum des isolierten intakten „PAS-cal“-Polypeptids. Das dekonvolvierte Spektrum ist als Inset gezeigt. **(B)** ESI-MS-Spektrum des tryptisch verdauten „PAS-cal“ mit annotierten *m/z*-Signalen. Das dekonvolvierte Spektrum, welches je ein Signal für die vier Peptidfragmente zeigt, ist verkleinert eingefügt.

Tabelle 18: ESI-MS-Signale des „PAS-cal“-Polypeptids. Angegeben sind gemittelte Massen und m/z -Verhältnisse. Innerhalb der Messgenauigkeit von ± 1 Da wurden die erwarteten Massen unter Verwendung eines kommerziell verfügbaren Kalibrierungsstandards bestätigt.

Spezies	Berechnete M^a [Da]	Dekonvolvierte M^b [Da]	Beobachtete m/z -Signale	
Peptid 1 (A)	2152.371	2152.0806	$[M+3H]^{3+}$	718.3800
			$[M+4H]^{4+}$	539.0368
Peptid 2 (B)	4130.541	4130.0526	$[M+4H]^{4+}$	1033.5390
			$[M+5H]^{5+}$	827.0327
			$[M+6H]^{6+}$	689.3618
			$[M+7H]^{7+}$	591.0254
Peptid 3 (C)	6108.711	6108.0352	$[M+8H]^{8+}$	764.5251
			$[M+9H]^{9+}$	679.6898
Peptid 4 (D)	8086.881	8086.0095	$[M+10H]^{10+}$	809.6224
			$[M+11H]^{11+}$	736.1119
			$[M+12H]^{12+}$	674.8532
PAScal (intakt)	20495.536	20495.5	$[M+6NH_3+11H]^{11+}$	1873.4
			$[M+7NH_3+12H]^{12+}$	1719.0
			$[M+7NH_3+13H]^{13+}$	1586.7
			$[M+8NH_3+14H]^{14+}$	1474.5
			$[M+8NH_3+15H]^{15+}$	1376.3
			$[M+7NH_3+16H]^{16+}$	1289.3
			$[M+6NH_3+17H]^{17+}$	1212.6
			$[M+4NH_3+18H]^{18+}$	1143.5
			$[M+2NH_3+19H]^{19+}$	1081.5
			$[M+NH_3+20H]^{20+}$	1026.7
			$[M+NH_3+21H]^{21+}$	977.8
			$[M+NH_3+22H]^{22+}$	933.4
			$[M+23H]^{23+}$	892.1
			$[M+24H]^{24+}$	855.0
$[M+25H]^{25+}$	820.8			
$[M+26H]^{26+}$	789.3			
$[M+27H]^{27+}$	760.1			
$[M+28H]^{28+}$	733.0			
$[M+29H]^{29+}$	707.7			
$[M+30H]^{30+}$	684.2			
$[M+31H]^{31+}$	662.1			

a berechnet mit Hilfe der Software Compass Data Analysis 4.0

b Dekonvolution der Rohdaten aus dem ESI-Massenspektrum mit Hilfe der Software Compass Data Analysis 4.0

Die präparative Spaltung von SUMO-PAScal (Abbildung 38B) erfolgte durch Zugabe von 1000:1 (w/w) Ulp1 zu den vereinigten AEX-Eluaten in einem Gesamtvolumen von 10 mL unter Inkubation für 1 h bei 37 °C. Mittels SEC-Chromatographie an einer HiLoad 26/60

Superdex 200-Säule (*prep grade*, 320 mL Bettvolumen) wurde das freigesetzte „PAS-cal“-Polypeptid unter Pufferwechsel in 50 mM NH_4HCO_3 aus dem Spaltansatz isoliert (Abbildung 38C). Direkt vor ESI-MS-Messungen wurde das „PAS-cal“-Peptidkonkatamer (0,28 mg/mL) im Verhältnis 60:1 (w/w) mit hochreinem Trypsin für 3 h bei 37 °C inkubiert, und nach erneutem Trypsin-Zusatz der gleichen Menge wurde der Verdau über Nacht bei 30 °C fortgesetzt.

Zur ESI-MS-Messung wurde die erhaltene Lösung mit 20 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % (v/v) Ameisensäure versetzt. Auf die gleiche Weise wurde auch eine Probe des ungespaltenen isolierten „PAS-cal“-Polypeptids vorbereitet. Die Messungen erfolgten an einem maXis Q-TOF-Instrument mit ESI-Quelle, welches mit Hilfe des kommerziellen ESI-MS-Standards „Electrospray Calibrant Solution“ kalibriert wurde. Die Dekonvolution der ESI-Rohdaten wurde mit der Geräte-Software Compass Data Analysis 4.0 vorgenommen. Der beobachtete m/z -Bereich erstreckte sich von 500 bis 3000, wobei die beste Signalauflösung zwischen 500 und 1500 erzielt wurde.

Nach Dekonvolution zeigten die ESI-MS-Spektren sowohl für das intakte Peptid-Konkatamer vor dem tryptischen Verdau als auch für die mit Trypsin freigesetzten „PAS-cal“-Peptide die erwarteten Signale (Abbildung 39). Die experimentellen Daten stimmten mit 20495,5 Da für das intakte „PAS-cal“-Polypeptid sowie mit 2152,2, 4130,1, 6108,0 und 8086,0 Da für dessen Peptidfragmente perfekt mit den berechneten Massen überein (vergleiche Tabelle 18). Die „PAS-cal“-Präparation zeichnete sich durch exzellente Monodispersität aus und lieferte nach Trypsin-Verdau die vier Peptidfragmente im äquimolaren Verhältnis mit vergleichbaren Signalintensitäten, was die geforderten Eigenschaften für einen peptidbasierten Massenstandard erfüllt.

Auffälligerweise erhöhten sich die Anzahl der Einzelsignale im Rohspektrum sowie die Signalintensitäten nach Dekonvolution mit der Länge des jeweiligen Peptidfragments, die herkunftsbedingt in äquimolaren Mengen vorliegen (vergleiche Abbildung 39B). Dies lieferte einen Hinweis darauf, dass positive Ladungen nicht nur auf die Arginin-Reste und N-Termini der „PAS-cal“-Peptide beschränkt sind, sondern auch am Peptidrückgrat selbst auftreten können (Wysocki *et al.*, 2000). Auf diese Weise kamen die mehrfach geladenen PAS-Peptid-Molekülonen zustande, die in Tabelle 18 zusammengestellt sind. Die MS-Analyse bestätigte die vollständige tryptische Spaltung des „PAS-cal“-Konkatomers zu den vier erwarteten Peptiden durch das völlige Fehlen unvollständiger Peptid-Fragmente.

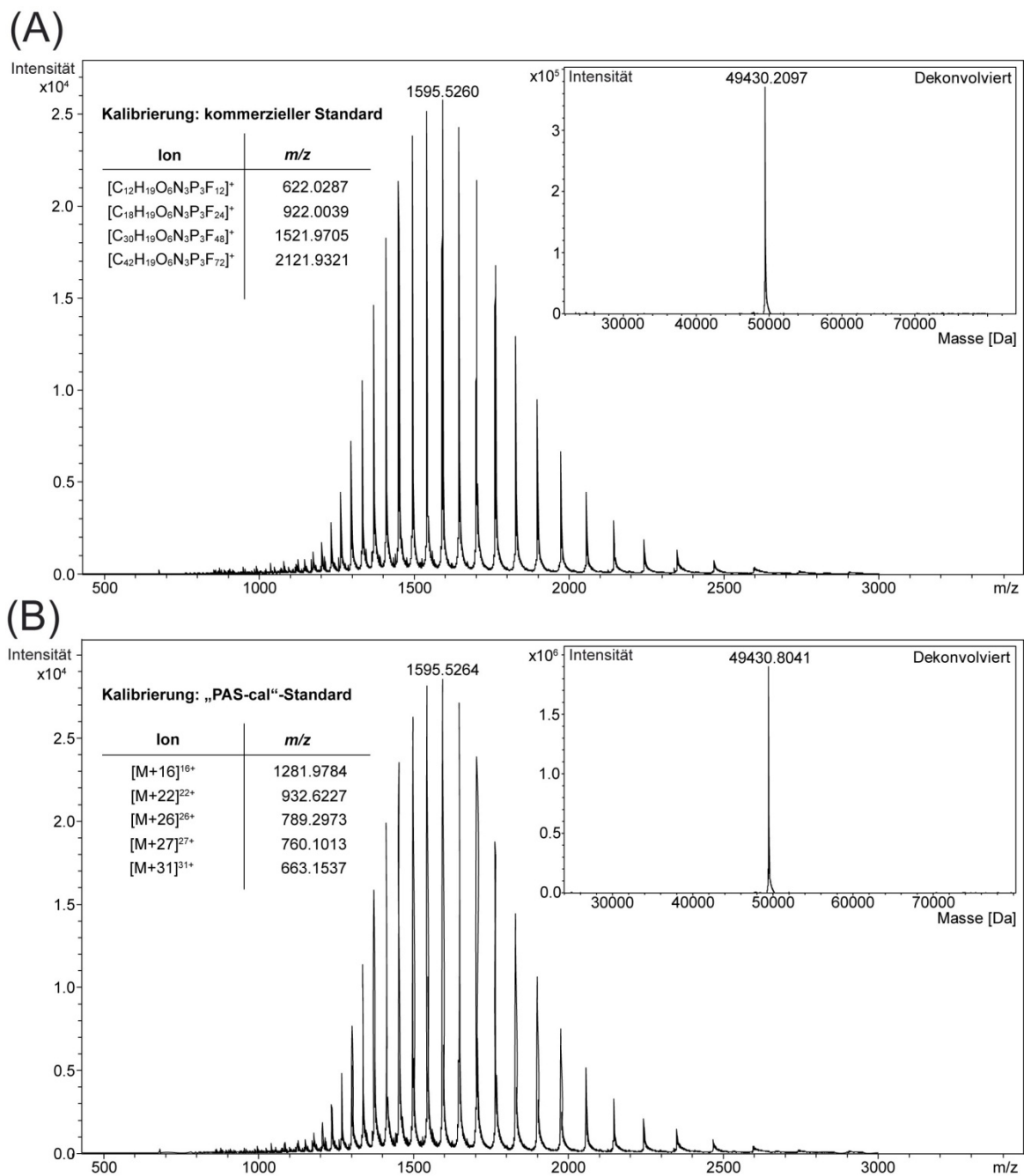


Abbildung 40: Auswertung des ESI-MS-Rohspektrums und des entsprechenden dekonvolvierten Spektrums eines gereinigten rekombinanten Proteins (Fab-Fragment) nach Kalibrierung mit einem kommerziellen bzw. dem „PAS-cal“-Standard. (A) Kalibrierung mit einem kommerziellen Standard (Electrospray Calibrant Solution). (B) Kalibrierung mit dem intakten „PAS-cal“-Polypeptid. Die für die Kalibrierung verwendeten monoisotopischen m/z -Werte sind den eingefügten Tabellen zu entnehmen. Die prominentesten m/z -Signale in den Rohspektrums sind gekennzeichnet, dekonvolvierte Spektren sind mit eingefügt. Die mittels der Geräte-Software berechnete monoisotopische Masse des gemessenen Fab-Fragments beträgt 49429,6413 Da. Diese Masse wird mit beiden Standards innerhalb der Messtoleranz von ± 2 Da reproduziert.

Die gleichmäßige Protonierung der „PAS-cal“-Peptide sowie deren effiziente enzymatische Freisetzung aus dem SUMO-Fusionsprotein durch Ulp1 und Trypsin sind vermutlich der ungeordneten Struktur der PAS-basierten Polypeptid-Sequenz zu verdanken. Um die Genauigkeit des „PAS-cal“-Standards direkt mit einem kommerziellen Standard zu vergleichen, wurde eine Probe eines rekombinanten Fab-Fragments (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Petra Kornberger; Kornberger & Skerra, 2014) mit einer Masse von ca. 49 kDa in zwei unabhängigen ESI-MS-Messungen am maXis Q-TOF-Massenspektrometer analysiert (Abbildung 40). Für die erste Messung wurde zur Gerätekalibrierung der kommerzielle Standard Electrospray Calibrant Solution verwendet, der auf Fluoralkyl-Phosphazenenverbindungen basiert.

Die zweite MS-Messung des Fab-Fragments erfolgte nach Kalibrierung des Instruments mit ausgewählten m/z -Signalen des intakten „PAS-cal“-Polypeptidstandards. Beide ESI-MS-Experimente führten zur vergleichbar akkuraten Bestätigung der erwarteten Proteinmasse von 49429,6413 Da, welche mit Hilfe der Geräte-Software Compass Data Analysis 4.0 unter Berücksichtigung des Verlusts von 5×2 Da durch Ausbildung der Disulfid-Bindungen im Fab-Fragment berechnet worden war. Für ESI-MS-Anwendungen ist also die Kalibrierung durch das regelmäßig, über einen großen Bereich verteilte m/z -Muster des intakten „PAS-cal“-Polypeptids von besonderem Nutzen und führt zu ebenso präzisen Messergebnissen wie mit einem kommerziellen Standard.

Nach Untersuchung der Eignung des „PAS-cal“-Standards zur ESI-MS-Kalibrierung wurde das Verhalten des Polypeptids und seiner Fragmente in der MALDI-Massenspektrometrie geprüft. Für die MALDI-MS-Messungen wurde ein UltrafleXtreme-Gerät verwendet.

Tryptisch gespaltenes „PAS-cal“-Peptid wurde mit dem intakten PAS-cal-Polypeptid im Mol-Verhältnis 3:1 gemischt und mit dem gleichen Volumen an 2,5-Dihydroxybenzoesäure (10 $\mu\text{g/mL}$ in 30 % (v/v) Acetonitril, 0,2 % (v/v) Trifluoressigsäure) versetzt. Nach Trocknung auf einer MALDI-Probenplatte wurde die Probe mit 1000 Pulsen pro Spektrum im linearen Positiv-Modus gemessen. Hierbei wurde ein m/z -Bereich von 1000 bis 23000 analysiert, wobei m/z -Signale unterhalb von 1500 unterdrückt wurden. Zur Berechnung der erwarteten m/z -Werte kam die Geräte-Software Compass Isotope Pattern 1.3 zum Einsatz.

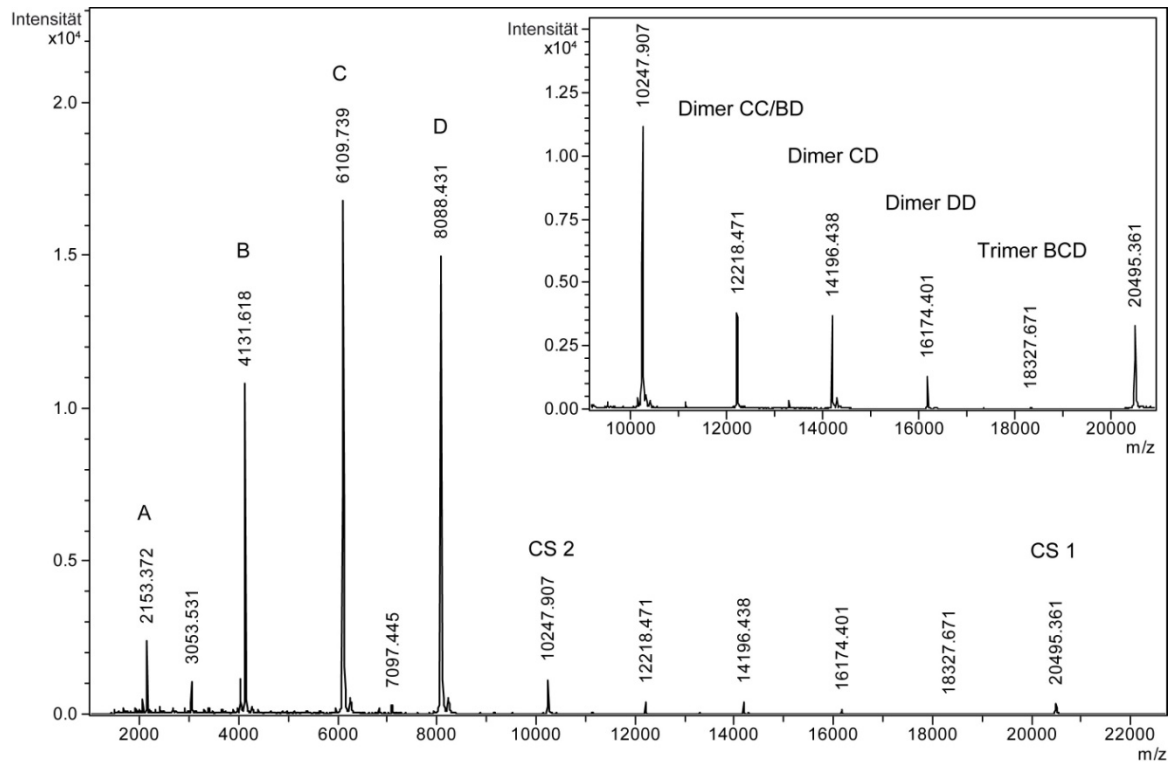


Abbildung 41: MALDI-MS-Spektrum von „PAS-cal“ bzw. seinen tryptischen Peptidfragmenten. Das Spektrum wurde im linearen Modus aufgenommen. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt die Ladungszustände +1 und +2 des intakten Polypeptids sowie die di- und trimeren Spezies, die aus den Peptidfragmenten entstanden (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: MALDI-MS-Signale des „PAS-cal“-Polypeptids. Die beobachteten m/z -Verhältnisse stimmen mit den erwarteten Werten innerhalb der Messgenauigkeit überein.

Spezies		Berechnete m/z -Signale ^a	Beobachtete m/z -Signale ^b
Peptid 1 (A)	$[M+H]^+$	2153.379	2153.372
Peptid 2 (B)	$[M+H]^+$	4131.548	4131.618
Peptid 3 (C)	$[M+H]^+$	6109.718	6109.739
Peptid 4 (D)	$[M+H]^+$	8087.888	8088.431
PAS-cal (intakt)	$[M]^{2+}$ (CS 2)	10247.775	10247.907
	$[M]^+$ (CS 1)	20495.536	20495.361
Dimer CC oder BD	$[M+M+H]^+$	12218.439	12218.471
Dimer CD	$[M+M+H]^+$	14196.599	14196.438
Dimer DD	$[M+M+H]^+$	16174.769	16174.401
Trimer BCD	$[M+M+M+H]^+$	18327.147	18327.671

^a berechnet mit Hilfe der Software Compass Isotope Pattern 1.3

^b durch MALDI-MS gemessen an einem UltrafleXtreme-Instrument

Das MALDI-Spektrum zeigte neben den Signalen des intakten „PAS-cal“-Standards und seiner vier tryptischen Fragmente auch diverse di- und trimere Ladungsaddukte der einzelnen Peptide (Abbildung 41), wobei alle Erwartungswerte für die m/z -Signale präzise nachgewiesen wurden (Tabelle 19). Die hier beobachtete Verbrückung mehrerer Einzelpeptide ist ein bekanntes MALDI-Phänomen (Hillenkamp *et al.*, 1991) und wird vermutlich von den Arginin-Seitenketten über gemeinsam koordinierte Protonen vermittelt. Im Fall des „PAS-cal“-Standards ermöglichte dieser Effekt zusätzliche Signale in dem einer Kalibrierung zugänglichen m/z -Bereich bei hohen Werten. Somit können nach Kalibrierung mit „PAS-cal“ auch große makromolekulare Verbindungen, vor allem Biomoleküle wie Proteine, verlässlich durch MALDI-MS analysiert werden.

4 Diskussion

4.1 Vergleichende biophysikalische Betrachtungen von PAS-Polypeptiden und PEG

4.1.1 Stand der PEGylierungs- und PASylierungstechnologie

Die Verbesserung der pharmakologischen Eigenschaften von Wirkstoffen mittels chemischer Konjugation mit PEG-Polymeren ist wohletabliert (Binder & Skerra, 2015) und hat bereits zahlreiche PEGylierte Protein- und Peptid-Biopharmazeutika zur Vermarktung geführt, wie u. a. Interferon- α -2a (Pegasys; Reddy *et al.*, 2002) und ein Fab-Fragment gegen TNF α (Cimzia; Blick & Curran, 2007). Auch kleine pharmakologisch aktive Verbindungen wie das Cytostatikum Taxol sind als Kandidaten zur Optimierung durch PEGylierung von Interesse, da deren *In vivo*-Halbwertszeit aufgrund der geringen Molekülgröße besonders kurz ausfällt (Pasut *et al.*, 2004). Insbesondere die fehlende Bioabbaubarkeit, die zu schädlichen PEG-Ablagerungen in verschiedenen Geweben führen kann (Bendele *et al.*, 1998), hat jedoch die Suche nach biologischen Polymeren als PEG-Mimetika angeregt. Unter diesen bieten ungeordnete rekombinante Polypeptide mit großem hydrodynamischem Volumen besonders vorteilhafte Aussichten, zumal sie sich zur Fusion mit therapeutischen Proteinen oder Peptiden eignen und derlei biotechnologisch produzierte Wirkstoffe so ohne zusätzlichen Aufwand pharmakologisch verbessert werden können.

Als biologische Alternative zur PEGylierung hat die PASylierung von pharmakologisch relevanten Proteinen ihre Eignung zur Verbesserung pharmakokinetischer und -dynamischer Eigenschaften bereits mehrfach bewiesen. Durch Einstellung der Kettenlänge des ungeordneten PAS-Polypeptids kann die Technologie auf die jeweiligen Anwendungserfordernisse abgestimmt werden. Für Anwendungen wie das *In vivo*-Imaging wurden PAS-Sequenzen mittlerer Länge zur Fusion mit Fab-Fragmenten gegen HER2 bzw. CD20 erfolgreich eingesetzt (Mendler *et al.*, 2015). Der optimale Kontrast beim Imaging wurde in dieser Studie mittels Fusion von PAS#1(200) mit dem C-Terminus der leichten Kette der Antikörperfragmente erzielt, welche zur radioaktiven Bildgebung mit ^{124}I bzw. ^{125}I markiert wurden.

Zur Erhöhung der Bioaktivität von Therapeutika durch Verlängerung der Wirkungsdauer eignen sich dagegen vor allem längere PAS-Polypeptide ab einer Länge von 600 Resten. So zeigte das menschliche Wachstumshormon (hGH) nach PASylierung mit einer PAS#1(600)-Polypeptidsequenz nach intravenöser Injektion eine 95fach

verlängerte Plasma-Halbwertszeit im Mausmodell und dabei annähernd die volle Rezeptoraffinität der nicht PASylierten Version (Schlapschy *et al.*, 2013). Der wachstumsfördernde Effekt von PAS#1(600)-hGH wurde anhand der Gewichtszunahme wachstumsdefizienter Mäuse quantifiziert und war infolge der PASylierung mindestens 6fach gesteigert. Auch menschliches Interferon- α -2b (IFN) und das humanisierte Fab-Fragment des Antikörpers 4D5 gegen HER2 (Trastuzumab) erfuhren im Mausmodell als PAS#1(600)-Fusionsproteine eine Verlängerung der Halbwertszeit um den Faktor 30 bzw. 21, wie in derselben Arbeit demonstriert wurde.

Ein auf Interferon- α -2b basierender IFN-Superagonist zeigte als PAS#1(600)-Fusionsprotein eine mehr als 10fach gesteigerte Plasma-Halbwertszeit im transgenen Mausmodell für Multiple Sklerose (Harari *et al.*, 2014). Das Adipokin Leptin profitierte nach N-terminaler PASylierung mit einem PAS#1(600)-Polypeptid von einer sogar 46fach erhöhten Halbwertszeit im Plasma von Mäusen, welche nach einmaliger Verabreichung des Fusionsproteins mit einer mehrere Tage andauernden signifikanten Reduktion der täglichen Nahrungsaufnahme um bis zu 60 % reagierten (Morath *et al.*, 2015). Dahingegen hielt die Wirkung des nicht PASylierten Leptin nicht einmal für 24 h an. Bemerkenswerterweise erwies sich die PASylierung als voll kompatibel mit der Passage des Hormons durch die Blut-Hirn-Schranke, die offenbar für das PAS#1(600)-Leptin-Fusionsprotein im Hypothalamus ohne Einschränkungen erfolgte.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung unterschiedlicher PAS-Polypeptidsequenzen, die hinsichtlich ihrer biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften PEG gegenübergestellt wurden. Im Vordergrund standen dabei die konformationellen Merkmale beider Polymertypen und die Auswirkungen der Aminosäuresequenz auf die Molekülform und das hydrodynamische Volumen, welches den effektiven hydrodynamischen Radius eines Wirkstoffkonjugats signifikant erhöht und maßgeblich für den Erfolg der PASylierungs- wie auch der PEGylierungstechnologie ist. Konformationsanalysen des PAS-Polypeptidrückgrats erfolgten mittels CD-Spektroskopie und wurden mit hydrodynamischen Daten aus SEC- und DLS-Messungen in Bezug gesetzt. Einen wichtigen Teil der hydrodynamischen Charakterisierung der Polymere in dieser Arbeit stellte die Erhebung von Viskositätsdaten dar. Schließlich wurden vergleichende SDS-PAGE-Analysen durchgeführt und das Lösungsverhalten der Polymere sowie deren Hydrophilie anhand von RPC-Experimenten studiert.

4.1.2 Vorzugskonformationen und hydrodynamisches Volumen der Polymere in wässriger Lösung

Viele Polymere weisen in Lösung vorzugsweise eine *Random-Coil*-Konformation auf, die statistisch fluktuiert und keine strukturelle Ordnung beinhaltet. Das ideale *Random-Coil*-Polymer stellt man sich als unendlich dünne Kette aus Rückgratatomen oder -atomgruppen vor, welche durch Bindungen verknüpft sind, die sich durch unabhängige Diederwinkel mit vollkommen freier Rotierbarkeit auszeichnen (Cantor & Schimmel, 1980). In einem realen Polymer hingegen sind die Diederwinkel zwischen den Einheiten des Rückgrats teilweise fixiert, da definierte Bindungsrotamere in Abhängigkeit von der Rotationsbarriere energetisch begünstigt sind, und aufgrund der endlichen Ausdehnung der Polymerkette nimmt diese selbst ein bestimmtes Raumvolumen in Anspruch. Selbstverständlich sind dabei Konformationen, bei denen Teile des Polymers einander durchdringen müssten, nicht zugänglich, so dass die einzelnen Rotationswinkel nicht mehr völlig unabhängig voneinander sind (*Excluded-volume Effect*). Zusätzlich erhöht sich das von der Polymerkette eingenommene Volumen durch die Solvatisierung mit Lösungsmittelmolekülen, insbesondere durch Ausbildung von H-Brücken mit Wassermolekülen.

In Polypeptiden sind aufgrund des Doppelbindungscharakters der Peptidbindung die C_{α} -Atome zweier verbundener Aminosäuren jeweils in einer Raumebene fixiert. Die konformationelle Freiheit des Peptidrückgrats beschränkt sich daher auf die Drehung um die N- C_{α} - bzw. C_{α} -C-Einfachbindungen, welche durch die φ - bzw. ψ -Diederwinkel charakterisiert sind. Das räumliche Ausschlussvolumen einer Polypeptidkette (*Excluded Volume*) hängt von den Aminosäureresten ab, aus denen es aufgebaut ist. Diese Seitenketten bestimmen auch den mittleren Gyrationradius eines *Random-Coil*-Polypeptids, der sich im charakteristischen C_n -Wert als Maß für die Starrheit einer Polypeptidkette widerspiegelt. Je schneller sich der C_n -Wert mit steigender Kettenlänge des Polypeptids an einen asymptotischen Wert bei unendlicher Länge annähert und je kleiner der sich ergebende C_{∞} -Wert ist, desto flexibler ist das Polypeptid. Poly-Glycin zeigt daher den mit Abstand geringsten C_{∞} -Wert aller Polypeptide und erreicht diesen schon bei viel kürzeren Kettenlängen als jedes andere Polypeptid.

Aufgrund der ausgeprägten konformationellen Freiheitsgrade des Polyether-Rückgrats aus durchweg nahezu frei drehbaren Einfachbindungen liegt PEG in wässriger Lösung als flexibles *Random-Coil*-Polymer vor. Dies wurde durch volumetrische Messungen wässriger PEG-Lösungen unter Variation des Umgebungsdrucks in Kombination mit Kleinwinkel-Neutronenstreuung bewiesen, welche durch Beobachtung der Veränderung

des Gyrationradius von PEG mit dem Druck dessen konformationelle Charakterisierung erlaubten (Vennemann *et al.*, 1987). Das Polymer-Rückgrat nimmt dabei bevorzugt eine *gauche*-Konformation an. Es gibt experimentelle Hinweise darauf, dass die helicale Struktur von PEG, wie sie im Feststoff vorliegt, auch in wässriger Lösung ausgeprägt sein kann (Dinç *et al.*, 2010), allerdings sind solche Strukturabschnitte des Polymers mit lokaler Ordnung als fluktuierend zu betrachten und widersprechen damit der *Random-Coil*-Konformation als statistischem Konformationsmittel nicht.

Die Koordination von Wassermolekülen durch die PEG-Ether-Sauerstoffatome mittels Wasserstoffbrückenbindungen führt zu H₂O-Agglomeraten zu beiden Seiten der PEG-Kette, was zu einem stark vergrößerten hydrodynamischen Volumen beiträgt (Dinç *et al.*, 2010). Mit Hilfe hydrodynamischer und viskosimetrischer Methoden konnte den in dieser Arbeit untersuchten Amino-PEG-Polymeren eine statistisch bevorzugte nahezu sphärische Molekülform zugeordnet werden, wie es für eine ungeordnete *Random-Coil*-Kette zu erwarten ist (siehe Abschnitt 3.1.10).

Die Untersuchung der Konformation der PAS-Polypeptide in wässriger Lösung mittels CD-Spektroskopie (vergleiche Abschnitt 3.1.9) erbrachte im Einklang mit vorangegangenen Studien charakteristische Differenzspektren mit einem ausgeprägten Minimum um 200 nm (Schlapschy *et al.*, 2013). Allen PAS-Spektren fehlte jedoch ein Maximum bei etwa 225 nm, welches für die *Random-Coil*-Struktur von Polypeptiden mit charakteristischem Minimum bei 195 nm (Tiffany & Krimm, 1969) zu erwarten sein sollte. Dies legte die Zuordnung der CD-Spektren von PAS-Polypeptiden eher zu einer „ungeordneten Polyprolin-Struktur“ nahe (Tiffany & Krimm, 1968a), welche lediglich ein einzelnes intensives Minimum um 200 nm aufweist. Eine reine *Random-Coil*-Struktur wurde laut Fachliteratur für Polypeptide in wässriger Lösung nur selten beobachtet.

Die „ungeordnete Polyprolin-Struktur“ zeichnet sich sowohl durch Sekundärstrukturbeiträge der *Random-Coil*-Konformation von Polypeptiden (charakteristisches Minimum bei 195 nm) als auch der PPII-Helix aus, deren ideales CD-Spektrum ein charakteristisches Minimum bei 205 nm und ein Maximum bei 225 nm aufweist (Kakinoki *et al.*, 2005). Da repetitive Sequenzabschnitte innerhalb eines Polypeptids höchst unwahrscheinlich eine rein zufällige Struktur ausbilden (Hayashi *et al.*, 1999), sind grundsätzlich zumindest kleine Anteile struktureller Ordnung in PAS-Polypeptiden zu erwarten.

4.1.3 Hydrodynamisches Volumen und Molekülform der Polymere

Die hydrodynamische Charakterisierung der PAS-Polypeptide erfolgte mit Hilfe von SEC, DLS und Mikroviskosimetrie (Abschnitt 3.1.10). Wie für die untersuchten PEG-Polymere wurden hydrodynamische Radien unter Formannäherung der Polypeptide durch ideale Sphären aus den Viskositätsdaten abgeleitet und mit den in DLS-Messungen beobachteten Radien verglichen. Hierbei wurden in Abhängigkeit von der Sequenz-Zusammensetzung der PAS-Polypeptide, deren Einfluss auf die Konformation weiter unten in der Diskussion (Abschnitt 4.2.3) eingehend betrachtet wird, Diskrepanzen zwischen den aus der intrinsischen Viskosität $[\eta]$ berechneten und mit DLS bestimmten hydrodynamischen Radien festgestellt (vergleiche Tabelle 8, Abschnitt 3.1.10). Die Abweichung der Molekülgestalt von der idealen Kugelform wurde mittels mathematischer Methoden auf prolate Ellipsoide als wahrscheinlichste Molekülform der PAS#1-, PA#1- und P1A1-Polypeptide zurückgeführt. Konformationelle PPII-Strukturanteile führen bekanntermaßen zu einer eindimensionalen Streckung des Polypeptid-Rückgrats (Tiffany & Krimm, 1968a), was die Formabschätzung der PAS-Polypeptide als prolate Ellipsoide plausibel macht.

Die apparente Molmasse der PAS-Polypeptide als Maß für deren hydrodynamisches Volumen wurde in dieser Arbeit sowohl durch SEC- wie auch DLS-Experimente abgeschätzt und fiel durchweg größer aus als für PEGs mit vergleichbarer Masse. Diese Befunde bekräftigen die Annahme einer elongierten Konformation der PAS-Polypeptide aufgrund von PPII-Anteilen, zumal derart länglich geformte Polymere bei Kalibrierung mit globulären Standardproteinen stets höhere apparente Molmassen zeigen als ideale kugelförmige *Random-Coil*-Polymere, was sowohl für die SEC (Dubin & Principi, 1989) wie auch DLS-Experimente (Schurr & Schmitz, 1986) bekannt ist.

Aufgrund der flexiblen Natur der *Random-Coil*-Konformation haben lineare Polymere wie PEG den Vorteil, prinzipiell auch Poren durchdringen zu können, die kleiner sind als der durchschnittliche hydrodynamische Moleküldurchmesser, und sie zeigen bessere Gewebepenetration als starre kugelförmige Makromoleküle (Markovsky *et al.*, 2012). Neben der idealisierten Kugelform eines *Random-Coil*-Polymers ist auch die elongierte ellipsoide Molekülgestalt der PAS-Polypeptide als zeitliches Mittel des Ensembles möglicher Konformationen zu verstehen, was der Passage durch Poren mit kleinerem Durchmesser also nicht im Wege steht.

4.1.4 Viskosimetrische Untersuchungen der Polymere in wässriger Lösung

Die viskosimetrische Charakterisierung der PAS#1- und PA#1-Polypeptide zeigte für die Polypeptid-Sequenzen deutlich geringere Viskositätswerte als für PEG vergleichbarer Molmasse bei allen untersuchten Polymerkonzentrationen (vergleiche Abschnitt 3.1.10). Als Folge des verglichen mit den PAS-Polypeptiden größeren Mark-Houwink-Parameters K , der in dieser Arbeit zu etwa 0,109 mL/g bestimmt wurde, nimmt die von PEG vermittelte Viskosität mit steigender Kettenlänge schneller zu als für die PAS-Polypeptide. Derselbe Zugewinn an hydrodynamischem Volumen bringt also bei PEG eine stärker ausgeprägte Viskositätssteigerung mit sich, als diese für die PAS-Polypeptide bestimmt wurde (vergleiche Abschnitt 3.1.10). Dies ist ein für biopharmazeutische Anwendungen interessanter Befund, da die Nierenfiltration umgekehrt proportional zum hydrodynamischen Volumen ist.

Mit den PAS-Sequenzen bietet sich so auch in diesem Aspekt eine wertvolle Alternative zum PEG-Polymer, wenn nämlich kritische Schwellenwerte der Probenviskosität nicht überschritten werden dürfen. Beispielsweise werden bei Verabreichung von Biopharmazeutika mittels subkutaner Injektion üblicherweise hochkonzentrierte Proteinlösungen (um 100 mg/mL) in möglichst kleinen Volumina (etwa 1 mL) gespritzt, wobei die Probenviskosität unterhalb von 20 cP liegen sollte (Nichols *et al.*, 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Mark-Houwink-Parameter der PAS-Polypeptide experimentell Werte von $a = 0,060$ und $K = 0,054$ für PAS#1 bzw. $a = 0,063$ und $K = 0,075$ mL/g für PA#1 ermittelt und für PEG die Werte $a = 0,06$ und $K = 0,109$ mL/g (vergleiche Tabelle 9, Abschnitt 3.1.10). Die PEG-Referenzwerte liegen für a im Bereich 0,5 bis 0,7 und für K bei 0,05 bis 0,125 mL/g in wässriger Lösung (Vergleichswerte der American Polymer Standard Corporation, siehe <http://www.ampolymer.com/Mark-HouwinkParameters.html>; Gregory & Huglin, 1986; Bailey *et al.*, 1958). Die in dieser Arbeit bestimmten Viskositätsparameter für PEG stehen in guter Übereinstimmung mit den Referenzwerten.

Die experimentellen Werte der PAS-Polypeptide zeigen grundsätzlich Ähnlichkeit mit den Parametern von PEG und auch von Polymethylmethacrylat (PMMA), wofür man a -Werte von 0,5 bis 0,8 und K -Werte zwischen 0,05 und 0,12 mL/g in polaren organischen Lösungsmitteln kennt (Wagner, 1987). Die Referenzwerte von PEG und PMMA wurden in sogenannten „guten Lösungsmitteln“ bestimmt, worin die Wechselwirkungen des Polymers mit Solvensmolekülen stärker sind als die der Polymer-Moleküle untereinander. Der Mark-Houwink-Exponent a ist ein empirisches Maß für die Aus-

dehnung einer Polymerkette in Lösung, welche von der Art des Lösungsmittels abhängt. Für die *Random-Coil*-Konformation nimmt a charakteristische Werte zwischen 0,5 und 0,8 an (Masuelli, 2014). Die experimentellen Werte des Mark-Houwink-Exponenten liegen für die hier angeführten Polymere PEG und PMMA wie auch die PAS-Polypeptide im entsprechenden Bereich und erlauben dadurch auch aufgrund der Viskositätsmessungen die empirische Zuordnung zu dieser Lösungskonformation. Außerdem weist die Ausprägung der *Random-Coil*-Struktur bei PEG und PMMA in „guten Lösungsmitteln“ darauf hin, dass sich die für die PAS-Polypeptide verwendeten wässrigen Puffer hervorragend als Solvens eignen und die Wechselwirkung mit Wassermolekülen gegenüber denen zwischen den Polypeptid-Molekülen bevorzugt ist, was zudem ungefaltete Struktur in Lösung stabilisiert. Dieser Aspekt der konformationsabhängigen Löslichkeit wird in Abschnitt 4.2.3 der Diskussion weiter ausgeführt.

In dieser Arbeit wurden nur die klassischen PAS-Polypeptidsequenzen PAS#1 und PA#1 bei variierender Länge mittels Viskosimetrie untersucht. Viskositätsstudien der P1A1- und der P1A3-Sequenzen wurden für Polypeptide einer Standardlänge von 200 Aminosäuren durchgeführt und ergaben für beide Polypeptidsequenzen erhöhte Viskositätswerte im Vergleich zu PAS#1 und PA#1. Während für P1A1(200) eine elongierte Molekülkonformation (erläutert im Abschnitt 4.2.3) als Ursache vermutet wurde, führte möglicherweise beim P1A3-Polypeptid die Bildung von Mikroaggregaten (ausgeführt im Abschnitt 4.2.4) in der Polymer-Lösung zur beobachteten Erhöhung der Probenviskosität. Zur Bestimmung der Mark-Houwink-Parameter des konformationell interessanten P1A1-Polypeptids könnten weitere Viskositätsmessungen mit verschiedenen Kettenlängen durchgeführt werden, um zusätzliche Aussagen über die Molekülform aus dem formcharakteristischen Parameter a zu gewinnen.

4.1.5 Hydrophiler Charakter der Polymere

Die RPC-Untersuchungen der Polymere ließen den Schluss zu, dass die Polypeptide im Vergleich zu PEG schwächere hydrophobe Interaktionen mit der Polystyrol-Matrix eingehen (siehe Abschnitt 3.1.8). PAS-Polypeptide tragen also deutlich mehr zur Gesamtlöslichkeit eines PASylierten Konstrukts bei als PEG zur Löslichkeit von PEG-Konjugaten. Da der hydrophile Charakter der PAS#1-Sequenz einerseits und der Serin-freien PA#1-Sequenz andererseits anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nahezu ununterscheidbar war, konnte das Peptid-Rückgrat der PAS-Polypeptide als das eigentliche Biomimetikum für PEG herausgestellt werden, weil

dessen Eigenschaften das biophysikalische Verhalten der PAS-Polypeptide gegenüber den Seitenketten dominieren (Schlapschy *et al.*, 2013). Die hohe Hydrophilie der Polypeptide scheint also eine fundamentale Eigenschaft des gut exponierten Peptidrückgrats zu sein, zu der die PAS-Seitenketten keinen direkten Beitrag liefern. Die Iminosäure Prolin verhindert aufgrund konformationeller Einschränkungen, die detailliert in Abschnitt 4.2.2 erläutert werden, die Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen. Die ungefaltete Polypeptidkette gewöhnlicher Proteine tendiert in wässriger Lösung dagegen zur Aggregation aufgrund von Wechselwirkungen der Seitenketten, unter denen vor allem hydrophobe Interaktionen eine Rolle spielen. Mit den Aminosäureresten Prolin, Alanin und Serin wurden bewusst kleine Seitenketten (im Vergleich mit den Abmessungen der Peptidgruppe) gewählt, die minimale Möglichkeiten zur Wechselwirkung mit anderen Resten bieten und daher hohe Wasserlöslichkeit zeigen (Schlapschy *et al.*, 2013).

Die Hydrophilie der in dieser Arbeit untersuchten Polymere kann durch das Verhältnis unpolarer aliphatischer Kohlenwasserstoffgruppen zu polaren Atomgruppen mit H-Brücken-Donor- oder -Akzeptor-Funktion bewertet werden. Zu letzteren zählen die Amid-(NH) und Carbonyl-Gruppen (CO) von Peptidbindungen bzw. die PEG-Ethersauerstoffe. Das $\text{CH}_n:(\text{NH}/\text{CO})$ -Verhältnis der PA#1-Polypeptidsequenz liegt beispielsweise mit 1,35 deutlich unter dem $\text{CH}_2:\text{O}$ -Verhältnis von PEG mit einem Wert von 2, so dass selbst für das Serin-freie PA#1 ein stärkerer hydrophiler Charakter als für das PEG-Polymer zu erwarten ist (Schlapschy *et al.*, 2013). Die hohe Lösungsmittlexposition der polaren Peptidgruppen des Rückgrats infolge der ungeordneten Sekundärstruktur ist als Hauptursache der ausgeprägten Hydrophilie von PAS-Polypeptiden zu sehen. Der Vergleich des basischen Charakters der Peptidbindung (am Beispiel von *N*-Ethylacetamid: $\text{pK}_\text{S} \approx -0,5$; Cox *et al.*, 1981) mit der Etherbindung (am Beispiel von Diethylether: $\text{pK}_\text{S} \approx -2,1$; Levitt & Levitt, 1979) weist darüber hinaus auf die etwa 40mal bessere Protonierbarkeit des PAS-Polypeptidrückgrats als weiteren Aspekt der Hydrophilie hin.

4.1.6 SDS-PAGE-Analysen der Polymere

In der SDS-PAGE waren weder PAS-Polypeptide noch PEG mit dem für Proteine etablierten Farbstoff Coomassie Brilliant-Blau R-250 anfärbbar (siehe Abschnitt 3.1.7). Die Bindung von Coomassie an Proteine wird auf die elektrostatische Wechselwirkung des Farbstoffs mit positiv geladenen Aminosäure-Seitenketten mittels der anionischen Sulfonat-Gruppen zurückgeführt, welche außerdem durch hydrophobe Wechsel-

wirkungen zwischen unpolaren Seitenketten des Proteins und dem aromatischen Ring-system des Farbstoffs eine Verstärkung erfährt (Tal *et al.*, 1985). Da keines der Polymere, die in dieser Arbeit Gegenstand der SDS-PAGE-Analyse waren, über geeignete Seitenketten oder chemische Gruppen verfügt, ist das Ausbleiben der Coomassie-Färbereaktion nicht überraschend.

Für PEG-Polymere ist mit der BaI_2 -Methode (Skoog, 1979) eine Möglichkeit zur spezifischen Anfärbung in der SDS-PAGE bekannt. Interessanterweise ließen sich auch die PAS-Polypeptide mit Hilfe dieser Methode färben. Dies weist auf Gemeinsamkeiten von PEG und PAS im chemischen Verhalten gegenüber den Ba^{2+} -Ionen hin (vergleiche Abbildung 42, Abschnitt 4.1.9), deren Komplexbildung über Sauerstoffatome vermutlich die Koordination von Polyiodid-Ionen für den Färbungsprozess ermöglicht. Allerdings war die Anfärbung der PAS-Polypeptide mit dieser Methode weniger effizient.

Nachdem der Färbenachweis von PAS-Polypeptiden und PEG in der SDS-PAGE etabliert war, konnten Unterschiede im elektrophoretischen Laufverhalten beider Polymere untersucht werden. Erstaunlicherweise zeigte das für seine Hydrophilie bekannte PEG eine gegenüber den freien PAS-Polypeptiden erheblich gesteigerte elektrophoretische Mobilität, was auf eine wesentlich höhere Bindekapazität für SDS hindeutete (vergleiche Abschnitt 3.1.7). Die grundsätzlich niedrige SDS-Bindekapazität der PAS-Polypeptide, die auch in dieser Arbeit beobachtet wurde, kann in Analogie zur Coomassie-Färbung durch das Fehlen basischer und vor allem hydrophober Seitenketten erklärt werden (Tal *et al.*, 1985). Obwohl das PEG-Polymer keinerlei Seitenketten aufweist, scheint dessen Polyether-Rückgrat deutlich mehr hydrophobe Wechselwirkungen mit SDS-Molekülen auszuprägen. An der äußerst geringen SDS-Bindung durch PAS-Polypeptide scheiterten auch indirekte SDS-Gel-Färbeverfahren wie z. B. die Kupferfärbung (Lee *et al.*, 1987), die auf der Bindung von SDS durch Proteinanalyten und der Präzipitation von ungebundenem SDS beruhen, so dass sich für die PAS-Polypeptide kein feststellbarer Kontrast der Banden vor dem Gel-Hintergrund ergab.

4.1.7 Löslichkeitsverhalten der Polymere in wässriger Lösung

Gemeinsamkeiten zwischen PAS-Polypeptiden und den ebenfalls ungeladenen PEG-Polymeren zeigten sich in dieser Arbeit im Löslichkeitsverhalten gegenüber Solventien unterschiedlicher Polarität. Beide Polymertypen lösen sich in wässrigen Puffern bis zu hohen Konzentrationen von über 100 mg/mL.

Unter den Polyethern nimmt PEG mit seiner hohen Wasserlöslichkeit eine Sonderstellung ein. Diese wird damit erklärt, dass sich der Abstand von Sauerstoffatomen innerhalb der Polymerkette nahezu perfekt in das Wasserstoffbrücken-Netzwerk des Wassers einpassen lässt. Aufgrund der konformationellen Flexibilität des PEG-Rückgrats können – weitgehend unter Beibehaltung der energetisch günstigen *gauche*-Konformation – die benachbarten Sauerstoffatome Abstände von ungefähr 2,85 Å einnehmen, während die Abstände zwischen jedem dritten Sauerstoffatom gleichzeitig auf etwa 4,7 Å einstellbar sind, wie aus theoretischen Struktursimulationen hervorgeht (Kjellander & Florin, 1981). Dadurch kann sich eine PEG-Kette gut in hexagonal strukturiertes Wasser einfügen, worin die H₂O-Sauerstoff-Atome die gleichen Abstände aufweisen, was u.a. mittels Röntgen/Raman- und Röntgen-Absorptionsspektroskopie bestimmt wurde (Bergmann *et al.*, 2007).

Wasser bildet im gefrorenen Zustand eine hexagonale Struktur aus (Eis 1h-Struktur), wobei die Moleküle in Flüssigkeit bevorzugt in tetraedrischer Koordination mit verringertem Ordnungsgrad vorliegen. Die Solvatisierung von PEG könnte nach Ansicht von Blandamer *et al.* (1969) eine lokal erhöhte Ordnung der von PEG koordinierten Wassermoleküle zur Folge haben und hexagonale Strukturen begünstigen. Allerdings könnte sich umgekehrt auch das flexible PEG-Polymer durch Annahme einer helicalen Konformation, ähnlich der Feststoffstruktur, mit einem O-O-Abstand von etwa 2,88 Å an die tetraedrische Wasserstruktur anpassen (Kjellander & Florin, 1981). Die mittlere Lösungskonformation von PEG als Ensemble fluktuierender Einzelkonformationen beinhaltet mit hoher Wahrscheinlichkeit lokal geordnete Strukturbereiche (siehe Abschnitt 4.1.2), die dementsprechend zur guten Löslichkeit dieses Polymers in Wasser beitragen.

Es ist denkbar, dass die „ungeordnete Polyprolin“-Konformation des PAS-Polypeptids, die in dieser Arbeit beobachtet wurde (Abschnitt 4.1.2), vergleichbar kompatibel mit der hexagonalen Wasser-Struktur ist, wie es für PEG angenommen wird. Auch wenn aufgrund struktureller Anteile der PPII-Konformation bestimmte ϕ - und ψ -Diederwinkel bevorzugt sind und der ϕ -Winkel von Prolinresten sogar fixiert ist – wie im Abschnitt 4.2.2 eingehend erläutert wird – sind die von den C _{α} -Atomen ausgehenden Einfachbindungen im Polypeptid-Rückgrat prinzipiell frei drehbar. Für den Fall der PPII-Konformation des PA#1-Sequenzausschnitts in Abbildung 42 (Abschnitt 4.1.9) als in Lösung bevorzugte Teilkonformation (diskutiert im Abschnitt 4.2.3) wurden die Abstände des Amid-Stickstoffs zum Carbonyl-Sauerstoff derselben Aminosäure mit 2,9 Å und zum Amid-Stickstoff der folgenden Aminosäure mit 3,7 Å unter Verwendung der PyMol-Software (DeLano, 2002) abgeschätzt. Die Abstände zweier aufeinander folgender

Carbonyl-Sauerstoffatome wurden auf gleiche Weise zu 3,8 Å bestimmt, und der N-O-Abstand innerhalb der Peptidgruppe zu 2,2 Å. Trotz konformationeller Einschränkungen, die bei einem Polypeptid infolge der planaren Fixierung der Peptidgruppen im Vergleich zu PEG bestehen, könnten einige der H-Brücken-Donoren und -Akzeptoren im PAS-Polypeptidrückgrat aufgrund flexibler Konformationen geeignete Abstände für den Einbau in die lokale Wasserstruktur annehmen.

Die für Proteine wohletablierte Methanol/Chloroform-Fällung (Wessel & Flügge, 1984) von SUMO-PA#1(200) demonstrierte die Unlöslichkeit des PA#1-Polypeptids als Bestandteil eines Fusionsproteins. Die Fällung von PAS-Fusionsproteinen aus wässriger Lösung durch begrenzt mischbare, aber hinreichend unpolare Lösungsmittel war auch mit einem hohen Überschuss an Aceton bei -20 °C möglich. Allerdings war die Polarität des Lösungsmittelgemischs erst bei einem Anteil von 80 % (v/v) Aceton zur Fällung des Fusionsproteins TrxA-PA#1(600) ausreichend herabgesetzt (Abschnitt 3.1.8).

Andere Fällungsmethoden für Proteine basieren auf der Denaturierung der nativen Struktur durch Einwirkung von Säuren, welche durch Protonierung negative Ladungen der Proteinseitenketten, die an strukturellen elektrostatischen Wechselwirkungen beteiligt sind, neutralisieren und so die native Proteinfaltung destabilisieren (Scopes, 1994). Nach saurer Denaturierung durch Trichloressigsäure geht man davon aus, dass aufgrund von solvensexponierten unpolaren Bereichen der Proteinoberfläche, welche im nativen Zustand nicht zugänglich sind, die spontane Aggregation „partiell strukturierter Faltungsintermediate“ eintritt (Rajalingam *et al.*, 2009). Da PAS-Polypeptide bereits in nativer Form strukturell ungeordnet vorliegen und keine hydrophoben Strukturen aufweisen, welche intermolekulare Wechselwirkungen im wässrigen Milieu fördern könnten, sind solche Methoden zur Herabsetzung der Löslichkeit wenig geeignet, sofern dies nicht auf die Faltung des Fusionspartners zutrifft. Die hohe Hydrophilie der PAS-Polypeptide kann dagegen selbst aggregationsempfindliche Fusionspartner in wässriger Lösung stabilisieren, wie bereits bei thermischen Entfaltungstudien mit PASyliertem Interferon und hGH beobachtet wurde (Schlapschy *et al.*, 2013). Dieser stabilisierende Effekt könnte dazu beigetragen haben, dass das Fusionsprotein TrxA-PA#1(600) durch Ansäuern mit Trichloressigsäure (bis 13 % der Sättigungskonzentration) nicht zur Präzipitation gebracht werden konnte.

Interessanterweise ließen sich die TrxA- und SUMO-PAS-Fusionsproteine allerdings durch Ammoniumsulfat aus konzentrierter wässriger Lösung fällen (siehe Abschnitt 3.1.8). Dieser in der Proteinbiochemie häufig verwendete Prozess der „Aussalzung“ kann dadurch erklärt werden, dass die vom PAS-Polypeptid-Rückgrat koordinierte

ausgedehnte Hydrathülle von dem sehr hygroskopischen Salz $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hinreichend verknappt wird, um die zur Fällung erforderlichen Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen zu verstärken (Scopes, 1994). Im Fall von PAS-Sequenzen und anderen löslichen Proteinen sind diese Wechselwirkungen nicht primär hydrophober Natur, sondern beruhen vielmehr vor allem auf polaren und durch Wasserstoffbrücken vermittelten Interaktionen der Peptidgruppen.

4.1.8 Löslichkeitsverhalten in organischen Lösemitteln

Von den verschiedenen organischen Lösungsmitteln, die in dieser Arbeit für die PAS-Polypeptide getestet wurden (Abschnitt 3.1.8), eignen sich die aprotischen Lösemittel DMF und DMSO für PEG- sowie PAS-Polymere gleichermaßen gut. Mit Diethylether dagegen können beide Polymere aus dem organischen Solvens präzipitiert werden. Bekanntermaßen ist Polyethylenglycol in unpolaren Lösungsmitteln wie Kohlenwasserstoffen und Ethern unlöslich (Harris *et al.*, 1984), wohingegen stärker polare Verbindungen wie Tetrahydrofuran und Chloroform und auch Alkohole wie Methanol (Dinç *et al.*, 2010) und Ethanol (Haglund, 1987) für PEG sogar bessere Lösungsmittel als Wasser darstellen. Dies wurde von Dinç *et al.* (2010) anhand der Berechnung von Θ -Temperaturen, bei denen die Wechselwirkungen des Polymers mit dem Solvens energetisch ähnlich ausgeprägt sind wie die der Polymer-Moleküle untereinander, für PEG in verschiedenen organischen Lösungsmitteln und Wasser gezeigt. Mit steigender Temperatur verringert sich dabei generell die Löslichkeit von PEG. Für die organischen Lösemittel Tetrahydrofuran, Chloroform, DMSO und Methanol lagen die Θ -Temperaturen oberhalb der in Wasser ermittelten Temperatur, weshalb Wasser die geringste Lösungskapazität für PEG zu haben scheint.

Auffälligerweise ließ sich das PAS-Polypeptid PA#1(200) weder in Ethanol noch mit Aceton oder Acetonitril, die sich bekanntermaßen allesamt gut als Lösungsmittel für PEG eignen (Harris, 1992), in Lösung bringen. Ein Laborbefund von Lars Friedrich (XL-protein GmbH, persönliche Mitteilung) demonstrierte aber die Löslichkeit des Polypeptids in Methanol. Die PAS-Polypeptide erfordern also grundsätzlich stärker polare Lösungsmittel als PEG, was erneut auf eine höhere Hydrophilie der Biopolymere schließen lässt. In weiterführenden Studien könnte die maximale Löslichkeit von PAS-Polypeptiden in geeigneten organischen Solventien quantifiziert werden, was für chemische Konjugationsreaktionen in größerem Maßstab (siehe Abschnitt 4.3.2) relevant wäre.

4.1.9 Löslichkeitsverhalten bei erhöhten Temperaturen

Auch in den temperaturabhängigen Veränderungen der Löslichkeit und der Lösungskonformation weisen PAS-Polypeptide Parallelen zu PEG auf (Abschnitt 3.1.8). Für die PEG-Polymere in dem hier untersuchten Längen- bzw. Größenbereich (10 bis 40 kDa) und den verwendeten Konzentrationen von 1 bis 100 mg/mL sind in wässriger Lösung untere (LCST) und obere (UCST) kritische Lösungstemperaturen über 100 °C ($0\text{ °C} < 100\text{ °C} < \text{LCST} < \text{UCST}$) aus der Literatur bekannt (Bae *et al.*, 1991; Seuring & Agarwal, 2012b). Das bedeutet in der Praxis, dass unterhalb von 100 °C und PEG-Konzentrationen von 10 %, d. h. 100 mg/mL, keine Mischungslücke für ein PEG-Wasser-Gemisch vorliegt. Ein ähnliches Temperaturverhalten zeigen auch viele Polyvinylalkohole und Polyacrylsäureester. Acrylamid/Acrylnitril-Copolymere und Polymethacrylamid hingegen sind Beispiele für Polymere mit einer oberen kritischen Lösungstemperatur zwischen 0 und 100 °C, unterhalb derer in wässriger Lösung eine Phasentrennung beobachtet werden kann ($0\text{ °C} < \text{UCST} < 100\text{ °C}$; Seuring & Agarwal, 2012a).

Photometrische Trübungsmessungen mit PA#1(600) und PA#1(200) unter Beobachtung der optischen Dichte bei 600 nm ließen darauf schließen, dass das temperaturabhängige Löslichkeitsverhalten der PAS-Polypeptide dem von PEG ähnelt, da keine Phasentrennung im Bereich 0 bis 100 °C beobachtet wurde. Die graduelle Erwärmung der PA#1-Polypeptide auf 90 °C bei einer Konzentration von 5 mg/mL ließ keine Löslichkeitsgrenze in wässrigem Puffer erkennen. Ausgedehnte Turbiditätsmessungen bei deutlich höheren Polypeptid-Konzentrationen könnten womöglich Mischungslücken bestimmter PAS-Polypeptide in wässriger Lösung auffindig machen, wobei zudem sequenzabhängige Unterschiede in der Löslichkeit untersucht werden könnten.

Auch wenn die Löslichkeit der untersuchten PAS-Polypeptide bei erhöhten Temperaturen nicht erkennbar an Grenzen stieß, wurden dennoch gewisse temperaturabhängige Strukturübergänge für die PAS-Polypeptidsequenzen mittels CD-Spektroskopie festgestellt (Abschnitt 3.1.9). Die mit steigender Temperatur zu beobachtende Verringerung der Signalintensität und Verschiebung des charakteristischen CD-Minimums bei 200 nm in Richtung höherer Wellenlängen entsprach genau den Beobachtungen, die schon Tiffany und Krimm (1972) an Poly-L-Lysin und Poly-L-Glutaminsäure mit ungeordneter Konformation gemacht hatten. Der strukturelle Ordnungsgrad der PAS-Polypeptide erhöhte sich graduell zugunsten von PPII-Sekundärstrukturelementen und unter partiellem Verlust von *Random-Coil*-Charakter,

wie im Abschnitt 4.2.4 genauer betrachtet wird. Die dabei eintretende Streckung der mittleren Polypeptid-Konformation konnte an der direkt mittels DLS messbaren Vergrößerung des hydrodynamischen Radius nachvollzogen werden (vergleiche Abschnitt 3.1.9). Auch bei Erwärmung von PEG-Lösungen in Isobuttersäure auf etwa 60 °C wurden übrigens reversible Umordnungsprozesse beobachtet, in dem Fall jedoch umgekehrt zwischen einer stärker elongierten helicalen Struktur und der *Random-Coil*-Struktur (Alessi, 2004).

4.1.10 Chemischer Aufbau der Polymere

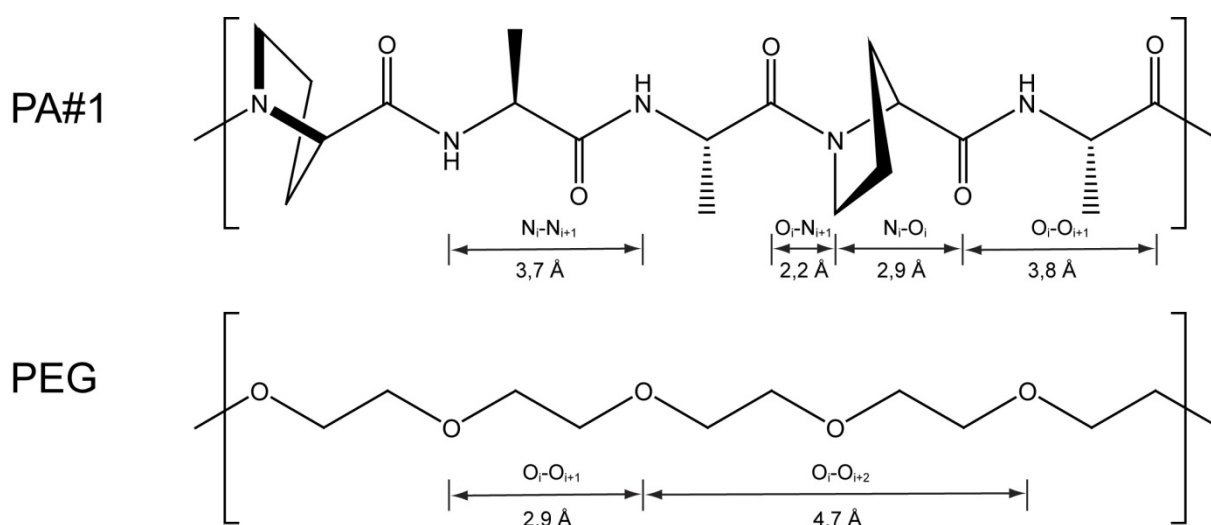


Abbildung 42: Vergleich des chemischen Aufbaus von PAS-Polypeptiden (am Beispiel eines Ausschnitts der PA#1-Polypeptidsequenz) und PEG-Polymeren. Das Peptid-Rückgrat ist in all-*trans*-Konfiguration und ebenso wie das PEG-Polymer in gestreckter Konformation dargestellt (mit ChemDraw Ultra 8.0). Für die PEG-Sauerstoffatome sind die Abstände angegeben, die mit größter Wahrscheinlichkeit in wässriger Lösung vorliegen (Kjellander & Florin, 1981). Die Abstände hydrophiler Atomgruppen (Amid-Stickstoff N und Carbonyl-Sauerstoff O) innerhalb derselben Aminosäure i bzw. bis zur folgenden Aminosäure $i+1$ des PA#1-Polypeptidrückgrats wurden mit Hilfe von PyMol (DeLano, 2002) anhand eines Prolin-Dekapeptids in PPII-Konformation (Szabo, 1997; PDB-Koordinatensatz unter <http://www.cryst.bbk.ac.uk/pp97/assignments/projects/szabo/index.htm>) abgeschätzt. Auch wenn das Polyether-Rückgrat von PEG mit seinen zahlreicheren drehbaren Einfachbindungen höhere konformationelle Flexibilität als das PA#1-Polypeptidrückgrat aufweist, könnten einige H-Brücken-Donoren und -Akzeptoren der polaren Peptidgruppen in geeigneter Konformation passende Abstände zum Einbau in das Wasserstoffbrücken-Netzwerk des wässrigen Solvens einnehmen, ähnlich wie für PEG vermutet. Das gleiche gilt für die Koordination von Ba^{2+} -Ionen bei der BaI_2 -Färbung (Skoog, 1979). Das Polymer-Rückgrat der PAS-Sequenzen ist durch die solvens exponierten Peptidbindungen intrinsisch stärker polar als die PEG-Polyether-Kette, da es im Verhältnis zu unpolaren Kohlenwasserstoffgruppen eine größere Zahl von H-Brücken-Donoren und -Akzeptoren aufweist als PEG.

Ihrem biologischen Ursprung zum Trotz ähneln PAS-Polypeptide PEG auch hinsichtlich ihrer chemischen Stabilität. Wie das chemische Polymer sind die PAS-Sequenzen aufgrund des Fehlens reaktiver Seitenketten elektrisch neutral und chemisch inert, was insbesondere für die Serin-freien P/A-Polypeptide gilt (vergleiche Abbildung 42). Gegenüber posttranslationalen Modifikationen in der Zelle wie auch Hydrolyse oder Oxidation an der Luft zeigen sich die Polypeptid-Sequenzen vergleichbar unempfindlich wie PEG (Binder & Skerra, 2015). Hierbei ist allerdings zu bemerken, dass PEG wie alle Alkylether zur Bildung von Peroxiden durch Oxidation tendiert (Kumar & Kalonia, 2006), was bei PAS chemisch nicht möglich ist. Aufgrund der Abwesenheit von Cysteinresten beeinträchtigen PAS-Sequenzen nicht die korrekte Faltung von Fusionspartnern, deren native Struktur Disulfidbrücken verlangt; dadurch kann die PASylierung auch auf Proteine angewandt werden, die zur Sekretion in das bakterielle Periplasma und dortigen Bildung struktureller Disulfid-Bindungen vorgesehen sind (Skerra & Plückthun, 1988). Bei Fusion mit Proteinen, die freie Cysteinreste tragen, wie sie beispielsweise im IL-1Ra (Abschnitt 3.1.3) vorliegen, ist die Bildung unerwünschter Disulfid-Bindungen zwischen Polypeptid und dem Fusionspartner zudem ausgeschlossen.

4.2 Effekte von Sequenzveränderungen auf die Eigenschaften von PAS-Polypeptiden

4.2.1 Vorzugskonformationen von Poly-L-Prolin in Lösung

Zum besseren Verständnis der Auswirkungen der Iminosäure Prolin auf die konformationellen Eigenschaften einer Polypeptidkette sollen hier die strukturellen Präferenzen des Prolin-Homopolymers eingehender beleuchtet werden. Poly-L-Prolin kann abhängig von der Polarität des Lösemittels zwei charakteristische Sekundärstrukturen annehmen (Kakinoki *et al.*, 2005). In der kompakteren Polyprolin(I)-Struktur ist das hydrophile Peptidrückgrat gut durch die Prolin-Seitenketten abgeschirmt, so dass diese rechtsgängige Helix in einem unpolaren Lösungsmittel bevorzugt ist. Die Peptidbindungen liegen dabei ausnahmslos in *cis*-Konfiguration vor. Im Gegensatz dazu nehmen in der linksgängigen PPII-Helixstruktur alle Peptidbindungen die *trans*-Konfiguration ein, was zu einer gestreckten Konformation mit starker Lösungsmittel-exposition des Peptidrückgrats führt; diese ist in polarer Umgebung wie wässrigen Puffern begünstigt (Abbildung 43).

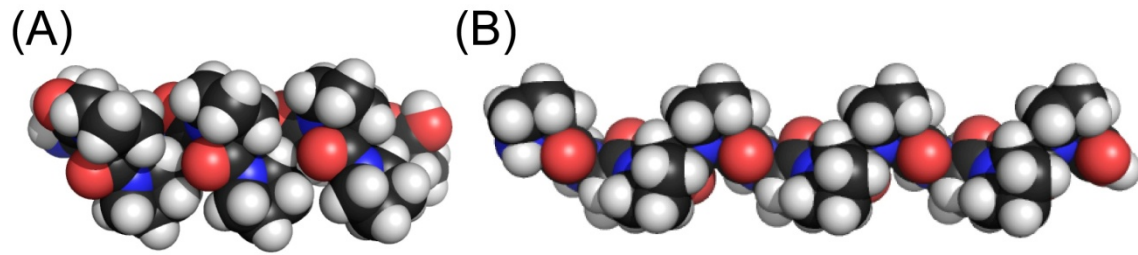


Abbildung 43: Struktur der Polyprolin-Helices Typ I und II. Das gleiche Dekapeptid aus *L*-Prolin (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/pps97/assignments/projects/szabo/index.htm>) ist in den beiden unterschiedlichen Konformationen dargestellt, die lösungsmittelabhängig bevorzugt werden (dargestellt mit PyMol, DeLano, 2002). Schwarz: Kohlenstoff; weiß: Wasserstoff; rot: Sauerstoff; blau: Stickstoff. **(A)** In der dicht gepackten Polyprolin(I)-Konformation ist das hydrophile Peptidrückgrat durch die Prolin-Seitenketten weitgehend abgeschirmt. **(B)** Die Polyprolin(II)-Helix weist eine stärker gestreckte Konformation unter erhöhter Exposition der polaren Peptidgruppen auf.

Bemerkenswerterweise bleiben die φ - und ψ -Diederwinkel des Peptidrückgrats in beiden Prolin-Helixtypen nahezu gleich (PPI: $\varphi = -75^\circ$, $\psi = 160^\circ$; PPII: $\varphi = -75^\circ$, $\psi = 145^\circ$) und spiegeln so die konformationellen Beschränkungen wider, die der Pyrrolidin-Ring von Prolin infolge seiner doppelten Verankerung am Peptidrückgrat vor allem für den φ -Winkel mit sich bringt. Langsame reversible Konformationsübergänge von der PPII- zur PPI-Struktur unter der dazu erforderlichen *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidbindungen, welche mit einer recht niedrigen Geschwindigkeit mit einer Halbwertszeit von etwa 1 min bei 25 °C erfolgt (Creighton, 1992), wurden für Poly-*L*-Prolin als direkte Folge der Veränderung der Lösungsmittelzusammensetzung beobachtet (Lin & Brandts, 1980). So genügte der Zusatz von 90 % (v/v) Butanol zu dem in Wasser gelösten Polypeptid, um den Übergang der Poly-Prolin(II)-Konformation zur PPI-Helix zu stimulieren. Das CD-Spektrum von Poly-*L*-Prolin in wässrigem Puffer, wo die PPII-Konformation vorherrscht, zeigt auffallende Ähnlichkeit mit einem idealen *Random-Coil*-Spektrum, allerdings mit einer Verschiebung des charakteristischen Minimums von 195 zu 205 nm, und es weist ebenfalls ein Maximum um 225 nm auf (Kakinoki *et al.*, 2005).

4.2.2 Konformationelle Betrachtungen Prolin-reicher Polypeptide

Viele bisherige Konformationsstudien von Alanin-basierten (und teilweise Prolin-haltigen) Peptiden beschränkten sich auf kurze Oligopeptide einer Länge von 7 bis 11 AS, um den Einfluss von Seitenketten auf die ausgebildete Sekundärstruktur möglichst gering zu halten (Shi *et al.*, 2002; Rucker & Creamer, 2002; Pappu & Rose, 2002). Eine Arbeit mit Copolymeren aus *L*-Prolin und jeweils einer anderen ausgewählten Aminosäure involvierte zwar Polypeptide mit höheren Molmassen um 30 kDa, doch war die

Zusammensetzung auf Ebene der Aminosäuresequenz aufgrund chemischer Polymerisation aus Aminosäure-Mischungen uneinheitlich und dem Zufall überlassen (Iizuka *et al.*, 1993). Die PAS-Polypeptidsequenzen können dagegen als Modellverbindungen für langkettige Polymere, quasi ohne Seitenkettenwechselwirkungen, mit einstellbarer Länge und kontrolliert eingeführten Prolin-Resten herangezogen werden, um die an kurzen Peptiden beobachteten Konformationen zu überprüfen und in ein umfassenderes Bild der konformationellen Präferenzen eines langkettigen Polypeptidrückgrats in wässriger Lösung zu integrieren.

Die in dieser Arbeit durchgeführten CD-spektroskopischen Untersuchungen der PAS-Polypeptide (vergleiche Abschnitt 3.1.9) zeigten ein intensives charakteristisches Minimum bei 200 nm, jedoch war kein Maximum im Bereich um 225 nm zu erkennen, wie schon weiter oben erwähnt. Damit wiesen die CD-Spektren die Charakteristika einer „ungeordneten Polyprolin-Struktur“ (Tiffany & Krimm, 1968a) auf. Die drei hier untersuchten PAS-Polypeptidsequenzen mit ähnlichem Prolin-Gehalt, PAS#1 und PA#1 mit 35 % sowie P1A1P1A4 mit 28,6 %, ergaben nahezu ununterscheidbare CD-Spektren. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die konkrete Aminosäureabfolge einen geringeren Einfluss auf die in Lösung ausgeprägte Konformation eines Prolin-haltigen Polypeptids hat als der mengenmäßige Anteil der Iminosäure.

Die „ungeordnete Polyprolin-Struktur“ setzt sich aus Strukturanteilen der *Random-Coil*-Konformation von Polypeptiden sowie der PPII-Konformation zusammen (vergleiche Abschnitt 4.1.2). Eine solche statistisch vorherrschende Struktur ließe sich gut in die Sichtweise der ungeordneten *Random-Coil*-Struktur von Polypeptiden als Ensemble definierter, energetisch bevorzugter Rückgratkonformationen unter Dominanz von PPII-Strukturelementen einpassen (Lefèvre *et al.*, 2007). Schon Schimmel und Flory (1968) schlugen vor, sich die theoretische *Random-Coil*-Konformation des Polypeptid-Rückgrats als Kette von PPII-Segmenten vorzustellen, die durch enge Biegungen verbunden sind.

Die Tendenz ungeordneter Polypeptide zur Ausprägung lokaler PPII-Strukturelemente gründet auf der Tatsache, dass die PPII-Konformation die maximale Solvatisierung des hydrophilen Peptidrückgrats erlaubt und zugleich Entropieverluste minimiert, die bei einer Konformation mit höherem Ordnungsgrad auftreten. Dies wurde für Alanin- und Lysinpeptide experimentell gezeigt, die mit einer Länge von 7 AS für die Ausbildung der von den Seitenketten potentiell bestimmten charakteristischen Sekundärstrukturen (z. B. α -Helix für Poly-*L*-Alanin) jeweils zu kurz waren (Shi *et al.*, 2002; Rucker & Creamer, 2002), und zudem theoretisch für Alanin-Peptide dieser Länge vorhergesagt (Pappu &

Rose, 2002). Grundsätzlich kann bei Vernachlässigung von Seitenkettenwechselwirkungen die PPII-Konformation als intrinsisch bevorzugte Konformation der Peptidbindung gesehen werden, wie von Gokce *et al.* (2005) durch CD-spektroskopische Analyse einer großen Auswahl *N*-acetylierter Aminosäuren gezeigt.

Schimmel und Flory (1968) sagten zwei theoretische Konformationen vorher, die ein isolierter *trans*-Prolylrest energetisch bevorzugt annehmen sollte und die der Diederwinkelkombination einer α -helicalen (mit $\psi = -55^\circ$) und einer PPII-helicalen Struktur (mit $\psi = 145^\circ$) entsprechen. Bei variablem ψ -Winkel ist der ϕ -Winkel dabei mit -75° stets durch den Pyrrolidinring fixiert. Zwar wurde die Ausbreitung der PPII-Konformation in Prolin-haltigen Oligopeptiden über einen nicht-Prolin-Rest hinweg als sehr unwahrscheinlich vorhergesagt (Vila *et al.*, 2004), doch ist seit langem bekannt, dass Prolin die konformationelle Freiheit der in der Peptidsequenz vorangehenden Aminosäure massiv einschränkt. Dieser Effekt wirkt sich allerdings bloß auf eine einzelne Peptidbindung aus und hängt somit nicht von der Länge des Polypeptids ab (Schimmel & Flory, 1968).

Der in einer Peptidkette von Prolin gefolgte Aminosäure wird theoretisch laut Schimmel & Flory (1968) aufgrund sterischer Beschränkungen durch die Iminosäure die PPII-Konformation aufgezwungen. Dies wurde insbesondere für kleine Reste wie Alanin vorhergesagt und kann das in gefalteten Proteinen tatsächlich beobachtete Phänomen erklären, dass ein Prolin-Rest nur ganz am Anfang einer α -Helix auftreten kann, andernfalls aber diesen Sekundärstrukturtyp destabilisiert (Aurora & Rose, 1998). Das Auftreten isolierter scharfer Biegungen innerhalb einer PPII-dominierten Prolin-haltigen Polypeptid-Kette lässt sich teilweise auf die Konformationsänderung eines *trans*-Prolyl-Rests von der gestreckten PPII-Konformation in die bereits angesprochene, kompaktere Form mit den Diederwinkeln einer α -Helix zurückführen. Dabei wird ein gewisser Grad an struktureller Unordnung verursacht, der zur *Random-Coil*-Konformation beitragen kann (Schimmel & Flory, 1968).

Es ist darauf hinzuweisen, dass an diesem Prozess keine *cis/trans*-Isomerisierung einer Prolyl-Peptidbindung beteiligt ist, die bei 25°C mit einer Halbwertszeit von etwa 1 min abläuft (Creighton, 1992). Die Möglichkeit einer solchen Isomerisierung in einem Prolinreichen Peptid ist vielmehr als zusätzliche unabhängige Ursache für strukturelle Unordnung zu verstehen. Ungefähr 5 (bis 6) % *cis*-Prolyl-Peptidbindungen liegen in einem durchschnittlichen Peptidrückgrat vor (Lu *et al.*, 2007), da bei Prolin die Unterschiede in der sterischen Wechselwirkung für die beiden möglichen Konfigurationen viel schwächer ausgeprägt sind als bei jeder anderen Aminosäure. Dieses

Phänomen kommt bei kurzen Peptiden kaum zum Tragen, erlangt mit steigender Kettenlänge aber zunehmend an Bedeutung für die Polypeptid- und Protein-Struktur (Lu *et al.*, 2007).

Die PPII-Konformation ist in der Natur auch bei gefalteten Proteinen weit verbreitet. Alanin-Prolin-Segmente mit reduzierter konformationeller Flexibilität infolge der PPII-Struktur wurden bereits innerhalb der Hinge-Region von Antikörpern (Endo & Arata, 1985), an den terminalen Regionen von Histonen sowie assoziierten Proteinen (Cary *et al.*, 1981) und in der Linker-Region der funktionellen Kerndomäne der Lactat-Dehydrogenase (Packman *et al.*, 1984) gefunden. Außerdem wurde gezeigt, dass auch Spinnenseiden-Proteine vor allem in ihren Prolin- und Glycin-reichen repetitiven Bereichen PPII-Segmente aufweisen, was zu essentiellen Eigenschaften für die Ausbildung funktionaler Seidenfasern führt; vor dem Spinnprozess scheinen sogar die Polyalanin-Abschnitte solcher Proteine teilweise in der PPII-Konformation vorzuliegen (Leclerc *et al.*, 2012; Lefèvre *et al.*, 2012; Holland *et al.*, 2008; Lefèvre *et al.*, 2007). Bei der Strukturuntersuchung Elastin-artiger Modellpeptide wurde die PPII-Konformation (manchmal auch als 3_1 -Helix bezeichnet) nur für $(PG)_n$ im kristallinen Zustand durch Röntgenbeugung nachgewiesen (Martino *et al.*, 2000); das Peptid $(ALGGALG)_n$ hingegen zeigte bei der Analyse durch CD- und FT-IR-Spektroskopie in wässriger Lösung eine im statistischen Mittel ungeordnete Konformation, ähnlich den NMR-Befunden eines weiteren Elastin-ähnlichen Peptids, $(VPGVG)_6$ (Ohgo *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass Glycin-reiche Polypeptide vor allem im Zusammenspiel mit Prolin zur Ausprägung von PPII-Strukturanteilen tendieren, welche aber nur in kristalliner Form stabilisiert vorliegen.

4.2.3 Konformationelle Betrachtungen von PAS-Polypeptiden

Mit der „ungeordneten Polyprolin-Struktur“ enthalten alle in dieser Arbeit studierten PAS-Polypeptidsequenzen mehr oder weniger PPII-helicale Strukturelemente. Offenbar werden diese Strukturanteile vom relativen Prolin-Gehalt bestimmt, wie der Vergleich der erhaltenen CD-Spektren deutlich macht (siehe Abschnitt 3.1.9). Mit steigendem Prolin-Anteil der PAS-Polypeptide erfährt das charakteristische CD-Minimum bei etwa 200 nm eine leichte Verschiebung in Richtung des PPII-Minimums bei 205 nm. Der größte Prolin-Gehalt von 50 % im P1A1-Polypeptid hatte den stärksten PPII-Charakter zur Folge, wie anhand des Minimums bei 203 nm im CD-Spektrum (siehe Abbildung 16, Abschnitt 3.1.9) festgestellt werden konnte. Auch Prolin-Alanin-Copolymere zufälliger Zusammen-

setzung mit annähernd 50 % Prolin ergaben derartige PPII-ähnliche CD-Spektren (Iizuka *et al.*, 1993).

Durch die bereits erwähnten theoretischen Analysen von Schimmel und Flory (1968) wird die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Korrelation der PPII-Strukturanteile mit dem Prolin-Gehalt erklärt, da demnach zu erwarten ist, dass ein Alanin- bzw. Serin-Rest in den PAS-Sequenzen die PPII-Konformation des gegebenenfalls nachfolgenden Prolin-Rests übernimmt. Für Sequenzen mit gleichem Prolin-Gehalt wie PAS#1 und PA#1 ist deshalb im Prinzip die gleiche Lösungskonformation zu erwarten, einhergehend mit der Ausprägung nahezu identischer hydrophiler Eigenschaften, wie sie in dieser Arbeit experimentell bestätigt wurden und durch das gut exponierte Polypeptidrückgrat begründet sind (Abschnitt 4.1.5).

Die hydrodynamische Charakterisierung der PAS-Polypeptide durch SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.1.7), SEC und DLS (beides siehe Abschnitt 3.1.10) führte zu der Erkenntnis, dass bei vergleichbarer Länge, in diesem Fall von etwa 200 Resten, das hydrodynamische Volumen und die apparente Molmasse ebenfalls mit dem Prolin-Gehalt der Sequenzen korrelieren.

Die P1A1-Sequenz mit dem höchsten Anteil an der Iminosäure Prolin (50 %) zeichnete sich vor allen anderen PAS-Polypeptiden durch den größten hydrodynamischen Radius und die höchste apparente Molmasse in SEC und SDS-PAGE aus. Formabschätzungen unter Berücksichtigung der viskosimetrischen Daten ergaben für diese Sequenz eine stark elongierte Konformation mit großer Abweichung von der Kugelgestalt, die als prolates Ellipsoid mit einem Achsenverhältnis von 10 zu interpretieren ist (vergleiche Abbildung 21, Abschnitt 3.1.10). NMR-Studien des N-terminalen Prolin-reichen Segments der leichten Kette des Skelett-Myosins mit einem (PA)₇-Motiv belegten eine elongierte, bemerkenswert starre Konformation mit dem Diffusionsverhalten eines starren Zylinders für den P1A1-analogen Teil (Bhandari *et al.*, 1986). Diese Studie bestätigte im Einklang mit Schimmel und Flory (1968), dass die Rotationsfreiheit eines jeden Prolin-Rests stark mit der Bewegung des vorhergehenden Alanin-Rests korreliert war.

Im Gegensatz dazu stand in der vorliegenden Arbeit das P1A3-Polypeptid – mit dem geringsten Prolin-Gehalt (25 %) – am ehesten im Einklang mit der sphärischen Formapproximation und wies den kleinsten hydrodynamischen Radius sowie die geringste apparente Molmasse auf. Die klassischen PAS-Sequenzen PAS#1 und PA#1 zeigten in Übereinstimmung mit dem erhöhten Prolin-Anteil von 35 % eine leicht

gestreckte Molekülstruktur mit einem prolaten Achsenverhältnis von 5, was auch an den erhöhten hydrodynamischen Abmessungen in den DLS-, SEC- und SDS-PAGE-Analysen erkennbar war.

Anhand der hydrodynamischen Daten ließen sich also die mit dem Pro-Gehalt zunehmenden PPII-Strukturanteile der PAS-Polypeptide, die in der CD-Spektroskopie zu beobachten waren, zu einer Erhöhung des hydrodynamischen Volumens in Bezug setzen, welche vor allem als Folge elongierter Molekülkonformationen interpretiert werden kann (Abschnitt 4.1.2). Die ideale *Random-Coil*-Struktur wird anscheinend mit steigendem Pro-Anteil unter Streckung der Molekülform verzerrt. Eine Verminderung des Pro-Gehalts müsste umgekehrt – unter drastischer Reduktion des hydrodynamischen Volumens – letztendlich zur Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen (α -Helix im Fall von Poly-L-Alanin) führen, wie sie allerdings für keine der untersuchten PAS-Polypeptide beobachtet wurden.

Auch an den IL-1Ra-Fusionsproteinen mit unterschiedlichen PAS-Polypeptiden ließ sich die Abhängigkeit des hydrodynamischen Volumens vom Pro-Gehalt der PAS-Sequenzen nachvollziehen. So zeigte das Fusionsprotein mit der Sequenz P1A5, die den geringsten Prolin-Anteil von 16,7 % aufweist, auch die kleinste apparente Molmasse in SDS-PAGE und SEC sowie den kleinsten DLS-Radius aller IL-1Ra-Fusionsproteine. Das hydrodynamische Verhalten des P1A1P1A4-Fusionsproteins (28,6 % Pro in der P1A1P1A4-Sequenz) unterschied sich kaum von dem der PAS#1- und PA#1-Fusionsproteine (35 % Pro in den PAS-Sequenzen), was die Vermutung bekräftigt, dass der mittlere Pro-Gehalt einen weitaus größeren Einfluss auf die Polypeptid-Konformation hat als die konkrete Aminosäuresequenz.

4.2.4 Temperaturabhängige Konformationsübergänge der PAS-Polypeptide

Ab einem Prolin-Gehalt von mindestens 35 % wurden für die PAS-Polypeptide temperaturabhängige Strukturübergänge unter Verlust von *Random-Coil*-Anteilen und Zunahme von PPII-Konformation mittels CD-Spektroskopie beobachtet (vergleiche Abbildung 16 und Tabelle 5, Abschnitt 3.1.9). Die Konformationsübergänge erfolgten graduell innerhalb des verwendeten linearen Temperaturgradienten von 20 bis 90 °C für zwei verschiedene Heizraten (1 °C/min bzw. 0,5 °C/min). Für die PPII-Segmente des PAS-Polypeptidrückgrats, die mit *trans*-Prolyl-Bindungen vorliegen, war somit die Beteiligung der *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Peptidbindungen aufgrund deren relativ langer Halbwertszeit um 1 min bei 25 °C (Creighton, 1992) unwahrscheinlich. Die

Prolyl-Isomerisierung hätte vermutlich als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Konformationsänderung das lineare Ansprechverhalten auf die Temperatur bei den verwendeten Temperaturgradienten beeinflusst. Für die strukturell ungeordneten Bereiche des Polypeptidrückgrats, welche auch *cis*-Prolyl-Bindungen aufweisen könnten, lässt sich dieser Rückschluss allerdings nicht ziehen.

Für Elastin-artige Polypeptide wurden bereits ähnliche thermische Übergänge beobachtet, allerdings gegensätzlich als Verlust an PPII-Struktur interpretiert (Martino *et al.*, 2000; Lam & Hsu, 2003). Im Licht der Ergebnisse dieser Arbeit erscheint diese Auslegung aber fragwürdig; sowohl die Differenzspektren der untersuchten PAS-Polypeptide bei 90 und 20 °C, welche inversen *Random-Coil*-Spektren ähneln, als auch die durch DLS-Messung bestätigte Erhöhung des hydrodynamischen Volumens von PA#1(600) mit steigender Temperatur (vergleiche Abschnitt 3.1.9) sprechen zumindest hier dafür, dass der Ordnungsgrad des PAS-Polypeptidrückgrats bei Temperaturerhöhung mit dem Anteil an elongierten PPII-Sekundärstrukturelementen zunimmt.

Der Prolin-Gehalt von 25 % in der P1A3-Sequenz reichte allerdings für die Stabilisierung einer löslichen *Random-Coil*-Konformation in wässriger Lösung bei erhöhten Temperaturen nicht aus. Für Prolin-Alanin-Polypeptide zufälliger Zusammensetzung mit 25 % Prolin durch chemische Polymerisation aus den Aminosäuren wurden nur etwa 50 % wasserlösliche Polypeptide erhalten, was auf reduzierte Löslichkeit bei zu geringem Pro-Anteil hindeutet (Iizuka *et al.*, 1993). Diese Beobachtung steht im Einklang mit den verringerten Ausbeuten an löslichem Protein, die in dieser Arbeit für die IL-1Ra-Fusionsproteine mit den Polypeptidsequenzen P1A3 und P1A5 sowie das TrxA-P1A3(200)-Fusionsprotein anfielen (siehe Abschnitte 3.1.3 und 3.1.6).

Der Versuch, einen Konformationsübergang von P1A3(200) durch Erwärmung zu induzieren (siehe Abschnitt 3.1.9), führte zur irreversiblen Aggregation und Präzipitation des Polypeptids in β -Schleifen-ähnlichen Strukturen (Bush *et al.*, 1978), da offenbar der PPII-Charakter mit seinen guten Lösungseigenschaften nicht stark genug ausgeprägt war. Diese hier beobachteten Effekte erinnern an die Strukturübergänge in Alaninreichen Domänen von Spinnenseiden-Polypeptiden. Dabei machen diese Domänen Konformationsänderungen von *Random-Coil*- und PPII-Struktur über sogenannte β -Spiralen bis hin zu semikristallinen β -Faltblatt-Segmenten durch. Auf diese Weise wird offenbar vor dem Spinnprozess eine hohe Löslichkeit der Polypeptide gewährleistet und einer spontanen Faserbildung vorgebeugt, während nach erfolgter Assemblierung der Spinnfaser die erforderliche Mischung aus Flexibilität und Stärke resultiert (Leclerc *et al.*, 2012; Hayashi *et al.*, 1999). Die Struktur der β -Spirale (Hayashi *et al.*, 1999) ist durch

einige Wasserstoffbrückenbindungen in β -Schleifen stabilisiert und kann als Übergang zwischen der PPII-Struktur ohne Wasserstoffbrücken und der β -Faltblatt-Sekundärstruktur aufgefasst werden, die viele solcher H-Brückenbindungen involviert. Wenn die Beteiligung des Peptidrückgrats an strukturellen Wasserstoffbrücken auf Kosten von Solvensinteraktionen zunimmt, ist zu erwarten, dass stärker Alanin-reiche PAS-Sequenzen bei Temperaturerhöhung unlöslich werden.

Ein thermischer Übergang von der PPII-Konformation zur β -Faltblatt-Struktur wurde für kurze Alanin-Peptide einer Länge von 7 Resten bereits beobachtet (Shi *et al.*, 2002). Für reines Poly-L-Alanin würde man letztlich die α -Helix als Vorzugskonformation in wässriger Lösung erwarten (Shental-Bechor *et al.*, 2005), auf die es weder für das oben diskutierte P1A3-Polypeptid noch für die P1A5-Sequenz mit 16,7 % Pro experimentelle Hinweise in dieser Arbeit gab. Womöglich würde eine weitere Reduktion des Prolin-Gehalts auf beispielsweise 5 % durch Verlängerung der Polyalanin-Segmente die stabile Ausbildung der α -Helix gestatten, welche bekanntermaßen auf H-Brücken zwischen dem Carbonyl-O-Atom einer Aminosäure mit dem Amid-H-Atom der jeweils drei Reste entfernten Aminosäure aufbaut.

Zusammenfassend führte also, ausgehend von den klassischen PAS-Polypeptiden PAS#1 und PA#1 (35 % Pro), die Herabsetzung des Prolin-Gehalts über P1A3 (25 %) zu P1A5 (16,7 %) möglicherweise zu einer hydrodynamischen Kontraktion der Polypeptidkette, deren erhöhter *Random-Coil*-Charakter eine Verringerung des hydrodynamischen Volumens mit sich brachte. Eine Erhöhung des relativen Prolin-Anteils bis hin zum P1A1-Polypeptid (50 %) dagegen hatte eine Verstärkung des intrinsischen PPII-Charakters unter weiterer Verzerrung der *Random-Coil*-Konformation zur Folge und ging mit einer deutlich elongierten Konformation und einem höheren hydrodynamischen Volumen einher.

4.2.5 Auswirkungen von anderen Aminosäuren auf die Polypeptidkonformation

Die vollständige Substitution von Alanin durch Glycin in der P1A3-Sequenz führte zum Polypeptid P1G3, welches in dieser Arbeit als TrxA-Fusionsprotein hergestellt wurde (Abschnitt 3.2.3). Das Fusionsprotein zeichnete sich durch eine unerwartet geringe apparente Molmasse in der SDS-PAGE aus, was auf ein verglichen mit dem P1A3-Polypeptid drastisch reduziertes hydrodynamisches Volumen schließen ließ. Im Licht der Ergebnisse, die für die hydrodynamischen Eigenschaften von P1A3 mit genauso 25 % Prolinanteil erhalten wurden (Abschnitt 4.2.3), ist anzunehmen, dass die von Glycin

vermittelte zusätzliche Erhöhung der konformationellen Freiheit des Peptidrückgrats (Schimmel & Flory, 1968) zu einer weiteren Reduktion des PPII-Charakters zugunsten des *Random-Coil*-Charakters der Sequenz führte (Schlapschy *et al.*, 2007).

Mangels Seitenkette kann das prochirale Glycin als einzige Aminosäure nahezu beliebige ϕ -Winkel und ψ -Winkel annehmen (Brant *et al.*, 1967). Diese Eigenschaft Glycin-reicher Polypeptidsequenzen ist bereits seit langem bekannt und hat in Abhängigkeit vom Gly-Gehalt die Ausprägung kompakter Sekundärstrukturen zur Folge (Cantor & Schimmel, 1980). Von allen Poly-*L*-Aminosäuren weist Poly-Glycin den mit Abstand geringsten Wert für das charakteristische Verhältnis C_{∞} des mittleren Gyrationradius eines Polypeptids zur Summe der mittleren Längen der einzelnen Peptideinheiten auf und erreicht diesen asymptotischen Wert bereits bei kurzen Kettenlängen. Dadurch zeichnet es sich mit dem stärksten *Random-Coil*-Charakter unter den Polyamino-säuren aus, dies allerdings mit dem kleinsten hydrodynamischen Volumen. Trotz der ausgeprägten *Random-Coil*-Konformation neigen Glycin-reiche Polypeptide wie die HAP-Sequenz Gly₄Ser (Schlapschy *et al.*, 2007) zur Aggregation in wässriger Lösung, deren Triebkraft wahrscheinlich die Ausbildung energetisch günstiger kristalliner Strukturen ist.

Auch das P1A3-Polypeptid zeigte vor allem bei Erwärmung Tendenzen zur Aggregation, die in diesem Fall mit der Ausbildung von β -Strukturelementen erklärt werden könnten, wie sie auch in den Alanin-reichen Abschnitten von Spinnenseiden-Proteinen auftreten (siehe oben). Obwohl Glycin im Zusammenspiel mit Prolin in Spinnenseiden-Proteinen oftmals PPII-helicale Konformationen annimmt, wie auch an zufällig zusammengesetzten Prolin-Glycin-Copolymeren mit 50 % Prolin beobachtet wurde (Iizuka *et al.*, 1993), scheint ähnlich wie im Fall von P1A3 der Prolin-Anteil von nur 25 % für eine ausreichende Stabilisierung dieser mehr gestreckten Konformation in wässriger Lösung nicht auszureichen. Im Gegenteil wird der versteifende Effekt, den Prolin auf das Peptidrückgrat ausübt, durch die stark erhöhten Freiheitsgrade aufgrund des großen Anteils an Glycin offenbar überkompensiert.

Vor dem Hintergrund des Aufbaus der PAS-Polypeptide aus kleinen Aminosäureresten, deren Seitenketten in wässriger Lösung kaum Wechselwirkungen eingehen, wird verständlich, dass repetitive Sequenzen anderer Typen von Aminosäuren mit großer Wahrscheinlichkeit Sekundärstrukturen annehmen, die zusätzlich von den Seitenketten stabilisiert werden. Beispielsweise werden die Sekundärstrukturen der in dieser Arbeit untersuchten Polypeptid-Sequenzen NNT und QQH (Besman *et al.*, 2009), welche ursprünglich eher zum Zweck der *N*-Glykosylierung vorgesehen waren (Abschnitt 3.2.3),

(ohne Kohlenhydrat-Reste an den Seitenketten) maßgeblich von den Asparagin- und Glutamin-Seitenketten bestimmt. Diese haben in kumulierter Form bekanntermaßen die Tendenz, über Wasserstoffbrücken zwischen den Säureamid-Gruppen der Seitenketten und den Peptidgruppen des Rückgrats ähnlich einem Reißverschluss zu unlöslichen β -Faltblatt-artigen Strukturen zu aggregieren (Perutz *et al.*, 2002). Die Ausbildung solcher Strukturen könnte durch die Threonin- bzw. Histidin-Reste im NNT- bzw. QQH-Polypeptid teilweise gestört werden, zumal in neutraler wässriger Lösung Histidin-Homopolymere eher α -helicale (McCord *et al.*, 1977) und Threonin-Polymere ungeordnete Strukturen (Noudeh *et al.*, 2003) bevorzugen. Allerdings könnten His und Thr an dem von Asparagin bzw. Glutamin gebildeten Geflecht aus Wasserstoffbrückenbindungen mit ihren Seitenketten grundsätzlich partizipieren. Bei der für die QQH-Sequenz gegebenen regelmäßigen Aminosäureabfolge wurde in dieser Arbeit eine durch α -Helix dominierte aggregationsempfindliche Struktur beobachtet, was selbst als Fusionsprotein mit SUMO bei der Produktion in *E. coli* vollständig zur unlöslichen Form führte (vergleiche Abschnitt 3.2.3).

Grundsätzlich ist es also unwahrscheinlich, mit anderen Aminosäuren als Pro, Ala, Ser und gegebenenfalls Gly repetitive Polypeptid-Sequenzen konstruieren zu können, die unter physiologischen Bedingungen eine in wässriger Lösung stabile ungeordnete Struktur aufweisen. Man beachte, dass die einzelnen Reste der PAS-Sequenzen jeweils als Homopolymer zur Ausbildung von α -Helix im Fall von Alanin (Shental-Bechor *et al.*, 2005), der β -Faltblatt-Struktur bei Serin (Quadrifoglio & Urry, 1968) und der bereits diskutierten Polyprolin II-Helix für Prolin (Stapley & Creamer, 1999) tendieren. Durch Vermeidung längerer Sequenzabschnitte mit der gleichen Aminosäure und unter Nutzung der konformationellen Besonderheiten der Iminosäure Prolin können stabile Sekundärstrukturen im PAS-Polypeptidrückgrat vermieden werden (Schlapschy *et al.*, 2013).

4.2.6 Ladungsbedingte Veränderungen in PAS-Polypeptiden

In die PAS#1-Polypeptidsequenz wurden mit Hilfe von Lys- bzw. Glu-Resten gleichnamige Ladungen eingeführt, was drastische Auswirkungen auf die Eigenschaften der PAS-Polypeptide hatte (Abschnitt 3.2.2). Gegensätzlich geladene Reste innerhalb eines Polypeptids wurden bewusst vermieden, da diese durch elektrostatische Anziehung die Lösungskonformation der Polypeptide gestört hätten. Intramolekulare Wechselwirkungen hätten zu kontrahierten Konformationen mit verringertem hydro-

dynamischen Volumen geführt, und intermolekulare Interaktionen zur ungewünschten Assoziation verschiedener Ketten.

In der SDS-PAGE fiel die erhöhte elektrophoretische Mobilität auf, die mit der Zahl der Ladungen innerhalb eines PAS#1-Polypeptids zunahm. Interessanterweise waren es aber gerade die positiv geladenen Varianten, die wahrscheinlich durch Koordination kompletter SDS-Mizellen mit den Lys-Seitenketten eine stärkere Beschleunigung im elektrischen Feld erfuhren als die negativ geladenen Polypeptide. Grundsätzlich begünstigten die positiven Lys-Seitenketten offenbar die Bindung negativ geladener Moleküle, was u. a. durch eine erhöhte Färbefeffizienz in der SDS-PAGE sowohl mit Coomassie als auch mit Bal_2 (Skoog, 1979) sogar an freien PAS-Polypeptiden mit Lysin-Resten direkt nachweisbar war (vergleiche Abbildung 31, Abschnitt 3.2.3), vermutlich durch Koordination der anionischen Sulfonatgruppen des Coomassie-Farbstoffs (Tal *et al.*, 1985). Bei der Bal_2 -Färbung stabilisierten die eingeführten Lys-Reste möglicherweise die Wechselwirkung mit den beteiligten Polyiodid-Ionen. PAS#1-Polypeptide mit Glu-Seitenketten hingegen verschlechterten das SDS-PAGE-Färbeergebnis für beide Färbemethoden, vermutlich infolge elektrostatischer Abstoßung.

In der CD-Spektroskopie waren bis auf leichte Intensitätssteigerungen des charakteristischen Minimums bei 200 nm keinerlei Veränderungen infolge der eingebauten Ladungen zu erkennen; allerdings könnte die Erhöhung der Signalintensität auf eine leichte Streckung der Polypeptid-Konformationen zurückgeführt werden (Tiffany & Krimm, 1969). Derartige Beobachtungen wurden bereits bei CD-spektroskopischen Untersuchungen der Polypeptide Poly-L-Lysin und Poly-L-Glutaminsäure festgestellt und mit gesteigerten PPII-Strukturanteilen als Folge elektrostatischer Abstoßung erklärt (Tiffany & Krimm, 1968b). Die apparente Molmasse der PAS-Polypeptide in neutraler wässriger Lösung wurde laut der SEC- und DLS-Messungen erwartungsgemäß mit steigender Ladungsdichte leicht erhöht (Abschnitt 3.2.2), weil die Abstoßung gleichnamiger Ladungen zu einer Streckung der Molekülkonformation führen sollte. Da aber das Verhältnis der durch DLS und SEC ermittelten apparenten Molmassen, welches wie für die IL-1Ra-PAS-Fusionsproteine als empirisches Maß für die mittlere Elongation eines *Random-Coils* herangezogen wurde (Abschnitt 3.1.10), für alle PAS#1-Polypeptide annähernd konstant blieb, ist keine auffällige Veränderung der Molekülform geladener PAS#1-Polypeptide im Vergleich zur ungeladenen Version festzustellen. Die Erhöhung des Prolin-Anteils von PAS-Polypeptiden hatte also letztlich einen stärkeren Effekt auf die Polypeptid-Konformation als der Einbau von Ladungen. Genauere Informationen über die Molekülform könnten aus Viskositätsmessungen durch Ableitung

des translationalen Friktionsfaktors f_P abgeleitet werden, der in dieser Arbeit nur für die ungeladenen PAS-Polypeptide bestimmt wurde.

RPC-Experimente mit den geladenen PAS#1-Polypeptiden verdeutlichten den Einfluss der Ladungen auf hydrophobe Interaktionen (Abschnitt 3.2.2). Die positiv geladenen Reste der Lysin-haltigen Polypeptide beeinträchtigen die – wenn auch geringen – hydrophoben Wechselwirkungen mit der Polystyrol-Matrix der RPC-Säule im sauren Milieu deutlich.

Die analytische Ionenaustauschchromatographie (vergleiche Abschnitt 3.2.2) ließ deutlich erkennen, wie in den geladenen PAS-Fusionsproteinen die ionischen Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial bei gleichem pH-Wert mit steigender Ladungsdichte zunahm. Aus diesen Befunden ließ sich ableiten, dass geladene Polypeptid-Sequenzen bei Fusion mit einem Wirkstoff pH-abhängige elektrostatische Effekte auf ihren Fusionspartner ausüben, welche gewünschte biochemische/biologische Interaktionen beeinflussen können. So ist beispielsweise bekannt, dass positiv geladene Polymere durch Opsonin-vermittelte Phagozytose rasch aus dem Blutstrom entfernt werden und sich bevorzugt in der Leber anreichern (Owens & Peppas, 2006), wohingegen anionische Polymere die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran aufgrund elektrostatischer Abstoßung nur schwer durchdringen können (Markovsky *et al.*, 2012). Dieser Effekt ist insbesondere für Wirkstoffe zu beachten, die zur Passage der Blut-Hirn-Schranke vorgesehen sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass für die Anwendung zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit von pharmakologischen Wirkstoffen *in vivo* ein neutrales Polymer wie PAS weitaus vielseitiger einsetzbar ist als ein geladenes (Bio)Polymer.

Kationische Polymere könnten allerdings spezielle Anwendungen ermöglichen, die auf ladungsvermittelten Wechselwirkungen beruhen. Polymere mit positiven Ladungen können beispielsweise zur Einkapselung von Wirkstoffen in Polymer-Hydrogele benutzt werden und den Wirkstoff durch pH-abhängige Konformationsänderung gezielt freisetzen, wie anhand der Einbettung von Ovalbumin in Poly-2-(diethylamino)-ethylmethacrylat (PDEAEMA) mit einem Kern aus Poly-2-aminoethylmethacrylat (PAEMA) gezeigt wurde (Hu *et al.*, 2007). Nukleinsäuren lassen sich von kationischen Polymeren als Trägermoleküle unter Neutralisierung der negativen Ladungen komplexieren und zum Zellkern dirigieren. Hierzu sind beispielsweise Polyamine wie Polyethylenimin (PEI), aber auch Poly-L-Lysin gebräuchlich (Twaites *et al.*, 2005).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit polykationischer Polymere basiert darauf, dass diese bei Aufnahme in Endosomen die während des Ansäuerungsprozesses einströmenden Protonen abfangen und Gegenionen akkumulieren. Hierdurch wird ein osmotisches Druckgefälle verursacht, was zum Anschwellen der frühen Lysosomen bis zur Lyse unter Freisetzung ihres Inhalts in das Cytoplasma führt (Liechty *et al.*, 2010). Somit ist eine effektive *Endosomal-Escape*-Strategie für Wirkstoffkonjugate mit geeigneten Polymeren gegeben. Das basische Polysaccharid Chitosan (Poly-D-glucosamin) zeigt starke Wechselwirkungen mit den anionischen Glykosaminoglykanen (GAGs) in Schleimsekreten. Diese muco-adhäsiven Eigenschaften eröffnen neue Verabreichungsformen für therapeutische Wirkstoffe. So führte ein Paclitaxel-Chitosan-Konjugat nach oraler Verabreichung zu einer stark erhöhten Bioverfügbarkeit verglichen mit intravenös verabreichten Wirkstoffen, offenbar aufgrund der erhöhten Retentionszeit im Gastrointestinaltrakt sowie der Umgehung des P-Glycoprotein-vermittelten Ausschleusemechanismus und der Metabolisierung mittels Cytochrom-P450 (Lee *et al.*, 2008b). Ein muco-adhäsives N-Trimethylchitosan-Antigen-Konjugat eignete sich zum Auftrag auf die Nasenschleimhaut zur lokalen Immunstimulation, wo das positiv geladene Polysaccharid die Immunantwort auf das Antigen zusätzlich verstärkte (Slutter *et al.*, 2010).

Auch Lysin- oder Arginin-haltige PAS-Polypeptide sollten sich prinzipiell für die oben angesprochenen Anwendungen eignen und böten sogar den Vorteil der Bioabbaubarkeit, den von den genannten kationischen Polymeren nur die Chitosan-Derivate haben. Die positive Ladungsdichte in PAS-Sequenzen wäre zudem einfach durch entsprechende Planung von Genkassetten einstellbar.

4.3 Chemische Kopplung von PAS-Polypeptiden als Alternative zur PEGylierung

4.3.1 Therapeutische Anwendungen von PEG-Konjugaten mit nicht Protein-basierten Wirkstoffen

Neben therapeutischen Proteinen und Peptiden eignen sich auch andere bioaktive Substanzen zur chemischen Konjugation mit PEG. Besonders bei kleinen Wirkstoffen werden die generellen Eigenschaften des PEG-Konjugats maßgeblich von der vergleichsweise großen PEG-Kette geprägt. Hierbei lässt sich vor allem beim Tumor-*Targeting* der Effekt erhöhter Permeabilität und Retention (EPR-Effekt) ausnutzen (Iyer *et al.*, 2006). Große Moleküle diffundieren spontan in das poröse Tumorgewebe und reichern sich dort u. a. infolge der beeinträchtigten Lymphdrainage an (Maeda *et al.*,

2000). Niedermolekulare Cytostatika wie Taxol, Camptothecin, *cis*-Platin und Doxorubicin stellen mit ihren wohldefinierten chemischen Funktionalitäten und möglichen Konformationen sowie der effizienten Reinigung des gekoppelten Produkts anhand des erhöhten hydrodynamischen Volumens interessante Kandidaten für die PEGylierung dar (Pasut *et al.*, 2004). Außerdem profitieren die hydrophoben Verbindungen von der Kopplung mit dem hydrophilen Polymer durch verbesserte Löslichkeit und Bioverfügbarkeit. Sogar PEGylierte Oligodesoxynukleotide zur Verbesserung der Membrangängigkeit durch Abschirmung der negativen Eigenladungen und Erhöhung der Stabilität gegenüber Nucleasen sind Gegenstand der Forschung (Veronese & Pasut, 2005) und ermöglichen beispielsweise als *Antisense*-Wirkstoffe die gezielte Stilllegung der Expression von Genen (Twaites *et al.*, 2005).

Den oben angesprochenen Vorteilen der PEGylierung zum Trotz hat bisher kein niedermolekularer Wirkstoff in PEGylierter Form die Zulassung als Medikament erreicht (Pasut & Veronese, 2009; Greenwald *et al.*, 2000). An Konjugaten mit kleinen Molekülen, deren biophysikalische und biochemische Eigenschaften maßgeblich von dem gekoppelten Polymer geprägt werden, wird besonders deutlich, dass die Technologie der PEGylierung zentrale Anforderungen für die therapeutische Anwendung nicht erfüllen kann. Hierzu tragen die produktionsbedingte Polydispersität (Bagal *et al.*, 2008) und die mangelnde Bioverträglichkeit bei. Diese äußert sich im Fehlen biologischer Abbauwege und in einer gewissen Immunogenität des PEG-Polymers (Garay *et al.*, 2012), die vor allem bei Konjugaten mit sehr kleinen Verbindungen stark zum Tragen kommen dürfte. In mindestens 25 % aller Blutspenden wurden Antikörper gegen PEG nachgewiesen, die wahrscheinlich auf die zunehmende PEG-Exposition in Form von kosmetischen und pharmazeutischen Produkten sowie prozessierten Lebensmitteln zurückzuführen ist. Auch Konjugate immunogener Verbindungen mit PEG können eine Immunreaktion auf das PEG-Polymer selbst stimulieren (Ishida *et al.*, 2006). Beispielsweise wurde die Bildung gegen PEG gerichteter Antikörper in Leukämiepatienten nach Verabreichung von PEG-Asparaginase beobachtet, was die therapeutische Wirkung des PEG-Konjugats beeinträchtigte (Armstrong *et al.*, 2007). Viele toxikologische Befunde von PEG aus den 1950er bis 1970er Jahren entsprechen nicht mehr dem aktuellen Stand der Wissenschaft, und vor allem Phänomene wie die PEG-vermittelte unerwünschte Fusion biologischer Membranen sowie die unvorhersagbare Aktivierung des Komplement-Systems der Immun-Antwort in Verbindung mit einer zunehmenden Hypersensibilitätsproblematik müssen eingehend untersucht werden und komplizieren die Anwendung PEGylierter Wirkstoffe (Knop *et al.*, 2010).

Demgegenüber war für PASylierte Protein-Wirkstoffe im Mausmodell nicht einmal bei Vorimmunisierung mit PASyliertem Interferon- α -2b eine Immunreaktion auf das PAS#1-Polypeptid zu beobachten (Schlapschy *et al.*, 2013). Aufgrund der biotechnologischen Herstellung stellen PAS-Polypeptide inhärent monodisperse Verbindungen dar und können durch lysosomalen Verdau im Organismus restlos metabolisiert werden (Markovsky *et al.*, 2012). Als gut charakterisiertes Biomimetikum für das PEG-Polymer übertreffen sie dessen vorteilhafte Eigenschaften sogar, wie in dieser Arbeit für die PAS-Polypeptide anhand (1) der erhöhten Hydrophilie, (2) dem vergrößerten hydrodynamischen Volumen bei vergleichbarer Masse und (3) der verringerten Viskosität bei vergleichbarem hydrodynamischen Volumen gezeigt wurde (Abschnitte 3.1.8 und 3.1.10).

4.3.2 Chemische Konjugationsmethoden für lineare Konjugate mit PAS-Polypeptiden

Ein Ziel dieser Arbeit war daher die PASylierung auch solcher therapeutischer Moleküle, die nicht zu den Proteinen bzw. Peptiden gehören und somit nicht auf genetischer Ebene N- oder C-terminal mit PAS-Sequenzen fusioniert werden können. Um die prinzipielle Eignung von PAS-Polypeptiden zur gerichteten chemischen Konjugation mit niedermolekularen Verbindungen zu zeigen, wurden deshalb PA#1-basierte Polypeptide durch Einbau geeigneter Seitenketten mit spezifischen chemischen Reaktivitäten ausgestattet, welche zur Kopplung an Fluorescein- und Coumarin-Derivate genutzt wurden (vergleiche Abschnitt 3.2.1).

Mittels Säureamid-Chemie konnte der N-Terminus des klassischen PA#1-Polypeptids entweder direkt mit einem Fluorescyl-Chromophor modifiziert oder mit neuen Funktionen wie etwa der thiol-reaktiven Iodacetamid-Gruppe ausgestattet werden, welche die Kopplung mit einem Mercapto-Coumarin-Derivat ermöglichte. In das PA#1-Polypeptid eingeführte Cystein-Seitenketten eignen sich zur Konjugation mit thiol-reaktiven chemischen Funktionen wie beispielsweise Maleimiden oder Alkylhalogeniden, wie in der vorliegenden Arbeit mit der Iodacetamid-Gruppe gezeigt wurde.

Mit den hier entwickelten N-terminal blockierten Pga-Peptiden konnte erstmals der C-Terminus eines PA#1-Polypeptids selektiv aktiviert und zur Kopplung genutzt werden. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass die PA#1-Sequenzen im Gegensatz zu den XTEN-Polypeptiden (Schellenberger *et al.*, 2009) keinerlei saure oder nucleophile Reste aufweisen, welche zu unerwünschten Nebenreaktionen führen könnten. Die Pyroglutamat-Zyklisierung (Sanger & Thompson, 1953) bot einen spontan und quantitativ erfolgenden Teilschritt bei der Polypeptid-Präparation und führte ohne

zusätzlichen Aufwand zu einem stabil geschützten N-Terminus (vergleiche Abschnitt 3.2.1). So konnten bei der anschließenden Aktivierung der C-terminalen Carboxylgruppe Nebenreaktionen wie Zyklisierung oder Polykondensation der PAS-Sequenzen vermieden werden. Ein in die PA#1-Polypeptidsequenz eingeführter Lysin-Rest konnte zudem selektiv ohne stringente Kontrolle des pH-Werts gekoppelt werden, was andernfalls zur Differenzierung gegenüber der N-terminalen Aminogruppe erforderlich wäre, aber dennoch keine hohe Kopplungsspezifität garantiert (Kinstler *et al.*, 1996).

4.3.3 Chemische Konjugationsmethoden für PAS-Polypeptide zur Erzeugung einer Verzweigungsstelle

Die insbesondere bei kleinen Wirkstoffen beschränkte Zahl der potentiellen Kopplungsstellen für PEG-Polymere führte zur Entwicklung dendrimerer PEG-Reagenzien, welche die Anbringung zweier PEG-Ketten an derselben Position, vermittelt durch Lysin oder eine Dicarbonsäure, unter Einführung einer Verzweigungsstelle erlauben (Pasut *et al.*, 2004). Außerdem sind verzweigte sogenannte *Multi-Arm*-PEG-Moleküle erhältlich. Die Synthese derartiger PEG-Reagenzien ist allerdings aufwendig (Kling, 2013). Die chemische PASylierung bietet hier mit der rekombinanten Produktion einer entsprechend funktionalisierten Polypeptidkette eine einfache Alternative, da viele der erforderlichen Aminosäure-Modifikationen auf genetischer Ebene kodiert werden können und nicht in zusätzlichen Schritten eingeführt werden müssen. Verzweigte PEG-Moleküle profitieren im Vergleich zu linearen Versionen gleichen Molekulargewichts teilweise von einem erhöhten hydrodynamischen Volumen durch den Verzweigungseffekt bei gleichzeitig verminderter Probenviskosität (Kling, 2013).

Solche verzweigten PEG-Moleküle könnten mit Hilfe entsprechender PA#1-Sequenzen simuliert werden, indem ein spezifisch eingebauter Rest innerhalb der Polypeptid-Kette (wie beispielsweise Lys oder Cys) als Kopplungsstelle für ein Zielmolekül genutzt und gleichzeitig ein Verzweigungspunkt erzeugt wird. In dieser Arbeit wurde die kleine Fluorescyl-Gruppe an eine verhältnismäßig große P/A-Polypeptidkette gekoppelt, wobei sich die Konjugate der PA#1(400)-Polypeptide mit interner Kopplungsstelle (Lys bzw. Cys) im hydrodynamischen Volumen laut SEC weder von den ungekoppelten Polypeptiden noch vom N-terminal markierten linearen Konjugat ungefähr gleicher Länge unterschieden. Die Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens im Vergleich zum linearen Konjugat wurde für Polymere nur bei Kopplung mit relativ großen Molekülen (z. B. Protein, Nanokapsel) beobachtet, deren hydrodynamisches Eigenvolumen in der Größenordnung des verwendeten Polymers liegt (Veronese *et al.*, 1997).

Ein ähnlicher Effekt wurde für ein 4D5-Fab-Fragment erzielt, indem dessen leichte und schwere Kette C-terminal jeweils unmittelbar nach der interchenaren Disulfidbrücke mit einem PAS#1(200)-Polypeptid fusioniert wurden (Schlapschy *et al.*, 2013). Das resultierende Konstrukt übertraf nicht nur die Maus-Plasma-Halbwertszeit eines Fusionsproteins etwa der gleichen Masse mit einer einzelnen linearen PAS#1(400)-Sequenz bei weitem, sondern sogar die *In vivo*-Halbwertszeit der Version mit einer linearen PAS#1(600)-Sequenz, obwohl das hydrodynamische Volumen laut SEC-Analyse deutlich über dem des verzweigten Konstrukts lag. Neben dem hydrodynamischen Volumen wurde auch die an Verzweigungspunkten erhöhte räumliche Dichte des *Random-Coil*-Polypeptids als Ursache der stärker retardierten Nierenfiltration vermutet (Schlapschy *et al.*, 2013).

Mit mehr als einer Kopplungsstelle ausgestattet, könnten PAS-Polypeptide als Linker zwischen mehreren Wirkstoffen fungieren, was interessante biopharmazeutische Anwendungen eröffnet. Die Verwendung bispezifischer Polypeptid-Linker würde darüber hinaus die selektive Kopplung unterschiedlicher Moleküle, wie etwa einer Erkennungskomponente (z. B. Rezeptorligand) mit einem bioaktiven Wirkstoff (z. B. Cytotoxin), ermöglichen. Unter Einsatz chemisch orthogonaler Kopplungsstrategien für Amino-, Carboxy- und Thiol-Gruppen ist die Synthese trispezifischer Linker und sogar büsten- oder sternförmig verzweigter Polypeptide mit maßgeschneiderten hydrodynamischen Eigenschaften denkbar. Über eine Querverknüpfung einzelner Peptid-Stränge könnten PAS-Hydrogele generiert werden, die das komplette Anwendungsspektrum ihres nicht-biologischen PEG-Gegenstücks, beispielsweise als Depot zur kontinuierlichen Wirkstoffversorgung (Liu *et al.*, 2009) oder zur Unterstützung der Wundheilung (Zhao & Milton Harris, 1998), erwarten lassen.

4.3.4 Reversible PEGylierung für pharmakologisches *Fine-Tuning*

Für die meisten Anwendungen mit kleinen Molekülen müssen die PEG-Wirkstoff-Konjugate als Pro-Formen eingestuft werden, die ihr volles Wirkpotential erst nach Abspaltung von zumindest einem Teil der Polymer-Ketten entfalten können, da diese oftmals für die Bioaktivität elementare Positionen abschirmen (Filpula & Zhao, 2008). Zur reversiblen Anbringung der PEG-Polymere wurden verschiedene Verfahrensweisen entwickelt. So können labile chemische Bindungen eingeführt werden, die als direkte Antwort auf eine Veränderung in der chemischen Umgebung brechen und den unmodifizierten Wirkstoff freisetzen. In diesem Zusammenhang sind Linker aufzuführen, deren Stabilität vom pH-Wert (z. B. Hydrazon-Linker; Kratz *et al.*, 1999) oder dem

Redox-Milieu abhängt (z. B. Disulfid-Linker; Zalipsky *et al.*, 1999), oder die als Peptidsequenzen von spezifischen Enzymen erkannt werden, beispielsweise im Lysosom (Duncan *et al.*, 1983).

Als neues Forschungsgebiet hat sich die sogenannte reversible PEGylierung (*releasable PEGylation*, *rPEGylation*) entwickelt, die sich dem Design von Linkern für eine kontinuierliche und kontrollierte Freisetzung der PEG-Polymere widmet. Bei dieser Herangehensweise können wichtige pharmakologische Parameter wie lokale Wirkstoffkonzentration und -gesamtexposition über die Wahl des chemischen Linkers sowie die Variation des Designs, der Anzahl und Länge der verwendeten PEG-Ketten sogar noch genauer als bei der permanenten PEGylierung eingestellt werden (Filpula & Zhao, 2008). Dabei wurden Biokonjugat-Reporter-Assays mit rPEGyliertem grünfluoreszierenden Protein (Greenwald *et al.*, 2003) und Bioaktivitäts-Assays von rPEGyliertem Lysozym (Zhao *et al.*, 2006) eingesetzt, um den Zusammenhang zwischen der Eliminierung der PEG-Ketten und der Wiederherstellung der Bioaktivität des freigesetzten Proteins besser zu verstehen.

Verschiedene auf Benzyl-Eliminierung (Lee *et al.*, 2001) oder Bicin-Deamidierung (Zhao *et al.*, 2006) basierende Linker sind verfügbar, die die Verabreichung von PEG-maskierten Cytotoxinen in höheren Dosen erlauben. Durch reversible Anbringung von PEG-Polymeren können diese Stoffe über einen Zeitraum biologisch inaktiv gehalten werden, der für das Erreichen des Wirkorts ausreicht und eine verfrühte cytotoxische Aktivität gegenüber gesundem Gewebe verhindert (Yu *et al.*, 2005). Unter den vielversprechenden Kandidaten für die rPEGylierung finden sich neben Cytotoxinen auch Hormone und Cytokine wie Interleukin-2 (Greenwald *et al.*, 2003) und Interferon- β -1b (Yamasaki *et al.*, 1988).

Obwohl auch der reversiblen PEGylierung das synthetische Polymer PEG zugrunde liegt, wurde sie als biomimetische Technologie bezeichnet, da hierbei das vielfach in der Natur etablierte Pro-Wirkstoff-System genutzt wird, bei dem aktive Wirkstoffe erst nach Maturierung am Zielort entstehen (Filpula & Zhao, 2008). Mit den PAS-Polypeptiden als vollständig abbaubaren Biopolymeren ist tatsächlich ein biomimetischer Ansatz gegenüber der PEGylierung gelungen. Die Auswahl der Aminosäuren Prolin und Alanin für die PA#1-Sequenz resultiert aufgrund des Fehlens reaktiver Seitenketten in einem chemisch inerten Polypeptid (Abschnitt 4.1.9) und erlaubt dennoch eine zielgerichtete chemische Modifikation, wie sie bei PEG-Polymeren möglich ist.

Die PASylierung könnte bei Bedarf durchaus mit labilen chemischen Linkern kombiniert werden, allerdings ist zu betonen, dass die Modifikation mit PAS-Polypeptiden als Konsequenz der Bioabbaubarkeit eine intrinsische Reversibilität unter geeigneten Umgebungsbedingungen mit sich bringt. Obwohl der Einbau einer oder mehrerer Erkennungssequenzen für lysosomale Enzyme (Duncan *et al.*, 1983) in eine PAS-Polypeptidsequenz (intern oder terminal) auf elegante Weise durch Modifikation der entsprechenden PAS-Genkassette möglich wäre, ist ein solcher zusätzlicher Vorbereitungsschritt bei der Herstellung chemischer PAS-Konjugate mit Cytotoxinen gar nicht erforderlich. Nach der Internalisierung des Konjugats in die Zielzelle durch Endocytose ist nämlich im Lysosom der vollständige enzymatische Abbau der Polypeptid-Ketten zu den *L*-Aminosäuren in Analogie zu anderen Polypeptiden wie Poly-*L*-Glutaminsäure zu erwarten (Markovsky *et al.*, 2012).

Die chemische PASylierung macht alle Arten von therapeutischen Molekülen der Modifikation mit PAS-Polypeptiden an definierten Positionen zugänglich und erweitert somit deren Anwendungsbereich, ursprünglich begrenzt auf Fusion mit Peptid- und Protein-Therapeutika, auf prinzipiell alle chemischen Verbindungen. Dabei vereint sie die Vorteile beider Technologien, der PEGylierung und PASylierung. Alle Kopplungsprodukte mit PA#1-Polypeptiden in dieser Arbeit zeigten hohe Monodispersität in der Massenbestimmung durch ESI-MS (vergleiche Abbildung 28, Abschnitt 3.2.1), was von der homogenen Zusammensetzung der für die Konjugation präparierten Polypeptide herrührte. Die SEC-Analyse der PA#1-Konjugate mit hydrophoben Fluorescein- und Coumarin-Derivaten ließ die den Polypeptidsequenzen zu verdankende hohe Hydrophilie der Kopplungsprodukte erkennen, welche ein lediglich marginal verzögertes Elutionsverhalten gegenüber den ungekoppelten PA#1-Polypeptiden aufgrund von Wechselwirkungen mit der SEC-Säulenmatrix zeigten (vergleiche Abbildung 29, Abschnitt 3.2.1). Auch die chemische PASylierung bringt also die im Vergleich zu PEG besseren hydrodynamischen und hydrophilen Eigenschaften der PAS-Polypeptide – neben intrinsischer Homogenität, Bioverträglichkeit und Bioabbaubarkeit – mit sich, so dass sich Anwendungspotential für *Small-Molecule*-Wirkstoffe ergibt.

4.4 Anwendung eines PAS-Polypeptids als Standard für die Massenspektrometrie

4.4.1 Stand der Technik von Standards zur MS-Kalibrierung

Da in der MALDI-Massenspektrometrie hauptsächlich einfach geladene Ionen des Analyten gebildet werden und dabei ein großer m/z -Bereich abgedeckt werden muss, werden langkettige synthetische Polymere zur Kalibrierung der Instrumente eingesetzt. Erhältlich ist eine große Auswahl an chemisch synthetisierten Makromolekülen, z. B. Polyethylenglykol, Poly(methylmethacrylat), Polystyrol, Polymethylsiloxan, Polystyrol-sulfonat (Esser *et al.*, 2000; Royo & Brintzinger, 2002; Tatro *et al.*, 2002; Wu & Odom, 1998), wie auch an Peptiden und rekombinanten Proteinen, beispielsweise Bradykinin-Fragmente, Aldolase oder Insulin (Strupat, 2005). Die chemischen Polymere weisen relativ homogene Ionisierungseigenschaften infolge des gleichförmigen Molekülaufbaus auf, sind allerdings herstellungsbedingt nur als polydisperse Substanzen mit schlecht kontrollierbarer Molekulargewichtsverteilung verfügbar. Umgekehrt verhält es sich für die bisher erhältlichen Peptid-Standards, die zwar monodispers vorliegen, aber zu unregelmäßigen Intensitätsverteilungen im Massenspektrum führen, wobei die Funktion der Ionisierungsstellen in einer Polypeptidkette in hohem Maße von der chemischen Umgebung und damit der lokalen Aminosäuresequenz abhängt. Außerdem ist die biotechnologische Präparation hochreiner Proteine für die Massenspektrometrie aufwendig. Die chemische Peptidsynthese hingegen ist auf Massen von etwa 3 bis 4 kDa limitiert (Albericio, 2004).

Bei ESI-MS-Anwendungen bilden sich mehrfach geladene Ionen des Analyten mit einer charakteristischen m/z -Verteilung im Rohspektrum. Die Molekülmasse des Analyten ergibt sich in der Regel erst nach mathematischer Dekonvolution der Einzelsignale aus den Rohdaten. Der relativ eng begrenzte m/z -Messbereich in der ESI-Massenspektrometrie erlaubt allerdings die Verwendung eher kleiner, chemisch-synthetisch leichter zugänglicher Verbindungen zur Kalibrierung, welche im Rohspektrum jeweils als einfach geladenes Molekülion erscheinen. In diesem Zusammenhang greift man auf eine große Auswahl an perfluorierten aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen, Trialkylaminen, Triazin-Derivaten (Bowen & Field, 1975) sowie Phosphazen-Derivaten (Moini, 1994) und deren Mischungen zurück, und sogar anorganische Alkalisalze (Hao *et al.*, 2001) finden Anwendung. Aminoverbindungen tendieren zur Aufnahme positiver Ladungen durch Protonierung, wohingegen perfluorierte Alkylreste ein annähernd monoisotopisches Masseninkrement

von 50 Da pro CF₂-Einheit liefern. So führt etwa eine mit sechs Fluoralkyl-Seitenketten modifizierte Phosphazen-Verbindung zu einer Signalverteilung mit einer Differenz von 300 Da zwischen Verbindungen, deren Satz an sechs Alkyl-Ketten sich um jeweils eine CF₂-Einheit unterscheidet (Moini, 1994). Zudem sind perfluorierte Alkylketten weitgehend gegen sekundäre ESI-Fragmentierungsreaktionen geschützt, die üblicherweise zu einem Abbau nicht-fluorierter Kohlenwasserstoffe vergleichbarer Länge während der Messung führen. Trotz dieser Vorzüge ist die Synthese derartiger Verbindungen kostspielig und erfordert spezielle Maßnahmen (Carriedo *et al.*, 1997).

4.4.2 Rekombinante Polypeptide als MS-Standards

Als Alternative zu chemisch synthetisierten Standards und rekombinanten natürlichen Proteinen oder deren Fragmenten wurde der Einsatz künstlicher, biotechnologisch hergestellter Peptide mit speziellem Design für die MS-Kalibrierung vorgeschlagen. Das sogenannte QCAL-Polypeptid setzte sich als Konkatermer aus 22 Peptiden zusammen, die mittels Trypsin-Verdau in stöchiometrischer Menge freigesetzt werden können (Eyers *et al.*, 2008). Dieser Standard wurde zur Überprüfung von MALDI-Massenspektrometern hinsichtlich der Auftrennung und Analyse von Peptiden entwickelt. Die Peptid-Spaltprodukte von QCAL beinhalten eine repräsentative Mischung natürlicher Aminosäuren, einschließlich geeigneter Positionen zur optionalen chemischen Einführung post-translationaler Modifikationen wie Deamidierung oder Methionin-oxidation. Das QCAL-Polypeptid entsprang der in demselben Labor zuvor entwickelten QconCAT-Technologie (Beynon *et al.*, 2005), wobei das QconCAT-Peptidkonkatermer eine Auswahl von Peptidfragmenten enthielt, die jeweils charakteristische Bereiche von Proteinen als Grundlage einer Proteomik-Studie umfassten. Eine Isotopen-Markierung während der Expression erlaubte die Anwendung dieser Peptidfragmente als interne Standards für die MS-Quantifizierung entsprechender Proteinproben.

Die QCAL-Peptide mit ihren eher geringen Molekulargewichten von 0,4 bis 3,2 kDa konnten allerdings nur einen sehr begrenzten *m/z*-Bereich abdecken. Bemerkenswert ist, dass die QconCAT- und QCAL-Polypeptide bei Expression in *E. coli* BL21(DE3) ausschließlich in der unlöslichen Zellfraktion anfielen (Pratt *et al.*, 2006), was die Solubilisierung der Einschlusskörper in 6 M Guanidiniumchlorid erforderte. Die Unlöslichkeit der biosynthetischen Polypeptide beeinträchtigte auch die Effizienz des tryptischen Verdau, weil sich nicht alle vorhergesagten Spaltstellen als zugänglich erwiesen. Tatsächlich konnten nur 10 von 20 erwarteten QconCAT-Peptidfragmenten eindeutig Signalen in den Massenspektren zugeordnet werden, und die messbaren

Analyten waren mit einer Länge von 10 bis 15 Aminosäuren relativ kurz (Beynon *et al.*, 2005).

Im Vergleich dazu deckten die 22 QCAL-Peptidfragmente zwar einen größeren Längenbereich von 4 bis 26 Resten ab, allerdings ergaben die äußerst ähnlichen Molekülmassen einiger Fragmente eine sehr enge m/z -Verteilung und komplizierten die Signalzuordnung. Manche der erwarteten Peptide konnten in ESI-MS-Spektren überhaupt nicht identifiziert werden oder erst nach chemischer Modifizierung, wie etwa der Einführung einer Guanidin-Gruppe (Eyers *et al.*, 2008). Diesen Befunden dürften die ungleichen Ionisierungseigenschaften einiger Peptidfragmente zugrunde liegen.

4.4.3 Ein Polypeptid-Standard auf Basis der PASylierungstechnologie

Im Zuge der vorliegenden Arbeit entstand die Idee, die homogenen chemisch-physikalischen Eigenschaften des PAS-Polypeptidrückgrats mit seiner konformationell ungeordneten Struktur und der stark ausgeprägten Hydrophilie, die durch die hohe Lösungsmittlexposition der polaren Peptidbindungen verursacht wird (Abschnitt 4.1.5), zur Herstellung eines rekombinanten Polypeptid-Standards zu nutzen. Dem hier entwickelten „PAS-cal“-Polypeptid (20,5 kDa) liegt die PAS#5-Polypeptidsequenz zugrunde, in die bis zu 4 Arginin-Reste als Spaltstellen für Trypsin eingeführt wurden. Der tryptische Verdau des Polypeptids führt schließlich zu 4 Polypeptid-Fragmenten, welche einen großen Massenbereich von 2 bis 8 kDa mit gleichmäßigem Abstand abdecken.

„PAS-cal“ gestattet die unaufwendige Produktion und Reinigung in löslicher Form als SUMO-Fusionsprotein sowie die Lagerung des gereinigten freigesetzten Polypeptid-Standards als gut resolubilierbares Lyophilisat (siehe Abschnitt 3.2.4). Unter sterilen Bedingungen stellte auch die Langzeitlagerung von PAS-cal in wässriger Lösung kein Problem dar. Die präparative Spaltung der PAS-cal-Sequenz vom SUMO-Fusionspartner durch Ulp1 sowie der tryptische Verdau des isolierten Polypeptids zu den vier Fragmenten des MS-Standards gestaltete sich durch die gute Zugänglichkeit des Peptidrückgrats für die beiden Proteasen erheblich effizienter als für die QCAL-Peptide beschrieben (Abschnitt 4.4.2). Die „PAS-cal“-Standardpeptide traten nach vollständiger Trypsinspaltung stets in äquimolarer Menge und mit vergleichbaren Intensitäten im Spektrum auf.

Damit übertrafen sie sogar eine chemisch-synthetische Version des „PAS-cal“-Standards, der sich aus einer Mischung von Standard-Peptiden einer Länge von 8 bis

37 Aminosäuren mit Massen im Bereich 750 bis 3000 Da zusammensetzte und speziell für MALDI-MS-Analysen kurzer Peptide im Rahmen von Proteomik-Studien geeignet war (Maier *et al.*, 2014). Die Sequenz der Peptide basierte ebenso wie der in dieser Arbeit realisierte rekombinante „PAS-cal“-Standard auf der PAS#5-Aminosäuresequenz, allerdings wurden die Einzelpeptide Rest für Rest durch chemische Festphasen-Synthese aus den Aminosäuren produziert. Die so erhaltene Peptid-Mischung enthielt herstellungsbedingt Nebenprodukte aus unvollständigen Kopplungsreaktionen, und die äquimolare Zusammensetzung des aus den Einzelpeptiden gemischten Kalibrierstandards konnte nur abgeschätzt werden.

Sowohl die chemisch-synthetischen „PAS-cal“-Peptide als auch die „PAS-cal“-Fragmente des rekombinanten Polypeptid-Standards wiesen jeweils eine stabile positive Ladung an ihrem C-terminalen Arginin-Rest auf, was hohe Signalintensitäten in MS-Anwendungen gewährleistete (Krause *et al.*, 1999). Die für die langen rekombinanten „PAS-cal“-Peptidfragmente beobachteten hohen Intensitäten und deren Abhängigkeit von der Peptidlänge (vergleiche Abbildung 39, Abschnitt 3.2.4) lassen sich aber nur dadurch erklären, dass auch das Polypeptidrückgrat Protonen aufnimmt, welche in mehr oder weniger regelmäßigen Abständen über die Polypeptidkette verteilt sind (Wysocki *et al.*, 2000; Somogyi *et al.*, 1994). In stark saurer Lösung und auch in der Gasphase tendieren die Sauerstoffatome von Säureamid-Bindungen in der Tat zur Protonierung (Bagno *et al.*, 1999). Beide Bedingungen sind durch den sauren Probenpuffer bei der ESI-MS-Messung und die Verdampfung der Probe durch *Electro-Spray*-Ionisierung gegeben. Eine derart gleichmäßige Ladungsverteilung entlang des Rückgrats, wie sie bei „PAS-cal“ beobachtet wurde, ist nur in inhärent homogenen Polypeptiden möglich, die eine über die gesamte Länge einheitliche chemische Umgebung bieten.

Die hervorragende Eignung von „PAS-cal“ zur ESI-MS-Kalibrierung anhand der m/z -Signale des intakten Konkatomers konnte im direkten Vergleich mit einem kommerziellen Standard demonstriert werden und führte zur gleichermaßen präzisen Massenbestimmung eines rekombinanten Fab-Fragments (vergleiche Abbildung 40, Abschnitt 3.2.4). Der tryptische Verdau in die Peptidfragmente und deren Adduktbildung zu di- und trimeren Spezies eröffnen auch in MALDI-MS-Anwendungen die Möglichkeit zur Kalibrierung über einen großen m/z -Bereich (vergleiche Abbildung 41, Abschnitt 3.2.4). Die auffallend effektive Zusammenlagerung einzelner PAS-Peptide über gemeinsame verbrückende Protonen (Hillenkamp *et al.*, 1991) ist eine weitere Konsequenz der homogenen Aminosäuresequenz. Der „PAS-cal“-Polypeptid-Standard erlaubt also eine stringente Signalzuordnung innerhalb des zur Kalibrierung verwendeten

Bereichs und ermöglicht präzise Massenbestimmungen selbst großer Biopolymere wie Proteine. Durch die rekombinante Herstellung des „PAS-cal“-Polypeptids unterliegt die Länge der Peptidfragmente nicht den Einschränkungen der chemischen Synthese und kann bei Bedarf beliebig erweitert und modifiziert werden.

„PAS-cal“ stellt einen günstigen und vielseitigen Kalibrierstandard dar, der die Vorteile von (1) hoher Ausbeute bei der Produktion in *E. coli*, (2) hoher Spaltungseffizienz beim tryptischen Verdau und (3) gut erkennbarer Signale in ESI- und MALDI-MS in sich vereint. Ein breites Feld an Anwendungsmöglichkeiten in der Protein- und Peptidanalytik und Proteomik eröffnet sich durch Anpassung der Aminosäuresequenz und Peptidlänge mit Hilfe der hier etablierten flexiblen Klonierungsstrategie. In aufwendigen LC-MS-Experimenten in der Proteomik, die eine hohe Messgenauigkeit verlangen, steht mit „PAS-cal“ nun eine Referenzverbindung zur Verfügung, welche nach Zusatz zur MS-Probe die Signalauswertung erleichtern kann. Üblicherweise involvieren solche Experimente die tryptische Spaltung der Analyten, so dass der zugegebene „PAS-cal“-Standard direkt in der Probe *in situ* Peptidfragmente mit bekannten *m/z*-Signalen hoher Intensität liefern kann, wobei deren artifizielle Aminosäuresequenzen die Unterscheidung von denen der Probe gewährleisten. Auf diese Weise kann auch während ausgedehnter Messungen die Kalibrierung validiert werden. Gleichzeitig kann das charakteristische Fragmentierungsmuster von „PAS-cal“ als Maß für die Vollständigkeit des Trypsin-Verdaus herangezogen werden. Nach Einführung einer Trypsin-Spaltstelle im Fusionsprotein zwischen SUMO und „PAS-cal“ könnte außerdem Trypsin die konformationsabhängige SUMO-Protease bei der Präparation des „PAS-cal“-Polypeptids ersetzen und *in situ* alle Peptidfragmente vom Fusionsprotein freisetzen. Als Fusionspartner biomedizinisch relevanter Proteine könnte „PAS-cal“ mit seiner charakteristischen MS-Signatur zudem deren Quantifizierung *in vivo* erleichtern, beispielsweise zur Bestimmung intrazellulärer Expressionsniveaus in Zellkultur oder der Plasma-Halbwertszeit in Tierstudien.

5 Zusammenfassung

Die PASylierungstechnologie nutzt das große hydrodynamische Volumen, welches Polypeptidsequenzen aus den Aminosäuren Prolin, Alanin und gegebenenfalls Serin in wässriger Lösung aufgrund ihrer ungeordneten *Random-Coil*-Struktur annehmen, zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit von Therapeutika *in vivo*. In Analogie zur chemischen Kopplung mit PEG-Polymeren wurde die Technologie bereits für therapeutische Proteine wie Wachstumshormon und Leptin eingesetzt, indem PAS-Polypeptidsequenzen mit deren freiem N- oder C-Terminus fusioniert wurden, was letztlich eine stark verlangsamte Nierenfiltration bewirkte. In dieser Arbeit sollten verschiedene PAS-Polypeptide als biomimetische Substanzen für PEG charakterisiert und spezielle Anwendungsmöglichkeiten der PAS-Polypeptide als chemisch inerte und strukturell homogene Biopolymere studiert werden. Ausgehend von den klassischen PAS-Sequenzen PAS#1 und PA#1 wurden verschiedene weitere P/A-Polypeptide (ohne Serin) konstruiert, deren Untersuchungen sowohl anhand von Fusionsproteinen mit dem Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten (einem Biopharmazeutikum) als auch der freien PAS-Sequenzen erfolgten, die durch chemische oder enzymatische Spaltung entsprechender PAS-Fusionsproteine mit TrxA bzw. SUMO präpariert wurden. Alle PAS-Fusionsproteine wurden gentechnisch in *E. coli* hergestellt.

Die hydrodynamischen Eigenschaften der PAS-Polypeptide wurden mit Hilfe dreier unabhängiger Techniken analysiert: SEC, DLS und Mikroviskosimetrie. Die erhaltenen Daten zeigten in konsistenter Weise, dass das in wässriger Lösung ausgeprägte hydrodynamische Volumen der PAS-Polypeptide von deren Prolin-Gehalt bestimmt wurde. Bei vergleichbarer Masse zeigten PAS-Polypeptide grundsätzlich ein größeres hydrodynamisches Volumen als PEG. Viskosimetrische Studien gestatteten die Ermittlung der intrinsischen Viskosität $[\eta]$ für die verschiedenen P/A-Sequenzen sowie im Fall von PAS#1, PA#1 und PEG die Herleitung der polymerspezifischen Mark-Houwink-Parameter K und a . Diese Parameter konnten zudem aus der Korrelation zwischen $[\eta]$ und den hydrodynamischen Radien aus SEC- oder DLS-Analysen bestätigt werden. Die Viskosität von PAS-Polypeptiden in wässriger Lösung lag auch bei hohen Konzentrationen stets unterhalb der für PEG vergleichbarer Masse. Den Polymeren PAS#1 und PA#1 konnte anhand der Mark-Houwink-Parameter – analog zu PEG – die *Random-Coil*-Struktur als Vorzugskonformation in wässriger Lösung zugeordnet werden. Die DLS-Messungen gestatteten darüber hinaus Formabschätzungen der Polymermoleküle, wonach eine ideale sphärische Form nur für PEG vorzuliegen scheint, wohingegen die PAS-Polypeptide mit steigendem Prolin-Gehalt (als statistisches Ensemble) zunehmend

elongierte Konformationen annehmen. Konformationsanalysen mittels CD-Spektroskopie ergaben Einblicke in die Sekundärstrukturpräferenzen unterschiedlicher PAS-Polypeptide und legten eine generelle Zuordnung zur „ungeordneten Polyprolin-Struktur“ nahe, welche sich durch *Random-Coil*- wie auch Polyprolin(II)-Strukturanteile auszeichnet. Ein erhöhter Prolin-Gehalt der PAS-Polypeptide hatte die Verstärkung von PPII-Strukturanteilen zur Folge, im Einklang mit der ermittelten Molekülform auf Grundlage der hydrodynamischen Daten. Die besondere Lösungskonformation der PAS-Polypeptide aus ungeordneten *Random-Coil*-Ketten mit verschiedenen ausgeprägten Anteilen an PPII-Struktur erlaubt eine gezielte Einstellung der konformationellen Eigenschaften und stellt die Entwicklung diesbezüglich maßgeschneiderter Biopolymere in Aussicht.

Die Löslichkeitseigenschaften und die Polarität der PAS-Polypeptide wurden mittels RPC an einer hydrophoben Polystyrol-Matrix und in verschiedenen organischen Lösungsmitteln untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass das in den strukturell ungeordneten PAS-Sequenzen solvensexponierte Polypeptid-Rückgrat für deren hohe Hydrophilie verantwortlich ist und sogar die von PEG übersteigt. Die untersuchten PAS-Polypeptide zeigten überraschend große Ähnlichkeiten mit PEG hinsichtlich der guten Löslichkeit in polaren organischen Lösemitteln und ebenso bei erhöhten Temperaturen keine erkennbar verminderte Löslichkeit in wässriger Lösung.

In einer anwendungsbezogenen Studie wurden modifizierte PA#1-Polypeptide mittels unterschiedlicher chemischer Konjugationsmethoden mit kleinen Chromophoren gekoppelt, womit die prinzipielle Eignung zur chemischen PASylierung praktisch beliebiger Wirkstoffe an gezielten Positionen demonstriert wurde. Die Einführung gleichsinniger Ladungen in PAS#1-Polypeptidsequenzen hatte eine leichte Streckung der Molekülkonformation offenbar aufgrund elektrostatischer Abstoßung zur Folge, äußerte sich aber vor allem in der drastischen Veränderung des pI-Werts entsprechender Fusionsproteine. Die in dieser Arbeit ebenfalls untersuchten repetitiven Polypeptid-Sequenzen P1G3, QQH und NNT fielen durch reduzierte Löslichkeit mit ausgeprägten Tendenzen zur Aggregation auf und zeigten in wässriger Lösung keine stabile *Random-Coil*-Konformation wie die PAS-Polypeptide. Die Entwicklung des „PAS-cal“-Polypeptids für die Massenspektrometrie auf Grundlage einer spaltbaren PAS#5-Polypeptidsequenz führte schließlich zu einem neuartigen Kalibrierstandard aus vier positiv geladenen Peptiden abgestufter Länge, der für ESI-MS- und MALDI-MS-Messungen großer Biomoleküle gleichermaßen geeignet ist und dabei ebenso akkurate Messergebnisse liefert wie ein kommerzieller chemisch-synthetischer Standard.

6 Summary

The PASylation technology exploits the large hydrodynamic volume, adopted by polypeptide sequences comprising proline, alanine and/or serine residues in aqueous solution due to their disordered *random-coil* conformation, for prolongation of the *in vivo* half-life of therapeutics. By analogy with chemical conjugation to PEG polymers, PASylation has already been applied to therapeutic proteins such as human growth hormone and leptin by fusing PAS polypeptide sequences to their free N- or C-terminus which resulted in strongly retarded renal filtration. In this thesis different PAS polypeptides should be characterized as biomimetic compounds for PEG and special applications of PAS polypeptides as chemically inert and structurally homogeneous biopolymers should be studied. Based on the classical PAS sequences PAS#1 and PA#1, several P/A polypeptides (without serine) were constructed and investigated by means of fusion proteins with the interleukin-1-receptor antagonist (a biopharmaceutical) as well as the free PAS polypeptides that were prepared by chemical or enzymatic cleavage of respective PAS fusion proteins with TrxA or SUMO. All PAS fusion proteins were produced by genetic engineering in *E. coli*.

The hydrodynamic properties of the PAS polypeptides were analyzed by use of three independent techniques: SEC, DLS and microviscometry. The obtained consistent data reveal that the hydrodynamic volume of PAS polypeptides in aqueous solution was determined by their proline content. PAS polypeptides generally exhibited higher hydrodynamic volumes than PEGs with comparable molecular weights. Viscometric studies allowed for the determination of the intrinsic viscosity $[\eta]$ for various P/A sequences and the derivation of the polymer-specific Mark-Houwink parameters K and a for the three polymer types PAS#1, PA#1 and PEG. Those parameters could also be confirmed from the correlation between $[\eta]$ and the hydrodynamic radii as obtained from SEC or DLS experiments. Remarkably, even at high polymer concentrations, the viscosity of PAS polypeptides in aqueous solution was always lower than the viscosity observed for PEGs with comparable molecular masses. Similar to PEG, the polymers PAS#1 and PA#1 could be assigned a *random-coil* structure as their preferred conformation in aqueous solution. In addition, DLS measurements allowed for shape estimations of the polymer molecules, indicating an ideal spherical shape only for PEGs whereas the PAS polypeptides adopt increasingly elongated conformations (within the statistical ensemble) with rising proline content of the PAS sequence. Conformational analyses by CD spectroscopy provided insights into the preferred secondary structure of various PAS polypeptides and suggested a principal classification as “disordered

poly(proline) structure” featuring both *random-coil* and poly(proline)(II) structural contributions. A rising proline percentage within the PAS polypeptides led to consolidation of PPII structural content, in good accordance with the the molecular shape approximation based on the hydrodynamic data. The special solution conformation of PAS polypeptides comprising disordered *random-coil* chains with varying PPII structural contributions allows for systematic adjustment of the conformational properties and proposes the development of biopolymers to be tailored in this regard.

The solubility properties and polarity of PAS polypeptides were studied by RPC with a hydrophobic poly(styrene) matrix and in different organic solvents. In this context the sovent-exposed polypeptide backbone of the structurally disordered PAS sequences was found to be the origin of their high hydrophilicity which even surpasses the hydrophilicity of PEG. The analyzed PAS polypeptides showed suprising similarities to PEG regarding good solubility in polar organic solvents as well as no observable solubility decrease in aqueous solution upon rising temperature.

In an application-related study, modified PA#1 polypeptides were coupled to small chromophores using different chemical conjugation procedures, demonstrating their principal applicability for chemical PASylation of virtually any drug at defined positions. The introduction of same-polarity charges to PAS#1 polypeptide sequences caused a slight extension of the molecular conformation due to electrostatic repulsion, but, above all, drastic pI changes of respective fusion proteins. The repetitive polypeptide sequences P1G3, QQH and NNT, which were investigated in this thesis as well, showed reduced solubility with strong aggregation tendencies and did not exhibit a stable *random-coil* conformation in aqueous solution as observed for the PAS polypeptides. The development of the “PAS-cal” polypeptide for mass spectrometry based on a cleavable PAS#5 polypeptide sequence resulted in a novel calibration standard featuring four positively charged peptides of equally spaced lengths. The “PAS-cal” standard was shown to be well suited for both ESI and MALDI MS analyses of large biomolecules, leading to measurement results with the same accuracy as obtained with a commercial chemically synthesized standard.

7 Abkürzungsverzeichnis

AEX	<i>Anion Exchange Chromatography</i> , Anionenaustauschchromatographie
A_{λ}	Absorption bei Wellenlänge λ
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
aTc	Anhydrotetracyclin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
Bla	β -Lactamase
BSA	Rinderserumalbumin
Cam	Chloramphenicol
CD	Circulardichroismus
CEX	<i>Cation Exchange Chromatography</i> , Kationenaustauschchromatographie
cP	Zentipoise (Einheit der Viskosität) ($1 \text{ cP} = 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$)
DAB	Deutsche Arzneibuch-Norm
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DLS	Dynamische Lichtstreuung
E_{λ}	Extinktion bei Wellenlänge λ
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI-MS	Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie
η	Viskosität
Fab	Antigen-bindendes Fragment eines Immunglobulins
IEX	<i>Ion Exchange Chromatography</i> , Ionenaustauschchromatographie
IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-galactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LCST	<i>Lower Critical Solution Temperature</i> , untere kritische Lösungstemperatur
M	Molekülmasse

MALDI-MS	Matrixunterstützte Laser- Desorption/ionisationsmassenspektrometrie
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimid
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD ₅₅₀	Optische Dichte bei 550 nm
p.a.	<i>pro analysi</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
Ph. Eur.	<i>Pharmacopoea Europaea</i> , Europäische Arzneibuch-Norm
Θ	Elliptizität
PPII	Polyprolin(II)-Helix
RPC	<i>Reversed Phase Chromatography</i> , Umkehrphasenchromatographie
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Bäckerhefe
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	<i>Size-exclusion Chromatography</i> , Größenausschlusschromatographie
Tet	Tetracyclin
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>Unit</i>)
UCST	<i>Upper Critical Solution Temperature</i> , obere kritische Lösungstemperatur
UV/Vis	Wellenlängen des sichtbaren sowie nahen ultravioletten Lichts
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

8 Literaturverzeichnis

- Aksentijevich, I., Masters, S.L., Ferguson, P.J., Dancey, P., Frenkel, J., van Royen-Kerkhoff, A., Laxer, R., Tedgard, U., Cowen, E.W., Pham, T.H., Booty, M., Estes, J.D., Sandler, N.G., Plass, N., Stone, D.L., Turner, M.L., Hill, S., Butman, J.A., Schneider, R., Babyn, P., El-Shanti, H.I., Pope, E., Barron, K., Bing, X., Laurence, A., Lee, C.C., Chapelle, D., Clarke, G.I., Ohson, K., Nicholson, M., Gadina, M., Yang, B., Korman, B.D., Gregersen, P.K., van Hagen, P.M., Hak, A.E., Huizing, M., Rahman, P., Douek, D.C., Remmers, E.F., Kastner, D.L. & Goldbach-Mansky, R. (2009) An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist. *N Engl J Med* 360, 2426-2437.
- Aksentijevich, I., Nowak, M., Mallah, M., Chae, J.J., Watford, W.T., Hofmann, S.R., Stein, L., Russo, R., Goldsmith, D., Dent, P., Rosenberg, H.F., Austin, F., Remmers, E.F., Balow, J.E., Jr., Rosenzweig, S., Komarow, H., Shoham, N.G., Wood, G., Jones, J., Mangra, N., Carrero, H., Adams, B.S., Moore, T.L., Schikler, K., Hoffman, H., Lovell, D.J., Lipnick, R., Barron, K., O'Shea, J.J., Kastner, D.L. & Goldbach-Mansky, R. (2002) De novo CIAS1 mutations, cytokine activation, and evidence for genetic heterogeneity in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID): a new member of the expanding family of pyrin-associated autoinflammatory diseases. *Arthritis Rheum* 46, 3340-3348.
- Albericio, F. (2004) Developments in peptide and amide synthesis. *Curr Opin Chem Biol* 8, 211-221.
- Alessi, M.L. (2004) Coil-to-Helix Transition of Poly(ethylene oxide) in Solution. *Department of Chemical Engineering and Department of Chemistry and Biochemistry*. College Park, University of Maryland.
- Anderson, C.L., Chaudhury, C., Kim, J., Bronson, C.L., Wani, M.A. & Mohanty, S. (2006) Perspective-- FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. *Trends in immunology* 27, 343-348.
- Arend, W.P. (2002) The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13, 323-340.
- Arend, W.P., Malyak, M., Guthridge, C.J.a. & Gabay, C. (1998) Interleukin-1 Receptor Antagonist: Role in Biology. *Annu Rev Immunol* 16, 27-55.
- Armstrong, J.K., Hempel, G., Koling, S., Chan, L.S., Fisher, T., Meiselman, H.J. & Garratty, G. (2007) Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer* 110, 103-111.
- Aurora, R. & Rose, G.D. (1998) Helix capping. *Protein Sci* 7, 21-38.
- Bae, Y.C., Lambert, S.M., Soane, D.S. & Prausnitz, J.M. (1991) Cloud-point curves of polymer solutions from thermo-optical measurements. *Macromolecules* 24, 4403-4407.
- Bagal, D., Zhang, H. & Schnier, P.D. (2008) Gas-phase proton-transfer chemistry coupled with TOF mass spectrometry and ion mobility-MS for the facile analysis of poly(ethylene glycols) and PEGylated polypeptide conjugates. *Anal Chem* 80, 2408-2418.

- Bagno, A., Bujnicki, B., Bertrand, S., Comuzzi, C., Dorigo, F., Janvier, P. & Scorrano, G. (1999) Site of Protonation of Carboxylic and Non-Carboxylic Amides in the Gas Phase and in Water. *Chem Eur J* 5, 523-536.
- Bailey, F.E., Kucera, J.L. & Imhof, L.G. (1958) Molecular weight relations of poly(ethylene oxide). *J Polym Sci, Part A: Polym Chem* 32, 517-518.
- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R. & Becker, J. (1998) Structure Determination of the Small Ubiquitin-related Modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280, 275-286.
- Bendele, A., Seely, J., Richey, C., Sennello, G. & Shopp, G. (1998) Short communication: renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins. *Toxicol Sci* 42, 152-157.
- Bergmann, U., Di Cicco, A., Wernet, P., Principi, E., Glatzel, P. & Nilsson, A. (2007) Nearest-neighbor oxygen distances in liquid water and ice observed by x-ray Raman based extended x-ray absorption fine structure. *J Chem Phys* 127, 174504.
- Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. *J Bacteriol* 62, 293-300.
- Besman, M., Chipman, S., Leung, D. & Singer, J. (2009) Conjugates of biological active proteins having a modified *in vivo* half-life. IN CELL THERAPEUTICS, I. (Ed.).
- Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J. & Georgiou, G. (1999) Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13703-13708.
- Beynon, R.J., Doherty, M.K., Pratt, J.M. & Gaskell, S.J. (2005) Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nat Methods* 2, 587-589.
- Bhandari, D.G., Levine, B.A., Trayer, I.P. & Yeadon, M.E. (1986) 1H-NMR study of mobility and conformational constraints within the proline-rich N-terminal of the LC1 alkali light chain of skeletal myosin. *Eur J Biochem* 160, 349-356.
- Binder, U. & Skerra, A. (2012) Half-life extension of therapeutic proteins via genetic fusion to recombinant PEG mimetics IN KONTERMANN, R. (Ed.) *Therapeutic Proteins: Strategies to Modulate Their Plasma Half-Lives*. 1st ed. Weinheim (Germany), Wiley-VCH.
- Binder, U. & Skerra, A. (2015) Current Strategies for Pharmacokinetic Optimization. IN ROSENBERG, A. & DEMEULE, B. (Eds.) *Biobetters - Protein Engineering to Approach the Curative*. 1st ed. New York, Springer Science+Business Media.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Jones, G.J. & Gotschlich, E.C. (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem* 136, 175-179.

- Blandamer, M.J., Fox, M.F., Powell, E. & Stafford, J.W. (1969) A viscometric study of poly(ethylene oxide) in t-butyl alcohol/water mixtures. *Makromol Chem* 124, 222-231.
- Blick, S.K. & Curran, M.P. (2007) Certolizumab pegol: in Crohn's disease. *BioDrugs* 21, 195-201; discussion 202-193.
- Booth, C. & Gaspar, H.B. (2009) Pegademase bovine (PEG-ADA) for the treatment of infants and children with severe combined immunodeficiency (SCID). *Biologics* 3, 349-358.
- Bosse-Doenecke, E., Weininger, U., Gopalswamy, M., Balbach, J., Knudsen, S.M. & Rudolph, R. (2008) High yield production of recombinant native and modified peptides exemplified by ligands for G-protein coupled receptors. *Protein Expr Purif* 58, 114-121.
- Bowen, D.V. & Field, F.H. (1975) Chemical Mass Markers in Chemical Ionization Mass-Spectrometry. *Anal Chem* 47, 2289-2292.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brant, D.A., Miller, W.G. & Flory, P.J. (1967) Conformational energy estimates for statistically coiling polypeptide chains. *J Mol Biol* 23, 47-65.
- Brouwers, H. (2010) Viscosity of a concentrated suspension of rigid monosized particles. *Phys Rev E* 81, 051402.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-378.
- Bush, C.A., Sarkar, S.K. & Kopple, K.D. (1978) Circular dichroism of β turns in peptides and proteins. *Biochemistry* 17, 4951-4954.
- Callec, G., Anderson, A.W., Tsao, G.T. & Rollings, J.E. (1984) System development for aqueous gel permeation chromatography. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem* 22, 287-293.
- Cantor, C.R. & Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry*, New York, W. H. Freeman and Company.
- Carriedo, G.A., Alonso, F.J.G. & Gonzalez, P.A. (1997) Improved synthesis of cyclic and polymeric phosphazenes based on facile chlorine substitution with phenols promoted by cesium carbonate. *Macromol Rapid Comm* 18, 371-377.
- Cary, P.D., Crane-Robinson, C., Bradbury, E.M. & Dixon, G.H. (1981) Structural Studies of the Non-Histone Chromosomal Proteins HMG-T and H6 from Trout Testis. *Eur J Biochem* 119, 545-551.
- Chen, T., Small, D.A., Wu, L.-Q., Rubloff, G.W., Ghodssi, R., Vazquez-Duhalt, R., Bentley, W.E. & Payne, G.F. (2003) Nature-Inspired Creation of Protein-Polysaccharide Conjugate and Its Subsequent Assembly onto a Patterned Surface. *Langmuir* 19, 9382-9386.

- Chien, A., Edgar, D.B. & Trela, J.M. (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127, 1550-1557.
- Cohen, S.B., Moreland, L.W., Cush, J.J., Greenwald, M.W., Block, S., Shergy, W.J., Hanrahan, P.S., Kraishi, M.M., Patel, A., Sun, G. & Bear, M.B. (2004) A multicentre, double blind, randomised, placebo controlled trial of anakinra (Kineret), a recombinant interleukin 1 receptor antagonist, in patients with rheumatoid arthritis treated with background methotrexate. *Ann Rheum Dis* 63, 1062-1068.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. & Hsu, L. (1972) Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 2110-2114.
- Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarutti, N., Sironi, M., Giri, J.G., Dower, S.K., Sims, J.E. & Mantovani, A. (1993) Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261, 472-475.
- Cox, R.A., Druet, L.M., Klausner, A.E., Modro, T.A., Wan, P. & Yates, K. (1981) Protonation acidity constants for some benzamides, acetamides, and lactams. *Can J Chem* 59, 1568-1573.
- Creighton, T.E. (1992) *Proteins: Structures and molecular principles*, New York, W.H. Freeman.
- Cura, V., Gangloff, M., Eiler, S., Moras, D. & Ruff, M. (2008) Cleaved thioredoxin fusion protein enables the crystallization of poorly soluble ER α in complex with synthetic ligands. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 64, 54-57.
- Czajkowsky, D.M., Hu, J., Shao, Z. & Pleass, R.J. (2012) Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives. *EMBO Mol Med* 4, 1015-1028.
- Dasari, M., Espargaro, A., Sabate, R., Lopez del Amo, J.M., Fink, U., Grelle, G., Bieschke, J., Ventura, S. & Reif, B. (2011) Bacterial Inclusion Bodies of Alzheimer's Disease β -Amyloid Peptides Can Be Employed To Study Native-Like Aggregation Intermediate States. *ChemBioChem* 12, 407-423.
- Davis, S., Abuchowski, A., Park, Y.K. & Davis, F.F. (1981) Alteration of the circulating life and antigenic properties of bovine adenosine deaminase in mice by attachment of polyethylene glycol. *Clin Exp Immunol* 46, 649-652.
- De St. Groth, S.F., Webster, R.G. & Datyner, A. (1963) Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta* 71, 377-391.
- DeAngelis, P.L. (2013) HEPTune: a process of conjugating a naturally occurring sugar molecule, heparosan, to a drug for enhanced drug delivery. *Drug Dev Deliv* 13, 34-38.
- Debye, P. (1947) Molecular-weight Determination by Light Scattering. *J Phys Chem* 51, 18-32.

- DeFrees, S., Wang, Z.G., Xing, R., Scott, A.E., Wang, J., Zopf, D., Gouty, D.L., Sjöberg, E.R., Panneerselvam, K., Brinkman-Van der Linden, E.C., Bayer, R.J., Tarp, M.A. & Clausen, H. (2006) GlycoPEGylation of recombinant therapeutic proteins produced in *Escherichia coli*. *Glycobiology* 16, 833-843.
- DeLano, W.L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System on World Wide Web. <http://www.pymol.org>.
- Devereux, J., Haeberli, P. & Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* 12, 387-395.
- Di Cesare, S., Binder, U., Maier, T. & Skerra, A. (2013) High-Yield Production of PASylated Human Growth Hormone Using Secretory *E. coli* Technology. *Bioprocess Int* 11, 30-38.
- Dinarello, C.A. (2005) The many worlds of reducing interleukin-1. *Arthritis Rheum* 52, 1960-1967.
- Dinarello, C.A. (2007) Historical Review of Cytokines. *Eur J Immunol* 37, S34-S45.
- Dinarello, C.A. (2009) Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27, 519-550.
- Dinarello, C.A. & Thompson, R.C. (1991) Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today* 12, 404-410.
- Diñç, C.Ö., Kibarar, G. & Güner, A. (2010) Solubility profiles of poly(ethylene glycol)/solvent systems. II. comparison of thermodynamic parameters from viscosity measurements. *J Appl Polym Sci* 117, 1100-1119.
- Dubin, P.L. & Principi, J.M. (1989) Failure of universal calibration for size-exclusion chromatography of rodlike macromolecules vs. random coils and globular proteins. *Macromolecules* 22, 1891-1896.
- Duncan, R., Cable, H.C., Lloyd, J.B., Rejmanová, P. & Kopeček, J. (1983) Polymers containing enzymatically degradable bonds, 7. Design of oligopeptide side-chains in poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] copolymers to promote efficient degradation by lysosomal enzymes. *Die Makromolekulare Chemie* 184, 1997-2008.
- Einstein, A. (1905) Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik* 322, 549-560.
- Einstein, A. (1906) Eine neue Bestimmung der Moleküldimensionen. *Annalen der Physik* 324, 289-306.
- EMA (2010) European Public Assessment Report (EPAR) Cimzia®
- EMA (2012) CHMP safety working party's response to the PDCO regarding the use of PEGylated drug products in the paediatric population.

- Endo, S. & Arata, Y. (1985) Proton nuclear magnetic resonance study of human immunoglobulins G1 and their proteolytic fragments: structure of the hinge region and effects of a hinge region deletion on internal flexibility. *Biochemistry* 24, 1561-1568.
- Esser, E., Keil, C., Braun, D., Montag, P. & Pasch, H. (2000) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of synthetic polymers. 4. Coupling of size exclusion chromatography and MALDI-TOF using a spray-deposition interface. *Polymer* 41, 4039-4046.
- Exler, J.H., Hummerich, D. & Scheibel, T. (2007) The amphiphilic properties of spider silks are important for spinning. *Angew Chem Int Ed Engl* 46, 3559-3562.
- Eyers, C.E., Simpson, D.M., Wong, S.C., Beynon, R.J. & Gaskell, S.J. (2008) QCAL — a novel standard for assessing instrument conditions for proteome analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* 19, 1275-1280.
- Fernandes, A.I. & Gregoriadis, G. (2001) The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase: implication in its pharmacokinetics. *Int J Pharm* 217, 215-224.
- Filpula, D. & Zhao, H. (2008) Releasable PEGylation of proteins with customized linkers. *Adv Drug Delivery Rev* 60, 29-49.
- Filpula, D.R., Yang, K., Basu, A. & Pastan, I.H. (2006) Polymer-linked pseudomonas exotoxin immunotoxin. IN INC., E. P. (Ed.).
- Fleischmann, R.M., Schechtman, J., Bennett, R., Handel, M.L., Burmester, G.R., Tesser, J., Modafferi, D., Poulakos, J. & Sun, G. (2003) Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (r-metHuIL-1ra), in patients with rheumatoid arthritis: A large, international, multicenter, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 48, 927-934.
- Fling, S.P. & Gregerson, D.S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* 155, 83-88.
- Foster, G. (2010) Pegylated Interferons for the Treatment of Chronic Hepatitis C. *Drugs* 70, 147-165.
- Garay, R.P., El-Gewely, R., Armstrong, J.K., Garratty, G. & Richette, P. (2012) Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. *Expert Opin Drug Deliv* 9, 1319-1323.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. & Bairoch, A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. IN WALKER, J. M. (Ed.) *The Proteomics Protocols Handbook*. New York, NY, USA, Humana Press.
- Gebauer, M. (2013) Kombinatorisches Design und funktionelle Charakterisierung von Anticalinen gegen die Extra-Domäne B in onkofetalem Fibronectin. *Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt*. Freising-Weihenstephan, Technische Universität München.

- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-326.
- Glaesner, W., Vick, A.M., Millican, R., Ellis, B., Tschang, S.H., Tian, Y., Bokvist, K., Brenner, M., Koester, A., Porksen, N., Etgen, G. & Bumol, T. (2010) Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein. *Diabetes Metab Res Rev* 26, 287-296.
- Godwin, A., Bolina, K., Clochard, M., Dinand, E., Rankin, S., Simic, S. & Brocchini, S. (2001) New strategies for polymer development in pharmaceutical science--a short review. *J Pharm Pharmacol* 53, 1175-1184.
- Gokce, I., Woody, R.W., Anderluh, G. & Lakey, J.H. (2005) Single Peptide Bonds Exhibit Poly(Pro)II ("Random Coil") Circular Dichroism Spectra. *J Am Chem Soc* 127, 9700-9701.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J. & David, M.M. (1949) Determination of Serum Proteins by means of the Biuret Reaction. *J Biol Chem* 177, 751-766.
- Greenfield, N. & Fasman, G.D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* 8, 4108-4116.
- Greenfield, N.J. (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols* 1, 2876-2890.
- Greenwald, R.B., Conover, C.D. & Choe, Y.H. (2000) Poly(ethylene glycol) Conjugated Drugs and Prodrugs: A Comprehensive Review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 17, 62.
- Greenwald, R.B., Yang, K., Zhao, H., Conover, C.D., Lee, S. & Filpula, D. (2003) Controlled Release of Proteins from Their Poly(Ethylene Glycol) Conjugates: Drug Delivery Systems Employing 1,6-Elimination. *Bioconjugate Chem* 14, 395-403.
- Gregoriadis, G., Jain, S., Papaioannou, I. & Laing, P. (2005) Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: a role for polysialic acids. *Int J Pharm* 300, 125-130.
- Gregory, P. & Huglin, M.B. (1986) Viscosity of aqueous and alkaline solutions of poly(ethylene oxide). *Die Makromolekulare Chemie* 187, 1745-1755.
- Gross, E. (1967) [27] The cyanogen bromide reaction. IN HIRS, C. H. W. (Ed.) *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- Haag, R. & Kratz, F. (2006) Polymer therapeutics: concepts and applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 45, 1198-1215.
- Haglund, B.O. (1987) Solubility studies of polyethylene glycols in ethanol and water. *Thermochimica Acta* 114, 97-102.
- Hannum, C.H., Wilcox, C.J., Arend, W.P., Joslin, F.G., Dripps, D.J., Heimdal, P.L., Armes, L.G., Sommer, A., Eisenberg, S.P. & Thompson, R.C. (1990) Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 343, 336-340.

- Hao, C., March, R.E., Croley, T.R., Smith, J.C. & Rafferty, S.P. (2001) Electrospray ionization tandem mass spectrometric study of salt cluster ions. Part 1—investigations of alkali metal chloride and sodium salt cluster ions. *J Mass Spectrom* 36, 79-96.
- Haraldsson, B., Nystrom, J. & Deen, W.M. (2008) Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 88, 451-487.
- Harari, D., Kuhn, N., Abramovich, R., Sasson, K., Zozulya, A.L., Smith, P., Schlapschy, M., Aharoni, R., Koster, M., Eilam, R., Skerra, A. & Schreiber, G. (2014) Enhanced in vivo efficacy of a type I interferon superagonist with extended plasma half-life in a mouse model of multiple sclerosis. *Journal Biol Chem* 289, 29014-29029.
- Harris, J.M. (1992) *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, Boston, MA, USA, Springer US.
- Harris, J.M. & Chess, R.B. (2003) Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 2, 214-221.
- Harris, J.M., Struck, E.C., Case, M.G., Paley, M.S., Yalpani, M., Van Alstine, J.M. & Brooks, D.E. (1984) Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol) derivatives. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem* 22, 341-352.
- Hayashi, C.Y., Shipley, N.H. & Lewis, R.V. (1999) Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. *Int J Biol Macromol* 24, 271-275.
- Henderson, B. & Blake, S. (1992) Therapeutic potential of cytokine manipulation. *Trends Pharmacol Sci* 13, 145-152.
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Elektrophoresis* 6, 103-112.
- Higgins, R.C. & Dahmus, M.E. (1979) Rapid visualization of protein bands in preparative SDS-polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 93, 257-260.
- Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R.C. & Chait, B.T. (1991) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* 63, 1193A-1203A.
- Hochuli, E. (1988) Large-scale chromatography of recombinant proteins. *Journal of chromatography* 444, 293-302.
- Holland, G.P., Creager, M.S., Jenkins, J.E., Lewis, R.V. & Yarger, J.L. (2008) Determining Secondary Structure in Spider Dragline Silk by Carbon-Carbon Correlation Solid-State NMR Spectroscopy. *J Am Chem Soc* 130, 9871-9877.
- Homsi, J., Simon, G.R., Garrett, C.R., Springett, G., De Conti, R., Chiappori, A.A., Munster, P.N., Burton, M.K., Stromatt, S., Allievi, C., Angiuli, P., Eisenfeld, A., Sullivan, D.M. & Daud, A.I. (2007) Phase I Trial of Poly-L-Glutamate Camptothecin (CT-2106) Administered Weekly in Patients with Advanced Solid Malignancies. *Clin Cancer Res* 13, 5855-5861.

- Horvath, C. & Melander, W. (1977) Liquid Chromatography with Hydrocarbonaceous Bonded Phases; Theory and Practice of Reversed Phase Chromatography. *J Chromatogr Sci* 15, 393-404.
- Hu, Y., Litwin, T., Nagaraja, A.R., Kwong, B., Katz, J., Watson, N. & Irvine, D.J. (2007) Cytosolic delivery of membrane-impermeable molecules in dendritic cells using pH-responsive core-shell nanoparticles. *Nano Lett* 7, 3056-3064.
- Huggins, M.L. (1942) The Viscosity of Dilute Solutions of Long-Chain Molecules. IV. Dependence on Concentration. *J Am Chem Soc* 64, 2716-2718.
- Iizuka, Y., Uchida, C., Wakamatsu, K. & Oya, M. (1993) Synthesis and Properties of High Molecular Weight Polypeptides Containing Proline. *Bull Chem Soc Jpn* 66, 1269-1272.
- Ishida, T., Ichihara, M., Wang, X., Yamamoto, K., Kimura, J., Majima, E. & Kiwada, H. (2006) Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J Control Release* 112, 15-25.
- Israelachvili, J. (1997) The different faces of poly(ethylene glycol). *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 94, 8378-8379.
- Iyer, A.K., Khaled, G., Fang, J. & Maeda, H. (2006) Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today* 11, 812-818.
- Jeng, M.F., Campbell, A.P., Begley, T., Holmgren, A., Case, D.A., Wright, P.E. & Dyson, H.J. (1994) High-resolution solution structures of oxidized and reduced Escherichia coli thioredoxin. *Structure* 2, 853-868.
- Jevsevar, S., Kunstelj, M. & Porekar, V.G. (2010) PEGylation of therapeutic proteins. *Biotechnol J* 5, 113-128.
- Kabsch, W. & Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577-2637.
- Kakinoki, S., Hirano, Y. & Oka, M. (2005) On the Stability of Polyproline-I and II Structures of Proline Oligopeptides. *Polym Bull* 53, 109-115.
- Kerensky, T.A., Gottlieb, A.B., Yaniv, S. & Au, S.C. (2012) Etanercept: efficacy and safety for approved indications. *Expert Opin Drug Saf* 11, 121-139.
- Kinstler, O., Brems, D., Lauren, S., Paige, A., Hamburger, J. & Treuheit, M. (1996) Characterization and Stability of N-terminally PEGylated rhG-CSF. *Pharm Res* 13, 996-1002.
- Kjellander, R. & Florin, E. (1981) Water structure and changes in thermal stability of the system poly(ethylene oxide)-water. *J Chem Soc Faraday Trans* 77, 2053-2077.
- Kling, J. (2013) PEGylation of Biologics. *Bioprocess Int* 11, 34-43.
- Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D. & Schubert, U.S. (2010) Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 6288-6308.

- König, S.H. (1975) Brownian motion of an ellipsoid. A correction to Perrin's results. *Biopolymers* 14, 2421-2423.
- Kornberger, P. & Skerra, A. (2014) Sortase-catalyzed in vitro functionalization of a HER2-specific recombinant Fab for tumor targeting of the plant cytotoxin gelonin. *mAbs* 6, 354-366.
- Krämer, E.O. (1938) Molecular Weights of Celluloses and Cellulose Derivates. *Ind Eng Chem* 30, 1200-1203.
- Kratz, F. (2014) A clinical update of using albumin as a drug vehicle — A commentary. *J Control Release* 190, 331-336.
- Kratz, F., Beyer, U. & Schutte, M.T. (1999) Drug-Polymer Conjugates Containing Acid-Cleavable Bonds. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 16, 245-288.
- Krause, E., Wenschuh, H. & Jungblut, P.R. (1999) The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins. *Anal Chem* 71, 4160-4165.
- Kumar, V. & Kalonia, D.S. (2006) Removal of peroxides in polyethylene glycols by vacuum drying: Implications in the stability of biotech and pharmaceutical formulations. *AAPS PharmSciTech* 7, E47-E53.
- Kuo, T.T. & Aveson, V.G. (2011) Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics. *mAbs* 3, 422-430.
- Kurfürst, M.M. (1992) Detection and molecular weight determination of polyethylene glycol-modified hirudin by staining after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 200, 244-248.
- Kurnit, D.M. (1989) Escherichia coli recA deletion strains that are highly competent for transformation and for in vivo phage packaging. *Gene* 82, 313-315.
- Lam, S.L. & Hsu, V.L. (2003) NMR identification of left-handed polyproline type II helices. *Biopolymers* 69, 270-281.
- Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Langer, C.J., O'Byrne, K.J., Socinski, M.A., Mikhailov, S.M., Lesniewski-Kmak, K., Smakal, M., Ciuleanu, T.E., Orlov, S.V., Dediu, M., Heigener, D., Eisenfeld, A.J., Sandalic, L., Oldham, F.B., Singer, J.W. & Ross, H.J. (2008) Phase III Trial Comparing Paclitaxel Poliglumex (CT-2103, PPX) in Combination with Carboplatin Versus Standard Paclitaxel and Carboplatin in the Treatment of PS 2 Patients with Chemotherapy-Naïve Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *J Thor Oncol* 3, 623-630.
- Larsen, C.M., Faulenbach, M., Vaag, A., Volund, A., Ehres, J.A., Seifert, B., Mandrup-Poulsen, T. & Donath, M.Y. (2007) Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 356, 1517-1526.
- Lauffer, M.A. (1942) Experimental Facts Pertaining to the Relationship between Viscosity, Molecular Size, and Molecular Shape. *Chem Rev* 31, 561-586.

- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. & McCoy, J.M. (1993) A Thioredoxin Gene Fusion Expression System That Circumvents Inclusion Body Formation in the E. coli Cytoplasm. *Nat Biotech* 11, 187-193.
- Leader, B., Baca, Q.J. & Golan, D.E. (2008) Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat Rev Drug Discov* 7, 21-39.
- Leclerc, J., Lefèvre, T., Pottier, F., Morency, L.-P., Lapointe-Verreault, C., Gagné, S.M. & Auger, M. (2012) Structure and pH-induced alterations of recombinant and natural spider silk proteins in solution. *Biopolymers* 97, 337-346.
- Lee, C.-D., Sun, H.-C., Hu, S.-M., Chiu, C.-F., Homhuan, A., Liang, S.-M., Leng, C.-H. & Wang, T.-F. (2008a) An improved SUMO fusion protein system for effective production of native proteins. *Protein Sci* 17, 1241-1248.
- Lee, C., Levin, A. & Branton, D. (1987) Copper staining: A five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 166, 308-312.
- Lee, E., Lee, J., Lee, I.H., Yu, M., Kim, H., Chae, S.Y. & Jon, S. (2008b) Conjugated chitosan as a novel platform for oral delivery of paclitaxel. *J Med Chem* 51, 6442-6449.
- Lee, S., Greenwald, R.B., McGuire, J., Yang, K. & Shi, C. (2001) Drug Delivery Systems Employing 1,6-Elimination: Releasable Poly(ethylene glycol) Conjugates of Proteins. *Bioconjugate Chem* 12, 163-169.
- Lefèvre, T., Leclerc, J., Rioux-Dube, J.F., Buffeteau, T., Paquin, M.C., Rousseau, M.E., Cloutier, I., Auger, M., Gagne, S.M., Boudreault, S., Cloutier, C. & Pezolet, M. (2007) Conformation of spider silk proteins in situ in the intact major ampullate gland and in solution. *Biomacromolecules* 8, 2342-2344.
- Lefèvre, T., Paquet-Mercier, F., Rioux-Dubé, J.-F. & Pézolet, M. (2012) Structure of silk by raman spectromicroscopy: From the spinning glands to the fibers. *Biopolymers* 97, 322-336.
- Lencer, W.I. & Blumberg, R.S. (2005) A passionate kiss, then run: exocytosis and recycling of IgG by FcRn. *Trends Cell Biol* 15, 5-9.
- Levitt, L.S. & Levitt, B.W. (1979) Calculation of Acidity Constants of Protonated Weak Organic Bases by a New Method, III* Ethers. *Z Naturforsch* 34, 614.
- Lewis, A.M., Varghese, S., Xu, H. & Alexander, H.R. (2006) Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J Transl Med* 4, 48.
- Liebner, R., Mathaes, R., Meyer, M., Hey, T., Winter, G. & Besheer, A. (2014) Protein HESylation for half-life extension: synthesis, characterization and pharmacokinetics of HESylated anakinra. *Eur J Pharm Biopharm* 87, 378-385.
- Liechty, W.B., Kryscio, D.R., Slaughter, B.V. & Peppas, N.A. (2010) Polymers for Drug Delivery Systems. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 1, 149-173.
- Lima, C.D. & Mossesso, E. (2011) Rapidly Cleavable Sumo Fusion Protein Expression System For Difficult To Express Proteins. IN INC, C. R. F. (Ed.).

- Lin, L.-N. & Brandts, J.F. (1980) Kinetic mechanism for conformational transitions between poly-L-prolines I and II: a study utilizing the cis-trans specificity of a proline-specific protease. *Biochemistry* 19, 3055-3059.
- Ling, M., Merante, F. & Robinson, B.H. (1995) A rapid and reliable DNA preparation method for screening a large number of yeast clones by polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 23, 4924-4925.
- Liu, S., Maheshwari, R. & Kiick, K.L. (2009) Polymer-Based Therapeutics. *Macromolecules* 42, 3-13.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Lu, K.P., Finn, G., Lee, T.H. & Nicholson, L.K. (2007) Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nat Chem Biol* 3, 619-629.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 65, 271-284.
- Maier, S.K., Bashkueva, K., Rosli, C., Skerra, A. & Kuster, B. (2014) PAS-cal: A repetitive peptide sequence calibration standard for MALDI mass spectrometry. *Proteomics* 14, 2427-2431.
- Mandrup-Poulsen, T. (1996) The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 39, 1005-1029.
- Markovsky, E., Baabur-Cohen, H., Eldar-Boock, A., Omer, L., Tiram, G., Ferber, S., Ofek, P., Polyak, D., Scomparin, A. & Satchi-Fainaro, R. (2012) Administration, distribution, metabolism and elimination of polymer therapeutics. *J Control Release* 161, 446-460.
- Martino, M., Bavoso, A., Guantieri, V., Coviello, A. & Tamburro, A.M. (2000) On the occurrence of polyproline II structure in elastin. *J Mol Struct* 519, 173-189.
- Masuelli, M.A. (2014) Mark-Houwink Parameters for Aqueous-Soluble Polymers and Biopolymers at Various Temperatures. *Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry* 2, 37-43.
- McCord, R.W., Blakeney, E.W. & Mattice, W.L. (1977) Conformational changes induced in ionized poly(L-arginine) and poly(L-histidine) by sodium dodecyl sulfate. *Biopolymers* 16, 1319-1329.
- McCoy, J. & La Ville, E. (2001) Expression and Purification of Thioredoxin Fusion Proteins. *Current Protocols in Protein Science*. John Wiley & Sons, Inc.
- McInnes, I.B. & Schett, G. (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7, 429-442.
- Meerman, H.J. & Georgiou, G. (1994) Construction and characterization of a set of E. coli strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Biotechnology* 12, 1107-1110.

- Mendler, C.T., Friedrich, L., Laitinen, I., Schlapschy, M., Schwaiger, M., Wester, H.J. & Skerra, A. (2015) High contrast tumor imaging with radio-labeled antibody Fab fragments tailored for optimized pharmacokinetics via PASylation. *mAbs* 7, 96-109.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Moini, M. (1994) Ultramark-1621 as a calibration reference compound for mass-spectrometry. II. Positive-ion and negative-ion electrospray-ionization. *Rapid Commun Mass Sp* 8, 711-714.
- Morath, V., Bolze, F., Schlapschy, M., Schneider, S., Sedlmayer, F., Seyfarth, K., Klingenspor, M. & Skerra, A. (2015) PASylation of Murine Leptin Leads to Extended Plasma Half-Life and Enhanced in Vivo Efficacy. *Mol Pharm* 12, 1431-1442.
- Mori, S. & Barth, H.G. (1999) *Size Exclusion Chromatography*, New York, Springer Science+Business Media.
- Mossessova, E. & Lima, C.D. (2000) Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol Cell* 5, 865-876.
- Nichols, P., Li, L., Kumar, S., Buck, P.M., Singh, S.K., Goswami, S., Balthazor, B., Conley, T.R., Sek, D. & Allen, M.J. (2015) Rational design of viscosity reducing mutants of a monoclonal antibody: Hydrophobic versus electrostatic intermolecular interactions. *mAbs* 7, 212-230.
- Noudeh, G.D., Taulier, N. & Chalikian, T.V. (2003) Volumetric characterization of homopolymeric amino acids. *Biopolymers* 70, 563-574.
- Nyrkova, I.A., Semenov, A.N., Aggeli, A. & Boden, N. (2000) Fibril stability in solutions of twisted β -sheet peptides: a new kind of micellization in chiral systems. *Eur Phys J B* 17, 481-497.
- Ohgo, K., Kawase, T., Ashida, J. & Asakura, T. (2006) Solid-state NMR analysis of a peptide (Gly-Pro-Gly-Gly-Ala)(6)-Gly derived from a flagelliform silk sequence of *Nephila clavipes*. *Biomacromolecules* 7, 1210-1214.
- Olins, P.O., Devine, C.S., Rangwala, S.H. & Kavka, K.S. (1988) The T7 phage gene 10 leader RNA, a ribosome-binding site that dramatically enhances the expression of foreign genes in *Escherichia coli*. *Gene* 73, 227-235.
- Olsen, J.V., Ong, S.-E. & Mann, M. (2004) Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. *Mol Cell Proteomics* 3, 608-614.
- Ortiz, M.L., Calero, M., Patron, C.F., Castellanos, L. & Mendez, E. (1992) Imidazole-SDS-Zn reverse staining of proteins in gels containing or not SDS and microsequence of individual unmodified electroblotted proteins. *FEBS Letters* 296, 300-304.

- Osborn, B.L., Sekut, L., Corcoran, M., Poortman, C., Sturm, B., Chen, G., Mather, D., Lin, H.L. & Parry, T.J. (2002) Albutropin: a growth hormone–albumin fusion with improved pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats and monkeys. *Eur J Pharmacol* 456, 149-158.
- Owens, D.E., 3rd & Peppas, N.A. (2006) Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 307, 93-102.
- Packman, L.C., Hale, G. & Perham, R.N. (1984) Repeating functional domains in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli*. *EMBO J* 3, 1315-1319.
- Pamies, R., Hernández Cifre, J., del Carmen López Martínez, M. & García de la Torre, J. (2008) Determination of intrinsic viscosities of macromolecules and nanoparticles. Comparison of single-point and dilution procedures. *Colloid Polym Sci* 286, 1223-1231.
- Pappu, R.V. & Rose, G.D. (2002) A simple model for polyproline II structure in unfolded states of alanine-based peptides. *Protein Sci* 11, 2437-2455.
- Papworth, C., Bauer, J.C., Braman, J. & Wright, D.A. (1996) QuikChange site-directed mutagenesis. *Strategies*, 3-4.
- Pasut, G., Guiotto, A. & Veronese, F. (2004) Protein, peptide and non-peptide drug PEGylation for therapeutic application. *Expert Opin Ther Pat* 14, 859-894.
- Pasut, G. & Veronese, F.M. (2009) PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: an overview. *Adv Drug Delivery Rev* 61, 1177-1188.
- Patel, S. & Benfield, P. (1996) Pegaspargase (Polyethylene Glycol-L-Asparaginase). *Clin Immunother* 5, 492-496.
- Perrin, F. (1934) Mouvement brownien d'un ellipsoïde - I. Dispersion diélectrique pour des molécules ellipsoïdales. *J Phys Radium* 5, 497-511.
- Perutz, M.F., Pope, B.J., Owen, D., Wanker, E.E. & Scherzinger, E. (2002) Aggregation of proteins with expanded glutamine and alanine repeats of the glutamine-rich and asparagine-rich domains of Sup35 and of the amyloid beta-peptide of amyloid plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5596-5600.
- Plückthun, A. & Skerra, A. (1989) Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 178, 497-515.
- Poole, R.M. & Nowlan, M.L. (2014) Albiglutide: first global approval. *Drugs* 74, 929-938.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-599.
- Pratt, J.M., Simpson, D.M., Doherty, M.K., Rivers, J., Gaskell, S.J. & Beynon, R.J. (2006) Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes. *Nat Protoc* 1, 1029-1043.
- Prussak, C.E., Almazan, M.T. & Tseng, B.Y. (1989) Peptide production from proteins separated by sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 178, 233-238.

- Quadrifoglio, F. & Urry, D.W. (1968) Ultraviolet rotatory properties of polypeptides in solution. II. Poly-L-serine. *J Am Chem Soc* 90, 2760-2765.
- Quartier, P., Allantaz, F., Cimaz, R., Pillet, P., Messiaen, C., Bardin, C., Bossuyt, X., Boutten, A., Bienvenu, J., Duquesne, A., Richer, O., Chaussabel, D., Mogenet, A., Banchereau, J., Treluyer, J.M., Landais, P. & Pascual, V. (2011) A multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial with the interleukin-1 receptor antagonist anakinra in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis (ANAJIS trial). *Ann Rheum Dis* 70, 747-754.
- Rajalingam, D., Loftis, C., Xu, J.J. & Kumar, T.K.S. (2009) Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. *Protein Sci* 18, 980-993.
- Reddy, A.R., Prasad, D.V. & Darbarwar, M. (1986) Absorption and fluorescence spectra of 7-aminocoumarin derivatives. *J Photochem* 32, 69-80.
- Reddy, R.K., Modi, M.W. & Pedder, S. (2002) Use of peginterferon alfa-2a (40 KD) (Pegasys®) for the treatment of hepatitis C. *Adv Drug Delivery Rev* 54, 571-586.
- Ritz, D., Lim, J., Reynolds, C.M., Poole, L.B. & Beckwith, J. (2001) Conversion of a peroxiredoxin into a disulfide reductase by a triplet repeat expansion. *Science* 294, 158-160.
- Roos, G., Garcia-Pino, A., Van belle, K., Brosens, E., Wahni, K., Vandenbussche, G., Wyns, L., Loris, R. & Messens, J. (2007) The Conserved Active Site Proline Determines the Reducing Power of Staphylococcus aureus Thioredoxin. *J Mol Biol* 368, 800-811.
- Royo, E. & Brintzinger, H.H. (2002) Mass spectrometry of polystyrene and polypropene ruthenium complexes. A new tool for polymer characterization. *J Organomet Chem* 663, 213-220.
- Rucker, A.L. & Creamer, T.P. (2002) Polyproline II helical structure in protein unfolded states: lysine peptides revisited. *Protein Sci* 11, 980-985.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sakurada, I., Nakajima, A., Yoshizaki, O. & Nakamae, K. (1962) Conformation of polymethyl methacrylate stereochemical isomers in non-interacting media. *Kolloid-Z.u.Z.Polymer* 186, 41-50.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F. & Thompson, E.O. (1953) The amino-acid sequence in the glycol chain of insulin. II. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem J* 53, 366-374.
- Sato, H. (2002) Enzymatic procedure for site-specific pegylation of proteins. *Adv Drug Delivery Rev* 54, 487-504.

- Schellenberger, V., Wang, C.W., Geething, N.C., Spink, B.J., Campbell, A., To, W., Scholle, M.D., Yin, Y., Yao, Y., Bogin, O., Cleland, J.L., Silverman, J. & Stemmer, W.P. (2009) A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner. *Nat Biotechnol* 27, 1186-1190.
- Schimmel, P.R. & Flory, P.J. (1968) Conformational energies and configurational statistics of copolypeptides containing L-proline. *J Mol Biol* 34, 105-120.
- Schiweck, W. & Skerra, A. (1995) Fermenter production of an artificial fab fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallization through constant domain shuffling. *Proteins* 23, 561-565.
- Schlapschy, M. (2004) Konstruktion eines bispezifischen F(ab)₂-Fragments zur Immuntherapie des Hodgkin-Lymphoms. *Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt*. Freising-Weihenstephan, Technische Universität München.
- Schlapschy, M., Binder, U., Borger, C., Theobald, I., Wachinger, K., Kisling, S., Haller, D. & Skerra, A. (2013) PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng Des Sel* 26, 489-501.
- Schlapschy, M., Theobald, I., Mack, H., Schottelius, M., Wester, H.J. & Skerra, A. (2007) Fusion of a recombinant antibody fragment with a homo-amino-acid polymer: effects on biophysical properties and prolonged plasma half-life. *Protein Eng Des Sel* 20, 273-284.
- Schmidt, T.G. & Skerra, A. (1994) One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin. *J Chromatogr A* 676, 337-345.
- Schoepfer, R. (1993) The pRSET family of T7 promoter expression vectors for *Escherichia coli*. *Gene* 124, 83-85.
- Schreuder, H.A., Rondeau, J.M., Tardif, C., Soffientini, A., Sarubbi, E., Akeson, A., Bowlin, T.L., Yanofsky, S. & Barrett, R.W. (1995) Refined crystal structure of the interleukin-1 receptor antagonist. Presence of a disulfide link and a cis-proline. *Eur J Biochem* 227, 838-847.
- Schurr, J.M. & Schmitz, K.S. (1986) Dynamic Light Scattering Studies of Biopolymers: Effects of Charge, Shape, and Flexibility. *Ann Rev Phys Chem* 37, 271-305.
- Scopes, R.K. (1974) Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal Biochem* 59, 277-282.
- Scopes, R.K. (1994) *Protein Purification: Principles and Practice*, New York, Springer.
- Seuring, J. & Agarwal, S. (2012a) First Example of a Universal and Cost-Effective Approach: Polymers with Tunable Upper Critical Solution Temperature in Water and Electrolyte Solution. *Macromolecules* 45, 3910-3918.
- Seuring, J. & Agarwal, S. (2012b) Polymers with upper critical solution temperature in aqueous solution. *Macromol Rapid Commun* 33, 1898-1920.

- Shaikh, P.Z. (2011) Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review. *Int J of Pharm & Life Sci* 2, 1247-1263.
- Shental-Bechor, D., Kirca, S., Ben-Tal, N. & Haliloglu, T. (2005) Monte Carlo studies of folding, dynamics, and stability in alpha-helices. *Biophys J* 88, 2391-2402.
- Shi, Z., Olson, C.A., Rose, G.D., Baldwin, R.L. & Kallenbach, N.R. (2002) Polyproline II structure in a sequence of seven alanine residues. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 99, 9190-9195.
- Simha, R. (1940) The Influence of Brownian Movement on the Viscosity of Solutions. *J Phys Chem* 44, 25-34.
- Sjöback, R., Nygren, J. & Kubista, M. (1995) Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectrosc* 51, L7-L21.
- Skerra, A. (1989) Funktionelle Expression Antigen bindender Immunglobulinfragmente in *Escherichia coli*. *Fakultät für Chemie und Pharmazie*. München, Ludwig-Maximilians-Universität
- Skerra, A. (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151, 131-135.
- Skerra, A. & Plückthun, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038-1041.
- Skerra, A. & Plückthun, A. (1991) Secretion and in vivo folding of the Fab fragment of the antibody McPC603 in *Escherichia coli*: influence of disulphides and cis-prolines. *Protein Eng* 4, 971-979.
- Skoog, B. (1979) Determination of polyethylene glycols 4000 and 6000 in plasma protein preparations. *Vox Sang* 37, 345-349.
- Slutter, B., Bal, S.M., Que, I., Kaijzel, E., Lowik, C., Bouwstra, J. & Jiskoot, W. (2010) Antigen-adjuvant nanoconjugates for nasal vaccination: an improvement over the use of nanoparticles? *Mol Pharm* 7, 2207-2215.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Sommermeier, K., Eichner, W., Frie, S., Jungheinrich, C., Scharpf, R., Lutterbeck, K., Hemberger, J. & Orlando, M. (2002) Conjugates of hydroxyalkyl starch and an active reagent. IN GMBH, F. K. D. (Ed.).
- Somogyi, A., Wysocki, V.H. & Mayer, I. (1994) The effect of protonation site on bond strengths in simple peptides – application of ab initio and modified neglect of differential overlap bond orders and modified neglect of differential overlap energy partitioning. *J Am Soc Mass Spectr* 5, 704-717.
- Stapley, B.J. & Creamer, T.P. (1999) A survey of left-handed polyproline II helices. *Protein Sci* 8, 587-595.
- Strauch, K.L. & Beckwith, J. (1988) An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 1576-1580.

- Strupat, K. (2005) Molecular weight determination of peptides and proteins by ESI and MALDI. *Methods Enzymol* 405, 1-36.
- Studier, F.W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* 219, 37-44.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.
- Szabo, Z. (1997) Polyproline helices. Szeged, Hungary, Department of Medical Chemistry, Albert-Szent-Gyorgyi Medical University.
- Tal, M., Silberstein, A. & Nusser, E. (1985) Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. *J Biol Chem* 260, 9976-9980.
- Tatro, S.R., Baker, G.R., Fleming, R. & Harmon, J.P. (2002) Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry: Determining Mark-Houwink-Sakurada parameters and analyzing the breadth of polymer molecular weight distributions. *Polymer* 43, 2329-2335.
- Tewari, A., Buhles, W.C., Jr. & Starnes, H.F., Jr. (1990) Preliminary report: effects of interleukin-1 on platelet counts. *Lancet* 336, 712-714.
- Tiffany, M.L. & Krimm, S. (1972) Effect of temperature on the circular dichroism spectra of polypeptides in the extended state. *Biopolymers* 11, 2309-2316.
- Tiffany, M.L. & Krimm, S. (1968a) Circular dichroism of poly-L-proline in an unordered conformation. *Biopolymers* 6, 1767-1770.
- Tiffany, M.L. & Krimm, S. (1968b) New chain conformations of poly(glutamic acid) and polylysine. *Biopolymers* 6, 1379-1382.
- Tiffany, M.L. & Krimm, S. (1969) Circular dichroism of the "random" polypeptide chain. *Biopolymers* 8, 347-359.
- Twaites, B., de las Heras Alarcon, C. & Alexander, C. (2005) Synthetic polymers as drugs and therapeutics. *J Mater Chem* 15, 441-455.
- Vennemann, N., Lechner, M.D. & Oberthür, R.C. (1987) Thermodynamics and conformation of polyoxyethylene in aqueous solution under high pressure: 1. Small-angle neutron scattering and densitometric measurements at room temperature. *Polymer* 28, 1738-1748.
- Veronese, F.M., Caliceti, P. & Schiavon, O. (1997) Branched and Linear Poly(Ethylene Glycol): Influence of the Polymer Structure on Enzymological, Pharmacokinetic, and Immunological Properties of Protein Conjugates. *J Bioact Compat Polym* 12, 196-207.
- Veronese, F.M. & Pasut, G. (2005) PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today* 10, 1451-1458.
- Vila, J.A., Baldoni, H.A., Ripoll, D.R., Ghosh, A. & Scheraga, H.A. (2004) Polyproline II Helix Conformation in a Proline-Rich Environment: A Theoretical Study. *Biophys J* 86, 731-742.

- Wagner, H.L. (1987) The Mark–Houwink–Sakurada Relation for Poly(Methyl Methacrylate). *J Phys Chem Ref Data* 16, 165-173.
- Wang, L., Maji, S.K., Sawaya, M.R., Eisenberg, D. & Riek, R. (2008) Bacterial Inclusion Bodies Contain Amyloid-Like Structure. *PLoS Biol* 6, e195.
- Wang, T.F. (2011) SUMO fusion protein expression system for producing native proteins. IN ACADEMIA SINICA, T. (Ed.).
- Wang, Z., Li, H., Guan, W., Ling, H., Mu, T., Shuler, F.D. & Fang, X. (2010) Human SUMO fusion systems enhance protein expression and solubility. *Protein Expr Purif* 73, 203-208.
- Wessel, D. & Flügge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138, 141-143.
- Wu, K.J. & Odom, R.W. (1998) Characterizing synthetic polymers by MALDI MS. *Anal Chem* 70, 456A-461A.
- Wysocki, V.H., Tsaprailis, G., Smith, L.L. & Brechi, L.A. (2000) Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J Mass Spectrom* 35, 1399-1406.
- Yamasaki, N., Matsuo, A. & Isobe, H. (1988) Novel Polyethylene Glycol Derivatives for Modification of Proteins. *Agric Biol Chem* 52, 2125-2127.
- Yang, K., Basu, A., Wang, M., Chintala, R., Hsieh, M.C., Liu, S., Hua, J., Zhang, Z., Zhou, J., Li, M., Phyu, H., Petti, G., Mendez, M., Janjua, H., Peng, P., Longley, C., Borowski, V., Mehlig, M. & Filpula, D. (2003) Tailoring structure-function and pharmacokinetic properties of single - chain Fv proteins by site - specific PEGylation. *Protein Eng* 16, 761-770.
- Yang, Z., Wang, J., Lu, Q., Xu, J., Kobayashi, Y., Takakura, T., Takimoto, A., Yoshioka, T., Lian, C., Chen, C., Zhang, D., Zhang, Y., Li, S., Sun, X., Tan, Y., Yagi, S., Frenkel, E.P. & Hoffman, R.M. (2004) PEGylation Confers Greatly Extended Half-Life and Attenuated Immunogenicity to Recombinant Methioninase in Primates. *Cancer Res* 64, 6673-6678.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Yin, H., Morioka, H., Towle, C.A., Vidal, M., Watanabe, T. & Weissbach, L. (2001) Evidence that HAX-1 is an Interleukin-1 α N-terminal Binding Protein. *Cytokine* 15, 122-137.
- Young, M.A., Malavalli, A., Winslow, N., Vandegriff, K.D. & Winslow, R.M. (2007) Toxicity and hemodynamic effects after single dose administration of MalPEG-hemoglobin (MP4) in rhesus monkeys. *Transl Res* 149, 333-342.
- Yousefpour, P. & Chilkoti, A. (2014) Co-opting biology to deliver drugs. *Biotechnol Bioeng* 111, 1699-1716.

- Yu, D., Peng, P., Dharap, S.S., Wang, Y., Mehlig, M., Chandna, P., Zhao, H., Filpula, D., Yang, K., Borowski, V., Borchard, G., Zhang, Z. & Minko, T. (2005) Antitumor activity of poly(ethylene glycol)–camptothecin conjugate: The inhibition of tumor growth in vivo. *J Control Release* 110, 90-102.
- Yuen, K.C.J., Conway, G.S., Popovic, V., Merriam, G.R., Bailey, T., Hamrahian, A.H., Biller, B.M.K., Kipnes, M., Moore, J.A., Humphriss, E., Bright, G.M. & Cleland, J.L. (2013) A Long-Acting Human Growth Hormone With Delayed Clearance (VRS-317): Results of a Double-Blind, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose Study in Growth Hormone–Deficient Adults. *J Clin Endocrinol Metab* 98, 2595-2603.
- Zacchigna, M., Cateni, F., Drioli, S. & Bonora, G.M. (2011) Multimeric, Multifunctional Derivatives of Poly(ethylene glycol). *Polymers* 3, 1076.
- Zalovsky, J., Chamberlain, A.K., Horton, H.M., Karki, S., Leung, I.W., Sproule, T.J., Lazar, G.A., Roopenian, D.C. & Desjarlais, J.R. (2010) Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. *Nat Biotechnol* 28, 157-159.
- Zalipsky, S., Qazen, M., Walker, J.A., Mullah, N., Quinn, Y.P. & Huang, S.K. (1999) New Detachable Poly(ethylene glycol) Conjugates: Cysteine-Cleavable Lipopolymers Regenerating Natural Phospholipid, Diacyl Phosphatidylethanolamine. *Bioconjugate Chem* 10, 703-707.
- Zhang, J.-M. & An, J. (2007) Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin* 45, 27-37.
- Zhang, R., Jain, S., Rowland, M., Hussain, N., Agarwal, M. & Gregoriadis, G. (2010) Development and Testing of Solid Dose Formulations Containing Polysialic Acid Insulin Conjugate: Next Generation of Long-Acting Insulin. *J Diabetes Sci Technol* 4, 532-539.
- Zhao, H., Yang, K., Martinez, A., Basu, A., Chintala, R., Liu, H.-C., Janjua, A., Wang, M. & Filpula, D. (2006) Linear and Branched Bicin Linkers for Releasable PEGylation of Macromolecules: Controlled Release in Vivo and in Vitro from Mono- and Multi-PEGylated Proteins. *Bioconjugate Chem* 17, 341-351.
- Zhao, X. & Milton Harris, J. (1998) Novel degradable poly(ethylene glycol) hydrogels for controlled release of protein. *J Pharm Sci* 87, 1450-1458.
- Zheng, Z.Y., Wang, S.Z., Li, G.S., Zhan, X.B., Lin, C.C., Wu, J.R. & Zhu, L. (2013) A new polysialic acid production process based on dual-stage pH control and fed-batch fermentation for higher yield and resulting high molecular weight product. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 2405-2412.

9 Anhang

PAS1.2(200)

5' - GCC AGC CCT GCC GCA CCT GCG CCC GCA TCA CCT GCG GCA CCT GCA CCT TCC GCC CCG GCT
 GCA TCT CCT GCC GCA CCC GCG CCT GCC AGC CCA GCT GCA CCT GCC CCA AGT GCG CCA GCA
 GCA TCC CCT GCC GCG CCT GCC CCC GCT AGT CCA GCG GCC CCA GCT CCA TCT GCA CCA GCT
 GCT AGC CCT GCT GCA CCA GCT CCT GCT TCT CCC GCA GCC CCA GCG CCT TCT GCT CCC GCA
 GCC TCA CCT GCG GCC CCG GCA CCA GCA TCT CCA GCG GCA CCA GCA CCT TCG GCC CCT GCT
 GCT AGC CCA GCA GCA CCT GCG CCA GCC TCA CCA GCT GCT CCC GCT CCT AGT GCC CCG GCG
 GCC TCG CCT GCT GCT CCT GCA CCA GCT TCG CCA GCG GCA CCG GCT CCT TCG GCG CCG GCT
 GCT TCA CCA GCA GCA CCT GCT CCA GCG TCC CCA GCG GCC CCT GCT CCA AGT GCT CCG GCT
 GCA TCG CCT GCC GCT CCT GCT CCT GCA TCC CCA GCT GCT CCA GCA CCA AGC GCA CCT GCC
 GCC TCA CCA GCG GCG CCA GCA CCC GCC AGC CCA GCA GCG CCT GCT CCA TCC GCA CCG GCG -3'

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala

P1A3(200)

5' - GCC GCA GCA CCG GCA GCA GCC CCT GCA GCA GCT CCA GCT GCC GCA CCA GCA GCT GCA CCA
 GCT GCA GCG CCT GCT GCT GCT CCT GCA GCT GCG CCA GCA GCT GCT CCG GCA GCG GCA CCG
 GCT GCA GCA CCA GCC GCA GCC CCA GCA GCC GCT CCT GCT GCA GCT CCT GCG GCT GCA CCA
 GCG GCT GCC CCT GCG GCA GCA CCA GCA GCA GCG CCA GCG GCT GCA CCA GCT GCC GCA CCG
 GCA GCA GCT CCG GCA GCA GCA CCA GCA GCG GCA CCG GCA GCT GCG CCT GCC GCT GCG CCT
 GCG GCA GCC CCT GCC GCA GCT CCA GCA GCA GCA CCG GCA GCT GCT CCA GCG GCA GCT CCT
 GCA GCA GCC CCA GCC GCT GCG CCT GCC GCA GCG CCA GCA GCT GCG CCT GCA GCG GCT CCA
 GCC GCA GCA CCA GCG GCA GCT CCA GCT GCA GCC CCT GCT GCA GCG CCA GCA GCA GCA CCT
 GCG GCT GCC CCT GCA GCG GCT CCG GCT GCA GCG CCT GCG GCA GCA CCT GCA GCG GCA CCA
 GCA GCA GCC CCT GCG GCA GCG CCT GCT GCA GCC CCA GCT GCA GCC CCA GCA GCG GCA CCA -3'

Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Pro

P1A5(198)

5' - GCC GCA GCA GCA GCA CCG GCA GCT GCA GCA GCT CCA GCG GCA GCA GCT GCC CCT
 GCA GCC GCA GCT GCA CCA GCA GCA GCC GCA GCG CCT GCA GCA GCT GCC GCT CCG
 GCA GCA GCA GCC GCA CCA GCT GCC GCA GCA GCT CCT GCC GCA GCC GCA GCC CCA
 GCC GCA GCA GCG GCT CCA GCA GCA GCT GCA GCA CCA GCC GCT GCA GCC GCA CCG
 GCA GCT GCG GCA GCA CCA GCA GCG GCA GCA GCC CCA GCA GCT GCA GCA GCG CCT
 GCA GCC GCA GCA GCG CCA GCT GCA GCA GCG GCA CCG GCA GCG GCA GCG GCT CCG
 GCA GCA GCT GCA GCC CCT GCC GCA GCA GCT GCA CCT GCA GCA GCC GCA GCA CCG
 GCT GCC GCA GCG GCA CCA GCC GCA GCA GCT GCC CCA GCG GCA GCA GCA GCA CCA
 GCA GCT GCT GCA GCA CCA GCT GCA GCC GCA GCA CCA GCG GCT GCC GCA GCG CCA
 GCA GCG GCA GCG GCA CCA GCG GCA GCG GCA GCA CCG GCA GCA GCG GCA GCC CCT
 GCA GCC GCT GCA GCT CCT GCA GCA GCG GCA GCG CCA GCC GCA GCC GCA GCT CCT -3'

Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Pro

Abbildung A1: PAS-Genkassetten mit verminderter Repetitivität, hergestellt durch Gensynthese (Life Technologies, Darmstadt). Zwecks Übersichtlichkeit ist nur der DNA-Leitstrang mit Translation dargestellt.

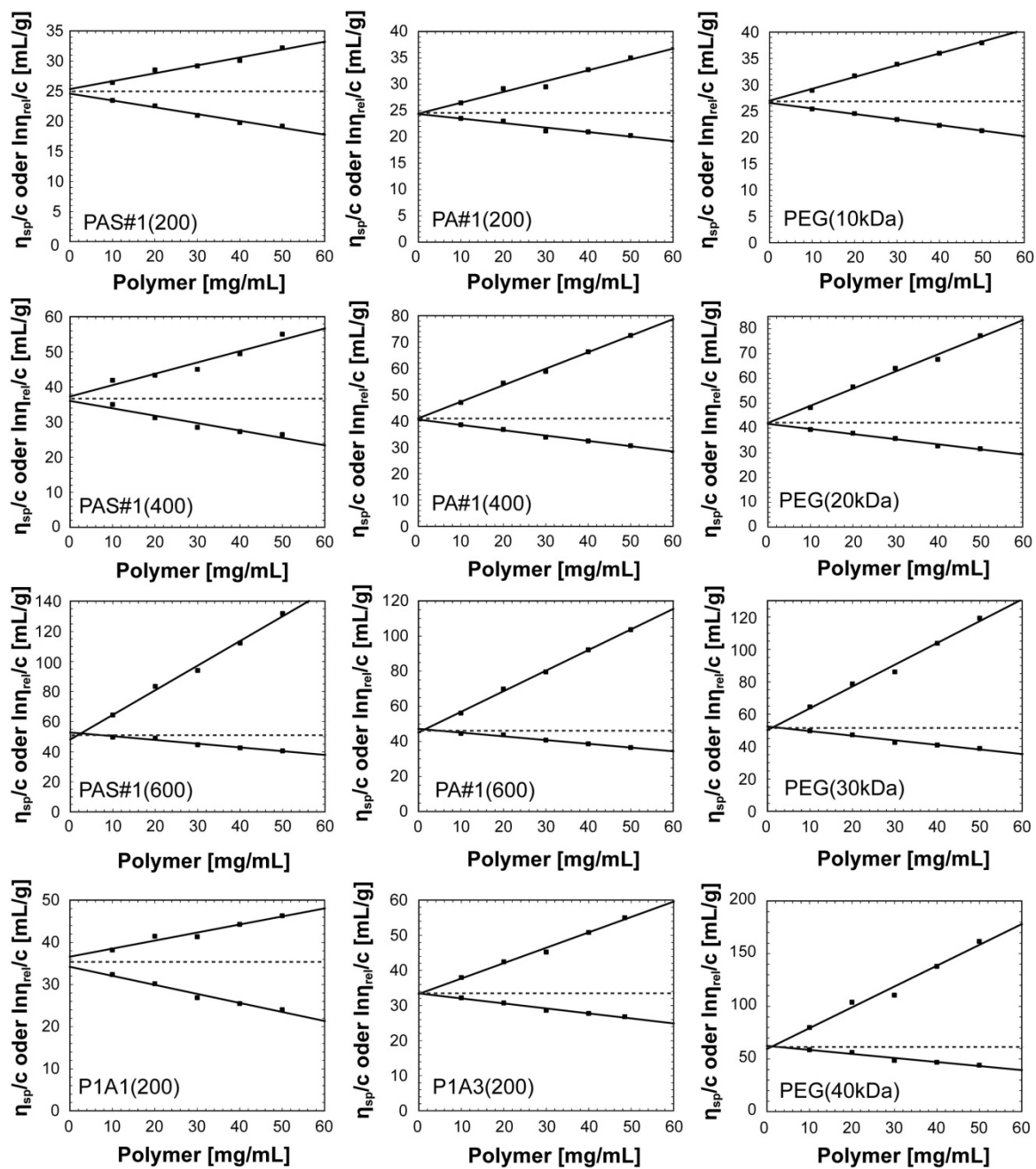


Abbildung A2: Auswertung der intrinsischen Viskositäten $[\eta]$ nach Huggins und Krämer. Zur linearisierten Auftragung wurden die Gleichungen 5 und 6 (siehe Abschnitt 2.6.2) verwendet. Die Achsenschnittpunkte sind durch gestrichelte Linien als Mittelwert aus beiden linearen Extrapolationen markiert.

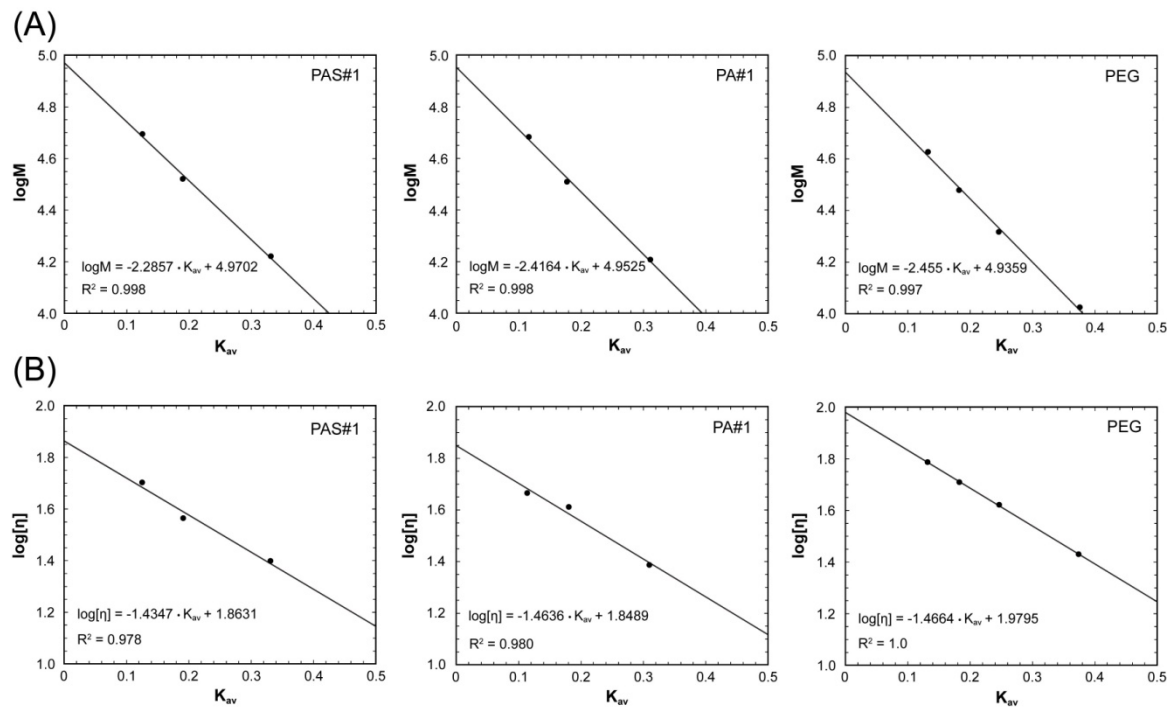


Abbildung A3: Bestimmung der Mark-Houwink-Parameter aus den SEC-Daten. Die Parameter a und K für die drei Polymerspezies PAS#1, PA#1 und PEG wurden aus Auftragungen des Molekulargewichts sowie der intrinsischen Viskositäten gegen den K_{AV} -Parameter evaluiert. **(A)** $\log M$ vs. K_{AV} analog zur SEC-Kalibrierung (lineare Regression durch Gleichung 2, siehe Abschnitt 2.6.1). **(B)** $\log[\eta]$ vs. K_{AV} zur Auswertung der Mark-Houwink-Parameter (lineare Regression durch Gleichung 10, siehe Abschnitt 2.6.2).