

Technische Universität München
TUM School of Life Sciences
Lehrstuhl für Biologische Chemie

**Anwendung konformationell ungeordneter rekombinanter
PAS-Aminosäurepolymere für die Stabilisierung
therapeutischer Proteine**

Dipl.-Biotechnol. Nadine Kuhn

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Prof. Dr. Michael Schemann

Prüfende der Dissertation:

1) Prof. Dr. Arne Skerra

2) Prof. Dr. Dieter Langosch

Die Dissertation wurde am 12.04.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Life Sciences am 13.07.2021 angenommen.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Arne Skerra für die spannende Themenstellung, seine exzellente Betreuung und sein stetes Interesse am Fortgang des Projekts. Zudem möchte ich mich für die ausgezeichnete Infrastruktur bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der XL-protein GmbH und insbesondere bei Uli Binder und Dr. Lars Friedrich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen für die tolle Arbeitsatmosphäre bedanken. Im Besonderen danke ich Dr. Joscha Breibeck, Simon Weiß, Dr. Claudia Mendler, Dr. Petra Kornberger, Andreas Reichert, Evelyn Eggenstein und Antonia Richter für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und gemeinsamen Unternehmungen. Meinen Dank möchte ich auch an Therese Wiedemann und Martina Dotzauer für die herzliche Unterstützung im Laboralltag bekunden.

Einen weiteren Dank gebührt Dr. Martin Schlapschy für seine experimentellen und wissenschaftlichen Diskussionen zu den PK-Studien.

Einen großen Dank möchte ich an meine Studenten Sebastian Doll, Monika Plescher, Tina Jost und Dr. Patricia Kammerer richten für deren wertvolle Beiträge zu dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei meinen zahlreichen Kooperationspartnern Prof. Gideon Schreiber und Dr. Daniel Harari vom Weizmann-Institut für Wissenschaften, Dr. Daniel Douek und Krystelle Nganou Makamdop der *National Institutes of Health*, Dr. Thomas Purkarthofer und Dr. Roland Weis von der VTU Technology GmbH sowie Herrn Dr. Christoph Schmidt vom Institut für Naturheilkunde und Klinische Pharmakologie bedanken ohne deren fachlichen und experimentellen Beiträge diese Arbeit sowie weitere Teilprojekte nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonders herzlich möchte ich meiner Familie, meinem Ehemann Sebastian Kuhn und meinen engsten Freunden danken, die mich während der Zeit meiner Doktorarbeit und darüber hinaus immer unterstützt haben. Meinen ausdrücklichen Dank möchte ich an Sebastian Kuhn und Dr. Joscha Breibeck richten für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Teile der vorliegenden Arbeit (sowie weitere Teilprojekte) wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

- 1) Harari, D., **Kuhn, N.**, Abramovich, R., Sasson, K., Zozulya, A.L., Smith, P., Schlapschy, M., Aharoni, R., Köster, 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. *J Biol Chem* 289, 29014-29029.
- 2) Harder, M.J., **Kuhn, N.**, Schrezenmeier, H., Höchsmann, B., von Zabern, I., Weinstock, C., Simmet, T., Ricklin, D., Lambris, J.D., Skerra, A., Anliker, M. & Schmidt, C.Q. (2017) Incomplete inhibition by eculizumab: mechanistic evidence for residual C5 activity during strong complement activation. *Blood* 129, 970-980.
- 3) **Kuhn, N.**, Schmidt, C.Q., Schlapschy, M. & Skerra, A. (2016) PASylated Coversin, a C5-specific complement inhibitor with extended pharmacokinetics, shows enhanced anti-hemolytic activity in vitro. *Bioconjug Chem* 27, 2359-2371.
- 4) Nganou-Makamdop, K., Billingsley, J.M., Yaffe, Z., O'Connor, G., Tharp, G.K., Ransier, A., Laboune, F., Matus-Nicodemos, R., Lerner, A., Gharu, L., Robertson, J.M., Ford, M.L., Schlapschy, M., **Kuhn, N.**, Lensch, A., Lifson, J., Nason, M., Skerra, A., Schreiber, G., Bosinger, S.E. & Douek, D.C. (2018) Type I IFN signaling blockade by a PASylated antagonist during chronic SIV infection suppresses specific inflammatory pathways but does not alter T cell activation or virus replication. *PLoS pathogens* 14, e1007246.

Poster:

- 1) **Kallweit, N.**, Schlapschy, M., Wachinger, K., Theobald, I., Binder, U., Harari, D., Schreiber, G. & Skerra, A. Design and characterization of PASylated IFN- α 2b and its superagonist 'YNS- α 8 tail' to achieve extended plasma half-life by PASylation[®]. International Symposium on Quantitative Biology & Cytokine Signaling, Engelberg, Schweiz, 22.–25. Januar 2012.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	1
1.1 Strategien zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit von Biotherapeutika	1
1.2 PEGylierung von Biotherapeutika	3
1.3 Alternative Kopplung von Therapeutika mit Biopolymeren	6
1.4 PASylierung von Therapeutika.....	8
1.5 Humane Interferon-Varianten als Kandidaten für die PASylierung.....	11
1.6 Der Komplementinhibitor OmCI als Kandidat für die PASylierung.....	16
1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Bakterienstämme, Gensynthesen und Plasmide	23
2.1.2 Oligodesoxynukleotide	25
2.1.3 Proteinreagenzien	27
2.1.4 Chemikalien.....	28
2.1.5 Standards und Kits.....	32
2.1.6 Geräte und Zubehör	33
2.1.7 Verbrauchsmaterial.....	38
2.1.8 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen	40
2.2 Molekularbiologische Methoden	47
2.2.1 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	47
2.2.2 Herstellung CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	48
2.2.3 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	48
2.2.4 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA	49
2.3 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA	49
2.3.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese	49
2.3.2 Präparative Gelelektrophorese.....	50
2.3.3 Denaturierende Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese	50
2.4 <i>In vitro</i> -Modifizierung von DNA.....	52
2.4.1 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen	52
2.4.2 Dephosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden	52

2.4.3	Ligierung von DNA-Fragmenten.....	53
2.4.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von Genen	53
2.4.5	Ortsgerichtete Mutagenese nach dem QuikChange-Verfahren	54
2.4.6	Sequenzierung doppelsträngiger DNA	55
2.5	Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	56
2.5.1	Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> -Kulturen im Schüttelkolben.....	56
2.5.2	Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> -Kulturen im Laborfermenter	59
2.6	Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in <i>Pichia pastoris</i>	62
2.7	Proteinchemische Methoden	62
2.7.1	Chromatographische Verfahren	62
2.7.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	70
2.7.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	71
2.8	Immunochemische Methoden	72
2.8.1	Bestimmung des Endotoxingehalts.....	72
2.8.2	Anti-virale und anti-proliferative Zell-Assays.....	73
2.8.3	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	73
2.8.4	<i>In vitro</i> Hämolyse-Assays.....	75
2.8.5	<i>Western Blotting</i>	77
2.9	Biophysikalische Methoden	78
2.9.1	Massenspektrometrie (ESI-MS).....	78
2.9.2	Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR)	79
2.9.3	Circulardichroismus (CD) Spektroskopie.....	83
2.9.5	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	84
2.10	<i>In vivo</i> -Experimente	85
2.10.1	Lumineszenz-Studien mit PASyliertem YNS α 8 in HyBNAR/Luc-Mäusen	85
2.10.2	(EAE)-Studien mit PASyliertem YNS α 8 in HyBNAR-Mäusen	85
2.10.3	Pharmakokinetische Studie von PASyliertem IFN-1ant in Rhesusaffen.....	85
2.10.4	Pharmakokinetische Studie von PASyliertem OmCI in Mäusen	85
2.10.5	Computerprogramme und Datenbanken	87
4	Ergebnisse.....	89

4.1	PASylierter Interferon- α 2b Superagonist zur Behandlung von MS	89
4.1.1	Gentechnische Herstellung und Reinigung	89
4.1.2	Biophysikalische und funktionelle Charakterisierung.....	100
4.1.3	Pharmakokinetische und -dynamische Charakterisierung.....	106
4.2	PASylierter Interferon- α 2b Antagonist zur Behandlung von AIDS.....	108
4.2.1	Gentechnische Herstellung und Reinigung	108
4.2.2	Biophysikalische und funktionelle Charakterisierung.....	125
4.2.3	Pharmakokinetische Charakterisierung	132
4.3	PASyliertes OmCI zur Behandlung von PNH.....	133
4.3.1	Gentechnische Herstellung in <i>P. pastoris</i> und Reinigung.....	134
4.3.2	Gentechnische Herstellung in <i>E. coli</i> und Reinigung.....	150
4.3.3	Biophysikalische und funktionelle Charakterisierung.....	164
4.3.4	Pharmakokinetische Charakterisierung	171
6	Diskussion.....	175
6.1	Präparation PASylierter Proteine.....	175
6.1.1	Übersicht.....	175
6.1.2	Expressionsstrategien für PASylierte Proteine.....	177
6.1.3	Reinigung.....	185
6.3	Biophysikalische Eigenschaften PASylierter Proteine	189
6.3.1	Sekundärstruktur und hydrophile Eigenschaften.....	189
6.3.2	Hydrodynamisches Volumen	190
6.3.3	Affinität und Funktionalität	195
6.4	<i>In vivo</i> -Charakterisierung.....	199
6.4.1	Pharmakokinetik in Tiermodellen	199
6.4.2	Wirksamkeit in präklinischen Krankheitsmodellen	203
6.4.3	Immunogenität.....	207
7	Zusammenfassung.....	211
8	Abkürzungsverzeichnis	213
9	Literaturverzeichnis.....	215

1 Einleitung

1.1 Strategien zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit von Biotherapeutika

Der überwiegende Teil der zugelassenen therapeutischen Proteine sind kleine Proteine oder Peptide, die eine kurze Plasma-Halbwertszeit von nur wenigen Stunden im Menschen besitzen. Dazu zählen unter anderem das Epoetin (EPO), der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF), das Wachstumshormon (GH) sowie verschiedene Interferone (IFNs) (Tang *et al.*, 2004). Ein Vorteil kleiner Proteine ist einerseits deren gute Gewebepenetration, andererseits werden sie aber sehr schnell aus dem Blutstrom entfernt, was die volle Entfaltung des pharmakologischen Potentials verhindert (Binder & Skerra, 2015). Das macht häufige Injektionen erforderlich, was wiederum die Wahrscheinlichkeit immunologischer Reaktionen und die Behandlungskosten erhöht (Dozier & Distefano, 2015).

Die Eliminierung von Proteinen aus dem Blutplasma erfolgt auf unterschiedlichen Wegen: a) durch Proteolyse, b) durch die Aufnahme in Leberzellen, c) durch den Abbau infolge einer Immunreaktion oder d) durch die Ausscheidung über die Niere (Caliceti & Veronese, 2003). Im letzteren Fall erfolgt die Ausscheidung kleiner Proteine (10–30 kDa) zum größten Teil durch Filtration durch die 3,5–4 nm (35–40 Å) großen Poren in der glomerulären Basalmembran, wobei diese in den Primärharn gelangen, gefolgt von verschiedenen Resorptions- und Abbauprozessen in den proximalen Tubuluszellen (Haraldsson *et al.*, 2008). Neben dem hydrodynamischen Volumen von Proteinen hat auch deren elektrische Nettoladung einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz der Nierenfiltration. Die glomeruläre Basalmembran besitzt aufgrund von anionischen Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix eine negative Gesamtladung. Durch elektrische Abstoßung ist die Filtration durch die Nierenporen somit für große, saure (d.h. negativ geladene) Proteine wie beispielsweise das humane Serumalbumin (HSA; $d=90$ Å, $pI=5$) besonders langsam (Binder & Skerra, 2012).

Unter den konventionellen Biopharmazeutika ist nur die Klasse der humanen bzw. humanisierten monoklonalen Antikörper (MAbs), nicht von einer kurzen Plasma-Halbwertszeit betroffen. Sie weisen im Menschen mit ein bis zwei Wochen eine sehr lange Zirkulationsdauer auf, die zum einen durch deren Größe von ca. 150 kDa (also oberhalb der Nierenfiltrationsgrenze) und zum anderen durch das endosomale *Recycling* über den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) beruht (Tabrizi *et al.*, 2006). Der FcRn ist auf verschiedenen Zelltypen zu finden, hauptsächlich auf vaskulären Endothelzellen, hämatopoetischen Zellen, Podozyten und Leberzellen (Kuo & Aveson, 2011; Roopenian & Akilesh, 2007). Dort schützt er nicht nur Immunglobuline, sondern auch das am häufigsten vorkommende Plasmaprotein HSA vor vorzeitigem Katabolismus (Rath *et al.*, 2015). Folglich kann die Fusion eines therapeutischen Proteins oder Peptids mit einer Fc-Domäne oder mit HSA eine Verlängerung

2 Einleitung

der Plasma-Halbwertszeit bewirken, weil der Wirkstoff nach Aufnahme durch die Endothelzellen unter sauren Bedingungen mit dem FcRn interagieren kann und durch Exozytose wieder an die Zelloberfläche zurückgegeben wird. Andere Plasmaproteine werden hingegen in den Lysosomen abgebaut (Ober *et al.*, 2004).

Zusammenfassend betrachtet gibt es zwei Ansatzpunkte, um die Plasma-Halbwertszeit von kleinen Proteinen und Peptiden zu verlängern:

- 1) Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens über die Größe der Nierenporen hinaus, was die renale Filtration aufgrund eines physikalischen Effekts verlangsamt, oder
- 2) Fusion mit einem Liganden des FcRn (Fc-Domäne oder HSA), um unter Nutzen eines biologischen Effekts endosomales *Recycling* zu bewirken.

Tabelle 1: Strategien zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit. Die derzeit verfügbaren Technologien zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit lassen sich nach ihrem Effekt einteilen in physikalische Strategien (durch Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens jenseits der Nierenporengröße, *links*) und biologische Strategien (durch Einführung einer Bindungsaktivität gegenüber dem FcRn, *rechts*) (Binder & Skerra, 2015).

Physikalischer Effekt	Biologischer Effekt
<p>Chemische Kopplung mit synthetischen Polymeren:</p> <ul style="list-style-type: none"> • PEGylation • GlycoPEGylation • TransCon PEG • ReCODE™ PEGylation • TheraPEG™/PolyPEG™ • PolyXen® • HEPTune™ • Fleximer® • Polyglutamat • HESylation® <p>Genetische Fusion mit PEG-ähnlichen Polypeptiden:</p> <ul style="list-style-type: none"> • XTEN® • PASylation® <p>Erweiterte Glycosylierung:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hyperglycosylation • CTP fusion • GlycoPolymer • NexP™ • Hydroxyprolin-reiche Sequenzen 	<p>Fc-Fusionsproteine:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dimere Fc-Fusion • Monomere Fc-Fusion • Peptibody • MIMETIBODY™ • hyFc • LAPSCOVERY™ • YTE Technology • NHance™ • Xtend™ <p>Albumin-Konjugate:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Veltis® • PC-DAC™ • AlbuDAb™ • Albumod™ • Fettsäuren • Albutag

Es gibt eine Reihe von Technologien, die diese Effekte zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit nutzen (Tabelle 1). Der primär physikalische Effekt der Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens wird in Biotherapeutika a) durch chemische Konjugation mit synthetischen Polymeren, b) durch genetische Fusion mit ungeordneten Polypeptiden oder

c) durch Glycosylierung erzielt. Der biologische Effekt der FcRn-Bindung wird durch Fusion mit den genannten Liganden erreicht und beinhaltet damit auch eine Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens. Darüber hinaus gibt es auch Verfahren der indirekten Albuminassoziaton, z.B. mittels Fettsäuren oder Peptiden (Binder & Skerra, 2015).

Zu den erfolgreich entwickelten Wirkstoffen, die den beschriebenen Effekt des endosomalen Recyclings nutzen, zählen beispielsweise Enbrel[®] (Etanercept; Amgen; Kerensky *et al.*, 2012), ein Fc-Fusionsprotein mit dem Rezeptor für den Tumor-Nekrose-Faktor (TNFR), und Eperzan[®] [EU]/Tanzeum[™] [US] (Albiglutide; GlaxoSmithKline; Poole & Nowlan, 2014), ein Fusionsprotein aus Albumin und einem Rezeptoragonisten für das Glucagon-ähnliche Peptid 1 (GLP-1). Allerdings sind Fc- und Albuminfusionsproteine sehr komplexe Proteine mit zahlreichen Disulfidbrücken und Glycosylierungsstellen, die eine aufwendige Produktion in Zellkulturen erfordern und aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Reaktionen (z.B. die Effektorfunktionen der Fc-Region) unerwünschte Nebenwirkungen auslösen können. Ein weiterer Nachteil von HSA ist in Folge seiner großen molekularen Komplexität die geringe Löslichkeit des rekombinanten Proteins, was zu Aggregaten führen kann, die eine ungewollte Immunantwort auslösen können.

Um die genannten Nachteile der aufwendigen Produktion und unerwünschten Nebenwirkungen der biologischen Strategie zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit zu umgehen, werden die physikalischen Strategien intensiv erforscht und weiterentwickelt. Die bisher erfolgreichste Strategie zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit stellt die chemische Konjugation mit dem synthetischen Polymer Polyethylenglycol (PEG) (Abschnitt 1.2) dar. Eine vielversprechende Alternative bietet dagegen die genetische Fusion mit rekombinanten Biopolymeren (Abschnitt 1.3).

1.2 PEGylierung von Biotherapeutika

Die derzeit meistverwendete Methode zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit von Proteinen ist die chemische Kopplung des synthetischen Polymers PEG mit dem Biotherapeutikum, um dessen hydrodynamisches Volumen zu vergrößern (Markovsky *et al.*, 2012; Zündorf & Dingermann, 2014). Das Konzept der PEGylierung wurde zum ersten Mal von Davies und Abuchowsky im Zusammenhang mit der Modifizierung von bovinem Albumin (Abuchowski *et al.*, 1977b) und boviner Catalase (Abuchowski *et al.*, 1977a) beschrieben, anfänglich mit dem Ziel der Deimmunisierung der rekombinanten Proteine ohne gravierende Aktivitätsverluste zu bewirken. Als weiterer Effekt der PEGylierung wurde eine verlängerte Plasma-Halbwertszeit der modifizierten Proteine festgestellt. Seitdem wurde die PEGylierung intensiv untersucht und weiterentwickelt (Zündorf & Dingermann, 2014).

Das PEG-Polymer ist chemisch inert, ungeladen und dennoch sehr gut wasserlöslich. Es nimmt in wässriger Lösung eine ungeordnete Struktur an, wobei jede PEG-Einheit über ihren polaren Ethersauerstoff als Wasserstoffbrückenakzeptor mit zwei Wassermolekülen

4 Einleitung

interagieren kann. Dadurch wird das hydrodynamische molekulare Volumen des Biotherapeutikums, im Vergleich zu einem globulären Protein mit einer ähnlichen Molekülmasse, um den Faktor 5–10 vergrößert und dementsprechend die Ausscheidung über die Niere verringert (Kolate *et al.*, 2014; Binder & Skerra, 2015). Darüber hinaus schützt das PEG-Polymer samt seiner Hydrathülle das konjugierte Biotherapeutikum vor enzymatischem Abbau und vor unspezifischen Interaktionen mit Antikörpern, welche ungünstige immunologische Effekte hervorrufen könnten (Zündorf & Dingermann, 2014).

Die Aminogruppe stellt in Proteinen die häufigste funktionelle Gruppe dar; sie ist meist dem hydrophilen Lösungsmittel exponiert und kann mit unterschiedlichen chemischen Reagenzien modifiziert werden (Veronese & Pasut, 2005). Daher wurden PEG-Polymerketten zunächst ungerichtet über Carbonsäureamid-Bindungen an Lysin-Seitenketten oder den N-Terminus des Biotherapeutikums gekoppelt. Durch die statistische Kopplung können allerdings wichtige funktionelle Bindungsstellen des Proteins maskiert werden, was zu Aktivitätsverlusten führen kann. Zudem führt die ungerichtete PEGylierung zu Gemischen aus PEG-Isomeren einschließlich mehrfach PEGylierter Spezies mit unterschiedlichen molekularen Massen, was die reproduzierbare Herstellung des Wirkstoffs sowie dessen Beurteilung hinsichtlich Immunogenität und klinischer Wirksamkeit schwierig macht. Als weitere Nachteile wurden Diolverunreinigungen, instabile Bindungen und die Beschränkung auf die Verwendung von ausschließlich kurzen PEG-Ketten (5–10 kDa) beschrieben (Veronese & Pasut, 2005). Trotzdem wurden PEG-Isomergemische wie PEG-Asparaginase (Oncaspar[®]; Graham, 2003) und PEG-Adenosindeaminase (Adagen[®]; Levy *et al.*, 1988) als PEGylierte Therapeutika der ersten Generation durch die FDA zugelassen.

In PEGylierten Therapeutika der zweiten Generation wurden entscheidende Verbesserungen der Technologie vorgenommen und PEG-Ketten größerer Molekülmasse verwendet, um die pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften des PEGylierten Biotherapeutikums zu verbessern (Zündorf & Dingermann, 2014). Durch eine Vielzahl an chemischen und enzymatischen Methoden ist ebenfalls eine gerichtete Konjugation an Thiol-, Hydroxyl- oder Amidgruppen ermöglicht (Veronese & Pasut, 2005; Zündorf & Dingermann, 2014). Die PEGylierung freier Cystein-Reste mit thiolreaktiven chemischen Gruppen wie Iodacetamid oder Maleimid, durch Alkylierung bzw. Michael-Addition im basischen Milieu, ist hierbei die spezifischste Methode, weil Cystein relativ selten in Proteinen bzw. Peptiden vorkommt. Allerdings sind natürliche Cystein-Reste oft auch an strukturellen Disulfidbrücken beteiligt und liegen aufgrund ihrer Hydrophobie häufig im Inneren des Proteins, wodurch sie für chemische Kopplungen nicht zur Verfügung stehen. Der zugelassene Wirkstoff Cimzia[®] (Fab-Fragment gegen Tumor-Nekrose-Faktor α , TNF α ; Blick & Curran, 2007) ist ein Beispiel für ein Biotherapeutikum, in das durch *Protein-Engineering* ein zusätzlicher freier Cystein-Rest eingeführt wurde, der zur chemischen Kopplung mit einer verzweigten 40 kDa PEG-Kette diente.

Des Weiteren können zur spezifischen PEG-Kopplung auch Enzyme wie beispielsweise die Transglutaminase oder die Sialyltransferase eingesetzt werden. Die Transglutaminase katalysiert die Kopplung zwischen Amino-PEG und Glutamin-Resten (Sato, 2002) und die Sialyltransferase die Kopplung von Sialyl-PEG mit Serin- bzw. Threonin-Resten, die zuvor mit N-Acetylgalactosamin modifiziert wurden (DeFrees *et al.*, 2006). Zudem ist es möglich, maßgeschneiderte und spaltbare PEG-Linker zu verwenden, durch die die PEG-Kette abhängig vom chemischen Milieu wieder vom Biotherapeutikum abgespalten werden kann (Filpula & Zhao, 2008).

Es gibt derzeit über fünfzehn PEGylierte Moleküle für unterschiedliche Indikationsgebiete auf dem Markt (Santos *et al.*, 2018; Ramos-de-la-Peña & Aguilar, 2019). Die Hälfte davon sind sogenannte *Biobetters*, d.h. Weiterentwicklungen bereits zugelassener Biopharmazeutika. Prinzipiell wurden dabei drei unterschiedliche Kopplungsstrategien verfolgt: (a) Konjugation mit mehreren kurzen PEG-Ketten mit 5–10 kDa Molekülmasse (Krystexxa[®], Adagen[®], Oncaspar[®], Somavert[®]), (b) Konjugation mit einer einzelnen langen PEG-Kette mit 12–30 kDa Molekülmasse (Neulasta[®], PLEGRIDY[®], PEG-Intron[®], Mircera[®]) und (c) Konjugation mit verzweigten PEG-Derivaten mit ca. 40 kDa Molekülmasse (PEGASYS[®], Cimzia[®], Omontys[®], Macugen[®]). Verzweigtes PEG besitzt im Vergleich zum linearen PEG den Vorteil einer niedrigeren Viskosität bei teilweise längerer Plasma-Halbwertszeit, aber den Nachteil der teureren Herstellung (Binder & Skerra, 2015). Viele weitere Kandidaten PEGylierter Biotherapeutika befinden sich in der klinischen Entwicklung, wie beispielsweise eine PEGylierte rekombinante humane Hyaluronidase PH-20 (PEGPH20; Holozyme Therapeutics; Infante *et al.*, 2018) eine PEGylierte hGH-Variante (ACP001; Ascendis Pharma; Chatelain *et al.*, 2017) sowie ein PEGyliertes Interferon- β (TRK-560; Toray Industries; Tsuge *et al.*, 2017).

Aufgrund der unterschiedlichen Kopplungsstrategien und PEG-Varianten stellt die PEGylierung insgesamt eine vielseitige und skalierbare Technologie, wenn auch technisch anspruchsvoll, zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit dar.

Trotz der zahlreichen Vorteile der PEGylierung weist diese Technologie auch entscheidende Nachteile auf:

- 1) Zusätzlicher Prozessschritt in der Herstellung: Die kovalente Kopplung von PEG-Derivaten an das Biotherapeutikum erfordert weitere Arbeitsschritte im Herstellungsprozess, die die Ausbeute verringern und die Kosten erhöhen (Ramos-de-la-Peña & Aguilar, 2019).
- 2) Inhomogenität: PEG-Reagenzien werden durch Polymerisation von Ethylenoxid hergestellt. Die Länge der erzeugten Polymerkette ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie beispielsweise der Konzentration an Ethylenoxid oder der Reaktionszeit. Die so erzeugten PEG-Polymere bestehen aus einem komplexen Gemisch. Die Herstellung von GMP-konformen PEG-Derivaten definierter Länge ist teuer, und es verbleibt immer eine

Inhomogenität in der Kettenlänge (Bagal *et al.*, 2008). Dies erschwert zusätzlich die Reinigung und Analytik des Kopplungsprodukts. Die Varianten im Endprodukt führen zu unterschiedlichen Plasma-Halbwertszeiten und damit heterogener Wirksamkeit (Kling, 2013).

3) Verringerte biologische Aktivität: Bei verschiedenen Cytokinen (Grace *et al.*, 2001; Baker *et al.*, 2006), Hormonen (Cho *et al.*, 2011; Elinav *et al.*, 2009) und anderen bindenden Proteinen (Fabs oder alternativen *Scaffolds*-, Schlapschy *et al.*, 2013; Fishburn, 2008) wurde nach PEGylierung Verlust oder Verringerung der biologischen Aktivität beobachtet. Beispielsweise besitzt das PEGylierte Interferon PEGASYS[®] nur noch eine antivirale Aktivität von 7 % (Bailon *et al.*, 2001). Dieser Effekt wird allerdings durch die verlängerte biologische Verfügbarkeit (vergrößerte Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve; AUC) kompensiert (Binder & Skerra, 2015).

4) Immunogenität: PEGylierte Proteine können als Antigene wirken und damit eine Immunantwort auslösen. So wurden bei mit PEGylierten Proteinen behandelten Patienten Anti-PEG-Antikörper nachgewiesen, beispielsweise nach der Behandlung mit Krystexxa[®] (EMA, 2013) oder Oncaspar[®] (Armstrong *et al.*, 2007). Darüber hinaus wurden Anti-PEG-Antikörper auch im Blut gesunder Blutspender gefunden. Diese Antikörper sind bei 20–25 % der Spender nachweisbar und resultieren vermutlich unspezifisch aus dem regelmäßigen Kontakt mit PEG aus verschiedenen Quellen wie z.B. Kosmetika, verarbeiteten Lebensmitteln oder PEGylierten Biotherapeutika (Garay *et al.*, 2012). Hauptursache für eine Immunreaktion ist die terminale Methoxy-Gruppe, die in allen konventionellen PEG-Polymeren vorkommt. Als Abhilfe wurde daher Hydroxy-PEG entwickelt, was die Immunogenität PEGylierter Biotherapeutika verringern soll (Saifer *et al.*, 2014).

5) Akkumulation im Organismus: PEG kann im menschlichen Körper nicht abgebaut werden und wird je nach Anwendung nicht vollständig ausgeschieden. Eine Akkumulation von PEG wurde in der Leber, der Niere (Bendele *et al.*, 1998), in Makrophagen (Young *et al.*, 2007) und in den Ependymzellen der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen (EMA, 2010; EMA, 2012). Die möglichen langfristigen physiologischen Effekte dieser Akkumulation sind noch nicht untersucht.

1.3 Alternative Kopplung von Therapeutika mit Biopolymeren

Um die genannten Nachteile der PEGylierung zu umgehen und gleichzeitig deren Vorteile zu erhalten, darunter die Ladungsneutralität, gute Löslichkeit, freie Positionierung und Skalierbarkeit der Polymerlänge, sowie die Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens im Konjugat, wurde nach Alternativen zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit gesucht. Eine Kombination der Vorteile ungeordneter Polymere aus modularen Bausteinen mit der Biokompatibilität und einfachen Herstellung durch genetische Fusion legte dabei die Verwendung von (Poly)-Peptidketten nahe. Zwei grundsätzlich unterschiedliche Technologien wurden für solche PEG-Mimetika entwickelt: Die XTEN[®]-Technologie, die

durch Fusion mit einem negativ geladenen Biopolymer charakterisiert ist (Schellenberger *et al.*, 2009) und die PASylierung (PASylation[®]) (Schlapschy *et al.*, 2013), die als Weiterentwicklung aus der HAPylierung (Schlapschy *et al.*, 2007) hervorgegangen ist und sich durch Fusion mit einem ungeladenen Biopolymer auszeichnet. Beide Technologien imitieren den volumenvergrößernden Effekt von PEG, bieten allerdings den Vorteil einer konstanten Produktqualität des genetisch kodierten Fusionsproteins sowie einer ortsspezifischen Modifikation. Zudem ermöglicht der Einsatz unterschiedlicher Biopolymerlängen – wie bei der PEGylierung – eine maßgeschneiderte Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit.

Das XTEN-Biopolymer, entwickelt durch die Firma Amunix, besteht aus sechs unterschiedlichen Aminosäuren: Pro, Glu, Ser, Thr, Ala und Gly. Diese führen in einer nicht-repetitiven Anordnung zu einem unstrukturierten, geladenen und hydrophilen Biopolymer mit verschiedenen Längenvarianten (z.B. 144, 288, 432, 576, 864 oder 912 Aminosäuren) (Podust *et al.*, 2016). Die optimale Sequenz wurde durch einen extensiven Screeningprozeß auf besonders lösliche, chemisch stabile und unstrukturierte Polypeptide, die einen maximalen hydrodynamischen Radius erzeugten, gefunden. Hydrophobe Aminosäuren, die zu Aggregation oder zu einer HLA/MHC-II-vermittelten Immunantwort führen können, wurden dabei ausgeschlossen. Des weiteren wurde die Aminosäure Cystein, die intramolekulare und intermolekulare Disulfidbrücken bilden kann, vermieden, genauso wie positive Aminosäuren (His, Lys und Arg), die mit der negativ geladenen Zellmembran interagieren können und amidhaltige Aminosäuren (Asn, Gln), die zur Deamidierung Anlaß geben können. Nach einem ersten Screening der XTEN-Genbibliothek wurden gut exprimierbare Sequenzen iterativ ligiert und einem weiteren Screening unterzogen. Die finale XTEN-Sequenz wurde nach folgenden Kriterien ausgewählt: genetische Stabilität, Löslichkeit, Hitzestabilität, Aggregationsverhalten und Kontaminationsprofil mit Wirtszellproteinen, DNA und Lipopolysaccharid. Es resultierte eine XTEN-Sequenz, die einen wesentlichen Anteil an Glutamat-Resten enthält und dementsprechend negative Nettoladung aufweist, was zur drastischen Verringerung des pI-Werts bei Fusionsproteinen führt (beispielweise von pI=5,2 auf pI=3 beim Entwicklungskandidaten *long-acting* hGH (VRS-317; Binder & Skerra, 2012; Cleland *et al.*, 2012).

Durch die negative Nettoladung hat das XTEN-Biopolymer neben seinem volumenvergrößernden Effekt den Vorteil einer zusätzlichen Abstoßung des Fusionsproteins von der ebenfalls negativ geladenen glomerulären Basalmembran der Niere (Schellenberger *et al.*, 2009), was zusätzlich die Plasma-Halbwertszeit verlängert. Andererseits ist auch die Glykocalyx von Endothelzellen negativ geladen, was wiederum die Gewebepenetration des XTEN-Fusionsproteins verschlechtert. Außerdem werden Rezeptormoleküle, die häufigsten Zielproteine von Biotherapeutika, auf negativ geladenen Zelloberflächen präsentiert, was die Bindung des gleichartig geladenen XTEN-Fusionsproteins und damit seine Wirksamkeit

durch elektrostatische Abstoßung verringern kann (Markovsky *et al.*, 2012). Als Beispiel sei hier das hGH-XTEN-Fusionsprotein genannt, das um den Faktor 12 verringerte Bindungsaffinität (EC_{50} -Wert in einem zellbasierten *In vitro*-Bindungsassay) im Vergleich zum unfusionierten hGH zeigte (Cleland *et al.*, 2012).

Das erste XTEN-Fusionsprotein bestand aus Exendin-4 und einem 864 Aminosäuren langen XTEN-Biopolymer, das im Vergleich zum unfusionierten Peptid eine 65-fach verlängerte Plasma-Halbwertszeit in Ratten und sogar eine 125-fach verlängerte Plasma-Halbwertszeit in Affen zeigte (Schellenberger *et al.*, 2009). Inzwischen wurde eine Reihe weiterer Biotherapeutika und Peptide mit dem XTEN-Biopolymer fusioniert, wie beispielsweise Glucagon (Geething *et al.*, 2010), das Glucagon-ähnliche Peptid 2 (Alters *et al.*, 2012), das antivirale Peptid T20 (Ding *et al.*, 2014) und Annexin A5 (Haeckel *et al.*, 2014). Das antivirale Peptid T20 und das Glucagon-ähnliche Peptid 2 stellen darüber hinaus Beispiele für eine chemische Kopplung von XTEN-Biopolymeren an Peptide dar. Nach Abbruch der Phase 3-Studie von hGH-XTEN hat man von dieser Technologie in den letzten Jahren allerdings nichts mehr gehört.

1.4 PASylierung von Therapeutika

Als weitere Technologie zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit von Proteinen wurde die HAPylierung (HAP: *Homo Amino Acid Polymer*) entwickelt, die ein ungeladenes Polypeptid aus einer repetitiven Abfolge des Aminosäuremotifs $(Gly_4Ser)_n$ verwendet (Schlapschy *et al.*, 2007). Diese Art konformationell hochflexibler Peptid-Oligomere wurde bereits zur Verknüpfung separater Domänen in rekombinanten Fusionsproteinen verwendet, beispielsweise in Form eines $(Gly_4Ser)_3$ -*Spacers* zur Herstellung von *Single Chain Fv* Fragmenten, welche auch Eingang in klinische Studien fanden (Holliger & Hudson, 2005; Nagorsen *et al.*, 2009). Verwandte Sequenzen treten in natürlichen humanen Proteinen auf, wie z. B. im Zinkfinger-DNA-Bindungsprotein 99 und in der mitogen-aktivierenden Proteinkinase 4. Glycin wurde als Hauptbestandteil des Biopolymers gewählt, da es aufgrund seiner fehlenden Seitenkette die flexibelste aller Aminosäuren ist (Schulz & Schirmer, 1979; Creighton, 1992). Es war davon auszugehen, dass Homoglycin-Polymere aufgrund ihrer großen inneren Lösungsentropie und ihrer geringen Tendenz zur Ausbildung intermolekularer Wechselwirkungen unter physiologischen Bedingungen eine ungeordnete Sekundärstruktur (*Random Coil*) annehmen (Shental-Bechor *et al.*, 2005); chemisch gesehen sind sie zudem dem PEG relativ ähnlich.

Allerdings gab es praktische Probleme mit solchen Homoglycin-Polymeren, die von deren Herstellung durch rekombinante DNA-Technologie herrühren: Erstens wird Gly durch die vier Codons GGC, GGT, GGG und GGA kodiert, was in einem Gen für ein ausschließlich aus Glycin bestehendes Polypeptid zu einem extrem hohen GC-Gehalt führt und damit dessen Klonierung und Sequenzierung erschwert. Dabei sind zudem die seltenen Glycin-Codons

GGG und GGA ungünstig, da sie wegen der geringen Häufigkeit der zugehörigen Glycyl-tRNAs zu einer schlechten Translationseffizienz führen (Chen & Texada, 2006). Deshalb wurde Glycin in der HAP-Sequenz zu 20 % durch die polare Aminosäure Serin ersetzt, d.h. (Gly4Ser)_n, welche in der Seitenkette eine solvatisierende Alkoholgruppe trägt und damit zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen mit den Lösungsmittel ausbilden kann (Schlapschy *et al.*, 2007).

Als Modellprotein zur Anwendung der HAPylierung wurde das anti-HER2-Fab-Fragment 4D5-8 verwendet, mit dessen leichter Kette ein HAP-Polymer mit 100 Aminosäuren bzw. 200 Aminosäuren fusioniert wurde. Beide HAPylierten Fab-Fragmente zeigten im Vergleich zum nicht-modifizierten Fab-Fragment ununterscheidbare Bindungsaktivität gegenüber dem HER2-Antigen. Das HAP(200)-Fusionsprotein zeigte ein um den Faktor 2 vergrößertes hydrodynamisches Volumen (bestimmt durch Größenausschlußchromatographie, SEC), sowie nach intravenöser (*i.v.*) Injektion in BALB/c Mäusen eine um den Faktor 3 verlängerte terminale Plasma-Halbwertszeit im Vergleich zum nicht-fusionierten Fab-Fragment. Für das HAP(100)-Fusionsprotein war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt.

Für beide Polymerlängen HAP(100) bzw. HAP(200) konnte mittels CD-Spektroskopie gezeigt werden, dass sie unter physiologischen Bedingungen eine unstrukturierte *Random-Coil*-Konformation annehmen. Die erzielte Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit war allerdings relativ niedrig und daher nur für spezialisierte Anwendungen wie die medizinische Bildgebung (*In vivo Imaging*) interessant (Schlapschy *et al.*, 2007).

Trotz eines Anteils von 20 % Serin-Resten in der HAP-Sequenz wurde beim HAP(200)-Fusionsprotein eine ausgeprägte Tendenz zur Aggregation festgestellt, die in geringerem Maße auch beim HAP(100)-Fusionsprotein beobachtet wurde. Offensichtlich war also der Anteil an Ser-Resten in der HAP-Sequenz noch nicht ausreichend, um die Tendenz zur Aggregation, die früher schon bei chemisch synthetisierten reinen Glycin-Polymeren beschrieben worden war, aufzuheben (Bamford *et al.*, 1956). Aufgrund seiner fehlenden Seitenkette war außerdem davon auszugehen, dass Glycin bei gehäuftem Auftreten in einer Polymersequenz einen verdichtenden Effekt auf die *Random-Coil*-Struktur hat (Schlapschy *et al.*, 2007; Binder & Skerra, 2012).

Anhand dieser Erfahrungen wurde daher die PASylation-Technologie entwickelt, mit dem Ziel, die Löslichkeit des Polypeptids zu erhöhen und noch längere Biopolymersequenzen zu realisieren. Beim Design der verbesserten Sequenz aus Pro-, Ala- und Ser-Resten (PAS) wurde aus den oben genannten Gründen vollständig auf die Aminosäure Gly verzichtet, ebenso wie auf Aminosäuren mit hydrophoben oder geladenen Seitenketten. Unter den hydrophilen Aminosäuren wurden Asn und Gln mit ihren Carboxamidseitenketten wegen der bekannten Tendenz zur Aggregation und ihrer Rolle in bestimmten Proteinfehlfaltungserkrankungen ausgeschlossen. Die Aminosäuren Thr und His wurden

aufgrund ihrer Neigung zur Ausbildung von β -Faltblattstrukturen beziehungsweise wegen ihrer Basizität und Metallbindungskapazität ebenfalls nicht berücksichtigt. Durch diese Eingrenzung standen nur noch die drei kleinen, ausreichend polaren Aminosäuren Pro, Ala und Ser (PAS) für das Design der neuen Sequenz zur Verfügung (Schlupschy *et al.*, 2013).

Es ist bekannt, dass Homopolymere dieser einzelnen Aminosäuren stabile Sekundärstrukturen bilden: die α -Helix bei Poly-*L*-Ala (Shental-Bechor *et al.*, 2005), das β -Faltblatt für Poly-*L*-Ser (Quadrifoglio & Urry, 1968) und die Polyprolin II-Helix für Poly-*L*-Pro (Stapley & Creamer, 1999). Die zugrundeliegende Hypothese war jedoch, dass durch eine nicht-repetitive Abfolge dieser drei Aminosäuren die Tendenz zur Ausbildung ihrer individuell präferierten Sekundärstrukturen unterbunden werden könnte. Außerdem bietet die Iminosäure Prolin durch die Tendenz zur N-terminalen *cis/trans*-Isomerisierung einen zusätzlichen Freiheitsgrad in der Konformation des Polymerrückgrats und erhöht so dessen innere Entropie. Des Weiteren wurden die drei Aminosäuren möglichst unregelmäßig angeordnet, um kurze Wiederholungen aus 2–4 Aminosäuren, wie sie in Sekundärstrukturen auftreten, zu vermeiden (Binder & Skerra, 2012).

Die kleinste sich wiederholende Einheit der bevorzugten PAS-Sequenz (#1) besteht aus einer definierten Abfolge von Pro, Ala und Ser mit einer Sequenzlänge von 20 Aminosäuren (AS), die zu einer Gesamtlänge von 100 Aminosäuren und weiteren Vielfachen davon (mit bis zu etwa 1000 AS) repetitiv zusammenschaltet wurde und als Modul zur Fusion mit Zielproteinen verwendet werden kann (Binder & Skerra, 2017). Die PAS-Sequenz (#1) weist eine expandierte *Radom-Coil*-Konformation auf, wie durch SEC und CD nachgewiesen (Schlupschy *et al.*, 2013).

Vorversuche hatten gezeigt, dass PAS-Sequenzen ab einer Länge von 200 Aminosäuren die Plasma-Halbwertszeit verschiedener Therapeutika messbar verlängern. Beispielsweise führt die Fusion mit einem PAS#1(200)-Polypeptid zu einer Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit eines Fab-Fragments um den Faktor 4, die Fusion mit einem PAS#1(400)-Polypeptid um den Faktor 11 und die Fusion mit einem PAS#1(600)-Polypeptid sogar um den Faktor 21 in der Maus (Schlupschy *et al.*, 2013).

Die repetitive Abfolge der PAS-Basissequenz garantiert gleichmäßige biophysikalische Eigenschaften über die gesamte Polymerlänge hinweg. Damit ähnelt die PAS-Sequenz in ihren chemischen Eigenschaften und ihren physiologischen Effekten wiederum dem PEG-Polymer und übertrifft dieses sogar in den Aspekten Hydrophobizität, hydrodynamische Vergrößerung und Viskosität bei vergleichbarer Molekülmasse (Breibeck & Skerra, 2017). Im Gegensatz zur PEGylierung erlaubt die genetische Fusion mit der PAS-Sequenz allerdings eine kostengünstige Ein-Schritt-Produktion ohne weitere Kopplungs- oder Modifizierungsschritte *in vitro*. Des Weiteren sind PAS-Polypeptide einerseits sehr stabil im Blutplasma, können andererseits jedoch durch intrazelluläre Proteasen zu nicht-toxischen,

leicht metabolisierbaren *L*-Aminosäuren abgebaut werden, was eine Gewebeanreicherung des PAS-Polypeptides verhindert (Binder & Skerra, 2017).

Als weiterer Vorteil sind PAS-Polymere einerseits sehr hydrophil, andererseits sind sie aber ungeladen und verändern dadurch nicht den pI-Wert des Fusionspartners (analog zu PEG). So beeinträchtigen sie nicht die Diffusion des Fusionsproteins in die negativ geladene extrazelluläre Matrix oder die Translokation über biologische Membranen. Mit Hilfe der ESETEC[®]-Technology von Wacker Biotech konnte anhand von PASyliertem hGH gezeigt werden, dass die Sekretion auch großer PASylierter Proteine in das Kulturmedium von *E. coli* mit Multi-Gramm-Ausbeuten problemlos möglich ist (Di Cesare *et al.*, 2013).

In dieser Arbeit sollte das PAS-Polymer mit einer Länge von 600 Aminosäuren (PAS(600)) hinsichtlich seines Einsatzes als biologische Alternative zu PEG als Fusionspartner für verschiedene therapeutisch interessante Proteine (Abschnitte 1.5 und 1.6) untersucht werden.

1.5 Humane Interferon-Varianten als Kandidaten für die PASylierung

Eine Klasse von pharmakologisch aktiven Proteinen, die in dieser Arbeit im Zusammenhang mit der PASylierung eingesetzt wurde, sind die Interferone (IFNs), kleine Cytokin-Proteine mit vielfältigen physiologischen Funktionen (Lee & Ashkar, 2018). Konkret wurden modifizierte Varianten des humanen Typ I IFN- α 2b verwendet, die sowohl als Kandidaten für innovative therapeutische Proteine als auch als vielversprechende Modellproteine zur Entwicklung und Anwendung der PASylation-Technologie interessant sind.

IFNs sind gehören neben den Interleukinen (ILs) zur Familie der Cytokine (Turner *et al.*, 2014). Diese vermitteln diverse biologische und zelluläre Prozesse, wie beispielweise Resistenz gegenüber viralen und bakteriellen Infektionen, Zellproliferation, antitumorale Aktivität und adaptive Immunantwort (Schreiber, 2017). Humane IFNs werden hauptsächlich von Leukozyten, Fibroblasten und T-Zellen gebildet und sind in drei Gruppen unterteilt (Turner *et al.*, 2014). Zu Typ I gehören IFN- α mit 13 homologen Varianten (Sequenzhomologie untereinander: 80 %), sowie IFN- ω , - κ , - ε und - β mit jeweils einem Vertreter (Sequenzhomologie untereinander: 30–50 %). Zu Typ II Interferone gehört nur IFN- γ und zu Typ III nur IFN- λ (Schreiber, 2017). IFNs der Typen I, II und III haben sich evolutionär unabhängig voneinander entwickelt. Sie binden verschiedene Rezeptoren und aktivieren dadurch unterschiedliche biologische Prozesse, jedoch zeigen sie alle antivirale Aktivität.

Hier wird nur auf die Typ I IFNs näher eingegangen. Diese bilden ternäre Komplexe mit demselben Zelloberflächenrezeptor Interferon- α/β Rezeptor (IFNAR), der aus den zwei Untereinheiten Interferon- α/β Rezeptor 1 (IFNAR1) und Interferon- α/β Rezeptor 2 (IFNAR2) besteht (Abbildung 1; Thomas *et al.*, 2011). Der Hauptunterschied zwischen den verschiedenen IFN-Subtypen liegt in ihrer unterschiedlichen Affinität gegenüber den zwei

Rezeptoruntereinheiten. Grundsätzlich liegen die Affinitäten zu IFNAR2 im nanomolaren Bereich, variieren zwischen den Subtypen jedoch in drei Zehnerpotenzen, mit IFN- α 1 als schwächstem (200 nM) und IFN- β als stärkstem Liganden (0,2 nM) (Piehler & Schreiber, 1999; Lavoie *et al.*, 2011). Die Affinitäten gegenüber IFNAR1 sind vergleichsweise niedrig, meist im mikromolaren Bereich (Cohen *et al.*, 1995; Piehler & Schreiber, 1999; Lamken *et al.*, 2004). Alle IFN- α -Varianten binden den IFNAR1 mit einer solch niedrigen Affinität (1–5 μ M), wohingegen IFN- β mit 50 nM die stärkste Bindung mit IFNAR1 eingeht (Lamken *et al.*, 2004; Lavoie *et al.*, 2011).

Beide Rezeptoruntereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 sind membranintegrale Proteine, die jeweils aus einer extrazellulären Domäne, einer einzelnen Transmembranhelix sowie einer cytoplasmatischen Domäne bestehen. Die extrazelluläre Domäne besteht in beiden Untereinheiten aus Fibronektin-ähnlichen Domänen vom Typ III, wobei sich IFNAR1 und IFNAR2 in der Anzahl dieser Domänen unterscheiden (IFNAR1: vier Subdomänen (SD; SD1–SD4), die durch Genduplikation aus der üblichen zwei Domänenstruktur entstanden sind, IFNAR2: zwei Domänen (D; D1–D2)) (Thomas *et al.*, 2011). Des Weiteren unterscheiden sich die Untereinheiten in der Größe der intrazellulären Domäne (IFNAR1: 100 Aminosäuren, IFNAR2: 251 Aminosäuren) (Schreiber & Piehler, 2015).

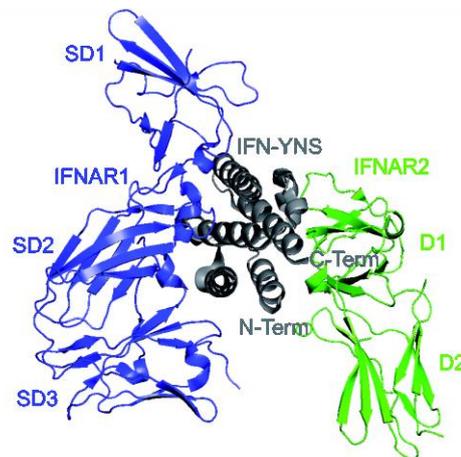


Abbildung 1: Kristallstruktur des ternären Ligand-Rezeptor-Komplexes der Typ I IFNs. Gezeigt sind der Ligand (IFN- α 2b Mutante „IFN-YNS“, grau) sowie die extrazellulären Domänen der Rezeptoruntereinheiten IFNAR1 (SD1 bis SD3, blau) und IFNAR2 (D1 und D2, grün) (PDB 3SE3, dargestellt mit Pymol; DeLano, 2002).

Es wird angenommen, dass die Typ I IFNs zuerst die extrazelluläre Domäne der IFNAR2-Untereinheit binden (Schreiber & Piehler, 2015). Daraufhin assoziiert die IFNAR1-Untereinheit mit dem binären Komplex. Der ternäre Komplex führt zur Phosphorylierung der intrazellulär assoziierten Janus-Tyrosin-Kinasen Tyk2 und Jak1, die wiederum die Phosphorylierung von STAT-Proteinen (STAT1 und STAT2) bewirken, was für die

intrazelluläre Signalübertragung und schließlich die Aktivierung der Transkription verantwortlich ist. Die phosphorylierten pSTAT1/pSTAT2-Heterodimere bilden zusammen mit dem IFN-Regulationsfaktor 9 (IRF9) den Komplex ISGF3 (*IFN-stimulated Gene Factor 3*), der in den Zellkern diffundiert und dort als Transkriptionsfaktor für IFN-induzierbare Gene (ISGs) wirkt. Der *Suppressor of Cytokine Signaling* (SOCS) und die ubiquitin-spezifische Protease 18 (USP18) sind negative Regulatoren dieser Signalkaskade (Schreiber & Piehler, 2015; Urin *et al.*, 2015).

Typ I IFNs besitzen antivirale und antiproliferative Aktivität und zeigen darüber hinaus vielfältige immunmodulatorische Effekte. Der antivirale Effekt der Typ I IFNs ist in zellbasierten Assays bereits nach wenigen Stunden und bei pikomolarer IFN-Konzentration zu beobachten und wird auch nach Entfernung des IFNs aus dem Assayansatz noch aufrechterhalten. Er stellt die erste Immunabwehr gegenüber Viren oder andere Krankheitserregern dar. Diese Genaktivierung wird als „robuste“ IFN-Aktivität bezeichnet (Schreiber & Piehler, 2015). Zusätzlich lösen Typ I IFNs auch eine antiproliferative Antwort aus, die jedoch nur in spezifischen Zelltypen und bei deutlich höheren IFN-Konzentrationen (ca. 1000-fach) als bei der antiviralen Antwort zu beobachten ist; sie wird daher als „einstellbare“ (*tuneable*) IFN-Aktivität bezeichnet. Die antiproliferative Antwort erfordert in Zell-Assays eine mehrtägige kontinuierliche Rezeptoraktivierung und ist empfindlich gegenüber der Konzentration des IFNAR an der Zelloberfläche (Schreiber & Piehler, 2015). Unter physiologischen Bedingungen wird die antiproliferative Antwort jedoch nur von IFN- β mit seiner starken Bindung an IFNAR1 ausgelöst (Levin *et al.*, 2011).

Alle Varianten des Subtyps IFN- α besitzen eine gemeinsame Tertiärstruktur bestehend aus einem Bündel von α -Helices ohne β -Faltblattanteile und mit einer Molekülmasse (M) von 19–20 kDa. Sie besitzen einen hohen Anteil an Leucin und Glutaminsäure und enthalten vier konservierte Cysteine an den Positionen 1, 29, 99 und 139, die im nativen Protein als zwei Disulfidbindungen verknüpft vorliegen. Die meisten Varianten haben eine Sequenzlänge von 166 Aminosäuren, die Variante IFN- $\alpha 2$ stellt mit nur 165 Aminosäuren eine Ausnahme dar. Einige Varianten weisen darüber hinaus eine natürliche posttranslationale Heterogenität auf, die sich zum einen aus unterschiedlicher O-Glycosylierung und zum anderen aus einem begrenzten proteolytischen Verdau am C-Terminus ergibt. Zur Unterscheidung der einzelnen IFN- α -Varianten werden für deren Nomenklatur weitere Suffixe verwendet, es können entweder weitere Buchstaben (z.B. IFN- αA und IFN- αB), weitere Ziffern (z.B. IFN- $\alpha 7$ oder IFN- $\alpha 8$) oder eine Kombination von Ziffer und Buchstabe (z.B. IFN- $\alpha 2b$) genutzt werden (Walsh, 2003).

Aufgrund ihrer vielfältigen physiologischen Effekte werden Typ I IFNs intensiv erforscht und stellen darüber hinaus interessante Kandidaten für die Entwicklung therapeutischer Wirkstoffe dar. So werden Typ I IFNs beispielweise für die Behandlung von Hepatitis B und

C (z.B. Viraferon[®]; IFN- α 2b), von verschiedenen Krebserkrankungen (z.B. Roferon[®] A; IFN- α 2a) und von Multipler Sklerose (MS; z.B. Betaferon[®]; IFN- β 1b) eingesetzt. Die therapeutische Wirkung von Interferon- β bei MS beruht auf einem allgemeinen immunmodulatorischen Effekt, durch den vermutlich die Expression von entzündungshemmenden Mediatoren erhöht wird, während gleichzeitig die Expression proinflammatorischer Cytokine herunterreguliert wird (Kieseier, 2011).

Die generell kurze terminale Plasma-Halbwertszeit der Interferone (2–3 h im Menschen) begrenzt jedoch deren Wirksamkeit (Radwanski *et al.*, 1987) und fordert häufige Verabreichung (z.B. jeden zweiten Tag bei Betaferon[®]). Daher wurden verschiedene PEGylierte IFN-Varianten mit verlängerter Plasma-Halbwertszeit entwickelt, so etwa PEG-Intron[®] (IFN- α 2b zur Behandlung von Hepatitis B und C) mit einer 12 kDa PEG-Kette und PEGASYS[®] (IFN- α 2a zur Behandlung von Hepatitis C) mit einer verzweigten 40 kDa PEG-Kette sowie Plegridy[®] (IFN- β 1a zur Behandlung von schubförmig remittierender MS) mit einer 20 kDa PEG-Kette (siehe Abschnitt 1.2). Die Häufigkeit der Verabreichung konnte durch die PEGylierung deutlich verringert werden (z.B. zweiwöchentlich für Plegridy[®]; Heathcote *et al.*, 2000; Dhalluin *et al.*, 2005; Newsome *et al.*, 2017), jedoch geht sie häufig mit deutlichen Aktivitätsverlusten einher (Grace *et al.*, 2001; Baker *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2011; Elinav *et al.*, 2009; Schlapschy *et al.*, 2013; Fishburn, 2008; Bailon *et al.*, 2001) (siehe auch Abschnitt 1.2).

Neben der therapeutischen Anwendung natürlich vorkommender IFNs wurden durch *Protein-Engineering* auch gänzlich neue Interferon-Varianten mit veränderten Bindungseigenschaften generiert, die Potential als Wirkstoffkandidaten zur Modulation der Interferon-abhängigen Immunität versprechen. So wurden am Weizmann-Institut für Wissenschaften, Israel, zwei neue IFN- α 2b-Mutanten entwickelt (Levin *et al.*, 2014), IFN-YNS α 8 und IFN-1ant, die sich durch sechs bzw. vier Aminosäuremutationen vom humanen Wildtyp-Protein unterscheiden und dadurch gegensätzlich andere Bindungs- und Wirkeigenschaften aufweisen (Abbildung 2).

IFN-YNS wurde durch *Phage-Display* einer IFN- α 2b-Variantenbibliothek unter Selektion auf erhöhte IFNR1-Bindungsaktivität isoliert (Kalie *et al.*, 2007). Hieraus resultierten die drei Mutationen H57Y, E58N und Q61S (YNS), die zusammen zu einer 60-fachen Erhöhung der Affinität gegenüber IFNAR1 führen. Im Vergleich zu IFN- β , welches der stärkste natürlich vorkommende Ligand für IFNAR1 ist, ergab sich bemerkenswerterweise eine dreifach verbesserte Rezeptoraffinität. Zusätzlich wurden anschließend die C-terminalen Mutationen E159K, S160R und R162K eingefügt, die sich in der natürlichen Interferon-Variante IFN- α 8 finden und 15-fach erhöhte Affinität gegenüber IFNAR2 vermitteln (Slutzki *et al.*, 2006). Die Kombination dieser sechs Mutationen resultierte in einer Interferon-Variante (IFN-YNS α 8), die in Zell-Assays 300-fach erhöhte antiproliferative Wirkung gegenüber IFN- α 2b zeigte

(Levin *et al.*, 2011). IFN-YNS α 8 wirkt als potenter Superagonist gegenüber natürlichem IFN- α 2b und stellt eine potentielle Alternative zu den etablierten Medikamenten zur Behandlung von Multipler Sklerose dar (z. B. Betaferon[®], Betaseron[®], Rebif[®], Avonex[®]).

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110							
IFN- α 2b	---	CDLPQTHSLGSRRTMLLAQ	MRRRISLFSCLKDRHDFGFPQ	EEF-G-NQFQK	AETIPVLHEMIQQ	IFNLFSTK	QDSSAAWDET	LLDKFYTELY	QQLNDLEAC	VIQGVGV	TETPLM								
IFN-YNS α 8	---											YNS							
IFN-1ant	---																		
IFN- α 1a	---	E	DN	S	PS	M	D	PA	S	L	T	D	C	M	EER	G			
IFN- α 4a	---	N	A	I	G	H	E	D	H	QA	S	T	E	EQS	E	S			
IFN- α 5	LG-	SN	IM	G	P	D	QA	S	T	T	MM	E	ED						
IFN- α 6	SLD	H	M	R	D	AS	V	T	V	R	L	M	E	W	GG				
IFN- α 7	---	RN	A	I	G	P	E	R	E	D	H	TQA	S	T	E	EQS	E	S	
IFN- α 8	---	N	A	I	P	E	DDK	QA	S	T	L	E	I	D	S	M	E	I	S
IFN- α 10	---	N	A	I	G	G	P	RI	D	QA	S	T	E	EQS	E	S			
IFN- α 13a	---	E	DN	S	PS	M	D	PA	S	L	T	D	C	M	EER	G			
IFN- α 14	---	N	S	NN	M	P	E	D	QA	S	M	T	N	E	I	F	M	E	E
IFN- α 16	---	N	A	I	G	H	Y	V	D	QA	SAF	T	I	F	T	E	E	IA	
IFN- α 17	---	N	A	I	G	P	L	D	TQA	S	T	E	EQS	E	S	N	E	ME	
IFN- α 21	---	N	A	I	G	P	D	QA	S	T	T	EQS	E	S	N	E	E		
		120	130	140	150	160													
IFN- α 2b		KEDSILAVR	KYFQRITLYL	KEKKYSPCA	WEVVR	AEIMR	SFSLSTNLQ	ESLRSKE											
IFN-YNS α 8												KR	K						
IFN-1ant													KR	K					
IFN- α 1a		NA	K	R	T	L	R	R											
IFN- α 4a		N	T	T	L	F	KR	R	D										
IFN- α 5		NV	T	T	A	R	R												
IFN- α 6		N	T	T	S	R	R	R											
IFN- α 7		N	F	M	F	KKG	R	D											
IFN- α 8		Y	T	S	I	KR	K												
IFN- α 10		N	I	R	L	F	KR	R	D										
IFN- α 13a		NA	K	R	T	L	R	R											
IFN- α 14		N	K	M	L	F	KR	R	D										
IFN- α 16		N	MG	F	KG	R	D												
IFN- α 17		N	T	L	F	KI	R	D											
IFN- α 21		NV	K	T	KIF	R	R												

Abbildung 2: Aminosäuresequenzvergleich zwischen humanem IFN- α 2b, den durch Protein-Engineering erzeugten Mutanten IFN-YNS α 8 und IFN-1ant und allen weiteren natürlich vorkommenden humanen IFN- α Varianten. IFN-YNS α 8 ist ein IFN-Superagonist und IFN-1ant ein IFN-Antagonist. Die drei Mutationen H57Y, E58N und Q61S (YNS) im Superagonisten führen zu einer 60-fach höheren Affinität gegenüber IFNAR1, wohingegen die Mutation R120E im Antagonisten die Affinität gegenüber IFNAR1 fast auslöscht. Beide Mutanten beinhalten außerdem die C-terminale Aminosäuresequenz der natürlichen Interferon-Variante IFN- α 8 mit den Mutationen E159K, S160R und R162K, die eine 15-fach erhöhte Affinität gegenüber IFNAR2 vermitteln. Verwendeten UniProt-IDs: P01563 mit der Mutation K23R (IFN- α 2b), P01562 (IFN- α 1a/IFN- α 13a), P05014 (IFN- α 4a), P01569 (IFN- α 5), P05013 (IFN- α 6), P01567 (IFN- α 7), P32881 (IFN- α 8), P01566 (IFN- α 10), P01570 (IFN- α 14), P05015 (IFN- α 16), P01571 (IFN- α 17), P01568 (IFN- α 21). Als Matrize wurde die Sequenz von IFN- α 2b verwendet. Die Nummerierung der Aminosäuresequenzen erfolgte nach Abspaltung der Signalsequenz.

Auch IFN-1ant basiert auf IFN- α 2b, wobei ebenfalls die C-terminalen Mutationen E159K, S160R und R162K des IFN- α 8 eingeführt wurden, um hohe Bindungsaktivität gegenüber IFNAR2 zu erreichen. Im Gegensatz zum Superagonisten IFN-YNS α 8 wurde jedoch nur ein einziger weiterer Aminosäureaustausch vorgenommen; die Mutation R120E führt zu einer beinahe vollständigen Auslöschung der Affinität gegenüber IFNAR1 (Pan *et al.*, 2008). Damit

geht IFN-1ant einerseits eine stärkere Bindung mit IFNAR2 ein als das Wildtyp-Protein IFN- α 2b und kann es somit von dieser Rezeptoruntereinheit verdrängen. Auf der anderen Seite kommt es durch die verlorene Aktivität gegenüber IFNAR1 nur zu verminderter Bildung des ternären Komplexes. Somit stellt IFN-1ant einen Antagonisten des IFN- α 2b dar, der die durch Interferone ausgelöste intrazelluläre Signalkaskade inhibiert. Diese spezifische immunmodulatorische Wirkungsweise kann zur Behandlung bestimmter Krankheitstypen genutzt werden, die mit Interferon-abhängigen systemischen Entzündungsreaktionen zusammenhängen, wie beispielsweise Lupus, Tuberkulose, AIDS oder bestimmte Arten kognitiver Beeinträchtigung (Urin *et al.*, 2015).

Auch wenn diese beiden IFN-Varianten durch ihre veränderten Bindungseigenschaften vielversprechende Wirkstoffkandidaten darstellen, leiden sie wie alle Interferone aufgrund ihrer geringen Molekülgröße an einer sehr kurzen Plasma-Halbwertszeit (2–3 h im Menschen). Dagegen wurde die PASylation-Technologie bereits erfolgreich an einem Interferon angewendet, indem Wildtyp IFN- α 2b als Modellprotein mit PAS-Polypeptiden unterschiedlicher Länge gekoppelt und charakterisiert wurden. Dabei wurde mit dem PAS#1(600)-Polymer eine um den Faktor 30 verlängerte terminale Plasma-Halbwertszeit in der Maus bei nahezu gleichbleibender Affinität gegenüber IFNAR2 erreicht (Schlapschy *et al.*, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit sollten der Superagonist IFN-YNS α 8 und der Antagonist IFN-1ant daher mit Hilfe der PASylation-Technologie modifiziert und die resultierenden Varianten biophysikalisch und pharmakokinetisch charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte im Rahmen von Kooperationsprojekten die Wirksamkeit des PASylierten IFN-Superagonisten in einem Mausmodell für Multiple Sklerose und die Wirksamkeit des PASylierten IFN-Antagonisten an SIV-infizierten Rhesusaffen untersucht werden.

1.6 Der Komplementinhibitor OmCI als Kandidat für die PASylierung

Als weitere Wirkstoffklasse, die durch PASylierung modifiziert werden können, sollten hier Lipocaline verwendet werden, kleine Bindungsproteine, die auch den *Scaffold* für die Wirkstoffklasse der Anticaline[®] liefern (Gebauer & Skerra, 2009). Gegenstand dieser Arbeit war das Lipocalin OmCI, das im Speichel der Lederzecke (*Ornithodoros moubata*) vorkommt und als natürlicher Inhibitor die Komplementkaskade des Wirtsorganismus hemmt.

Das Komplementsystem ist ein wichtiger Teil der angeborenen Immunantwort und besteht aus über 30 verschiedenen Plasmaproteinen oder Rezeptoren, die vergleichbar mit der Blutgerinnungskaskade durch eine Abfolge von proteolytischen Ereignissen die erste Antwort der Immunabwehr gegenüber Pathogenen darstellt (Noris & Remuzzi, 2013). Die Komplementaktivierung kann auf drei unterschiedlichen Wegen erfolgen: (1) Der klassische Weg der Komplementaktivierung wird durch die Bindung des Faktors C1 an Immunkomplexe (mit IgG oder IgM) ausgelöst; (2) der Lektin-Weg wird durch spezifische Mannose-haltige Kohlenhydratstrukturen auf der Oberfläche von Mikroorganismen aktiviert; (3) der alternative

Weg resultiert aus dem spontanen Zerfall einer Thioesterbindung innerhalb des Komplementfaktors C3 (Abbildung 3).

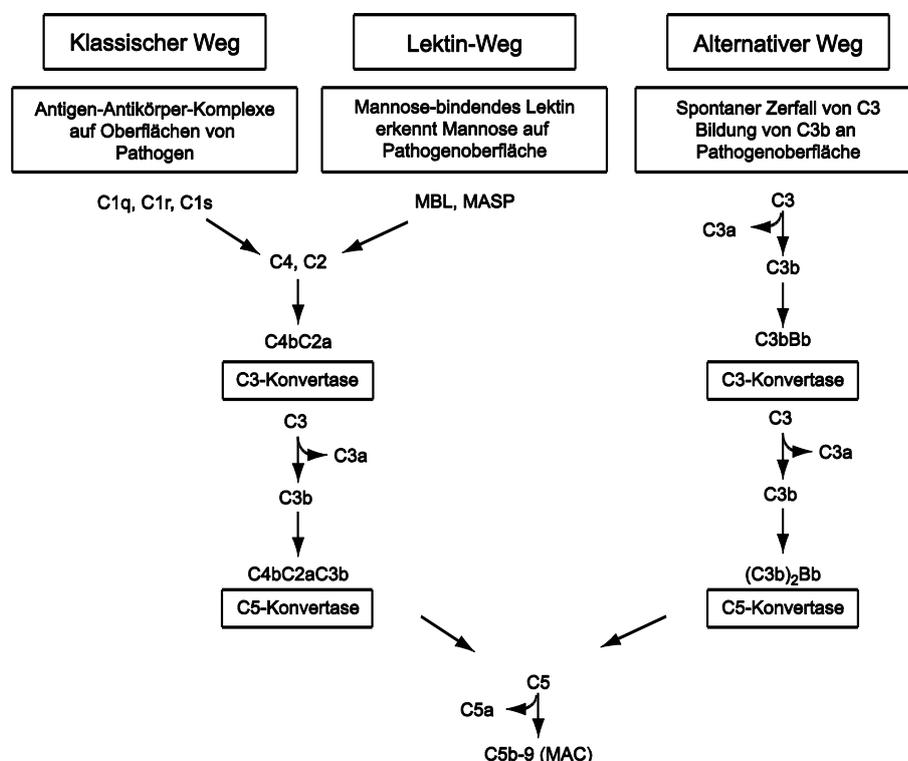


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Komplementkaskade mit den drei unterschiedlichen Aktivierungswegen und dem terminalen *Membrane Attack Complex* (MAC) Noris & Remuzzi, 2013.

Alle drei Wege führen zur Aktivierung des Enzyms C3-Konvertase, die den Komplementfaktor C3 in C3a und C3b spaltet. C3b kann wiederum an die Oberfläche von Pathogenen binden (Opsonisierung) und deren Phagozytose auslösen oder zusammen mit weiteren Komplementfaktoren eine C5-Konvertase bilden, die wiederum den Komplementfaktor C5 in C5a und C5b spaltet. C3a und C5a sind Entzündungsmediatoren (Anaphylatoxine), die durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, den C3a- bzw. C5a-Rezeptor, Leukozyten rekrutieren und aktivieren. Das C5b-Molekül bildet schließlich zusammen mit den Komplementfaktoren C6 bis C9 den sogenannten *Membrane Attack Complex* (MAC) an der Pathogenoberfläche und löst dort die Lyse durch Porenbildung in der Zellmembran aus (Ricklin *et al.*, 2010; Noris & Remuzzi, 2013). In speziellen Situationen wie beispielsweise bei schweren Gewebeschädigungen (*Severe Tissue Injury*), Wundverletzungen (*Acute Trauma*) oder systemischen Entzündungen (*Systemic Inflammation*) kann das C5-Protein zusätzlich durch einen alternativen, sogenannten extrinsischen Komplementweg unter Beteiligung der Blutgerinnungsfaktoren Thrombin, Plasmin, XIa, Xa oder IXa aktiviert werden (Amara *et al.*, 2010).

Um sich vor dem eigenen Komplementsystem zu schützen, verfügt der menschliche Körper über verschiedene lösliche und membranständige Komplementregulatoren (CReg)

(Ehrnthaller *et al.*, 2011). Eine fehlerhafte Regulation des Komplementsystems führt zu zahlreichen chronischen Erkrankungen, beispielsweise der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH), dem atypischen hämolytisch-urämischen Syndrom (aHUS), der C3 Glomerulopathie und der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD), und spielt eine wichtige Rolle bei akuten klinischen Ereignissen wie Sepsis, Transplantatabstoßung (Rejektion) oder Reperfusionsschäden (Risitano, 2015).

Das bessere Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen hinter solchen komplement-vermittelten Erkrankungen erhöhte das Interesse an der Entwicklung spezifischer Komplementinhibitoren (Ricklin & Lambris, 2013). Der C5-spezifische humanisierte monoklonale Antikörper Eculizumab (Soliris; Alexion Pharmaceuticals, Inc.) war das erste solcher komplement-spezifischer Medikamente auf dem Markt; es wurde 2007 durch die FDA und die EMA zunächst zur Behandlung von PNH (Parker *et al.*, 2007; Hillmen *et al.*, 2006) und 2011 zusätzlich zur Behandlung von aHUS (Legendre *et al.*, 2013; Risitano, 2015) zugelassen.

PNH ist eine seltene, lebensbedrohliche Erkrankung der Hämatopoese, die durch eine unkontrollierte komplement-vermittelte Hämolyse, vermehrte Ausbildung von Thrombosen und verminderte Bildung von Blutzellen im Knochenmark gekennzeichnet ist. Ausgelöst wird diese Krankheit durch eine somatische Mutation in dem Gen für *Phosphatidylinositol Glycan Class A* (PIG-A). Dieses Enzym vermittelt die Biosynthese des Glycosylphosphatidylinositols (GPI), das zur Verankerung einer Vielzahl peripherer Membranproteine benötigt wird. Insbesondere wird die Biosynthese der beiden Membranproteine CD55 und CD59 verhindert, die als Komplementregulatoren die Erythrozyten und Blutplättchen vor dem körpereigenen Komplementsystem schützen. Durch diesen Defekt sind die Blutzellen in PNH-Patienten besonders anfällig gegenüber einer komplement-vermittelten intravaskulären Hämolyse (Schrezenmeier & Höchsmann, 2012; Heitlinger, 2013). Das Komplementsystem kann in PNH-Patienten durch ganz unterschiedliche Faktoren aktiviert werden (z.B. durch eine Infektion); die resultierende Hämolyse kann beispielsweise zu chronischen Ermüdungserscheinungen bis zu lebensbedrohlichen Thrombosen führen (Parker *et al.*, 2007; Hill *et al.*, 2013).

Eculizumab hat sich zu einem wichtigen Wirkstoff für die Behandlung von PNH entwickelt. Dieser Antikörper inhibiert gezielt die C5-Aktivierung, indem er an das C5-Protein bindet und dessen Spaltung in C5a und C5b durch die C5-Konvertase hemmt. Infolgedessen wird die Bildung des lytischen MACs verhindert und die Komplementkaskade an diesem Punkt gestoppt. Als Vorteil dieses Eingriffs spät in der Komplementkaskade bleibt die Bildung von C3b und damit die Erkennung von Pathogenen und deren Abwehr unbeeinflusst (Heitlinger, 2013). In Langzeitstudien mit PNH-Patienten hat Eculizumab sich als sehr effektiv und gut verträglich gezeigt (Kelly *et al.*, 2011; Hillmen *et al.*, 2013), allerdings wiesen die

behandelten Patienten ein erhöhtes Risiko für Infektionen durch *Neisseria meningitis* auf, was durch entsprechende Impfung vor der Eculizumab-Behandlung minimiert werden kann (Kelly *et al.*, 2011). Dennoch gibt es einen großen Anteil unter den PNH-Patienten (25–35 %), der ungenügend auf die Eculizumab-Therapie reagiert und daher auf Bluttransfusionen angewiesen ist. Dies könnte durch die Aufnahme von C3-opsonisierten Erythrozyten durch Phagozytose in Milz und Leber verursacht werden (Risitano, 2015; Lin *et al.*, 2015). Da die Eculizumab-Therapie mit jährlichen Kosten von 389.000 US-Dollar pro Patient (Parker *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2011) sehr teuer ist, besteht hohes Interesse an kostengünstigeren und effektiveren Therapien.

Der *Ornithodoros moubata* Komplementinhibitor (OmCI, auch Coversin, Nomacopan oder rEV576; Akari Therapeutics) wurde aus dem Speichel der namensgebenden Lederzecke isoliert, als dessen Bestandteil er während einer Blutmahlzeit die Komplementaktivierung des Wirtsorganismus unterdrückt (Garcia *et al.*, 2013; Nunn *et al.*, 2005). Ähnlich zu Eculizumab bindet OmCI an den Komplementfaktor C5 und inhibiert durch Hemmung der C5-Konvertase die MAC-Bildung; die Epitope für die jeweilige Bindung unterscheiden sich allerdings zwischen den beiden Molekülen (Jore *et al.*, 2016). Bei einem Teil der PNH-Patienten tritt die heterozygote Punktmutation c.2654G→A (p.Arg885His) im C5-Gen auf und, die das Epitop für Eculizumab zerstört aber nicht mit der Bindestelle für OmCI interferiert. Da dieser Polymorphismus in Japan bei 3,5 % der Bevölkerung auftritt, stellte OmCI in diesem Fall eine vielversprechende Alternative dar (Nishimura *et al.*, 2014).

Die rekombinante Expression und Charakterisierung von OmCI wurde erstmals 2005 beschrieben (Nunn *et al.*, 2005). OmCI besteht aus insgesamt 168 Aminosäuren, inklusive einer N-terminalen, die Sekretion vermittelnden Signalsequenz von 18 Aminosäuren (UniProt-ID: Q5YD59). Das native OmCI Protein umfaßt 150 Aminosäuren und weist eine Molekülmasse von ca. 17 kDa auf. OmCI gehört zur Familie der Lipocaline, die eine Gruppe von kleinen sekretorischen (150–180 Aminosäuren) und funktionell vielfältigen Proteinen darstellt, welche lipophile Liganden innerhalb ihrer kelchförmigen Bindungstasche binden können und für deren Transport, Speicherung oder Ausscheidung verantwortlich sind (Schiefner & Skerra, 2015). OmCI besteht aus einem zentralen 8-strängigen anti-parallelen β -Barrel und einer flankierenden C-terminalen α -Helix, es enthält drei Disulfidbindungen (Cys6-Cys128, Cys38-Cys150 und Cys100-Cys129) und zwei potentielle N-Glycosylierungsstellen (Asn60 und Asn84) (Abbildung 4A; Roversi *et al.*, 2007), die allerdings im natürlich vorkommenden Protein nicht glycosyliert sind (Nunn *et al.*, 2005). OmCI besitzt große strukturelle Homologie zu wichtigen humanen Plasmaproteinen, beispielsweise dem Tränenlipocalin, die zur gleichen Proteinfamilie gehören, aber funktionell unterschiedlich sind (Schiefner & Skerra, 2015).

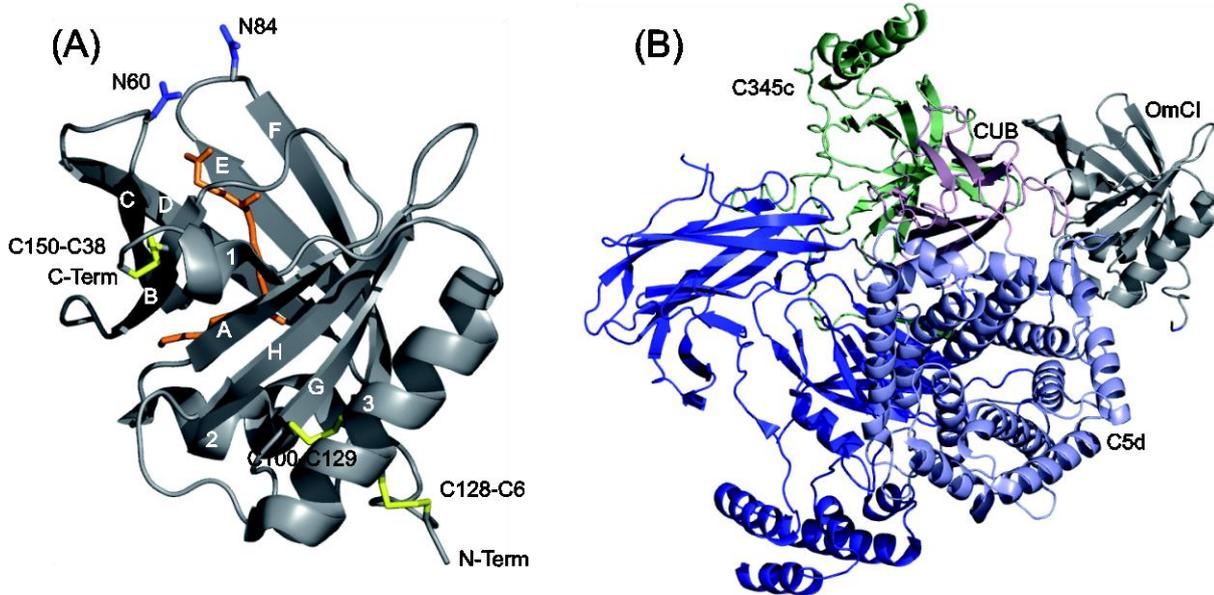


Abbildung 4: Kristallstruktur von OmCI. (A) In *E. coli* produziertes rekombinantes OmCI (grau) im Komplex mit dem Entzündungsmediator Leukotrien B4 (LTB4) (orange) (PDB 3ZUO, dargestellt mit PyMol; DeLano, 2002). OmCI bindet LTB4 in seiner zentralen Bindungstasche. Die Strukturelemente sind nummeriert: α -Helices mit 1 bis 3 und β -Faltblatt-Stränge mit A bis H. Der N- und C-Terminus ist beschriftet. Die drei Disulfidbrücken (Cys6-Cys128, Cys38-Cys150, Cys100-Cys129) sind gelb hervorgehoben und die zwei potentiellen N-Glycosylierungsstellen (Asn60 und Asn84) sind blau markiert. (B) Rekombinantes OmCI (grau) in Komplex mit der B-Kette des humanen C5-Proteins (dunkelblau, abgesehen von den Domänen C345c (hellgrün), CUB (pink) und C5d (hellblau); PDB 5HCC). OmCI bindet die drei Domänen C345c, CUB und C5d der B-Kette des C5-Proteins seitlich über seine Schleifen β C- β D und β H- α 3.

OmCI bindet das C5-Protein mit einer hohen Affinität von ca. 1 nM. Die Bindung erfolgt allerdings nicht über die hydrophobe Bindungstasche, sondern seitlich über die Schleifen β C- β D und β H- α 3 (Abbildung 4B). Im C5-Protein sind die drei Domänen C5d, CUB und C345c an der Bindung mit OmCI beteiligt (Jore *et al.*, 2016). Darüber hinaus kann OmCI in seiner zentralen Bindungstasche den Entzündungsmediator Leukotrien B4 (LTB4) komplexieren und erfüllt damit eine weitere entzündungshemmende Funktion (Roversi *et al.*, 2013). Im Vergleich zu Eculizumab zeigt OmCI breite Spezies-Kreuzreaktivität zwischen Maus, Ratte, Meerschweinchen, Schwein und dem Menschen. Deshalb konnte die Wirksamkeit des rekombinanten OmCI in diversen präklinischen Krankheitsmodellen für beispielsweise Myasthenia Gravis (MG), Guillain-Barré-Syndrom (GBS), Antiphospholipid-Syndrom (APS), Asthma und Sepsis (Soltys *et al.*, 2009; Huber-Lang *et al.*, 2014; Romay-Penabad *et al.*, 2014; Roversi *et al.*, 2013) demonstriert werden.

Rekombinantes OmCI wurde als Therapeutikum (Coversin) bereits in einer Phase Ia Studie an gesunden Probanden getestet, wo eine beinahe vollständige Inhibierung von C5 (> 95 %) nach subkutaner Injektion von 0,57 mg/kg erzielt werden konnte (Weston-Davies *et al.*, 2014). Die in der Studie gemessene Dauer der C5-Inhibierung war auf maximal 24 h begrenzt; in der Anwendung wäre damit eine tägliche Dosierung mit OmCI notwendig, um den gewünschten pharmakologischen Effekt zu erreichen.

In dieser Arbeit sollte die PASylation-Technologie zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit von OmCI genutzt werden, ohne seine Bindungsaffinität zu den physiologischen Liganden und Verträglichkeit zu mindern. Die Eignung des PASylierten OmCI als alternatives Biotherapeutikum zur Behandlung von PNH und anderen komplementvermittelten Erkrankungen sollte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht werden

1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die PASylation-Technologie an medizinisch relevanten Modellproteinen anzuwenden und so potentielle neue Therapeutika zu entwickeln. Dafür wurden ein humaner Interferon- α 2b-Superagonist sowie ein -Antagonist und der C5-spezifische Komplementinhibitor OmCI jeweils mit einem PAS-Biopolymer fusioniert.

Hierfür sollten zunächst unterschiedliche Expressions- und Reinigungsstrategien untersucht und hinsichtlich der Ausbeute an rekombinanten PASylierten Proteinen optimiert werden. Zudem sollten von den gereinigten Fusionsproteinen die hydrodynamischen Eigenschaften mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) und dynamischer Lichtstreuung (DLS) untersucht sowie die strukturellen Eigenschaften mittels Circular dichroismus (CD) Spektroskopie charakterisiert werden.

Des Weiteren sollte die *In vitro*-Aktivität der PASylierten Interferon-Varianten und des PASylierten OmCI mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR) und geeigneter Zell-Assays charakterisiert werden, um den Einfluss des PAS-Polypeptids auf die Proteinaktivität zu untersuchen.

Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit sollte in Kooperation mit dem Weizmann-Institut für Wissenschaften, den *National Institutes of Health* (NIH) und der XL-protein GmbH die pharmakokinetische und -dynamische Untersuchung der PASylierten Wirkstoffe in geeigneten Tiermodellen sein, um den Verlängerungseffekt auf die Plasma-Halbwertszeit und die Wirksamkeit der PASylierten Therapeutika *in vivo* zu studieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme, Gensynthesen und Plasmide

Escherichia coli-Stämme:

BL21	<i>F</i> , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (Studier & Moffatt, 1986)
JM83	<i>F</i> , <i>ara</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>rpsL</i> (<i>strA</i>), ϕ 80, (<i>lacZ</i> Δ M15) (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
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>PvuII</i>) (Meerman & Georgiou, 1994)
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::Tn10 trxB</i> (<i>kan^R</i> , <i>tet^R</i>) (Bessette <i>et al.</i> , 1999; Ritz <i>et al.</i> , 2001)
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>lacZYAargF</i>) U169 [<i>F'</i> : <i>proAB⁺</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZ</i> Δ M15, <i>Tn10</i> (<i>tet^R</i>)] (Bullock <i>et al.</i> , 1987)

Gensynthesen:

Gensynthesen wurden von der Firma Genent/Thermo Fisher Scientific, Regensburg durchgeführt.

pMA-OmCI-His ₆	UniProt-ID: Q5YD59; aa 19-168 Codon-Optimierung für <i>E. coli</i>
pMA-pOmCI-His ₆	UniProt-ID: Q5YD59; aa 19-168 Codon-Optimierung für <i>Pichia pastoris</i> Zwei Mutationen: N78Q/N102Q

Plasmide:

Alle verwendeten Plasmide stammen aus der Sammlung von Prof. Dr. Arne Skerra (Lehrstuhl für Biologische Chemie, TUM) oder der XL-protein GmbH (Tabelle 2).

Tabelle 2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	Referenz
pASK75	Skerra, 1994
pASK37	Skerra & Plückthun, 1991
pASK-IBA4-IFN	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
pASK75-His ₆ -hGH	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
pTUM4	Schlapschy <i>et al.</i> , 2006 Dieses Helferplasmid trägt die Gene der <i>E. coli</i> eigenen Thiol/Disulfid-Oxidoreduktasen <i>DsbA</i> und <i>DsbC</i> sowie die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen <i>FkpA</i> und <i>SurA</i> . Die Gene werden konstitutiv überexprimiert. Das Plasmid trägt als Selektionsmarker eine Chloramphenicol-Resistenz.
pASK88-hu4D5-duoSapI-PAS#1(200)	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013 zur Isolierung der PAS#1(200)-Genkassette
pCR2.1_PAS#1.2(200)duoSapI	XL-protein GmbH zur Isolierung der PAS#1.2(200)-Genkassette
pXL1-PAS#1.7(200)	XL-protein GmbH zur Isolierung der PAS#1.7(200)-Genkassette
pXL1-PAS#1.6/1.3/1.2(600)	XL-protein GmbH zur Isolierung der PAS#1.6/1.3/1.2(600)-Genkassette
pPDI4	Prof. Dr. Arne Skerra Zur Isolierung des pPDI-Gens

In Tabelle 3 sind die Plasmide aufgelistet, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit konstruiert worden sind.

Tabelle 3: Im Rahmen dieser Arbeit erzeugte Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften
pASK75-His ₆ -IFN	tet ^{b/o} ; OmpA-His ₆ -IFN- α 2b; bla/tetR
pASK75-His ₆ -PAS#1(600)-IFN	wie pASK75 mit OmpA-His ₆ -PAS#1(600)-IFN- α 2b
pASK75-His ₆ -YNS α 8	wie pASK75 mit OmpA-His ₆ -YNS α 8 Harari <i>et al.</i> , 2014b
pASK75-His ₆ -PAS#1(600)-YNS α 8	wie pASK75 mit OmpA-His ₆ -PAS#1(600)-YNS α 8 Harari <i>et al.</i> , 2014b
pASK75-His ₆ -IFN-1ant	wie pASK75 mit OmpA-His ₆ -IFN-1ant
pASK75-His ₆ -PAS#1(600)-IFN-1ant	wie pASK75 mit OmpA-His ₆ -PAS#1.6/1.3/1.2 (600)-IFN-1ant
pASK75-T7RBS-His ₆ -PAS#1(600)-IFN-1ant	wie pASK75; T7RBS; His ₆ -PAS#1.6/1.3/1.2(600)-IFN-1ant
pASK37-T7RBS-His ₆ -PAS#1(600)-IFN-1ant	lacUV5 ^{b/o} ; T7RBS; His ₆ -PAS#1.6/1.3/1.2(600)-IFN-1ant; bla/lacI
pASK75-OmCI-His ₆	wie pASK75 mit OmpA-OmCI-His ₆
pASK75-OmCI-PAS#1(200)-His ₆	wie pASK75 mit OmpA-OmCI-PAS#1.2(200)-His ₆
pMA-pOmCI-PAS#1(600)-His ₆	Klonierungsvektor für <i>P. pastoris</i> Produktion pOmCI-PAS#1.7(600)-His ₆ ; bla
pMA-pOmCI	wie pMA-Klonierungsvektor mit pOmCI
pMA-pOmCI-PAS#1(600)	wie pMA-Klonierungsvektor mit pOmCI-PAS#1.7(600)
pMA-PAS#1(600)-pOmCI	wie pMA-Klonierungsvektor mit PAS#1.7(600)-pOmCI
pASK75-T7RBS-His ₆ -OmCI-dsbC	wie pASK75; T7RBS; His ₆ -OmCI-dsbC
pASK75-T7RBS-His ₆ -PAS#1(600)-OmCI-dsbC	wie pASK75; T7RBS; His ₆ -PAS#1.6/1.3/1.2(600)-OmCI-dsbC
pASK75-T7RBS-His ₆ -OmCI-PDI	wie pASK75; T7RBS; His ₆ -OmCI-PDI Kuhn <i>et al.</i> , 2016
pASK75-T7RBS-His ₆ -PAS#1(600)-OmCI-PDI	wie pASK75; T7RBS; His ₆ -PAS#1.6/1.3/1.2(600)-OmCI-PDI Kuhn <i>et al.</i> , 2016

2.1.2 Oligodesoxynukleotide

Die verwendeten Oligodesoxynukleotide (*Primer*) wurden teilweise durch das Labor von Prof. Dr. Skerra zur Verfügung gestellt oder bei der Firma Thermo Fisher Scientific, Ulm, in HPLC-gereinigter Form bestellt. *Primer* mit einer Länge > 50 bp (mit Sternchen gekennzeichnet) wurden zusätzlich durch denaturierende Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese gereinigt (Abschnitt 2.3.3).

PCR-Amplifizierung verschiedener Strukturgene:

NK_OmCI_1_f 5'- CTA CCG GCT CTT CTG CCG ATA GCG AAA GCG ATT GTA
CC -3'

NK_OmCI_1_r 5'- TGG CAG AAG CTT AAC AAT CTT TCA GAT GCG GAT AC
-3'

NK_PDI_1_f* 5'- TGT GCC AAG CTT AAC GAG GGC AAA AAA TGA AAG ACG
CCC CCG AGG AGG AGG ACC AC -3'

NK_PDI_1_r 5'- GGT CCG GGT CTC CAG CTT ACA GTT CAT CTT TCA CAG
CTT TCT G -3'

NK_dsbC_1_f* 5'- TGT TAG AAG CTT AAC GAG GGC AAA AAA TGA AAG ATG
ACG CGG CAA TTC AAC -3'

NK_dsbC_1_r 5'- GGT CAA GGT CTC CAG CTT ATT TAC CGC TGG TCA TTT
TTT GGT G -3'

OmCI-ForV2 5'- GTG TCT CTC GAG AAG AGG AGC TCT TCT GCC GAC TCT
GAA TCC GAC TGT AC-3'

OmCI-RevV2 5'- TGG TGA GCG GCC GCC TAT TAG CAA TCC TTC AAG TGT
GGG-3'

OmCI-RevV3 5'- TGA TGG GCG GCC GCT CTT CAG GCG CAA TCC TTC AAG
TGT GGG -3'

QuikChange-Mutagenese:

NK_IFNa_agonist_1_f 5'- CCA TCC CTG TCC TCT ATA ACA TGA TCT CGC
AGA TCT TCA ATC TC -3'

NK_IFNa_agonist_1_r 5'- GAG ATT GAA GAT CTG CGA GAT CAT GTT ATA
GAG GAC AGG GAT GG -3'

NK_IFNa_agonist_2_f 5'- GTC AAC AAA CTT GCA AAA ACG TTT AAA AAG
TAA GGA ATA AGC TTG -3'

NK_IFNa_agonist_2_r 5'- CAA GCT TAT TCC TTA CTT TTT AAA CGT TTT
TGC AAG TTT GTT GAC -3'

NK_IFNa_antagonist_1_f 5'- CCA TTC TGG CTG TGG AGA AAT ACT TCC AAA
GAA TCA C -3'

NK_IFNa_antagonist_1_r 5'- GTG ATT CTT TGG AAG TAT TTC TCC ACA GCC
AGA ATG G -3'

DNA-Sequenzierung:

NK_PDI_1_Seq_r 5'- GGC AAG AAC AGC AGG ATG -3'
pMA-For 5'- ACG ACT CAC TAT AGG GCG -3'
pMA-Rev 5'- GAC AGG TTT CCC GAC TGG -3'
PR1 5'- CGC AGT AGC GGT AAA CG -3'
D20 5'- CCA CTC CCT ATC AGT GAT -3'

2.1.3 Proteinreagenzien

Enzyme

Benzonase, Purity > 99 %	Merck, Darmstadt
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym (Huhn), <i>Molecular Biology Grade</i>	AppliChem, Darmstadt
<i>Pfu Ultra II</i> DNA-Polymerase	Agilent Technologies, Waldbronn
Q5 Hot Start DNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot oder New England Biolabs, Schwalbach
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot

Antikörper

AffiniPure Anti-Human IgG (Fc γ spezifisch; aus Maus)	Jackson Immuno Research, West Grove, PA
Anti-Maus-IgG-AP-Konjugat (Fc-spezifisch; aus Ziege)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Monoklonales Anti-polyHistidin-HRP-Konjugat (aus Maus)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Monoklonales Anti-Human IFN α 2b 9D3 (aus Maus)	Abcam, Cambridge, UK

Monoklonales Anti-Human IFN α 2b 4E10-
HRP (aus Maus) Abcam, Cambridge, UK

Marker zur Kalibrierung der Größenausschlußchromatographiesäulen

Alkoholdehydrogenase Sigma-Aldrich, Steinheim

Apoferritin Sigma-Aldrich, Steinheim

β -Amylase Sigma-Aldrich, Steinheim

Blue Dextran Sigma-Aldrich, Steinheim

Carboanhydrase Sigma-Aldrich, Steinheim

Cytochrom C Sigma-Aldrich, Steinheim

Myoglobin Sigma-Aldrich, Steinheim

Ovalbumin Sigma-Aldrich, Steinheim

Rinderserumalbumin (BSA) Sigma-Aldrich, Steinheim

Thyroglobulin Sigma-Aldrich, Steinheim

Sonstige Proteine

Humanes C5-Protein Complement Technology, Tyler, TX

Recombinant Human IFN- α / β R2
Fc Chimera R&D Systems, Minneapolis, MN

Trypsin (modifiziert, *Sequencing Grade*,
für MS) Promega, Madison, WI

2.1.4 Chemikalien

(N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethan-
sulfonsäure (HEPES) Carl Roth, Karlsruhe

1,4-Dithio-*D,L*-threitol (DTT) GERBU Biotechnik, Heidelberg

2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure,
Monohydrat (MES) Carl Roth, Karlsruhe

2,2'-Dithiodipyridin Sigma-Aldrich, Steinheim

2-Mercaptoethanol Carl Roth, Karlsruhe

4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-
Hydrochlorid (AEBSF) AppliChem, Darmstadt

5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-4-Toluidinsalz (BCIP)	AppliChem, Darmstadt
Acetonitril, <i>HPLC grade</i> (ACN)	VWR International, Darmstadt oder AppliChem, Darmstadt
Acetonitril, <i>LC-MS grade</i> (ACN)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid-Stammlösung, 30 %ig (w/w), mit 2,6 % (w/w) Bisacrylamid	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Adenosin-5'-triphosphorsäure-Dinatriumsalz (ATP)	AppliChem, Darmstadt
Agarose für die Gelelektrophorese	Bio&SELL, Feucht bei Nürnberg
Agarose, <i>Low Melting Point</i>	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Ameisensäure, <i>LC-MS grade</i> (FA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ameisensäure, p. A.	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniak, 25%ig Lösung	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumacetat (NH ₄ OAc)	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumhydrogencarbonat (NH ₄ HCO ₃)	AppliChem, Darmstadt
Ammoniummolybdat, Tetrahydrat (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄)	Fluka Analytical / Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin, Natriumsalz (Amp)	Formedium, Hunstanton, UK
Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc)	Acros Organics, Geel, Belgien
Antifoam Y-30 Emulsion	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI
Bacto Tryptone	Difco Laboratories, Detroit, MI
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit, MI
Borsäure (H ₃ BO ₃)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt

BSA (Bovine Serum Albumin), Fraktion IV	AppliChem, Darmstadt
Butan-1-ol	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid, Dihydrat (CaCl ₂)	AppliChem, Darmstadt
Chloramphenicol (Cam)	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau R-250	AppliChem, Darmstadt
D(+)-Glucose, Monohydrat	AppliChem, Darmstadt
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumphosphat, Dihydrat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas, St. Leon-Rot
Eisen(III)-chlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Electrospray Calibrant Solution</i> (#63606-10ML)	Fluka Analytical/Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure, 99,9 % (AcOH)	Honeywell Riedel-de Haën, Seelze-Hannover
Essigsäure, LC-MS grade	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol, p.a. (EtOH)	VWR International, Darmstadt
Ethanol, technisch, 96 % DAB	CLN, Niederhummel
Ethanolamin, 1 M Lösung	GE Healthcare Europe, Freiburg
Ethidiumbromid, 1%ige (w/v) Lösung	AppliChem, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	AppliChem, Darmstadt
Formamid, deionisiert, für Auftragspuffer Primerreinigung	AppliChem, Darmstadt
Glycerin, 99 %	Carl Roth, Karlsruhe
Imidazol	Merck, Darmstadt
Isopropanol, p.A.	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol, technisch	CLN, Niederhummel
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Formedium, Hunstanton, UK

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Kaliumsulfat, p. A. (K_2SO_4)	AppliChem, Darmstadt
Kobalt(II)chlorid, Hexahydrat (CoCl_2)	Merck, Darmstadt
Kupfer(II)chlorid, Hexahydrat (CuCl_2)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>L</i> -Prolin	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid, Hexahydrat (MgCl_2)	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumsulfat, Hydrat (MgSO_4)	Carl Roth, Karlsruhe
Mangan(II)chlorid, Tetrahydrat (MnCl_2)	Merck, Darmstadt
Methanol, <i>LC-MS grade</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim oder AppliChem, Darmstadt
Methanol, technisch	AppliChem, Darmstadt
Molekularsieb 4 Å	AppliChem, Darmstadt
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
Natriumacetat (NaOAc)	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat (NaH_2PO_4)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat, p.a. (NaHCO_3)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhypochlorit, technisch, 13 %ige (w/v) Lösung (NaOCl)	AppliChem, Darmstadt
<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-di-methylaminopropyl)- carbodiimid (EDC)	GE Healthcare Europe, Freiburg
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid (NHS)	GE Healthcare Europe, Freiburg
Nickelsulfat (NiSO_4)	AppliChem, Darmstadt
<i>Nitro Blue Tetrazolium</i> (NBT)	AppliChem, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth, Karlsruhe

Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Referenzlösungen für pH-Meter	Carl Roth, 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, Karlsruhe
Rotiphorese Sequenziergel-Verdünner (50 % (w/v, 8,3 M) Harnstoff in Wasser)	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure, konz. 37 %ige (w/v) Lösung (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Thiamin, Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trifluoressigsäure (TFA), 99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trinatriumcitrat, Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP)	Carl Roth, Karlsruhe oder Pierce Biotechnology, Rockford, IL
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Ultra Qualität	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Xylencyanol	AppliChem, Darmstadt
Zinkacetat (Zn(OAc) ₂)	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.5 Standards und Kits

DNA- und Protein-Größenstandards

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

Kits zur DNA-Isolierung

QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
-------------------------	----------------

QIAprep Spin Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
<u>Kits und Geräte zur DNA-Sequenzierung</u>	
SmartSeq Kit	Eurofins Genomics, Ebersberg
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	PerkinElmer LAS, Rodgau
ZR DNA Sequencing Clean-up Kits	Zymo Research, Irvine, CA
ABI-Prism 310 Genetic Analyzer	PerkinElmer LAS, Rodgau
<u>Kits für ELISA und <i>Western Blotting</i></u>	
QuantaBlu Fluorogenic Peroxidase Substrate Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
SIGMAFAST 3,3-Diaminobenzidin- Tabletten	Sigma-Aldrich, Steinheim
WIESLAB Complement System Kit, Alternativer Komplementweg (COMPL AP330)	Wieslab, Malmö, Schweden
WIESLAB Complement System Kit, Klassischer Komplementweg (COMPL CP310)	Wieslab, Malmö, Schweden
2.1.6 Geräte und Zubehör	
<u>Pipetten und Pipettierhilfen</u>	
Accu-jet	Brand, Wertheim
DISCOVERY Comfort (D1000)	HTL Lab solution, Warschau, Polen
Eppendorf Research (2,5 µl)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research, 8 Kanalphipette (300 µl)	Eppendorf, Hamburg
Gilson P20 bis P200	Abimed Analysen-Technik, Langenfeld
HandyStep	Brand, Wertheim
Pipetboy acu	Integra Bioscience, Fernwald

Schüttelapparate

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

Elektrophorese

Dünnschichtchromatographie-Platte zur Reinigung von Oligodesoxynukleotiden Kieselgel 60 F254 20 x 20 Alufolien	Merck, Darmstadt
Elektroblot-Apparatur	Eigenbau, Carl Roth, Karlsruhe
Gelapparatur zur Oligodesoxynukleotid-Reinigung	Eigenbau
HE33 Submarine (DNA-Auftrennung)	Hoefer, Holliston, MA
Hochspannungsgerät, PS3003	Biometra, Göttingen
Minigel-Twin (Protein-Auftrennung)	Biometra, Göttingen
Niedrigspannungsgerät, Power Pack P25	Biometra, Göttingen
UV-Transilluminator TI 3 (254 nm)	Biometra, Göttingen

Brutschränke

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

Schüttelinkubatoren

Innova 43	New Brunswick / Eppendorf, Hamburg
ITE, Multitron, Multitron II	Infors, Bottmingen, Schweiz

Fermentation

10 L-Fermentersystem mit Umwurfzylinder	Schütt Labortechnik, Göttingen
C Flow Durchfluß-Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pH Meß- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pO ₂ Meß- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C Pump D Schlauchpumpen-Modul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
O ₂ -Sensor (12/320 A-Type)	Mettler-Toledo, Steinbach

pH-Elektrode (Typ 465)	Ingold Messtechnik, Steinbach
Wasserbad Haake F6/C25	Thermo Haake, Karlsruhe
<u>Zellaufschluß</u>	
Hochdruckhomogenisator PANDA Plus 2000	GEA Niro Soavi, Lübeck
French Press-Hochdruckhomogenisator	SLM Instruments, Urbana, USA
Ultraschallhomogenisator S250D	Branson Ultrasonics, Danbury, CT
<u>Proteinreinigung</u>	
Chromatographieanlage ÄKTA Purifier P-10	GE Healthcare Europe, Freiburg
Chromatographieanlage ÄKTA Explorer P-100	GE Healthcare Europe, Freiburg
Autosampler A-900	GE Healthcare Europe, Freiburg
Fraktionssammler Frac 900/920	GE Healthcare Europe, Freiburg
Fraktionssammler Multirac und Superrac	LKB Instrument, Gräfelfing
Fraktionssammler RediFrac	GE Healthcare Europe, Freiburg
Peristaltische Pumpe P-1	GE Healthcare Europe, Freiburg
Signalschreiber REC 112	GE Healthcare Europe, Freiburg
Signalschreiber SE120	ABB Goerz, Mannheim
<u>Lyophilisierung</u>	
Rotations-Vakuumkonzentrator Speedvac RVC2-18CD plus HCL	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode
<u>Säulenmaterial und Chromatographiesäulen</u>	
Fractogel EMD TMAE (S) (IEX)	Merck Millipore, Billerica, MA
Ni-Sepharose High Performance (IMAC)	GE Healthcare Europe, Freiburg
Source 15S / Q (IEX)	GE Healthcare Europe, Freiburg
HiLoad 16/60 Superdex 75 / 200 prep grade, 120 ml Bettvolumen	GE Healthcare Europe, Freiburg
HiLoad 26/60 Superdex 75 / 200 prep grade, 320 ml Bettvolumen	GE Healthcare Europe, Freiburg

HisTrap HP (Ni-Sepharose High Performance), 5 ml Bettvolumen (IMAC)	GE Healthcare Europe, Freiburg
PD-10 Gelfiltrationssäule (SEC)	GE Healthcare Europe, Freiburg
Resource RPC, 1 ml Bettvolumen	GE Healthcare Europe, Freiburg
Resource S / Q, 1 ml und 6 ml Bettvolumen (IEX)	GE Healthcare Europe, Freiburg
Superdex 75 / 200 10/300 GL, (Tricorn S75 / S200), 24 ml Bettvolumen (SEC)	GE Healthcare Europe, Freiburg
<u>Nachweis von Endotoxinen</u>	
Endosafe PTS, Chips und Meßgerät	Charles River Laboratories, Wilmington, MA
<u>Massenspektrometer</u>	
maXis Q-TOF (ESI-MS) mit Software Compass Data Analysis 4.0	Bruker Daltonik, Bremen
6210 Time-of-Flight LC/MS (ESI-MS) mit Software MassHunter BioConfirm B.03.01	Agilent Technologies, Waldbronn
<u>Spektroskopie und Analytik</u>	
BIAcore 2000 (SPR-Spektroskopie) mit Software BIAevaluation 4.1	GE Healthcare Europe, Freiburg
CD-Spectropolarimeter Jasco J-810 mit Spectra Manager Software 1.00.00 (CD-Spektroskopie)	Jasco Labor- und Datentechnik, Groß-Umstadt
Spektrophotometer NanoDrop 2000 (UV/Vis)	Thermo Fisher Scientific, Ulm
Spektrophotometer Ultrospec 2000 pro (UV/Vis)	GE Healthcare Europe, Freiburg
Spektrophotometer Ultrospec 2100 pro (UV/Vis)	GE Healthcare Europe, Freiburg
Zetasizer Nano-S (DLS-Messung) mit Zetasizer Software 6.32	Malvern Instruments, Herrenberg

Synergy II ELISA Reader mit Software Gen5 1.09	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
ELISA washer ELx405	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
<u>Sterilisierung und steriles Arbeiten</u>	
Autoklav Varioklav Typ 500	H&P Labortechnik, Oberschleißheim
Bi-Destillierapparat aus Glas 2304	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Reinstwasseranlage Purelab ultra	ELGA LabWater Holding, Celle
<u>Temperaturregulierung</u>	
F12-ED Kälte-Umwälzthermostat	JULABO, Seelbach
Metallblockthermostat Techne Dri-Block DB-2A	Thermodux, Wertheim
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
T-Personal Thermocycler	Biometra, Göttingen
Wasserbad Haake K15/K20	Thermo Electron, Karlsruhe
<u>Waagen</u>	
Feinwaage 125A	Precisa Gravimetrics, Dietikon Schweiz
Laborwaage PE620	Gebr. Bosch, Jungingen
Laborwaage XB22C	Precisa Gravimetrics, Dietikon Schweiz
<u>Zentrifugen und Zentrifugenbecher</u>	
Tischzentrifuge Eppendorf 5415R und 5415C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
Sorvall RC6+ mit den Rotoren SS-34, SLA1500, SLA3000, F10- 4x1000LEX	Thermo Fisher Scientific, Ulm
Nalgene Zentrifugenbecher für Sorvall-Rotoren SS-34, SLA-1500, SLA-3000, F10-4x1000LEX	Thermo Fisher Scientific, Ulm
Sorvall RC 12BP+ mit Rotor H-12000	Thermo Fisher Scientific, Ulm
Sigma 4K15 und 4-16KS	Sigma, Osterode

2.1.7 Verbrauchsmaterial

BIAcore-Sensorchips

CM3	GE Healthcare Europe, Freiburg
CMD2001	Xantec bioanalytics, Düsseldorf
CMDP	Xantec bioanalytics, Düsseldorf

Dialyseschläuche und Konzentratoren

Slide-A-Lyzer 0,5 ml Mini, MWCO 3,5 & 10 kDa	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
Spectra/Por 1, MWCO 6-8 kDa	Carl Roth, Karlsruhe
Dialyseschlauch Typ 27, MWCO 12-16 kDa	Biomol, Hamburg
Millipore Amicon Ultra-4 bzw. -15, MWCO 3, 10 oder 30 kDa	Merck Millipore, Billerica, MA
Vivaspin 500, MWCO 10 kDa	GE Healthcare Europe, Freiburg

Folien und Membranen

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

Kunststoffröhrchen

Kulturröhrchen mit Deckel, 13 ml	Sarstedt, Nürnberg
PP-Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PP-Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PP-Schraubbecher mit Deckel 100 ml	Sarstedt, Nürnberg

Küvetten

Halb-Mikro-Kunststoffküvetten, PS (10 mm)	Sarstedt, Nürnberg
Küvette, 2x Optisch, PS (10 mm)	Sarstedt, Nürnberg
Quarz, Typ 105.251-QS (DLS; 3 mm)	Hellma, Müllheim, Baden
Quarz, Typ 106-QS (CD; 0,1 mm)	Hellma, Müllheim, Baden
Quarz, Typ 108.002-QS (Absorption; 10 mm)	Hellma, Müllheim, Baden

Mikrotiterplatten

Nunc 96F MaxiSorb Black Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

Petrischalen

Petrischalen, 94 mm, PS Greiner Bio-One, Frickenhausen

Petrischalen, 150 mm, PS Sarstedt, Nürnberg

Pipettenspitzen

Kristallklar (0,5 bis 10 µl) Brand, Wertheim

Gelb (5 bis 200 µl) Sarstedt, Nürnberg

Blau (200 bis 1000 µl) Gilson International, Limburg-Offheim

SafeSeal-Tips, Filter Tip,
low binding (20 µl bis 1000 µl) Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf

Reaktionsgefäße

Safe-Lock 1,5 ml Eppendorf, Hamburg

Safe-Lock 2,0 ml Eppendorf, Hamburg

Reaktionsgefäß, dünnwandig,
0,1 und 0,2 ml Brand, Wertheim

Sterilfilter und Spritzen

Spritzenfilter Filtropur, PES, steril,
26 mm, (0,45 und 0,2 µm) Sarstedt, Nürnberg

Membranfilter Whatmann, nicht steril
(0,2 µm) Merck Millipore, Billerica, MA

Microsart Membranfilter, CN, steril,
50 mm (0,45 µm) Sartorius Stedim Biotech, Göttingen

Rotilabo-Spritzenfilter, PVDF, steril,
15 mm (0,2 µm) Carl Roth, Karlsruhe

Ultrafree-MC, PVDF, nicht steril,
10,6 mm (0,22 und 0,45 µm) Merck Millipore, Billerica, MA

Ultrafree-MC, PVDF, steril,
10,6 mm (0,22 µm) Merck Millipore, Billerica, MA

Dispenser-Tips 2,5 und 5 ml Brand, Wertheim

Einwegspritzen (1, 5, 10, 20, 50 ml) Becton Dickinson, Heidelberg

Einwegspritzen „Injekt“, 1 ml B. Braun, Melsungen

2.1.8 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

Alle hier aufgeführten wässrigen Lösungen wurden durch Autoklavieren oder Filtration durch eine 0,2 µm-Membran sterilisiert. Prinzipiell wurden alle Lösungen unter Verwendung von Millipore-Wasser hergestellt. Ausnahmen waren Kulturmedien, die mit entionisiertem Wasser, und Lösungen zur DNA-Präparation, die mit bidestilliertem Wasser angesetzt wurden. Die Antibiotika wurden den Flüssigmedien erst kurz vor der Verwendung zugesetzt. Antibiotika und Induktoren wurden bei -20 °C gelagert. Kulturplatten wurden bei 4 °C und Lösungen, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Antibiotika-Stammlösungen

Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in H ₂ O (1:1000 zum Medium)
Chloramphenicol (Cam)	30 mg/ml in 70 % Ethanol (1:1000 zum Medium)

Induktor-Stammlösungen

Anhydrotetracyclin (aTc)	2 mg/ml in DMF (1:10.000 zum Medium) oder 5 mg/ml in DMF (1:10.000 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)

Mit 5 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und im Autoklaven sterilisiert.

2x YT Medium

Bacto Tryptone	16 g/l
Bacto Yeast Extract	10 g/l
NaCl	5 g/l
Bacto Agar	15 g/l (nur für Kulturplatten)

Mit 5 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und im Autoklaven sterilisiert.

Lösungen für die Fermentation**Mineralsalzlösung:**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	31 mM
KH_2PO_4	19 mM
NH_4Cl	25 mM
$\text{Na}_3 \text{ Citrat} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	5 mM

Die Mineralsalzlösung hat nach dem Autoklavieren einen pH-Wert von 6,9.

Glucoselösungen:

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

MgSO₄-Stammlösung:

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

Thiamin-Stammlösung:

10,0 mg/ml Thiamin-Hydrochlorid	(sterilfiltriert)
---------------------------------	-------------------

FeCl₃-Stammlösung:

35,0 g/l FeCl ₃ • 6 H ₂ O	(sterilfiltriert)
---	-------------------

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

Zn-Acetat-Stammlösung:

8,0 g/l Zn-Acetat • 2 H ₂ O	(sterilfiltriert)
--	-------------------

Spurenelement-Stammlösung (sterilfiltriert):

$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	3,0 g/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,3 g/l
H_3BO_3	0,6 g/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g/l
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,2 g/l
EDTA	4 mM (sterilfiltriert)

Weitere Lösungen für die Fermentation:

L-Prolin	100 g/l
12,5 % (w/v) NH ₃	zur pH-Wert-Kontrolle
Antifoam Y-30 Emulsion	zur Unterdrückung von Schaumbildung

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer:

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

6x DNA Gel Loading Dye / Thermo Fisher Scientific:

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

TE-Puffer (zur Elution von gereinigter DNA, Qiagen GmbH):

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

EB-Puffer:

Tris/HCl pH 8,5	10 mM
-----------------	-------

Puffer für die *Primer*-Reinigung

TBE-Puffer:

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM

2 x Formamid-Auftragspuffer:

Formamid	98 % (v/v)
0,5 M EDTA	2 % (v/v)
Bromphenolblau	2 % (w/v)

Puffer für die SDS-PAGE**1x SDS-Laufpuffer (Fling & Gregerson, 1986):**

Tris	50 mM
Glycin	190 mM
SDS	1 g/l

Die Lösung hat einen pH Wert von ca. 8,8.

4x Lower-Tris:

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

4x Upper-Tris:

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

5x Auftragspuffer:

Tris/HCl pH 8,0	250 mM
SDS	7,5 % (w/v)
Glycerin	25 % (v/v)
Bromphenolblau	0,25 mg/ml
β -Mercaptoethanol (β -ME)	12,5 % (v/v) (bei reduzierendem Auftragspuffer)

Färbelösung:

Essigsäure (AcOH)	10 % (v/v)
Isopropanol	25 % (v/v)
Coomassie Brilliantblau R-250	0,1 % (w/v)

Entfärbelösung 1:

wie Färbelösung, aber ohne Coomassie Brilliantblau

Entfärbelösung 2:

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

Aufbewahrungslösung:

AcOH 7 % (v/v)

Glycerin 2 % (v/v)

Chromatographie-Puffer

IMAC-Laufpuffer:

NaP_i pH 7,5 40 mM

NaCl 500 mM

AEX-Laufpuffer:

Reinigung von His₆-PAS(600)-IFN und ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant

Tris/HCl pH 8,5 20 mM

EDTA 1 mM nur bei ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant

Reinigung von MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant

NaP_i pH 7,5 40 mM

Reinigung von pOmCI-Varianten und MKHis₆-OmCI

Tris/HCl pH 7,5 20 mM

EDTA 1 mM

CEX-Laufpuffer:

Reinigung von His₆-PAS(600)-YNSα8

Tris/HCl pH 7,0 20 mM

Reinigung von MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant

MES/NaOH pH 6,5 20 mM

EDTA 1 mM

Reinigung von MKHis₆-PAS(600)-OmCI

MES/NaOH pH 6,0 20 mM

EDTA 1 mM

SEC-Laufpuffer:

PBS:

KH ₂ PO ₄	4 mM
Na ₂ HPO ₄	16 mM
NaCl	115 mM

pH 7,4 stellt sich ein.

HBS:

Für anschließende BIAcore-Messungen der verschiedenen OmCI-Varianten.

HEPES/NaOH pH 7,4	10 mM
NaCl	150 mM

Puffer für das *Western Blotting***Transferpuffer:**

Methanol	20 % (v/v)
5x SDS-Puffer	20 % (v/v)

PBST-0,1:

PBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20

Blockierlösung:

3 % (w/v) BSA in PBST-0,1

Puffer für ELISA**TBS:**

Tris/HCl pH 7,4	20 mM
KCl	5 mM
NaCl	137 mM

Wasch-/Verdünnungspuffer (TBST-0,1):

TBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20

TBS und TBST-0,1 wurden als 10xStammlösungen angesetzt und für eine längere Haltbarkeit sterilfiltriert (0,2 µm).

Blockierlösung:

3 % (w/v) BSA in TBST-0,1

Puffer für SPR-Messungen

Immobilisierungspuffer:

NaAcetat/CH₃COOH pH 5,0 10 mM

Laufpuffer:

HBS-T0,05

HBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20

PBS-T0,05

PBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20

Regenerierungspuffer:

Glycin/HCl pH 2,7 10 mM

MgCl₂ 2 M

Alle SPR-Lösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µm) und im Ultraschallbad entgast.

Puffer für die RPC

Laufpuffer:

ACN 2 % (v/v)

TFA 0,065 % (v/v)

Elutionspuffer:

ACN 80 % (v/v)

TFA 0,05 % (v/v)

Für die anschließende ESI-MS Analytik wurde zur Ansäuerung 0,1 % (v/v) Ameisensäure (FA) verwendet.

CD/DLS-Puffer

KP_i pH 7,5 5 mM

K₂SO₄ 50 mM

Sonstige Puffer

Benzonase-Puffer:

Tris/HCl pH 8,0 100 mM

MgCl₂ 5 mM

Periplasma-Aufschlußpuffer:

Borsäure/NaOH pH 8,0	200 mM
Saccharose	500 mM
EDTA pH 8,0	1 mM (15 mM für die Fermentation)
2,2'-Dithiodipyridin	1 mM

Cytoplasma-Aufschlußpuffer:

NaP _i pH 7,5	40 mM
AEBSF	0,2 mM

EDTA-Stammlösung:

EDTA/NaOH pH 8,0	500 mM
------------------	--------

Die EDTA-Stammlösung wurde filtriert (Porengröße 0,2 µm) und autoklaviert.

2.2 Molekularbiologische Methoden**2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen**

nach Gebauer (2013)

Einzelkolonien von *E. coli* XL1-Blue, BL21, JM83, KS272 oder Origami B wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf LB-Agar-Kulturplatten und Inkubation über Nacht bei 37 °C erhalten. Nach der Transformation (Abschnitt 2.2.3) erfolgte die Selektion auf Plasmidtragende Zellen durch Zusatz der entsprechenden Antibiotika zum Nährmedium (Abschnitt 2.1.8). Die Kulturplatten mit den Bakterienkolonien wurden bei 4 °C gelagert. Wildtyp-Zellen wurden bis zu vier Wochen, transformierte Zellen hingegen nur für ein bis zwei Wochen zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet.

Flüssigkulturen wurden in der Regel mit LB-Medium unter Zusatz geeigneter Antibiotika angesetzt. Hierzu wurde 3 ml Medium in 13 ml Kulturröhrchen mit Belüftungskappe bzw. bei größeren Ansätzen 50 ml Medium in 100 ml Kulturkolben oder 2000 ml Medium in 5000 ml Erlenmeyerkolben mit einem Verschluss aus Aluminiumfolie verwendet. Bis zu einem Volumen von 50 ml wurden die Kulturen direkt mit einer Bakterienkolonie von der Agarplatte angeimpft. Größere Kulturen wurden im Verhältnis 1:40 (v/v) mit einer stationären 50 ml Übernachtskultur (30 °C, 180–200 rpm) inokuliert. Zelldichten wurden in 1 cm Kunststoffküvetten durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm (OD₅₅₀) mit Hilfe eines Ultrospec 2000-Spektralphotometers bestimmt. Bei optischen Dichten größer als 1,0 wurde die Zellsuspension zuvor in Medium verdünnt. Der Meßwert wurde jeweils um den Meßwert des reinen Mediums korrigiert.

Zur dauerhaften Konservierung von *E. coli*-Stämmen wurde 0,5 ml einer stationären Übernachtskultur mit 1,0 ml hitzesterilisiertem 87 % (v/v) Glycerin versetzt, gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.2 Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

nach Schlapschy (2004)

Für die Aufnahme von Plasmid-DNA (Abschnitt 2.2.3) wurden die *E. coli*-Zellen mit Hilfe der klassischen CaCl₂-Methode (Cohen *et al.*, 1972) in eine transformationskompetente Form überführt. Je nach *E. coli*-Stamm wurden ca. 10⁵ bis 10⁶ Transformanden pro µg Plasmid-DNA erhalten.

50 ml LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotika wurde mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Ab einer optischen Dichte von OD₅₅₀ = 0,5 wurde die Kultur in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (Sigma 4K15 oder Sigma 4-16KS, 4416 g, 4 °C, 10 min) sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellsediment in 40 ml eiskalter 100 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert (s.o.). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 20 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nach wiederholter Zentrifugation (s.o.) wurden die Zellen in 2 ml 50 mM CaCl₂, 15 % v/v Glycerin resuspendiert und in 100 oder 200 µl Aliquots auf sterile vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Die Zellsuspension wurde entweder direkt für die Transformation verwendet oder bei -80 °C gelagert. Alle eingesetzten Lösungen wurden im Autoklaven dampfsterilisiert und vor der Verwendung im Kühlraum (4 °C) abgekühlt.

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

nach Gebauer (2013)

Zu einem 100–200 µl Aliquot der frisch hergestellten oder auf Eis aufgetauten CaCl₂-kompetenten *E. coli*-Zellen wurde 1 µl Plasmid-DNA, 5 µl eines Mutagenese-Ansatzes (Abschnitt 2.4.5) bzw. 7,5 µl eines Ligierungsansatzes (Abschnitt 2.4.3) pipettiert und für 30 min nach Mischen auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 5 min auf 37 °C erwärmt und die Zellen anschließend in 1 ml LB-Medium überführt und für 45 min bei 37 °C unter Schütteln bei 180 rpm inkubiert. Von der mit Plasmid-DNA transformierten Zellsuspension wurde 10 und 100 µl auf LB-Agarplatten mit dem geeigneten Antibiotikum ausplattiert. Für die mit einem Ligierungsansatz transformierten Zellen wurde noch eine zusätzliche Platte mit den restlichen Zellen angesetzt. Hierfür wurde die übriggebliebene Zellsuspension zentrifugiert (MiniSpin, 5000 rpm, 2 min), das Medium abgezogen, die Zellen in 100 µl LB-Medium resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Zusätzlich wurden 100 µl der Zellsuspension

transformiert mit der Kontroll-Ligierung ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.4 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA

nach Gebauer (2013)

Für die Isolierung von zirkulärer Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Plasmid-Isolierungskits der Firma Qiagen verwendet. Das Funktionsprinzip ist die Kombination aus alkalischer Lyse der Bakterienzellen (Birnboim & Doly, 1979) mit anschließender Adsorption der Plasmid-DNA an einem Trägermaterial (z. B. Anionenaustauscher, Silicagel).

Für die Analyse von Transformanden, z. B. nach der Neukonstruktion von Plasmiden, erfolgte die Plasmid-Isolierung im analytischen Maßstab mit Hilfe des *QIAprep Spin Plasmid Mini Kit*. Dazu wurde 3 ml einer stationären Übernachtskultur eingesetzt und nach dem Protokoll des Herstellers verarbeitet. Die Plasmid-DNA wurde im letzten Schritt in 50 µl EB-Puffer aufgenommen. Je nach verwendetem *E. coli* Stamm und Plasmid wurde mit diesem Präparationsverfahren 5–10 µg DNA isoliert. Für Klonierungen, bei welchen größere Mengen an Plasmid-DNA benötigt wurden, wurde mit Hilfe des *Qiagen Plasmid Midi Kit* die Plasmid-DNA aus 50 ml einer stationären Übernachtskultur nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Dabei wurde in der Regel ca. 100 µg Plasmid-DNA in 100 µl EB-Puffer erhalten. Die in EB-Puffer gelöste Plasmid-DNA wurde direkt zur Spaltung mit Restriktionsenzymen im analytischen oder präparativen Maßstab eingesetzt (Abschnitt 2.4.1) oder bei -20 °C gelagert.

2.3 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA

Doppelsträngige DNA-Fragmente wurden in Abhängigkeit von ihrer Größe mit Hilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese in Gegenwart von Ethidiumbromid (Sambrook *et al.*, 2001) aufgetrennt. Dieses Verfahren wurde sowohl im analytischen Maßstab zur Restriktionsanalyse von Plasmiden als auch im präparativen Maßstab zur Isolierung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde hingegen zur Reinigung von Oligodesoxynukleotiden (> 50 bp) oder zur Auftrennung von DNA-Fragmenten bei der DNA-Sequenzierung verwendet.

2.3.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

nach Schlapschy (2004)

Zur Analyse von unverdauter Plasmid-DNA oder von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau wurde die Agarose-Gelelektrophorese mit 1 % (w/v) Agarose-Gelen durchgeführt. Dazu wurde 0,5 g Agarose in 50 ml 1 x TAE-Puffer eingewogen, in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte (durch mehrmaliges Schwenken überprüft), auf ca. 50–60 °C unter fließendem Wasser abgekühlt, versetzt mit 1/10.000 Volumen einer 1 %igen (w/v) Ethidiumbromidlösung und in eine Gelkammer mit

Geltaschenformer (8 Taschen oder 12 Taschen) gegossen. Nach Erstarren der Lösung war das Gel typischerweise 10,5 cm lang, 7,5 cm breit, und 0,5 cm dick. Danach wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt, die im Anschluß mit 1xTAE-Puffer befüllt wurde. In der Regel wurden die Taschen mit 20 µl (8 Taschen-Gel) oder 15 µl (12 Taschen-Gel) DNA-Lösung, die vorher mit 1/6 Volumen des 6x Auftragspuffers versetzt worden war, beladen.

Zudem wurde 6 µl 1 kb oder 100 bp Markerlösung der ebenfalls mit 6x Auftragspuffer versetzt, aufgetragen. Die Elektrophoresedauer betrug 45–60 min bei einer Spannung von 90 V. Danach wurde das Gel entnommen und die DNA-Fragmente wurden anhand der Interkalation des Ethidiumbromids durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Rotfilters photographiert.

2.3.2 Präparative Gelelektrophorese

nach Gebauer (2013)

Die präparative Reinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten (Inserts oder Vektor-Fragmente) erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese analog zu Abschnitt 2.3.1, wobei eine Agarose mit besonders niedrigem Schmelzpunkt verwendet wurde (*Low Melting Point Agarose*). In der Regel wurden 1 %ige (w/v) Agarose-Gele mit breiteren Taschen hergestellt, die mit einem größeren Probenvolumen von 40-60 µl beladen wurden. Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei einer Spannung von 70 V für 90 min. Im Anschluß wurden die DNA wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben sichtbar gemacht, jedoch mit UV-Licht geringerer Intensität (365 nm), um Strahlenschäden zu vermeiden, und die gewünschten DNA-Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die so isolierte DNA wurde anschließend mittels des *QIAquick Gel Extraction Kits* gemäß Herstellerangaben aus den Gelstücken extrahiert, gereinigt und mit 30 µl EB-Puffer von dem Säulenmaterial eluiert. Die Konzentration der isolierten DNA wurde dem Spektrophotometer NanoDrop 2000 bestimmt und die Probe bis zur weiteren Verwendung auf Eis oder bei -20 °C gelagert.

2.3.3 Denaturierende Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese

nach Gebauer (2013)

Da bei der Synthese von Oligodesoxynukleotiden mit einer Länge von > 50 bp trotz HPLC-Reinigung der Prozentsatz unvollständiger Sequenzen erfahrungsgemäß nachteilig ist, wurden diese zusätzlich durch denaturierende Harnstoff/Polacrylamid-Gelelektrophorese gereinigt. Die Reinigung erfolgte ausgehend von dem lyophilisierten Endprodukt eines 40 nmol-Syntheseansatzes gemäß dem von Skerra (1989) beschriebenen Protokoll.

Ausgehend von einer Fertiglösung mit 8,3 M Harnstoff, 25 % (w/v) Acrylamid-Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 19:1 (Rotiphorese Sequenziergel-Konzentrat), einer 8,3 M Harnstoff-Fertiglösung (Rotiphorese Sequenziergel-Verdünner) sowie 10 x TBE wurden 12 %ige (w/v) Acrylamid-Gele hergestellt. Durch Zugabe von 40 µl TEMED und 1 ml 10 % (w/v) APS zu 100 ml dieser Lösung wurde die Polymerisation gestartet. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet. Die zu polymerisierende Acrylamid-Lösung wurde zwischen zwei Gelplatten (20 x 40 cm), die mit entsprechendem Abstandshaltern (1,5 mm Dicke) durch Klammern fixiert waren, gefüllt und mit einem Geltaschenformer mit 6 Taschen versehen. Nach der Polymerisation wurden die Abstandshalter entfernt und die Gelkammer vertikal in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt.

Das lyophilisierte Rohprodukt (*Primer*) eines 20 nmol-Syntheseansatzes (Thermo Fisher Scientific) wurde zunächst auf eine Konzentration von 100 pmol/µl mit ddH₂O eingestellt. Hiervon wurden 40 µl der *Primer*-Lösung mit 40 µl Formamid-Auftragspuffer versetzt, für 5 Minuten im Heizblock auf 95 °C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten. Je zwei der großen Taschen wurden mit je 40 µl der *Primer*-Lösung mittels einer Hamilton-Spritze befüllt. Die Laufzeit des Gels betrug 4–5 Stunden bei 40 Watt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf eine UV-durchlässige Kunststoffolie überführt und die Oligodesoxynukleotid-Banden durch *UV-Shadowing* (bei 254 nm) vor einer DC-Fluorescein-Indikatorplatte sichtbar gemacht. Die dem vollständigen *Primer* entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten (zwei Gelstücke) und zur Zerkleinerung in 1 ml-Kunststoffspritzen überführt, die am vorderen Ende zugeschmolzen und mit einer Kanüle durchbohrt waren. Die Gelstücke wurden mit dem Stempel am vorderen Ende der Spritze zusammengedrückt und nach Entfernen des Stempels mit 0,5 ml TE-Puffer versetzt, woraufhin die Masse unter Druck in ein steriles 13 ml Röhrchen gepresst wurde. Die in der Spritze verbliebenden Reste werden erneut mit 0,5 ml TE-Puffer versetzt und ausgepresst. Die erhaltene Suspension wurde über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

Anschließend wurde die Gelmasse mittels eines Mikrozentrifugenfilters (0,22 µm) abgetrennt (MiniSpin, 13400 rpm, RT, 30 sec), das Filtrat vereinigt und dreimal mit 1-Butanol extrahiert, wobei die wässrige Phase auf ca. 0,4 ml eingeeengt wurde. Zur DNA-Fällung wurden 40 µl NaAcetat (3 M), 4 µl MgCl₂ (1 M) und 1 ml EtOH (100 %, RT) hinzugegeben und der Ansatz bei - 20 °C für ca. 1 Stunde inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (Eppendorf 5418R, 14000 rpm, 4 °C, 30 min) wurde das Präzipitat mit 500 µl auf - 20 °C vorgekühltem 70 %igen (v/v) Ethanol gewaschen, zentrifugiert, bei RT getrocknet und in 50 µl H₂O gelöst. Zum Schluß erfolgte die Konzentrationsbestimmung des gereinigten Oligodesoxynukleotids (meist 1:200 verdünnt in TE-Puffer) nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (Abschnitt 2.7.3) anhand der Absorption bei 260 nm. Der Extinktionskoeffizient des *Primers* berechnete sich aus der Summe der Absorptionsbeiträge der einzelnen Basen (A: 15,0 mM⁻¹cm⁻¹, C: 7,4 mM⁻¹cm⁻¹, G: 11,8 mM⁻¹cm⁻¹, T: 8,8 mM⁻¹cm⁻¹).

2.4 *In vitro*-Modifizierung von DNA

2.4.1 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

nach Gebauer (2013)

Zur Restriktionsanalyse von Plasmiden (Sambrook *et al.*, 2001) sowie zur Präparation von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten für weitere Klonierungsschritte wurden die DNA-Moleküle mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Der Restriktionsverdau wurde in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem durchgeführt. Wurde eine Spaltung mit mehreren Enzymen durchgeführt, wurde derjenige Puffer gewählt, in dem alle Enzyme maximale Aktivität besaßen. Konnte kein solcher Puffer gefunden werden oder wurden unterschiedlichen Temperaturen benötigt, wurden die Reaktionen nacheinander durchgeführt und die DNA dazwischen mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* gereinigt und in 30 µl EB-Puffer aufgenommen.

Die Restriktionsspaltung im analytischen Maßstab wurde mit 300–500 ng Plasmid-DNA und je 2,5 bis 5 U einer oder mehrerer Restriktionsendonukleasen in einem Volumen von 20 µl durchgeführt und für 1–2 h bei der für das Enzym empfohlenen Temperatur, meistens 37 °C, inkubiert. Spaltungen im präparativen Maßstab wurden in 40 oder 50 µl mit 2 bis 3 µg Plasmid-DNA und jeweils 20 bis 30 U der entsprechenden Endonuklease durchgeführt. Anschließend wurden diese Ansätze zwischen 2 und 4 h bei der optimalen Reaktionstemperatur inkubiert.

2.4.2 Dephosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden

nach Gebauer (2013)

Sollte eine präparierte PAS-Genkassette, die durch Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *SapI* oder *EarI* isoliert worden war, in einen mit *SapI* linearisierten Empfängervektor inseriert werden, wurden die 5'-Enden des Empfängervektors dephosphoryliert, um eine intramolekulare Ligierung zu verhindern. Hierfür wurde 1 U der Alkalischen Phosphatase (FastAP, aktiv in allen Puffersystemen) direkt nach dem Verdau mit *SapI* und Hitzeinaktivierung zum präparativen Restriktionsansatz hinzu pipettiert. Die Mischung wurde für 15–60 min bei 37 °C inkubiert und die darin enthaltenen Enzyme anschließend mit Hilfe eines Silikagel-Säulchens (*QIAquick PCR Purification Kit*) nach den Angaben des Herstellers abgetrennt.

2.4.3 Ligierung von DNA-Fragmenten

nach Gebauer (2013)

Zur Konstruktion neuer Plasmide wurden DNA-Fragmente mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft. Hierzu wurde die DNA des Empfängervektors und des Inserts zunächst durch präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigt (Abschnitt 2.3.2) und zuvor dephosphoryliert, sofern nötig (Abschnitt 2.4.2). Die Konzentration der DNA-Lösungen wurde mit dem NanoDrop 2000 Spektrophotometer bestimmt. Für einen Ligierungsansatz wurden 20–50 fmol linearisierter Empfängervektor eingesetzt sowie eine drei- bis sechsfache molare Menge (Insertion von mehreren PAS#1(200)-Genkassetten) an Insert-DNA. Zusätzlich zu den zu ligierenden DNA-Fragmenten wurde 1,5 µl 10x Puffer (Fermentas; 400 mM Tris/HCl pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP) und 1 µl T4 DNA-Ligase (Fermentas; 1 Weiss Unit/µl) hinzugegeben und mit sterilem ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 15 µl aufgefüllt. Parallel wurde ein Kontroll-Ligierungsansatz nur mit der Vektor-DNA angesetzt, der zur Quantifizierung der Religierung diente. Beide Ansätze wurden entweder für ca. 16 h bei 16 °C oder für 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde jeweils 7,5 µl der Lösungen zur Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen (100 µl Suspension) verwendet (Abschnitt 2.2.3).

2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von Genen

nach Schlapschy (2004)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Saiki *et al.*, 1988) wurde in der vorliegenden Arbeit zur Amplifizierung von Genfragmenten eingesetzt. Die in der PCR paarweise eingesetzten *Primer* flankierten jeweils den zu amplifizierenden Bereich und besaßen an ihrem 3'-Ende eine mindestens 18 bp lange, zur Matrizen-DNA komplementäre Sequenz. Für die PCR wurde die Q5 *Hot Start High-Fidelity* DNA-Polymerase (NEB) verwendet, die eine 100-fach kleinere Fehlerrate als die *Taq* DNA-Polymerase und eine 12-fach kleinere Fehlerrate als die *Pfu* DNA-Polymerase besitzt. Der Standard-Reaktionsansatz für eine PCR enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl ca. 50 ng Matrizen-DNA und je 2,5 µl der beiden 10 µM *Primer* (25 pmol). Weiterhin enthielt der Ansatz 10 µl 5x Q5-Puffer, sowie 1 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Nach Auffüllen mit ddH₂O auf 50 µl wurde 1 U der Q5 DNA-Polymerase zugegeben. Die Aktivität der Q5-Polymerase war bei RT durch einen Aptamer-basierten Inhibitor blockiert, der unter normalen Zyklusbedingungen freigesetzt wurde, so dass ein *Hotstart* nicht nötig war (NEB, Version 8.0 - 9/15). Die PCR wurde in wiederholten Zyklen durchgeführt, die aus je drei Schritten bestanden: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 98 °C für 10 s; 2. Hybridisierung (*Annealing*) der *Primer* an die DNA-Matrix bei 50–72 °C (je nach Schmelztemperatur des gebildeten Hybrids) für 20 s; 3. Synthese (*Elongation*) der DNA bei 72 °C für 15 s (20–30 s/kb). Der Zyklus wurde in der

Regel 30-mal durchlaufen. Zusätzlich wurde vor dem Start der PCR-Zyklen eine initiale Denaturierung (*Initial Denaturation*) bei 98 °C für 30 s und nach Durchlaufen der PCR-Zyklen ein abschließender Syntheseschritt (*Final Extension*) bei 72 °C für 2 min durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde anschließend durch präparative Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.3.2) isoliert und mittels des *QIAquick Gel Extraction Kits* nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.4.5 Ortsgerichtete Mutagenese nach dem QuikChange-Verfahren

nach Gebauer (2013)

Zur ortsgerichteten Einführung von Punktmutationen wurde die QuikChange-Mutagenese verwendet (Braman *et al.*, 1996). Bei diesem PCR-basierten Verfahren diente das Ausgangsplasmid, in das eine Mutation eingeführt werden soll, als Matrize. Mit Hilfe paarweise komplementärer *Primer*, die die gewünschte Mutation enthielten, und einer thermostabilen *Pfu* Ultra II Fusion DNA-Polymerase (Agilent) mit *Proof-Reading*-Aktivität wurde das Plasmid davon ausgehend vollständig repliziert. Im Anschluß daran wurde das Ausgangsplasmid durch eine methylierungsabhängige Restriktionsspaltung mit der Endonuklease *DpnI* verdaut, während die neu synthetisierte DNA nicht methyliert war und unverändert blieb, also zur Transformation von *E. coli* verwendet werden konnte. Das Design der Mutagenese-*Primer* orientierte sich an den Empfehlungen des Herstellers des *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene). Ein typischer Reaktionsansatz von 50 µl enthielt ca. 70–125 ng des zu mutierenden Plasmids, isoliert aus einem dam⁺ *E. coli* Stamm, wie z. B. XL1-Blue; jeweils 1 µl der 10 µM Mutagenese-*Primer* (10 pmol); 1,0 µl dNTP-Mix (10 mM dNTP, Fermentas) und 5 µl des 10x *Pfu* Ultra II Puffers (NEB; mit einer finalen Konzentration von 2 mM MgCl₂). Der Ansatz wurde zunächst im Thermocycler für 30 s auf 95 °C (*Hotstart*) erhitzt, bevor die Reaktion durch Zugabe von 1,0 µl *Pfu* Ultra II Fusion DNA-Polymerase gestartet wurde. Die PCR erfolgte auch hier in drei Schritten: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C für 30 s; 2. Hybridisierung (*Annealing*) der *Primer* bei 45–52 °C für 1 min; 3. Synthese (*Elongation*) der DNA bei 68 °C für 1 min pro kb Plasmid. Der Zyklus wurde insgesamt 18-mal durchlaufen. Bei Mutagenesen, bei denen mehrere Basenpaare geändert werden sollten, und das beschriebene Protokoll nicht funktionierte, konnte es von Vorteil sein, eine zweistufige Mutagenese-PCR (Wang & Malcolm, 1999) durchzuführen. Es erfolgt vor der PCR mit beiden *Primer* zunächst erstmal wird eine PCR mit jeweils nur einem *Primer* in zwei separaten Ansätzen.

Hierfür wurde jeweils die Hälfte der Reagenzien eingesetzt in zwei separaten Reaktionsgefäßen mit jeweils nur einem *Primer* versetzt. Zuerst wurden 10 Zyklen des oben beschriebenen PCR-Programms durchgeführt, diesmal nach Zugabe von 0,5 µl *Pfu* Ultra II DNA-Polymerase pro Ansatz. Danach wurden beide Ansätze vereinigt, mit weiteren 0,5 µl *Pfu* Ultra II DNA-Polymerase versetzt und nochmals 18 Zyklen des PCR-Programms

durchgeführt. Abschließend wurde zu 40 µl des Ansatzes 1 µl (10 U) *DpnI* pipettiert und für 1 bis 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Überprüfung der DNA-Amplifizierung und des *DpnI* Verdau wurden 10 µl des Ansatzes vor sowie nach dem *DpnI*-Verdau mit einem analytischen Agarose-Gel (Abschnitt 2.3.1) analysiert. Auch wenn keine Amplifikation nachweisbar war, wurde 5 µl des Ansatzes zur Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* XL1-Blue-Zellen (100 µl Suspension) eingesetzt (Abschnitt 2.2.3).

2.4.6 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Durch Mutagenese veränderte oder durch PCR amplifizierte DNA-Abschnitte wurden einer Sequenzanalyse unterworfen. Anfangs wurden die Sequenzierreaktionen noch am Lehrstuhl für Biologische Chemie mit Hilfe des institutseigenen ABI PRISM 310-Sequenziergeräts durchgeführt; später wurden diese Analysen jedoch an Eurofins Genomics in Ebersberg ausgelagert. Beide Methoden basierten auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (1977).

2.4.6.1 Sequenzanalyse mit Hilfe eines ABI PRISM 310-Sequenziergeräts

nach Schlapschy (2004)

Hierfür wurde das ABI PRISM Big Dye *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* verwendet. Dieses enthielt eine modifizierte *Taq* DNA-Polymerase (Ampli Taq ; Tabor & Richardson, 1987) sowie Terminatoren (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), die mit jeweils unterschiedlichen Dichlorrhodamin-Molekülen gekoppelt waren (Rosenblum *et al.*, 1997). Auf diese Weise wurde die wachsende DNA-Kette während der Polymerasereaktion in statistischer Weise abgebrochen und gleichzeitig mit dem der Terminatorbase entsprechenden Fluorophor markiert. Die so entstandenen DNA-Fragmente wurden im Sequenziergerät mittels Kapillar-Elektrophorese in einem geeigneten Polymer (*Performance Optimized Polymer 6*, POP-6) aufgetrennt und anhand ihrer Fluoreszenzgruppen detektiert. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit Hilfe einer geeigneten Software (ABI PRISM DNA *Sequencing Analysis 3.3*) interpretiert und als Elektropherogramm bzw. als Textdatei ausgegeben.

Generell wurden zu 4 µl BigDye *Ready Reaction Mix* je 2 µl Plasmid-DNA (ca. 300 ng), 2 µl eines geeigneten *Primers* (1,6 µM) und 2 µl H₂O gegeben. Die Mischung wurde folgendem PCR-Zyklus unterworfen: 1mal 95 °C, 5 min; 25mal 95 °C 30 s; 50 °C, 30 s; 60 °C, 1 min und danach bis zur Entnahme auf 10 °C gekühlt. Danach wurde das PCR-Produkt durch Zugabe von 2,5 µl 125 mM EDTA pH 8,0 und 30 µl EtOH (p.a.) für 15 min bei RT gefällt. Der Ansatz wurde abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, 14000 rpm, 30 min) und der Überstand sofort abgenommen. Daraufhin wurde die gefällte DNA vorsichtig mit 125 µl 70 % (v/v) EtOH (p.a.) gewaschen und nochmals zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, 14000 rpm, 15 min). Der Überstand wurde abermals abgenommen, das Präzipitat mit offenem

Deckel bei RT getrocknet und schließlich in 14 µl des mitgelieferten TSR-Puffer (*Template Suppression reagent*) aufgenommen. Die Probe wurde in das dafür vorgesehene Reaktionsgefäß überführt, in das ABI PRISM 310-Sequenziergerät gestellt und die Kontroll-Software (*ABI PRISM 310 Data Collection*) gestartet. Die beschriebenen zeitaufwendigen Fällungs- und Reinigungsschritte des PCR-Produkts wurden später durch Anwendung des *DNA Sequencing Clean-up Kits* (Zymo Research) ersetzt.

2.4.6.2 Sequenzanalyse mit Hilfe eines SmartSeq Kits von Eurofins Genomics

Für die Sequenzanalyse mit Hilfe des SmartSeq Kits wurde 15 µl der Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 50–100 ng/µl, mit 2 µl des entsprechenden Sequenzier-Primers (10 µM) versetzt, in ein mit Barcode beschriftetes Gefäß des *SmartSeq Kits* von Eurofins Genomics gegeben und eingeschickt. Das Sequenziererergebnis war üblicherweise am nächstfolgenden Tag auf der Eurofins Genomics Webseite abrufbar.

2.5 Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

2.5.1 Anzucht, Induktion und Ernte von *E. coli*-Kulturen im Schüttelkolben

2.5.1.1 Expression im Periplasma von *E. coli*

nach Gebauer (2013)

Für die bakterielle Produktion von His₆-PAS(600)-YNSα8 wurde ein pASK75-Derivat (Skerra, 1994) als Expressionsvektor verwendet, welches für eine Fusion des maturen Proteins mit der Signalsequenz des OmpA (Outer Membrane Protein A; Movva *et al.*, 1980) kodiert. Die OmpA-Signalsequenz vermittelt die Sekretion des heterologen Proteins in den periplasmatischen Raum von *E. coli*, in dessen oxidierendem Milieu sich Disulfidbrücken ausbilden können. Das rekombinante Protein kann aus diesem Zellkompartiment in prozessierter und gefalteter Form isoliert werden, indem das Periplasma selektiv unter Bildung von Sphäroplasten aufgeschlossen wird (Witholt *et al.*, 1976). Dabei wird die äußere Membran von *E. coli* durch Komplexierung zweiwertiger Ionen destabilisiert, sodass die periplasmatischen Proteine in das Aufschlussmedium freigesetzt werden (Skerra, 1989). Gleichzeitig werden hypertone Bedingungen – eingestellt durch eine hohe Konzentration an Saccharose – die Sphäroplasten stabilisiert. Der in dieser Arbeit verwendete Periplasma-Aufschlußpuffer (Abschnitt 2.1.8) enthielt (anstelle von 100 mM Tris) 200 mM Borsäure und zusätzlich 1 mM Dithiodipyridin. Borsäure wirkt als Inhibitoren gegenüber Serinproteasen und Dithiodipyridin gegenüber Cysteinproteasen (siehe auch Abschnitt 4.1.3.2 Proteolytischer Abbau).

Zur Herstellung rekombinanter Proteine im 2 l-Kulturmaßstab wurde zunächst 50 ml LB-Medium mit 100 mg/l Amp versetzt und mit einer Einzelkolonie des mit dem entsprechenden Plasmid transformierten *E. coli*-Stamm KS272 angeimpft und über Nacht bei 30 °C im

Schüttler (180–200 rpm) inkubiert. Im Anschluß daran wurde 2 l LB-Medium (in einem 5 l Erlenmeyerkolben) in einem Verhältnis von 1:40 mit der stationären Übernachtskultur angeimpft. Zur Bestimmung der Zelldichte (OD_{550}) wurde der Kultur eine Probe entnommen und im Spektrometer bei 550 nm vermessen.

Die Kultur wurde im Schüttler bei 22 °C und 180 rpm bis zu einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$ inkubiert. Durch Zugabe von 200 µg/l aTc wurde die Produktion des rekombinanten Proteins gestartet. Für PASylierte Proteine wurde zum Induktionszeitpunkt auch 0,5 g/l L-Prolin und 2,5 g/l Glucose zur Kultur hinzugegeben. Die Induktionsdauer betrug jeweils 3 h.

Zur Ernte wurden die *E. coli*-Zellen durch einen ersten Zentrifugationsschritt (SLA-3000, 5000 rpm, 4 °C, 15 min) vom Kulturmedium abgetrennt. Das Sediment wurde in den darauffolgenden Schritten immer auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde das Kulturmedium verworfen und noch vorhandene Restflüssigkeit mit einer Pipette abgezogen. Zur Isolierung der periplasmatischen Zellfraktion wurde das Bakterien-Sediment in einem 1:100 Kulturvolumen an eiskaltem Periplasma-Aufschlußpuffer, mit 20 mg/l Lysozym versetzt, durch wiederholtes Aufziehen mit einer Glaspipette zügig resuspendiert. Die Suspension wurde in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt und für 30 min auf Eis inkubiert, bevor die Sphäroplasten durch Zentrifugation abgetrennt wurden (Sigma 4K15 oder Sigma 4-16KS, 5000 rpm, 4 °C, 20 min). Nach erneuter Zentrifugation (SS-34, 15000 rpm, 4 °C, 15 min) wurde der geklärte Extrakt entweder über Nacht gegen das 100-fache Volumen IMAC-Puffer dialysiert und direkt vor der Chromatographie an Ni-Sephrose High Performance (Abschnitt 2.7.1.1) sterilfiltriert (0,45 µm) oder ohne Dialyseschritt bei -20 °C eingefroren. Im Verlauf des Kulturwachstums wurden zur Analyse der Proteinproduktion mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.7.2) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (meistens halbstündlich) Gesamtzellproteinextrakte hergestellt. Hierfür wurde 1 ml der Kultur zentrifugiert (Eppendorf MiniSpin, 13200 rpm, RT, 5 min), der Überstand verworfen, die Zellen in 80 µl Benzonase-Lösung (12,5 U/ml in Benzonase-Puffer, siehe Abschnitt 2.1.8) resuspendiert und mit 20 µl 5x Auftragspuffer (reduzierend) für die SDS-PAGE gemischt. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat nach Hitzebehandlung (5 min, 95 °C) für die SDS-PAGE verwendet. Zur besseren Vergleichbarkeit unterschiedlicher Expressionszeitpunkte wurden die Proben in auf die Zelldichte normierter Menge aufgetragen.

2.5.1.2 Expression im Cytoplasma von *E. coli*

nach Breibeck (2016); Rauth (2015)

Zur cytoplasmatischen Produktion von MKHis₆-PAS(600)-OmCI und MKHis₆-OmCI wurde der *E. coli*-Stamm Origami B mit seinem weniger reduzierendem Cytosol (Ritz *et al.*, 2001), was die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken ermöglicht, verwendet. Zusätzlich wurde die eukaryotische Disulfidisomerase PDI (Skerra, 1989; Pihlajaniemi *et al.*, 1987), koexprimiert (siehe Abschnitt 3.3.2.2). Die Zellen wurden nach der Produktion des rekombinanten Proteins mit Hilfe einer Hochdruckzelle (*French Press*) aufgeschlossen. Durch anschließende Zentrifugation wurden die unlöslichen Bestandteile vom löslichen Cytoplasma-Extrakt abgetrennt. Der verwendete pASK75-Vektor (Skerra, 1994) trug die Gene für OmCI und die eukaryotische PDI auf einem dicistronischen Operon unter Kontrolle des *tet*-Promotor-Operators. Durch Zugabe von 200 µg/l aTc wurde die rekombinante Produktion der zwei Proteine gestartet.

Zur präparativen cytoplasmatischen Produktion von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI wurden *E. coli* Origami B Zellen mit dem jeweiligen Expressionsplasmid pASK75-T7RBS-His₆-OmCI-PDI bzw. pASK75-T7RBS-His₆-PAS#1(600)-OmCI-PDI transformiert. Als Vorkultur wurde 50 ml 2YT-Medium (100 mg/l Amp) mit einer frisch transformierten Einzelkolonie, die maximal zwei Tage alt war, angeimpft. Die Vorkultur wurde bei 30 °C im Schüttler bei 180–200 rpm für ca. 18 h inkubiert, bis sich ein OD₅₅₀-Wert von ~ 3 einstellte. Daraufhin wurde 2 l 2YT-Medium (im 5 l Erlenmeyerkolben), versetzt mit 100 mg/l Amp, mit einer Start-OD von 0,06–0,08 angeimpft (typisches Volumenverhältnis 1:40). Die Kultur wurde im Schüttler bei 22 °C und 180 rpm für weitere 10 bis 11 h bis zu einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,6 inkubiert. Durch Zugabe von 200 µg/l aTc wurde die Produktion des rekombinanten Proteins gestartet. Für PASylierte Proteine wurden zum Induktionszeitpunkt noch 0,5 g/l *L*-Prolin und 2,5 g/l Glucose zur Kultur hinzugegeben. Das Zellwachstum wurde durch regelmäßige Messung der OD₅₅₀ überwacht und der Fortgang der Proteinbiosynthese in Gesamtzellextrakten nach Induktion durch reduzierende SDS-PAGE überprüft.

Die Ernte des 2 l-Ansatzes erfolgte nach 23–24 h, indem zunächst die Zellen von dem Kulturmedium durch Zentrifugation (Sorvall RC 6+-Zentrifuge, F10-4x1000LEX, 4 °C, 20 min, 5000 rpm) abgetrennt wurden. Danach wurde das Zellsediment entweder bei -20 °C eingefroren oder direkt in 20–30 ml gekühltem IMAC-Laufpuffer resuspendiert und durch 4 Durchgänge in der großen Druckzelle (35 ml Probenvolumen) der *French Press* bei 16000 psi aufgeschlossen. Danach wurden die unlöslichen Bestandteile durch abermalige Zentrifugation (SS-34, 15000 rpm, 4 °C, 20 min) abgetrennt. Die lösliche Fraktion wurde sterilfiltriert (0,45 µm) und für die anschließende IMAC-Reinigung (Abschnitt 2.7.1.1) verwendet.

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

2.5.2.1 Expression im Periplasma von *E. coli*

nach Schlapschy (2004)

Für *In vivo*-Studien wurden größere Mengen der rekombinanten PASylierten Proteine His₆-PAS(600)-YNS α 8, His₆-PAS(600)-IFN und ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant benötigt. Diese wurden nach einer von Schiweck & Skerra (1995) etablierten Methode durch Fermentation von *E. coli* hergestellt. Es handelt sich dabei um ein diskontinuierliches (*Fed-Batch*) Fermentationsverfahren, bei dem die Bakterien in einem 10 l-Fermentergefäß mit Mineralsalzmedium kultiviert wurden, dem Ammoniak als Stickstoff- und Glucose als Kohlenstoffquelle zugefüttert wurde. Während des gesamten Verlaufs der Fermentation wurden homöostatische Bedingungen durch Kontroll- und Regeleinheiten für Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffpartialdruck gewährleistet.

Der *E. coli*-Stamm KS272 wurde mit dem entsprechenden pASK75-Derivat transformiert. Zusätzlich wurden die *E. coli*-Zellen mit einem Helferplasmid pTUM4, welches für die Gene der *E. coli* Thiol/Disulfid-Oxidoreduktasen *DsbA* und *DsbC* und der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen *FkpA* und *SurA* unter der Kontrolle konstitutiver Promotoren trägt, cotransformiert (Schlapschy *et al.*, 2006). Durch die Koexpression der verschiedenen periplasmatischen Faltungshelfer sollte die Ausbeute an korrekt gefalteter PASylierter Interferon-Variante erhöht werden.

Als Vorvorkultur wurde 2 ml mit den entsprechenden Antibiotika (100 mg/l Amp für die Selektion des Expressionsplasmids und 30 mg/l Cam für die Selektion des Helferplasmids pTUM4) versetztes LB-Medium mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und für 6–8 h bei 37 °C und 180–200 rpm inkubiert. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte daraufhin in 360 ml Mineralsalzlösung (siehe Abschnitt 2.1.8), der 40 ml 20 % (w/v) Glucose, 4 ml 1 M MgSO₄, 400 μ l Antibiotika-Stammlösung und 400 μ l Thiamin-Stammlösung zugesetzt worden war. Die Vorkultur wurde im Verhältnis 1:1000 mit der Vorvorkultur angeimpft und für ca. 26 h bei 30 °C und 180–200 rpm inkubiert. Die Zelldichte der stationären Vorkultur betrug typischerweise OD₅₅₀ = 1,5–2,0.

Das Kulturgefäß wurde mit 7 l-Mineralsalzlösung befüllt, sterilisiert und auf dem Magnetrührer fixiert. Vor dem Inokulieren der Fermenterkultur wurde die Fermentationslösung auf 25 °C temperiert und über einen Trichter die folgenden sterilen Lösungen zugegeben: 800 ml 20 % (w/v) Glucose, 80 ml 1 M MgSO₄, 8 ml der entsprechenden Antibiotika-Stammlösung sowie der Thiamin-Stammlösung, je 4 ml FeCl₃- und Zn-Acetat-Lösung, 10 ml Spurenelement-Lösung, 5 g in 50 ml H₂O vorgelöstes *L*-Prolin und 200 μ l 30 %ige Antifoam A-Lösung. Die Belüftung fand zunächst durch Druckluft statt, woraufhin dem im begasten Medium herrschenden Sauerstoffpartialdruck der relative Wert

"100 %" zugeordnet wurde. Die Rührgeschwindigkeit betrug 470 rpm (entsprechend 40 % der Maximalleistung des Geräts). Das Kulturmedium wurde im Verhältnis 1:20 mit der gesamten Vorkultur (400 ml) angeimpft und über Nacht bei 25 °C inkubiert. Der pH-Wert wurde durch Titration mit 12,5 % (w/v) Ammoniak bei pH 7,0 (niedrigster Wert: 6,0; höchster Wert: 7,4) konstant gehalten. Am nächsten Morgen (nach ca. 14 h) lag die Zelldichte bei $OD_{550} = 6$ und die Sauerstoffregulierung durch Begasung mit Druckluft bzw. reinem Sauerstoff (niedrigster Wert: 29 %; höchster Wert: 30 %) begonnen.

Um die Bakterienkultur mit ausreichend Kohlenstoff zu versorgen, wurde 14 ml/h 50 %ige (w/v) Glucose-Lösung ab einer Zelldichte $OD_{550} = 7,5$ hinzugegeben. Ab einer Zelldichte von $OD_{550} = 12,5$ wurde die Zufuhrgeschwindigkeit auf 20 ml/h, ab $OD_{550} = 18,5$ auf 30 ml/h und ab $OD_{550} = 22,5$ auf 40 ml/h erhöht. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte alle 30 min, indem der Kultur mit Hilfe einer 10 ml Spritze kleinere Probenmengen entnommen wurden, im Verhältnis 1:10-1:50 mit Mineralsalzlösung verdünnt und im Spektrometer bei 550 nm vermessen wurden. Zudem wurden von diesen verdünnten Proben Gesamtzellproteinextrakte für eine SDS-PAGE Analyse bereitgestellt. Weiterhin wurden der Kultur bei $OD_{550} = 13$ nochmals je 4 ml Fe- bzw. Zn-Stammlösung und 10 ml der Spurenelement-Lösung, sowie 200 µl 30 %ige Antifoam A-Lösung zugesetzt.

Die Genexpression wurde bei einer Zelldichte von $OD_{550} = 20$ mit 500 µg/l aTc induziert. Die Kultivierung wurde für weitere 2,5 h fortgesetzt und die Zellen im Anschluß zügig durch Zentrifugation (Sorvall RC 6+-Zentrifuge, F10-4x1000LEX, 4 °C, 20 min, 5000 rpm) geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden in ein kaltes 1000 ml-Becherglas überführt, in vorgekühltem Periplasma-Aufschlußpuffer mit Hilfe eines Magnetrührers resuspendiert, mit 250 µg/ml Lysozym versetzt und für 30 min im Kühlraum bei 4 °C gerührt, um einen vollständigen Periplasma-Aufschluß zu erreichen. Das eingesetzte Puffervolumen betrug $2 \text{ ml l}^{-1} OD_{550}^{-1}$, wobei die OD_{550} in der Regel bei 25 bis 33 lag. Der periplasmatische Proteinextrakt wurde in einem ersten Zentrifugationsschritt (Sorvall-Zentrifuge, SLA-1500-Rotor, 4 °C, 20 min, 11500 rpm) von den Sphäroplasten grob getrennt. In einem zweiten Zentrifugationsschritt (40 min, unter sonst gleichen Bedingungen) wurde der Extrakt von verbliebenen Zellen und Zelltrümmern geklärt.

Für die nachfolgende IMAC-Reinigung wurde der Periplasma-Extrakt viermal gegen das 10-fache Volumen IMAC-Laufpuffer (Abschnitt 2.1.8) dialysiert. Ausgefallenes Protein und Partikel wurden durch Zentrifugation (Sorvall-Zentrifuge, SLA-1500-Rotor, 4 °C, 30 min, 11500 rpm) und Sterilfiltrieren (0,45 µm) abgetrennt und die so erhaltene Proteinlösung sofort zur Chromatographie eingesetzt. Wurde nicht der komplette Periplasma-Extrakt aufgearbeitet, wurde ein Teil ohne Dialyseschritt für eine spätere Aufarbeitung bei -20 °C eingefroren.

2.5.2.2 Expression im Cytoplasma von *E. coli*

Zur cytoplasmatischen Biosynthese von MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant im 8 l-Maßstab wurde der *E. coli* Origami B-Stamm mit dem entsprechenden Derivat von pASK37 (Skerra & Plückthun, 1991) transformiert, der einen durch IPTG induzierbaren *lacUV5*-Promotor besitzt. Dessen Basalexpression konnte durch Zusatz von 1 % (v/v) Glucose im Nährmedium vollständig unterdrückt werden (Skerra, 1989). Um ausreichend große Kolonien nach der Transformation zu erhalten, wurden diese für ca. 21 h bei 37 °C inkubiert. Zur Proteinproduktion wurde entsprechend dem Protokoll zur periplasmatischen Fermentation vorgegangen, jedoch wurde eine höhere Temperatur von 30 °C für die Anzucht der Vorvorkultur, der Hauptkultur und während der Genexpressionsphase verwendet.

Die 2 ml Vorvorkultur wurde bei 30 °C für 16 h bei 200 rpm inkubiert. Die Zellen besaßen zu diesem Zeitpunkt eine Zelldichte von $OD_{550} = 2,4$. Die Vorvorkultur wurde zusätzlich mit 1 % Glucose versetzt, um die Basalexpression zu unterdrücken. Die darauffolgenden Vor- und Hauptkulturen enthielten nach dem etablierten Protokoll bereits Glucose mit einem Volumenanteil von 2 % (v/v). Die Vorkultur wurde mit einem Verhältnis von 1:1000 mit der Vorvorkultur angeimpft, bei 30 °C und 200 rpm für 30 h bis zu einer Zelldichte von $OD_{550} = 1,3$ angezogen. Mit der gesamten der Vorkultur (400 ml) wurde 7600 ml der zuvor sterilisierten Nährstofflösung angeimpft und über Nacht bei 30 °C kultiviert. Am nächsten Morgen (nach ca. 14 h) lag die OD_{550} zwischen 6 und 7. Mit der Sauerstoffregulierung wurde begonnen. Die Versorgung mit Kohlenstoff (50 %ige (w/v) Glucose-Lösung), Eisen, Zink und Spurenelementen, erfolgte analog dem Fermentationsprotokoll zur Herstellung periplasmatischer Proteine. Der OD_{550} -Wert der Kultur wurde alle 30 min bestimmt, und von jedem Zeitpunkt wurden Gesamtzellproteinextrakte für eine anschließende SDS-PAGE-Analyse angefertigt. Die Genexpression wurde bei einer Zelldichte von $OD_{550} = 28,5$ mit 0,5 mM IPTG induziert.

Nach 2,5 h erreichten die Zellen eine Zelldichte von $OD_{550} = 42$. Daraufhin wurde zur Zellernte zügig zentrifugiert (Sorvall RC 6+-Zentrifuge, F10-4x1000LEX, 4 °C, 20 min, 5000 rpm). Die sedimentierten Bakterien wurden bis zum Zellaufschluss bei - 20 °C gelagert. Dazu wurden die Zellen aus einer Fermentation in einem Gesamtvolumen von etwa 1 l 40 mM NaP_i pH 7,5 unter Zusatz von 0,2 mM AEBSF als Inhibitor für Serinproteasen resuspendiert, mit einem PANDA-Hochdruck-Homogenisator bei 400 bar aufgeschlossen und mittels subtraktiver AEX-Chromatographie gereinigt (Abschnitt 2.7.1.4).

2.6 Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in *Pichia pastoris*

Die rekombinante Herstellung der pOmCI-Varianten in *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) wurde im Rahmen einer Kooperation durch die Firma VTU Technology GmbH nach einem proprietären Protokoll durchgeführt (Weis & Purkarthofer, 2013). Als eukaryotischer Expressionsstamm besitzt *P. pastoris* Vorteile gegenüber prokaryotischen Expressionsorganismen hinsichtlich Proteinausbeute, Proteinfaltung und posttranslationalen Modifikationen, wobei er ähnlich einfach zu kultivieren ist wie *E. coli*. Zudem wächst *P. pastoris* schneller, ist billiger und einfacher zu handhaben als eukaryotische Säugerzellkulturen. *P. pastoris* ist ein methylothermer Organismus, der Methanol als einzige Kohlenstoffquelle metabolisieren kann. Für die heterologe Genexpression rekombinanter Proteine wird in der Regel der methanol-induzierbare Promotor des AOX1-Gens verwendet, das Bestandteil des physiologischen Methanolmetabolismus in *P. pastoris* ist und für eine Alkoholoxidase kodiert, die Methanol unter Verwendung von molekularem Sauerstoff zu Formaldehyd oxidiert (Krainer *et al.*, 2012).

Die Produktion der pOmCI-Varianten in den transformierten *P. pastoris* Zellen erfolgte in kontrollierten Bioreaktoren mit einem Kulturvolumen von 300 ml durch Sekretion in den Kulturüberstand mit Hilfe der α -Faktor Signalsequenz aus *Saccharomyces cerevisiae* (Lin-Cereghino *et al.*, 2013). Die Genexpression wurde durch Zugabe von Methanol gestartet, 73 Stunden später erfolgte die Ernte des Kulturüberstands durch Filtration. Der Kulturüberstand wurde bei -80 °C eingefroren und zur Reinigung und Analytik an den Lehrstuhl für Biologische Chemie verschickt.

2.7 Proteinchemische Methoden

2.7.1 Chromatographische Verfahren

2.7.1.1 Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

nach Breibeck (2016)

Als schonenden ersten Reinigungsschritt aus dem Periplasma oder dem löslichen Zellextrakt wurde für die meisten Proteine in dieser Arbeit die Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*, IMAC) genutzt (Porath *et al.*, 1975). Die Bindung von Proteinen an das Säulenmaterial erfolgt hierbei über die Komplexbildung freier Valenzen von immobilisierten Übergangsmetall-Ionen durch kumulierte Cystein- und Histidin-Reste des Proteins, wobei die Metallionen an der Säulenmatrix über chelatisierende Liganden verankert sind. Die Adsorption unter nativen Pufferbedingungen wurde bei den hier untersuchten rekombinanten Proteinen jeweils durch ein His₆-Tag gewährleistet (Skerra *et al.*, 1991). In der vorliegenden Arbeit wurden Ni²⁺-Ionen an einem Nitrilotriessigsäure (NTA)-modifizierten High Performance-Sepharose-Material feiner Korngröße immobilisiert.

2.7.1.2 IMAC unter Verwendung eines peristaltischen Pumpsystems

IMAC-Reinigung von His₆-PAS(600)-YNSα8 und His₆-PAS(600)-IFN

Die chromatographische Reinigung erfolgte mittels peristaltischer Pumpen und zur Schonung des zu reinigenden Proteins vor Proteolyse und Denaturierung bei einer Umgebungstemperatur von 4 °C. Zunächst wurde die IMAC-Säule mit Ni²⁺-Ionen durch Beschicken mit einem Bettvolumen 100 mM NiSO₄ beladen und mit Wasser nachgespült. Danach erfolgte die Äquilibration mit Laufpuffer bis zum Erreichen der Basislinie. Der filtrierte Periplasma-Extrakt mit His₆-PAS(600)-YNSα8 aus drei 2 l-Schüttelkulturen wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine IMAC-Säule mit 7 ml Bettvolumen aufgetragen, wohingegen für die IMAC-Reinigung von His₆-PAS(600)-YNSα8 und His₆-PAS(600)-IFN aus einer 8 l-Fermentation eine IMAC-Säule mit 30 ml Bettvolumen und eine Flussrate von 4 ml/min beim Auftragen der Probe verwendet wurde.

Nach Waschen mit IMAC-Laufpuffer erfolgte die Elution von His₆-PAS(600)-YNSα8 (2 l-Maßstab) bei einer Flussrate von 1 ml/min und einem Imidazol-Konzentrationsgradienten von 0 bis 150 mM über 20 Säulenvolumina. Für die darauffolgenden IMAC-Reinigungen aus der 8 l-Fermentation wurde nach dem Waschschrift ein zusätzlicher Vorelutionsschritt mit 20 mM Imidazol eingeführt, um eine effizientere Abtrennung der Wirtszellproteine von dem PASylierten Protein zu erzielen. Daraufhin erfolgte die Elution von His₆-PAS(600)-YNSα8 und His₆-PAS(600)-IFN mit einem Imidazol-Konzentrationsgradienten von 20 bis 150 mM über 20 Säulenvolumina bei 4 ml/min. Bei allen IMAC-Reinigungen wurden Elutionsfraktionen entsprechend einem halben Säulenvolumen gesammelt.

2.7.1.3 IMAC an Äkta-Chromatographie-Systemen

Die Reinigung an den ÄKTA-Chromatographie-Systemen fand bei Raumtemperatur statt.

IMAC-Reinigung von ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant und MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant

Der erste Reinigungsschritt von ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant war die IMAC-Reinigung. Der filtrierte Periplasma-Extrakt aus einer 8-l Fermentation wurde mit 6 ml/min auf eine IMAC-Säule mit 100 ml Bettvolumen aufgetragen. Nach Waschen mit IMAC-Laufpuffer wurde ein Imidazol-Konzentrationsgradient von 0 bis 30 mM über 2 Säulenvolumina angelegt um einen Großteil an Wirtszellproteinen zu eluieren. Im zweiten Imidazol-Konzentrationsgradienten von 30 bis 150 mM über 2 Säulenvolumina eluierte das rekombinante ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant bei ca. 120 mM Imidazol. Es wurden 13 ml Elutionsfraktionen gesammelt.

Bei der Reinigung des cytoplasmatisch produzierten MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant stellte die IMAC-Chromatographie im Anschluß an eine subtraktive AEX-Chromatographie (siehe Abschnitt 2.7.1.4) den zweiten Reinigungsschritt dar. Die IMAC wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min betrieben und nach Auftrag der Probe und Waschen der Säule (Bettvolumen: 10 ml) mit IMAC-Laufpuffer für 2 Säulenvolumina erfolgte eine Vorelution bei 15 mM

Imidazol. Nach Anlegen eines Imidazol-Konzentrationsgradienten von 15 bis 150 mM über 15 Säulenvolumina eluierte das MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant bei ca. 50 mM Imidazol.

IMAC-Reinigung von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI

Der erste Reinigungsschritt der cytoplasmatisch produzierten Proteine MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI war ebenfalls die IMAC-Chromatographie. Die IMAC-Säule (Bettvolumen: 15 ml) wurde nach Auftrag des Cytoplasma-Extrakts mit 15 mM Imidazol für 5 Säulenvolumina in IMAC-Laufpuffer gewaschen. Für das Auftragen der Probe und die Elution von MKHis₆-OmCI wurde eine Flussrate von 2 ml/min verwendet. Für das Auftragen von MKHis₆-PAS(600)-OmCI wurde die Flussrate auf 0,5 ml/min herabgesetzt, um eine effizientere Bindung des PASylierten Proteins an das Säulenmaterial zu gewährleisten; die Elution erfolgte bei 2 ml/min. Im Anschluß daran wurde das nicht PASylierte OmCI in einem Imidazol-Konzentrationsgradienten von 15 bis 300 mM über 15 Säulenvolumina und das PASylierte OmCI in einem flacheren Imidazol-Gradienten 15 bis 150 mM über 15 Säulenvolumina eluiert. MKHis₆-OmCI eluierte bei ca. 150 mM Imidazol, wohingegen MKHis₆-PAS(600)-OmCI zwischen 30 und 80 mM Imidazol eluierte. Es wurden 10 ml Elutionsfraktionen gesammelt.

Durch Spülen mit 50 mM EDTA in IMAC-Laufpuffer wurde das Säulenmaterial nach der Proteinreinigung von den komplexierten Metall-Ionen mitsamt nicht eluiertem Protein befreit und stand nach Waschen mit ddH₂O für ein erneutes Beladen zur Verfügung. Trotz der höheren Bindekapazität des Ni-Sepharose High Performance-Materials reichte die Wechselwirkung PASylierter Proteine mit dem Säulenmaterial für die effiziente Trennung von unspezifisch gebundenen Wirtszellproteinen meist nicht aus. Eine Vorelution mit 15 bis 30 mM Imidazol während der IMAC-Reinigung führte daher zu einer Erhöhung der Proteinreinheit in den IMAC-Elutionsfraktionen. Nach Zugabe von EDTA zum Eluat bis zu einer Gesamtkonzentration von 10 mM sowie von 1 mM Dithiodipyridin als Proteolyse-Schutz wurde mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.7.2) die Proteinreinheit überprüft. Die vereinigten IMAC-Fraktionen wurden daraufhin für die IEX-Chromatographie (Abschnitt 2.7.1.4) vorbereitet.

2.7.1.4 Ionenaustauschchromatographie (IEX)

nach Breibeck (2016)

Die Ionenaustauschchromatographie (IEX) stellte den ersten, zweiten oder den jeweils letzten Reinigungsschritt PASylierter und nicht PASylierter Proteine in dieser Arbeit dar und fand an den ÄKTA-Chromatographie-Systemen bei RT statt. Je nach von Protparam (Wilkins *et al.*, 1999) berechnetem pI-Wert wurde die Anionenaustausch- (AEX) oder Kationenaustauschchromatographie (CEX) eingesetzt, um die Proteine anhand ihrer pH-abhängigen 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. Nur für den ersten Reinigungsschritt von MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant aus dem Gesamtzellextrakt von *E. coli* Origami B wurde eine subtraktive AEX-Chromatographie durchgeführt, bei der möglichst nur die verunreinigenden Wirtszellproteine an die Säule adsorbierten.

Zur Vorbereitung der IEX-Chromatographie wurden vereinigte Fraktionen aus dem vorhergehenden Reinigungsschritt (IMAC) zwei- bis dreimal (davon mindestens einmal über Nacht) gegen das 50–100fache Volumen des vorgesehenen Laufpuffers dialysiert, um eine geringe Ionenstärke in den Proben zu gewährleisten. Meist hatte die Dialyse (verwendete Membranporengröße: PASylierte Proteine 12–16 kDa, nicht PASylierte Proteine 6–8 kDa) gegen einen IEX-Laufpuffer mit niedrigem Salzgehalt die Präzipitation von Wirtszellproteinen und damit einen zusätzlichen Reinigungseffekt zur Folge, wobei die Proteinaggregate mittels Zentrifugation und Sterilfiltration durch eine 0,2 µm-Membran abgetrennt wurden.

CEX-Reinigung von His₆-PAS(600)-YNSα8 und AEX-Reinigung von His₆-PAS(600)-IFN

Für die periplasmatisch produzierten PASylierten Proteine His₆-PAS(600)-YNSα8 und His₆-PAS(600)-IFN aus einer 8 l-Fermentation wurde im zweiten Reinigungsschritt eine CEX- bzw. eine AEX-Reinigung gewählt. Im verwendeten CEX-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,0) band His₆-PAS(600)-YNSα8 (pI = 8,37) an die negativ geladenen Sulfonat-Gruppen der Resource S Säule (Bettvolumen: 6 ml), wohingegen His₆-PAS(600)-IFN (pI = 6,54) im AEX-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8,5) an die positiv geladenen quartären Ammonium-Gruppen der verwendeten Resource Q Säule (Bettvolumen: 6 ml) adsorbierte. Beide Säulen wurden mit einer Flußrate von 1 ml/min betrieben. Die Elution der Proteine erfolgte in einem flachen Gradienten von 0 bis 200 mM NaCl bei ca. 90 mM NaCl für His₆-PAS(600)-YNSα8 und 20 mM für His₆-PAS(600)-IFN über 15 Säulenvolumina. Es wurden jeweils 2 ml Fraktionen gesammelt.

AEX-Reinigung von ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant und MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant

Für das periplasmatisch produzierte ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant (pI = 6,83) aus einer 8 l-Fermentation wurde für den zweiten Reinigungsschritt eine Source 15 Q-Säule (Bettvolumen: 60 ml) zur AEX-Reinigung gewählt, die über ihre quartären Ammonium-Gruppen die negativen Ladungen des PASylierten Proteins im AEX-Laufpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) zu binden vermag. Der AEX-Laufpuffer enthielt zusätzlich 1 mM EDTA, was dem Schutz vor Metalloproteasen diente. Die Säule wurde bei einer Flußrate von 2 ml/min betrieben. Ein flacher Gradient von 0 bis 200 mM NaCl über 10 Säulenvolumina führte zur Elution von ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant bei ca. 30 mM NaCl. Es wurden 13 ml Fraktionen gesammelt.

Zur Optimierung der Reinigungsstrategie für das cytoplasmatisch produzierte MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant (pI = 7,12) wurde 10 ml des Zellaufschlusses aus einer 8 l-Fermentation (entsprechend dem Volumen eines Zellextrakts aus einer 2 l-Kultur im Schüttelkolben) verwendet (Abschnitt 2.5.2). Der erste Reinigungsschritt bestand aus einer subtraktiven AEX-Chromatographie an einer Fractogel EMD TMAE (S)-Säule (Bettvolumen: 10 ml). Da in dem verwendeten Cytoplasma-Aufschlußpuffer/AEX-Laufpuffer (40 mM NaP_i pH 7,5) das rekombinante Protein hauptsächlich protoniert vorlag, fand keine Bindung an den positiv geladenen Anionentauscher statt. Die Säule wurde mit einer Flußrate von 2 ml/min betrieben. MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant wurde im Durchlauf in 5 ml Fraktionen aufgefangen. Im Anschluß wurden die Durchlauffractionen vereinigt, mit 500 mM NaCl versetzt und einer IMAC-Reinigung unterworfen (Abschnitt 2.7.1.1). Um zu untersuchen, ob die Zugabe von Dithiodipyridin zum Cytoplasma-Extrakt die Ausbildung von Disulfidbrücken begünstigt (Maruyama *et al.*, 1999), wurden zwei Reinigungsversuche, einmal mit 1 mM und einmal ohne das Reagens, parallel durchgeführt.

CEX-Reinigung von MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant

Der dritte Reinigungsschritt von MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant bestand aus einer CEX-Chromatographie an einer Source 15S-Säule (Bettvolumen: 6 ml). Hierzu wurde die Probe zuvor in CEX-Laufpuffer dialysiert (20 mM MES/NaOH pH 6,5, 1 mM EDTA). Die CEX-Säule wurde mit einer Flussrate von 1,5 ml/min betrieben, und nach Anlegen eines Gradienten von 0 bis 300 mM NaCl über 10 Säulenvolumina eluierte MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant bei ca. 250 mM NaCl in 1,5 ml Fraktionen.

AEX-Reinigung der PASylierten und nicht PASylierten pOmCI-Varianten

Als erster Reinigungsschritt zur Aufbereitung PASylierter und nicht PASylierter Varianten von pOmCI (pI = 4,55) aus Zellkulturüberständen von *P. pastoris* wurde eine AEX-Chromatographie an einer Resource Q-Säule durchgeführt (Bettvolumen: 10 ml). Im verwendeten AEX-Laufpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) adsorbierten die negativ geladenen Proteine an die positiven Ladungen des Säulenmaterials. Die Säule wurde bei einer Flußrate von 1,5 ml/min betrieben. Unter Verwendung eines Konzentrationsgradienten von 0 bis 300 mM NaCl über 10 Säulenvolumina eluierte pOmCI bei etwa 200 mM NaCl und die PASylierten Varianten (pOmCI-PAS(600) und PAS(600)-pOmCI) schon wesentlich früher bei 40 mM NaCl in 2 ml Fraktionen.

AEX-Reinigung von MKHis₆-OmCI und CEX-Reinigung von MKHis₆-PAS(600)-OmCI

Der zweite Reinigungsschritt von MKHis₆-OmCI (pI = 5,07) war eine AEX-Chromatographie an einer Resource Q-Säule (Bettvolumen: 6 ml). Im AEX-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) adsorbierte MKHis₆-OmCI an die positiven Ladungen des Säulenmaterials und eluierte nach Anlegen eines NaCl-Konzentrationsgradienten von 0 bis 300 mM NaCl über 10 Säulenvolumina bei ca. 170 mM NaCl in 2 ml Fraktionen. Der zweite Reinigungsschritt von MKHis₆-PAS(600)-OmCI (pI = 5,07) war eine CEX-Chromatographie an einer Resource S Säule (Bettvolumen: 6 ml). Im CEX-Puffer (20 mM MES/NaOH pH 6,0, 1 mM EDTA) adsorbierte MKHis₆-PAS(600)-OmCI, trotz theoretisch negativer Oberflächenladung, sehr stark an die negativen Sulfonat-Gruppen der CEX-Säule und eluierte nach Anlegen eines NaCl-Konzentrationsgradienten von 0 bis 500 mM über 20 Säulenvolumina zwischen 220–300 mM NaCl in 2 ml Fraktionen. Beide Säulen wurden bei einer Flussrate von 1,5 ml/min betrieben.

Die Reinheit der erhaltenen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE untersucht. Geeignete Fraktionen wurden in der Regel mittels SEC-Chromatographie (Abschnitt 2.7.1.5) weiter gereinigt. Wie bei der Affinitätschromatographie war auch für die IEX-Reinigungsschritte beim Vergleich mit den Bindungseigenschaften der unmodifizierten Proteine grundsätzlich eine schwächere Bindung an die Säule und frühere Elution zu beobachten, was jedoch bei der Abtrennung verkürzter PASylierter Varianten und Wirtszellproteinen von Vorteil war.

2.7.1.5 Größenausschlusschromatographie (SEC)

nach Breibeck (2016)

Die Gelfiltration bzw. Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) wurde sowohl als analytische Methode zur hydrodynamischen Charakterisierung von Proteinen beziehungsweise zur Überprüfung des Oligomerisierungszustands als auch im präparativen Maßstab unter Einsatz eines ÄKTA-Chromatographie-Systems verwendet. Im präparativen Maßstab wurde die SEC-Chromatographie meist als dritter Reinigungsschritt nach der IEX-Chromatographie (Abschnitt 2.7.1.4) für die rekombinanten Proteine His₆-PAS(600)-IFN, His₆-PAS(600)-YNS α 8, ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant, MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI herangezogen.

In der SEC werden die Moleküle in einer Probe nach der Größe getrennt, da sie Zugang zu unterschiedlichen Porengrößen in der Chromatographiematrix 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).

2.7.1.5.1 Analytische SEC zur Bestimmung der apparenten Molekülmasse

Die analytische Säule Superdex S200 10/300 GL mit einem Bettvolumen von 24 ml wurde mit sterilfiltriertem und entgastem SEC-Laufpuffer (PBS) äquilibriert, bevor eine Proteinprobe mit einem Volumen von 225 µl und einer Konzentration von 0,25 mg/ml mittels Autosampler aufgetragen wurde. Bei einer Flussrate von 0,5 ml/min wurde die Absorption der Proteine bei 280 nm verfolgt. 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; Thyroglobulin: 669 kDa) erlaubte die Korrelation der jeweils bestimmten Elutionsvolumina V_e mit der bekannten Molekülmasse M anhand folgender Beziehung:

$$\log M = -A \cdot K_{av} + B \quad \text{Gleichung 1}$$

Hierin stellen A und B säulenspezifische Konstanten dar. Genau genommen müsste die intrinsische Viskosität $[\eta]$ des untersuchten Proteins in diese Beziehung miteinbezogen 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 als Komponente des Achsenabschnitts B vernachlässigt werden kann.

Der Partitionskoeffizient K_{av} ergibt sich aus dem Elutionsvolumen V_e (Callec *et al.*, 1984):

$$K_{av} = \frac{(V_e - V_0)}{(V_t - V_0)} \quad \text{Gleichung 2}$$

Hierbei ist V_0 das Säulenausschlussvolumen (bestimmt mit Dextranblau zu 7,53 ml) und V_t das Bettvolumen (angegeben mit 24 ml). Umgekehrt wurde mit dieser Gleichung die apparente Molekülmasse des analysierten Proteins anhand seines Elutionsvolumens V_e ermittelt.

2.7.1.5.2 Präparative SEC

SEC-Reinigung von His₆-PAS(600)-YNSa8 und His₆-PAS(600)-IFN

Zur SEC-Reinigung von His₆-PAS(600)-IFN bzw. His₆-PAS(600)-YNSa8, wurden die rekombinanten Proteine nach der AEX-Chromatographie bzw. CEX-Chromatographie (8 l-Maßstab) oder IMAC-Chromatographie (2 l-Maßstab) (Abschnitt 2.7.1.1 oder Abschnitt 2.7.1.4) mittels einer Amicon Ultra-15-Konzentrator-Einheit (30 kDa MWCO) konzentriert. Für His₆-PAS(600)-IFN (8 l-Maßstab) wurden zwei Aliquots zu je 1,5 ml bei einer Proteinkonzentration von 2,3 mg/ml auf eine HiLoad 16/60 Superdex 200-Säule (Bettvolumen: 120 ml) aufgetragen. Die Proteinlösung mit His₆-PAS(600)-YNSa8 wurde

höher konzentriert und jeweils nur ein Aliquot zu 1,5 ml bei einer Proteinkonzentration von 9,0 mg/ml (8 l-Maßstab) bzw. 6,6 mg/ml (2 l-Maßstab) verwendet. Die SEC-Chromatographie erfolgte in PBS mit einer Flussrate von 1 ml/min, wobei Fraktionen zu 1,5 ml (8 l-Maßstab) bzw. 2,0 ml (2 l-Maßstab) gesammelt wurden.

SEC-Reinigung von ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant

Zur SEC-Reinigung von ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant nach der AEX-Chromatographie wurden die vereinigten AEX-Fraktionen (120 ml) auf zwei Teile je 60 ml aufgeteilt und mit einem Centricon Plus-70 Centrifugal Filter von Millipore (10 kDa MWCO) auf 9 ml mit einer Proteinkonzentration von 2,6-2,8 mg/ml konzentriert sowie bei 0,2 µm sterilfiltriert. Danach wurde die Proteinlösung auf eine HiLoad 26/60 Superdex 200-Säule (Bettvolumen: 320 ml) aufgetragen und 4 ml Fraktionen gesammelt. Die SEC-Chromatographie verlief in PBS mit 1 mM EDTA (PBSE) bei einer Flussrate von 3,5 ml/min.

SEC-Reinigung von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI

Die präparative Reinigung von MKHis₆-OmCI erfolgte an einer Superdex 75 10/300 GL Säule (Bettvolumen: 24 ml) und die von MKHis₆-PAS(600)-OmCI an einer HiLoad 26/60 Superdex 200 Säule (Bettvolumen: 320 ml) mit PBS als Laufpuffer bei einer Flussrate von 0,5 ml/min bzw. 3,5 ml/min. Die Elutionsfraktionen wurden in Fraktionen je 0,5 ml bzw. 4 ml gesammelt. Zur Reinigung von MKHis₆-OmCI wurde ein Aliquot von 500 µl mit einer Konzentration von 8 mg/ml und für MKHis₆-PAS(600)-OmCI ein 10 ml Aliquot mit einer Konzentration von 1 mg/ml aufgetragen.

2.7.1.6 Umkehrphasenchromatographie (RPC)

nach Breibeck (2016)

Zur Untersuchung der hydrophilen Eigenschaften von Proteinen kann die Umkehrphasenchromatographie (*Reverse Phase Chromatography*, RPC) verwendet werden. Hierbei adsorbiert das Protein an die moderat hydrophoben stationäre Phase und kann mit steigendem Acetonitril-Gehalt im Laufpuffer eluiert werden (Horvath & Melander, 1977). In dieser Arbeit wurde eine Resource RPC-Säule mit einem Bettvolumen von 1 ml und einer Polystyrol-Matrix eingesetzt. Das ÄKTA-Chromatographie-System wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min betrieben.

Zur Analyse der hydrophilen Eigenschaften von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI wurde jeweils 200 µg der Proteinprobe auf den verwendeten Laufpuffer (2 % (v/v) ACN, 0,065 % (v/v) TFA) eingestellt und durch eine 1 ml Probenschleife auf die gegen Laufpuffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Elution der Proben erfolgte mit einem Gradienten von 0 bis 100 % Elutionspuffer (80 % (v/v) ACN, 0,05 % TFA) über 20 Säulenvolumina. Die Absorption der Proben wurde bei 280 nm verfolgt.

Zur Vorbereitung bzw. Auftrennung teilweise heterogener Proteinproben für anschließende massenspektrometrische Untersuchungen, wie beispielsweise zur Quantifizierung der Mannosemoleküle des in *P. pastoris* hergestellten pOmCI-Proteins, wurde 350 µg eines gereinigten Proteins auf die Säule aufgetragen. Lauf- und Elutionspuffer enthielten anstelle von TFA, 0,1 % (v/v) FA, die zu einer geringeren Ionensuppression und daher zu einem besseren massenspektrometrischen Messsignal führt. Die Elution der Proben erfolgte mit einem flachen Gradienten von 0 bis 100 % Elutionspuffer über 40 Säulenvolumina. Dabei wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt, die anschließend direkt für eine ESI-Q-TOF Messung verwendet werden konnten (Abschnitt 2.9.1).

2.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

nach Schlapschy (2004); Gebauer (2013); Richter (2018)

Die Analyse von Proteinen und deren Mischungen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) unter Verwendung des Puffersystems von Fling & Gregerson (1986). Die elektrophoretische Mobilität der durch Anlagerung von SDS-Molekülen negativ geladenen Proteine wird durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamid-Gels bestimmt und verhält sich annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molmasse des Proteins (Creighton, 1997). Für PASylierte Proteine wurden in der Regel 12 %ige und für nicht PASylierte Proteine 15 %ige SDS-Polyacrylamid-Trenngele verwendet.

Die Gelelektrophorese erfolgte in der Regel mit Gelen im Format 8,6 x 7,7 cm bei einer Dicke von 1 mm. Zunächst wurde eine Gelkammer aus Glasplatten mit einer Gummidichtung zusammengebaut. Die Trenngelmischung für zwei Gele mit einem Gesamtvolumen von 10 ml enthielt 2,5 ml 4x Lower-Tris sowie einen der gewünschten Konzentration des Gels entsprechenden Anteil einer 30 %igen (w/v) Acrylamid-Stammlösung mit 2,6 % (w/v) Bisacrylamid. Zur Herstellung von 12 %igen Gelen wurde dementsprechend 4 ml und für 15 %ige Gele 5 ml Acrylamid-Stammlösung verwendet. Das restliche Volumen wurde mit Wasser aufgefüllt. Nach dem Polymerisationsstart durch Zugabe von 8 µl TEMED und 80 µl 10 % (w/v) APS wurde 5 ml der Trenngelmischung in den Spalt zwischen den abgedichteten Glasplatten pipettiert und mit Wasser überschichtet, um Luftzutritt zu vermeiden. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels (ca. 45 min) wurde das Wasser abgegossen und verbliebene Reste mit Whatman-Papier aufgesaugt. Für die Herstellung der 5 %igen Sammelgelmischung wurden 1 ml Acrylamid-Stammlösung und 1,5 ml 4x Upper-Tris mit Wasser zu einem Gesamtvolumen von 6 ml aufgefüllt. Die Polymerisation des Sammelgels wurde durch Zugabe von 8 µl TEMED und 80 µl 10 % (w/v) APS gestartet. Die Lösung wurde auf das erstarrte Trenngel zwischen den Glasplatten gegossen, und es wurde ein Taschenformer mit zehn oder fünfzehn Zähnen eingesetzt. Bei der Herstellung von SDS-Gelen zur Auftrennung von PASylierten Proteinen wurde der Taschenformer möglichst tief

eingesetzt, um ein kurzes Sammelgel zu erzeugen. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Metallklammern sowie die Dichtungen vorsichtig entfernt und das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt, die mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt wurde.

Zur Probenvorbereitung wurde jeweils 20 µl Proteinlösung mit 5 µl 5x Auftragspuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Bei der Vorbereitung von SDS-Proben ohne β-ME wurde auf den Hitzeschritt verzichtet. In die Probestaschen des vollständig polymerisierten Gels wurde dann je 15 µl bei zehn Taschen oder 7,5 µl bei fünfzehn Taschen Proteinlösung pipettiert und die Elektrophorese unter Verwendung von 1x SDS-Laufpuffer mit Obergrenzen von 120 V und 30 mA betrieben. Nach ca. 2 h für PASylierte Proteine oder 1 h 45 min für nicht PASylierte Proteine hatte der Bromphenolblau-Marker die untere Gelkante erreicht. Das Gel wurde inklusive Sammelgel entnommen und für 20 min in Färbelösung geschwenkt. Zur Entfernung der unspezifischen Hintergrundfärbung wurden das Gel anschließend für ca. 15 min in die Entfärbelösung 1 und danach bis zum Erreichen des gewünschten Entfärbungsgrades in Entfärbelösung 2 gegeben. Abschließend wurde das Gel in Aufbewahrungslösung gelagert. Das Färben sowie Entfärben wurden auf einem Horizontalschüttler bei 30 rpm vorgenommen (Zusammensetzung der Lösungen siehe Abschnitt 2.1.8). Nachdem das Gel ausreichend entfärbt und die Proteinbanden gut zu erkennen waren, wurde dieses auf einem Leuchttisch platziert und mit Hilfe einer PC-gekoppelten CCD-Kamera und der Software BioCaptMW Version 10.04 (Vilber Lourmat, Eberhardzell) digitalisiert.

2.7.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

nach Gebauer (2013); Breibeck (2016)

Die Konzentration c von Lösungen gereinigter Proteine wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm in einer Quarzküvette der Schichtdicke $d = 1$ cm mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt:

$$A_{280} = \varepsilon * c * d \quad \text{Gleichung 3}$$

Der molare Extinktionskoeffizienten ε , die Molekülmasse M wie auch der pI-Wert wurden für jedes Protein mit Hilfe des Programms ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>; Wilkins *et al.*, 1999) individuell berechnet. Der Extinktionskoeffizient ε wurde dabei nach einem Algorithmus kalkuliert, der die Absorptionsbeiträge der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystin aufsummiert (Gill & von Hippel, 1989). Da die PAS-Sequenz aufgrund des Fehlens entsprechender Seitenketten keinen Beitrag zur Absorption bei 280 nm liefert, wurden für alle PASylierten Proteine die Koeffizienten der unmodifizierten Versionen verwendet (Tabelle 4).

Tabelle 4. Molare Extinktionskoeffizienten ϵ und Molekülmassen M der in dieser Arbeit produzierten Proteine. Die Berechnung erfolgte anhand der Primärsequenz mit Hilfe des ExPASy Programms ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) unter Berücksichtigung vollständig oxidierter Cysteinreste.

Protein	Expressionssystem	M [Da]	pI	ϵ [$M^{-1}cm^{-1}$]
Strep-tag II-IFN	<i>E. coli</i> , periplasmatisch	20923,9	6,13	24200
His ₆ -PAS(600)-IFN	<i>E. coli</i> , periplasmatisch	70261,8	6,54	18700
His ₆ -PAS(600)-YNS α 8	<i>E. coli</i> , periplasmatisch	70271,9	8,37	20190
ASHis ₆ -PAS(600)-IFN-1ant	<i>E. coli</i> , periplasmatisch	70274,8	6,83	18700
MKHis ₆ -PAS(600)-IFN-1ant	<i>E. coli</i> , cytoplasmatisch	70247,9	7,12	18700
pOmCI-His ₆	<i>P. pastoris</i> , sekretorisch	17875,7	4,98	22835
pOmCI-PAS(600)-His ₆	<i>P. pastoris</i> , sekretorisch	67430,9	4,98	22835
OmCI-His ₆	<i>E. coli</i> , periplasmatisch	18092,9	4,98	22835
OmCI-PAS(200)-His ₆	<i>E. coli</i> , periplasmatisch	34611,3	4,98	22835
pOmCI	<i>P. pastoris</i> , sekretorisch	16807,7	4,55	22835
pOmCI-PAS(600)	<i>P. pastoris</i> , sekretorisch	66433,9	4,55	22835
PAS(600)-pOmCI	<i>P. pastoris</i> , sekretorisch	66695,1	4,55	22835
MKHis ₆ -OmCI	<i>E. coli</i> , cytoplasmatisch	18194,1	5,07	22835
MKHis ₆ -PAS(600)-OmCI	<i>E. coli</i> , cytoplasmatisch	67749,3	5,07	22835

2.8 Immunchemische Methoden

2.8.1 Bestimmung des Endotoxingehalts

Für Proteinpräparationen, die für *In vivo*-Studien verwendet werden sollten, wurde der Endotoxin-Gehalt bestimmt. Hierfür wurde das Endosafe-PTS System mit Teststreifen einer Sensitivität von 0,1–10 Units/ml verwendet. Das Prinzip der Messung beruht auf der Aktivierung einer Kaskade von Serinproteasen im Limulus Amöbozyten-Lysat (LAL) nach Zugabe von Endotoxin. Das letzte Enzym spaltet ein chromogenes Substrat, das p-Nitroanilin (pNA) freisetzt. PNA ist bei leicht basischen pH ein gelber Farbstoff, dessen Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge zwischen 385 und 410 nm bestimmt werden kann. Für eine Messung wurde jeweils 25 μ l einer geeigneten Verdünnung (in sterilem, endotoxinfreiem ddH₂O) der zu testenden Proteinlösung (1:10 His₆-PAS(600)-IFN, 1:50–1:100 für His₆-PAS(600)-YNS α 8, 1:50 für ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant) in die Kanäle des Teststreifens gegeben. Vor der Messung wurden die Proben für 5 min bei 95 °C inkubiert. Zwei Kanäle enthielten bereits eine bestimmte Menge an Endotoxin und dienten als Referenz. Die Endotoxin-Messung erfolgte als Doppelbestimmung und das Ergebnis wurde in EU/ml angegeben, das in EU/mg umgerechnet wurde. Die Endotoxin-Konzentrationen waren typischerweise wie folgt: His₆-PAS(600)-YNS α 8 < 20 EU/mg, His₆-PAS(600)-IFN < 2 EU/mg, ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant < 1,4 EU/mg.

2.8.2 Anti-virale und anti-proliferative Zell-Assays

Die anti-viralen und anti-proliferativen Zell-Assays wurden am Weizmann-Institut für Wissenschaften, Israel nach veröffentlichten Methoden (Harari *et al.*, 2014b; Kalie *et al.*, 2007) durchgeführt. Als Zellsystem wurde in beiden Assays die humane Amnion-WISH-Zelllinie verwendet, die standardmäßig zur Charakterisierung der biologischen Aktivität humaner Interferone eingesetzt wird (Meager, 2002).

2.8.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.8.3.1 ELISA zur Quantifizierung von rekombinantem PASylierten IFN-1ant im Blutplasma von Rhesusaffen

Der ELISA zur Quantifizierung von rekombinantem IFN-1ant und ASHis₆-PAS#1(600)-IFN-1ant in Blutplasmaproben von Rhesusaffen wurde durch Dr. Krystelle Nganou Makamdop am *Human Immunology Section/Vaccine Research Center, National Institutes of Health (NIH)*, Bethesda, USA, nach einem am Lehrstuhl für Biologische Chemie etablierten und veröffentlichten Protokoll (Schlapschy *et al.*, 2013), durchgeführt. Die ermittelten pharmakologischen Daten wurden am Lehrstuhl für Biologische Chemie numerisch mittels der WinNonlin Software nach der Bateman-Funktion angepasst (Nganou-Makamdop *et al.*, 2018).

2.8.3.2 ELISA zur Quantifizierung von rekombinantem PASylierten OmCI in Mausplasma

Zur Quantifizierung von MKHis₆-PAS(600)-OmCI und MKHis₆-OmCI in Mausplasmaproben zu verschiedenen Zeitpunkten der pharmakokinetischen Studie (Abschnitt 2.10.4) wurde ein *Sandwich*-ELISA-Aufbau etabliert. Hierbei wurde das humane C5-Protein an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte adsorbiert, dann die Mausplasmaproben mit dem zu quantifizierenden OmCI-Proteins appliziert, welches mit Hilfe eines Antikörperkonjugats durch fluorogene Enzymreaktion anhand seines Hexahistin-Anhängels detektiert wurde.

Zur Durchführung des Assays wurde in jede Vertiefung einer schwarzen Mikrotiterplatte (MaxiSorp) jeweils 50 µl humanes C5-Protein (Complement Technology) in einer Konzentration von 12 µg/ml in PBS über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Proteinlösung abgegossen und die Platte zur Entfernung von Flüssigkeitsresten ausgeklopft. Danach wurden die Vertiefungen mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Waschgeräts (ELISA Washer ELx405) zweimal mit 300 µl TBS-T0,1 gewaschen und abermals ausgeklopft. Zur Absättigung verbliebener Bindestellen wurde jede Vertiefung mit jeweils 200 µl 3 % (w/v) BSA in TBST-0,1 für zwei Stunden inkubiert. Daraufhin wurden die Vertiefungen sechsmal mit 300 µl TBST-0,1 gewaschen und abermals ausgeklopft.

Von den Mausplasmaproben mit unbekanntem Gehalt an MKHis₆-OmCI bzw. MKHis₆-PAS(600)-OmCI wurden 1:2 Verdünnungen in der mit C5 beschichteten Mikrotiterplatte

erstellt und zur Komplexbildung für 1 h inkubiert. Es musste darauf geachtet werden, dass alle Verdünnungsstufen einen gleichbleibenden Mausplasmaanteil von maximal 2 % (v/v) enthielten (0,25–2 % für MKHis₆-PAS#1(600)-OmCI und 2 % für MKHis₆-OmCI). Dazu wurde 50 µl TBST-0,1 mit bis zu 2 % (v/v) Mausplasma von unbehandelten Mäusen in die alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte vorgelegt. Für die Vertiefung der ersten Verdünnungsstufe wurde 50 µl TBS-T0,1 ohne Mausplasma verwendet. Daraufhin wurde 50 µl einer entsprechend verdünnten MKHis₆-OmCI bzw. MKHis₆-PAS#1(600)-OmCI-Lösung in die erste Vertiefung gegeben, gut gemischt und 50 µl dieser Lösung für den nächsten Verdünnungsschritt verwendet.

Die Vertiefungen wurden daraufhin erneut sechsmal mit 300 µl TBST-0,1 gewaschen und ausgeklopft. Zum Nachweis der an C5 gebundenen OmCI-Moleküle mittels ihres Hexahistidin-Anhängels wurde Anti-His₆-HRP-Konjugat 1:2000 in TBST-0,1 verdünnt und je 50 µl in jede Vertiefung pipettiert. Nach einstündiger Inkubation wurden die Vertiefung wieder jeweils sechsmal mit TBS-0,1 und TBS gewaschen. Im Anschluß wurden 100 µl einer fluorogenen Meerrettichperoxidase-Substratlösung (*QuantaBlu Fluorogenic Peroxidase Substrate*) in die Vertiefungen pipettiert. Die enzymatische Reaktion lief bei einer Temperatur von 37 °C ab. Die Fluoreszenzwerte wurden nach 15 min, im linearen Bereich der enzymatischen Reaktion, mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts (Synergy II plate reader) bestimmt. Dieses war ausgestattet mit einem Filterset von 330 ± 20 nm zur Anregung und 420 ± 50 nm zur Messung der Emission.

Die gemessenen Fluoreszenzwerte mit unbekanntem Gehalt an MKHis₆-OmCI bzw. MKHis₆-PAS(600)-OmCI wurden gegen Fluoreszenzwerte einer Standardkurve mit bekannter Konzentration verglichen. Die Standardkurve wurde durch 1:2 Verdünnungen einer durch SEC gereinigten Probe in TBST-0,1, unter Zusatz von bis zu 2 % (v/v) Mausplasma von unbehandelten Mäusen, erhalten (gemessen in Triplikaten). Die so ermittelte Standardkurve zeigt einen sigmoidalen Verlauf und wurde entsprechend folgender Gleichung angepasst:

$$F = F_{max} + \frac{F_{min} - F_{max}}{\left(1 + \left(\frac{C}{C_{50}}\right)^k\right)^a} \quad \text{Gleichung 4}$$

F entspricht hierbei der jeweils gemessenen Fluoreszenz, C ist die variierte Konzentration an MKHis₆-OmCI bzw. MKHis₆-PAS#1(600)-OmCI, C_{50} die halbmaximale Konzentration, k die Kurvensteigung (Hill-Koeffizient) und a der Asymmetriefaktor (Baud, 1993).

Da in den Mausplasmaproben bereits murines C5 in einem physiologischen Konzentrationsbereich von 50–85 µg/ml (≅ 265–450 nM bei einer Molekülmasse von 189 kDa; Harris *et al.*, 1982) vorliegt, welches ebenfalls mit den rekombinanten MKHis₆-OmCI bzw. MKHis₆-PAS(600)-OmCI interagiert, ergibt sich eine außergewöhnliche Asymmetrie

der Standardkurve. Demnach ist es nur möglich, ungebundenes MKHis₆-OmCI bzw. MKHis₆-PAS(600)-OmCI zu detektieren.

Für jeden Zeitpunkt der pharmakokinetischen Studie wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der für drei Mäuse gemessenen Konzentration an MKHis₆-OmCI bzw. MKHis₆-PAS(600)-OmCI berechnet. Die Daten wurden numerisch mittels der WinNonlin-Software angepasst und mit KaleidaGraph dargestellt. Im Fall der *i.v.* Injektion wurden die Daten für MKHis₆-OmCI in monoexponentieller Weise und die Daten für MKHis₆-PAS(600)-OmCI in biexponentieller Weise angepasst (Abschnitt 2.10.4). Die Daten für MKHis₆-PAS#1(600)-OmCI nach *s.c.* Injektion wurden hingegen nach der Bateman-Funktion ausgewertet (Kuhn *et al.*, 2016).

2.8.4 *In vitro* Hämolyse-Assays

2.8.4.1 ELISA zur Inhibierung des alternativen und klassischen Komplementwegs

Um den inhibitorischen Effekt von MKHis₆-OmCI bzw. MKHis₆-PAS(600)-OmCI auf den klassischen (CP) bzw. alternativen Komplementweg (AP) zu untersuchen, wurden die kommerziell erhältliche ELISA Kits COMPL CP310 bzw. COMPL AP330 (Seelen *et al.*, 2005) verwendet, deren Mikrotitervertiefungen entweder mit IgM oder mit Lipopolysacchariden (LPS) beschichtet waren. In jede Vertiefung wurden Verdünnungspuffer (DIL Puffer) mit spezifisch auf den Assay angepasster Zusammensetzung verdünntes humanes Serum sowie verschiedene Konzentrationen an Inhibitorlösung appliziert. Im Verlauf der Inkubation wurde das Komplementsystem aus dem Serum durch die jeweilige Beschichtung aktiviert und die Menge an gebildetem C5b-9-Komplex mittels eines mit alkalischer Phosphatase markierten Antikörpers detektiert. Nach Zugabe von p-Nitrophenylphosphat (pNPP) wurde ein gelber Farbstoff gebildet, dessen Farbintensität mit der Komplement-Aktivität korrelierte. Das verwendete humane Serum war ein Pool aus fünf gesunden Personen (im Kit enthalten). Die Durchführung erfolgte entsprechend Herstellerangaben und wird hier kurz zusammengefasst.

Für den ELISA zur klassischen Komplementaktivierung wurde das Patientenserum 1:90 in Verdünnungspuffer mit Mg²⁺ und Ca²⁺ verdünnt (5 µl Serum und 445 µl CP DIL Puffer). Für den ELISA zur alternativen Komplementaktivierung wurde dagegen ein Verhältnis 1:18 in Verdünnungspuffer mit Mg²⁺ und EGTA (20 µl Serum und 340 µl AP DIL Puffer) verwendet, um selektive Aktivierung des entsprechenden Komplementwegs zu erreichen (Seelen *et al.*, 2005).

Zu Aliquots des verdünnten Serums (360 µl) wurden sieben verschiedene Verdünnungsstufen (40 µl der verdünnten Inhibitorlösung) an 10-fach konzentrierter Lösung vom gereinigtem MKHis₆-OmCI bzw. MKHis₆-PAS(600)-OmCI in PBS hinzugegeben, so dass sich Endkonzentrationen im Bereich von 0,5–50 nM für den CP und von 5–100 nM für den AP

ergaben. Die Endverdünnungen der Seren lag somit bei 1:100 (1 % v/v) für den CP und bei 1:20 (5 % v/v) für den AP. Für Referenzmessungen wurde das gleiche Volumen an PBS (40 µl) wurde entweder zu verdünntem (Positivkontrolle, PC; im Kit enthalten) oder zu hitze-inaktiviertem Serum (Negativkontrolle, NC; im Kit enthalten) hinzugegeben. Zur Bereinigung der Basislinie wurden 900 µl des entsprechenden DIL Puffers mit 100 µl PBS verdünnt.

Im Anschluß daran wurde 100 µl der vorbereiteten Serumprobe (mit Inhibitorlösung, PC, NC oder der mit PBS verdünnte Dil Puffer in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden die Vertiefungen geleert und dreimal mit 300 µl Waschlösung aus dem Kit gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurden die Vertiefungen durch Klopfen des Streifens auf saugfähigem Zellstoff sorgfältig ausgeleert. Dann wurde zu jeder Vertiefung 100 µl der Antikörper-AP-Konjugatlösung zugegeben und für 30 min im Brutschrank bei 25 °C inkubiert. Dann wurden die Vertiefungen abermals dreimal gewaschen. Zum Schluß erfolgte die Nachweisreaktion mit 100 µl der pNPP-Substratlösung bei 25 °C. Absorptionswerte wurden innerhalb des linearen Bereichs der enzymatischen Reaktion bei 405 nm (nach 30 min für den CP und nach 20 min für den AP) mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts (Synergy II plate reader) gemessen. Für alle Serumproben (mit Inhibitorlösung, PC und NC) wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die gemessenen Absorptionswerte der Serumproben wurden durch die Absorptionswerte des mit PBS verdünnten Dil Puffer bereinigt. Daraufhin wurde jeweils Mittelwert Standardabweichung berechnet. Mittels der KaleidaGraph-Software wurden die gemittelten Absorptionswerte gegen die eingesetzte Inhibitorkonzentration aufgetragen. Um die halbmaximale Inhibitorkonzentration zu bestimmen, wurde der sigmoidale Kurvenverlauf entsprechend folgender Gleichung angepasst:

$$A = \frac{A_{max}}{1 + \left(\frac{C}{IC_{50}}\right)^k} \quad \text{Gleichung 5}$$

A entspricht hierbei der Absorption (nach Basislinienkorrektur), C der jeweilig eingesetzten Konzentration an MKHis₆-OmCI bzw. MKHis₆-PAS(600)-OmCI, IC₅₀ der halbmaximalen Inhibitorkonzentration und k der Kurvensteigung (Hill-Koeffizient) (Kornberger & Skerra, 2014).

2.8.4.2 Zell-Assay zur Inhibierung des alternativen Komplementwegs unter Verwendung von PNH-ähnlichen Erythrozyten

Um die Inhibitorwirkung von MKHis₆-OmCI bzw. MKHis₆-PAS(600)-OmCI auf die AP-vermittelte Lyse von Erythrozyten zu untersuchen, wurde ein PNH *in vitro* Model verwendet. Dieser Assay wurde von unseren Kooperationspartnern am Institut für Naturlheilkunde & Klinische Pharmakologie in Ulm nach einem veröffentlichten Protokoll durchgeführt (Kuhn *et al.*, 2016).

2.8.5 Western Blotting

nach Schlapschy (2004); Breibeck (2016)

2.8.5.1 Nachweis von potentiellen Antikörpern gegen die PAS(600)-Sequenz oder gegen das IFN-γ-α8 Protein in Mausseren

Eine Immunantwort gegen PAS(600)-YNSα8 in Mäusen wurde mittels *Western Blotting* untersucht. Die Versuche wurden durch unsere Kooperationspartner am Weizmann-Institut für Wissenschaften, Israel nach einer veröffentlichten Methode (Harari *et al.*, 2014b) durchgeführt.

2.8.5.2 Nachweis von OmCI und PASyliertem OmCI in Mausplasma

Für den immunochemischen Nachweis von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI in Mausplasmaproben wurde die Methode des *Western Blotting* angewendet. Jeweils 4 µl der Plasmaproben (PK-Studie, siehe Abschnitt 2.10.4) zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde in die Taschen eines 12 %-tigen SDS-Gels für MKHis₆-PAS(600)-OmCI bzw. 15 %-tigen SDS-PAGE für MKHis₆-OmCI gefüllt und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Plasma von unbehandelten BALB/c Mäusen diente einerseits als negative Referenzprobe, andererseits versetzt mit 168 ng MKHis₆-OmCI bzw. 620 ng MKHis₆-PAS(600)-OmCI als positive Referenzprobe. Im Anschluß an die SDS-PAGE wurden die Proteine durch Elektrotransfer auf eine hydrophobe Membran überführt und die OmCI-Proteine selektiv über deren Hexahistidin-Anhängsel braun angefärbt.

Die SDS-PAGE wurde wie im Abschnitt 2.7.2 beschrieben durchgeführt und das SDS-Gel anschließend für 20 min in Transferpuffer (20 % (v/v) Methanol in 1x SDS-Laufpuffer) geschwenkt. Für den Elektrotransfer wurden vier Blatt Whatman-Filterpapier (10,0 cm x 7,5 cm) mit Transferpuffer getränkt und unter Vermeidung von Luftblasen auf die Edelstahl-Kathodenplatte der Elektrobloßapparatur gelegt. Darauf wurden das SDS-Gel, die mit Transferpuffer benetzte Nitrocellulose-Membran, sowie weitere vier Blatt mit Puffer getränktes Whatman-Filterpapier gestapelt. Nach Aufsetzen der Graphit-Anodenplatte wurde der Elektrotransfer für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA für OmCI oder für 2 h bei 60 mA für das PASylierte OmCI betrieben. Beim *Western Blotting* PASylierter Proteine

war generell deren verminderte elektrophoretische Mobilität zu beachten, weshalb der Elektrotransfer länger und bei einer höheren Stromstärke durchgeführt wurde. Nach kurzem Waschen der Nitrocellulose-Membran in PBS-T0,1 wurden freie Bindestellen mit 3 % (w/v) BSA in PBS-T0,1 für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit PBS-T0,1 gewaschen, bevor diese mit einer 1:1000 Verdünnung des Anti-His₆-HRP Konjugats für 1 h inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran je dreimal für 10 min mit PBS-T0,1 und dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Die Detektion der Meerrettichperoxidase-Aktivität erfolgte mit SigmaFAST Tabletten (3,3'-Diaminobenzidin und H₂O₂) welche in 5 ml Wasser gelöst wurden. Die Reaktion wurde durch Waschen in Wasser beendet. Die Membran wurde schließlich zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet, fotografiert und zur Dokumentation verwahrt.

2.9 Biophysikalische Methoden

2.9.1 Massenspektrometrie (ESI-MS)

2.9.1.1 Gesamtmassenbestimmung

nach Breibeck (2016)

Für die ESI-MS-Messung wurden die mittels SEC gereinigten PASylierten Interferon-Varianten bei einer Konzentration von 0,5 bis 2,0 mg/ml für zwei bis dreimal gegen 10 mM NH₄Ac pH 6,6 in einem Becherglas unter Verwendung von Dialyse-Einheiten (Slide-A-Lyzer 0,5 ml Mini) mit 10 kDa MWCO dialysiert. Im Anschluß daran wurden die dialysierten Proteine mit 20–50 % (v/v) Acetonitril und 0,1–1 % (v/v) Ameisensäure (FA) versetzt und ESI-MS-Spektren im Positiv-Modus an einem maXis Q-TOF-Instrument (Bruker Daltonics; Messgenauigkeit: ~0,2 ppm) mit ESI-Quelle oder einem 6210-Time-of-Flight-LC/MS-Gerät (Agilent Technologies; Messgenauigkeit: 2-5 ppm) aufgenommen.

Um insbesondere die korrekte Ausbildung der zwei Disulfidbrücken des PASylierten IFN-1ant Proteins zu untersuchen, wurden eine periplasmatisch und zwei cytoplasmatisch produzierte Proteinproben (gereinigt in Gegenwart von 1 mM Dithiodipyridin oder ohne diesen Zusatz) auf eine Konzentration von ca. 1,2 mg/ml eingestellt und in zwei Dialyserunden gegen 10 mM NH₄⁺Ac/NH₃ pH 8,2 umgepuffert. Direkt vor der Messung wurden für jede Proteinprobe zwei Proben angesetzt: eine Probe mit 5 mM DTT und die andere Probe nicht reduziert. Beide Proben wurden mit 50 % MeOH und 1 % AcOH versetzt und an dem 6210-Time-of-Flight-LC/MS-Gerät vermessen. Anhand der Massendifferenz zwischen der reduzierten und der oxidierten Probe wurde die Ausbildung der zwei Disulfidbrücken nachgewiesen.

Die durch IEX-gereinigten OmCI-Proben (MKHis₆-OmCI bzw. MKHis₆-PAS(600)-OmCI) wurden bei einer Konzentration von 0,7–0,8 mg/ml zwei bis dreimal gegen 50 mM NH₄HCO₃ pH 7,8 dialysiert. Zum Nachweis der drei Disulfidbrücken wurden ebenfalls ESI-MS Spektren

der vollständig reduzierten Proteinspezies durchgeführt. Hierzu wurden die Proteinlösungen nach der Dialyse mit 5 mM DTT bei 37 °C für 45 min und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Direkt vor der ESI-MS-Messung wurden die Proben mit 50 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % (v/v) FA versetzt und an dem maXis Q-TOF-Instrument ESI-Spektren aufgenommen. Alternativ erfolgte die Analyse an dem 6210-Time-of-Flight-LC/MS-Gerät mit einer Lösungsmittelzusammensetzung von 60 % (v/v) Methanol und 1 % (v/v) AcOH.

2.9.1.2 Peptidmassenfingerprint

Um die Konnektivität der zwei Disulfidbrücken des PASylierten IFN-1ant Proteins zu bestimmen, wurde die zwei cytoplasmatischen Proteinpräparationen mit der Protease Trypsin, die spezifisch nach den positiv geladenen Aminosäuren Arg und Lys schneidet, verdaut. Die cytoplasmatischen Proteinpräparationen wurden auf eine Konzentration von 3,4 mg/ml für die Präparation ohne Dithiodipyridin bzw. 1,8 mg/ml für die Präparation mit Dithiodipyridin mittels einer Vivaspin 500 Einheit (10 kDa) konzentriert und zweimal gegen 50 mM NH_4HCO_3 pH 7,6 dialysiert. Im Anschluß daran wurden die Präparation ohne Dithiodipyridin und die Präparation mit Dithiodipyridin mit einem Verhältnis 50:1 bzw. 45:1 (w/w) mit Trypsin (Promega; modifiziert, *sequencing grade*) bei 37 °C über Nacht NH_4HCO_3 pH 7,6 verdaut. Daraufhin wurden die entstandenen Peptide an einer C18 Zorbax SB-C18 Säule (5 μm , 150 x 0,5 mm; Agilent) nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt und die Peptidmassen an dem ESI-MS 6210 TOF Massenspektrometers von Agilent bestimmt.

Zur Bestimmung der O-Glycosylierungsstellen in pOmCI, pOmCI-PAS(600) und PAS(600)-pOmCI wurde analog der oben beschriebenen Methode vorgegangen. Allerdings wurden nach dem Verdau mit Trypsin noch die drei Disulfidbrücken mit 5 mM DTT reduziert.

Zur Berechnung von Peptidmassen mit Hilfe des ExPASy PeptideMass Algorithmus konnte entweder die monoisotopische, die nur die häufigsten stabilen Isotope, oder die durchschnittliche Masse, die alle stabilen Isotope gewichtet nach ihrer Häufigkeit betrachtet, ausgewählt werden. Da die gemessenen Peptidmassen der größeren PASylierten Peptide besser mit der durchschnittlichen Masse übereinstimmten wurde diese für alle Berechnung ausgewählt.

2.9.2 Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR)

nach Gebauer (2013)

Die Bindungsaffinität- und -kinetik PASylierter und nicht PASylierter Proteine wurde mit Hilfe der Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (*Surface Plasmon Resonance*, SPR, Liedberg *et al.*, 1995) an einem BIAcore 2000-Gerät untersucht. Das Messprinzip beruht auf der Änderung der Massenkonzentration eines Makromoleküls an einer biospezifischen *Sensorchip*-Oberfläche und der damit verbundenen Änderung des Brechungsindex, ohne die Notwendigkeit der vorherigen Markierung eines Interaktionspartners. Dies ermöglicht die

Untersuchung biomolekularer Wechselwirkungen in Echtzeit (*Real Time*). Der *Sensorchip* besteht aus einer Glasoberfläche mit einem dünnen Goldfilm und aufgelagerter Dextranmatrix. Die hier verwendete Dextranoberfläche war carboxymethyliert und diente der Immobilisierung eines Interaktionspartners ("Ligand") durch Amin-Kopplungschemie. Der *Sensorchip* befindet sich in der Durchflusszelle, die wiederum an ein kontinuierliches Flusssystem angeschlossen ist. Über einen Autosampler wird der zweite Partner, als "Analyt" bezeichnet, in das Flusssystem injiziert und kann mit dem Liganden wechselwirken. Der *Sensorchip* wird mit monochromatischem, linear polarisiertem Licht bestrahlt, so dass an der Goldoberfläche Totalreflexion eintritt. Hierbei werden winkelabhängig freie Elektronen des Metallfilms zu Schwingungen angeregt und bilden eine Oberflächenwelle (Oberflächenplasmon), die wiederum die Intensität des reflektierten Lichtstrahls teilweise reduziert (Plasmonresonanz). Bindet ein Analyt an dem Liganden, ändert sich mit der lokalen Proteinkonzentration der Brechungsindex und damit die Ausbreitungseigenschaften des Oberflächenplasmons und insbesondere der Winkel minimaler Lichtintensität. Dieser Resonanz-Winkel ist direkt proportional zur Konzentration des Komplexes aus Ligand und Analyt und wird in Resonanz-Einheiten (*Resonance Units*, RU) ausgedrückt (1 RU entspricht 1 pg/mm^2). Die Änderung der RUs mit der Zeit wird in einem *Sensorgram* dargestellt.

Für die SPR-Messung PASylierter Proteine wurde entweder der *CMDP-Sensorchip* von XanTec oder der *CM3-Sensorchip* von GE Healthcare verwendet. Beide *Sensorchips* wurden speziell für Kinetikmessungen großer Analyten entwickelt. Der *CMDP-Sensorchip* besitzt eine besonders dünne Hydrogel mit Carboxymethyl-dextran-Ketten von $< 5 \text{ nm}$, das eine möglichst ungehinderte Diffusion großer Analyten in das Hydrogel zum Liganden ermöglicht. Durch kontinuierliche Verbesserungen am Beschichtungsprozess des *CMDP-Sensorchips* im Verlauf dieser Doktorarbeit wurde dieser so verändert, dass die ursprünglichen Kopplungsausbeuten und somit die benötigte maximale Änderungen der RUs nicht mehr erreicht werden konnten, zudem variierten diese sehr stark zwischen den *Sensorchips*. Daher wurde für spätere SPR-Experimente ein vergleichbarer *CM3-Sensorchip* von GE Healthcare verwendet. Der *CM3-Sensorchip* besitzt ebenfalls eine relativ dünne Carboxymethyl-dextran-Matrix von 30–40 nm, jedoch konnten mit diesem Chip wieder höhere Kopplungsausbeuten, wie mit dem alten *CMDP-Sensorchip*, erreicht werden. Die BIAcore-Laufpuffer und -Regenerierungslösungen wurden vor der Messung $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ filtriert und im Ultraschallbad entgast. Alle Messungen wurden bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt.

2.9.2.1 SPR-Messung der PASylierten Interferon-Varianten

Im Falle der PASylierten Interferon-Varianten (IFN, YNS α 8, IFN-1ant) wurde die humane IFNAR2-Ektodomäne als Fc-Fusionsprotein (Recombinant Human IFN- α/β R2Fc Chimera; 51,3 kDa; pI: 5,59; R & D Systems) über einen kovalent gebundenen Fang-Antikörper (AffiniPure Anti-Human IgG; Fc γ -spezifisch, Jackson Immuno Research) auf der *Sensorchip*-

Oberfläche eines *CMDP-Sensorchips* (IFN, YNS α 8) oder eines *CM3-Sensorchips* (IFN-1ant) immobilisiert.

Zunächst wurden zwei Kanäle bis zum Erreichen einer stabilen Basislinie mit Laufpuffer (PBST-0,05; PBS und 0,05 (v/v) % Tween 20) äquibriert. Der Fang-Antikörper wurde unter gleichen Bedingungen in jedem Kanal einzeln immobilisiert. Zunächst wurde die Oberfläche mit 35 μ l einer 1:1 Mischung aus 0,05 M N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 0,2 M N-Ethyl-N'-(3-di-methylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) aktiviert. Nach Einstellen einer stabilen Basislinie erfolgte die Immobilisierung des Fang-Antikörpers an der *Sensorchip*-Oberfläche. Hierzu wurde 20 μ l des Fang-Antikörpers mit einer Konzentration von 100 μ g/ml in 10 mM NaAc pH 5,0 (Ausgangskonzentration des Fang-Antikörpers lag bei 1,8 mg/ml) über die *Sensorchip*-Oberfläche bei einer geringen Flussrate von 5 μ l/min geleitet. Nicht besetzte Bindungsstellen wurden anschließend mit 35 μ l 1 M Ethanolamin/HCl pH 8,5 geblockt. Die Beladung der *Sensorchip*-Oberfläche entsprach ca. 2000 bis 2400 RU. Einer dieser Kanäle diente bei der Kinetikmessung als Referenzkanal, um systemimmanente Artefakte zu korrigieren, und der andere Kanal als Messkanal. Über den Messkanal wurde anschließend 45 μ l der IFNAR2-Ektodomäne (Fc-fusioniert) mit einer Konzentration von 2 μ g/ml geleitet. Dabei bildete sich ein stabiler Komplex zwischen dem Fang-Antikörper und der Fc-Domäne des Rezeptors. Im Anschluss wurden beide Kanäle mit PBST-0,05 gespült, bis sich eine stabile Basislinie eingestellt hatte. Hierbei blieben 150-250 RU des Rezeptors an der *Sensorchip*-Oberfläche gebunden. Für die Kinetikmessungen wurden durch SEC gereinigte PASylierte Proteinproben (IFN, YNS α 8 in PBS und IFN-1ant in PBSE) verwendet. Für jedes Protein wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe aus fünf unterschiedlichen Konzentrationen (IFN: 1,56–25 nM; YNS α 8: 0,19–3,125 nM; IFN-1ant: 0,097–1,56 nM) in PBST-0,05 hergestellt. Zur Messung wurde bei konstantem Fluss (25 μ l/min) 75 μ l der Proteinprobe – oder des Laufpuffers – über beide Kanäle des *Sensorchips* injiziert. Die Dissoziation erfolgte durch Spülen mit PBST-0,05 für 1200 s. Nach jeder Messreihe wurde die IFNAR2-Ektodomäne durch kurze Injektion von 10 mM Glycin/HCl pH 2,7 von der Matrix verdrängt. Der *Sensorchip* wurde danach in PBST-0,05 bei 4 °C bis zur nächsten Messung gelagert.

2.9.2.2 SPR-Messungen mit OmCI-Varianten

Die Untersuchung der Bindungseigenschaften der OmCI-Varianten gegenüber deren physiologischen Zielstrukturen orientierte sich an der veröffentlichten SPR-Methode von Hepburn et al. (2007). Zunächst wurde das humane C5-Protein (190 kDa, Reinheit > 95 % SDS-PAGE; Complement Technolog) auf der Oberfläche eines *CMDP-Sensorchips* (PAS(600)-pOmCI, pOmCI-PAS(600), pOmCI) oder eines *CM3-Sensorchips* (pOmCI-PAS(600)-His₆, pOmCI-His₆, MKHis₆-PAS(600)-OmCI, MKHis₆-OmCI) kovalent durch EDC/NHS-Chemie immobilisiert. Bei einer Flussrate von 5 μ l/min wurde 10 μ l einer Lösung von 50 μ g/ml C5 (pI-Wert: 4,7–5,5) in 10 mM NaAc pH 5,0 über den zuvor aktivierten

Messkanal geleitet, bis eine Beladung von 3200–4300 RU erreicht war. Nicht besetzte Bindungsstellen wurden mit 35 μ l 1 M Ethanolamin/HCl pH 8,5 blockiert. Ein zweiter Kanal diente bei der Messung als Referenzkanal und wurde nur mit EDC/NHS aktiviert und mit Ethanolamin blockiert. Vor der Kinetikmessung wurde über beide Kanäle die Regenerierungslösung (2 M MgCl_2) injiziert und anschließend bis zur Einstellung einer stabilen Basislinie mit Laufpuffer (HBST-0,05; HBS und 0,05 % (v/v) Tween 20) gewaschen. Die OmCI-Proteine wurden direkt vor der SPR-Messung entweder mit einer PD10-Säule oder durch analytische SEC in HBS umgepuffert.

Von den gereinigten Proteinproben (in HBS) wurden 1:2 Verdünnungsreihen mit fünf unterschiedlichen Konzentrationen in HBST-0,05 hergestellt: 3,9–62,5 nM für MKHis₆-OmCI, pOmCI-His₆, pOmCI; 7,8–125 nM für MKHis₆-PAS(600)-OmCI, PAS(600)-pOmCI und 31,25–500 nM pOmCI-PAS(600)-His₆, pOmCI-PAS(600). Bei konstantem Fluss (30 μ l/min) wurde 100 μ l jeder Proteinprobe oder des Laufpuffers über beide Flusszellen des *Sensorchips* geleitet. Die Dissoziationsphase wurde für 900 s verfolgt; danach erfolgte die Regeneration durch wiederholte Injektion von 2 M MgCl_2 , gefolgt von Spülen mit Laufpuffer nach der Regeneration und vor dem eigentlichen Injizieren des Analyten, um eine Verschleppung der Regenerationslösung über die Reaktionszyklen zu minimieren (Myszka, 1999). Nach der Messung wurde der *Sensorchip* in HBST-0,05 bei 4 °C bis zur nächsten Messung gelagert.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm BIAevaluation V 4.1. (Karlsson & Falt, 1997). Die Rohdaten wurden zunächst durch Subtraktion des Signals in der Referenzzelle von systemimmanenten Artefakten wie Injektionsschwankungen oder unspezifischen Wechselwirkungen bereinigt. Danach wurde das Signal auf der Y-Achse direkt vor der Injektion auf 0 gesetzt und der Injektionsstart (X-Achse) aller Kurven angeglichen. Im Anschluß daran wurde der Mittelwert aus drei Puffermessungen von allen Kurven abgezogen (*Double Referencing*), um systematische Schwankungen innerhalb der Signale zu eliminieren und die Qualität der Daten weiter zu verbessern (Myszka, 1999). Zum Schluß wurden die Phasen der Assoziation und Dissoziation innerhalb einer Konzentrationsreihe mit Hilfe der BIAevaluation Software zugeordnet und simultan (*Global Fitting*, Morton & Myszka, 1998) nach dem bimolekularen Bindungsmodell von Langmuir angepasst (*1: 1 Langmuir binding*). Zur Interpretation der aller PASylierter und nicht PASylierter OmCI-Daten war es nötig, R_{max} als lokalen Parameter zu optimieren. R_{max} entspricht der maximalen Anzahl verfügbarer Bindestellen auf dem *Sensorchip*, der in diesem Fall innerhalb einer Konzentrationsreihe nicht konstant war.

2.9.3 Circular dichroismus (CD) Spektroskopie

nach Gebauer (2013)

Zur Bestimmung der Sekundärstruktur von PASyliertem OmCI und dessen nicht PASylierter Variante wurde die Methode der Circular dichroismus (CD) Spektroskopie verwendet. Der CD-Effekt tritt auf, wenn sich die Extinktionskoeffizienten ε_R und ε_L für die gegenläufigen, zirkular polarisierten Komponenten, in die sich linear polarisiertes Licht zerlegen lässt, beim Durchtritt durch ein optisch aktives Medium voneinander unterscheiden. Bei der CD-Spektroskopie an Proteinen unterscheidet man einerseits die Absorptionseigenschaften der Peptidbindung im Fern-UV-Bereich (180 bis 270 nm) und andererseits die Absorptionseigenschaften der aromatischen Seitenketten im Nah-UV-Bereich (250 bis 350 nm). Letztere erlauben eine Beurteilung ihrer molekularen Umgebung. CD-Spektren im Absorptionsbereich der Peptidbindung ergeben dagegen Aufschluss über den Sekundärstrukturgehalt eines Proteins und ermöglichen eine Abschätzung des jeweiligen Anteils der unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente.

Zur Vorbereitung der Messung wurden die Proben mit Hilfe einer PD10-Säule gegen 50 mM K_2SO_4 , 5 mM KP_i pH 7,5 umgepuffert. Dann wurde 60 μ l Proteinlösung mit einer Konzentration von 4,8 μ M für das PASylierte OmCI oder 27,6 μ M für OmCI in die Filmküvette aus Quarzglas mit einer Schichtdicke von 0,01 cm pipettiert und in den Probenhalter eines Jasco J-810 Spektropolarimeters gestellt. CD-Spektren zwischen 190 und 250 nm wurden durch Akkumulation von 15 Einzelspektren (*Scan Speed* 100 nm/min, *Response* 4 s, *Bandwidth* 1 nm, *Data pitch* 0,1 nm) bei einer Proben temperatur von 25 °C erhalten. Die ermittelten Werte für die Elliptizität [mdeg] bei einer Wellenlänge λ wurden zunächst durch Subtraktion an das Pufferspektrum bereinigt und in die molare Elliptizität (θ_M ; in deg cm^2 $mmol^{-1}$) umgerechnet:

$$\theta_M = \frac{\theta(\lambda)}{1000 \times c \times d} \quad \text{Gleichung 6}$$

Dabei bezeichnen $\theta(\lambda)$ die gemessene Elliptizität, c die Proteinkonzentration [mol/l], und d die Schichtdicke der Küvette [cm]. Zum Schluß wurde die molare Elliptizität gegen die jeweilige Wellenlänge aufgetragen. Das molare Differenzspektrum für die reine PAS(600)-Sequenz wurde erhalten, in dem das molare CD-Spektrum des MKHis₆-OmCI von dem des MKHis₆-PAS(600)-OmCI Proteins subtrahiert wurde.

2.9.5 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

nach Breibeck (2016)

Zur Bestimmung der hydrodynamischen Radien von Proteinmolekülen wurde die Methode der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) angewendet. Diese Methode beruht auf der Interferenz der Rayleigh-Streuung von langwelligem monochromatischem Licht ($\lambda = 600 \text{ nm}$) 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 überschreiten.

Hierzu wurde 60 μl einer Proteinlösung mit einer Konzentration von 0,3–0,6 mg/ml in eine Küvette aus Quarz mit einer Schichtdicke von 0,3 cm (Minimalvolumen: 45 μl) pipettiert und in den auf 25 °C temperierten Probenhalter eines Zetasizer Nano S Photometers gestellt. Größere Aggregate wurden zuvor durch Mikrofiltration (Porengröße 0,2 μm) entfernt. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der zugehörigen Software (Zetasizer Software 6.32). Dabei wurde die Standardmethode "*Protein-size at 25C-low vol plastic-fast.sop*" verwendet. Die angegebenen hydrodynamischen Radien sind Mittelwerte aus drei Messungen der gleichen Probe, die jeweils die internen Qualitätskriterien erfüllten.

Der hydrodynamische Radius r_H^{DLS} [nm] kann mit Hilfe des Stokes-Einstein-Modells für monodisperse, genähert sphärische Teilchen (Einstein, 1905) aus dem Diffusionskoeffizienten D (ermittelt aus der Korrelationsfunktion im DLS-Experiment) berechnet werden:

$$r_H^{\text{DLS}} = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad \text{Gleichung 7}$$

hierbei entspricht k der Boltzmann-Konstante. Für die Viskosität η der verwendeten verdünnten Proteinlösung wurde hier der Wert von reinem Wasser (0,8872 cP bei 25 °C) angenommen.

Die Berechnung der apparenten Molekülmasse M [kDa] aus dem gemittelten hydrodynamischen Radius r_H^{DLS} [nm] erfolgte mit Hilfe der Funktion "*Molecular Weight Estimate (kDa) for Globular Proteins*" der Zetasizer-Software nach der Einstein-Simha-Beziehung (Einstein, 1905; Simha, 1940):

$$M = \frac{(r_H^{\text{DLS}})^3 \times 4\pi \times 2,5N_A}{3[\eta]} \quad \text{Gleichung 8}$$

Hierbei ist N_A die Avogadro-Zahl und $[\eta]$ eine von der Software angenommene intrinsische Viskosität.

2.10 *In vivo*-Experimente

2.10.1 Lumineszenz-Studien mit PASyliertem YNS α 8 in HyBNAR/Luc-Mäusen

Die Lumineszenz-Studien in HyBNAR/Luc-Mäusen mit YNS α 8 (durch das Weizmann-Institut zur Verfügung gestellt) und His₆-PAS(600)-YNS α 8 wurden am Weizmann-Institut für Wissenschaften, Israel entsprechend einer veröffentlichten Methode (Harari *et al.*, 2014a; Harari *et al.*, 2014b) durchgeführt.

2.10.2 (EAE)-Studien mit PASyliertem YNS α 8 in HyBNAR-Mäusen

Die Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE)-Studien in HyBNAR-Mäusen mit murinem und humanem IFN β (von Merck-Serono), His₆-PAS(600)-YNS α 8 und His₆-PAS(600)-IFN α 2b wurden ebenfalls am Weizmann-Institut für Wissenschaften, Israel nach veröffentlichter Methode durchgeführt (Harari *et al.*, 2014b).

2.10.3 Pharmakokinetische Studie von PASyliertem IFN-1ant in Rhesusaffen

Die pharmakokinetischen Studien von PASyliertem (periplasmatisch hergestelltes Protein, siehe Abschnitt 3.2.1.2) und nicht PASyliertem IFN-1ant in Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) wurden durch das *Human Immunology Section/Vaccine Research Center*, NIH in den USA durchgeführt (Nganou-Makamdop *et al.*, 2018). Das nicht PASylierte IFN-1ant wurde durch das Weizmann Institut in Israel bereitgestellt.

2.10.4 Pharmakokinetische Studie von PASyliertem OmCI in Mäusen

nach Eggenstein (2017)

Die pharmakokinetische Studie von PASyliertem und nicht PASyliertem OmCI in BALB/c und C57BL/6J Mäusen wurde durch Dr. Martin Schlapschy, Lehrstuhl für Biologische Chemie, im SPF Tierstall am Else Kröner-Fresenius Zentrum der Technischen Universität München durchgeführt.

Zur Bestimmung der Plasma-Halbwertszeit nach intravenöser (*i.v.*) Verabreichung von PASyliertem und nicht PASyliertem OmCI wurden je Proteinkonstrukt insgesamt neun weibliche BALB/c (Gewicht: 18–20 g) verwendet. Zum Vergleich wurde zusätzlich eine Pharmakokinetik nach subkutaner (*s.c.*) Verabreichung von MKHis₆-PAS(600)-OmCI in weiblichen C57BL/6J Mäusen (18–20 g) ermittelt. Die Proteininjektion erfolgte in die Schwanzvene (ohne vorherige Betäubung der Versuchstiere) in einer Dosis von 137 nmol pro kg (b.w.) Protein in PBS; das entsprach 2,5 mg MKHis₆-OmCI je kg (b.w.) und 9,3 mg MKHis₆-PAS#1(600)-OmCI je kg (b.w.). Typischerweise wurde bei einer Maus mit 20 g ein Injektionsvolumen von ca. 100 μ l mit einer 0,5 mg/ml Lösung des nicht PASylierten Proteins eingesetzt. Im Fall des PASylierten Proteins lag die Konzentration der Proteinlösung entsprechend der größeren Molekülmasse höher, bei 1,86 mg/ml. Die insgesamt neun Mäuse

wurden in drei Gruppen (N=3) aufgeteilt, wobei allen Mäusen einer Gruppe zum gleichen Zeitpunkt Blut über die Schwanzvene entnommen wurde. Die Entnahme erfolgte nach 1, 2, 4, 7, 15, 23, 39, 47 und 70,5 h (*i.v.*) oder 1, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 33 oder 48 h (*s.c.*).

- Gruppe I:
i.v.: 1, 2, 47 und 70,5 h
s.c.: 1, 6 and 12 h
- Gruppe II:
i.v.: 15, 23 und 39 h
s.c.: 4, 16, 33 h
- Gruppe III:
i.v.: 4 und 7 h
s.c.: 8, 24 und 48 h

Dabei wurde 20–100 µl Blut entnommen, zentrifugiert (Tischzentrifuge Eppendorf 5415C, 4 °C, 20 min, 14000 rpm), der lösliche Überstand (\cong Blutplasma) abgenommen und bis zur Quantifizierung des Testproteins durch *Sandwich*-ELISA (Abschnitt 2.8.3) bei -20 °C eingefroren.

Zur Bestimmung der terminalen Plasma-Halbwertszeit von MKHis₆-PAS(600)-OmCI und MKHis₆-OmCI nach *i.v.* Verabreichung wurden die ermittelten Proteinkonzentrationen gegen die Zeitpunkte der Probenahme aufgetragen. Die Kurvenanpassung zur Beschreibung der Pharmakokinetik von MKHis₆-PAS(600)-OmCI erfolgte nach dem Model des zweiphasigen Konzentrationsabfalls mit dem Programm *WinNonlin* v6.1 (Pharsight, St. Louis, MO) gemäß der Gleichung:

$$c(t) = A x e^{(-\alpha+t)} + B x e^{(-\beta+t)} \quad \text{Gleichung 9}$$

Dabei ist $c(t)$ die Proteinkonzentration im Blutplasma [nM] in Abhängigkeit von der Zeit t [h] nach Injektion, A der relative Achsenabschnitt [nM] sowie α die kinetische Konstante [h^{-1}] in der Verteilungsphase, während B und β den jeweiligen Parameter in der Eliminierungsphase entsprechen.

Dagegen folgte die Pharmakokinetik von MKHis₆-OmCI dem Model eines einphasigen Konzentrationsabfalls gemäß der Gleichung:

$$c(t) = \frac{D}{V} x e^{(-k x t)} \quad \text{Gleichung 10}$$

mit D als Dosis [nmol/kg], V als apparentes Verteilungsvolumen [ml/kg] und k als kinetische Konstante [h^{-1}] der Eliminierungsphase. Weitere pharmakokinetische Parameter, wie die *Area under the Curve* (AUC; [h x nM]) und die *Clearance* (CL; [mL x h^{-1} x kg^{-1}]) wurden aus den Messdaten ebenfalls berechnet.

2.10.5 Computerprogramme und Datenbanken

Zur Analyse von DNA- und Proteinsequenzen sowie zur Planung von *Primern* für die ortsgerichtete Mutagenese und die PCR wurden die Programme REFORMAT, MAP, BESTFIT, MAPSORT, TRANSLATE, PEPTIDESORT aus dem Programmpaket UWGCG (Devereux *et al.*, 1984) verwendet.

Zur Analyse von Proteinsequenzen stand das am Lehrstuhl von Prof. Skerra entwickelte Programm ANTICALIGN zur Verfügung (Jarasch *et al.*, 2016). Proteinspezifische Parameter wie die Molekülmasse, der pI-Wert und der molare Extinktionskoeffizient wurden mittels *ProtParam* (Wilkins *et al.*, 1999) auf dem ExPASy Server berechnet. Zusätzlich wurde der *PeptideMass* Algorithmus zur Bestimmung von Peptidmassen nach einem Trypsin-Verdau verwendet.

Sequenz- und Strukturdaten von Proteinen sowie relevante Publikationen wurden über das *World Wide Web* aus folgenden Datenbanken erhalten:

Protein Data Bank	http://www.rcsb.org/pdb
Universal Protein Database	http://www.uniprot.org
ExPASy Server	http://www.expasy.org
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

Die Darstellung dreidimensionaler Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm *PyMOL Molecular Graphics System* v1.3 (DeLano, 2002).

Für die Auswertung der Messdaten aus pharmakokinetischen Studien wurde das Programm *WinNonlin* v6.1 (Pharsight, St. Louis, MO) verwendet. Die Graphische Darstellung von Messdaten einschließlich nicht-linearer Regression wurde mit dem Programm *KaleidaGraph* v4.03 (Synergy Software Reading, PA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 PASylierter Interferon- α 2b Superagonist zur Behandlung von MS

3.1.1 Gentechnische Herstellung und Reinigung

Ein Ziel dieser Arbeit war es, durch PASylierung des IFN- α 2b-Superagonisten YNS α 8 (Levin *et al.*, 2011) einen alternativen Wirkstoff mit verlängerter Plasma-Halbwertszeit gegenüber IFN- β (Lengyel, 1982) zur Behandlung von MS (Kieseier, 2011) zu entwickeln. Im Rahmen früherer Versuche zur PASylierung von verschiedenen Modellproteinen wurde bereits das Wildtyp-Protein IFN- α 2b in Fusion mit PAS-Sequenzen unterschiedlicher Länge (PAS(200), PAS(400), PAS(600)) produziert und charakterisiert (Schlapschy *et al.*, 2013). Hierbei wurde gezeigt, dass sich die PASylierten Interferon-Varianten mit ihren beiden strukturell relevanten Disulfidbrücken im Periplasma des *E. coli* K12 Stamms KS272 in aktiver Form herstellen lassen und dass sich mit einer PAS-Sequenz von 600 Aminosäuren eine klinisch relevante Pharmakokinetik (Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit um den Faktor 30) erreichen lässt. Daher wurde in dieser Arbeit der Superagonist YNS α 8 ebenfalls mit einer PAS(600)-Sequenz versehen und periplasmatisch produziert. Bei der Reinigung PASylierter Proteine über das anfangs verwendete *Strep*-tag II war in früheren Arbeiten aufgefallen, dass die Kapazität der verwendeten *Strep*-Tactin-Säule für PASylierte Proteine deutlich erniedrigt war. Außerdem wurde eine Immunogenität des *Strep*-tag II Affinitätsanhängsels in mit PASyliertem Interferon behandelten Mäusen beobachtet (Schlapschy *et al.*, 2013). Daher sollte in dieser Arbeit stattdessen ein Hexahistidin-Anhängsel (His₆-tag) zur Affinitätsreinigung der Interferon-Varianten verwendet werden.

Als Vergleichsprotein für die biophysikalische und pharmakokinetische Charakterisierung wurde zudem das entsprechende Wildtyp-Protein IFN- α 2b hergestellt. In den folgenden beiden Abschnitten werden die Plasmidkonstruktion (Abschnitt 3.1.1.1) sowie die periplasmatische Produktion und Reinigung (Abschnitt 3.1.1.2) der beiden PASylierten Proteine IFN- α 2b und YNS α 8 beschrieben.

3.1.1.1 Plasmidkonstruktion für die periplasmatische Produktion in *E. coli*

Der Superagonist YNS- α 8 wurde durch Einführung der sechs Mutationen H57Y, E58N, Q61S, E159K, S160R und R162K (Schreiber & Piehler, 2015) in das humane Wildtyp-Protein IFN- α 2b (UniProt-ID: Q86UP4; Positionen 2–166) generiert. Hierzu wurde das Plasmid pASK-IBA4-IFN (Schlapschy *et al.*, 2013) verwendet, auf dem das Wildtyp-Protein IFN- α 2b (Position 2–166) mit folgenden regulatorischen Sequenzen kodiert war: ribosomale Bindestelle des OmpA-Proteins (Outer Membrane Protein A) zur effizienten Translationsinitiation, OmpA-Signalsequenz (Movva *et al.*, 1980) zur Sekretion in das oxidierende Milieu des periplasmatischen Raums von *E. coli*, um dort die native Faltung zu

```

XbaI      ****
121 AAAAACTAGATAACGAGGGCAAAAAATGAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTTTATAGATCTATTGCTCCCGTTTTTTACTTTTTCTGTGCGATAGCGCTAACGTCACCGTG
MetLysLysThrAlaIleAlaIleAlaValAlaLeu -
OmpA-Signalsequenz →
NheI      KasI
181 TGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCCTAGCCATCACCACCATCACCATGGCGCCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
accgaccaaaagcgatggcatcgctccggcgatcggttagtggtgtagtggtaccgcggt
AlaGlyPheAlaThrValAlaGlnAlaAlaSerHisHisHisHisHisHisGlyAlaSer -
1 His6-tag → 10

SapI
241 GCTCTTCTGCCTGTGATCTGCCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGGAGGACCTTGATGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGAGAAGACGGACACTAGACGGAGTTTGGGTGTCGGACCCATCGTCTCTGGAACCTACG
SerSerAlaCysAspLeuProGlnThrHisSerLeuGlySerArgArgThrLeuMetLeu -
20 30

301 TCCTGGCACAGATGAGGAGAATCTCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGGACCGTGTCTACTCCTTTAGAGAGAAAAGAGGACGAACTTCTGTCTGTACTGAAAC
LeuAlaGlnMetArgArgIleSerLeuPheSerCysLeuLysAspArgHisAspGly -
40 50

NK_IFNα_agonist_1_f 5'-CCATCCCTGTCTCTc
361 GATTTCCCCAGGAGGAGTTTGGCAACCAGTTCCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCTCTc
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTAAAGGGTCTCTCAAACCGTTGGTCAAGGTTTCCGACTTTGGTAGGGACAGGAGG
PheProGlnGluGluPheGlyAsnGlnPheGlnLysAlaGluThrIleProValLeuHis -
60 70 Tyr
3'-GGTAGGGACAGGAGa

ATaAcATGATCtCGCAGATCTTCAATCTC-3'
ATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGG
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACTCTACTAGGTCGTCTAGAAGTTAGAGAAGTCGTGTTTCTGAGTAGACGACGAACCC
GluMetIleGlnGlnIlePheAsnLeuPheSerThrLysAspSerSerAlaAlaTrpAsp -
Asn Ser 80 90
TATgTACTAGagCGTCTAGAAGTTAGAG-5' NK_IFNα_agonist_1_r

481 ATGAGACCTCTAGACAAATTTACTACTGAACTTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACTCTGGGAGGATCTGTTAAGATGTGACTTGAGATGGTCGCTGACTTACTGGACCTTC
GluThrLeuLeuAspLysPheTyrThrGluLeuTyrGlnGlnLeuAsnAspLeuGluAla -
100 110
541 CCTGTGTGATACAGGGGTGGGGTGACAGAGACTCCCCTGATGAAGGAGGACTCCATTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGACACACTATGTCCCCACCCCTGCTCTGAGGGGACTACTTCTCCTGAGGTAAG
CysValIleGlnGlyValGlyValThrGluThrProLeuMetLysGluAspSerIleLeu -
120 130
601 TGGCTGTGAGGAAACTTCCAAGAATCACTCTCTATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
accgacactccTTTATGAAGTTTCTTAGTGAGAGATAGACTTCTCTTCTTATGTCGG
AlaValArgLysTyrPheGlnArgIleThrLeuTyrLeuLysGluLysLysTyrSerPro -
140 150

NK_IFNα_agonist_2_f 5'-GTCAACAACT
661 CTTGTGCTGGGAGGTTGTCAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTGTCAACAAACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAACACGGACCTCCAACAGTCTCGTCTTTAGTACTCTAGAAAAGAAACAGTTGTTTGA
CysAlaTrpGluValValArgAlaGluIleMetArgSerPheSerLeuSerThrAsnLeu -
160 170
TGCAAAAcGTTTAAaAGTAAGGAATAAGCTTG-3'
HindIII
721 TGCAAGAAAGTTTAAAGTAAGGAATAAGCTTGACCTGTGAAGTGAATAATGGCGCACA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACGTTCTTTCAAATTTCTTCTTCTTATTCGAACCTGGACACTTCACTTTTTACCAGGCTG
GlnGluSerLeuArgSerLysGluEnd
LysArg Lys 179
ACGTTTtTgCAAATTTCTTCTTCTTATTCGAAC-5' NK_IFNα_agonist_2_r

```

Abbildung 5: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des IFN- α 2b Gens in pASK75-His₆-IFN und Mutagenese-Primer zur Konstruktion von pASK75-His₆-YNS α 8. Die Aminosäuresequenz des rekombinanten IFN- α 2b nach Abspaltung der OmpA-Signalsequenz ist grau hinterlegt, das Hexahistidinanhängsel ist türkis hervorgehoben. Der Start der nativen IFN- α 2b Aminosäuresequenz (Cys1, Abbildung 2) ist durch Unterstreichen hervorgehoben. Die ribosomale Bindestelle (RBS) des OmpA-Proteins ist durch Sternchen (*) markiert, Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen, die Schnittstelle von SapI ist rot eingezeichnet. Die vier Primer, die ausgehend von pASK-IBA4-IFN für die Mutagenese zum YNS α 8 verwendet wurden, sind eingezeichnet, die sechs mutierten Codons bzw. Aminosäuren sind gelb hinterlegt, die sich unterscheidenden Nukleotide sind zusätzlich durch Kleinschrift hervorgehoben.

ermöglichen (Skerra & Plückthun, 1988); Ala-Ser-Linker; *Strep*-tag II zur Affinitätsreinigung (Schmidt & Skerra, 2007); Gly-Ala-Ser-Ser-Ser-Ala-Linker mit einer singulären *KasI*-Restriktionsschnittstelle für die Subklonierung des IFN-Gens und einer singulären *SapI*-Restriktionsschnittstelle zur Insertion von PAS#1-Genkassetten. Anschließend wurden die Gene für YNS- α 8 und IFN- α 2b auf einem Derivat des universellen Expressionsplasmids pASK75 (Skerra, 1994) subkloniert (Abbildung 7), das sich von pASK-IBA4 durch die Kodierung des N-terminalen His₆-tags anstelle des *Strep*-tag II unterscheidet, während die anderen Genelemente erhalten blieben. Zur Kontrolle der heterologen Expression in *E. coli* verwendeten beiden Plasmide das sehr dicht reprimierte *tet*-Promotor/Operator-System (Skerra, 1994), wodurch die Basalsynthese eines unter Umständen toxischen Fremdgens im Vergleich zu anderen Promotor/Operator-Systemen (z.B. lacUV5-Promotor; Skerra & Plückthun, 1991) sehr niedrig gehalten wird.

Zur Konstruktion des Gens für den Superagonisten YNS- α 8 wurden in zwei aufeinanderfolgenden Mutagenese-Schritten mit den *Primern* NK_IFNa_agonist_1_f und NK_IFNa_agonist_1_r die drei Mutationen H57Y, E58N und Q61S (erhöhen die Affinität zu IFNAR1) und mit den *Primern* NK_IFNa_agonist_2_f und NK_IFNa_agonist_2_r die drei Mutationen E159K, S160R und R162K (erhöhen die Affinität zu IFNAR2) in das IFN- α 2b Gen auf dem Plasmid pASK-IBA4-IFN eingeführt. Die korrekte Nukleotidsequenz wurde durch Sequenzanalyse mit den *Primern* D20 (*forward*) und PR1 (*reverse*) bestätigt. Im Anschluß wurden die Genkassetten für IFN- α 2b und YNS α 8 über die Restriktionsschnittstellen *KasI* und *HindIII* auf dem Vektor pASK75-His₆-hGH (Schlupschy *et al.*, 2013) subkloniert, woraus die zwei Expressionsplasmide pASK75-His₆-IFN und pASK75-His₆-YNS α 8 resultierten (Abbildung 5). In beide Expressionsplasmide wurde schließlich die N-terminale PAS#1(600)-Genkassette inseriert. Hierfür wurde die Strategie eines sequentiellen Aufbaus der finalen PAS#1(600)-Genkassette aus drei identischen, konsekutiven Einheiten der kürzeren PAS#1(200)-Genkassette gewählt (Skerra *et al.*, 2008).

Die zugrundeliegende PAS#1(200)-Genkassette mit 600 bp, wurde ursprünglich durch unvollständige Ligierung von Minimal-kassetten aus zwei hybridisierten komplementären Oligodesoxynukleotiden mit einer Länge von 63 b erhalten, welche mittels ihrer 5'-GCC-Überhänge, die für die Aminosäure Alanin kodieren, assemblieren konnten. Aus zehn solcher Sequenzabschnitte setzt sich die so konstruierte 600 bp-Genkassette (PAS#1(200)) zusammen (Schlupschy *et al.*, 2013; Abbildung 6A). Das Design der Oligodesoxynukleotide folgte dem Ziel, unter Berücksichtigung der bekannten Codon-Frequenzen in *E. coli* eine größtmögliche Codon-Abwechslung innerhalb der Minimalsequenz zu erreichen. Zur Verifizierung der PAS#1(200)-Gensequenz wurde diese auf pASK88-hu4D5 kloniert, der eine doppelte *SapI*-Schnittstelle (*duoSapI*; Abbildung 6B) enthielt und in dieser Arbeit als Klonierungsvektor diente. Dieser ermöglichte durch Verdau mit dem Restriktionsenzymen *SapI* sowohl eine

präzise Insertion als auch die Exzision der PAS#1(200)-Genkassette über deren 5'-GCC/GGC-Überhänge.

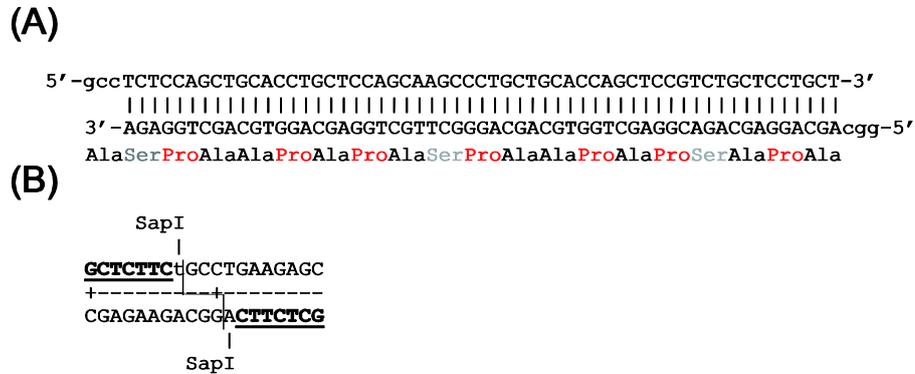


Abbildung 6: Klonierungskonzept zur PASylierung. (A) Das Oligodesoxynukleotid-Paar der Minimalkassette kodiert für die der PASylierung zugrundeliegende Minimalsequenz "PAS#1" aus 20 Aminosäuren und weist beiderseitig 5'-GCC/GGC-Überhänge auf, die zur Assemblierung längerer Sequenzen wie der der PAS#1(200)-Genkassette dient. (B) Doppelte *SapI*-Restriktionsschnittstelle im Plasmid pASK88-hu4D5, das zur Klonierung der PAS-Genkassetten verschiedener Längen dient. Die PAS-Sequenz kann hier mit ihren Überhängen inseriert und wieder ausgeschnitten werden.

Auch die Empfängervektoren pASK75-His₆-IFN und pASK75-His₆-YNSα8 enthielten im N-terminalen Gly-Ala-Ser-Ser-Ser-Ala-Linker eine singuläre *SapI*-Erkennungssequenz (Abbildung 5), über die die Plasmide zunächst linearisiert wurden. Anschließend wurde eine Ligierungsreaktion mit der 6-fachen molaren Menge der PAS#1(200)-Genkassette angesetzt, um so eine Ligierung mit Konkatalamern der PAS-Kassette über ihre 5'-GCC/GGC-Überhänge zu erreichen und in einem Schritt die Plasmide für verschiedene Interferon-Varianten mit der PAS#1(200)-, PAS#1(400)- und PAS#1(600)-Genkassette zu erhalten. In allen Fällen bleibt eine singuläre *SapI*-Schnittstelle N-terminal der inserierten PAS-Sequenz bestehen, die im Prinzip für weitere konsekutive Insertionsschritte verwendet werden kann; ein Wiederausschneiden der PAS-Genkassette aus dem Empfängervektor ist allerdings nicht mehr möglich. Bei beiden Ansätzen konnte das gewünschte Konstrukt mit der PAS#1(600)-Genkassette nicht in einem einzigen Ligierungsschritt erzeugt werden, denn es wurde zunächst nur das PAS#1(200)-Konstrukt erhalten. Basierend auf den erhaltenen Konstrukten wurde der Insertionsschritt durch präparativen Verdau mit *SapI* und anschließende Ligierung mit der PAS#1(200)-Genkassette wiederholt. Das finale Konstrukt pASK75-His₆-PAS#1(600)-IFN konnte dabei in nur einem weiteren Schritt erzeugt werden; für das finale Konstrukt pASK75-His₆-PAS#1(600)-YNSα8 war dagegen eine abermalige Wiederholung notwendig (Abbildung 7).

3.1.1.2 Periplasmatische Produktion in *E. coli* und Proteinreinigung

Die periplasmatische Produktion von His₆-PAS(600)-YNS α 8 unter Verwendung des *E. coli* Stamms KS272 wurde in einem ersten Ansatz im 2 l-Maßstab im Schüttelkolben etabliert (Abschnitt 2.5.1). Das Protein wurde mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung des N-terminalen His₆-tags (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*, IMAC; Porath *et al.*, 1975; Abschnitt 2.7.1.1) und Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC; Abschnitt 2.7.1.5) gereinigt. Die so erhaltene Proteinpräparation wies nach der SEC allerdings noch deutliche Verunreinigungen auf. Zudem war die absolute Ausbeute mit 2 mg pro 6 l Kulturmedium (3x 2 l-Schüttelkolben) bzw. 256 $\mu\text{g l}^{-1}$ OD₅₅₀⁻¹ (Volumen normiert auf eine Kulturdichte bei der Ernte von OD₅₅₀ = 1) zu niedrig für die geplanten *In vivo*-Mausstudien und die vorherige biophysikalische Charakterisierung.

Um die Ausbeute zu steigern, wurde das Protein daher in einem zweiten Ansatz durch Fermentation bei hoher Zelldichte im 8 l-Maßstab produziert (Schiweck & Skerra, 1995). Die konkrete Faltung des periplasmatischen Proteins während der Fermentation wurde durch Koexpression der *E. coli* eigenen Thiol/Disulfid-Oxidoreduktasen *DsbA* und *DsbC* sowie der Peptididyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen *FkpA* und *SurA* mit Chaperon-Aktivität unterstützt, die auf dem Helferplasmid pTUM4 kodiert waren (Schlapschy *et al.*, 2006). Die Reinigung wurde darüber hinaus durch den zusätzlichen Schritt eines Kationenaustauschers verbessert.

Zur Produktion von His₆-PAS(600)-YNS α 8 wurde *E. coli* KS272 mit dem Expressionsplasmid pASK75-His₆-PAS#1(600)-YNS α 8 und dem Helferplasmid pTUM4 kotransformiert; die Fermentation erfolgte nach etabliertem Protokoll (Schiweck & Skerra, 1995) in einem 10 l-Laborfermenter mit 8 l-Mineralsalz-Medium (Abschnitt 2.1.8) unter kontrollierter Substratdosierung (Glucose) und ausreichender Belüftung (Abschnitt 2.5.2). Ampicillin und Chloramphenicol wurden zur Selektion des Expressionsplasmids bzw. Helferplasmids zugesetzt. Die Fermentation wurde durch regelmäßige Bestimmung der OD₅₅₀ überwacht und gesteuert, der Fortgang der Proteinbiosynthese in Gesamtzellextrakten nach Induktion sowie der Proteingehalt im finalen Periplasma-Extrakt wurden durch reduzierende SDS-PAGE des Gesamtzellysats überprüft.

Die Zellen zeigten ein reproduzierbares exponentielles Wachstum und erreichten nach 18,5 h Stunden eine Zelldichte von OD₅₅₀ = 20 (Abbildung 8A), bei der die Biosynthese von His₆-PAS(600)-YNS α 8 mit 0,5 mg/l Anhydrotetracyclin (aTc) induziert wurde. Mit Eintritt in die stationäre Phase nach weiteren 2,5 Stunden wurden die Zellen zur Präparation der periplasmatische Proteinfraktion bei OD₅₅₀ = 25 geerntet.

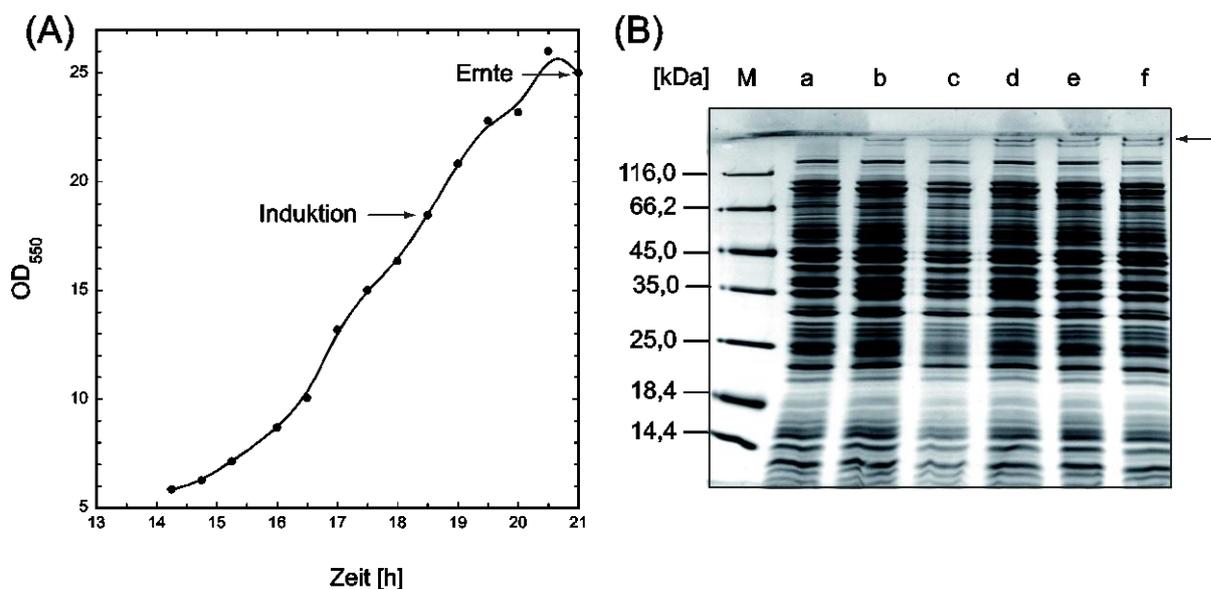


Abbildung 8. Periplasmatische Produktion von His₆-PAS(600)-YNSα8 im 8 l-Fermenter in *E. coli* KS272. (A) Geglättete Wachstumskurve der Bakterienkultur. Die Zelldichten (OD₅₅₀) bei Induktion und Ernte (nach weiteren 2,5 h) sind markiert. (B) Reduzierende SDS-PAGE zur Analyse der Proteinbiosynthese. His₆-PAS(600)-YNSα8 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet, M: Proteinmarker. Die Spuren a bis f stellen den Gesamtzellextrakt zu verschiedenen Expressionszeiten dar; a: Kultur zum Zeitpunkt der Induktion, b: 0,5 h Expression, c: 1,0 h Expression, d: 1,5 h Expression, e: 2,0 h Expression, f: 2,5 h Expression.

Nach Induktion der Genexpression nahm die Menge an rekombinantem His₆-PAS(600)-YNSα8 im Gesamtzellextrakt stetig zu (Abbildung 8B). Dabei migrierte His₆-PAS(600)-YNSα8 in der SDS-PAGE bei einer anomal vergrößerten apparenten Molekülmasse von > 116 kDa (berechnete Masse: 70,3 kDa), wie es für PASylierte Proteine aufgrund einer herabgesetzten SDS-Bindekapazität der hydrophilen PAS-Sequenz charakteristisch ist. Das niedrigere Verhältnis von negativer Ladung zu Proteingröße führt dabei zu einem verlangsamten elektrophoretischen Laufverhalten (Harari *et al.*, 2014b; Mendler *et al.*, 2015; Morath *et al.*, 2015; Schlapschy *et al.*, 2013).

Darüber hinaus wurden zwei Banden für das PASylierte YNSα8 in der SDS-PAGE identifiziert. Bei der zweiten Bande handelte es sich entweder um ein Abbauprodukt des PASylierten Proteins oder um eine unreife Form, die noch die OmpA-Signalsequenz trug.

Die Reinigung von His₆-PAS(600)-YNSα8 aus dem Periplasma-Extrakt erfolgte in drei chromatographischen Schritten (Abbildung 9): 1. IMAC an Ni²⁺-Sephrose, 2. Kationenaustausch-Chromatographie (CEX) und 3. SEC. Alle Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE überprüft, die Identität und Reinheit der finalen Proteinpräparation wurde durch ESI-MS verifiziert.

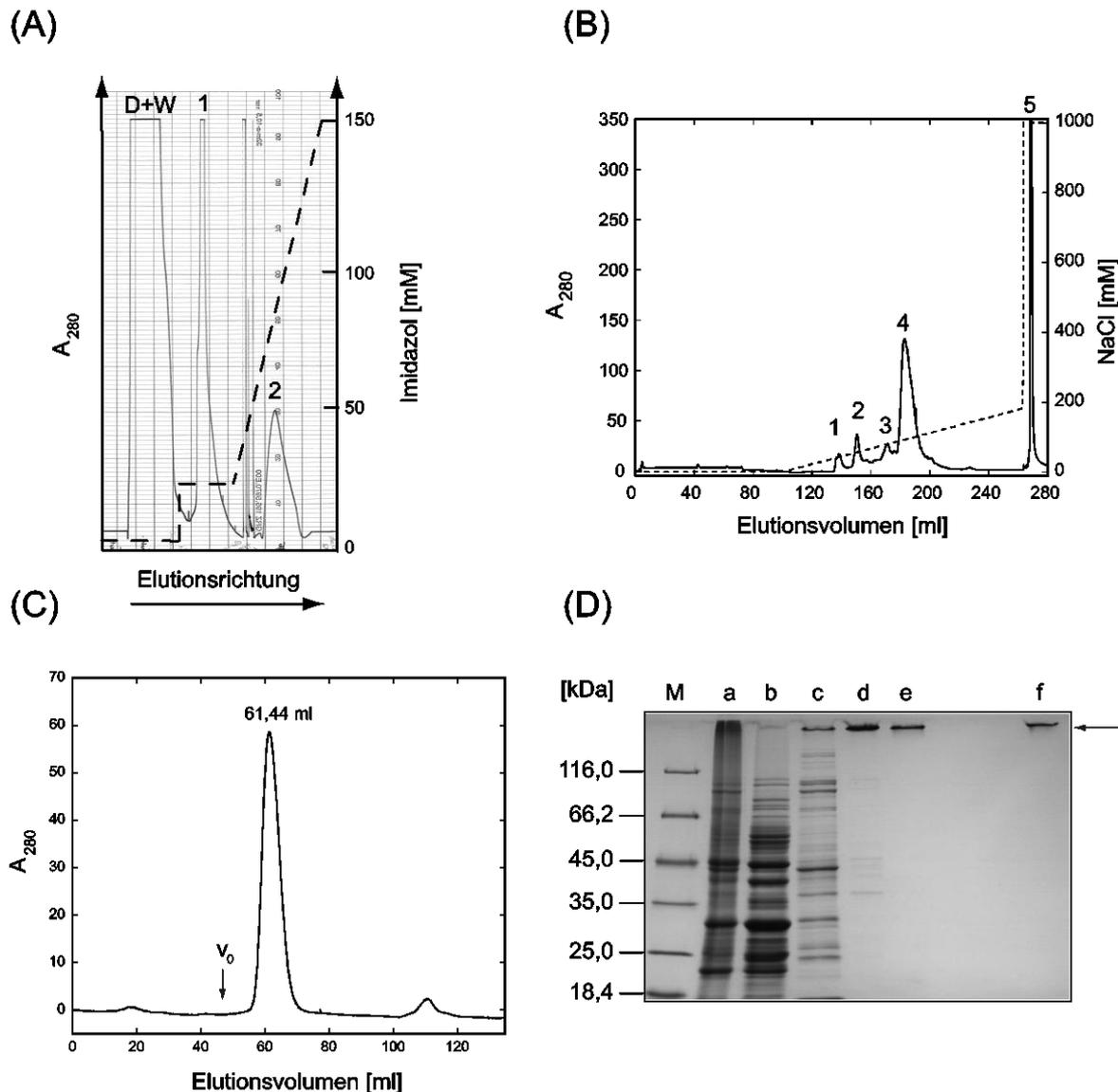


Abbildung 9. Chromatographische Reinigung von His₆-PAS(600)-YNS α 8. (A) IMAC-Reinigung an Ni-Sepharose High Performance. Durchlauf (D)- und Waschfraktion (W) repräsentieren den Proteinanteil, der nicht an die IMAC-Säule bindet. Durch eine Vorelution mit 20 mM Imidazol wurde ein Großteil der unspezifisch gebundenen Wirtszellproteine abgetrennt (Peak 1). Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 20–150 mM Imidazol (Peak 2), His₆-PAS(600)-YNS α 8 trat ausschließlich im rechten Schulterbereich von Peak 2 auf. Bei dem Ausschlag zu Beginn des Gradienten handelt es sich um Luft im Schlauch. (B) CEX-Reinigung an Resource S. Die Elution erfolgte bei pH 7,0 mit 0–200 mM NaCl. His₆-PAS(600)-YNS α 8 eluierte als Peak 4. (C) SEC-Reinigung an Superdex S200 (120 ml Bettvolumen). V₀ markiert das SEC-Ausschlussvolumen. His₆-PAS(600)-YNS α 8 eluierte als Monomer und in hoher Reinheit bei 61,44 ml. (D) Zusammenfassende SDS-PAGE-Analyse aller Reinigungsschritte. M: Proteinmarker, a: Periplasma-Extrakt, b: Durchlauf IMAC (D+W), c: IMAC-Eluat (rechter Schulterbereich Peak 2), d: CEX-Eluat (Peak 4), e: SEC-Eluat (reduzierende Bedingungen); f: SEC-Eluat (nicht-reduzierende Bedingungen).

Für den ersten Reinigungsschritt (IMAC unter Verwendung eines peristaltischen Pumpensystems bei 4 °C, Abschnitt 2.7.1.1) wurde der gewonnene Periplasma-Extrakt viermal gegen das 10-fache Volumen an IMAC-Puffer (Abschnitt 2.5.2) dialysiert und portionsweise auf eine Ni-Sepharose High Performance Säule (30 ml Bettvolumen) aufgetragen. Um bereits einen Großteil an unspezifisch gebundenen Wirtszellproteinen zu entfernen, wurde eine Vorelution mit 20 mM Imidazol durchgeführt (Abbildung 9A, Peak 1). Anschließend wurde mit einem linearen Gradienten von 20 bis 150 mM Imidazol eluiert. Die

Fractionen der IMAC wurden durch reduzierende SDS-PAGE überprüft (nicht gezeigt). His₆-PAS(600)-YNS α 8 eluierte bei ca. 100 mM Imidazol und konnte ausschließlich im rechten Schulterbereich (= IMAC-Eluat) des Elutionspeaks (Peak 2) nachgewiesen werden, der auch erhebliche Mengen an unspezifisch gebundenem Wirtszellprotein enthielt (Abbildung 9A, Peak 2; Abbildung 9D, Spur c). Trotz der Vorelution führte die IMAC-Reinigung also nur zunächst zu einer groben Abtrennung des PASylierten Proteins.

Für den zweiten Reinigungsschritt (CEX, Abschnitt 2.7.1.4) wurden alle Elutionsfraktionen aus der IMAC, die einen deutlichen Anteil an His₆-PAS(600)-YNS α 8 (pI = 8,37) enthielten, vereinigt, gegen 20 mM Tris/HCl pH 7,0 dialysiert und auf eine Resource S-Säule (6 ml Bettvolumen) aufgetragen. Es wurde ein linearer Gradient von 0 bis 200 mM NaCl angelegt (Abbildung 9B). Die einzelnen Fraktionen der CEX wurden durch reduzierende SDS-PAGE überprüft (nicht gezeigt). His₆-PAS(600)-YNS α 8 eluierte bei ca. 90 mM NaCl (Peak 4) und konnte damit von einem Großteil der kontaminierenden Wirtszellproteine (Peak 1 & 5) sowie von verschiedenen verkürzten und aggregierten/oligomeren Varianten (Peaks 2 und 3) abgetrennt werden. Die Fraktionen aus Peak 4 wurden vereinigt (= CEX-Eluat) und erschienen in der SDS-PAGE als nahezu reines Protein (Abbildung 9D, Spur d).

Für den letzten Reinigungsschritt (SEC, Abschnitt 2.7.1.5) wurde das vereinigte CEX-Eluat konzentriert und die Proteine auf einer Superdex S200 16/60-Säule (120 ml Bettvolumen) in PBS als Laufpuffer nach der Größe aufgetrennt (Abbildung 9C). His₆-PAS(600)-YNS α 8 lag ausschließlich als Monomer und in hoher Reinheit vor; es eluierte bei einem Elutionsvolumen von 61,44 ml, was basierend auf einer Kalibrierung mit Standardproteinen einer apparenten Molekülmasse von ca. 755 kDa entsprach. Entsprechend der SDS-PAGE-Analyse lag die Reinheit der finalen Proteinpräparation (= SEC-Eluat) bei > 95 % (Abbildung 9D, Spur e).

Zusätzlich wurde das SEC-Eluat durch nicht-reduzierende SDS-PAGE-Analyse untersucht (Abbildung 9D, Spur f), um die korrekte Ausbildung der zwei Disulfidbrücken im nativen Interferon zu überprüfen. Proteine mit ausgebildeten Disulfidbrücken migrieren unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der Regel etwas schneller als unter reduzierenden Bedingungen, da die denaturierte Polypeptidkette kompakter vorliegt. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen war für His₆-PAS(600)-YNS α 8 nur eine einzelne Bande erkennbar, es lagen daher scheinbar keine Disulfid-Isomere in der Proteinpräparation vor. Da PASylierte Proteine in der SDS-PAGE-Analyse eine sehr große apparente Molekülmasse aufweisen, ist eine eindeutige Unterscheidung von Isomeren allerdings schwierig.

Die absolute Ausbeute an Protein aus der beschriebenen 8 l-Fermentation lag nach der Reinigung bei 4 mg His₆-PAS(600)-YNS α 8, entsprechend 20 $\mu\text{g l}^{-1}$ OD₅₅₀⁻¹. Um ausreichende Proteinmengen für die geplanten *In vivo*-Mausstudien zu erhalten, wurde das Protein in einer zweiten Fermentation unter identischen Bedingungen hergestellt (nicht gezeigt); die absolute

Ausbeute war dabei etwas höher mit 13 mg His₆-PAS(600)-YNS α 8, entsprechend 54 $\mu\text{g l}^{-1}$ OD₅₅₀⁻¹.

Als Kontrolle für die biophysikalischen und pharmakokinetischen Untersuchungen wurde außerdem das PASylierte Wildtyp-Protein His₆-PAS(600)-IFN hergestellt und gereinigt (nicht gezeigt). Die Fermentation erfolgte nach dem oben etablierten Protokoll. Da das Wildtyp-Protein IFN- α 2b im Gegensatz zum Superagonisten YNS α 8 (pI = 8,37) einen sauren pI-Wert von 6,54 aufweist, wurde der zweite Reinigungsschritt (CEX) durch eine Anionenaustausch-Chromatographie (AEX, Abschnitt 2.7.1.4) ersetzt. Hierbei wurden die vereinigten IMAC-Elutionsfraktionen gegen 20 mM Tris/HCl pH 8,5 dialysiert und auf eine Resource Q-Säule (6 ml Bettvolumen) aufgetragen, die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0–200 mM NaCl. Die absolute Ausbeute der 8 l-Fermentation lag nach dem letzten Reinigungsschritt bei 11 mg His₆-PAS(600)-IFN, entsprechend 44 $\mu\text{g l}^{-1}$ OD₅₅₀⁻¹.

Zur finalen Bestätigung der Identität und Reinheit von His₆-PAS(600)-YNS α 8 und His₆-PAS(600)-IFN sowie der Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken wurden die Molekülmassen – nach Dialyse der Proteine gegen 10 mM Ammoniumacetat (NH₄Ac) pH 6,6 – mittels Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) bestimmt (Abschnitt 2.9.1.1). Für beide Proteine stimmten die detektierten Massen mit den erwarteten Massen sehr gut überein, die korrekte Ausbildung der beiden Disulfidbrücken im oxidierten Protein sowie die vollständige Abspaltung der OmpA-Signalsequenz konnte bestätigt werden (Tabelle 5; Abbildung 10).

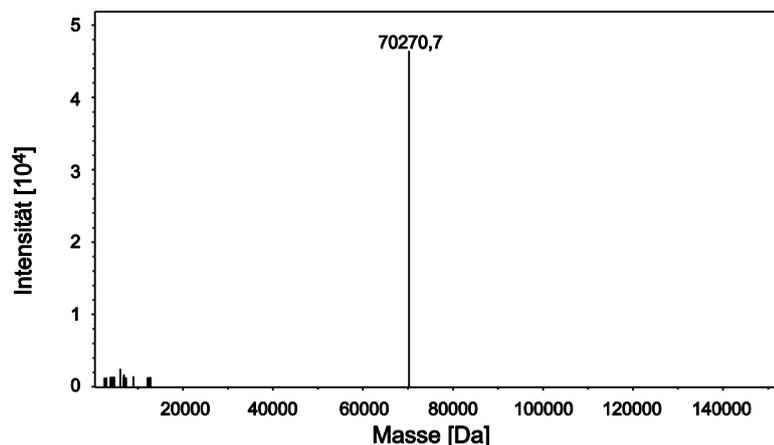


Abbildung 10: Dekonvolviertes ESI-MS-Spektrum von His₆-PAS(600)-YNS α 8. Die berechnete Masse von 70271,9 Da (ExpASY ProtParam unter Abzug von 4 av für die beiden Disulfidbindungen) konnte im Rahmen der Messgenauigkeit bestätigt werden (detektierte Masse: 70270,7 Da).

In beiden Fällen wurden keine weiteren Peaks detektiert was die hohe Reinheit der Proteinpräparationen belegt.

Tabelle 5. ESI-MS-Messungen der PASylierten Interferon-Varianten. Die detektierten Massen stimmten für beide PASylierten Interferon-Varianten mit den berechneten Massen (ExpASy ProtParam) sehr gut überein, auch die Ausbildung der zwei Disulfidbrücken im oxidierten Protein sowie die vollständige Abspaltung der OmpA-Signalsequenz konnte im Rahmen der Messgenauigkeit bestätigt werden.

Protein	Berechnete ox. Masse ^a [Da]	Detektierte Masse [Da]	Abweichung [Da]
His ₆ -PAS(600)-IFN	70261,8	70263,0	+1,2
His ₆ -PAS(600)-YNS α 8	70271,9	70270,7	- 1,2

^a Berechnet mit Hilfe des Programms ProtParam (ExpASy) unter Abzug von 4 av.

Da beide PASylierte Proteine für *In vivo*-Studien verwendet werden sollten, wurden nach dem letzten Reinigungsschritt (SEC) der jeweilige Endotoxingehalt bestimmt. Mit einem Endotoxingehalt von <20 EU/mg für His₆-PAS(600)-YNS α 8 und von <2 EU/mg für His₆-PAS(600)-IFN waren die Werte ausreichend niedrig (Malyala & Singh, 2008) und somit keine zusätzlichen Abreicherungs-schritte notwendig.

Für beide PASylierte Proteine wurde nach längerer Lagerzeit bei 5 °C ein deutlicher Proteinabbau festgestellt. Dieser konnte auf Kontamination mit ubiquitär vorkommenden Keimen aus der Umgebung bzw. Laborwasser (z.B. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Delftia tsuruhatensis* und *Pseudomonas sp.*) zurückgeführt werden.

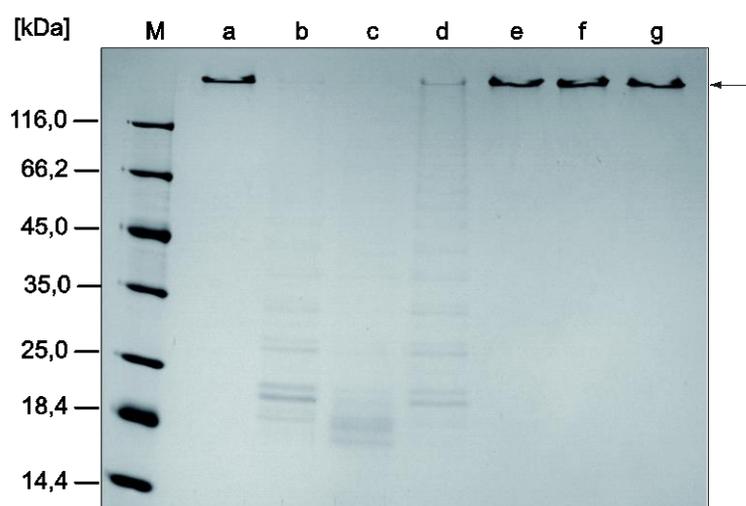


Abbildung 11: Reduzierende SDS-PAGE zum Proteinabbau von His₆-PAS(600)-IFN. 2,5 μ g SEC-gereinigtes His₆-PAS(600)-IFN wurde mit 20 μ l eines proteolytisch aktiven PBS-Puffer für 43 h bei 37 °C inkubiert. Der untersuchte PBS-Puffer wurde vor Versuchsbeginn für 7 Tage bei RT gelagert. Es wurde der Einfluss verschiedener Lagerbedingungen auf die proteolytische Aktivität untersucht. His₆-PAS(600)-IFN ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. M: Proteinmarker, a: vor Inkubation mit PBS, b: mit Original-PBS aus Schottflasche c: mit Original-PBS, das in ein Falcon abgefüllt wurde, d: mit Original-PBS aus Schottflasche, das für ca. 2 h bei -20 °C gelagert wurde, e: mit Original-PBS aus Schottflasche, das autoklaviert wurde, f: mit Original-PBS aus Schottflasche, das 0,45 μ m filtriert wurde, g: mit tagesfrisch angesetztem PBS, das 0,45 μ m filtriert und autoklaviert wurde.

Durch Sterilfiltration und Autoklavieren des proteolytisch aktiven PBS-Puffers konnte der Proteinabbau verhindert werden (vorläufige Ergebnisse; Abbildung 11).

Des Weiteren wurde der Einfluss verschiedener chemischer Substanzen auf die proteolytische Aktivität untersucht. Durch den Zusatz von NaN_3 ($\geq 0,01\%$), AEBSF ($\geq 1\text{ mM}$), H_3BO_3 ($\geq 50\text{ mM}$), 2,2-Dithiodipyridin ($\geq 1\text{ mM}$), EDTA ($\geq 1\text{ mM}$) und EGTA ($\geq 1\text{ mM}$) konnte der Proteinabbau verhindert werden (vorläufige Ergebnisse; Abbildung 12).

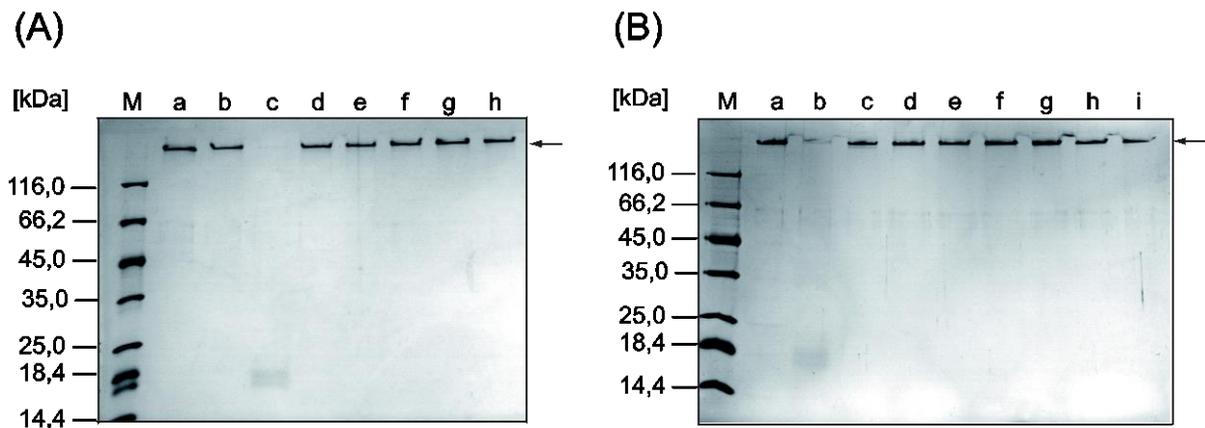


Abbildung 12: Reduzierende SDS-PAGE zu Protease-Inhibierungstests. 2,5 μg SEC-gereinigtes His₆-PAS(600)-IFN wurde mit 20 μl eines proteolytisch aktiven PBS-Puffer für 43 h bei 37 °C inkubiert. Der untersuchte PBS-Puffer wurde vor Versuchsbeginn für ca. 2 Monate bei RT gelagert. Es wurde der Einfluss verschiedener Chemikalien auf die proteolytische Aktivität untersucht. His₆-PAS(600)-IFN ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. (A) Einfluss verschiedener Azidkonzentrationen. M: Proteinmarker, a: vor Inkubation mit PBS, b: mit autoklavierten PBS (Negativkontrolle), c: 0 % NaN_3 (Positivkontrolle), d: 0,01 % NaN_3 , e: 0,02 % NaN_3 , f: 0,03 % NaN_3 , g: 0,04 % NaN_3 , h: 0,05 % NaN_3 . (B) Einfluss verschiedener Protease-Inhibitoren. M: Proteinmarker, a: vor Inkubation mit PBS, b: ohne Inhibitor (Positivkontrolle), c: 1 mM AEBSF, d: 50 mM H_3BO_3 , e: 1 mM Dithiodipyridin, f: 1 mM EGTA, g: 10 mM EGTA, h: 1 mM EDTA, i: 10 mM EDTA.

Aufgrund der Proteolyseempfindlichkeit PASylierter Proteine wurden finale Proteinpräparationen unter keimarmen Bedingungen (unter der Sicherheitswerkbank) filtriert (Porengröße: 0,2 μm), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Für alle nachfolgenden Analysen wurden frisch aufgetaute Proben verwendet. Außerdem wurden für die Reinigungen von PASylierten Proteinen ausschließlich filtrierte und autoklavierte Puffer verwendet. Zusätzlich wurden allen Reinigungspuffern – abgesehen von IMAC-Puffern – 1 mM EDTA zugesetzt.

3.1.2 Biophysikalische und funktionelle Charakterisierung

3.1.2.1 Hydrodynamische Charakterisierung

Um den Einfluss der PAS-Sequenz auf das hydrodynamische molekulare Volumen zu untersuchen, wurden His₆-PAS(600)-YNS α 8, His₆-PAS(600)-IFN und, zum Vergleich, das nicht PASylierte IFN- α 2b mittels SEC (Abschnitt 2.7.1.5) und dynamischer Lichtstreuung (DLS; Abschnitt 2.9.4) charakterisiert und die jeweilige apparente Molekülmasse bestimmt. Das Vergleichsprotein *Strep*-tag II-IFN- α 2b wurde in gereinigter Form freundlicherweise von Klaus Wachinger zur Verfügung gestellt.

Die analytische SEC wurde an einer Superdex 200 10/300 GL-Säule mit 24 ml Bettvolumen in PBS als Laufpuffer durchgeführt (Abbildung 13).

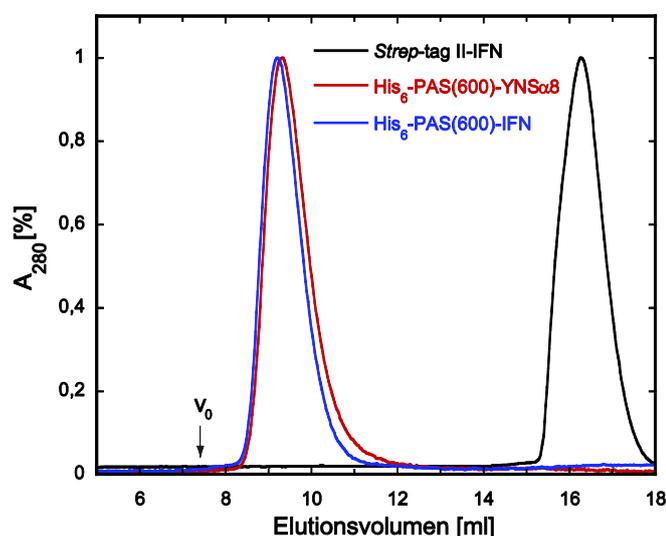


Abbildung 13: SEC-Profil der Interferon-Varianten an Superdex 200 10/300 GL. Das Probenvolumen betrug jeweils 225 μ l bei einer Konzentration von 0,25 mg/ml. Das SEC-Ausschlussvolumen $V_0 = 7,53$ ml ist markiert (Bettvolumen: 24 ml). Die beiden PASylierten Varianten weisen ein extrem kleines Elutionsvolumen im Vergleich zum nicht PASylierten Interferon auf.

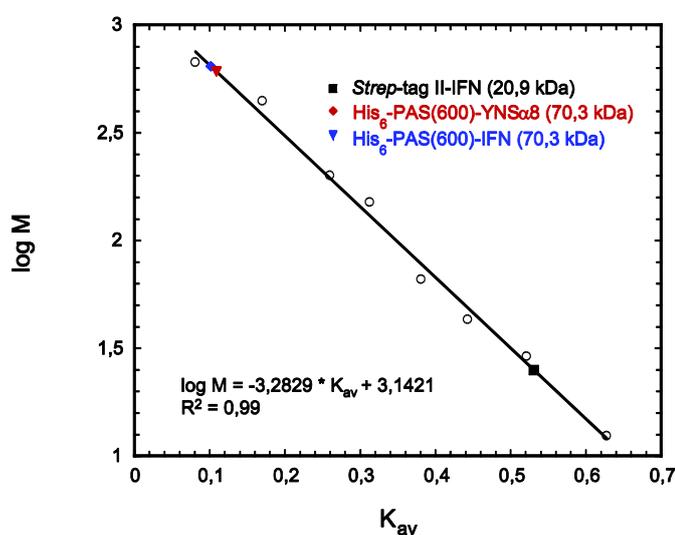


Abbildung 14: Kalibrierung der Superdex 200 und Vergleich mit Elutionsvolumina der Interferon-Varianten. Die SEC-Säule Superdex 200 10/30 GL (24 ml Bettvolumen) wurde mit globulären Standardproteinen Cytochrom C (12,4 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), β -Amylase (200 kDa), Apoferritin (443 kDa) und Thyroglobulin (669 kDa) in PBS kalibriert, das Ausschussvolumen wurde mit Dextranblau bestimmt ($V_0 = 7,53$ ml). Mittels linearer Regression ($\log M$ vs K_{av} , Gleichung 1) konnte eine Ausgleichsgerade erstellt werden, die zur Berechnung der apparenten Molekülmasse (M) der Interferon-Varianten verwendet wurde.

Mit globulären Standardproteinen wurde eine Kalibrierung der SEC-Säule vorgenommen. Die gemessenen SEC-Elutionsvolumina der Standardproteine wurden mit der bekannten Molekülmasse unter Verwendung der Gleichungen 1 und 2 (Abschnitt 2.7.1.5; Callec *et al.*, 1984) in Beziehung gesetzt. Unter Annahme einer globulären Molekülform wurde damit die

apparente Molekülmasse jeder Interferon-Variante aus dem jeweiligen gemessenen Elutionsvolumen berechnet (Abbildung 14).

Für das nicht PASylierte IFN- α 2b (*Strep*-tag II-IFN- α 2b) wurde eine apparente Molekülmasse von 25,0 kDa bestimmt, was nahe an der berechneten Molekülmasse von 20,9 kDa lag. Für das PASylierte IFN- α 2b (His₆-PAS(600)-IFN) und den PASylierten Superagonisten YNS α 8 (His₆-PAS(600)-YNS α 8) wurden apparente Molekülmassen von 642 kDa bzw. 607 kDa bestimmt, welche erheblich (um den Faktor 9,1 bzw. 8,6) über der berechneten Molekülmasse von jeweils 70,3 kDa lagen (Tabelle 6). Diese anomal vergrößerte apparente Molekülmasse ist für PASylierte Proteine aufgrund der ungeordneten *Random-Coil*-Struktur des PAS-Polymers charakteristisch (Schlapschy *et al.*, 2013; Breibeck & Skerra, 2017).

Tabelle 6. Übersicht über die apparenten Molekülmassen der Interferon-Varianten anhand von SEC und DLS. Die apparenten Molekülmassen wurden anhand der durch SEC bestimmten Elutionsvolumina (V_e) und der durch DLS bestimmten hydrodynamischen Radien (r_H) berechnet. Die starke Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens durch das ungeordnete PAS#1(600)-Polymer wird anhand des Verhältnisses von apparenter zu theoretischer Molekülmasse aufgezeigt.

Protein	M_{theor}^a [kDa]	SEC			DLS		
		V_e [ml]	M_{app}^b [kDa]	Faktor $M_{\text{app}}/M_{\text{theor}}$	r_H [nm]	M_{app}^c [kDa]	Faktor $M_{\text{app}}/M_{\text{theor}}$
<i>Strep</i> -tag II-IFN	20,9	16,28	25,0	1,2	3,8	76,5	3,7
His ₆ -PAS(600)-IFN	70,3	9,21	642	9,1	10,2	771	11,0
His ₆ -PAS(600)-YNS α 8	70,3	9,33	607	8,6	9,7	686	9,8

^a Theoretische Molekülmasse des oxidierten Proteins, berechnet mit Hilfe des Programms ProtParam (www.expasy.org)

^b Apparente Molekülmasse, berechnet aus den SEC-Elutionsvolumina und einer Kalibriergeraden mit globulären Standardproteinen

^c Apparente Molekülmasse, berechnet aus den hydrodynamischen Radien (r_H) mit Hilfe der Zetasizer Software

Als unabhängige Methode zur Bestimmung der apparenten Molekülmasse der drei Interferon-Varianten wurde die dynamischer Lichtstreuung (DLS; Abschnitt 2.9.4; Stetefeld *et al.*, 2016) angewandt. Die Methode beruht auf der Rayleigh-Streuung von langwelligem monochromatischem Licht ($\lambda = 600$ nm) an gelösten Partikeln, wobei das Streulicht der unterschiedlichen Streuzentren interferiert. Da sich die Abstände der Streuzentren aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung ständig verändern, können Fluktuationen in der Streulichtintensität gemessen werden. Aus dem zeitlichen Verlauf der Intensitätsfluktuationen lässt sich der Diffusionskoeffizient der gelösten Partikel ermitteln. Unter Annahme einer globulären Molekülform kann daraus mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung (Einstein, 1905) der hydrodynamische Radius berechnet werden.

Die hydrodynamischen Radien der drei Interferon-Varianten wurden in Dreifachbestimmung an einem Zetasizer Nano-S-Gerät bei einer Konzentration von 0,5–0,6 mg/ml in CD / DLS-Puffer (5 mM KPi pH 7,5, 50 mM K₂SO₄) bei 25 °C bestimmt. Mit Hilfe der Zetasizer Software wurden daraus die apparenten Molekülmassen der Proteine berechnet.

Es ergaben sich hydrodynamische Radien von 3,8 nm für das nicht PASylierte Interferon, von 10,2 nm für His₆-PAS(600)-IFN und von 9,7 nm für His₆-PAS(600)-YNS α 8; dies entspricht apparenten Molekülmassen von 76,5 kDa, 771 kDa und 686 kDa (Tabelle 6).

Sowohl in der SEC als auch in den DLS-Messungen ergaben sich für die PASylierten Proteinvarianten Vergrößerungsfaktoren ($M_{\text{app}}/M_{\text{theor}}$) im Bereich von 9–11. Das nicht PASylierte Interferon wies demgegenüber einen Vergrößerungsfaktor von 1,2 in der SEC auf, somit stimmt die apparente Molekülmasse dort sehr gut mit der theoretischen Molekülmasse überein. In der DLS-Messung ergab sich hier ein unerwartet hoher Vergrößerungsfaktor von 3,7. Dieser lässt sich durch die 4-Helix-Bündel-Struktur des Interferons erklären, die leicht in die Länge gestreckt ist und daher kein perfekt sphärisches Protein darstellt. Bei der Auswertung der DLS-Messungen wird dadurch sowohl der hydrodynamische Radius als auch die apparente Molekülmasse des Proteins überschätzt. Bei den PASylierten Varianten spielt dieser Effekt eine untergeordnete Rolle, weil das Interferon durch die Umhüllung mit dem statistisch ungeordneten Polymer verdeckt wird.

3.1.2.2 Bindungsstudien mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie

Die Bindungsaffinität und -kinetik von His₆-PAS(600)-YNS α 8 und His₆-PAS(600)-IFN gegenüber dem Interferon-Rezeptor 2 (IFNAR2) wurde mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (Abschnitt 2.9.2) bestimmt und mit Literaturdaten der jeweiligen nicht PASylierten Interferon-Versionen verglichen.

Die Methode nutzt das physikalische Phänomen der Oberflächenplasmon-Resonanz (*Surface Plasmon Resonance*; SPR, Liedberg *et al.*, 1995), um Massenänderungen an der Oberfläche eines funktionalisierten *Sensorchips* in Echtzeit zu quantifizieren. Wird einer der beiden zu untersuchenden Bindungspartner (Ligand) funktionell auf der Chip-Oberfläche immobilisiert, kann die anschließende Bindung des durch ein Fluidsystem zudosierten mobilen Partners (Analyt) zeitaufgelöst, markierungsfrei und mit hoher Empfindlichkeit verfolgt werden. Eine typische Vorgehensweise, um den Liganden an die Sensoroberfläche zu koppeln, ist die Verwendung eines mit einem Carboxymethyl-dextran-Hydrogel (CMD) beschichteten *Sensorchips*. Die Carboxylgruppen dieser Matrix können chemisch zu N-Hydroxysuccinimid-Estern aktiviert werden und damit Proteine oder Peptide anhand freier Lysin-Reste unter Ausbildung stabiler Säureamid-Bindungen kovalent an die Matrix gekoppelt werden. Anstelle der direkten Kopplung eines Liganden kann stattdessen auch zuerst ein sogenannter Fang-Antikörper (*Capture-Antibody*), an die Matrix gekoppelt werden, um auch bei einer unspezifischen Lysin-Kopplung eine gezielte Orientierung der Liganden auf der *Sensorchip*-Oberfläche zu erzeugen.

Zur Charakterisierung der PASylierten Interferon-Varianten wurde als Fang-Antikörper ein Fc-spezifischer Anti-Human IgG eingesetzt; als Ligand diente ein kommerziell erhältliches rekombinantes Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne des humanen IFNAR2 und

dem Fc-Teil eines humanen Antikörpers (IFNAR2-Fc). Hierfür wurde zunächst der bei pH 5,0 positiv geladene Fang-Antikörper (pI 6-8; Danielsson *et al.*, 1988) in relativ hoher Konzentration (100 µg/ml) über die negativ geladene Matrix geleitet, wobei unter Ausnutzung elektrostatischer Effekte die kovalente Kopplung von durchschnittlich 2000 bis 2400 Δ RU gelang. Nach Blockierung verbliebener Bindestellen wurde der IFNAR2-Fc mit niedriger Konzentration (2 µg/ml) in PBST-0,05 über dieselbe Oberfläche geleitet, wobei hier unter Bildung eines nicht kovalenten Komplexes aus Fang-Antikörper und IFNAR2-Fc durchschnittlich 200–250 Δ RU immobilisiert werden konnten.

Zur Ermittlung der kinetischen Konstanten wurde der jeweilige Analyt in aufsteigender Konzentration von 0,19 bis 3,125 nM für His₆-PAS(600)-YNS α 8 und von 1,56 bis 25 nM für His₆-PAS(600)-IFN injiziert und deren Assoziation sowie die anschließende Dissoziation verfolgt.

Im Anschluß daran wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) durch einen globalen Fit („Global Fitting“; Karlsson & Falt, 1997) unter Anwendung des Programms BIAevaluation V 4.1. nach dem 1:1-Bindungsmodell von Langmuir (Morton & Myszka, 1998) ermittelt. Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (K_D) ist als Quotient k_{on}/k_{off} definiert. Die graphische Darstellung der Differenz aus den experimentellen Meßdaten und der Ausgleichskurve jedes Sensorgramms einer Konzentrationsreihe ergab eine gleichmäßig Verteilung der Abweichungen in Richtung Y-Achse, was zeigt, dass das verwendete 1:1-Bindungsmodell die Kinetik der beiden Analyten sehr gut beschreibt (Abbildung 15).

Die in dieser Arbeit experimentell bestimmten kinetischen Konstanten der PASylierten Interferon-Varianten wurden mit den in der Literatur beschriebenen Werten (Levin *et al.*, 2011; Schlapschy *et al.*, 2013) für die nicht PASylierten Varianten sowie für eine kommerziell erhältliche PEGylierte Variante (PEGASYS) verglichen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammenfassung der kinetischen Konstanten für die Bindung PASylierter und nicht PASylierter Interferon-Varianten an IFNAR2.

Protein	k_{on} [$10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$]	k_{off} [10^{-3} s^{-1}]	K_D [nM]
<i>Strep</i> -tag II-IFN ^a	3,32	7,89	2,37 ± 0,02
PEG-IFN ^a	0,98	16,4	16,7 ± 0,12
His ₆ -PAS(600)-IFN	2,31 ± 0,02	20,0 ± 0,1	8,67 ± 0,10
YNS α 8 ^b	3,0	1,2	0,4
His ₆ -PAS(600)-YNS α 8	4,83 ± 0,02	2,10 ± 0,002	0,435 ± 0,002

^a(Schlapschy *et al.*, 2013)

^b(Levin *et al.*, 2011)

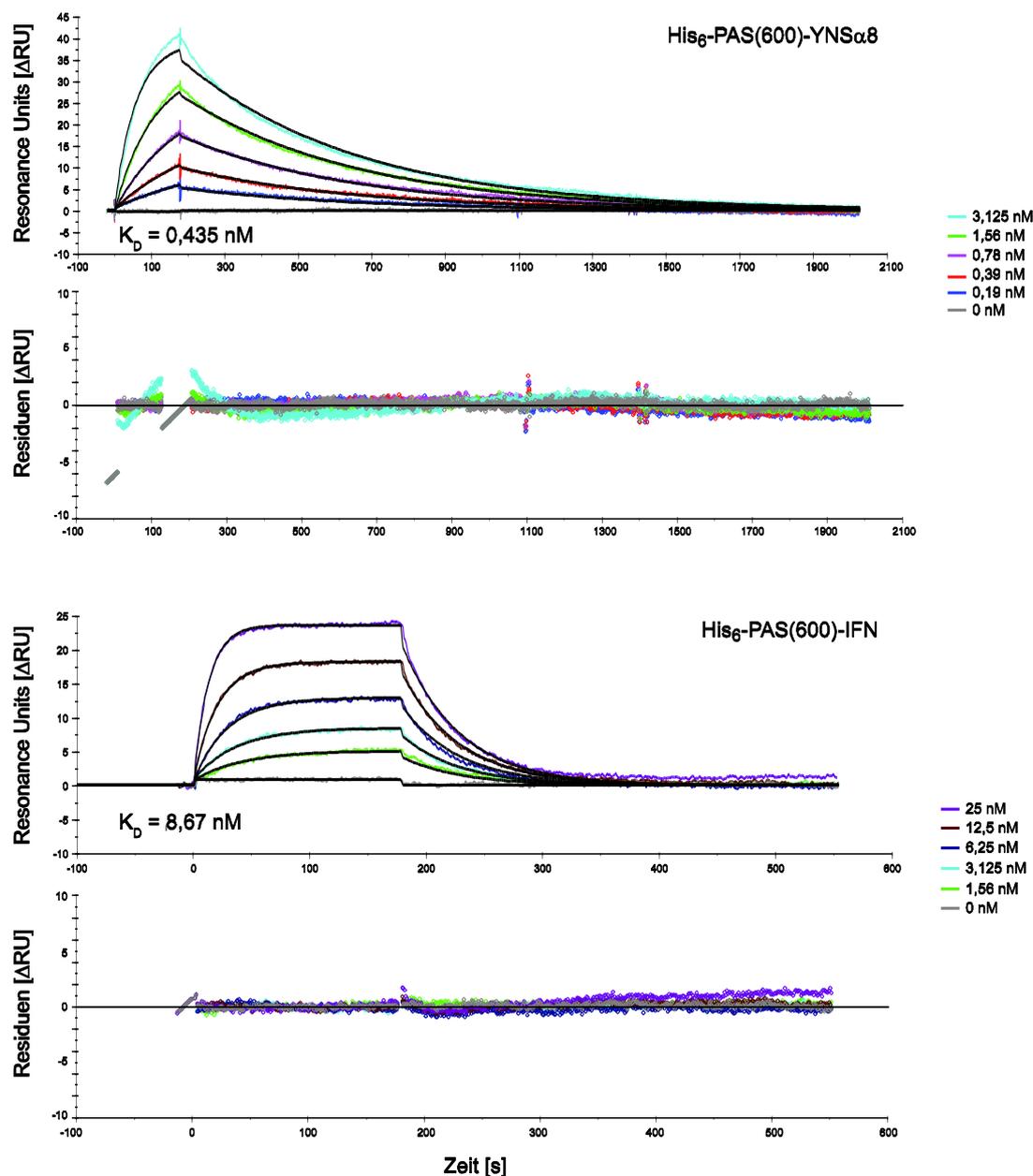


Abbildung 15: Messung der Bindungskinetik von His₆-PAS(600)-YNS α 8 und His₆-PAS(600)-IFN durch Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie. Ein mit IFNAR2-Fc (Δ RU = 200–250) beladener Carboxymethyl-dextran-Sensorchip (CMDP; XanTec) wurde mit PBST-0,05 (PBS und 0,05 (v/v) % Tween 20) äquilibriert und anschließend der Analyt mit einem Probenvolumen von 75 μ l bei konstantem Fluss von 25 μ l/min injiziert. Zur Ermittlung der kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} der PASylierten Proteine wurde für His₆-PAS(600)-YNS α 8 eine Konzentrationsreihe von 0,19 bis 3,125 nM und für His₆-PAS(600)-IFN von 1,56 bis 25 nM gemessen. Vor jeder neuen Messung wurde die vollständige Dissoziation des Analyten abgewartet. Die individuell von unspezifischen Signalanteilen bereinigten Sensorgramme für einzelne Konzentrationen wurden überlagert, global an das 1:1 Bindungsmodell nach Langmuir angepasst (schwarze Linien) und die Dissoziationskonstante K_D bestimmt. Der Residuen-Plot bildet die Differenz zwischen den experimentell erhobenen und den Ausgleichskurven ab.

Die experimentell bestimmte Dissoziationskonstante des PASylierten Interferon Wildtyp-Proteins His₆-PAS(600)-IFN lag bei 8,67 nM, die des PASylierten Superagonisten His₆-PAS(600)-YNS α 8 bei 0,435 nM. Auch in den PASylierten Varianten der Interferone zeigte sich die deutlich verbesserte Bindung der Mutante YNS α 8 (Levin *et al.*, 2011). Im Vergleich zu den veröffentlichten Dissoziationskonstanten zeigte sich für den N-terminal PASylierten

Superagonisten His₆-PAS(600)-YNS α 8 ein unveränderter K_D-Wert von 0,4 nM; die PASylierung hatte in diesem Fall also keinen nennenswerten Einfluss auf die Affinität. Im Fall des Wildtyp-Interferons IFN- α 2b wies die PASylierte Variante His₆-PAS(600)-IFN (K_D = 8,7 nM) eine um den Faktor 3,6 leicht verschlechterte Bindung auf. Bei der PEGylierten IFN-Variante (PEGASYS, K_D = 16,7 nM) ergab sich eine um den Faktor 7,0 verschlechterte Bindung, also ein im Vergleich zur PASylierung stärkerer Abfall der Rezeptor-Bindungsaktivität.

3.1.2.3 Untersuchungen zur antiproliferativen und antiviralen Aktivität

Die biologische Aktivität von His₆-PAS(600)-YNS α 8 wurde in zwei *In vitro*-Zell-Assays (anti-proliferativ und antiviral; Abschnitt 2.8.2) am Weizmann-Institut für Wissenschaften, Israel, charakterisiert und mit der biologischen Aktivität von nicht PASylierten IFN-Versionen IFN- α 2, IFN- β , IFN-YNS und IFN-YNS α 8 verglichen (Harari *et al.*, 2014b). Als Zellsystem wurde in beiden Assays die humane Amnion-WISH-Zelllinie verwendet (Meager, 2002), die standardmäßig zur Bestimmung der biologischen Aktivität humaner Interferone dient.

In beiden Assays wurde kein messbarer Verlust an Aktivität durch die PASylierung festgestellt. Die Ergebnisse der Zell-Assays bestätigten, dass die PASylierte Variante His₆-PAS(600)-YNS α 8 gegenüber der nicht PASylierten Variante sowohl hohe antiproliferative als auch antivirale Aktivität behalten hatte.

3.1.3 Pharmakokinetische und -dynamische Charakterisierung

3.1.3.1 Pharmakokinetische Studien in HyBNAR/MX2-Luc-Mäusen

Die Pharmakokinetik des PASylierten Superagonisten His₆-PAS(600)-YNS α 8 wurde am Weizmann-Institut für Wissenschaften, Israel, in einem transgenen Mausmodell an HyBNAR/MX2-Luc-Mäusen (Harari *et al.*, 2014a) hinsichtlich Gewebeverteilung und Halbwertszeit untersucht und mit der des nicht PASylierten YNS α 8 verglichen (vgl. Abschnitt 2.10.1). Die HyBNAR-Maus kodiert für transgene Varianten von IFNAR1 und IFNAR2, die aus einer humanen extrazellulären Domäne und murinen transmembran und cytoplasmatischen Segmenten bestehen. Die Besonderheit der doppeltransgene HyBNAR/MX2-Luc-Maus liegt darin, dass diese unter der Kontrolle des durch Typ I IFNs induzierbaren MX2 Promotors ein Luciferase-Gen exprimiert, wodurch die *in vivo* IFN-Aktivität durch Lumineszenzmessung sichtbar gemacht werden kann. Die ermittelten Plasma-Halbwertszeiten lagen nach intraperitonealer Darreichung von 1 μ g rekombinantes Protein für das nicht PASylierte YNS α 8 bei 3 h und für das PASylierte His₆-PAS(600)-YNS α 8 bei 30 h. Bei einer 4-fach erhöhten Dosis an His₆-PAS(600)-YNS α 8 zeigte sich eine durchgehende Erhöhung des MX2-Luciferase Signals mit vergleichbarem pharmakodynamischen Verlauf. Somit konnte für das PASylierte His₆-PAS(600)-YNS α 8 im Reporter-gen-abhängigen Mausmodell HyBNAR/MX2-Luc eine stabile Zirkulation, eine linear dosisabhängige

pharmakologische Aktivität und eine gegenüber dem nicht PASylierten YNS α 8 um den Faktor 10 verlängerte Plasma-Halbwertszeit nachgewiesen werden.

In einem weiteren Experiment mit HYBNAR/MX2-Luc-Mäusen wurde die Biodistribution der PASylierten und nicht PASylierten YNS α 8-Variante mit der des murinen IFN- β verglichen. Alle drei Proteine wiesen ein vergleichbares Aktivitätsprofil in allen Organen auf. Die Biodistribution und die Fähigkeit zur Aktivierung des Luciferase-Reportersystems wurden weder von der phylogenetischen Herkunft noch vom hydrodynamischen Volumen der drei Interferon-Varianten beeinflusst.

3.1.3.2 Experimentelle Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE) in HyBNAR-Mäusen

Die biologische Aktivität des PASylierten Superagonisten wurde *in vivo* anhand der experimentellen Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE) im HYBNAR-Mausmodell untersucht (Abschnitt 2.10.2). Die EAE ist eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems, die im Mechanismus und den Symptomen mit der Multiplen Sklerose (MS) beim Menschen vergleichbar ist, und die durch die Induktion einer Autoimmunantwort auf Myelin-Peptid-Epitope ausgelöst werden kann (Kieseier, 2011).

Um den therapeutischen Nutzen des PASylierten Superagonisten His₆-PAS(600)-YNS α 8 mit dem als Therapeutikum etablierten IFN- β zu vergleichen, wurden HyBNAR-Mäuse mit induzierter EAE durch *i.p.* Injektion von 0,25 μ g His₆-PAS(600)-YNS α 8 (bezogen auf den aktiven YNS α 8-Anteil) jeden zweiten Tag, bzw. von 1 μ g huIFN- β zweimal am Tag, über einen Zeitraum von 18 Tagen behandelt und für weitere 3 Tage ohne Behandlung beobachtet. In einem weiteren Experiment wurde der Effekt von His₆-PAS(600)-IFN auf den EAE-Krankheitsverlauf untersucht.

In allen Experimenten am EAE-Krankheitsmodell (Harari *et al.*, 2014a) zeigte sich trotz einer mit diesem Tiermodell vorhandenen hohen Variabilität, dass der PASylierte Superagonist deutlich die höchste Wirksamkeit aller getesteten Interferon-Varianten aufwies; damit war eine zwar transiente, aber während der gesamte Behandlungsdauer effektive Reduzierung der EAE-Krankheitssymptome möglich.

3.1.3.3 Untersuchungen zur Immunogenität

Um die Immunogenität des PASylierten Superagonisten His₆-PAS(600)-YNS α 8 zu untersuchen, wurden Blutseren von Mäusen, denen das Protein im Rahmen der Experimente zum EAE-Krankheitsmodell über einen Zeitraum von 18 Tagen wiederholt *i.p.* injiziert worden war (Abschnitt 3.1.3.2), durch *Western Blotting* (Abschnitt 2.8.5) auf die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern gegen die PAS-Sequenz oder den humanen Superagonisten YNS α 8 analysiert. In den Seren der mit His₆-PAS(600)-YNS α 8 behandelten Mäuse konnten jedoch keine Antikörper gegen das rekombinante Fusionsprotein, gegen die PAS-Sequenz oder den humanen Superagonisten nachgewiesen werden (Harari *et al.*, 2014b).

3.2 PASylierter Interferon- α 2b Antagonist zur Behandlung von AIDS

3.2.1 Gentechnische Herstellung und Reinigung

Typ I Interferone beeinflussen den Verlauf einer HIV-Infektion auf unterschiedliche Weise, ihre Wirkung ist dabei vom Zeitpunkt der therapeutischen Anwendung im Infektionsverlauf abhängig (Utay & Douek, 2016). Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Typ I Interferon-Aktivität während der akuten Phase der SIV/HIV-Infektion die Virusreplikation unterdrückt (Sandler *et al.*, 2014; Telenti, 2014).

Die Expression von ISGs bleibt allerdings auch im weiteren Verlauf der chronischen SIV-Infektion gegenüber dem Niveau vor der Infektion erhöht. Es ist dabei noch umstritten, ob die erhöhte Expression der ISGs der Kontrolle der chronischen Infektion durch das Immunsystem dient, oder ob sie direkt zur Erhöhung einer systemischen Entzündungsreaktion beiträgt und damit dem Krankheitsverlauf sogar Vorschub leistet. Durch die Gabe eines Typ I Interferon-Antagonisten, wie des IFN-1ant Proteins, während der chronischen Phase der SIV/HIV-Infektion soll die Typ I Interferon-Aktivität unterdrückt werden, was möglicherweise zu einer Verlangsamung des Krankheitsverlaufs führen kann (Sandler *et al.*, 2014; Telenti, 2014).

Der Interferon-Antagonist IFN-1ant war durch *Protein-Engineering* am Weizmann-Institut für Wissenschaften entwickelt worden (Levin *et al.*, 2014) und trägt gegenüber IFN- α 2b die Mutation R120E, welche die Affinität gegenüber IFNAR1 fast komplett eliminiert (Levin *et al.*, 2014), sowie die drei C-terminalen Mutationen E159K, S160R und R162K, die auch im IFN-Superagonisten YNS α 8 vorkommen und die Affinität zu IFNAR2 erhöhen (Schreiber & Piehler, 2015). Aufgrund dieser Bindungseigenschaften stellt IFN-1ant einen potenten Antagonisten zu den natürlichen IFN- α Varianten dar, da es eine sehr starke Bindung mit einer Untereinheit des IFNAR eingeht, ohne jedoch zu einer Rezeptoraktivierung zu führen.

Um den Effekt einer Version des Interferon-Antagonisten IFN-1ant mit verlängerter Plasma-Halbwertszeit auf den Krankheitsverlauf einer SIV (verwendeter Virusstamm: SIVmac251)-Infektion in Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) zu untersuchen und so möglicherweise ein neues Therapeutikum zur Behandlung von HIV im Menschen zu entwickeln, sollten in dieser Arbeit ausreichende Mengen an hochreinem und funktionellem His₆-PAS(600)-IFN-1ant hergestellt werden. Für die vorgelagerte pharmakokinetische Studie wurden 14 mg gereinigtes Protein benötigt, für die SIV-Infektionsstudie wurde ein Bedarf von mehr als 1 g veranschlagt. Die Tierexperimente wurden am NIH (Bethesda) in den USA durchgeführt.

In den folgenden Abschnitten werden die Plasmidkonstruktion für die periplasmatische (Abschnitt 3.2.1.1) und cytoplasmatische Expressionsstrategie (Abschnitt 3.2.1.3) sowie die periplasmatische (Abschnitt 3.2.1.2) und cytoplasmatische Produktion (Abschnitt 3.2.1.4) sowie Reinigung des PASylierten Proteins beschrieben.

3.2.1.1 Plasmidkonstruktion für die periplasmatische Produktion in *E. coli*

Ausgehend vom Expressionsvektor pASK75-His₆-IFN mit dem Gen für IFN- α 2b (Abschnitt 3.1.1.1) wurden zunächst durch zwei aufeinanderfolgende ortsgerichtete Mutagenese-Schritte nach dem QuikChange-Verfahren die vier charakteristischen Mutationen für den Interferon-Antagonisten IFN-1ant eingeführt und so der Vektor pASK75-His₆-IFN-1ant erhalten (Abbildung 16). In einer ersten PCR-Reaktion wurde die Mutation R120E über die *Primer* NK_IFNa_antagonist_1_f und NK_IFNa_antagonist_1_r in das IFN- α 2b-Protein eingeführt. In einer zweiten PCR-Reaktion wurden zusätzlich die drei Mutationen E159K, S160R und R162K am C-Terminus eingefügt. Der Erfolg der Mutagenese wurde mittels DNA-Sequenzierung unter Verwendung des *Primers* PR1 überprüft. Um unbeabsichtigte Mutationen im Vektorfragment ausschließen zu können, wurde das Gen nach den beiden Mutagenese-Schritten über *XbaI/HindIII* auf dem Vektor pASK75 subkloniert.

In einem weiteren Klonierungsschritt sollte die PAS#1(600)-Genkassette in den Vektor pASK75-His₆-IFN-1ant eingefügt werden. Während bei der Plasmidkonstruktion für den PASylierten Interferon-Superagonisten YNS α 8 noch eine PAS#1(600)-Genkassette verwendet worden war (Abschnitt 3.1.1.1), die aus identischen Kopien einer Minimalkassette von 60 bp assembliert worden war (Schlapschy *et al.*, 2013) und daher auch auf genetischer Ebene eine hohe Repetitivität aufwies, wurde bei der Plasmidkonstruktion für den PASylierten IFN-Antagonisten die verbesserte PAS#1.6/1.3/1.2(600)-Genkassette verwendet, welche eine im Prinzip nicht repetitive Nukleotidsequenz – bei unverändert kodierter PAS-Aminosäuresequenz aufweist (Binder & Skerra, 2017).

Zur Insertion der PAS#1(600)-Genkassette wurde zunächst durch Verdau des Vektors pXL1-PAS#1(600) mit *EarI* (erkennt 6 Nukleotide als Teil der Erkennungssequenz für *SapI*) die 1800 bp umfassende PAS#1.6/1.3/1.2-Genkassette isoliert, welche für die 600 Aminosäuren der PAS#1-Sequenz kodiert und nach dem Restriktionsverdau (wie bisher) zwei nicht-palindromische, drei Nukleotide lange 5'-Überhänge aufweist, die einem Ala-Codon (GCC/GGC) entsprechen. Der Vektor pASK75-His₆-IFN-1ant wurde mit *SapI* linearisiert; durch die kompatiblen Überhänge konnte anschließend die PAS#1.6/1.3/1.2-Genkassette durch unidirektionale Ligierung eingefügt werden, und so wurde das Plasmid pASK75-His₆-PAS#1(600)-IFN-1ant erhalten (Abbildung 17).

```

XbaI      ****
121  AAAAACTAGATAACCGAGGGCAAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTTTAGATCTATTGCTCCCGTTTTTTACTTTTTCTGTGCGATAGCGCTAACGTCACCGTG
MetLysLysThrAlaIleAlaIleAlaValAlaLeu -
OmpA-Signalsequenz →
NheI      KasI
181  TGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCGCTAGCCATCACCACCATCACCATGgCGCCa
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACCGACCAAAGCGATGGCATCGCGTCCGGCGATCGGTAGTGGTGGTAGTGGTACCGCGGT
AlaGlyPheAlaThrValAlaGlnAlaAlaSerHisHisHisHisHisHisGlyAlaSer -
1      His6-tag →      10

SapI
241  GCTCTTCGCTGTGATCTGCCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGGAGGACCTTGATGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGAGAAGACGACACTAGACGGAGTTGGGTGTCGACCCATCGTCTCTGGAACACTCG
SerSerAlaCysAspLeuProGlnThrHisSerLeuGlySerArgArgThrLeuMetLeu -
20      30

301  TCTTGGCACAGATGAGGAGAATCTCTCTTTCTCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGGACCGTGTCTACTCTCTTAGAGAGAAAAGAGGACGAACTTCCTGTCTACTGAAAC
LeuAlaGlnMetArgArgIleSerLeuPheSerCysLeuLysAspArgHisAspPheGly -
40      50

361  GATTTCCCAGGAGGAGTTTGGCAACCAGTTCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCTCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTAAAGGGTCTCCTCAAACCGTTGGTCAAGGTTTCCGACTTTGGTAGGACAGGAGG
PheProGlnGluGluPheGlyAsnGlnPheGlnLysAlaGluThrIleProValLeuHis -
60      70

421  ATGAGATGATCCAGCAGATCTCAATCTCTCAGCACAAGGACTCATCTGTGCTTGGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACTCTACTAGTCTGTAGAAAGTTAGAGAAGTCGTGTTTCCTGAGTAGACGGAACCC
GluMetIleGlnGlnIlePheAsnLeuPheSerThrLysAspSerSerAlaAlaTrpAsp -
80      90

481  ATGAGACCTCCTAGACAAATCTACACTGAACCTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACTCTGGGAGGATCTGTTAAGATGTGACTTGAGATGGTCGCTGACTTACTGGACCTTC
GluThrLeuLeuAspLysPheTyrThrGluLeuTyrGlnGlnLeuAsnAspLeuGluAla -
100     110

NK IFNα antagonist 1 f 5'-CCATTC
541  CCTGTGTGATACAGGGGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCCTGATGAAGGAGGACTCCATTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGACACACTATGTCCCCACCCCACTGTCTCTGAGGGGACTACTTCCTCTGAGGTAAG
CysValIleGlnGlyValGlyValThrGluThrProLeuMetLysGluAspSerIleLeu -
120     130
3'-ggtaag

601  TGGCTGTGgagAAATACTTCAAAGAATCAC-3'
TGGCTGTGAGGAAATCTCAAAGAATCACTCTCTATCTGAAAGAGAGAAATACAGCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACCGCACTCCTTTATGAAGTTTCTTAGTGAAGATAGACTTCTCTCTTTATGTGCGG
AlaValArgLysTyrPheGlnArgIleThrLeuTyrLeuLysGluLysLysTyrSerPro -
140     150
Glu

ACCGACACctCTTTATGAAGTTTCTTAGTG-5' NK IFNα antagonist 1_r

NK IFNα agonist 2 f 5'-GTCAACAACT
661  CTTGTGCCTGGGAGGTTGTCAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTGTCAACAACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACACGGACCCCTCAACAGTCTCGTCTTAGTACTCTAGAAAAGAACAGTTGTTGA
CysAlaTrpGluValValArgAlaGluIleMetArgSerPheSerLeuSerThrAsnLeu -
160     170
3'-cagttgtttga

HindIII
721  TGCAAGAAAGTTTAAAGTAAGGAATAAGCTTG-3'
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACGTTCTTTCAAATCTTCATTCCTTATTCGAACCTGGACACTTCACTTTTACCAGCGTG
GlnGluSerLeuArgSerLysGluEnd
LysArg Lys 179
ACGTTtTgCAAATtTTCATTCCTTATTCGAAC-5' NK IFNα agonist 2_r

```

Abbildung 16: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des IFN- α 2b Gens in pASK75-His₆-IFN und Mutagenese-Primer zur Konstruktion von pASK75-His₆-IFN-1ant. Die Aminosäuresequenz des rekombinanten IFN- α 2b nach Abspaltung der OmpA-Signalsequenz ist grau hinterlegt, das Hexahistidinanhängsel ist türkis hervorgehoben. Der Start der nativen IFN- α 2b Aminosäuresequenz (Cys1, s. Abbildung 2) ist durch Unterstreichung hervorgehoben. Die ribosomale Bindestelle (RBS) des OmpA-Proteins ist durch Sternchen (*) markiert, Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen, die Schnittstelle von SapI ist rot eingezeichnet. Die vier Primer, die ausgehend von pASK75-His₆-IFN für die Mutagenese zum IFN-1ant verwendet wurden, sind wiedergegeben, die vier mutierten Codons bzw. Aminosäuren sind gelb hinterlegt, die sich unterscheidenden Nukleotide sind zusätzlich durch Kleinschrift hervorgehoben.

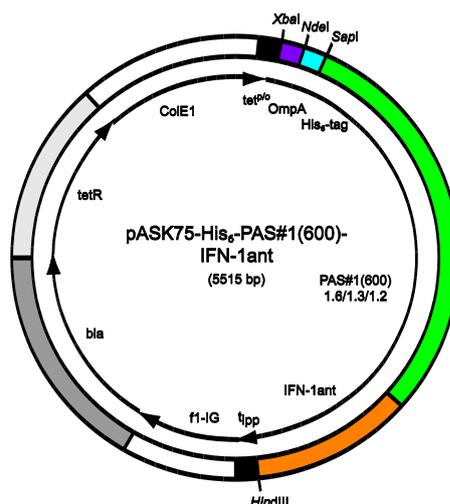


Abbildung 17: Vektor pASK75-His₆-PAS#1(600)-IFN-1ant zur periplasmatischen Expression von ASHis₆-PAS#1(600)-IFN-1ant. Das Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen OmpA-Signalsequenz und dem ASHis₆-PAS#1(600)-IFN-1ant Protein unter Kontrolle des tet^{P^o}. Nach der Translokation über die innere Membran der Bakterienzelle in das Periplasma wird das OmpA-Signalpeptid durch die Signalpeptidase entfernt. Singuläre Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet.

3.2.1.2 Periplasmatische Produktion in *E. coli* und Proteinreinigung

Zur periplasmatischen Produktion des PASylierten Antagonisten IFN-1ant wurde der *E. coli*-Stamm KS272 mit dem Expressionsplasmid pASK75-His₆-PAS#1(600)-IFN-1ant und dem Helferplasmid pTUM4 (Schlupschy *et al.*, 2006) kotransformiert. Die Kultivierung und Genexpression erfolgte analog zur Produktion des PASylierten Superagonisten im 8 l-Maßstab im Laborfermenter (Abschnitt 2.5.2). Die Fermentation wurde durch regelmäßige Bestimmung der OD₅₅₀ überwacht und gesteuert, der Fortgang der Proteinbiosynthese in Gesamtzellextrakten nach Induktion sowie der Proteingehalt im finalen Periplasma-Extrakt wurde durch reduzierende SDS-PAGE überprüft. Da bei der periplasmatischen Expression nach der Abspaltung der OmpA-Signalsequenz die beiden Aminosäuren Ala und Ser N-terminal am sekretierten Protein verblieben, wird das so hergestellte rekombinante Protein im folgenden als ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant bezeichnet.

Die Zellen zeigten exponentielles Wachstum und erreichten nach 16,5 h Stunden eine Zelldichte von OD₅₅₀ = 22 (Abbildung 18A), woraufhin die Biosynthese von ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant mit 0,5 mg/l Anhydrotetracyclin (aTc) induziert wurde. Mit Eintritt in die stationäre Phase nach weiteren 2,5 Stunden wurden die Zellen zur Präparation der periplasmatischen Proteinfraction bei OD₅₅₀ = 33 geerntet. Nach Induktion der Genexpression nahm die Menge an rekombinanten ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant zu; nach der Periplasma-Extraktion war es als prominente Proteinbande nachweisbar, während ein Großteil der Wirtszellproteine in den abgetrennten Sphäroplasten verblieb (Abbildung 18B). Im SDS-Gel wurde wieder eine zweite PASylierte Proteinspezies nachgewiesen, die allerdings nur im Cytoplasma auftrat (Abschnitt 3.1.1.2). Dabei handelt es sich entweder um ein Abbauprodukt des PASylierten Proteins oder um eine unreife Form, die noch die OmpA-Signalsequenz trug.

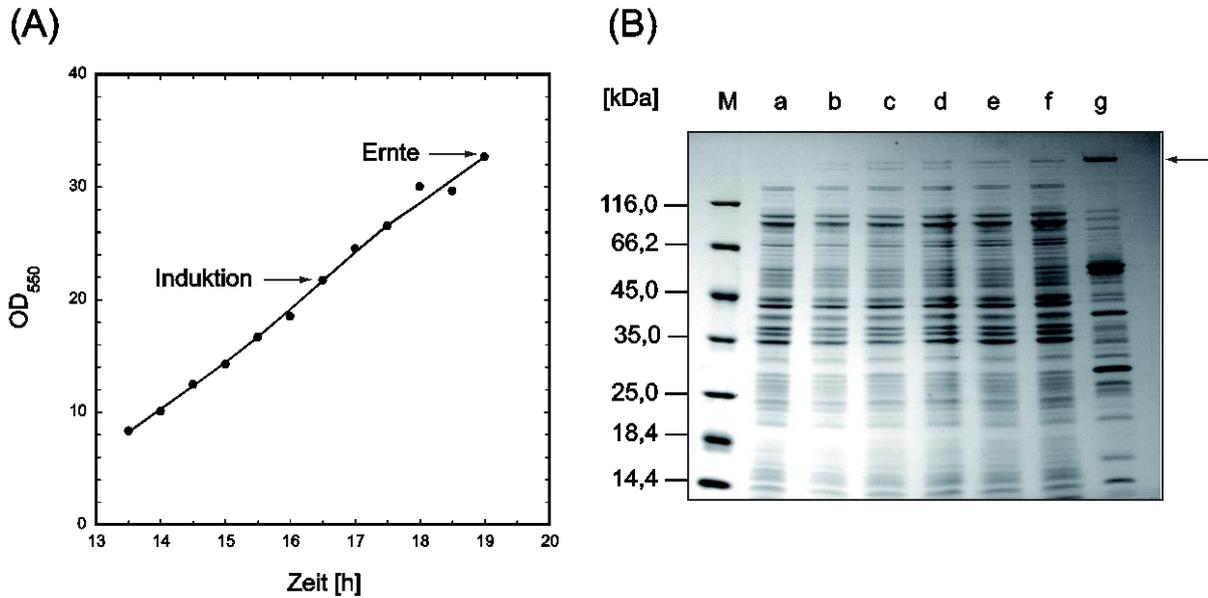


Abbildung 18: Periplasmatische Produktion von ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant im 8 l-Maßstab in *E. coli* KS272. (A) Geglättete Wachstumskurve der Bakterienkultur. Die Zelldichten (OD₅₅₀) bei Induktion und Ernte sind markiert. (B) Reduzierende SDS-PAGE zur Analyse der Proteinbiosynthese. ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. M: Proteinmarker. Die Spuren a bis f stellen den Gesamtzellextrakt zu verschiedenen Expressionszeiten dar; a: Kultur zum Zeitpunkt der Induktion, b: 0,5 h Expression, c: 1,0 h Expression, d: 1,5 h Expression, e: 2,0 h Expression, f: 2,5 h Expression, g: Periplasma-Extrakt.

Die weitere Reinigung des Proteins erfolgte in drei chromatographischen Schritten (Abbildung 19): 1. IMAC an Ni²⁺-Sephrose, 2. AEX und 3. SEC. Alle Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE überprüft; die Identität und Reinheit nach dem AEX-Schritt sowie der finalen Proteinpräparation wurde zudem durch ESI-MS verifiziert (Abbildung 20).

Für den ersten Reinigungsschritt (IMAC mit ÄKTA-Chromatographie-System bei Raumtemperatur, Abschnitt 2.7.1.1) wurde der Periplasma-Extrakt viermal gegen das 10-fache Volumen an IMAC-Puffer (Abschnitt 2.5.2) dialysiert und in einem Schritt auf eine Ni-Sephrose High Performance Säule (100 ml Bettvolumen) aufgetragen. Ein Großteil an unspezifisch gebundenen Wirtszellproteinen wurde durch Vorelution mit 30 mM Imidazol entfernt. Anschließend wurde mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 30 bis 150 mM Imidazol eluiert (Abbildung 19A, Peak 1). Die Fraktionen der IMAC wurden durch reduzierende SDS-PAGE überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt). ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant eluierte zusammen mit wenigen unspezifisch gebundenen Wirtszellproteinen bei ca. 120 mM Imidazol (Abbildung 19A, Peak 2; Abbildung 19D Spur c).

Für den zweiten Reinigungsschritt (AEX, Abschnitt 2.7.1.4) wurden alle IMAC-Elutionsfraktionen, die einen deutlichen Anteil an ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant (pI = 6,83) enthielten, vereinigt (Fraktionen 38 bis 48), gegen AEX-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5 / 1 mM EDTA) dialysiert und auf eine Source 15 Q-Säule (60 ml Bettvolumen) aufgetragen. Es wurde ein linearer Konzentrationsgradient von 0 bis 200 mM NaCl angelegt.

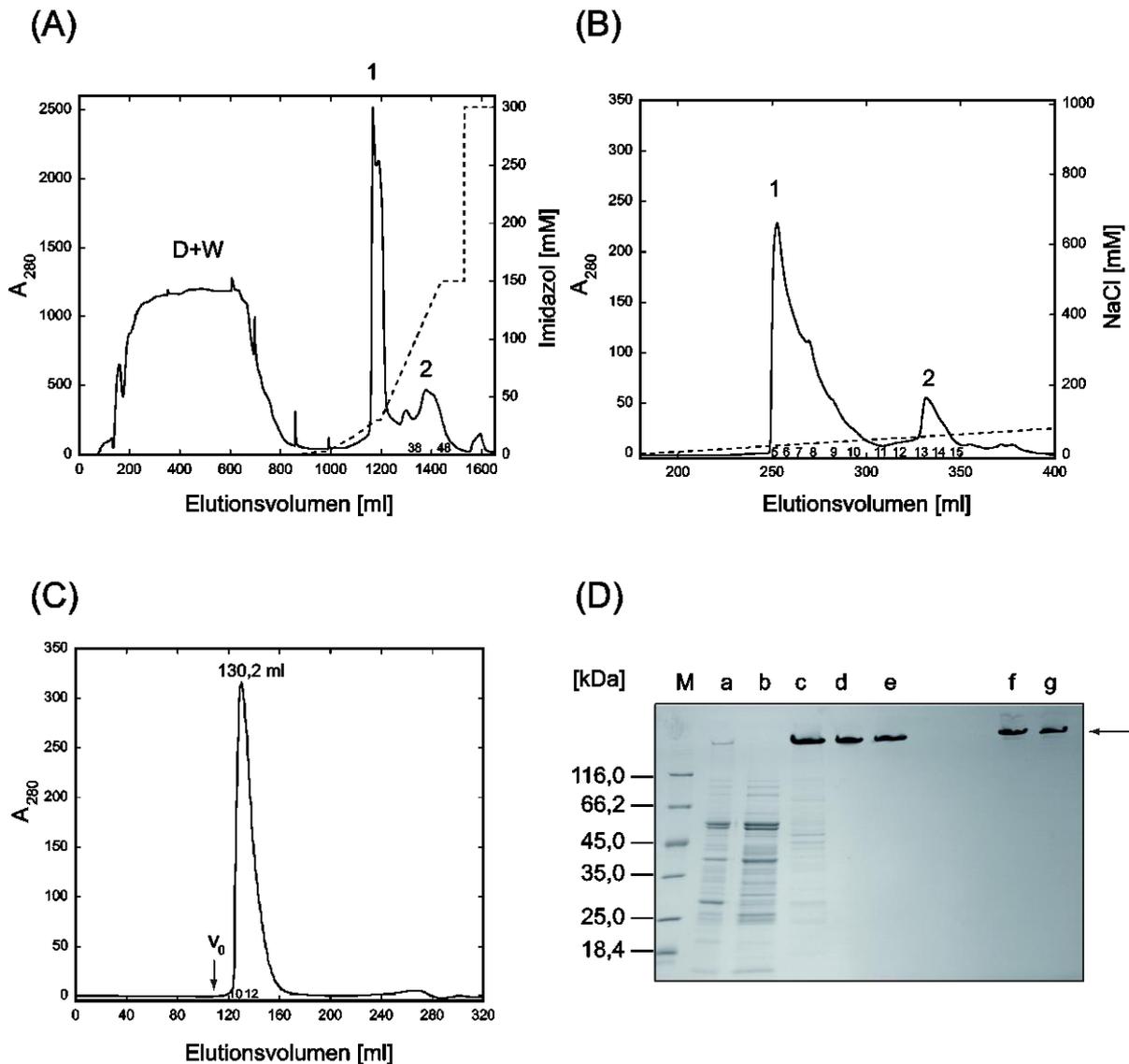


Abbildung 19: Chromatographische Reinigung von ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant. (A) IMAC-Reinigung an Ni-Sepharose High Performance. Durchlauf (D)- und Waschfraktion (W) repräsentieren den Proteinanteil, der nicht an die IMAC-Säule gebunden hat. Durch Vorelution mit 30 mM Imidazol wurde ein Großteil der unspezifisch gebundenen Wirtszellproteine abgetrennt (Peak 1). Die Elution erfolgte mit einem Konzentrationsgradienten von 30–150 mM Imidazol (Peak 2, Fraktionen 38–48). (B) AEX-Reinigung an Source 15 Q. Die Elution erfolgte bei pH 7,5 mit 0–200 mM NaCl. ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant eluierte als Peak 1. Im Peak 2 eluierte eine verkürzte Variante von ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant (siehe Abbildung 20). Beide Spezies konnten mittels AEX-Reinigung gut voneinander getrennt werden. (C) SEC-Reinigung an Superdex S200 (320 ml Bettvolumen). V_0 markiert das SEC-Ausschlussvolumen. ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant eluierte als Monomer und in hoher Reinheit bei 130,2 ml. (D) Zusammenfassende SDS-PAGE-Analyse aller Reinigungsschritte. M: Proteinmarker, a: Periplasma-Extrakt, b: Durchlauf IMAC (D+W), c: IMAC-Eluat (Peak 2, Fraktionen 38–48), d: CEX-Eluat (Peak 1, Fraktionen 5–10; reduzierend), e: SEC-Eluat (Fraktionen 10–12; reduzierende Bedingungen); f: CEX-Eluat (Peak 1, Fraktionen 5–10; nicht-reduzierend), g: SEC-Eluat (Fraktionen 10–12, nicht-reduzierende Bedingungen). Die erzielte Reinheit von ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant lag bei > 95 %.

Die einzelnen Fraktionen der AEX wurden durch reduzierende und nicht-reduzierende SDS-PAGE überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Großteil des Proteins eluierte bei ca. 30 mM NaCl (Abbildung 19B, Peak 1), ein kleinerer Anteil bei ca. 50 mM NaCl (Peak 2). Da die beiden Spezies in der SDS-PAGE-Analyse nicht unterscheidbar waren (Ergebnisse nicht gezeigt), wurden Fraktionen von Peak 1 und Peak 2 mittels ESI-MS (Abschnitt 2.9.1.1) untersucht. Dafür wurden die Proteinlösungen mit Hilfe eines Vivaspin 500 Konzentrators auf

~1 mg/ml konzentriert und gegen 10 mM Ammoniumacetat pH 6,6 dialysiert. Für den größeren Peak 1 wurde eine Molekülmasse von 70274,8 Da bestimmt, was exakt mit der berechneten Masse übereinstimmt und damit auch die korrekte Ausbildung der beiden Disulfidbrücken im oxidierten Protein sowie die vollständige Abspaltung der OmpA-Signalsequenz belegt (Abbildung 20A). Für den kleineren Peak 2 wurde eine geringere Masse von 69740,2 Da bestimmt, was einer Massendifferenz von -534,6 Da gegenüber der berechneten Masse entspricht (Abbildung 20B). Diese Differenz lässt sich nicht exakt durch Abspaltung von vier oder fünf C-terminalen Aminosäuren durch eine Carboxypeptidase erklären:

Gesuchte Masse: $m = 69740,2 \text{ Da}$

Abspaltung von KSKE: $m = 69806,3 \text{ Da} - 4 \text{ Da}$ (zwei Disulfidbindungen) = 69802,3 Da

Abspaltung von LKSKE: $m = 69693,1 \text{ Da} - 4 \text{ Da}$ (zwei Disulfidbindungen) = 69689,1 Da

Es könnte sich jedoch um ein zweifaches Natrium-Addukt der um fünf Aminosäuren verkürzten, reduziert vorliegenden Spezies handeln:

$$m = 69693,1 + 2 \times 23 \text{ Da} = 69739,1 \text{ Da}$$

Höchstwahrscheinlich ist der C-Terminus dieser ungefalteten Form im Vergleich zum nativen Protein sehr gut zugänglich. Da aber für beide Proteinfraktionen eine monodisperse Masse gefunden wurde, belegt dies eine effiziente Auftrennung beider Spezies durch die AEX-Chromatographie.

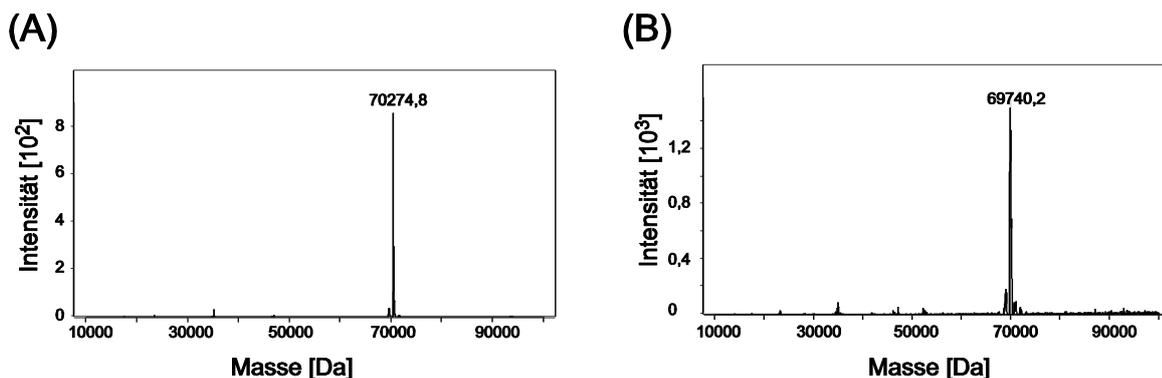


Abbildung 20: ESI-MS Analytik von Peak 1 und Peak 2 nach der AEX-Reinigung. Nach der AEX-Reinigung traten für ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant (pI = 6,83) zwei Spezies auf, die in getrennten Peaks (Peak 1 bei ca. 30 mM NaCl, Peak 2 bei ca. 50 mM) eluierten. Durch ESI-MS wurde für Peak 1 eine Masse von 70274,8 Da bestimmt (B), die exakt mit der berechneten Masse übereinstimmt. Für Peak 2 wurde eine Masse von 69740,2 Da bestimmt.

Für den letzten Reinigungsschritt durch SEC (Abschnitt 2.7.1.5) wurde das vereinigte AEX-Eluat (Abbildung 19D, Spuren d und f) aus Peak 1 (Fraktionen 5–10) konzentriert und die Proteine auf einer Superdex S200 26/60 (320 ml Bettvolumen) in PBS/1 mM EDTA als Laufpuffer nach Größe aufgetrennt. ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant lag ausschließlich als Monomer und in hoher Reinheit vor, es eluierte bei einem Elutionsvolumen von 130 ml

Abbildung 19C. Entsprechend der SDS-PAGE-Analyse lag die Reinheit der finalen Proteinpräparation als SEC-Eluat bei >95 % (Abbildung 19 D, Spuren e und g).

Die Ausbeute der 8 l-Fermentation lag nach dem letzten Reinigungsschritt bei 17 mg ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant, das entspricht einer relativen Ausbeute von 64 µg l⁻¹ OD₅₅₀⁻¹. Die Masse des nach SEC-Reinigung in PBS/E isolierten Proteins wurde nochmals mittels ESI-MS bestimmt. Das Massenspektrum (nicht gezeigt) wies vielfache Addukt-Peaks auf; die mittlere gefundene Masse von 70518,7 Da ($\Delta m = + 243,9$ Da) lässt sich durch Adduktbildung mit 10–11 Natriumionen erklären, was bei Proben aus PBS-gepufferter Lösung häufig zu beobachten und auch durch mehrmalige Dialyseschritte gegen 10 mM Ammoniumacetat pH 6,6 nicht ganz zu unterbinden ist. Ein einzelner kleinerer Massepeak wurde bei 69738,2 Da gefunden ($\Delta m = -536,6$ Da). Dieser könnte der nach der AEX gefundenen C-terminal um fünf Aminosäuren verkürzten, reduziert vorliegenden Variante ($m = 69739,1$ Da, zweifaches Natriumaddukt) entsprechen; die relative Häufigkeit im Massenspektrum lag jedoch bei unter 5 % und diese Spezies wurde zuletzt weder in der SEC noch in der SDS-PAGE identifiziert. Die finale Proteinpräparation wurde anschließend zur biophysikalischen Charakterisierung des PASylierten Superagonisten mittels SPR-Spektroskopie eingesetzt (Abschnitt 3.2.2.3).

Zur weiteren Verwendung für eine pharmakokinetische Studie in Rhesusaffen (Abschnitt 2.10.3) wurde außerdem der Endotoxingehalt bestimmt. Das Ergebnis war mit <1,4 EU/mg sehr niedrig, so dass kein zusätzlicher Abreicherungs-schritt notwendig war. Die Präparation wurde mittels Ultrafiltration (Centricon Plus-70 Zentrifugen-Filtereinheit) auf eine Konzentration von 3,5 mg/ml in PBS/E eingengt, unter keimarmen Bedingungen filtriert (Porengröße: 0,2 µm), auf vier Aliquots von jeweils 1,1 ml verteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei -80 °C gelagert und auf Trockeneis an die Arbeitsgruppe *Human Immunology Section/Vaccine Research Center* des NIH, Bethesda, USA versandt.

Für die weiterhin geplante SIV-Infektionsstudie im Rhesus-Tiermodell wurde ca. 1 g gereinigtes ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant benötigt. Hierfür war die Ausbeute von ca. 17 mg aus einer periplasmatischen 8 l-Fermentation nicht ausreichend.

3.2.1.3 Plasmidkonstruktion für die cytoplasmatische Produktion in *E. coli*

Bei der cytoplasmatischen Expression entfällt im Vergleich zur periplasmatischen Sekretion der limitierende Schritt der Proteintranslokation durch die innere Zellmembran von *E. coli*, wodurch potentiell höhere Ausbeuten möglich sind. Allerdings herrscht im bakteriellen Cytoplasma normalerweise ein reduzierendes Milieu, was die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken im rekombinanten Interferon behindert. Außerdem muss das rekombinante Protein aus einem Gesamtzellaufschluss von allen anderen Wirtszellproteinen abgetrennt werden, was die Reinigung deutlich schwieriger macht.

Die Problematik in Bezug auf die ineffiziente Ausbildung von Disulfidbrücken im bakteriellen Cytoplasma lässt sich durch spezielle Expressionsstämme von *E. coli* umgehen. So wurde beispielsweise die cytoplasmatische Biosynthese eines löslichen IFN-GST-Fusionsproteins mit Hilfe von *E. coli*-Stamm Origami B beschrieben (Rabhi-Essafi *et al.*, 2007); dort wurden Ausbeuten von mehr als 300 mg/l erreicht. In gewöhnlichen Bakterienstämmen wird das reduzierende Milieu im Cytoplasma, neben dem Tripeptid Glutathion, durch mindestens vier Thiol/Disulfid-Oxidoreduktasen, Thioredoxin und Glutaredoxin 1 bis 3 aufrechterhalten. Cytoplasmatische Proteine werden von diesen Redox-Partnern fortwährend reduziert, sie selbst liegen danach zunächst in oxidiertem Form vor. Die oxidierte Form von Thioredoxin wird durch das Flavoenzym Thioredoxin-Reduktase mittels NADPH reduziert. Hingegen werden die oxidierten Glutaredoxine ausschließlich durch Glutathion reduziert, das wiederum durch das Flavoenzym Glutathion-Reduktase und NADPH regeneriert wird (Prinz *et al.*, 1997). Origami-Derivate von *E. coli* tragen Mutationen in den Genen für die Thioredoxin-Reduktase (*trxB*) und die Glutathion-Reduktase (*gor*), wodurch die Regenerierung von oxidiertem Thioredoxin, Glutathion und Glutaredoxinen stark verlangsamt (Bessette *et al.*, 1999) und die Ausbildung von strukturellen Disulfidbrücken von heterolog exprimierten Proteinen im Cytoplasma somit begünstigt wird. Da vollständig Reduktase-defiziente Stämme allerdings ein stark verlangsamtes Wachstum zeigen (Berkmen, 2012), tragen die Origami-Stämme zusätzlich eine Mutation im Gen der Alkyl-Hydroperoxid Reduktase C (*ahpC*), die einen funktionellen Wechsel des Enzyms zu einer schwachen Disulfid-Reduktase bewirkt und somit das Zellwachstum wieder normalisiert (Ritz *et al.*, 2001).

Zur cytoplasmatischen Expression von His₆-PAS(600)-IFN-1ant wurde der kommerziell erhältliche Expressionsstamm Origami B (Novagen[®]/Merck) verwendet. Hierfür musste zunächst ein geeigneter Expressionsvektor konstruiert werden. Als Basis zur Subklonierung des Gens für PAS#1(600)-IFN-1ant diente zunächst ein Derivat von pASK75-T7RBS-His₆, das den *tet*-Promotor-Operator verwendet. Nach einer weiteren Subklonierung wurde das finale Expressionsplasmid auf Basis von pASK37 erhalten, das den *lacUV5*-Promotor/Repressor verwendet und durch die Umklonierung zusätzlich die hocheffiziente ribosomale Bindestelle des Gens 10 aus dem T7-Phagen (T7RBS) trägt (Abbildung 21).

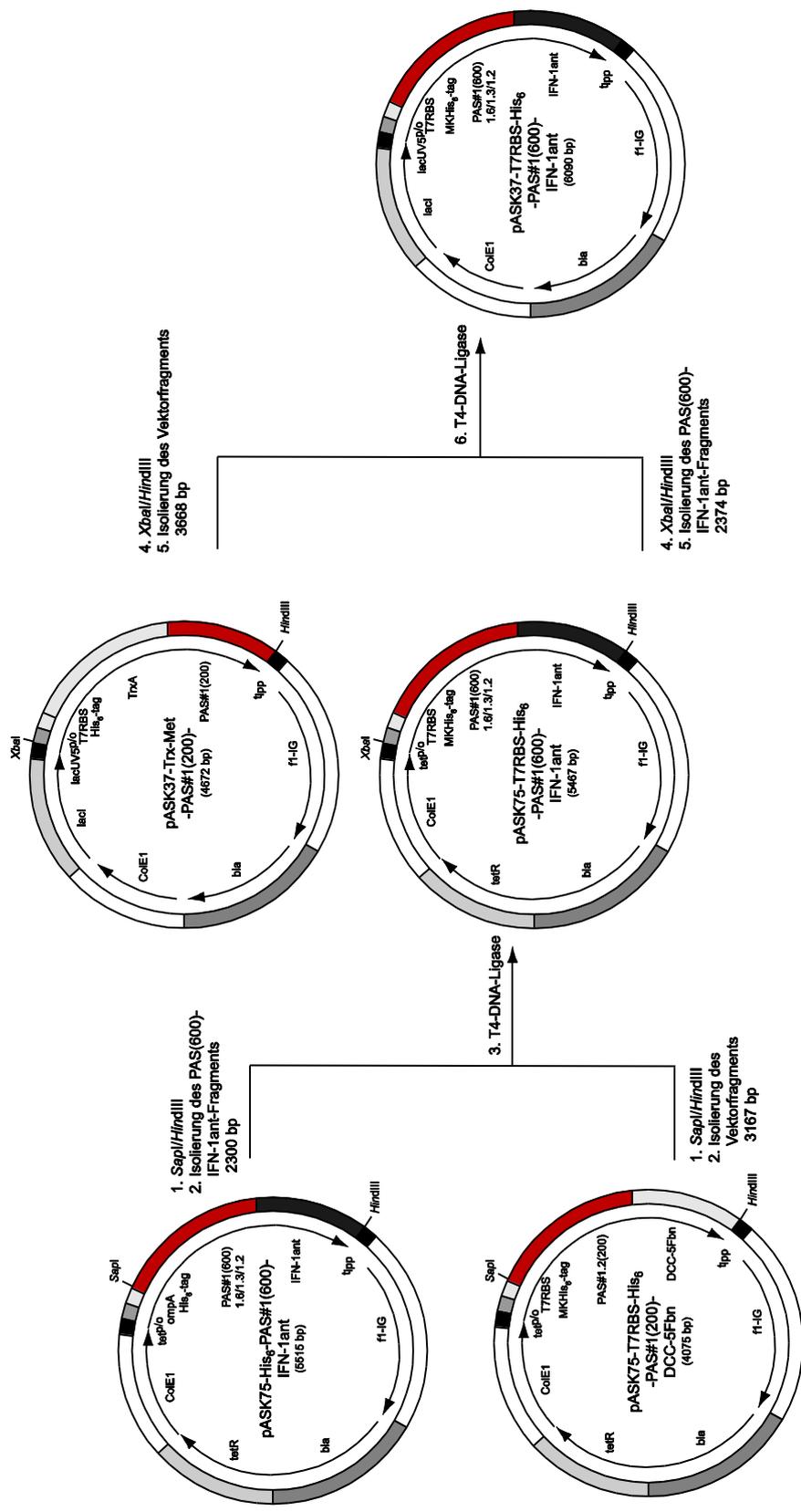


Abbildung 21: Konstruktion von pASK37-T7RBS-His₆-PAS#1(600)-IFN-1ant. Die Genkassette für PAS#1(600)-IFN-1ant (2300 bp) wurde mit *SapI* und *HindIII* aus dem periplasmatischen Expressionsplasmid pASK75-His₆-PAS#1(600)-IFN-1ant (Abbildung 16) ausgeschnitten und über dieselben Restriktionsschnittstellen in das cytoplasmatische Expressionsplasmid pASK75-T7RBS-His₆-PAS#1(200)-DCC5-Fbn inseriert. Dadurch wurde die N-terminale OmpA-Signalsequenz mit der darauffolgenden Aminosäuresequenz ASHHHHHHGASSA durch die Aminosäuresequenz MKHHHHHHSSA ersetzt. Gleichzeitig wurde die ribosomale Bindestelle des OmpA-Gens durch die ribosomale Bindestelle des Gens 10 aus dem T7-Phagen (T7RBS) ersetzt. Der Genabschnitt für das rekombinante Protein sowie die T7RBS wurde anschließend über *XbaI/HindIII* auf pASK37-Trx-Met-PAS#1(200) subkloniert, welches anstelle des *ret*-Promotor/Operator-Systems das lacUV5-Promotor/Operator-System verwendet. Das finale Plasmid wurde als pASK37-T7RBS-His₆-PAS#1(600)-IFN-1ant bezeichnet.

Die für PAS#1(600)-IFN-1ant kodierende Genkassette (2300 bp) wurde hierfür zunächst aus dem periplasmatischen Expressionsplasmid pASK75-His₆-PAS#1(600)-IFN-1ant (Abschnitt 3.2.1.1) über die Restriktionsschnittstellen *SapI* und *HindIII* auf das cytoplasmatische Expressionsplasmid pASK75-T7RBS-His₆-PAS#1(200)-DCC5-Fbn (Breibeck, 2016; Plescher, 2012) subkloniert. pASK75-T7RBS-His₆-PAS#1(200)-DCC5-Fbn ist ein Derivat von pASK75, das direkt stromaufwärts der *SapI*-Schnittstelle für die Aminosäuren Met und Lys kodiert, was einen optimierten cytoplasmatischen Translationsstart vermittelt, gefolgt vom His₆-Affinitätsanhängsel für die Proteinreinigung. Weiterhin trägt das Plasmid vor der kodierenden Region die ribosomale Bindestelle des Gens 10 aus dem T7-Phagen (T7RBS), die für eine sehr hohe Translationseffizienz sorgt (Olins *et al.*, 1988). Da das in den pASK75-Derivaten verwendete *tet*-Promotor/Operator-System zur Zeit dieser Arbeit noch unter Patentschutz stand und die Expression der Interferon-Varianten auch mit der Absicht einer späteren kommerziellen Nutzung erfolgen sollte, wurde die für His₆-PAS#1(600)-IFN-1ant kodierende Genkassette mit der T7RBS (2374 bp) anschließend über *XbaI/HindIII* auf pASK37-Trx-Met-PAS#1(200) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ina Theobald) subkloniert, welches stattdessen das *lacUV5*-Promotor/Operator-System (Skerra & Plückthun, 1991) nutzt. In diesem System wird die heterologe Genexpression durch Zugabe von IPTG induziert. Die höhere Basalexpression des Systems im Vergleich zu dem sehr dicht reprimierten *tet*-Promotor-Operator kann durch Zugabe von 1 % (w/v) Glucose zum Nährmedium reduziert werden (Plückthun & Skerra, 1989; Skerra & Plückthun, 1988). Das finale Expressionsplasmids wurde als pASK37-T7RBS-His₆-PAS#1(600)-IFN-1ant bezeichnet.

Die periplasmatisch (Abschnitt 3.2.1.1) und die cytoplasmatisch produzierten Varianten des IFN-Antagonisten unterscheiden sich N-terminal leicht in ihrer Aminosäuresequenz (Abbildung 22): Das periplasmatisch produzierte Protein ASHis₆-IFN-1ant beginnt mit den Aminosäuren AlaSer vor dem Hexahistidin-Affinitätsanhängsel, welche nach Abspaltung der OmpA-Signalsequenz am N-Terminus verbleiben; durch die Klonierungsstrategie befinden sich außerdem noch die Aminosäuren GlyAla zwischen dem Affinitätsanhängsel und der SerSerSerAla-Linker-Sequenz, in derer auch die *SapI*-Restriktionsschnittstelle lokalisiert ist. Das cytoplasmatische Protein MKHis₆-IFN-1ant beginnt hingegen mit den beiden Aminosäuren MetLys, die den Translationsstart markieren; die SerSerSerAla-Linker-Sequenz schließt sich hier unmittelbar an das Hexahistidin-Affinitätsanhängsel an, wodurch diese Variante um zwei Aminosäuren kürzer ist als das periplasmatisch produzierte Protein.

	1	10
periplasmatisch	ASHis ₆ -PAS(600)-IFN-1ant	ASHHHHHH [.] GASSSA [.]
cytoplasmatisch	MKHis ₆ -PAS(600)-IFN-1ant	MKHHHHHH--SSSA

Abbildung 22: N-terminales Sequenz-Alignment des periplasmatisch und cytoplasmatisch produzierten PASylierten Antagonisten IFN-1ant. Das periplasmatisch produzierte Fusionsprotein ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant und das cytoplasmatisch produzierte Protein MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant unterscheiden sich durch die beiden N-terminalen Aminosäuren (AS bzw. MK), außerdem ist die cytoplasmatische Variante um zwei Aminosäuren verkürzt.

3.2.1.4 Cytoplasmatische Produktion in *E. coli* und Proteinreinigung

Zur cytoplasmatischen Produktion des PASylierten IFN-Antagonisten MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant wurde der *E. coli*-Stamm Origami B mit dem Expressionsplasmid pASK37-T7RBS-His₆-PAS#1(600)-IFN-1ant transformiert. Die Fermentation erfolgte im 8 l-Maßstab im Laborfermenter nach etabliertem Protokoll für die periplasmatische Expression (vgl. Abschnitt 2.5.2); im Unterschied dazu wurde für die cytoplasmatische Expression jedoch eine Temperatur von 30 °C für alle Inkubationsschritte gewählt, außerdem wurde bereits die Vorvorkultur mit 1 % Glucose versetzt (Plückthun & Skerra, 1989; Skerra & Plückthun, 1988), um die Basalexpression des *lacUV5*-Promotor/Repressor-Systems zu unterdrücken. Im weiteren enthielten die Vor- und Hauptkultur entsprechend dem etablierten Protokoll Glucose mit einem Volumenanteil von 2 % (v/v). Die Fermentation wurde durch regelmäßige Bestimmung der OD₅₅₀ überwacht und gesteuert; der Fortgang der Proteinbiosynthese in Gesamtzellextrakten nach Induktion sowie der Proteingehalt im finalen Cytoplasma-Extrakt wurde durch reduzierende SDS-PAGE überprüft.

Die Zellen wiesen exponentielles Wachstum auf und erreichten nach 18,5 h Stunden eine Zelldichte von OD₅₅₀ = 28,5 (Abbildung 23A), woraufhin die Biosynthese von MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant mit 0,5 mM IPTG induziert wurde. Mit Eintritt in die stationäre Phase nach weiteren 2,5 Stunden wurden die Zellen bei OD₅₅₀ = 42 durch Zentrifugation geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden bis zum Zellaufschluß bei -20 °C eingefroren und gelagert. Nach der Induktion wurde das rekombinante MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant während der ersten 1,5 h in stetig zunehmender Menge produziert (Abbildung 23B), danach war keine weitere Erhöhung zu beobachten, jedoch stieg die Zelldichte bis zum Zeitpunkt der Ernte nach 2,5 Stunden noch leicht von 39 auf 42.

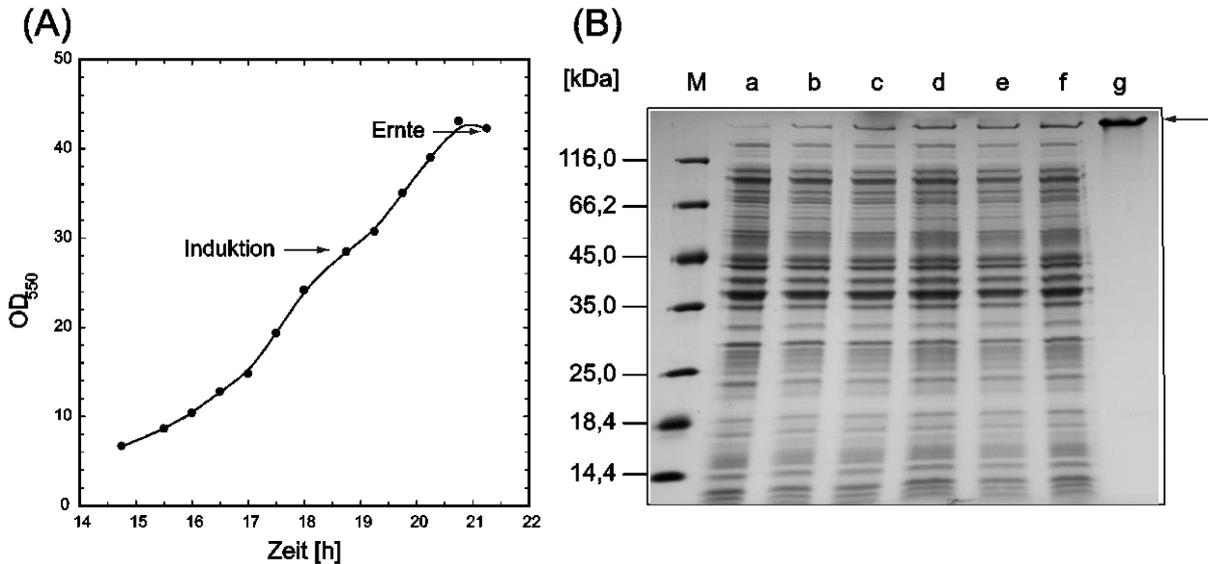


Abbildung 23: Cytoplasmatische Produktion von MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant im 8 l-Maßstab in *E. coli* Origami B. (A) Geglättete Wachstumskurve der Bakterienkultur. Die Zelldichten (OD₅₅₀) bei Induktion und Ernte nach weiteren 2,5 h sind markiert. (B) Reduzierende SDS-PAGE zur Analyse der Proteinbiosynthese. MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant ist mit einem Pfeil gekennzeichnet; M: Proteinmarker, die Spuren a bis f stellen den Gesamtzellextrakt zu verschiedenen Expressionszeiten dar; a: Kultur zum Zeitpunkt der Induktion, b: 0,5 h Expression, c: 1,0 h Expression, d: 1,5 h Expression, e: 2,0 h Expression, f: 2,5 h Expression, g: Vergleichsprobe ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant (8 µg aus periplasmatischer Präparation).

Zur Präparation des Gesamtzellextrakts wurden die sedimentierten Zellen in einem Gesamtvolumen von 1 l Cytoplasma-Aufschlusspuffer (40 mM NaP_i pH 7,5, 0,2 mM AEBSF) resuspendiert, und mit einem PANDA-Hochdruckhomogenisator bei 400 bar aufgeschlossen. Der Zusatz von AEBSF diente hierbei zum Schutz vor Serinproteasen (Pan *et al.*, 2008). Zelltrümmer und Proteinpräzipitat wurden durch mehrmalige einstündige Zentrifugation vom löslichen Zellextrakt separiert und dieser abschließend durch eine 0,45 µm-Mikrofiltration mittels einer *Crossflow*-Einheit geklärt.

Zur Entwicklung einer geeigneten Reinigungsstrategie wurden zunächst zwei parallele Reinigungen im kleinen Maßstab mit jeweils 10 ml des Zellaufschlusses (entsprechend dem Volumen eines Zellextrakts aus einer 2 l-Kultur im Schüttelkolben) durchgeführt. Hierbei wurde einem der beiden Ansätze das Oxidationsmittel Dithiodipyridin zugesetzt, das hinzugefügt wurde, um die Ausbildung von Disulfidbrücken aus möglicherweise noch unvollständig oxidierten Cystein-Resten in dem cytoplasmatisch hergestellten Protein zu begünstigen (Maruyama *et al.*, 1999).

Bei beiden Ansätzen erfolgte die Reinigung von MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant aus dem Cytoplasma-Extrakt in drei chromatographischen Schritten (repräsentativ gezeigt für den Ansatz ohne Dithiodipyridin, Abbildung 24): 1. AEX, 2. IMAC an Ni²⁺-Sephrose und 3. CEX. Alle Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE überprüft.

Diese Strategie unterscheidet sich von der Reinigung des periplasmatisch produzierten Proteins (IMAC, AEX, SEC; Abschnitt 3.2.1.2). Der erste Schritt mittels AEX diente dazu, möglichst viele Wirtszellproteine aus dem Gesamtzellextrakt zu entfernen; die Bedingungen

wurden mit einem pH von 7,5 so gewählt, dass ein großer Teil der Wirtszellproteine zurückgehalten wurden, während das zu reinigende Protein MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant (pI = 7,12) keine Bindung mit der Matrix einging und im Durchfluss aufgefangen werden konnte (subtraktive AEX). Nach dieser Vorreinigung war die Komplexität und Konzentration der Proteinlösung ausreichend reduziert, um MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant spezifisch über das His₆-Affinitätsanhängsel mittels IMAC anzureichern. Aufgrund der hohen Ausbeute der cytoplasmatischen Expressionsstrategie wurde im letzten Reinigungsschritt keine SEC verwendet, da hier zu sehr große Bettvolumina bzw. zahlreiche Läufe mit hochkonzentrierter Proteinlösung notwendig gewesen wären. Stattdessen wurde die CEX gewählt, die durch die Bindung des zu reinigenden Proteins eine spezifische Anreicherung bewirkt, deren Matrix eine hohe Bindungskapazität aufweist, und bei der das Protein durch geeignete Elution sogar konzentriert werden konnte. Die Monodispersität der finalen Proteinpräparation wurde dennoch durch analytische SEC überprüft (Abbildung 25).

Für den ersten Reinigungsschritt (AEX, Abschnitt 2.7.1.4) wurde der geklärte Cytoplasma-Extrakt (in Cytoplasma-Aufschlusspuffer, 40 mM NaP_i pH 7,5, versetzt mit 0,2 mM AEBSF) direkt auf eine Fractogel[®] EMD TMAE (S) Säule (10 ml Bettvolumen) aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte isokratisch mit AEX-Laufpuffer (40 mM NaP_i pH 7,5) bei einer Flußrate von 2 ml/min; dabei wurden Fraktionen von 5 ml gesammelt. MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant (pI = 7,12) lag beim gewählten pH von 7,5 hauptsächlich ungeladen (deprotonierter Form) vor und band daher nicht an das positiv geladene Anionentauschermaterial. Tatsächlich wurde das rekombinante Protein im Durchlauf (Fraktionen 2–4, Elutionsvolumen 5–20 ml) aufgefangen (Abbildung 24A), wohingegen verunreinigende Wirtszellproteine und aggregiertes MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant von der Säule zurückgehalten wurden (Fraktionen 14–16).

Für den zweiten Reinigungsschritt (IMAC, Abschnitt 2.7.1.1) wurden die gewonnenen AEX-Fraktionen vereinigt (Abbildung 24D). Für den Reinigungsansatz unter Zusatz von Dithiodipyridin wurde gegen 40 mM NaP_i pH 7,5, 500 mM NaCl dialysiert, um das Dithiodipyridin zu entfernen, das mit seinen Thiolgruppen ebenfalls mit der Ni-Sepharose interagieren kann. Der Ansatz ohne Dithiodipyridin konnte ohne Dialyse weiterverwendet werden; hier wurde vor der IMAC noch NaCl zu einer Endkonzentration von 500 mM NaCl zugesetzt. Die IMAC wurde mit einer Ni-Sepharose High Performance Säule (10 ml Bettvolumen) durchgeführt, unspezifisch gebundene Wirtszellproteine wurden in einer Vorelution mit 15 mM Imidazol/HCl entfernt (Abbildung 24B, Peak 1), anschließend wurde mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 15 bis 150 mM Imidazol eluiert. MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant eluierte bei ca. 50 mM Imidazol/HCl (Peak 2, Fraktionen 40 bis 46). Die Fraktionen der IMAC wurden durch reduzierende SDS-PAGE überprüft (Abbildung 24E). Da noch mehrere verunreinigende Proteinbanden nachweisbar waren, wurde ein dritter Reinigungsschritt durchgeführt.

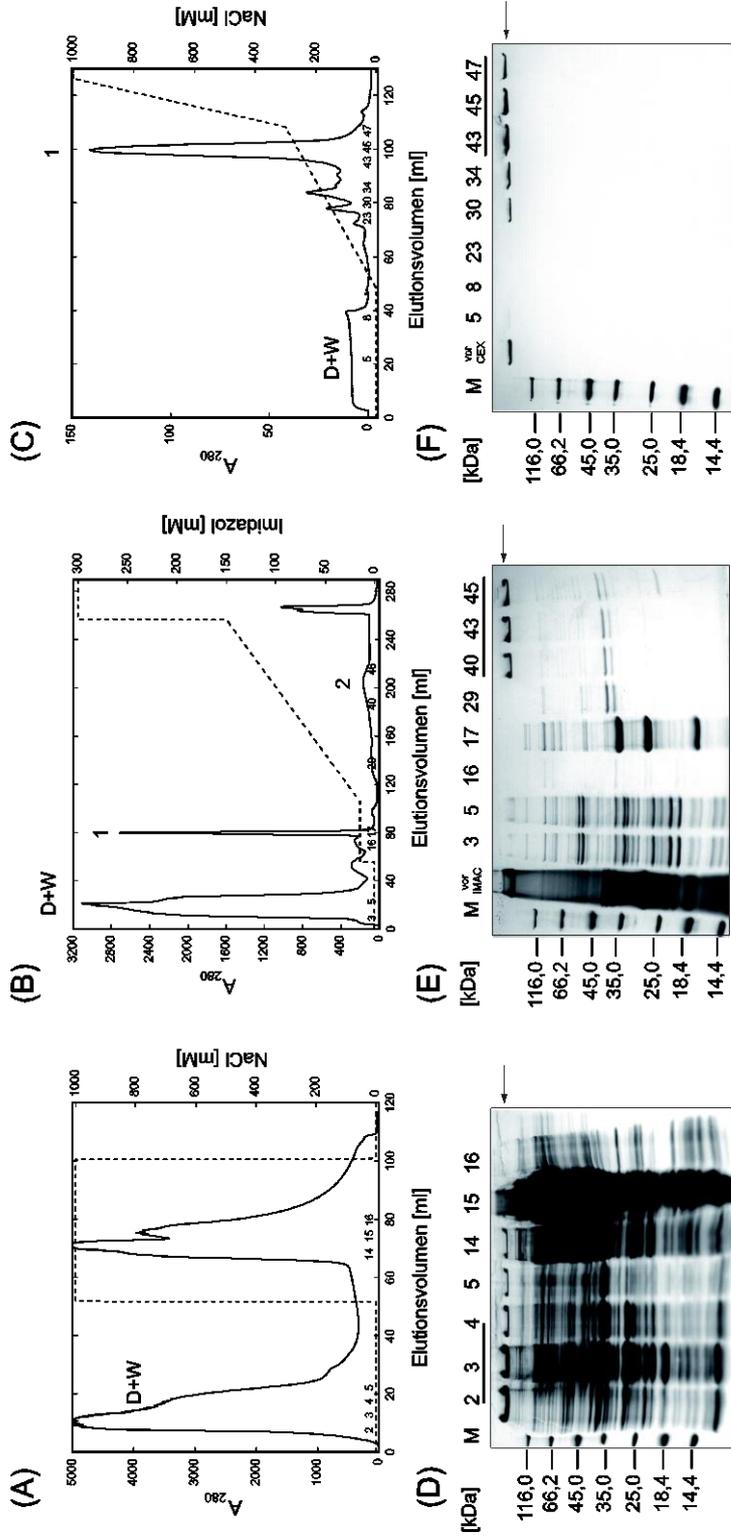


Abbildung 24 Chromatographische Reinigung von MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant (ohne Dithiodipyridin) aus 8 l-Maßstab. Chromatogramm zur AEX-Reinigung von geklärtem Cytoplasma-Extrakt an 10 ml Fractogel EMD TMAE (S). In dem verwendeten Laufpuffer 40 mM NaPi, pH 7,5 lag das MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant hauptsächlich ungeladen vor und interagiert nicht mit den positiv geladenen Trimethylammoniumethylgruppen des Chromatographiegels. Nach der AEX-Reinigung befand sich das rekombinante Protein in den Durchlauf- bzw. Waschfraktionen (D+W) 2 bis 4. (B) Chromatogramm zur IMAC-Reinigung an 10 ml Ni-Sepharose High Performance. MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant konnte über einen flachen Imidazol-Konzentrationsgradienten von 15–150 mM in den Fraktionen 40 bis 46 angereichert werden (Peak 2). Durch Vorelution mit 15 mM Imidazol konnten bereits ein Großteil der Wirtszellproteine abgetrennt werden (Peak 1). Die D+W Fraktion, entsprach dem Proteinanteil, der nicht an die IMAC-Säule gebunden hat. (C) Nach Dialyse gegen CEX-Puffer und Abtrennung des Präzipitats aus *E. coli*-Proteinen wurde das Zielprotein in hoher Reinheit durch CEX-Chromatographie an einer Resource S-Säule (Bettvolumen: 6 ml) isoliert. Die Fraktionen 43 bis 47 wurden vereinigt (Peak 1). (D) SDS-PAGE-Analyse der AEX-Reinigung (reduzierend). (E) SDS-PAGE-Analyse der IMAC-Reinigung (reduzierend). (F) SDS-PAGE-Analyse der CEX-Reinigung (nicht-reduzierend). Die Spuren sind mit den aufgetragenen Fraktionsnummern beschriftet und die jeweilig vereinigten Fraktionen unterstrichen.

Für diesen abschließenden Reinigungsschritt (CEX, Abschnitt 2.7.1.4) wurden die Elutionsfraktionen aus der IMAC vereinigt und gegen CEX-Laufpuffer (20 mM MES/NaOH, pH 6,5, 1 mM EDTA) dialysiert. Da hierbei ein Teil der verunreinigenden Wirtszellproteine und ein kleiner Anteil von MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant ausfielen (nicht gezeigt, aber belegt durch SDS-PAGE), wurde der unlösliche Proteinanteil durch Zentrifugation bei 15000 rpm abgetrennt. Der lösliche Überstand wurde auf eine Source 15S-Säule (6 ml Bettvolumen) aufgetragen und ein linearer Konzentrationsgradient von 0 bis 300 mM NaCl angelegt (Abbildung 24C), die einzelnen Fraktionen wurden durch nicht-reduzierende SDS-PAGE überprüft (Abbildung 24F). MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant eluierte bei ca. 250 mM NaCl (Peak 1, Fraktionen 43–47), die Reinheit der Fraktionen lag bei >95 %; und es wurden in der nicht-reduzierenden SDS-PAGE keine unterscheidbaren Disulfid-Isomere gefunden. Das rekombinante Protein wurde auch in den kleineren Vorpeaks (Fraktionen 30 und 34) identifiziert. Diese Spezies waren jedoch in der SDS-PAGE anhand ihrer Molekülmasse bzw. ihrer Disulfidverbrückung nicht von der Hauptspezies unterscheidbar; es kann sich hierbei um Ladungsvarianten (z.B. Deamidierung oder C-terminaler Abbau) des Proteins handeln, was nicht weiter untersucht wurde.

Um die Reinheit und den Oligomerisierungszustand der finalen Proteinpräparationen nach der CEX zu untersuchen, wurde 225 µl des vereinigten CEX-Pools einer analytischen SEC an einer Superdex 200 10/300 GL-Säule mit 24 ml Bettvolumen in PBS als Laufpuffer unterzogen (repräsentativ gezeigt für den Reinigungsansatz ohne Dithiodipyridin, Abbildung 25).

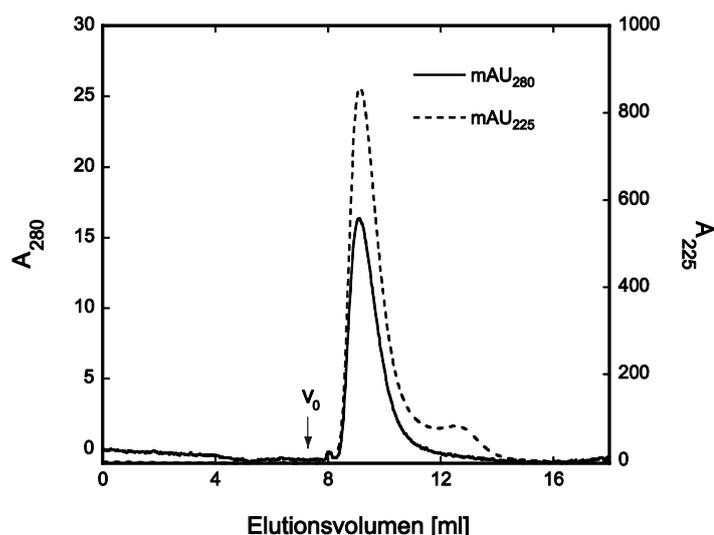


Abbildung 25: SEC-Profil des PASylierten Antagonisten MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant an Superdex 200 10/300 GL (Reinigungsansatz ohne Dithiodipyridin). Das SEC-Ausschlussvolumen ($V_0 = 7,53$ ml) ist markiert (Bettvolumen: 24 ml). Die Chromatogramme bei 280 nm und 225 nm zeigen einen homogenen monomeren Peak bei 9,13 ml ($M_{app} = 665,6$ kDa). Bei 225 nm wurde zusätzlich eine kleinere Spezies bei 12,56 ml ($M_{app} = 137,9$ kDa) detektiert.

Die UV-Absorption wurde sowohl bei 280 nm (Absorption vor allem durch die aromatischen Aminosäuren Trp und Tyr) als auch bei 225 nm (Absorption durch die Peptidbindung) aufgezeichnet. Durch die zusätzliche Messung bei 225 nm können C-terminal verkürzte Varianten des rekombinanten Fusionsproteins nachgewiesen werden, die zu einem höheren Anteil aus dem PAS-Polymer bestehen, welches allein keine Absorption bei 280 nm aufweist. Die Chromatogramme beider Wellenlängen zeigten einen homogenen monomeren Peak bei einem Elutionsvolumen von 9,13 ml ($M_{app} = 665,6$ kDa), was dem intakten MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant entsprach. Bei 225 nm wurde außerdem eine weitere Spezies bei einem Elutionsvolumen von 12,56 ml ($M_{app} = 137,9$ kDa) detektiert; diese stellt vermutlich ein Abbaufragment aus reinem PAS-Polymer dar, das einen Mengenanteil von ca. 10 % in der Proteinpräparation ausmachte (bestimmt anhand des Absorptionsprofils bei 225 nm).

Die gewählte Reinigungsstrategie für das cytoplasmatisch produzierte MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant war in beiden parallelen Ansätzen, also mit und ohne Dithiodipyridin, erfolgreich; alle Chromatogramme und SDS-PAGE Analysen waren zwischen diesen beiden Ansätzen vergleichbar. Die vollständige Ausbildung der Disulfidbrücken wurde zusätzlich durch ESI-MS des intakten Proteins (Abschnitt 3.2.2.1.1) sowie in Peptidmassen nach tryptischem Verdau (Abschnitt 3.2.2.1.2) untersucht und zwischen beiden Reinigungsansätzen verglichen. Da sich hier kein Unterschied zwischen den beiden Ansätzen nachweisen ließ, wurde auf die Zugabe von Dithiodipyridin für die weitere präparative Reinigung des verbleibenden Hauptteils des Gesamtzellextraktes aus der cytoplasmatischen 8 l-Fermentation von MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant verzichtet.

Die weitere Reinigung wurde durch die Firma XL-protein GmbH nach dem hier etablierten Reinigungsprotokoll durchgeführt; im weiteren Fortlauf wurden allerdings noch zwei Optimierungen an dem Protokoll vorgenommen: Der CEX-Laufpuffer (20 mM MES/NaOH, pH 6,5, 1 mM EDTA) wurde durch einen Phosphatpuffer (40 mM NaP_i, 1 mM EDTA, pH 7,0) ersetzt, in dem MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant eine bessere Löslichkeit zeigte; außerdem wurde eine weitere AEX als finaler Reinigungsschritt eingefügt, unter den gewählten Bedingungen (20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 9,0) wurde MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant im Gegensatz zur initialen, subtraktiven AEX hierbei vom Säulenmaterial gebunden und konnte abschließend mit Hilfe eines linearen NaCl-Gradienten selektiv eluiert werden.

Auf diese Weise wurde ca. 560 mg gereinigtes Protein aus der ersten 8 l-Fermentation gewonnen. Das entspricht einer Ausbeute von $1,7 \text{ mg l}^{-1} \text{ OD}_{550}^{-1}$ und liegt damit um den Faktor 27 höher als die Ausbeute aus der periplasmatischen Produktion von ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant ($64 \text{ } \mu\text{g l}^{-1} \text{ OD}_{550}^{-1}$) (vgl. Abschnitt 3.2.1.2). Die benötigte Menge von ~ 1 g gereinigtem IFN-Antagonisten für die SIV-Infektionsstudie wurde in insgesamt vier 8 l-Fermentationen hergestellt.

3.2.2 Biophysikalische und funktionelle Charakterisierung

3.2.2.1 Massenspektrometrische Untersuchungen zur Bestimmung von Disulfidbrücken

Um die verschiedenen Proteinpräparationen des PASylierten IFN-Antagonisten (periplasmatisch (Abschnitt 3.2.1.2), cytoplasmatisch und cytoplasmatisch unter Zugabe von Dithiodipyridin während der Reinigung (Abschnitt 3.2.1.4)) auf die korrekte Ausbildung der beiden Disulfidbrücken detailliert zu untersuchen, wurden sowohl die intakten Proteinmassen (Abschnitt 3.2.2.1.1) als auch Peptidmassen nach tryptischem Verdau (Abschnitt 3.2.2.1.2) mittels ESI-MS bestimmt.

3.2.2.1.1 Gesamtmassenbestimmung nach Reduktion mit Dithiothreitol (DTT)

Proteinproben wurden bei einer Konzentration von ~1,2 mg/ml (periplasmatisch und cytoplasmatisch) bzw. 0,7 mg/ml (cytoplasmatisch unter Zugabe von Dithiodipyridin während der Reinigung) zweimal gegen 10 mM Ammoniumacetat pH 8,2 dialysiert. Die Proben wurden mit 50 % MeOH und 1 % AcOH versetzt und die jeweilige Proteinmasse mittels ESI an einem Agilent 6210 Q-TOF Massenspektrometer bestimmt. Um den kleinen Massenunterschied von nur 2 Da pro Disulfidbrücke besser nachweisen zu können, wurde jeweils parallel dazu die Masse des vollständig reduzierten Proteins gemessen. Hierfür wurde ein Teil jeder Präparation vor der Massebestimmung mit 5 mM Dithiothreitol (DTT) versetzt. Anhand der Massendifferenz zwischen Probe und reduzierter Kontrolle ergab sich der Oxidationsgrad der Disulfidbrücken für jede Proteinpräparation.

Tabelle 8: Gesamtmassen der intakten Proteine aus periplasmatischer und cytoplasmatischer Expression.

Protein	Berechnete Masse [Da]	Bestimmte Masse [Da]		$\Delta m =$ Kontrollprobe – Analysenprobe [Da]
		Reduzierte Kontrollprobe	Gereinigte Analysenprobe	
ASHis ₆ -PAS(600)-IFN-1ant (periplasmatisch)	70278,8	70278,74	70274,97	+ 3,77
MKHis ₆ -PAS(600)-IFN-1ant (cytoplasmatisch; Reinigung ohne Dithiodipyridin)	70251,9	70250,93	70248,58	+ 2,35
MKHis ₆ -PAS(600)-IFN-1ant (cytoplasmatisch; Reinigung mit Dithiodipyridin)	70251,9	70252,08	70248,61	+ 3,47

In allen Proben wurde nach Dekonvolution ein einzelner Massenpeak gefunden (Massenspektren nicht gezeigt, in Tabelle 8 sind die detektierten Massen aufgelistet), die Masse der reduzierten Probe stimmte innerhalb der Messtoleranz mit der jeweiligen berechneten Masse überein. Im Vergleich zur reduzierten Kontrollprobe wurde in allen gereinigten Analysenproben ein messbarer Unterschied festgestellt (3,8 Da bei der periplasmatischen Präparation, 2,4 Da bei der cytoplasmatischen Präparation, 3,5 Da bei der cytoplasmatischen Präparation unter Zugabe von Dithiodipyridin während der Reinigung). Dies belegt, dass in allen Präparationen die Disulfidbrücken zumindest teilweise ausgebildet

waren. Der Erwartungswert bei vollständiger Ausbildung beider Disulfidbrücken im Protein wäre eine Massendifferenz von 4 Da zwischen vollständig oxidiert und vollständig reduzierter Probe. Dieser Unterschied wurde bei der periplasmatischen und bei der cytoplasmatischen Präparation nach Reinigung unter Zugabe von Dithiodipyridin annähernd gefunden. Bei der einfachen cytoplasmatischen Präparation (Reinigung ohne Zugabe von Dithiodipyridin) könnte die Differenz von nur 2,4 Da auf eine unvollständige Ausbildung der Disulfidbrücken hindeuten, andererseits könnte auch die Kontrollprobe, die mittels Zusatz von DTT vor der Messung generiert wurde, unvollständig reduziert gewesen sein. Zur weiteren Klärung wurde die Methode des Peptidmassen-Fingerprintings nach tryptischem Verdau der Proteine angewandt (Abschnitt 3.2.2.1.2).

3.2.2.1.2 Peptidmassen-Fingerprint nach Trypsin-Verdau

Beim Peptidmassen-Fingerprint (Hustoft *et al.*, 2012) werden Proteine vorzugsweise mit der Protease Trypsin verdaut, welche nach den positiv geladenen Aminosäuren Arg und Lys schneidet. Die entstandenen Peptide werden anschließend durch LC-MS getrennt und die einzelnen Peptidmassen analysiert. Mittels dieser Methode sind durch Disulfidbindungen verbrückte Peptide eindeutig von den nicht-verbrückten Peptiden unterscheidbar (Lakbub *et al.*, 2018).

Beide CEX-Pools der cytoplasmatischen Proteinpräparationen von MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant wurden mittels Vivaspin 500 (10 kDa) auf 3,4 mg/ml für die einfache cytoplasmatische Präparation (ohne Zugabe von Dithiodipyridin während der Reinigung) bzw. auf 1,8 mg/ml für die unter Zugabe von Dithiodipyridin gereinigte Präparation konzentriert. Nach zweifacher Dialyse gegen 50 mM NH₄HCO₃ pH 7,6 wurden die Lösungen im Verhältnis von 50:1 (w/w) bzw. 45:1 (w/w) mit Trypsin (3 bzw. 2 µg) versetzt und bei 37 °C über Nacht verdaut. Die entstandenen Peptide wurden anschließend mittels *in line* Zorbax SB-C18 Säule (5 µm, 150 x 0,5 mm, Agilent) nach Hydrophobizität aufgetrennt, die Massen mittels ESI-MS (Agilent 6210 TOF Massenspektrometer) bestimmt und mit den theoretisch erwarteten Massen aus einem *In silico*-Verdau verglichen (Tabelle 9). Die Proben wurden in einer Sequenz analysiert.

Tabelle 9: *In silico*-Verdau von MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant. Die theoretisch erwarteten Massen (>500 Da) nach Trypsin-Verdau wurden mit der Software ExPASy PeptideMass berechnet, die vier Cysteinreste befinden sich in den Peptiden 3-624, 696-724, 636-643 und 747-756 und sind rot markiert. Die erwartete Masse für das große disulfidverbrückte Peptid (3-624+696-724) beträgt 55325,6 Da (55327,6-2,0 Da für eine Disulfidbindung). Die erwartete Masse für das kleine disulfidverbrückte Peptid (636-643+747-756) beträgt 2117,5 Da (2119,5-2,0 Da für eine Disulfidbindung).

Berechnete Masse	Aminosäurepositionen	Peptidsequenz
52023,7959	3-624	HHHHHHSSSA (SPAAPAPASPAAPAPSAPAA) ₃₀ CDLPQTHSLGSR
55325,6	3-624 +696-724	HHHHHHSSSA (SPAAPAPASPAAPAPSAPAA)₃₀CDLPQTHSLGSR +FYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTEPLMK
1076,3808	626-634	TLMLLAQMR
910,1394	636-643	ISLFS CLK
2117,5	636-643 +747-756	ISLFSCLK +YSPCAWEVVR
1955,0729	646-661	HDFGFPEEEFGNQFQK
2459,8860	662-682	AETIPVLHEMIQQIFNLFSTK
1450,5218	683-695	DSSAAWDETLDDK
3303,7898	696-724	FYTELYQQLNDLEAC VIQGVGVTEPLMK
1003,1174	725-733	EDSILAVEK
612,6861	734-737	YFQR
749,9487	738-743	ITLYLK
1209,3852	747-756	YSP CAWEVVR
618,7491	757-761	AEIMR
1124,2590	762-771	SFSLSTNLQK

Die erwarteten Massen für das verbrückte große Peptid (Positionen 3-624 und 696-724) mit 55325,6 Da und das verbrückte kleine Peptid (Positionen 636-643 und 747-756) mit 2117,5 Da wurden sowohl in der cytoplasmatischen Präparation, ohne Zugabe von Dithiodipyridin während der Reinigung, als auch in der Präparation, die unter Zugabe von Dithiodipyridin gereinigt wurde, mit 55328,5 Da bzw. 55328,2 Da und 2117,1 Da bzw. 2116,6 Da gefunden (Abbildung 26 (A)-(D)). Massen für die vier möglichen falsch verbrückten Peptide (3-624+636-643: 52931,9 Da; 3-624+747-756: 53231,2 Da; 696-724+636-643: 4211,9 Da; 696-724+747-756: 4511,2 Da) sowie die einzelnen unverbrückten Peptide (3-624: 52023,8 Da; 636-643: 910,1 Da; 696-724: 3303,8 Da; 747-756: 1209,4 Da) waren in beiden Proben nicht detektierbar.

In den Massenspektren des großen Peptids (Positionen 3-624 und 696-724) beider cytoplasmatischer Präparationen traten neben der erwarteten Masse auch kleinere Massen von 54827,7 Da (Abbildung 26 C) bzw. 54828,4 Da (Abbildung 26 D) auf. Diese Masse stimmt sehr gut mit einer C-terminal um die fünf Aminosäuren SLGSR verkürzten Variante des Peptids 3-624 überein (berechnete Masse: 51523,2 Da (Peptid 3-619)+3303,8 Da (Peptid 696-724)-2,0 Da (Ausbildung einer Disulfidbrücke) = 54825,0 Da). Diese Verkürzung ist durch ein fehlerhaftes Schneiden von Trypsin oder eine kontaminierende Protease nach Position His619 erklärbar, nicht jedoch durch eine inkorrekt ausgebildete Disulfidbrücke. Damit wurde belegt, dass in beiden cytoplasmatischen Proteinpräparationen die zwei Disulfidbrücken von MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant vollständig und korrekt ausgebildet waren. Die Reinigung unter Zusatz von Dithiodipyridin bot also keinen Vorteil gegenüber der einfachen Reinigung ohne Zusatz.

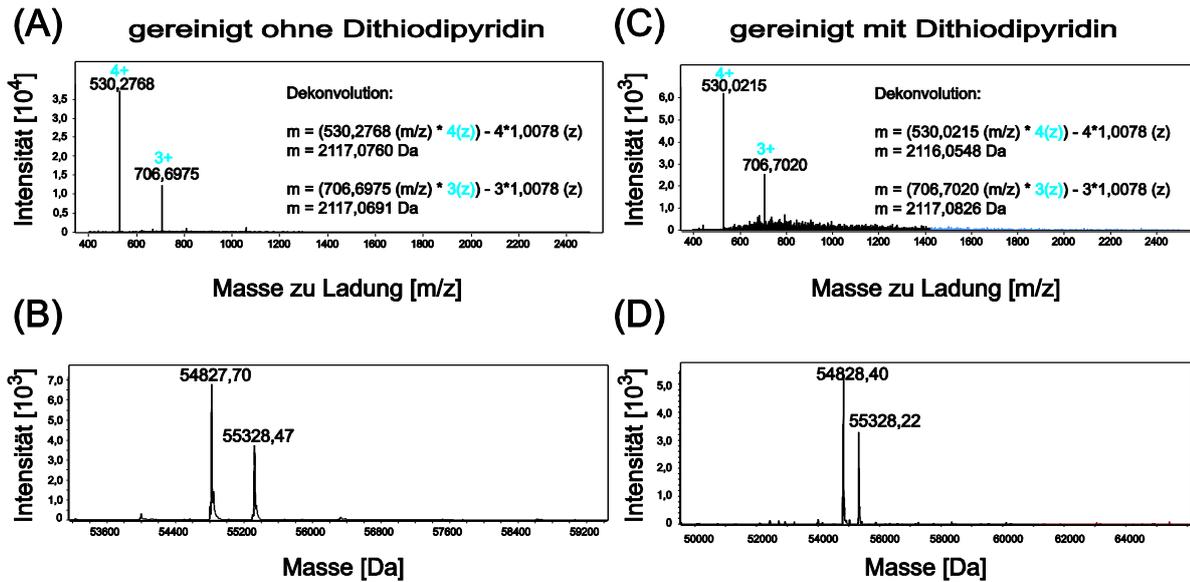


Abbildung 26: Massenspektren der zwei disulfidverbrückten Peptide in MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant (gereinigt ohne und mit Dithiodipyridin). In der einfachen Proteinpräparation (Reinigung ohne Zusatz von Dithiodipyridin) eluierten (A) die vierfach (530,2768 (m/z)) und dreifach (706,6975 (m/z)) geladene Molekülfragmente des kleineren disulfidverbrückten Peptids (berechnete Masse: 2117,5 Da) zwischen 16,026 und 16,077 min und (B) das größere disulfidverbrückte Peptid mit einer Masse von 55328,47 Da (berechnete Masse: 55327,60 Da) zwischen 19,116 und 20,095 min. In der Proteinpräparation, die nach Zusatz von Dithiodipyridin gereinigt wurde, eluierten (C) die vierfach (530,0215 (m/z)) und dreifach (706,7020 (m/z)) geladene Molekülfragmente des kleineren disulfidverbrückten Peptids zwischen 16,081 und 16,098 min und (D) das größere disulfidverbrückte Peptid mit einer Masse von 55328,2 zwischen 17,735 und 19,255 min.

3.2.2.2 Hydrodynamische Charakterisierung

Um auch für den PASylierten IFN-Antagonisten den vergrößernden Effekt des PAS-Polymers auf das hydrodynamische Volumen zu untersuchen, wurde sowohl für das periplasmatisch produzierte ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant als auch für das cytoplasmatisch produzierte MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant (Reinigung ohne Zugabe von Dithiodipyridin) die jeweilige apparente Molekülmasse mittels SEC (Abschnitt 2.7.1.5) und DLS (Abschnitt 2.9.4) bestimmt.

Die analytische SEC wurde mit beiden Proteinpräparationen an einer Superdex 200 10/300 GL-Säule mit 24 ml Bettvolumen in PBS als Laufpuffer durchgeführt (Abbildung 27). Zur Bestimmung der apparenten Molekülmassen war die Säule mit einer Reihe von Standardproteinen kalibriert worden (Abschnitt 3.1.2.1).

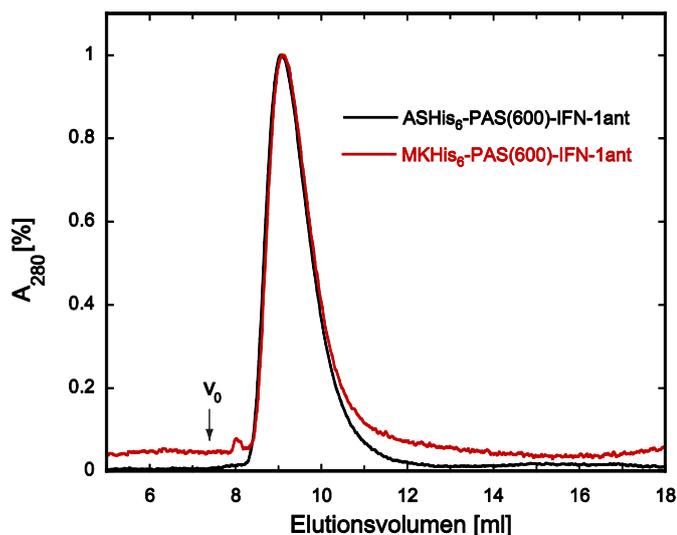


Abbildung 27: SEC-Profile von ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant (periplasmatisch) und MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant (cytoplasmatisch) an Superdex 200 10/300 GL. Das Probenvolumen betrug jeweils 225 µl bei einer Konzentration von 0,25 mg/ml. Das SEC-Ausschlussvolumen $V_0 = 7,53$ ml ist markiert (Bettvolumen: 24 ml). Beide Varianten des PASylierten IFN-Antagonisten weisen ein vergleichbar geringes Elutionsvolumen auf.

Die PASylierten Proteine wiesen mit 681 kDa für das periplasmatisch produzierte ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant und 666 kDa für das cytoplasmatisch produzierte MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant deutlich größere apparente Molekülmassen auf als die jeweiligen berechneten Molekülmassen von 70,3 kDa bzw. 70,2 kDa (Tabelle 10).

Tabelle 10. Übersicht über die apparenten Molekülmassen des PASylierten Interferon-Antagonisten anhand von SEC und DLS. Die apparenten Molekülmassen wurden anhand der durch SEC bestimmten Elutionsvolumina (V_e) und der durch DLS bestimmten hydrodynamischen Radien (r_H) berechnet. Die starke Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens durch das ungeordnete PAS#1(600)-Polymer wird anhand des Verhältnisses von apparenter zu theoretischer Molekülmasse aufgezeigt.

Protein	M_{theor}^a [kDa]	SEC			DLS		
		V_e [ml]	M_{app}^b [kDa]	Faktor $M_{\text{app}}/M_{\text{theor}}$	r_H [nm]	M_{app}^c [kDa]	Faktor $M_{\text{app}}/M_{\text{theor}}$
ASHis ₆ -PAS(600)-IFN-1ant	70,3	9,08	681	9,7	14,3	1700	24,2
MKHis ₆ -PAS(600)-IFN-1ant	70,2	9,13	666	9,5	15,1	1931	27,5

^a Theoretische Molekülmasse des oxidierten Proteins, berechnet mit Hilfe des Programms ProtParam (www.expasy.org)

^b Apparente Molekülmasse, berechnet aus den SEC-Elutionsvolumina und einer Kalibriergeraden mit globulären Standardproteinen

^c Apparente Molekülmasse, berechnet aus den hydrodynamischen Radien (r_H) mit Hilfe der DLS-Software

Als unabhängige Methode zur Bestimmung der apparenten Molekülmasse wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS, Abschnitt 2.9.4) der hydrodynamische Radius von ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant und MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant ermittelt. Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung an einem Zetasizer Nano-S-Gerät bei einer Konzentration von 0,4–0,5 mg/ml in CD / DLS-Puffer (5 mM KPi pH 7,5, 50 mM K₂SO₄) bei 25 °C. Mit Hilfe der Zetasizer Software wurden daraus die apparenten Molekülmassen der Proteine berechnet. Es ergaben sich hydrodynamische Radien von 14,3 nm für das periplasmatisch produzierte Protein ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant und 15,1 nm für das cytoplasmatisch produzierte Protein MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant; dies entspricht apparenten Molekülmassen von 1700 kDa bzw. 1931 kDa (Tabelle 10).

Um den Einfluss der PAS-Sequenz auf das hydrodynamische Volumen zu quantifizieren und die Ergebnisse der beiden analytischen Methoden SEC und DLS miteinander zu vergleichen, wurde für jedes Protein und für beide Methoden das Verhältnis von apparanter zu theoretischer Molekülmasse berechnet (= Vergrößerungsfaktor M_{app}/M_{theor} , Tabelle 10).

Während in der SEC Vergrößerungsfaktoren von 9,7 für ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant bzw. 9,5 für MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant bestimmt wurden und damit vergleichbar zu den Ergebnissen für die PAS(600)-Varianten von IFN- α 2b und des Superagonisten YNS α 8 (Abschnitt 3.1.2.1) waren, ergaben sich aus den DLS-Messungen deutlich größere Faktoren von 24,2 für ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant und 27,5 für MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant. Im Vergleich dazu lagen die hydrodynamischen Radien für die PAS(600)-Varianten von IFN- α 2b und YNS α 8 bei ca. 10 nm (Abschnitt 3.1.2.1), die dazugehörigen Vergrößerungsfaktoren lagen im Bereich von 10 bzw. 11 und waren damit deutlich kleiner. Ein solcher größerer hydrodynamischer Radius ließe sich theoretisch durch eine stärker gestreckte Konformation des PASylierten Antagonisten im Vergleich zum PASylierten IFN- α 2b und PASylierten Superagonisten erklären. Eine solche Änderung in der Konformation könnte sich möglicherweise aus den Mutationen im IFN-Teil des PASylierten Antagonisten gegenüber dem Ausgangsprotein IFN- α 2b ergeben. Andererseits reagiert die DLS-Messung sensitiver auf verschiedene Messeinflüsse als die SEC; es könnte sich bei dem gemessenen Unterschied also auch um eine Messgenauigkeit handeln. Eine signifikante Diskrepanz zwischen SEC und DLS-Messung hatte sich bei dem nicht PASylierten IFN- α 2b ebenfalls gezeigt (Abschnitt 3.1.2.1).

3.2.2.3 Bindungsstudien mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie

Die Bindungsaffinität- und -kinetik des periplasmatisch produzierten ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant und des cytoplasmatisch produzierten MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant gegenüber der Rezeptoruntereinheit IFNAR2 wurde mittels SPR (Abschnitt 2.9.2) bestimmt und mit Literaturdaten des nicht PASylierten Interferon-Antagonisten verglichen. Die Experimente wurden analog zu den vorangegangenen Bindungsstudien mit dem IFN-Superagonisten His₆-PAS(600)-YNS α 8 durchgeführt und ausgewertet (siehe Abschnitt 3.1.2.2).

Da die Firma XanTec die Oberfläche des initial verwendeten CMDP-*Sensorchips* modifiziert hat und so die ursprünglichen Kopplungsausbeuten nicht mehr erreicht werden konnten, wurde abweichend davon diesmal ein CM3-*Sensorchip* von GE Healthcare verwendet, wobei 150 Δ RU des Liganden IFNAR2-Fc immobilisiert wurde (Abbildung 28). Der CM3-*Sensorchip* besitzt eine dickere Dextranmatrix (30-40 nm) als der CMDP-*Sensorchip* (<5 nm), was höhere Kopplungsausbeuten ermöglicht. Die Matrix ist aber trotzdem dünn genug um Diffusionslimitierungen bei der Kinetikmessung großer Analyten zu minimieren.

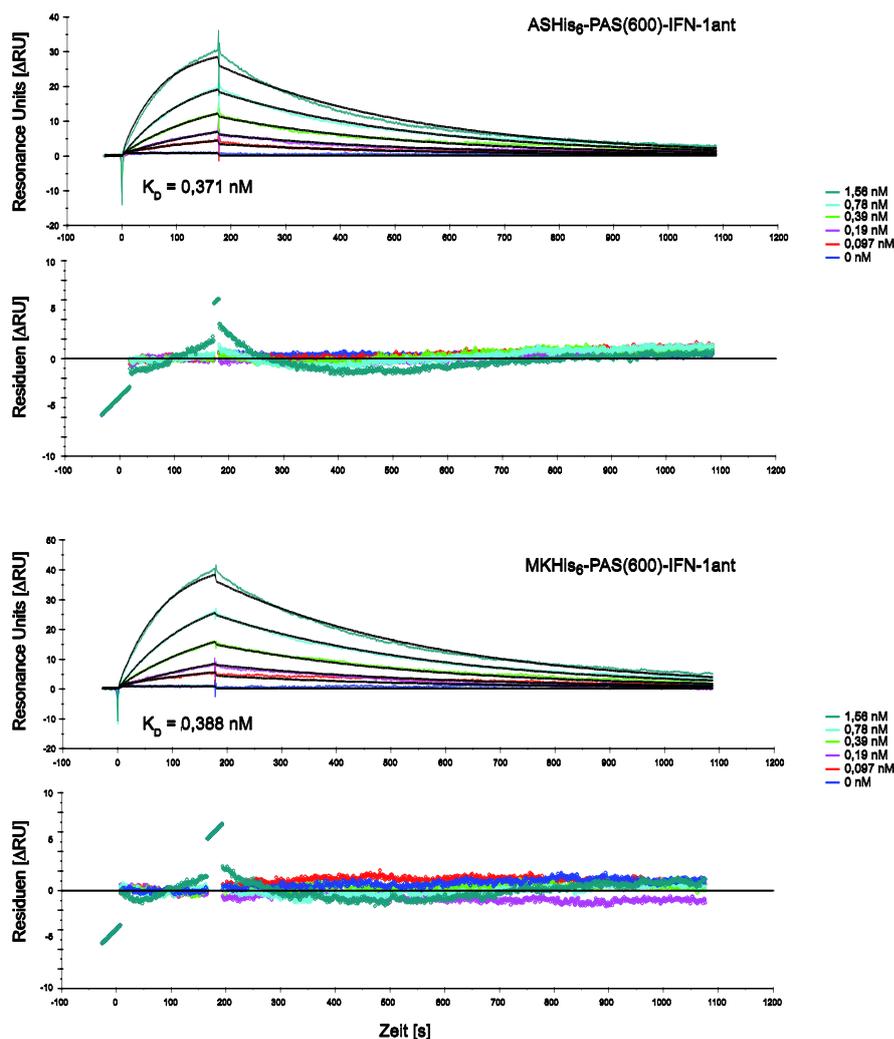


Abbildung 28: Messung der Bindungskinetik von ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant und MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant durch Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie. Ein mit IFNAR2-Fc ($\Delta\text{RU} = 150$) beladener Carboxymethyl-dextran-Sensorchip (CM3; GE Healthcare) wurde mit PBST-0,05 (PBS mit 0,05 (v/v) % Tween 20) äquilibriert und anschließend der Analyt in einem Probenvolumen von 75 μl bei konstantem Fluss von 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Zur Ermittlung der kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} der PASylierten Interferon-Antagonisten wurde eine Konzentrationsreihe von 0,097 bis 1,56 nM gemessen. Vor jeder neuen Messung wurde die vollständige Dissoziation des Analyten abgewartet. Die individuell von unspezifischen Signalanteilen bereinigten Sensorgramme für einzelne Konzentrationen wurden überlagert, global an das 1:1 Bindungsmodell nach Langmuir angepasst (schwarze Linien) und so die Dissoziationskonstante K_D bestimmt. Der Residuen-Plot bildet die Differenz aus experimentell erhobenen und berechneten Verläufen ab.

Die K_D -Werte wurden als 0,371 nM für das periplasmatisch produzierte ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant und als 0,388 nM für das cytoplasmatisch produzierte MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant bestimmt (Tabelle 11) und waren damit innerhalb der Messgenauigkeit identisch. Diese Ergebnisse lagen nur geringfügig höher (um den Faktor 1,3 bis 1,4) als der in der Literatur beschriebene Wert von 0,28 nM für den nicht PASylierten Antagonisten IFN-1ant (Pan *et al.*, 2008).

Tabelle 11: Zusammenfassung der kinetischen Konstanten für die Bindung PASylierter und nicht PASylierter Interferon-Antagonisten zu IFNAR2.

Protein	$k_{on} [10^6 M^{-1} s^{-1}]$	$k_{off} [10^{-3} s^{-1}]$	$K_D [nM]$
ASHis ₆ -PAS(600)-IFN-1ant	7,44 ± 0,06	2,76 ± 0,01	0,371 ± 0,003
MKHis ₆ -PAS(600)-IFN-1ant	6,37 ± 0,05	2,48 ± 0,01	0,388 ± 0,003
120E-8CTail („IFN-1ant“)	---	---	0,28

^a (Pan *et al.*, 2008)

Folglich hat die PASylierung keinen nennenswerten Einfluss auf die Bindungsaktivität des Interferon-Antagonisten. Außerdem wiesen die periplasmatisch und die cytoplasmatisch produzierte Proteinpräparation identische Bindungseigenschaften auf und waren somit gleichermaßen für weitere PK/PD-Experimente geeignet.

3.2.3 Pharmakokinetische Charakterisierung

Die Pharmakokinetik des PASylierten Interferon-Antagonisten wurde durch das *Human Immunology Section/Vaccine Research Center*, NIH der USA, in Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) untersucht, wobei das periplasmatisch produzierte ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant eingesetzt wurde (Abschnitt 2.10.3). Zum Vergleich wurde das nicht PASylierte Protein IFN-1ant vom Weizmann-Institut für Wissenschaften, Israel, zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse der Pharmakokinetikstudie wurden mit Hilfe der PK/PD-Modellierungs-Software WinNonlin am Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München, ausgewertet.

Die ermittelten Plasma-Halbwertszeiten lagen für das nicht PASylierte IFN-1ant bei $6,06 \pm 0,74$ h und für das PASylierte ASHis₆-PAS#1(600)-IFN-1ant bei $19,4 \pm 2,6$ h. Somit war die Plasma-Halbwertszeit für das PASylierte Protein um den Faktor 3,2 länger als für das nicht PASylierte Protein (Nganou-Makamdop *et al.*, 2018). Für die klinische Wirksamkeit bedeutsamer als die Plasma-Halbwertszeit ist jedoch die *Area Under the Curve* (AUC). Die AUC war für das PASylierte IFN-1ant Protein mit 2871 ± 219 h x nM sogar um den Faktor 70 größer als die des nicht PASylierten Proteins mit $41,2 \pm 3,5$ h x nM.

3.3 PASyliertes OmCI zur Behandlung von PNH

Ein weiterer Wirkstoffkandidat, der im Rahmen dieser Arbeit durch PASylierung modifiziert werden sollte, war der C5-spezifische Komplement-Inhibitor OmCI (Nunn *et al.*, 2005). Unter der Bezeichnung Coversin befindet sich eine rekombinante Version von OmCI als Alternative zu dem Antikörper Eculizumab für die Behandlung der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) in klinischer Entwicklung (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03427060>). OmCI bindet ein anderes Epitop des Zielmoleküls C5 als der Antikörper und erlaubt somit auch eine Behandlung von Patienten, die aufgrund eines natürlichen Polymorphismus im C5-Gen nicht auf die Behandlung mit Eculizumab ansprechen (Nishimura *et al.*, 2014).

Die Plasma-Halbwertszeit von ungebundenem OmCI (ca. 17 kDa) wurde in Mäusen mit ca. 30 min bestimmt (Hepburn *et al.*, 2007); dies ist deutlich kürzer als die durchschnittliche Plasma-Halbwertszeit von 6–8 Tagen für IgG-Antikörper (ca. 150 kDa) (Vieira & Rajewsky, 1988). Daher sollte nun durch PASylierung von rekombinantem OmCI eine deutliche Verlängerung seiner Plasma-Halbwertszeit erreicht werden. Als Expressionsorganismen wurden einerseits *P. pastoris* (Abschnitt 3.3.1) und andererseits *E. coli* (Abschnitt 3.3.2) verwendet. Die finale Proteinpräparation aus *E. coli* wurde schließlich für die umfassende biophysikalische und funktionelle Charakterisierung (Abschnitt 3.3.3) sowie für eine pharmakokinetische Studie in BALB/c Mäusen (Abschnitt 3.3.4) verwendet.

Zu Beginn dieser Arbeit war die heterologe Produktion von OmCI bereits mit dem Expressionsorganismus *Pichia methanolica* beschrieben worden (Nunn *et al.*, 2005). Da dort eine unerwünschte Hyperglycosylierung des natürlicherweise nicht glycosylierten Proteins auftrat, wurden die beiden Asparagin-Reste an den Positionen 60 und 84 zu Glutamin-Resten mutiert; die entsprechende Proteinpräparation aus *P. methanolica* wurde als pOmCI bezeichnet (Hepburn *et al.*, 2007). In zellbasierten Komplement-Inhibitionsassays konnte für dieses rekombinante OmCI eine vergleichbare biologische Aktivität wie für das native Protein aus der Zecke gezeigt werden (Nunn *et al.*, 2005). Für pOmCI wurde gegenüber dem humanen Bindungspartner C5 mittels SPR stabile Komplexbildung mit einer sehr niedrigen K_D von 18,5 nM bestimmt (Hepburn *et al.*, 2007). Für pOmCI wurde außerdem die Kristallstruktur ermittelt und anhand dieser ein Modell für die Bindung von C5 postuliert (Roversi *et al.*, 2007).

In ersten Versuchen zur gentechnischen Herstellung von PASylierten OmCI-Varianten im hiesigen Kontext wurde in einer Bachelorarbeit (Plescher, 2012) zunächst dessen Expression im Periplasma von *E. coli* evaluiert. Diese Strategie war für andere Lipocaline mit strukturellen Disulfidbrücken, einschließlich Anticalinen, bereits etabliert (Breustedt *et al.*, 2006) und umging mit dem bakteriellen Wirtsorganismus das Problem der unerwünschten Glycosylierung. Für die PASylierte Variante wurde aufgrund des Bindungsmodells mit C5

(Roversi *et al.*, 2007) zunächst eine C-terminale Fusion mit dem PAS(200)-Polymer gewählt. Die Gensequenz für OmCI wurde für die Condonverwendung in *E. coli* optimiert und zur Affinitätsreinigung wurde bei beiden Proteinen ein C-terminales His₆-tag angefügt. Hierbei zeigte sich allerdings, dass die Expression von OmCI-His₆ bzw. PASyliertem OmCI-PAS(200)-His₆ in *E. coli* KS272 und JM83 zur Lyse der Zellen führt und nennenswerte Mengen lösliches Protein konnten – selbst unter Koexpression von pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006) - hier jedoch nicht hergestellt werden.

In weiteren Versuchen wurde daher in einer Masterarbeit (Kammerer, 2013) ein eukaryotisches Expressionssystem mit HEK293-Zellen etabliert. Die PASylierte Variante trug diesmal ein C-terminales PAS(600)-Polymer. In der HEK293 Suspensionskultur ließen sich OmCI-His₆ und OmCI-PAS(600)-His₆ mit guten Ausbeuten (17 mg/l bzw. 9-27 mg/l) herstellen. Beide Proteine wurden daraufhin durch IMAC in Verbindung mit AEX und SEC gereinigt. Mittels ESI-MS konnte gezeigt werden, dass OmCI in HEK293-Zellen durch N-Glycosylierung modifiziert wurde, was die Charakterisierung der Proteinpräparation erschwerte. Die Affinität von OmCI aus HEK293 gegenüber dem humanen C5-Protein wurde mittels SPR bestimmt und lag mit 2,8 nM nahe am Literaturwert des rekombinanten pOmCI (18,5 nM; Hepburn *et al.*, 2007). Auch das C-terminal PASylierte OmCI wies eine hohe Affinität gegenüber C5 auf, die jedoch mit 52,4 nM (Kammerer, 2013) um etwa einen Faktor 20 niedriger lag als die des nicht modifizierten OmCI. In einem zellbasierten Hämolyse-Assay zur Inhibition des klassischen Wegs der Komplementaktivierung wurde die biologische Aktivität der beiden Varianten aus HEK293 untersucht. Hier war die inhibierende Wirkung des C-terminal PASylierten OmCI dagegen nur um den Faktor 2 schlechter als die des nicht modifizierten OmCI (Kammerer, 2013).

Aufgrund dieser Befunde wurde im nächsten Schritt die präparative Herstellung von PASyliertem OmCI in Hefe als Expressionsorganismus untersucht, um (i) unter Verwendung der veröffentlichten pOmCI-Mutante eine unerwünschte N-Glycosylierung zu umgehen und (ii) in einem wohl etablierten und günstigen Expressionssystem hohe Ausbeuten (Weinacker *et al.*, 2013) zu erreichen.

3.3.1 Gentechnische Herstellung in *P. pastoris* und Reinigung

3.3.1.1 Plasmidkonstruktion für die sekretorische Produktion in *P. pastoris*

Da in HEK293-Zellen bereits gezeigt werden konnte, dass das C-terminal PASylierte OmCI mit dem His₆-tag gegenüber C5 inhibitorisch aktiv ist, sollte dasselbe Fusionsprotein zunächst auch in Hefe hergestellt werden. Als Expressionsstamm wurde im Rahmen einer Kooperation mit der XL-protein GmbH und der VTU Technology GmbH die Hefe *P. pastoris* in Form eines proprietären Expressionssystems verwendet, welches besonders hohe Ausbeuten von bis

zu 25 g/l versprach; hierzu wurde die Gensequenz für die sekretorische Produktion in Hefe angepasst (Weis & Purkarthofer, 2013).

Das Expressionssystem von VTU Technology umfasst einen optimierten Hefestamm, entsprechende Plasmide für die stabile Transformation und optimierte Kulturbedingungen. *P. pastoris* ist ein methylother Organismus, der ausschließlich Methanol als Kohlenstoffquelle im Metabolismus nutzt. In dem proprietären Expressionssystem wird für die heterologe Genexpression rekombinanter Proteine der methanol-induzierbare Promotor des AOX1-Gens verwendet. Dieses ist Bestandteil des physiologischen Methanolmetabolismus von *P. pastoris* und kodiert für eine Alkoholoxidase, die Methanol unter der Verwendung von molekularem Sauerstoff zu Formaldehyd umsetzt (Krainer *et al.*, 2012). In den für die Transformation (in diesem Fall durch Elektroporation) verwendeten Plasmiden sind die Nukleotidsequenzen für den AOX1-Promotor und für das heterologe Protein durch spezifische Erkennungssequenzen für das Enzym Flippase (Flp) Rekombinase (FRT-Sequenzen) flankiert. Unter Einsatz der Flp Rekombinase wird der so markierte Sequenzabschnitt ortsspezifisch in das *Pichia*-Genom inseriert. Positive Klone werden durch Zeocin selektiert (Weis & Purkarthofer, 2013).

Für die Expression von pOmCI und dem C-terminal PASylierten pOmCI in dieser Hefe, unter Verwendung eines C-terminalen His₆-tags zur Affinitätsreinigung, waren entsprechende Klonierungsvektoren zuvor durch XL-protein GmbH konstruiert worden. Hierfür wurde ein rekombinantes OmCI-Gen synthetisiert, das auf der natürlichen Gensequenz aus *Ornithodoros moubata* (UniProt-ID: Q5YD59; Positionen 19–168) basierte, jedoch durch folgende Veränderungen für die PASylierung und Expression in *P. pastoris* optimiert worden war: (i) der Genabschnitt für die Aminosäuren 1–18, die in der Zecke als Signalsequenz für die Sekretion in den Speichel fungieren, wurde entfernt; (ii) ein durch das Expressionssystem vorgegebener Genabschnitt, der einen Teil der α -Faktor Signalsequenz aus *S. cerevisiae* (Lin-Cereghino *et al.*, 2013) für die sekretorische Expression in *P. pastoris* und eine *XhoI*-Restriktionsschnittstelle für die Subklonierung auf den proprietären Expressionsvektor enthält, wurde N-terminal vorangestellt; (iii) ein Genabschnitt, der für einen SerSerAla-Linker und das His₆-Affinitätsanhängsel kodiert und der eine *SapI*-Restriktionsschnittstelle für die Insertion einer PAS-Genkassette sowie eine C-terminale *NotI*-Restriktionsschnittstelle für die Subklonierung des Gens enthält, wurde hinter dem terminalen Cys-Codon des OmCI-Gens angefügt; (iv) die Asn-Reste an Positionen 78 und 102 wurden durch Gln-Reste ausgetauscht, um eine Hyperglycosylierung zu verhindern (Nunn *et al.*, 2005; Roversi *et al.*, 2007); (v) der GC-Gehalt und die Nukleotidsequenz wurden mittels der GeneArt GeneOptimizer Software (Fath *et al.*, 2011) für eine effiziente Expression in *P. pastoris* optimiert (Abbildung 29).

*Xho*I

361 AGGCCACGTGTCTTGTCCAGAGCTCCTCGAGAAGAGAGACTCTGAATCCGACTGTACTGG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 TCCGGTGCACAGAACAGGTCTCGAGGAGCTTCTCTCTGAGACTTAGGCTGACATGACC
 LeuGluLysArgAspSerGluSerAspCysThrGly -
 α-Faktor SS 1

421 TTCTGAGCCAGTTGATGCTTTCCAAGCTTTCTCCGAAGGTAAAGAGGCTTACGTTTTTGGT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 AAGACTCGGTCAACTACGAAAGGTTGAAAGAGGCTTCCATTTCTCCGAATGCAAACCA
 SerGluProValAspAlaPheGlnAlaPheSerGluGlyLysGluAlaTyrValLeuVal -
 10 20

481 TAGATCCACTGACCCAAAGGCTAGAGACTGTTTGAAGGGTGAACCTGCTGGTGAGAAGCA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 ATCTAGGTGACTGGGTTTCCGATCTCTGACAAACTTCCCACTGGACGACCCTCTTCGT
 ArgSerThrAspProLysAlaArgAspCysLeuLysGlyGluProAlaGlyGluLysGln -
 30 40

541 GGATAACACTTTGCCAGTTATGATGACTTTCAAGCAGGGTACTGACTGGGCTTCCACTGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 CCTATTGTGAAACGGTCAATACTACTGAAAGTTCGTCATGACTGACCCGAAGGTGACT
 AspAsnThrLeuProValMetMetThrPheLysGlnGlyThrAspTrpAlaSerThrAsp -
 50 60

601 TTGGACTTTCACTTTGACGGTGCTAAGGTTACTGCTACTTTGGGACAGTTGACTCAGAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 AACCTGAAAGTGAAACCTGCCACGATTCCAATGACGATGAAACCCCTGTCAACTGAGTCTT
 TrpThrPheThrLeuAspGlyAlaLysValThrAlaThrLeuGlyGlnLeuThrGlnAsn -
 70 80

661 CAGAGAGGTTGTTTACGACTCCCAATCTCACCCTGTCACGTTGACAAGGTTGAGAAAGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
 GTCTCTCCAACAAATGCTGAGGGTTAGAGTGGTGACAGTGCAACTGTCCAACCTTTTCT
 ArgGluValValTyrAspSerGlnSerHisHisCysHisValAspLysValGluLysGlu -
 90 100

721 GGTCCAGACTACGAGATGTGGATGTTGGATGCTGGTGGTTTGGAGTTGAGTTGAGTG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
 CCAAGGTCTGATGCTTACACCTACAACCTACGACCACCAAACCTTCAACTCCAACCTCAC
 ValProAspTyrGluMetTrpMetLeuAspAlaGlyGlyLeuGluValGluValGluCys -
 110 120

781 TTGTAGACAGAAGTTGGAAGAGTTGGCTTCCGGTAGAAACCAGATGTACCCACACTTGAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 AACATCTGTCTTCAACCTTCTCAACCGAAGGCCATCTTTGGTCTACATGGGTGTGAACTT
 CysArgGlnLysLeuGluGluLeuAlaSerGlyArgAsnGlnMetTyrProHisLeuLys -
 130 140

*Sap*I *Not*I

841 GGATTGCTCTTCTGCCATCATCACCATCACCCTAATAGCGGCCGCGGTACCTGGAGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
 CCTAACGAGAAGACGGGTAGTAGTGGTAGTGGTATTATCCGCCGCGCCATGGACCTCG
 AspCysSerSerAlaHisHisHisHisHisHisEnd
 150 His6-tag → 159

Abbildung 29: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des pOmCI Gens in pMA-OmCI-His₆. Die Aminosäuresequenz des rekombinanten pOmCI nach Abspaltung der α-Faktor-Signalsequenz ist grau hinterlegt, das Hexahistidinanhängsel ist türkis hervorgehoben. Der Start der nativen pOmCI Aminosäuresequenz ist durch Unterstreichung hervorgehoben. Mutierte Gln-Reste an Positionen 60 und 84 sind gelb hinterlegt. Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen, die Schnittstelle von *Sap*I ist rot eingezeichnet.

Das derart optimierte Gen wurde durch GeneArt/Thermo Fisher Scientific synthetisiert und in dem Klonierungsvektor pMA-pOmCI-His₆ zur Verfügung gestellt (Abbildung 30A).

Für die PASylierte Variante von pOmCI wurde durch XL-protein GmbH in einem weiteren Schritt in die singuläre SapI-Restriktionsschnittstelle eine PAS#1.7(600)-Genkassette inseriert. Die verwendete PAS#1.7(200)-Genkassette (Binder & Skerra, 2017) war hinsichtlich Repetitivität und Condonverwendung für eine Expression in *Pichia* optimiert worden und stammte aus dem Vektor pXL1-PAS#1.7(200); der erhaltene Klonierungsvektor wurde als pMA-pOmCI-PAS#1.7(600)-His₆ bezeichnet (Abbildung 30B).

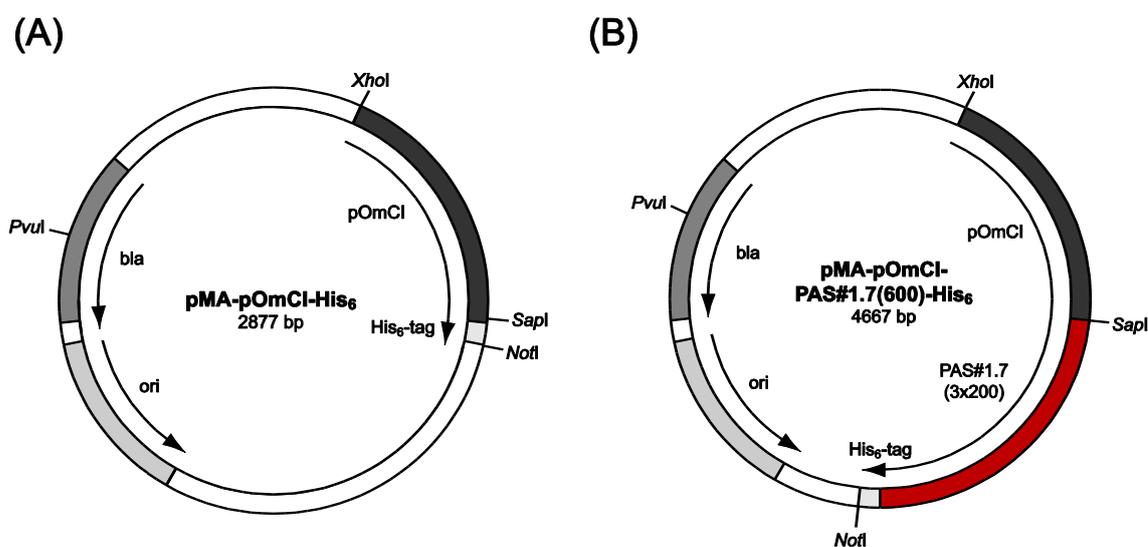


Abbildung 30. Schematische Darstellung der Klonierungsvektoren pMA-pOmCI-His₆ und pMA-pOmCI-PAS#1.7(600)-His₆. Singuläre Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet.

Beide Plasmide wurden an VTU Technology GmbH übergeben, wo die weitere Subklonierung, Transfektion und die sekretorische Produktion von pOmCI-His₆ und PASyliertem pOmCI-PAS(600)-His₆ in *P. pastoris* in Bioreaktoren mit einem Kulturvolumen von ~ 300 ml erfolgte. Die Genexpression wurde durch Zugabe von Methanol gestartet; nach 73 Stunden erfolgte die Ernte des Kulturüberstands durch Filtration. Dieser wurde bei -80 °C eingefroren und zur Verfügung gestellt. Beide Proteine konnten in hoher Ausbeute hergestellt werden (Produktion nicht gezeigt). Die anschließende Reinigung erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit für pOmCI-His₆ mittels AEX und SEC und für pOmCI-PAS(600)-His₆ mittels CEX, AEX und SEC (Abbildung 31).

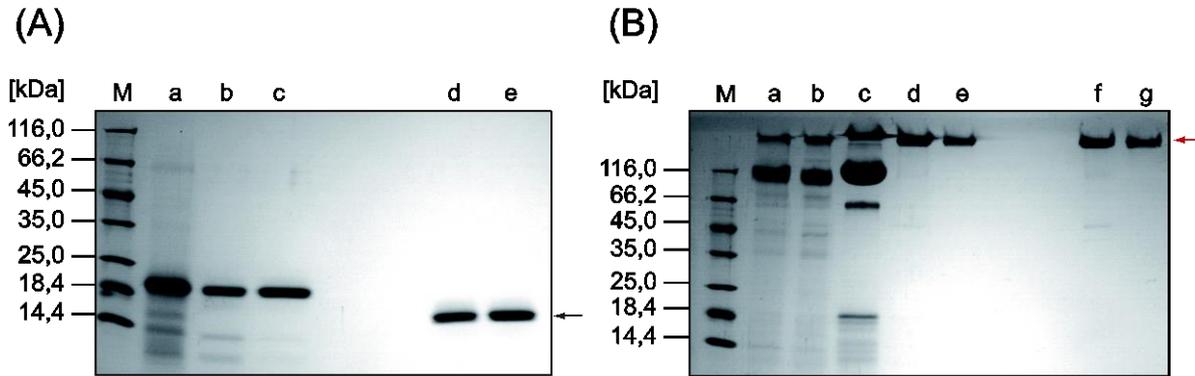


Abbildung 31: Zusammenfassende SDS-PAGE-Analyse aller Reinigungsschritte von pOmCI-His₆ und pOmCI-PAS(600)-His₆. pOmCI-His₆ und pOmCI-PAS(600)-His₆ sind mit Pfeilen gekennzeichnet, M: Proteinmarker. (A) pOmCI-His₆; a: Zellkulturüberstand, b: AEX-Eluat, c: SEC-Eluat (reduzierende Bedingungen), d: AEX-Eluat; e: SEC-Eluat (nicht-reduzierende Bedingungen). (B) pOmCI-PAS(600)-His₆; a: Zellkulturüberstand, b: CEX-Durchlauf-/Waschfraktion, c: CEX-Eluat, d: AEX-Eluat, e: SEC-Eluat (reduzierende Bedingungen), f: AEX-Eluat; e: SEC-Eluat (nicht-reduzierende Bedingungen).

Allerdings war das C-terminale His₆-tag der gereinigten pOmCI-His₆ Probe teilweise um drei Histidine abgebaut (Abbildung 32). Möglicherweise führte diese Heterogenität zu Problemen bei der ESI-MS-Analytik der PASylierten Probe, für diese keine auswertbaren Massendaten erhalten werden konnten.

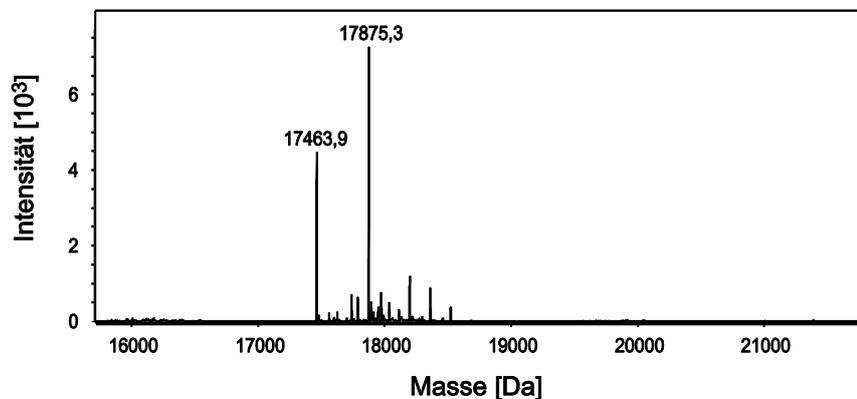


Abbildung 32: Dekonvolviertes ESI-MS-Spektrum von pOmCI-His₆. Die berechnete Masse von 17875,7 Da (ExPASy ProtParam unter Abzug von 6 av für die drei Disulfidbindungen) konnte im Rahmen der Messgenauigkeit bestätigt werden (detektierte Masse: 17875,3 Da). Es trat noch ein zweiter Peak (detektierte Masse: 17463,9) auf, der sich durch die Abspaltung von drei Histidinen (berechnete Masse unter Abzug von 6 av für die drei Disulfidbindungen: 17464,3 Da) erklären lässt.

Um zu untersuchen, ob die Bindungsaktivität durch die Position des PAS-Polymers beeinflusst wird, wurde daraufhin ein Genkonstrukt für die N-terminale Fusion der PAS-Sequenz hergestellt (PAS(600)-pOmCI). Da eine IMAC der bereits reinen Zellkulturüberstände nicht notwendig war, wurde dabei das His₆-tag entfernt und entsprechende Genkonstrukte auch für pOmCI und die C-terminale Fusion der PAS-Sequenz erstellt (pOmCI-PAS(600)).

Zur Konstruktion der Klonierungsvektoren für diese drei Proteinvarianten wurden ausgehend von dem Plasmid pMA-pOmCI-His₆ durch PCR-Amplifizierung mit geeigneten *Primern* folgende Veränderungen in der Gensequenz vorgenommen (Abbildung 33): (i) für das Konstrukt zur Expression von pOmCI wurde durch Verwendung des *Reverse-Primers* OmCI-RevV2 am 3'-Ende die Sequenz für das C-terminale His₆-tag sowie der vorangestellte SerSerAla-Linker mit der *SapI*-Restriktionsschnittstelle entfernt, als *Forward-Primer* diente pMA-For; (ii) für das Konstrukt zur Expression von pOmCI-PAS(600) wurde durch die Verwendung des *Reverse-Primers* OmCI-RevV3 am 3'-Ende die Sequenz für das C-terminale His₆-tag sowie der vorangestellte SerSerAla-Linker mit der *SapI*-Restriktionsschnittstelle entfernt, gleichzeitig wurde am 3'-Ende eine neue *SapI*-Restriktionsschnittstelle in umgekehrter Orientierung eingefügt, als *Forward-Primer* diente pMA-For; (iii) für das Konstrukt zur Expression von PAS(600)-pOmCI wurde durch Verwendung des *Forward-Primers* OmCI-ForV2 am 5'-Ende die Sequenz für den N-terminalen SerSerAla-Linker mit der *SapI*-Restriktionsschnittstelle entfernt; als *Reverse-Primer* wurde dabei OmCI-RevV2 verwendet, wodurch am 3'-Ende die Sequenz für das C-terminale His₆-tag sowie der vorangestellte SerSerAla-Linker mit der *SapI*-Restriktionsschnittstelle entfernt wurde.

Die erhaltenen PCR-Fragmente (pOmCI: 469 bp, SapI-pOmCI: 481 bp, pOmCI-SapI: 472 bp) wurden über *XhoI* und *NotI* in das pMA-Vektorrückgrat (pMA-OmCI-His₆) inseriert (Abbildung 34), woraufhin die Plasmide pMA-pOmCI, pMA-SapI-pOmCI und pMA-pOmCI-SapI erhalten wurden.

Mittels analytischem Restriktionsverdau und Sequenzierreaktion unter Verwendung des *Primers* pMA-For wurden die konstruierten Plasmide überprüft. Zur Generierung der Vektoren pMA-PAS#1.7(600)-pOmCI und pMA-pOmCI-PAS#1.7(600) für die Produktion der N-terminal bzw. C-terminal PASylierten Varianten wurde durch Verdau des Vektors pXL1-PAS#1.7(200) mit *EarI* zunächst eine PAS#1.7-Genkassette mit 600 bp isoliert, die für 200 Aminosäuren der PAS#1-Sequenz kodierte. Diese wurde anschließend in das zuvor mit *SapI* verdaute und dephosphorylierte Vektorrückgrat von pMA-SapI-pOmCI und pMA-pOmCI-SapI inseriert.

(A) *Forward-Primer* für die Klonierung von pMA-pOmCI und pMA-pOmCI-SapI:

pMA-For 5'-ACGACTCACTATAGGGCG-3'

```

ACGGCCAGTGAGCGCGACGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATGGCGGAAGGCCGTCA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TGCCGGTCACTCGCGCTGCATTATGCTGAGTGATATCCCGCTTAACCGCTCCCGCAGT

```

(B) *Forward-Primer* für die Klonierung von pMA-SapI-pOmCI:

```

                XhoI          SapI
OmCI-ForV2 5'-GTGTCCTCTCGAGAAGAGGAGCTTCTTCTGCGACTCTGAATCCGACTGTAC-3'
                LeuGluLysArgSerSerSerAla
                α-Faktor SS →
                XhoI
                |
AGGCCACGTGTCTTGTCCAGAGCTCCTCGAGAAGAGAGACTCTGAATCCGACTGTACTGG
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TCCGGTGCCACAGAACAGGTCTCGAGGAGCTTCTCTCTGAGACTTAGGCTGACATGACC
                LeuGluLysArgAspSerGluSerAspCysThrGly -
                α-Faktor SS →

```

(C) *Reverse-Primer* für die Klonierung von pMA-pOmCI und pMA-SapI-pOmCI:

```

TTGTAGACAGAAGTTGGAAGAGTTGGCTTCCGGTAGAAACCAGATGTACCCACACTTGAA
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
AACATCTGTCTTCAACCTTCTCAACCGAAGGCCATCTTTGGTCTACATGGGTGTAAGTT
CysArgGlnLysLeuGluGluLeuAlaSerGlyArgAsnGlnMetTyrProHisLeuLys
                3'-GGGTGTAAGTT
                SapI          NotI
                |          |
GGATTGCTCTTCTGCCCATCATCACCATCACCCTAATAGGCGCGCGGTACCTGGAGC
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
CCTAACGAGAAGACGGGTAGTAGTGGTAGTGGTATTATCCGCCGCGCCATGGACCTCG
AspCysSerSerAlaHisHisHisHisHisHisEnd
                His6-tag →
                NotI
CCTAACGATTATCCGCCGCGAGTGGT-5' OmCI-RevV2
AspCysEnd

```

(D) *Reverse-Primer* für die Klonierung von pMA-pOmCI-SapI:

```

TTGTAGACAGAAGTTGGAAGAGTTGGCTTCCGGTAGAAACCAGATGTACCCACACTTGAA
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
AACATCTGTCTTCAACCTTCTCAACCGAAGGCCATCTTTGGTCTACATGGGTGTAAGTT
CysArgGlnLysLeuGluGluLeuAlaSerGlyArgAsnGlnMetTyrProHisLeuLys
                3'-GGGTGTAAGTT
                SapI          NotI
                |          |
GGATTGCTCTTCTGCCCATCATCACCATCACCCTAATAGGCGCGCGGTACCTGGAGC
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
CCTAACGAGAAGACGGGTAGTAGTGGTAGTGGTATTATCCGCCGCGCCATGGACCTCG
AspCysSerSerAlaHisHisHisHisHisHisEnd
                His6-tag →
                SapI NotI
CCTAACCGGACTTCTCGCCGCGGTAGT-5' OmCI-RevV3
AspCysAlaEnd

```

Abbildung 33: Primer-Planung zur Amplifizierung von pOmCI, pOmCI-SapI und SapI-pOmCI. (A) Der *Forward-Primer* pMA-For hybridisiert stromaufwärts der Restriktionsschnittstelle *XhoI*. Durch diesen *Primer* ändert sich nichts an der Nukleotid-/Aminosäuresequenz. (B) Durch den *Forward-Primer* OmCI-ForV2 wird am 5'-Ende die Sequenz für den N-terminalen SerSerAla-Linker (gelb hervorgehoben) mit der *SapI*-Restriktionsschnittstelle zwischen die α -Faktor Signalsequenz und der Startaminoäure Asp von pOmCI eingefügt. (C) Durch den *Reverse-Primer* OmCI-RevV2 wird am 3'-Ende die Sequenz für das C-terminale His₆-tag sowie der vorangestellte SerSerAla-Linker mit der *SapI*-Restriktionsschnittstelle entfernt. (D) Durch den *Reverse-Primer* OmCI-RevV3 wird am 3'-Ende die Sequenz für das C-terminale His₆-tag sowie der vorangestellte SerSerAla-Linker mit der *SapI*-Restriktionsschnittstelle entfernt, gleichzeitig wurde am am 3'-Ende eine neue *SapI*-Restriktionsschnittstelle in umgekehrter Orientierung eingefügt, ein Ala-Linker (gelb hervorgehoben) bleibt bestehen. Als *Template* diente das Plasmid pMA-pOmCI-His₆. Durch die PCR-Reaktion neu eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

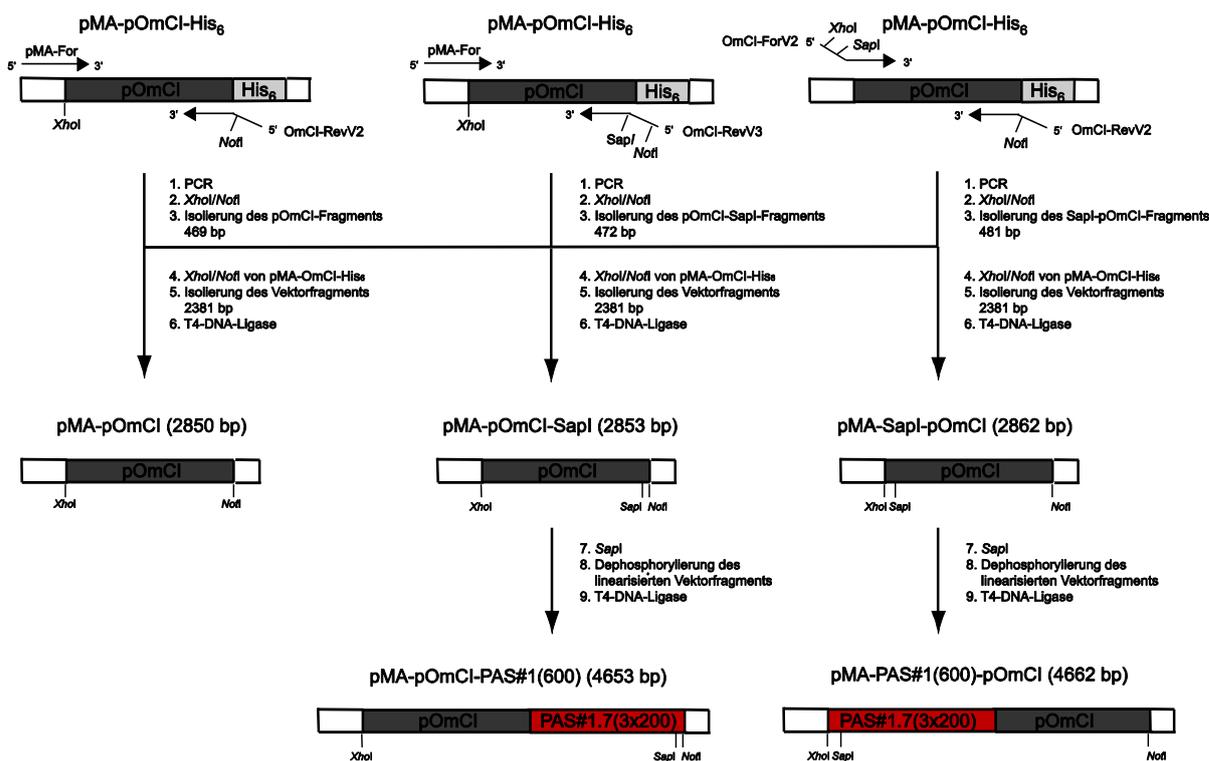


Abbildung 34: Klonierungsschema für pMA-pOmCI, pMA-pOmCI-PAS#1(600) und pMA-PAS#1(600)-pOmCI.

Die drei Plasmide wurden an VTU Technology übergeben, wo die weitere Subklonierung, Transformation und die sekretorische Produktion von pOmCI, pOmCI-PAS(600) und PAS(600)-pOmCI in *P. pastoris* in kontrollierten Bioreaktoren mit einem Kulturvolumen von ~300 ml erfolgte. Die Genexpression wurde durch Zugabe von Methanol gestartet, nach 73 Stunden erfolgte die Ernte des Kulturüberstands durch Filtration. Der geklärte Überstand wurde bei -80 °C eingefroren; die Reinigung (Abschnitt 3.3.1.2) und Charakterisierung (Abschnitt 3.3.1.3) erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

3.3.1.2 Reinigung von pOmCI-Varianten aus Kulturen von *P. pastoris*

Bei der Reinigung von pOmCI-His₆ und der C-terminal PASylierten Variante pOmCI-PAS(600)-His₆, bei denen ein Abbau des His₆-tags beobachtet wurde, war festgestellt worden, dass eine effiziente Reinigung der pOmCI-Varianten aus dem Kulturüberstand von *P. pastoris* auch ohne Affinitätschromatographie möglich ist.

Das nicht PASylierte pOmCI und die PASylierten pOmCI-Varianten ohne His₆-tag wurden daher nun in zwei Schritten mittels AEX und SEC gereinigt. Als erster Reinigungsschritt wurde eine AEX durchgeführt (Abschnitt 2.7.1.4). Mit seinem sauren pI-Wert von 4,55 adsorbierte pOmCI bei einem pH-Wert von 7,5 und unter Niedrigsalzbedingungen (20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA) stark an die quartären Ammonium-Gruppen der Resource Q-Säule (Bettvolumen: 10 ml). Unter Verwendung eines Salzgradienten von 0 bis 300 mM NaCl konnte pOmCI (Abbildung 35A, Peak 2) effektiv von den Wirtszellproteinen der Hefe (Abbildung 35A, Peak 1) separiert werden.

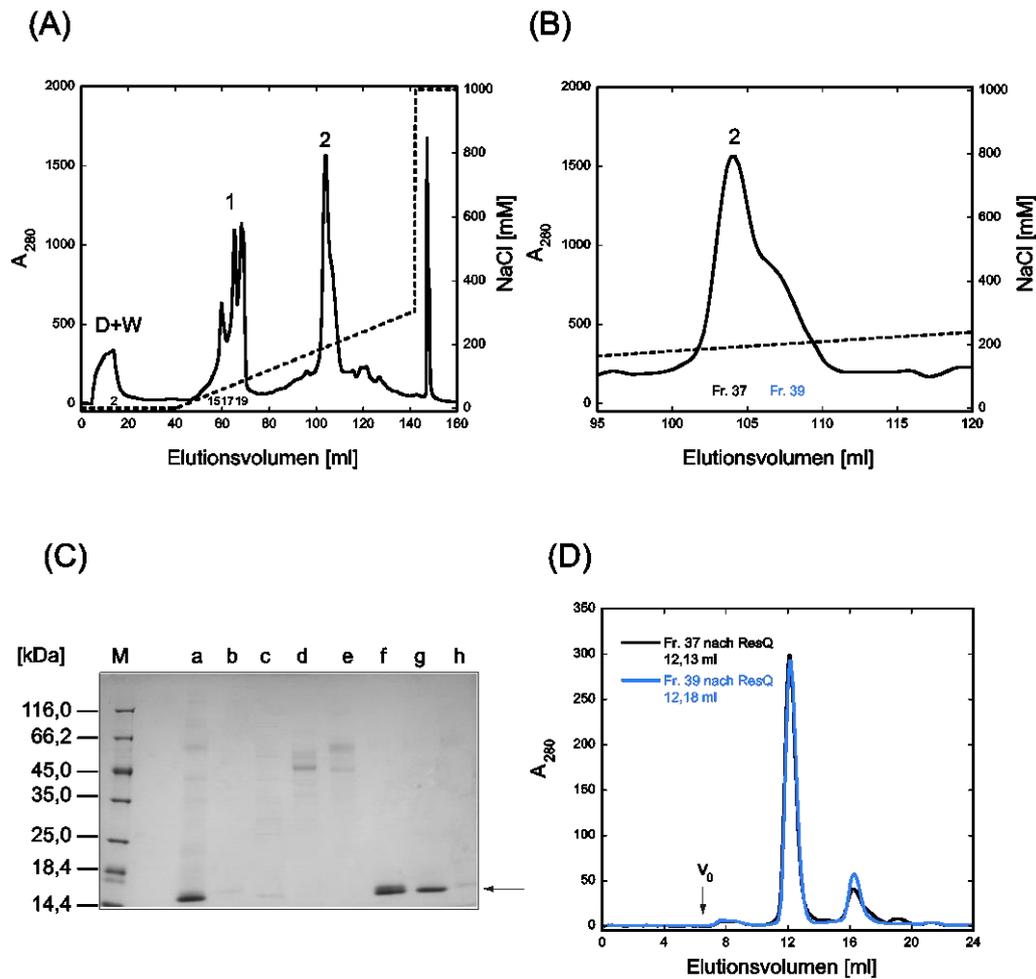


Abbildung 35: Chromatographische Reinigung von pOmCI aus *Pichia*-Kulturüberstand. (A) AEX-Reinigung an Resource Q-Säule (10 ml Bettvolumen). Durchlauf (D)- und Waschfraktion (W) repräsentieren den Proteinanteil, der nicht an die Resource Q-Säule bindet. Die Elution erfolgte bei pH 7,5 mit 0-300 mM NaCl. pOmCI eluierte als Peak 2 und konnte sehr effektiv von den Wirtszellproteinen der Hefe im Peak 1 separiert werden. (B) Zoom von Peak 2 der AEX-Reinigung. pOmCI eluierte bei einer Salzkonzentration von etwa 200 mM NaCl und zeigte einen inhomogenen Peak mit einer prägnanten Schulter. (C) SDS-PAGE (nicht-reduzierende Bedingungen) der AEX-Chromatographie in (A). M: Proteinmarker, a: nach Dialyse gegen AEX-Laufpuffer und Entfernung unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation (1:5 verdünnt), b: Fraktion 2, c: Fraktion 15, d: Fraktion 17, e: Fraktion 19, f: Fraktion 37 (1:5 verdünnt), g: Fraktion 39 (1:5 verdünnt), h: Fraktion 41. In AEX-Fraktion 37 ist neben der Hauptbande bei ca. 15 kDa eine weitere Bande mit geringfügig kleinerer Mobilität zu erkennen. (D) SEC-Reinigung an Superdex 75 10/300 (24 ml Bettvolumen). V_0 markiert das SEC-Ausschlussvolumen. Beide AEX-Fraktionen 37 und 39 zeigten einen nahezu identischen homogenen monomeren Peak bei 12,1-12,2 ml; dies entspricht einer vergleichbaren apparenten Molekülmasse von 12 kDa.

pOmCI eluierte bei einer Salzkonzentration von etwa 200 mM NaCl und zeigte einen inhomogenen Peak mit einer prägnanten Schulter (Abbildung 35B). Ausgewählte Fraktionen der AEX wurden mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE-Analyse überprüft (Abbildung 35C). Für den Elutionspeak von pOmCI (Peak 2) wurde auch im SDS-Gel eine Inhomogenität zwischen Hauptpeak (Fraktion 37) und Schulter (Fraktion 39) gefunden; in der Fraktion des Hauptpeaks war neben der Hauptbande bei ca. 15 kDa eine weitere Bande mit geringfügig geringerer Mobilität zu erkennen. Die Reinheit von pOmCI in den AEX-Fraktionen 36 bis 40 lag ca. 80 %, die Ausbeute betrug 6,4 mg pro 10 ml Kulturüberstand.

Als zweiter Reinigungsschritt und zur Charakterisierung des Oligomerisierungszustands wurden die beiden pOmCI enthaltenden AEX-Fraktionen 37 und 39 mittels analytischer SEC (Abschnitt 2.7.1.5) unter Verwendung einer Superdex 75 10/300 Säule untersucht (Fraktion 38 wurde nicht weiterverarbeitet). Der Laufpuffer war SPR-Puffer (10 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 150 mM NaCl). Beide Fraktionen zeigten einen nahezu identischen, homogenen, monomeren Peak bei 12,1 ml bzw. 12,2 ml (Abbildung 35C), entsprechend ähnlichen apparenten Molekülmasse von 12 kDa.

Da die Ursache für die Inhomogenität in den AEX-Fraktionen durch SDS-PAGE und SEC nicht identifiziert werden konnte, wurden beide Fraktionen mittels ESI-MS untersucht (Abschnitt 3.3.1.3).

Die PASylierten Varianten pOmCI-PAS(600) und PAS(600)-pOmCI wurden unter den gleichen Bedingungen gereinigt und analysiert. In der AEX eluierten beide PASylierte Proteine bereits bei einer NaCl-Konzentration von 40 mM (Abbildung 36A, Peak 1) in Coelution mit einem Teil an Wirtszellproteinen, welche allerdings im hinteren Bereich (Fraktionen 16-18) des Elutionspeaks 1 auftraten. Ein weiterer Teil an Wirtszellproteinen eluierte über einen breiten Bereich (Abbildung 36A, Peak 2) bei höherer NaCl-Konzentration sowie in der Regenerationsphase (Reinigung beispielhaft gezeigt für N-terminal PASyliertes PAS(600)-pOmCI, Abbildung 36A und B). Ausgewählte Fraktionen der AEX wurden mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE überprüft, PAS(600)-pOmCI migrierte bei einer Molekülmasse von >116 kDa. In allen Fraktionen war nur ein sehr geringer Anteil an Wirtszellproteinen zu beobachten, die reinsten Fraktionen mit höchstem Anteil an PAS(600)-pOmCI waren Fraktionen 14 bis 16 (Abbildung 36D). Auch bei den PASylierten OmCI-Varianten fand sich in der SDS-PAGE eine Inhomogenität in Form von Banden leicht unterschiedlicher Mobilität. Bei PAS(600)-pOmCI migrierten die Banden der Fraktionen 15 bis 17 (Hauptanteil des Proteins) mit leicht zunehmender Mobilität. Die Reinheit von PAS(600)-pOmCI in den Fraktionen 14 bis 16 lag bei ca. 80 %, die Ausbeute betrug 13 mg pro 10 ml Kulturüberstand.

Als zweiter Reinigungsschritt und zur Charakterisierung des Oligomerisierungszustands wurden die beiden PAS(600)-pOmCI enthaltenden Fraktionen mittels analytischer SEC (Abschnitt 2.7.1.5) unter Verwendung einer Superdex 200 10/300 Säule mit 10 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 150 mM NaCl als Laufpuffer untersucht. Bei PAS(600)-pOmCI zeigten die Hauptfraktionen 15 und 17 einen nahezu identischen, homogenen monomeren Peak bei 9,4 ml bzw. 9,0 ml (Abbildung 36D), dies entspricht apparenten Molekülmassen von ca. 593 kDa und 700 kDa. Die Fraktion 17 enthielt noch kleinere Verunreinigungen, die in der SEC gut abgetrennt werden konnten.

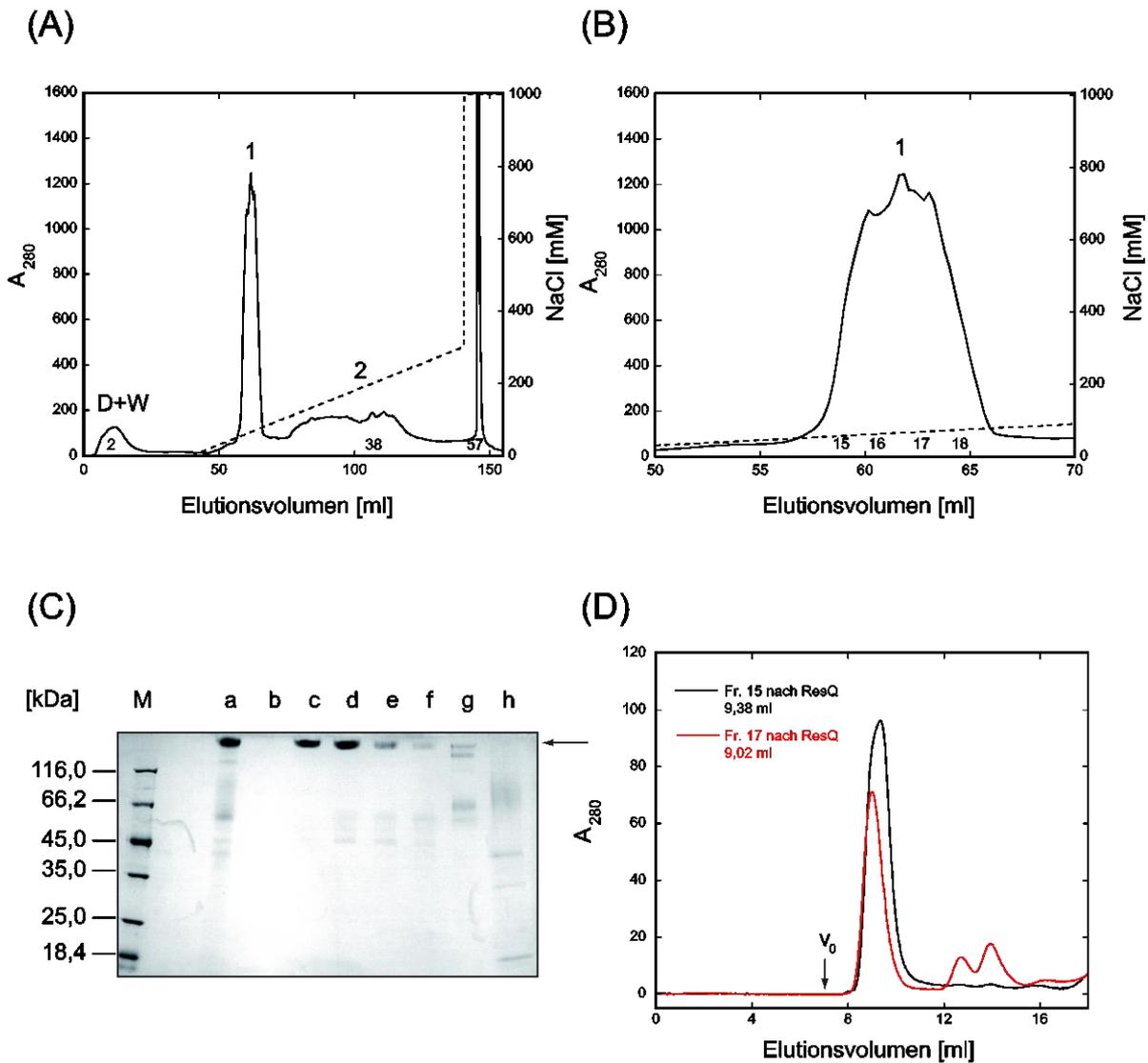


Abbildung 36: Chromatographische Reinigung von PAS(600)-pOmCI aus *Pichia*-Kulturüberstand. (A) AEX-Reinigung an Resource Q-Säule (10 ml Bettvolumen). Durchlauf (D)- und Waschfraktion (W) repräsentieren den Proteinanteil, der nicht an die Resource Q-Säule bindet. Die Elution erfolgte bei pH 7,5 mit 0-300 mM NaCl. PAS(600)-pOmCI eluierte im Peak 1 zusammen mit einigen Wirtszellproteinen, die allerdings im hinteren Teil des Elutionspeaks auftraten; ein weiterer Teil an Wirtszellproteinen eluierte über einen breiten Bereich in Peak 2 bei höherer NaCl-Konzentration sowie in der Regenerationsphase (B) Zoom von Peak 2 der AEX-Reinigung. PAS(600)-pOmCI eluierte bei einer Salzkonzentration von etwa 40 mM NaCl. (C) SDS-PAGE (nicht-reduzierende Bedingungen) der AEX-Chromatographie. M: Proteinmarker, a: nach Dialyse in AEX-Laufpuffer und Entfernung unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation (1:5 verdünnt), b: Fraktion 2, c: Fraktion 15, d: Fraktion 16, e: Fraktion 17, f: Fraktion 18, g: Fraktion 38, h: Regenerationsphase. Die Fraktionen 15-18 sind 1:5 verdünnt. Die Banden in den Fraktionen 15 bis 17 (Hauptanteil des Proteins) migrierten in der SDS-PAGE mit leicht zunehmender Mobilität. (D) SEC-Reinigung an Superdex 200 10/300 (24 ml Bettvolumen). V_0 markiert das SEC-Ausschlussvolumen. Beide AEX-Fractionen 15 und 17 zeigten einen nahezu identischen, homogenen monomeren Peak bei 9,4 ml bzw. 9,0 ml; dies entspricht apparenten Molekulmassen von ca. 593 kDa und 700 kDa.

Der Reinigungsverlauf und die Beobachtungen waren für das C-terminal PASylierte pOmCI Protein vergleichbar (nicht gezeigt). Nach dem AEX-Schritt ergab sich eine Ausbeute von 26 mg aus 10 ml Kulturüberstand.

3.3.1.3 Charakterisierung der gereinigten pOmCI-Varianten aus *P. pastoris*

Zur Identifikation der unterschiedlichen Proteinspezies von pOmCI, pOmCI-PAS(600) und PAS(600)-pOmCI, die in den AEX-Chromatogrammen beobachtet wurden und als zusätzliche Banden in der SDS-PAGE-Analyse auftraten, wurden die jeweiligen AEX-Hauptfraktionen massenspektrometrisch untersucht. Für pOmCI wurde die AEX-Hauptfraktion (Fraktion 37, Abbildung 35B) zuerst durch Umkehrphasenchromatographie (*Reverse Phase Chromatography*, RPC) an einer Polystyrol-Matrix aufgetrennt, die in den RPC-Fractionen aufgetrennten Proteinspezies (Abbildung 37A) wurden anschließend durch ESI-MS identifiziert (Abschnitt 2.7.1.6).

Für die RPC wurden 350 µg der AEX-Fraktion in einem Gemisch aus 2 % (v/v) ACN / 0,1 % (v/v) Ameisensäure (FA) auf eine 1 ml Resource RPC Säule aufgetragen (Probenvolumen: 780 µl). Im Anschluß erfolgte die Elution in einem flachen Gradienten von 2 % (v/v) bis 80 % (v/v) ACN. pOmCI eluierte wie schon in der AEX-Reinigung als ein Peak mit Schulter (Abbildung 37A). Ausgewählte RPC-Fractionen aus der vorderen Hälfte (Fraktion 47) und aus der hinteren Hälfte (Fraktion 49) des RPC-Elutionspeaks wurden anschließend direkt für die massenspektrometrische Analyse mittels ESI-Q-TOF verwendet. In Fraktion 47 wurden mindestens fünf verschiedene OmCI-Spezies (Abbildung 37B) detektiert. Die beobachteten Massendifferenzen stellten 2 bis 6 Vielfache von 162 Da dar und wiesen damit auf eine unerwartete Mannosylierung hin (monoisotopische Masse von Mannose: 180,1 Da, Massendifferenz bei einfacher Mannosylierung unter Wasserabspaltung: +162,1 Da). In RPC-Fraktion 49 wurde dahingegen nur eine 3-fach sowie eine nicht mannosylierte Spezies von pOmCI detektiert (Abbildung 37C). Durch Glycosylierung mit steigender Anzahl von hydrophilen Mannose-Resten lässt sich der heterogene Verlauf der AEX- und RPC-Chromatogramme gut erklären.

Die Addition von Mannose-Resten kann bei einigen Hefespezies in Form einer O-Glycosylierung von Serin- und Threonin-Seitenketten auftreten (Tanner & Lehle, 1987). Für pOmCI aus *P. methanolica* war nur eine unerwünschte N-Glycosylierung beobachtet worden (Nunn *et al.*, 2005); für den Expressionsorganismus *P. pastoris* wurden jedoch schon einige Fälle von O-Glycosylierung beschrieben (Bretthauer & Castellino, 1999).

Die PASylierten Proteine zeigten jeweils homogene Peaks in der RPC; in der ESI-MS-Analytik der entsprechenden RPC-Fractionen traten dagegen sehr viele Primärionen auf, so dass die Spektren nicht dekonvolviert werden konnten.

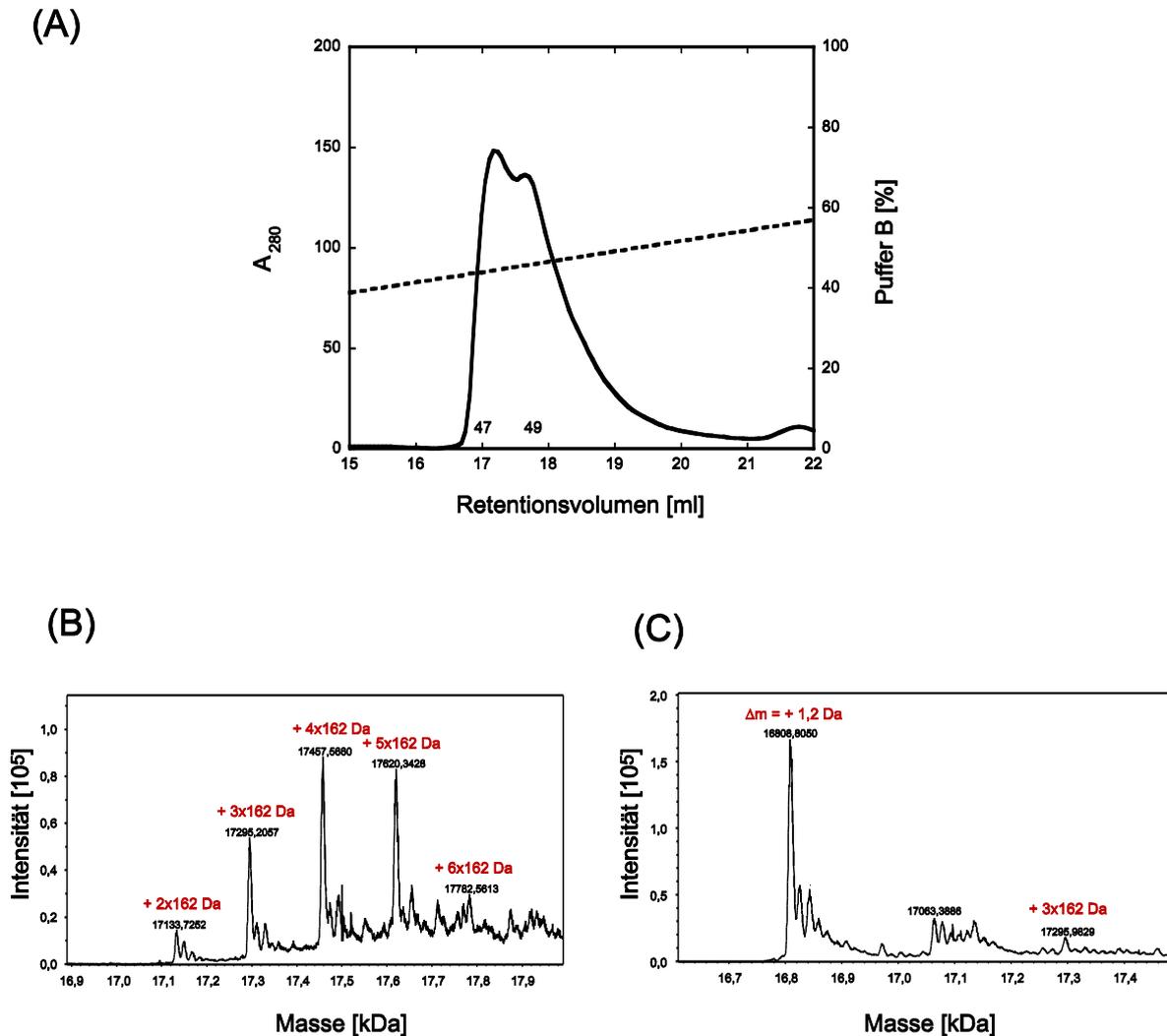


Abbildung 37: Umkehrphasenchromatographie (RPC) und ESI-MS-Analytik von pOmCI. (A) RPC-Chromatogramm der AEX-Fraktion 37. 350 μg der AEX-Fraktion wurden in einem Gemisch aus 2 % (v/v) ACN / 0,1 % (v/v) FA (Probenvolumen: 780 μl) auf eine 1 ml Resource RPC Säule bei einer Flußrate von 2 ml/min aufgetragen. Im Anschluß wurde ein flacher Gradienten von 2 % -80 % (v/v) ACN über 40 Säulenvolumina angelegt und 0,5 ml Fraktionen gesammelt. pOmCI eluierte in einem Doppelpeak. (B) und (C) ESI-MS Spektren der RPC-Fractionen 47 und 49. In der Fraktion 47 wurden mindestens fünf verschiedene OmCI-Spezies detektiert, die sich um die Molekülmassen von $N \times 162$ Da unterschieden. In der RPC-Fraktion 49 wurde neben einer 3-fach mannosylierten pOmCI-Spezies auch eine nicht-mannosylierte Spezies detektiert.

Um auch für die PASylierten pOmCI-Varianten den Grad einer möglichen Mannosylierung zu untersuchen und die betroffenen O-Glycosylierungsstellen einzugrenzen, wurde von pOmCI-PAS(600) und PAS(600)-pOmCI ein Peptidmassenfingerprint (Abschnitt 2.9.1.2) angefertigt. Hierfür wurden Proteinfraktionen von pOmCI-PAS(600) und PAS(600)-pOmCI aus der analytischen SEC (Beispielhaft für PAS(600)-pOmCI, gereinigte AEX-Fraktion 15; siehe Abbildung 36) gegen 50 mM NH_4HCO_3 pH 7,8 dialysiert und anschließend mit Trypsin bei 37 °C über Nacht enzymatisch verdaut. Disulfidbindungen wurden mit 5 mM DTT reduziert und die entstandenen Peptide mittels LC-MS zunächst aufgetrennt (C18 Zorbax SB-C18 Säule) und die zugehörigen Massen bestimmt.

Die gemessenen Massen wurden mit den erwarteten Massen aus einem *In silico*-Trypsin-Verdau mittels des PeptideMass Algorithmus (ExpASY Server) verglichen (Beispielhaft für PAS(600)-pOmCI in Tabelle 12). Von den 11 möglichen Peptiden >500 Da wurden zehn im Verdauansatz gefunden, bei drei Peptiden wurden zusätzlich einfach mannosylierte Varianten identifiziert. In Anbetracht der insgesamt 11 Threonin- und 9 Serin-Reste in pOmCI, die potentielle O-Glycosylierungsstellen darstellen und die sich auf 6 der massenspektrometrisch nachweisbaren Peptide verteilten, scheinen sich die Mannosylierungsstellen in pOmCI auf wenige zugängliche Positionen zu beschränken.

Im Peptid LEELASGR (737–744) konnte das einzelne Serin als O-Glycosylierungsstelle eindeutig identifiziert werden; in den Peptiden QGTDWASTDWTFTLDGAK (664–681) und VTATLGQLTQNR (682–693) konnte dagegen die O-Glycosylierungsstelle nicht weiter eingegrenzt werden, weil jeweils mehrere Threonin- und Serin-Reste vorkamen.

Tabelle 12. *In silico*-Verdau von PAS(600)-pOmCI. Die theoretisch erwarteten Massen nach Trypsin-Verdau wurden mit der Software ExpASY PeptideMass berechnet. Es entstanden 11 mögliche Peptide >500 kDa, von denen 10 eindeutig nachweisbar waren; für drei Peptide wurden zusätzlich mannosylierte Varianten gefunden. Das große PAS-Peptid von 52,2 kDa konnte nicht nachgewiesen werden.

Berechnete Massen	Aminosäurepositionen	Peptidsequenz	Gemessene Masse [Da]	Mannosylierte Masse [Da]
52193,8514	1–626	SSSA-(SPAAPAPASPAAPAPSA PAA) ₃₀ -DSES DCTGSEPVDAFQ AFSE GK	---	---
2674,0254	712–734	EVPDYEMWMLDAGGLEVEVECCR	2673,18	---
2000,1083	664–681	QGTDWASTDWTFTLDGAK	1999,94	2162,00 ($\Delta=+162,06$)
1782,9051	694–708	EVVYDSQSHHCHV DK	1781,82	---
1424,6932	652–663	QDNTLPVMMTFK	1423,71	---
1301,4654	682–693	VTATLGQLTQNR	1300,74	1462,80 ($\Delta=+162,06$)
1030,2097	745–752	NQMYPHLK	1029,53	---
873,9615	737–744	LEELASGR	873,47	1036,47 ($\Delta=+163,00$)
848,9977	627–633	EAYVLVR	848,50	---
686,7197	645–651	GEPAGEK	686,34	---
546,5780	634–638	STDPK	546,28	---

Das durch den Verdau entstehende PAS(600)-Peptid (52,2 kDa) war nicht nachweisbar. Das PAS(600)-Polypeptid beinhaltet 93 Serin-Reste, die ebenfalls potentielle O-Glycosylierungsstellen darstellen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass hier in der Hefe keine nennenswerte Mannosylierung stattfindet, da ansonsten eine sehr hohe Massenverteilung in der PAS-Sequenz aufgetreten wäre, die sich in der SDS-PAGE anhand verbreiteter Banden niedergeschlagen hätte.

Die Bindungsaktivität der drei gereinigten OmCI-Varianten pOmCI, pOmCI-PAS(600) und PAS(600)-pOmCI sowie der beiden mit His₆-tag versehenen Varianten pOmCI-His₆ und pOmCI-PAS(600)-His₆ aus den initialen Expressionsexperimenten gegenüber dem C5-Protein wurde mittels SPR-Spektroskopie (Abschnitt 2.9.2) untersucht. Hierfür wurde das humane C5-Protein über seine Lysin-Seitenketten als Ligand an die carboxymethylierte Oberfläche eines CM3-Sensorchips (GE Healthcare; pOmCI-His₆ und pOmCI-PAS(600)-His₆) bzw. CMDP-Sensorchips (XanTec; pOmCI, pOmCI-PAS(600) und PAS(600)-pOmCI) kovalent immobilisiert. Die Kopplung des C5-Proteins ($pI = 6,07$) erfolgte bei einem pH-Wert von 5, so konnte eine Immobilisierung von ca. $\Delta RU = 3750$ (CM3-Sensorchips) oder 3200 (CMDP-Sensorchips) erreicht werden.

Im Anschluß an die Immobilisierung wurden für gereinigte pOmCI-Varianten in verschiedenen Konzentrationen (pOmCI und pOmCI-His₆: 3,9–62,5 nM, pOmCI-PAS(600) und pOmCI-PAS(600)-His₆: 31,25–500 nM, PAS(600)-pOmCI: 7,8–125 nM) in HBST-0,05 Puffer die Komplexbildung verfolgt (Abbildung 38). Eine Gleichgewichtsphase (gleichbleibendes Resonanzsignal) wurde dabei nicht erreicht. Die Dissoziation wurde über einen Zeitraum von 900 Sekunden gemessen. Die Regeneration konnte nur durch mehrmalige Injektionen von 2 M MgCl₂ erreicht werden, was auf eine starke elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem humanen C5-Protein und dem pOmCI-Protein hinweist, wie bereits in der Literatur beschrieben (Nunn *et al.*, 2005).

Die Daten wurden nach dem bimolekularen Bindungsmodell von Langmuir (*1: 1 Langmuir binding*) unter Anwendung des Programms BIAevaluation V 4.1 angepasst (Abbildung 38). Dabei wurde R_{max} als ein lokaler Parameter definiert und für jede Konzentration separat bestimmt. R_{max} entspricht der maximalen Anzahl verfügbarer Bindestellen auf dem Sensorchip, die in diesem Fall nicht für jede Konzentration identisch war. Höchstwahrscheinlich wurde durch die verwendete 2 M MgCl₂-Lösung im Regenerationsschritt ein geringer Anteil der immobilisierten C5-Moleküle denaturiert; unter verschiedenen getesteten Lösungen konnte jedoch keine schonendere Regenerationslösung mit ausreichender Wirkung gefunden werden.

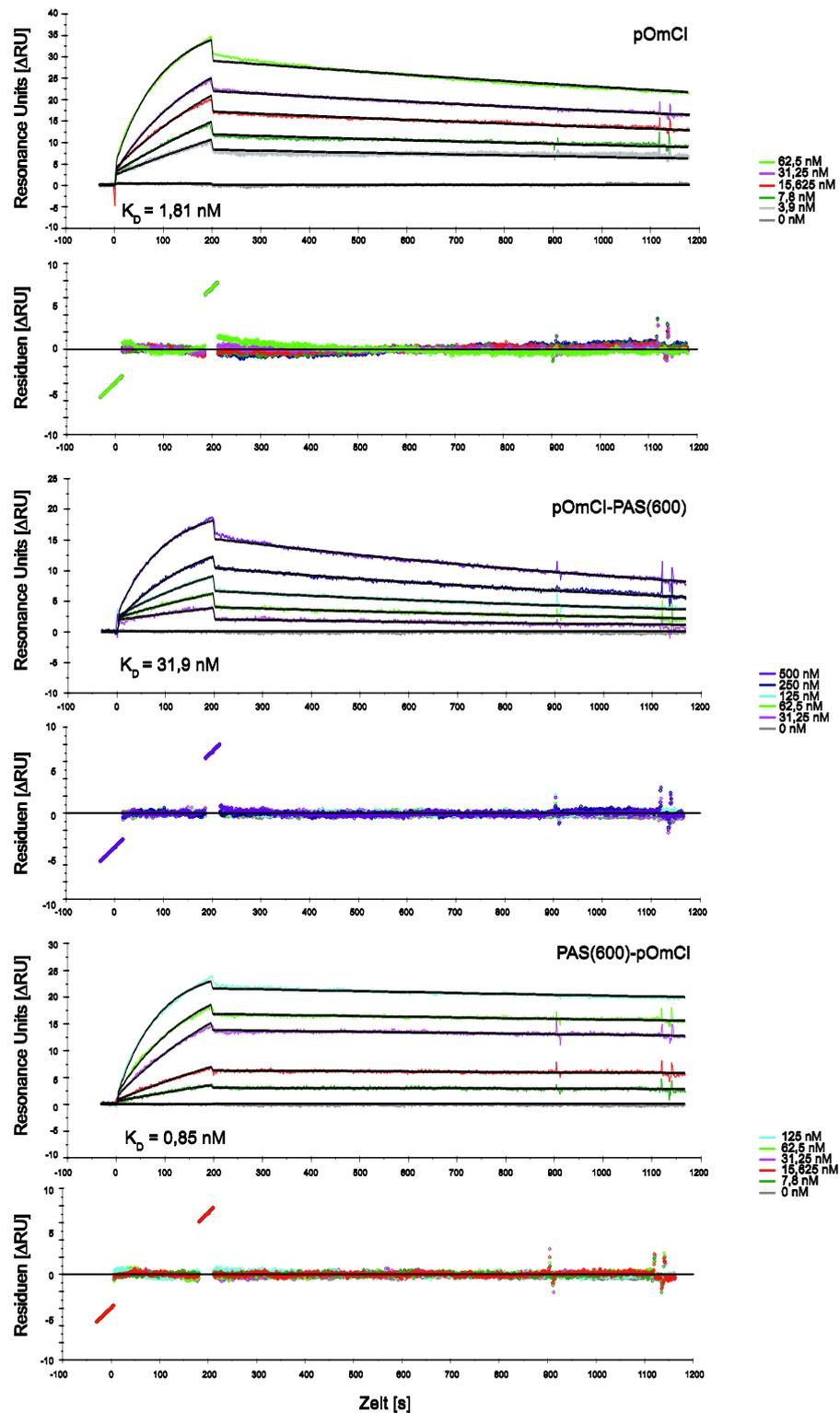


Abbildung 38: Messung der Bindungskinetik von pOmCI, pOmCI-PAS(600) und PAS(600)-pOmCI durch Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie. Ein mit C5-Protein ($\Delta\text{RU} = 3200$) beladener Carboxymethyl-dextran-Sensorchip (CMDP; XanTec) wurde mit HBST-0,05 äquilibriert und anschließend der Analyt mit einem Probenvolumen von 100 μl bei einem konstanten Fluss von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Zur Ermittlung der kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} der pOmCI-Varianten wurde eine Konzentrationsreihe von 3,9 bis 62,5 nM für pOmCI, von 31,25 bis 500 nM für pOmCI-PAS(600) und von 7,8 bis 125 nM für PAS(600)-pOmCI gemessen. Die Dissoziation wurde für 900 s verfolgt. Die Regeneration erfolgte durch mehrmalige Injektionen von 2 M MgCl_2 . Die individuell von unspezifischen Signalanteilen bereinigten Sensorgramme einzelner Konzentrationen (farbige Linien) wurden überlagert, global an das 1:1 Bindungsmodell (R_{max} als lokaler Parameter) nach Langmuir angepasst (schwarze Linien) und die Dissoziationskonstante K_D bestimmt. Der Residuen-Plot bildet die Differenz aus experimentell erhobenen und angepassten Verläufen ab.

Der ermittelte K_D -Wert lag für pOmCI bei $1,81 \pm 0,03$ nM und für pOmCI-His₆ geringfügig höher bei $2,54 \pm 0,06$ nM (Tabelle 13). Beide Werte waren vergleichbar mit dem Literaturwert für pOmCI von 18,5 nM (Hepburn *et al.*, 2007).

Tabelle 13. Zusammenfassung der kinetischen Konstanten für die Bindung PASylierter und nicht PASylierter pOmCI-Varianten an C5.

Protein	k_{on} [10^5 M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{off} [10^{-4} s ⁻¹]	K_D [nM]
pOmCI	$1,65 \pm 0,03$	$2,98 \pm 0,01$	$1,81 \pm 0,03$
pOmCI-PAS(600)	$0,200 \pm 0,004$	$6,39 \pm 0,02$	$31,90 \pm 0,72$
PAS(600)-pOmCI	$0,95 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,01$	$0,85 \pm 0,02$
pOmCI-His ₆ ^a	$1,02 \pm 0,02$	$2,6 \pm 0,01$	$2,54 \pm 0,06$
pOmCI-PAS(600)-His ₆ ^a	$0,133 \pm 0,003$	$12,50 \pm 0,02$	$94,3 \pm 2,4$
pOmCI ^b	---	---	$18,5 \pm 3,2$

^a pOmCI-Varianten mit His₆-tag (Sensorgramm nicht gezeigt)

^b (Hepburn *et al.*, 2007)

Der Komplex zwischen pOmCI bzw. pOmCI-His₆ und dem humanen C5 ist durch eine sehr langsame Dissoziationsrate k_{off} ($2,98 \pm 0,01$ bzw. $2,6 \pm 0,01 \times 10^{-4}$ s⁻¹) und eine schnelle Assoziationsrate k_{on} ($1,65 \pm 0,03$ bzw. $1,02 \pm 0,02 \times 10^5$ M⁻¹ s⁻¹) charakterisiert. Für das C-terminale PAS-Fusionsprotein war die Assoziationsrate um den Faktor 8 verlangsamt, aber die Dissoziationsrate um den Faktor 2 für pOmCI-PAS(600) bzw. 5 für pOmCI-PAS(600)-His₆ beschleunigt. Dies erhöhte die Dissoziationskonstante (K_D) von pOmCI-PAS(600) auf $31,90 \pm 0,72$ nM und von pOmCI-PAS(600)-His₆ auf $94,3 \pm 2,4$ nM. Interessanterweise lag der K_D -Wert des N-terminalen PAS(600)-Fusionsproteins bei $0,85 \pm 0,02$ nM und somit im gleichen Bereich wie die K_D des unfusionierten Proteins, mit geringfügig verlangsamer k_{on} - und k_{off} -Rate (siehe Tabelle 13).

Diese SPR-Ergebnisse zeigten, dass das N-terminale PAS(600)-Polymer keinen ungünstigen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des pOmCI hat. Hingegen wies das C-terminale OmCI-PAS(600) einen Aktivitätsverlust um den Faktor 18 (ohne His₆-tag) bzw. 37 (mit His₆-tag) auf. In einer neueren Veröffentlichung (Jore *et al.*, 2016) wurde beschrieben, dass der C-Terminus von OmCI an der Interaktion mit dem C5-Protein beteiligt ist, was im Einklang mit diesen Befunden steht. Folglich wurde das N-terminale PAS-Fusionsprotein für die Weiterentwicklung in dieser Arbeit verwendet. Da die drei Proteinvarianten ohne His₆-tag mit einem anderen *Sensorchip*-Typen als die Proteinvarianten mit His₆-tag gemessen wurden, sind kleinere Variationen von k_{on} und k_{off} zu erwarten, und es ist davon auszugehen, dass das His₆-tag keinen negativen Einfluss auf die Bindung hat.

3.3.2 Gentechnische Herstellung in *E. coli* und Reinigung

Um jegliche Glycosylierung auszuschließen, wurde zuletzt die bereits zur Herstellung des PASylierten Interferon-Antagonisten (Abschnitt 3.2.1.4) erfolgreich eingesetzte cytoplasmatische Produktion in dem *E. coli*-Stamm Origami B angewandt. Dabei wurden zusätzliche die Expressionsbedingungen optimiert und verschiedene Faltungshelfer getestet.

Da das rekombinante Protein aus einem proteinreichen Cytoplasma-Extrakt gereinigt werden sollte, wurde erneut das His₆-tag verwendet, um eine Reinigung mittels Affinitätschromatographie zu ermöglichen. Darüber hinaus erlaubte das Affinitätsanhängsel den spezifischen Nachweis des rekombinanten Proteins. Die so produzierten Proteinpräparationen wurden für die biophysikalische Charakterisierung (Abschnitt 3.3.3) sowie für pharmakokinetische Studien in Mäusen eingesetzt (Abschnitt 3.3.4).

3.3.2.1 Plasmidkonstruktion für die cytoplasmatische Produktion in *E. coli*

Als Expressionsplasmid für Origami B sollte ein Derivat von pASK75-T7RBS-DCC5Fbn verwendet werden, das folgende Elemente trug: *tet*-Promotor/Operator, die ribosomale Bindestelle des T7-Phagen, eine Ampicillinresistenz, Restriktionsschnittstellen für die Insertion eines Gens über *SapI/HindIII* stromaufwärts der Sequenz für ein N-terminales His₆-tag mit optimierten cytoplasmatischen Translationsstart (Met-Lys), gefolgt von einem SerSerSerAla-Linker, der eine *SapI*-Schnittstelle zur Insertion einer PAS-Genkassette enthielt. Dieser Vektor wurde bereits zur Konstruktion des Plasmids pASK75-T7RBS-His₆-PAS#1(600)-IFN-1ant verwendet (Abschnitt 3.2.1.3, Abbildung 21).

Als Quelle für das OmCI-Gen diente der periplasmatische Expressionsvektor pASK75-OmCI-His₆. Das Plasmid war im Rahmen der beschriebenen Vorexperimente zur periplasmatischen Expression von OmCI in *E. coli* konstruiert worden (Abschnitt 3.3; Plescher, 2012). Die kodierende OmCI-Sequenz (UniProt-ID: Q5YD59; Positionen 19–168) wurde durch Gensynthese (GeneArt / Thermo Fisher Scientific) erhalten und enthielt am 3'-Ende eine *SapI*-Schnittstelle zur Insertion von PAS-Genkassetten. Um die bestmögliche Expression in *E. coli* zu gewährleisten, waren der GC-Gehalt und die Nukleotidsequenz mit Hilfe der GeneArt GeneOptimizer Software optimiert worden (Fath *et al.*, 2011). Das synthetische Gen war zur periplasmatischen Expression auf den Expressionsvektor pASK75 (Skerra, 1994) subkloniert worden.

Zur Modifizierung des OmCI-Gens für die cytoplasmatische Expression wurde ausgehend von pASK75-OmCI-His₆ eine PCR-Amplifizierung mit den *Primern* NK_OmCI_1_f und NK_OmCI_1_r durchgeführt. Dabei wurde am 5'-Ende der Genabschnitt für das OmpA-Signalpeptid entfernt und durch eine Sequenz ersetzt, die für einen N-terminalen SerSerSerAla-Linker kodierte und eine *SapI*-Schnittstelle enthielt, über die direkt stromaufwärts der Sequenz für das N-terminale His₆-tag im Zielplasmid kloniert werden konnte. Am 3'-Ende wurden die Restriktionsschnittstellen *SapI* und *AfeI* sowie die kodierende Sequenz für das C-terminale His₆-tag entfernt, so dass der Leserahmen mit dem Codon für das C-terminale Cys endete, entsprechend der natürlichen Sequenz von OmCI (Abbildung 39).



Abbildung 39: Primer-Planung zur Amplifizierung des OmCI-Gens mit N-terminaler *SapI*-Schnittstelle. Mittels PCR wurde unter Verwendung der Primer NK_OmCI_1_f und NK_OmCI_1_r am 5'-Ende der Genabschnitt für das OmpA-Signalpeptid entfernt und durch einen N-terminalen SerSerSerAla-Linker ersetzt (gelb markiert), der eine *SapI*-Schnittstelle enthielt. Am 3'-Ende wurden die Restriktionsschnittstellen *SapI* und *AfeI*, sowie die kodierende Sequenz für das C-terminale His₆-tag (blau markiert) entfernt. Als *Template* diente das Plasmid pASK75-OmCI-His₆. Durch die PCR-Reaktion neu eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Das erhaltene PCR-Produkt (480 bp) wurde anschließend über die Restriktionsschnittstellen *SapI* und *HindIII* auf den cytoplasmatischen Expressionsvektor pASK75-T7RBS-His₆-DCC-5Fbn kloniert und so das Plasmid pASK75-T7RBS-His₆-OmCI erhalten (Abbildung 40). Das isolierte Plasmid wurde mit einem analytischen Doppelverdau mittels *XbaI/HindIII* und durch Sequenzierreaktion unter Verwendung des Primers D20 überprüft. Für die Herstellung der PASylierten OmCI-Version wurde durch Verdau mit *EarI* zunächst die PAS#1.6/1.3/1.2-Genkassette (1800 bp) aus dem Vektor pXL1-PAS#1(600) isoliert. Diese kodierte für 600 Aminosäuren der PAS#1-Sequenz und wurde bereits bei der Expression des PASylierten Interferon- α 2b Antagonisten MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant eingesetzt (Abschnitt 3.2.1.1). Die Genkassette wurde über *SapI* in pASK75-T7RBS-His₆-OmCI inseriert und so das Plasmid pASK75-T7RBS-His₆-PAS#1(600)-OmCI erhalten. Das isolierte Plasmid wurde durch einen analytischen Doppelverdau mit *XbaI/HindIII* überprüft.

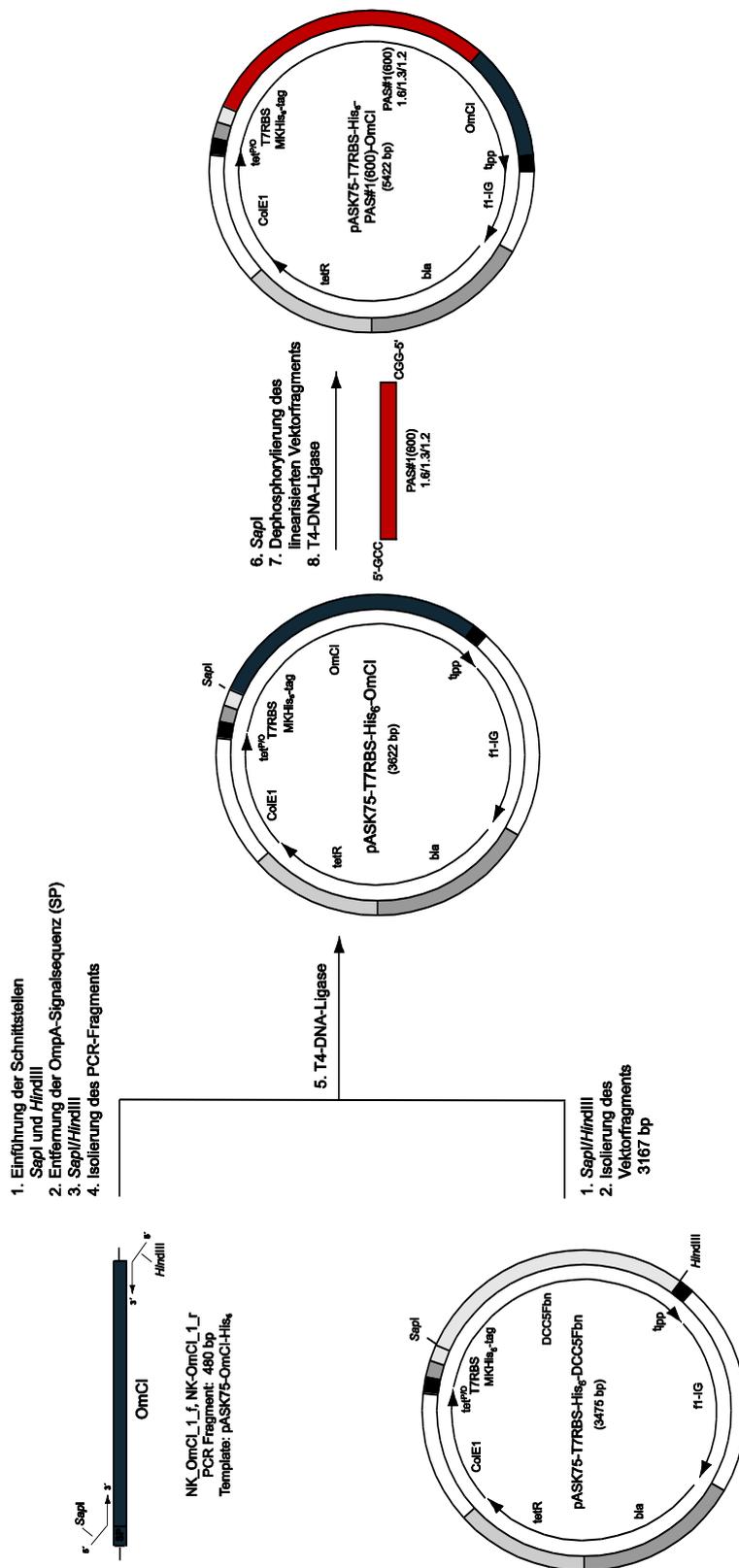


Abbildung 40: Klonierungsschema für pASK75-T7RBS-His₆-OmCI und pASK75-T7RBS-His₆-PAS#1(600)-OmCI. Die Genkassetten für OmCI mit N-terminaler *SapI*-Restriktionsschnittstelle wurde mittels PCR aus dem Plasmid pASK75-OmCI-His₆ amplifiziert (siehe Abbildung 39) und nach Verdau mit *SapI* und *HindIII* in das Plasmid pASK75-T7RBS-His₆-DCC-5Fbn inseriert. Dadurch entstand das Plasmid pASK75-T7RBS-His₆-OmCI. In einem weiteren Schritt wurde über *SapI* die PAS#1.6/1.3/1.2-Genkassette (1800bp) in dieses Plasmid eingefügt und so das Plasmid pASK75-T7RBS-His₆-PAS#1(600)-OmCI erhalten. Das Operon steht unter der Kontrolle des *tet*-Promotor/Operator-Systems.

Das Plasmid pASK75-T7RBS-His₆-OmCI wurde für erste Expressionsversuche mit dem *E. coli*-Stamm Origami B verwendet, unter Bedingungen analog zur Produktion des Interferon-Antagonisten (Abschnitt 3.2.1.4). Das nicht PASylierte cytoplasmatisch produzierte OmCI wird aufgrund der zusätzlichen beiden Aminosäuren Met und Lys im folgenden – auch in Abgrenzung zu in dem Hefe produzierten pOmCI-His₆ – als MKHis₆-OmCI bezeichnet. Dieses Protein lag in den ersten Versuchen nach Zellaufschluss jedoch größtenteils in unlöslicher Form vor. Um die korrekte Faltung von OmCI zu unterstützen, wurde daraufhin eine Disulfidisomerase koexprimiert. Im Fall der heterologen Expression von disulfidverbrückten Proteinen im Cytoplasma von *E. coli* ist bekannt, dass Disulfidisomerasen als Faltungshelfer wirken und die Ausbeute an löslichem Protein deutlich erhöhen können (Berkmen, 2012).

Hierzu wurden im Rahmen eines Forschungspraktikums zwei Faltungshelfer evaluiert: die prokaryotische Disulfid Oxidoreduktase DsbC (Schlapschy *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 1998), die bereits für die Expression von His₆-PAS(600)-YNS α 8 (Abschnitt 3.1.1.2) und ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant (Abschnitt 3.2.1.2) eingesetzt worden war, und die eukaryotische Protein-Disulfid-Isomerase PDI (Pihlajaniemi *et al.*, 1987; Skerra, 1989), für die beschrieben ist, dass deren Koexpression die Ausbeute eines Fab-Fragments im Periplasma von *E. coli* erhöht (Humphreys *et al.*, 1996).

Die Strukturgene für beide Disulfidisomerasen wurden in die cytoplasmatischen Expressionsplasmide pASK75-T7RBS-His₆-OmCI und pASK75-T7RBS-His₆-PAS#1(600)-OmCI derart eingefügt, dass sie zusammen mit dem Gen der entsprechenden OmCI-Variante in Form eines dicistronischen Operons vorlagen und so koexprimiert wurden. Das Gen für die PDI (UniProt-ID: P07237; Positionen 18–508; Skerra, 1989; Pihlajaniemi *et al.*, 1987) wurde mittels PCR aus dem Plasmid pPDI4 amplifiziert. Mit Hilfe des *Forward-Primers* NK_PDI_1_f wurde die humane Signalsequenz zur Sekretion der PDI entfernt und durch einen Sequenzabschnitt ersetzt, der am 5'-Ende eine *Hind*III-Schnittstelle für die Subklonierung enthielt, gefolgt von der intergenischen Sequenz mit der ribosomalen Bindestelle aus dem *OmpA*-Gen und der Codons für die Aminosäuren Met-Lys für eine effiziente Translationsinitiation in *E. coli*. Mit Hilfe des *Reverse-Primers* NK_PDI_1_r wurde eine *Bsa*I-Schnittstelle eingefügt (Abbildung 41).

```

          KasI
          |
          CCCGGCGGCGCCAACCGAAGCGCCCGCCTGATCCGTGTCGACATGCTGCGCCGCGCTC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          GGGCCGCGCGGTTGGCTTCGCGGGGCGGACTAGGCACAGGCTGTACGACGCGGCGCGAG
                                     MetLeuArgArgAlaLeu
                                     PDI Signalsequenz →

          HindIII  ****
NK_PDI_1_f 5'-TGTGCCAAGCTTACGAGGGCAAAAATGAAAGACGCCCCCGAGGAGGAGACCAC-3'
                                     MetLys
          TGCTGTGCCTGGCCGTGGCCGCCCTGGTGC GCGCCGACGCCCCCGAGGAGGAGACCACG
          -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          61  ACGACACGGACCAGCGCCGCGGACACGCGCGGCTGCGGGGGCTCCTCCTCCTGGTGC
          LeuCysLeuAlaValAlaAlaLeuValArgAlaAspAlaProGluGluGluAspHisVal
          ...

          ACCTGGAAGAAGCAGAGGAGCCAGACATGGAGGAAGACGATGATCAGAAAGCTGTGAAAG
          -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          1501  TGGACCTTCTTCGTCTCCFCGGTCTGTACCTCCTCTGCTACTAGTCTTTCGACACTTTC
          LeuGluGluAlaGluGluProAspMetGluGluAspAspGlnLysAlaValLysAsp
          3'-GTCTTTCGACACTTTC
          -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          1561  ATGAACTGTAATACGCAAAGCCAGACCCGGGCGCTGCCGAGACCCCTCGGGGGCTGCACA
          TACTTGACATTATGCGTTTCGGTCTGGGCCGCGACGGCTCTGGGGAGCCCCCGACGTTG
          GluLeuEnd   BsaI
          TACTTGACATTTCGACCTCTGGGCCTGG-5' NK_PDI_1_r

```

Abbildung 41: Primer-Planung zur Amplifizierung des PDI-Gens aus dem Plasmid pPDI4. Mittels PCR wurde unter Verwendung der *Primer* NK_PDI_1_f und NK_PDI_1_r am 5'-Ende der Genabschnitt für das natürliche Signalpeptid entfernt und durch eine Sequenz ersetzt, die am 5'-Ende eine *HindIII*-Schnittstelle enthielt, gefolgt von der intergenischen Sequenz mit der ribosomalen Bindestelle aus dem *OmpA*-Gen (grün hervorgehoben, RBS mit Sternchen markiert) und den Condons für die Aminosäuren MetLys (gelb hervorgehoben). Am 3'-Ende wurde eine *BsaI*-Schnittstelle eingefügt. Als *Template* diente das Plasmid pPDI4 (mRNA Sequenz: BC010859.1). Durch die PCR-Reaktion neu eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

BsaI ist ein Typ IIS Restriktionsenzym, das außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet und einen 5'-Überhang aus 4 Nukleotiden generiert. Die Sequenz des *Reverse-Primers* wurde derart gewählt, dass das Enzym beim Schneiden einen 5'-AGCT-Überhang generiert, der kompatibel mit dem gleichartigen Überhang einer *HindIII*-Restriktionsschnittstelle ist. Nach Verdau des PCR-Fragments mit *HindIII* und *BsaI* konnte es anschließend in die mit *HindIII* linearisierten Plasmide pASK75-T7RBS-His₆-OmCI und pASK75-T7RBS-His₆-PAS#1(600)-OmCI inseriert werden. Die entstandenen Vektoren wurden als pASK-T7RBS-His₆-OmCI-PDI und pASK75-T7RBS-His₆-PAS600-OmCI-PDI bezeichnet (Abbildung 42). Von ausgewählten Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert; korrekte Konstrukte wurden durch Restriktionsverdau mit *XbaI/XhoI* überprüft, und die inserierte DNA-Sequenz wurde mittels Sequenzierungsreaktion mit den *Primern* PR1 und NK_PDI_seq_r überprüft.

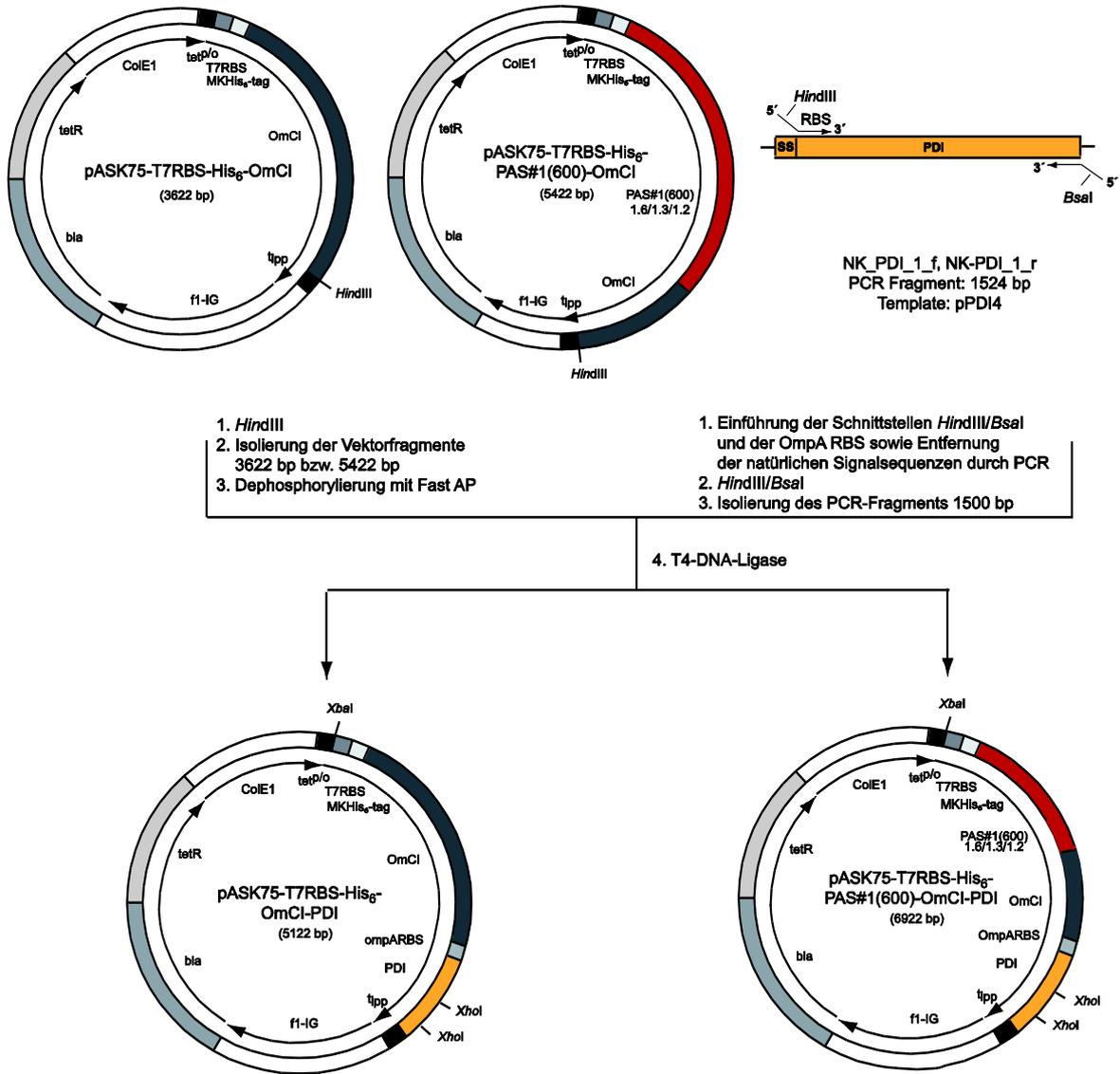


Abbildung 42: Konstruktion von pASK75-T7RBS-His₆-OmCI-PDI und pASK75-T7RBS-His₆-PAS#1(600)-OmCI-PDI. Die Genkassetten für die eukaryotische PDI wurde mittels PCR aus dem Plasmid pPDI4 amplifiziert (siehe Abbildung 41) und nach Verdau mit *Hind*III und *Bsa*I in die mit *Hind*III linearisierten Plasmide pASK75-T7RBS-His₆-OmCI und pASK75-T7RBS-His₆-PAS#1(600)-OmCI inseriert. Die entstandenen Vektoren wurden als pASK-T7RBS-His₆-OmCI-PDI und pASK75-T7RBS-His₆-PAS600-OmCI-PDI bezeichnet. Das dicistronische Operon steht unter der Kontrolle des *tet*-Promotor/Operator-Systems.

Für die Insertion von DsbC wurde analog vorgegangen. Das Gen wurde ohne Signalsequenz aus dem Plasmid pTUM4 amplifiziert. Die Koexpression dieser Disulfidisomerase zeigte aber keine erkennbare Verbesserung der Löslichkeit von OmCI und war gegenüber der PDI unterlegen (Klonierung und Expressionsexperimente nicht gezeigt).

3.3.2.2 Cytoplasmatische Produktion in *E. coli* und Proteinreinigung

In Vorexperimenten mit pASK-T7RBS-His₆-OmCI-PDI wurde die Expressionstemperatur variiert, um optimale Bedingungen zur Herstellung von MK-His₆-OmCI in Origami B in Gegenwart der Disulfidisomerase PDI zu finden. Die Experimente wurden im 2 l-Maßstab bei 22 °C, 30 °C und 37 °C durchgeführt; außerdem wurde jeweils die Expressionsdauer nach Induktionszeitpunkt zwischen 3 h, 5 h und über Nacht variiert (nicht gezeigt). Jeweils 50 ml der Expressionskulturen wurden durch Zentrifugation geerntet, in der *French Press* aufgeschlossen, und nach Abtrennung der Zelltrümmer und unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation wurde die Menge an löslichem MKHis₆-OmCI in den geklärten Cytoplasma-Extrakten durch nicht-reduzierende SDS-PAGE-Analyse bestimmt. Die intensivste Proteinbande für MK-His₆-OmCI fand sich nach der Expression bei 22 °C über Nacht (nicht gezeigt).

Zur präparativen cytoplasmatischen Produktion von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI wurden *E. coli* Origami B Zellen mit dem jeweiligen Expressionsplasmid pASK75-T7RBS-His₆-OmCI-PDI bzw. pASK75-T7RBS-His₆-PAS#1(600)-OmCI-PDI transformiert, und die Proteinproduktion unter Koexpression des Faltungshelfers PDI erfolgte im 2 l-Maßstab (Abschnitt 2.5.1). Die Proteinexpression erfolgte nach Induktion mit aTc bei 22 °C, nach ca. 24 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und durch Gesamtzellaufschluss mittels *French Press* die entsprechenden Cytoplasma-Extrakte erhalten.

Das Zellwachstum wurde durch regelmäßige Messung der OD₅₅₀ überwacht und die Proteinbiosynthese wurde in Gesamtzellextrakten nach Induktion sowie im finalen Cytoplasma-Extrakt durch reduzierende SDS-PAGE untersucht. Die Zellen wiesen exponentielles Wachstum auf und erreichten nach ca. 10 h (pASK75-T7RBS-His₆-OmCI-PDI) bzw. nach ca. 11 h (pASK75-T7RBS-His₆-PAS#1(600)-OmCI-PDI) eine Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,6 (Abbildung 43A), bei der die Biosynthese von MKHis₆-PAS(600)-OmCI und MKHis₆-OmCI mit 200 µg/l aTc induziert wurde.

Das weitere Wachstumsverhalten der zwei Kulturen war bis zur Ernte sehr unterschiedlich. Die MKHis₆-OmCI und PDI koexprimierenden Zellen zeigten über die gesamte Produktionszeit exponentielles Wachstum bis zu einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 4,4 zum Erntezeitpunkt nach 23 h. Die MKHis₆-PAS(600)-OmCI und PDI koexprimierenden Zellen dagegen erreichten schon nach 4 h die stationäre Phase bei einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 1,5, welche bis zum Erntezeitpunkt nach 24 h konstant blieb.

Wie durch SDS-PAGE erkennbar, nahm die Menge an rekombinanten MKHis₆-OmCI (Abbildung 43B) bzw. MKHis₆-PAS(600)-OmCI (Abbildung 43C) im Gesamtzellextrakt im Anschluß an die Induktion bis zum Erntezeitpunkt deutlich zu. Die eukaryotische PDI wurde hingegen nur schwach exprimiert. Die Ernte der Zellkulturen erfolgte durch Zentrifugation, und die sedimentierten Zellen wurden bis zum Zellaufschluß bei -20 °C eingefroren.

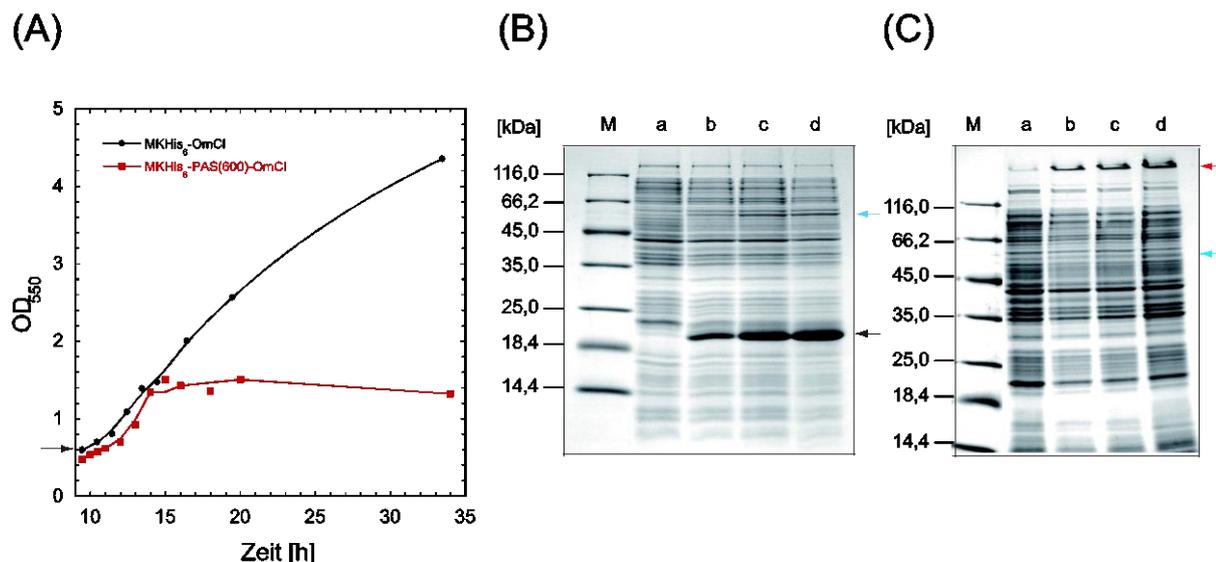


Abbildung 43: Cytoplasmatische Produktion von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI im 2 l-Maßstab in *E. coli* Origami B. (A) Geglättete Wachstumskurve der Bakterienkultur. Die Zelldichte ($OD_{550} = 0,6$) bei Induktion ist markiert. Die Ernte erfolgte zum Zeitpunkt der letzten Messung. (B) Reduzierende SDS-PAGE zur Analyse der Proteinbiosynthese von MKHis₆-OmCI. Die Spuren a bis d stellen den Gesamtzellextrakt zu verschiedenen Expressionszeiten dar. a: Kultur zum Zeitpunkt der Induktion, b: 5 h Expression, c: 9 h Expression, d: 24 h Expression. (C) Reduzierende SDS-PAGE zur Analyse der Proteinbiosynthese von MKHis₆-PAS(600)-OmCI. Die Spuren a bis d stellen den Gesamtzellextrakt zu verschiedenen Expressionszeiten dar. a: Kultur zum Zeitpunkt der Induktion, b: 5 h Expression, c: 9 h Expression, d: 23 h Expression, M: bezeichnet den Proteinmarker. Die Laufhöhen der drei überexprimierten Proteine MKHis₆-OmCI (Bande bei ca. 19 kDa; schwarz) und MKHis₆-PAS(600)-OmCI (Bande bei 116 kDa; rot) und PDI (Bande bei ca. 55 kDa; hellblau) sind jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Zur Herstellung der cytoplasmatischen Proteinfraktion wurden die sedimentierten Zellen in 20–30 ml Cytoplasma-Aufschlusspuffer (40 mM NaPi pH 7,5, versetzt mit 0,2 mM AEBSF) resuspendiert und mit der *French Press* aufgeschlossen. Zelltrümmer und Proteinpräzipitate wurden durch Zentrifugation und anschließende 0,45 µm-Mikrofiltration geklärt.

Die weitere Reinigung beider Proteine erfolgte in drei Schritten (MKHis₆-OmCI, Abbildung 44; MKHis₆-PAS(600)-OmCI, Abbildung 45): 1. IMAC, 2. IEX und 3. SEC. Alle Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE überprüft; die Identität und Reinheit der finalen Proteinpräparation wurde zudem durch ESI-MS verifiziert (Abbildung 46).

Allerdings wurde der zweite Reinigungsschritt auf unterschiedliche Weise durchgeführt. Als Ionenaustauscher-Schritt wurde bei MKHis₆-OmCI die zuvor etablierte Reinigung (Abschnitt 3.3.1.2) mittels AEX bei neutralem pH (7,5) gewählt, da das Protein mit seinem sauren pI von 5,1 unter diesen Bedingungen mit negativer Nettoladung vorliegt und gut an das Säulenmaterial bindet. Da sich bei den PASylierten OmCI-Varianten aus *P. pastoris* (Abschnitt 3.3.1.2) bzw. HEK293-Zellkultur (Kammerer, 2013) gezeigt hatte, dass diese eine geringe Affinität gegenüber dem Anionenaustauscher besaßen, wurde für MKHis₆-PAS(600)-OmCI stattdessen ein Kationenaustauscher bei leicht saurem pH von 6,0 gewählt. Bei PASylierten Proteinen war bereits häufiger beobachtet worden, dass sie gut an CEX-Säulen binden (nicht veröffentlicht). Darüber hinaus bot dieser Schritt den Vorteil, dass während der Dialyse gegen den sauren CEX-Puffer bereits ein großer Teil der Wirtszellproteine von

Origami B ausfielen; ähnliches war bei dem cytoplasmatisch produzierten PASylierten MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant beobachtet worden (Abschnitt 3.2.1.4).

Für den ersten Reinigungsschritt von MKHis₆-OmCI (IMAC, Abschnitt 2.7.1.1) wurde der geklärte Cytoplasma-Extrakt (in Cytoplasma-Aufschlusspuffer) auf eine Ni-Sepharose High Performance Säule (5 ml Bettvolumen) aufgetragen. Zur Entfernung des Großteils der unspezifisch gebundenen Wirtszellproteinen, wurde eine Vorelution mit 15 mM Imidazol durchgeführt (Abbildung 44A, Peak 1). Das nicht PASylierte MKHis₆-OmCI wurde anschließend mit einem linearen Gradienten von 15 bis 300 mM Imidazol eluiert. MKHis₆-OmCI eluierte bei ca. 150 mM (Abbildung 44A, Peak 1) und erschien in der SDS-PAGE als nahezu reines Protein (Abbildung 44D, Spur c).

Für den zweiten Reinigungsschritt von MKHis₆-OmCI (AEX, Abschnitt 2.7.1.4) wurden die IMAC-Fractionen 29 bis 32 vereinigt (IMAC-Eluat), anschließend zweimal gegen 100-fach AEX-Laufpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) dialysiert, die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt und die Lösungen sterilfiltriert (0,2 µm). Mit einem berechneten pI-Wert von 5,07 adsorbierte das MKHis₆-OmCI mit seiner negativen Oberflächenladung bei pH 7,5 sehr stark an die quartären Ammonium-Gruppen der Resource Q-Säule (6 ml Bettvolumen) und eluierte nach Anlegen eines NaCl-Konzentrationsgradienten von 0–300 mM NaCl bei ca. 170 mM NaCl (Abbildung 44B, Peak 2) in einem homogenen Peak. Dessen Analyse durch SDS-PAGE zeigte sehr reines Protein (Abbildung 44D, Spuren d und h). Noch im IMAC-Eluat enthaltene kleinere Verunreinigungen eluierten früher bei 80 mM NaCl (Abbildung 44B, Peak 1) und konnten demnach in diesem Schritt sehr gut abgetrennt werden.

Der dritte Reinigungsschritt von MKHis₆-OmCI (SEC, Abschnitt 2.7.1.5) diente hauptsächlich der Analyse des Oligomerisierungszustandes und der Umpufferung. Hierzu wurde das vereinigte AEX-Eluat (Fraktionen 24 bis 27) konzentriert und MKHis₆-OmCI an einer Superdex 75 10/300 GL (24 ml Säulenvolumen) in PBS als Laufpuffer nach Größe aufgetrennt (Abbildung 44C). MKHis₆-OmCI lag ausschließlich als Monomer und in hoher Reinheit vor, es eluierte bei einem Elutionsvolumen von 10,76 ml, was basierend auf einer Kalibrierung mit Standardproteinen erwartungsgemäß einer apparenten Molekülmasse von ca. 18 kDa entsprach. Entsprechend der SDS-PAGE-Analyse lag die Reinheit der finalen Proteinpräparation (Fraktionen 9 bis 12 = SEC-Eluat) bei >95 % (Abbildung 44D, Spur e und i).

Zusätzlich wurden das AEX-Eluat und das SEC-Eluat durch SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen untersucht (Abbildung 44D, Spuren h und i). Proteine mit ausgebildeten Disulfidbrücken migrieren unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der Regel etwas schneller als unter reduzierenden Bedingungen, da sie kompakter vorliegen.

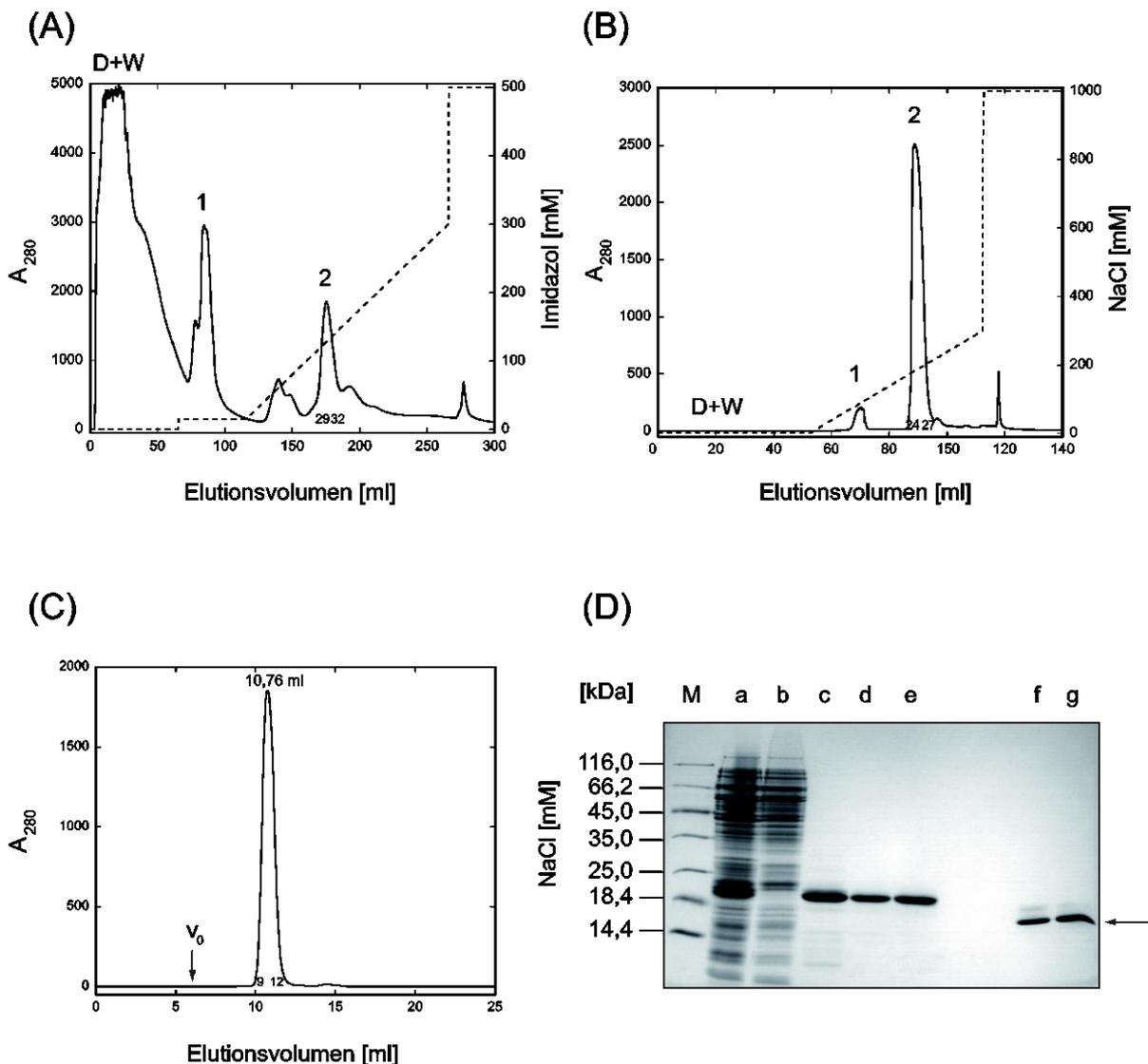


Abbildung 44: Chromatographische Reinigung von MKHis₆-OmCI. (A) IMAC-Reinigung an Ni-Sepharose High Performance. Durchlauf- (D) und Waschfraktion (W) repräsentieren den Proteinanteil, der nicht an die IMAC-Säule bindet. Durch Vorelution mit 15 mM Imidazol wurde ein Großteil der unspezifisch gebundenen Wirtszellproteine abgetrennt (Peak 1). Die Elution erfolgte mit einem Konzentrationsgradienten von 15-300 mM Imidazol (Peak 2). (B) AEX-Reinigung an Resource Q. Die Elution erfolgte bei pH 7,5 mit 0-300 mM NaCl. MKHis₆-OmCI eluierte als Peak 2. (C) SEC-Reinigung an Superdex 75 10/300 GL (24 ml Bettvolumen). V_0 markiert das SEC-Ausschlussvolumen. MKHis₆-OmCI eluierte als Monomer und in hoher Reinheit bei 10,76 ml. (D) Zusammenfassende SDS-PAGE-Analyse aller Reinigungsschritte. M: Proteinmarker, a: löslicher Cytoplasma-Extrakt, b: Durchlauf IMAC (D+W), c: IMAC-Eluat (Peak 2, Fraktionen 29-32), d: AEX-Eluat (Peak 2, Fraktionen 24-27 reduzierend), e: SEC-Eluat (Fraktionen 9-12; reduzierende Bedingungen); f: AEX-Eluat (Peak 2, Fraktionen 24-27; nicht-reduzierend), g: SEC-Eluat (Fraktionen 9-12; nicht-reduzierende Bedingungen). Die erzielte Reinheit von MKHis₆-OmCI lag bei >95 %.

Diese Annahme bestätigte sich für das nicht PASylierte MKHis₆-OmCI, das unter reduzierenden Bedingungen bei einer apparenten Molmasse von 19 kDa erschien, aber unter nicht-reduzierenden Bedingungen bei 15 kDa. Dies ließ darauf schließen, dass die drei Disulfidbrücken korrekt ausgebildet waren. Um dies noch genauer zu untersuchen, wurde eine ESI-MS-Analyse (Abschnitt 2.9.1) durchgeführt.

Für den ersten Reinigungsschritt von MKHis₆-PAS(600)-OmCI durch IMAC (Abschnitt 2.7.1.1) wurde der geklärte Cytoplasma-Extrakt (in Cytoplasma-Aufschlusspuffer) auf eine Ni-Sepharose High Performance Säule mit einem größeren Bettvolumen (15 ml) aufgetragen. Ein Großteil der unspezifisch gebundenen Wirtszellproteinen wurde erneut durch Vorelution mit 15 mM Imidazol entfernt (Abbildung 45A, Peak 1). Das PASylierte MKHis₆-PAS(600)-OmCI wurde anschließend mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 15 bis 150 mM Imidazol eluiert. Es eluierte über einen breiteren Bereich von 30 bis 80 mM (Abbildung 45A, Peak 2) mit noch einigen unspezifisch gebundenen Wirtszellproteinen (Abbildung 45D, Spur c).

Für den zweiten Reinigungsschritt von MKHis₆-PAS(600)-OmCI (CEX, Abschnitt 2.7.1.4) wurden die IMAC-Fractionen 22 bis 28 vereinigt (IMAC-Eluat), anschließend dreimal gegen 100-fach CEX-Laufpuffer (20 mM MES/NaOH pH 6,0, 1 mM EDTA) dialysiert, die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt und die Lösung sterilfiltriert (0,2 µm). Die Dialyse führte zu einer weiteren effizienten Abtrennung von Wirtszellproteinen (vergleiche Abbildung 45D, Spuren c und d). Mit einem berechneten pI-Wert von 5,07 adsorbierte das MKHis₆-PAS(600)-OmCI überraschenderweise trotz dem höheren pH 6,0 stark an die ebenfalls negativ geladenen Methylsulfonat-Gruppen der Resource S-Säule (6 ml Bettvolumen) und eluierte nach Anlegen eines NaCl-Konzentrationsgradienten von 0 bis 500 mM NaCl bei einer hohen Salzkonzentration zwischen 220 bis 300 mM NaCl (Abbildung 45B, Peak 3).

Im vorderen Teil des Hauptpeaks erschien es in der SDS-PAGE als reines Protein (Abbildung 45D, Spur d), in der hinteren Schulter des Hauptpeaks eluierten dagegen verkürzte Proteinvarianten. MKHis₆-PAS(600)-OmCI konnte so wiederum effizient von kleineren Verunreinigungen und aggregierten/oligomeren Varianten abgetrennt werden (Abbildung 45B, Peak 1 und 2).

Für den letzten Reinigungsschritt von MKHis₆-PAS(600)-OmCI (SEC, Abschnitt 2.7.1.5) wurde das vereinigte CEX-Eluat (Fraktionen 38 bis 42) konzentriert und an einer Superdex 200 pg HiLoad 26/60 (320 ml Säulenvolumen) in PBS als Laufpuffer nach Größe aufgetrennt (Abbildung 45C). MKHis₆-PAS(600)-OmCI lag ausschließlich als Monomer und in hoher Reinheit vor, es eluierte bei einem Elutionsvolumen von 150,73 ml. Entsprechend der SDS-PAGE-Analyse lag die Reinheit der finalen Proteinpräparation (Fraktionen 2 bis 6 = SEC-Eluat) bei >95 % (Abbildung 45D, Spur e).

Wie für das nicht PASylierte OmCI wurden das CEX-Eluat und das SEC-Eluat durch nicht-reduzierende SDS-PAGE untersucht (Abbildung 45D, Spuren h und i), um die korrekte Ausbildung der drei Disulfidbrücken in nativen Protein zu untersuchen. Auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen war für MKHis₆-PAS(600)-OmCI nur eine einzelne Bande (>200 kDa) erkennbar; es lagen daher scheinbar keine Disulfid-Isomere in der Proteinpräparation vor.

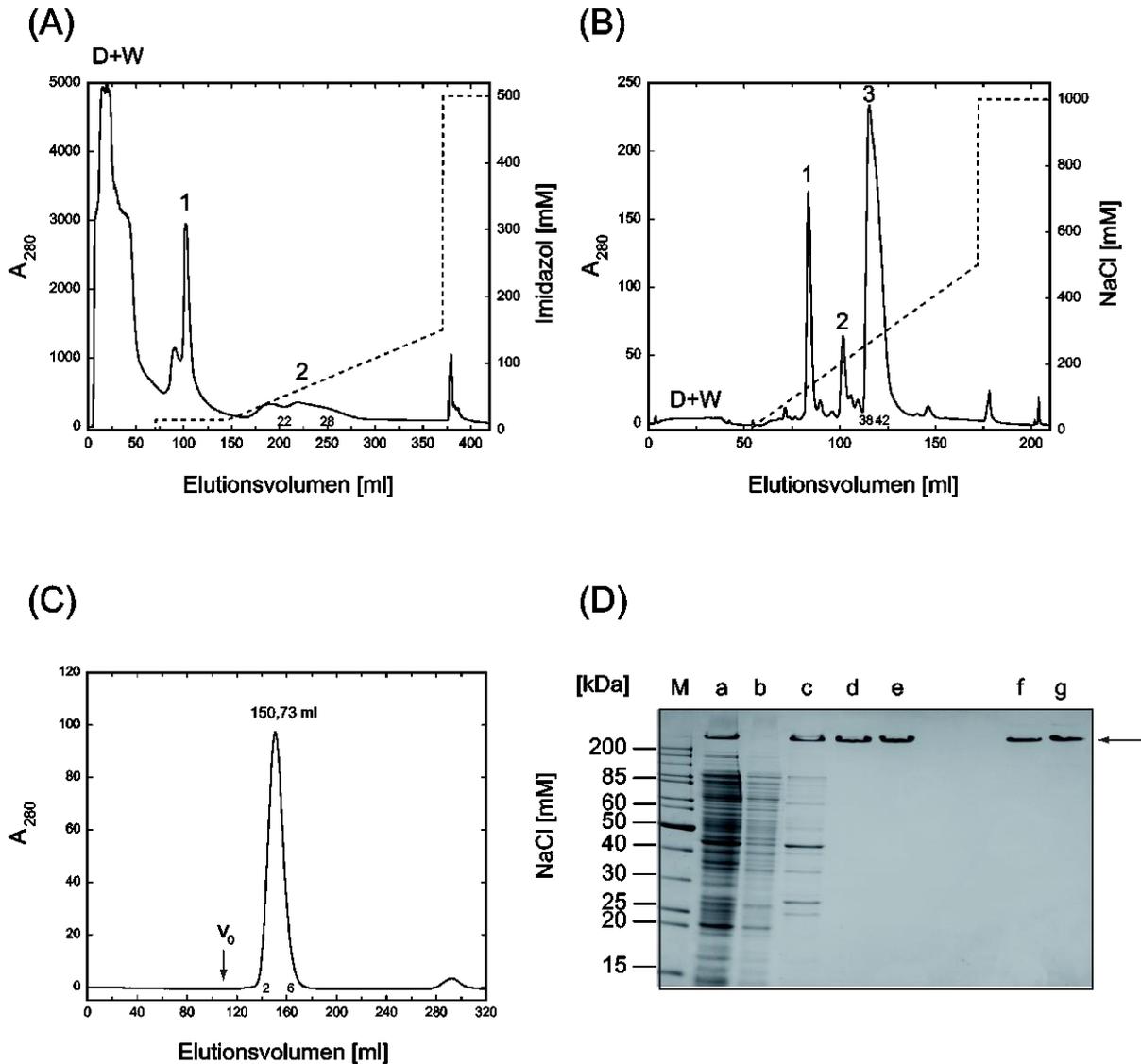


Abbildung 45: Chromatographische Reinigung von MKHis₆-PAS(600)-OmCI. (A) IMAC-Reinigung an Ni-Sepharose High Performance. Durchlauf- (D) und Waschfraktion (W) repräsentieren den Proteinanteil, der nicht an die IMAC-Säule bindet. Durch Vorelution mit 15 mM Imidazol wurde ein Großteil der unspezifisch gebundenen Wirtszellproteine abgetrennt (Peak 1). Die Elution erfolgte mit einem Konzentrationsgradienten von 15-150 mM Imidazol (Peak 2). (B) CEX-Reinigung an Resource S. Die Elution erfolgte bei pH 6,0 mit 0-500 mM NaCl. MKHis₆-PAS(600)-OmCI eluierte als Peak 3. (C) SEC-Reinigung an Superdex 200 pg HiLoad 26/60 (320 ml Bettvolumen). V₀ markiert das SEC-Ausschlussvolumen. MKHis₆-PAS(600)-OmCI eluierte als Monomer und in hoher Reinheit bei 150,73 ml. (D) Zusammenfassende SDS-PAGE-Analyse aller Reinigungsschritte. M: Proteinmarker, a: löslicher Cytoplasma-Extrakt, b: Durchlauf IMAC (D+W), c: IMAC-Eluat (Peak 2, Fraktionen 22-28), d: CEX-Eluat (Peak 2, Fraktionen 38-42; reduzierend), e: SEC-Eluat (Fraktionen 2-8; reduzierende Bedingungen), f: CEX-Eluat (Peak 2, Fraktionen 38-42; nicht-reduzierend), g: SEC-Eluat (Fraktionen 2-8; nicht-reduzierende Bedingungen). Die erzielte Reinheit von MKHis₆-PAS(600)-OmCI lag bei >95 %.

Da PASylierte Proteine in der SDS-PAGE generell eine sehr große apparente Molekülmasse aufweisen (Harari *et al.*, 2014b; Mendler *et al.*, 2015; Morath *et al.*, 2015; Schlapschy *et al.*, 2013), ist eine eindeutige Unterscheidung von Isomeren hier allerdings schwierig. Um diese genauer zu untersuchen, wurde eine ESI-MS-Analyse durchgeführt.

Die Ausbeute des beschriebenen Expressionsexperiments im 2 l-Maßstab lag bei 3,5 mg für MKHis₆-OmCI und bei 10 mg für MKHis₆-PAS(600)-OmCI; dies entspricht 0,4 mg l⁻¹ OD₅₅₀⁻¹ für MKHis₆-OmCI und bei 3,8 mg l⁻¹ OD₅₅₀⁻¹ für MKHis₆-PAS(600)-OmCI.

Zur abschließenden Bestätigung der Identität und Reinheit von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI sowie der Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken wurden die intakten Molekülmassen nach Dialyse der Proteine gegen 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (NH₄HCO₃) pH 7,9 mittels Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) bestimmt (Abschnitt 2.9.1.1).

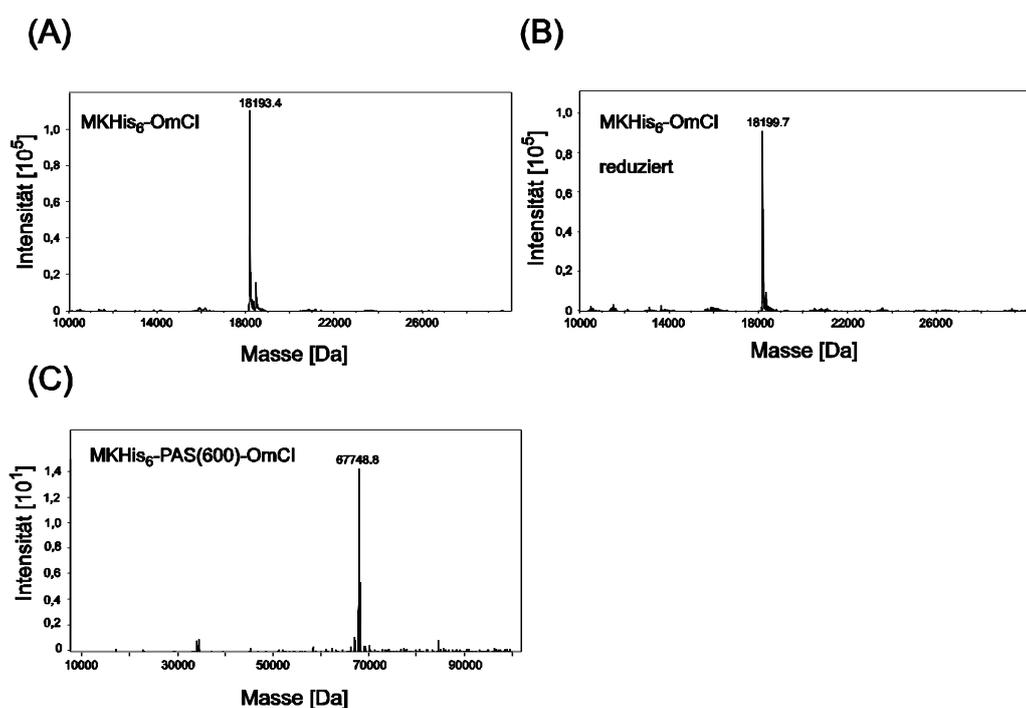


Abbildung 46: ESI-MS Spektren der gereinigten Proteine MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI aus cytoplasmatischer Expression. MKHis₆-OmCI; (A) oxydiert: berechnete Masse 18194,1 Da, $\Delta m = -0,7$ Da; (B) reduziert: berechnete Masse 18200,1 Da, $\Delta m = +0,4$ Da; Der gemessene Unterschied von +6,3 Da belegt die Ausbildung aller drei Disulfidbrücken. MKHis₆-PAS(600)-OmCI; (C) oxydiert: berechnete Masse 67749,3 Da, $\Delta m = -0,5$ Da.

Als Masse von MKHis₆-OmCI wurde 18193,4 Da (Abbildung 46A) bestimmt, was der berechneten Masse des nativen Proteins mit seinen drei Disulfidbrücken entsprach (18194,1 Da). Um die Ausbildung der drei Disulfidbrücken weiter zu bestätigen, wurde eine Probe parallel nach Zugabe und Inkubation mit 5 mM DTT als Reduktionsmittel gemessen. Das reduzierte MKHis₆-OmCI wies erwartungsgemäß eine Massendifferenz von +6,3 Da (18199,7-18193,4 Da) gegenüber dem nicht reduzierten Protein auf, im Einklang mit der Ausbildung aller drei Disulfidbrücken (Abbildung 46B). Die Masse des PASylierten Proteins MKHis₆-PAS(600)-OmCI wurde zu 67748,8 Da (Abbildung 46C) ermittelt, was gut mit der berechneten oxydierten Masse von 67749,3 Da übereinstimmte.

3.3.3 Biophysikalische und funktionelle Charakterisierung

3.3.3.1 Hydrodynamische Charakterisierung

Um den Effekt des PAS(600)-Polymers auf das hydrodynamische Volumen des Fusionsproteins zu untersuchen, wurden die jeweiligen apparenten Molekülmassen von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI mittels SEC (Abschnitt 2.7.1.5) und DLS (Abschnitt 2.9.4) bestimmt.

Die analytische SEC wurde mit beiden Proteinpräparationen an einer Superdex 200 10/300 GL-Säule mit 24 ml Bettvolumen in PBS als Laufpuffer durchgeführt (Abbildung 47). Zur Bestimmung der apparenten Molekülmassen war die Säule mit einer Reihe von Standardproteinen kalibriert worden (Abschnitt 3.1.2.1).

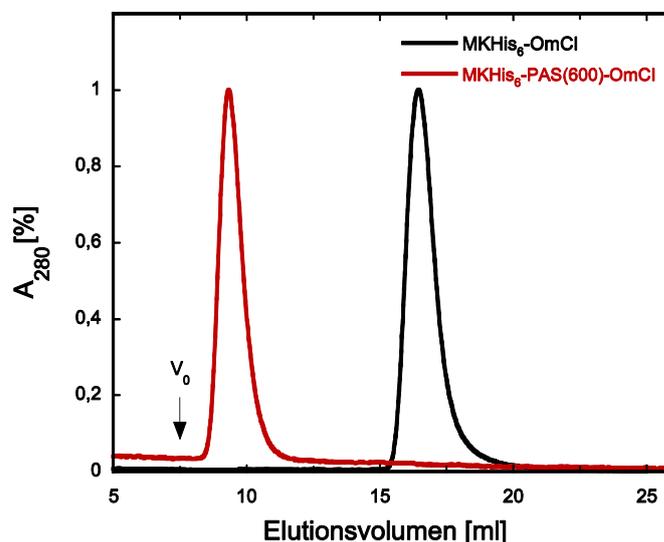


Abbildung 47: SEC-Profil von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI an Superdex 200 10/300 GL. Das SEC-Ausschlussvolumen $V_0 = 7,53$ ml ist markiert (Bettvolumen: 24 ml). Das Probenvolumen betrug jeweils 225 μ l bei einer Proteinkonzentration von 0,25 mg/ml. Die PASylierte Variante weist ein extrem niedriges Elutionsvolumen im Vergleich zum nicht PASylierten OmCI auf.

Beide Proteine wiesen einen monomeren Elutionspeak auf. Für MKHis₆-OmCI wurde eine apparente Molekülmasse von 23,6 kDa bestimmt (berechnete Molekülmasse: 18,2 kDa) und für MKHis₆-PAS(600)-OmCI eine apparente Molekülmasse von 580 kDa (berechnete Molekülmasse: 67,8 kDa). Das Verhältnis von apparerter zu theoretischer Molekülmasse (= Vergrößerungsfaktor $M_{app.}/M_{theor.}$) betrug demnach 8,6 für das PASylierte OmCI.

Als unabhängige Methode zur Bestimmung der apparenten Molekülmasse wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS, Abschnitt 2.9.4) der hydrodynamische Radius von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI ermittelt. Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung an einem Zetasizer Nano-S-Gerät bei einer Proteinkonzentration von 0,3–0,5 mg/ml in CD/DLS-Puffer (5 mM KP_i pH 7,5, 50 mM K₂SO₄) bei 25 °C. Mit Hilfe der Zetasizer Software wurden daraus die apparenten Molekülgrößen und -massen der Proteine

berechnet. Es ergaben sich hydrodynamische Radien von 2,8 nm für das nicht PASylierte MKHis₆-OmCI und von 9,3 nm für das PASylierte MKHis₆-PAS(600)-OmCI; dies entspricht apparenten Molekülmassen von 37,4 kDa für MKHis₆-OmCI (berechnete Molekülmasse: 18,2 kDa) bzw. 621 kDa für MKHis₆-PAS(600)-OmCI (berechnete Molekülmasse: 67,8 kDa). Das Verhältnis von apparenter zu theoretischer Molekülmasse ($M_{\text{app.}}/M_{\text{theor.}}$) betrug demnach 9,2 für das PASylierte OmCI.

Tabelle 14. Übersicht über die apparenten Molekülmassen von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI anhand von SEC und DLS. Die apparenten Molekülmassen wurden anhand der durch SEC bestimmten Elutionsvolumina (V_e) und der durch DLS bestimmten hydrodynamischen Radien (r_H) berechnet. Die starke Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens durch das ungeordnete PAS#1(600)-Polymer wird anhand des Verhältnisses von apparenter zu theoretischer Molekülmasse ersichtlich.

Protein	SEC				DLS		
	$M_{\text{theor.}}^a$ [kDa]	V_e [ml]	$M_{\text{app.}}^b$ [kDa]	Faktor $M_{\text{app.}}/M_{\text{theor.}}$	r_H [nm]	$M_{\text{app.}}^c$ [kDa]	Faktor $M_{\text{app.}}/M_{\text{theor.}}$
MKHis ₆ -OmCI	18,2	16,41	23,6	1,3	2,8	37,4	2,1
MKHis ₆ -PAS(600)-OmCI	67,8	9,43	580	8,6	9,3	621	9,2

^a Theoretische Molekülmasse des oxidierten Proteins, berechnet mit Hilfe des Programms ProtParam (www.expasy.org)

^b Apparente Molekülmasse, berechnet aus den SEC-Elutionsvolumina und einer Kalibriergeraden mit globulären Standardproteinen

^c Apparente Molekülmasse, berechnet aus den hydrodynamischen Radien (r_H) mit Hilfe der DLS-Software (Zetasizer Software 6.32)

Zusammenfassend betrachtet stimmten die Ergebnisse zur hydrodynamischen Charakterisierung der OmCI-Varianten zwischen SEC und DLS gut überein (Tabelle 14) und belegen, ähnlich wie schon bei den Interferon-Varianten (siehe Abschnitt 3.1.2.1 und Abschnitt 3.2.2.2), dass das PAS(600)-Polymer ein kleines Protein von ca. 20 kDa drastisch vergrößert.

3.3.3.2 Konformationsanalyse

Zum Vergleich der Sekundärstruktur der PASylierten und der nicht PASylierten OmCI-Variante wurden beide Proteinpräparationen mittels Circular dichroismus (CD) Spektroskopie untersucht. Circular dichroismus bezeichnet eine Eigenschaft optisch aktiver Moleküle, bei der circular polarisiertes Licht in Abhängigkeit seiner Drehrichtung (linkshändig circular bzw. rechtshändig circular polarisiert) beim Durchtritt durch das optisch aktive Medium unterschiedlich stark absorbiert wird. Diese Absorptionsdifferenz wird in der CD-Spektroskopie für Licht verschiedener Wellenlängen als Elliptizität gemessen und erlaubt im Fall von Proteinen Rückschlüsse auf deren Sekundärstruktur. Bei der CD-Spektroskopie an Proteinen unterscheidet man einerseits die Absorptionseigenschaften der Peptidbindung im Fern-UV-Bereich (180 bis 270 nm) und andererseits die Absorptionseigenschaften der aromatischen Seitenketten im Nah-UV-Bereich (250 bis 350 nm). Letztere erlauben eine Beurteilung ihrer molekularen Umgebung. CD-Spektren im Absorptionsbereich der Peptidbindung ergeben dagegen Aufschluss über den Sekundärstrukturgehalt eines Proteins und ermöglichen eine Abschätzung des jeweiligen Anteils der unterschiedlichen

Sekundärstrukturelemente, in diesem Fall hauptsächlich β -Faltblatt-Elemente für MKHis₆-OmCI und ein zusätzliches *Random-Coil*-Element für MKHis₆-PAS(600)-OmCI.

Proben von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI wurden in 50 mM K₂SO₄, 5 mM K-P_i pH 7,5 umgepuffert; CD-Spektren wurde mit Hilfe eines J-810 CD-Spektropolarimeters bei 25 °C im Fern-UV Bereich von 190 bis 250 nm aufgenommen. Die Messwerte für die Elliptizität (in mdeg) bei variierender Wellenlänge λ wurden zunächst durch Subtraktion des Pufferspektrums bereinigt und in die molare Elliptizität (Θ_M ; in deg cm² mmol⁻¹) umgerechnet.

Das CD-Spektrum für das nicht PASylierte OmCI entsprach dem typischen Spektrum eines Proteins mit β -Faltblatt-Struktur mit einem Eliptizitätsmaximum bei 190 nm und einem breiten Minimum bei 211 nm (Abbildung 48), welches den publizierten Fern-UV CD Spektren von rekombinanten humanen Lipocalinen ähnelt, ins besondere dem des humanen Tränenlipocalins (Breustedt *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu zeigte das PASylierte MKHis₆-PAS(600)-OmCI ein prominentes Minimum bei 201 nm. Um die Struktur des isolierten PAS(600)-Polymers daraus abzuleiten wurde ein molares Differenzspektrum durch Subtraktion des OmCI-Spektrums von dem des PAS(600)-OmCI berechnet. Dieses wies ein Minimum bei 199 nm auf, was auf reine *Random-Coil*-Struktur hindeutete und im Einklang mit den Ergebnissen vorangegangener Studien stand (Morath *et al.*, 2015; Schlapschy *et al.*, 2013).

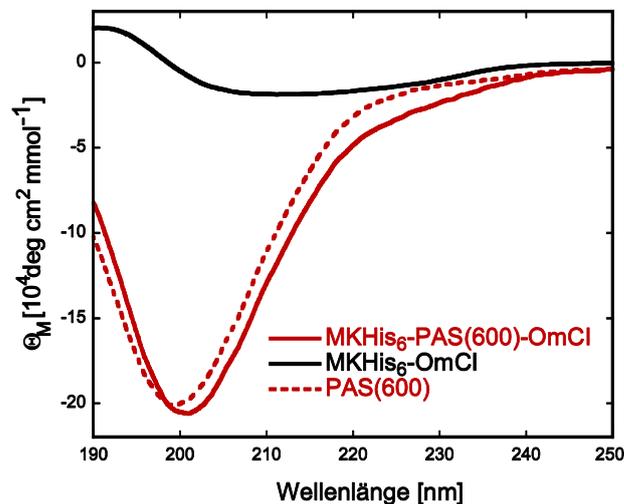


Abbildung 48: CD-Spektren von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI. Die CD-Spektren wurden in 50 mM K₂SO₄, 5 mM K-P_i pH 7,5 mit einem J-810 CD-Spektropolarimeters aufgenommen. Das molare Differenzspektrum für "PAS(600)" wurde durch Subtraktion des CD-Spektrums von MKHis₆-OmCI von dem des MKHis₆-PAS(600)-OmCI erhalten. Es zeigte sich ein Minimum bei 199 nm, was auf die reine *Random-Coil*-Struktur des PAS#1(600)-Polymers hindeutete.

Wie schon in der Arbeit von Breibeck (2016) beschrieben, fehlte dem PAS(600)-Spektrum ebenfalls ein Maximum bei etwa 225 nm, welches eigentlich für eine reine *Random-Coil*-Struktur zu erwarten wäre (Tiffany & Krimm, 1969). Daher entspricht das PAS(600)-Spektrum eher einer „ungeordneten Polyprolin-Struktur“, die nur ein ausgeprägtes Minimum bei 200 nm aufweist (Tiffany & Krimm, 1968) und sich durch *Random-Coil*- so wie Polyprolin(II)-Strukturanteile auszeichnet. In der Fachliteratur wird eine reine *Random-Coil*-Struktur in wässriger Lösung allerdings auch nur selten für Polypeptide beobachtet.

3.3.3.3 Untersuchung der hydrophilen Proteineigenschaften

Der Effekt des PAS(600)-Polymers auf die hydrophilen Eigenschaften des Fusionsproteins mit OmCI wurde mittels RPC-Chromatographie untersucht (Abschnitt 2.7.1.6). Hierbei adsorbieren die getesteten Proteine an die hydrophobe stationäre Polystyrol-Matrix der Chromatographie-Säule (Resource RPC) und werden mit einem steigenden Acetonitril-Gehalt im Laufpuffer eluiert (Horvath & Melander, 1977).

200 µg der rekombinanten Proteinproben (MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI) wurden durch Verdünnung mit 2-fach konzentriertem Laufpuffer auf den verwendeten RPC-Laufpuffer (2 % (v/v) ACN, 0,065 % (v/v) Trifluoressigsäure, TFA) eingestellt (Probenvolumen: 400 µl für MKHis₆-OmCI und 500 µl für MKHis₆-PAS(600)-OmCI) und auf eine Resource RPC-Säule (Bettvolumen: 1 ml) aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem Konzentrationsgradienten von 0 bis 100 % RPC-Elutionspuffer (80 % (v/v) ACN, 0,05 % TFA). Die Absorption der Proteine wurde bei 280 nm verfolgt.

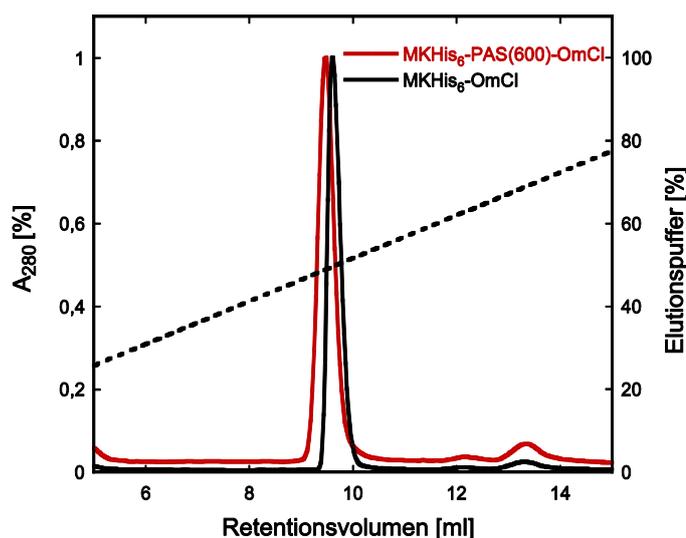


Abbildung 49: RPC-Analyse von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI. Das Bettvolumen der Resource RPC-Säule betrug 1 ml, und es wurde ein Konzentrationsgradient von 2 bis 80 % (v) ACN (dargestellt als gestrichelte Linie) über 20 Säulenvolumina bei einer Flussrate von 2 ml/min angelegt.

Beide Proteinpräparationen zeigten jeweils einen einzelnen, symmetrischen Peak (Abbildung 49) mit nahezu gleichem Retentionsvolumen. Das PASylierte OmCI (40,1 % ACN) eluierte

minimal früher von der RPC-Säule als das nicht PASylierte OmCI (40,8 % ACN). Dies zeigte, dass das PAS(600)-Polypeptid einerseits selbst sehr hydrophil ist und dass es andererseits bei kovalenter Kopplung mit einem Bindungspartner dessen Hydrophilie leicht erhöht (Schlapschy *et al.*, 2013; Breibeck & Skerra, 2017).

3.3.3.4 Bindungsstudien mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie

Die Bindungsaffinität- und kinetik von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI gegenüber dem humanen C5-Protein aus der Komplementkaskade wurde mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR, Abschnitt 2.9.2) bestimmt. Die SPR-Messungen wurden analog zu den vorherigen Experimenten mit den in Hefe hergestellten OmCI-Varianten durchgeführt (siehe Abschnitt 3.3.1.3).

Die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) wurden wie zuvor durch globalen Fit nach dem angepassten 1:1-Bindungsmodell (R_{max} als lokaler Parameter) von Langmuir ermittelt (Abbildung 50).

Tabelle 15: Zusammenfassung der kinetischen Konstanten für die Bindung PASylierter und nicht PASylierter OmCI-Varianten zu C5.

Protein	k_{on} [$10^5 M^{-1} s^{-1}$]	k_{off} [$10^{-4} s^{-1}$]	K_D [nM]
MKHis ₆ -OmCI	$1,75 \pm 0,02$	$2,12 \pm 0,01$	$1,21 \pm 0,02$
MKHis ₆ -PAS(600)-OmCI	$0,82 \pm 0,02$	$1,03 \pm 0,01$	$1,25 \pm 0,03$
OmCI ^a	---	---	$1 \pm 0,4$

^a (Roversi *et al.*, 2013)

MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI zeigten praktisch identische Dissoziationskonstanten von $1,21 \pm 0,02$ nM bzw. $1,25 \pm 0,03$ nM (Tabelle 15). Demnach wurde die Bindungsaktivität von OmCI durch das PAS(600)-Polymer nicht beeinträchtigt.

Außerdem stimmen die gemessenen K_D -Werte für die in *E. coli* produzierten OmCI-Varianten sehr gut mit dem in der Literatur beschriebenen Wert von 1 nM für das rekombinant in *E. coli* produzierte OmCI (Roversi *et al.*, 2013) überein. Die Bindungskinetik zeichnete sich wie schon beschrieben durch eine sehr langsame Dissoziationsrate aus, die für das PASylierte OmCI geringfügig langsamer (Faktor 2) war als beim nicht PASylierten OmCI. Diese Ergebnisse bestätigten die Beobachtungen zu den hier in Hefe produzierten OmCI-Varianten (Abschnitt 3.3.1.3), bei denen die N-terminale Fusion des PAS(600)-Polymers die Funktionalität von OmCI ebenfalls nicht beeinflusste.

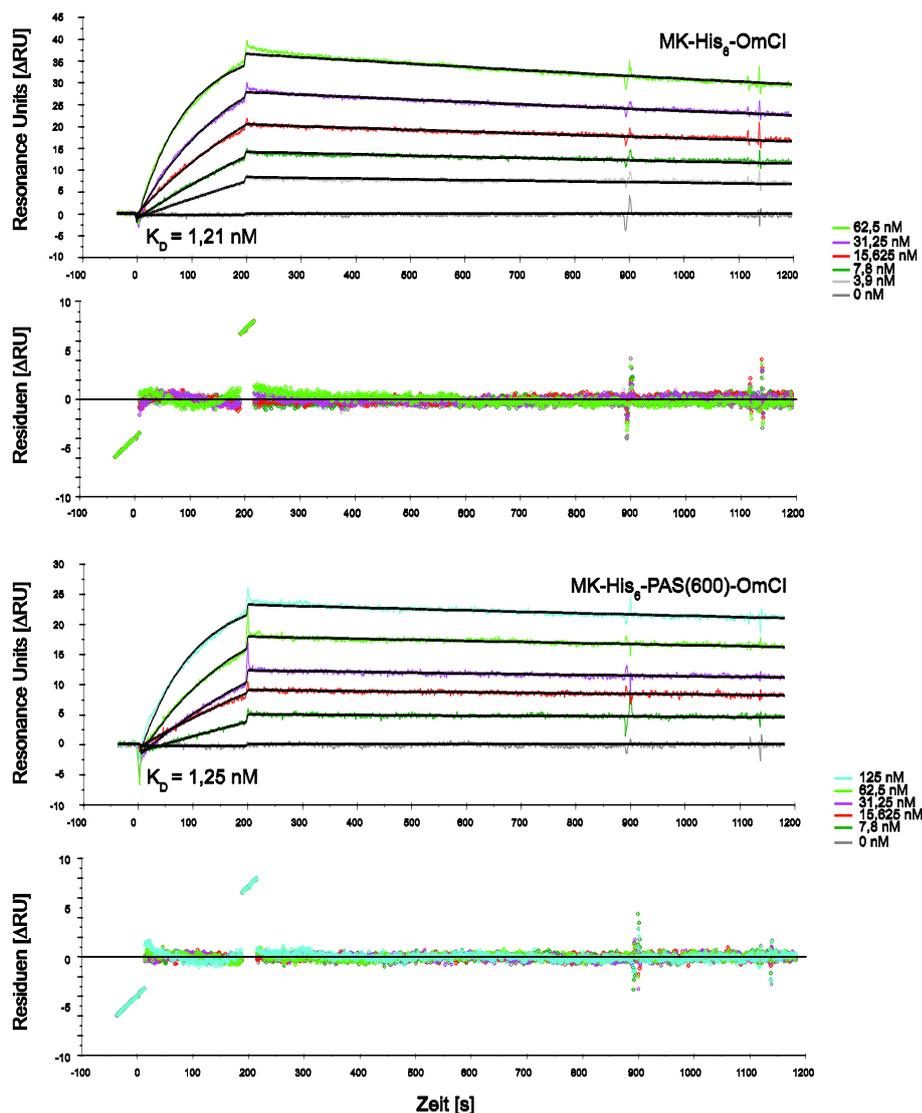


Abbildung 50: Messung der Bindungskinetik von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI durch Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie. Ein mit C5-Protein ($\Delta\text{RU} = 4300$) beladener Carboxymethyl-dextran-Sensorchip (CM3; GE Healthcare) wurde mit HBST-0,05 (HBS und 0,05 (v/v) % Tween 20) äquilibriert und anschließend der Analyt mit einem Probenvolumen von 100 μl bei einem konstanten Fluss von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Zur Ermittlung der kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} der OmCI-Varianten wurde eine Konzentrationsreihe von 3,9 bis 62,5 nM für MKHis₆-OmCI und von 7,8 bis 125 nM für MKHis₆-PAS(600)-OmCI gemessen. Die Dissoziation wurde für 900 s verfolgt. Die Regeneration erfolgte durch mehrmalige Injektionen von 2 M MgCl_2 . Die individuell von unspezifischen Signalanteilen bereinigten Sensorgramme wurden überlagert, global an das 1:1 Bindungsmodell (R_{max} als lokaler Parameter) nach Langmuir angepasst (schwarze Linien) und die Dissoziationskonstante K_D bestimmt. Der Residuen-Plot bildet die Differenz aus experimentell erhobenen und angepassten Verläufen ab.

3.3.3.5 Inaktivierung des Komplementwegs

Die biologische Aktivität beider OmCI-Varianten in Bezug auf die Inhibition der menschlichen Komplementkaskade wurde in zwei ELISA-Formaten (Abschnitt 2.8.3) untersucht. Es wurden die kommerziell erhältlichen ELISA Kits COMPL CP310 und COMPL AP330 (Wieslab; Seelen *et al.*, 2005) verwendet, die sich in der Beschichtung der Mikrotiterplatten unterschieden. Für die Quantifizierung des Einflusses auf den klassischen Komplementweg (CP) waren die Mikrotiterplatten mit IgM beschichtet, für den alternativen Komplementweg (AP) hingegen mit Lipopolysaccharid (LPS). In die Mikrotiterplatten

wurden verdünnte menschliche Serumproben gegeben, die zuvor mit unterschiedlichen Konzentrationen der rekombinanten OmCI-Varianten versetzt waren. Um die Menge an gebildetem C5b-9-Komplex (MAC) zu quantifizieren, machen sich beide Kits einen gegen C5b-9 gerichteten Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase markiert ist, zu Nutze.

In jede der Mikrotiterplatten wurde Verdüpfungspuffer mit spezifisch auf den Assay angepasster Zusammensetzung sowie verdünntes Patientenserum und verschiedene Konzentrationen an OmCI-Lösung (0,5–50 nM für den CP und 5–100 nM für den AP) appliziert. Während der Inkubation wurde das Komplementsystem durch das jeweilige Beschichtungsreagenz aktiviert und die dabei gebildete Menge an C5b-9-Komplex detektiert. Nach Zugabe von p-Nitrophenylphosphat (pNPP) wurde ein gelber Farbstoff gebildet, dessen Farbintensität mit der Menge an Komplement-Aktivität korrelierte. Das verwendete humane Serum war ein Pool aus fünf gesunden Patienten. Für die Positivkontrolle (PC) wurde dem verdünnten Patientenserum anstelle der OmCI-Lösung PBS appliziert, als Negativkontrolle (NC) wurde hitze-inaktiviertes Serum verwendet.

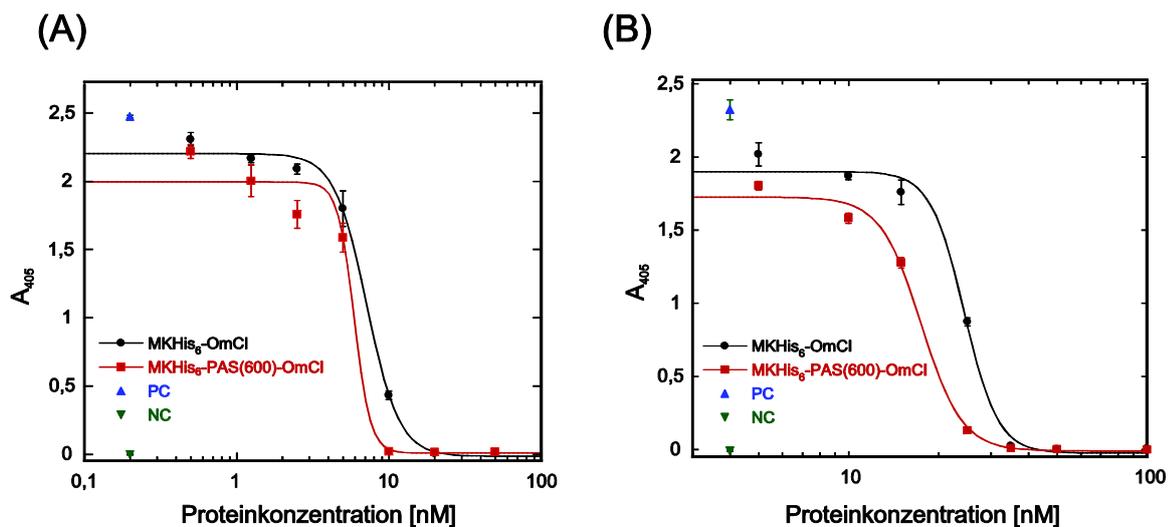


Abbildung 51: Effekt von PASyliertem und nicht PASyliertem OmCI auf den klassischen (CP) und alternativen (AP) Komplementweg. In Mikrotiterplatten, die mit IgM beschichtet waren, wurde in Anwesenheit von Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen der CP (A) aktiviert, hingegen wurde der AP (B) durch Beschichtung mit LPS und Anwesenheit von Mg^{2+} /EGTA aktiviert. In die Vertiefungen wurde MKHis₆-PAS(600)-OmCI und MKHis₆-OmCI in einer Konzentrationsreihe von 0,5–50 nM für den CP und 5–100 nM für den AP gegeben. Der CP enthielt 1 % (v/v) humanes Serum, der AP hingegen 5 % (v/v). Nach Waschen und Komplementaktivierung wurde die Ausbildung des MAC-Komplexes mit einem gegen das Neoantigen C5b-C9 gerichteten Antikörpers detektiert. Die Nachweisreaktion erfolgte mittels alkalischer Phosphatase und p-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat. Humanes Serum oder hitze-inaktiviertes humanes Serum dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Der Assay wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Mittelwerte und die zugehörige Standardabweichung sind dargestellt. Die ermittelten Absorptionswerte wurden einem sigmoidalen Kurvenverlauf angepasst und die halbmaximale InhibitorKonzentration (IC_{50}) bestimmt (siehe Formel in Abschnitt 2.8.4).

Beide Proteine konnten beide Komplementwege komplett inhibieren. Eine Konzentration von ≥ 20 nM von MKHis₆-OmCI beziehungsweise MKHis₆-PAS(600)-OmCI reichte aus, um den klassischen Komplementweg (CP) vollständig zu inhibieren, bei einer Blutserumkonzentration von 1 % (v/v) (Abbildung 51A). Um den alternativen

Komplementweg (AP) zu inhibieren, war eine etwas höhere Konzentration von ≥ 50 nM MKHis₆-OmCI beziehungsweise MKHis₆-PAS(600)-OmCI nötig. Der AP wurde allerdings auch bei einer höheren Serumkonzentration von 5 % (v/v) aktiviert (Abbildung 51B). In beiden Assays waren die IC₅₀-Werte für MKHis₆-PAS(600)-OmCI und MKHis₆-OmCI sehr ähnlich, im CP $6,0 \pm 1,0$ nM gegenüber $7,1 \pm 0,3$ nM und im AP $17,5 \pm 0,6$ nM gegenüber $24,5 \pm 0,6$ nM. Dies zeigt, dass das PAS-Anhängsel keinen negativen Effekt auf die inhibitorische Funktion von OmCI hat. Überraschenderweise zeigte das PASylierte OmCI sogar leicht geringere IC₅₀-Werte in beiden Assays.

Daraufhin wurden beide Proteine in einem klinisch relevanten *In vitro* PNH-Modell getestet (Abschnitt 2.8.4). Dieser Assay wurde am Institut für Naturheilkunde & Klinische Pharmakologie in Ulm im Rahmen einer Kooperation mit Herrn Dr. Christoph Schmidt durchgeführt. Hierzu wurden Erythrozyten von gesunden Spendern mit 2-(2-Aminoethyl)-isothioharnstoff-dihydrobromid (AET) sensibilisiert, um komplementregulierende Proteine auf der Zelloberfläche zu inaktivieren und somit einen PNH-ähnlichen Phänotypen zu induzieren (Ezzell *et al.*, 1991).

Wie erwartet unterdrückten beide Proteine die AP-vermittelte Lyse der Erythrozyten in Gegenwart von humanem Serum mit vergleichbaren IC₅₀-Werten (208 ± 26 nM für MKHis₆-OmCI und 216 ± 16 nM für MKHis₆-PAS(600)-OmCI; Kuhn *et al.*, 2016). Bei einer höheren Proteinkonzentration von 600 nM stellte sich für beide Proteine ein Plateau-Wert ein. Der prozentuale Anteil der Restlyse der Erythrozyten lag für MKHis₆-OmCI bei $34,6 \pm 2,5$ %, hingegen war die Restlyse für das MKHis₆-PAS(600)-OmCI deutlich verringert mit $6,9 \pm 1,5$ %.

Diese Experimente bestätigten die vergleichbare inhibitorische Aktivität von PASyliertem und nicht PASyliertem OmCI und deuteten sogar auf eine deutlich bessere Potenz für das PASylierte OmCI.

3.3.4 Pharmakokinetische Charakterisierung

Die pharmakokinetischen Eigenschaften des PASylierten OmCI-Proteins wurden nach *i.v.* Verabreichung in weiblichen BALB/c Mäuse (N=9) untersucht und mit denen des nicht PASylierten OmCI-Proteins verglichen (Abschnitt 2.10.4). Dazu wurden 137 nmol/kg (b.w.) jedes rekombinanten Proteins injiziert und Blutproben zu Zeitpunkten von 1 bis 70,5 h nach Injektion abgenommen. Die zeitabhängige Plasmakonzentration von MKHis₆-PAS(600)-OmCI und MKHis₆-OmCI wurden mit Hilfe eines *Sandwich*-ELISAs bestimmt (Abschnitt 2.8.3). Hierbei wurde zunächst das humane C5-Protein an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte adsorbiert, dann wurden die Plasmaproben appliziert und durch eine fluorogene Enzymreaktion der Meerrettichperoxidase (HRP) das OmCI-Protein mit Hilfe des Hexahistidin-Anhängsels detektiert.

Da sich im Blutplasma der Maus auch murines C5 befand, mit einer Konzentration zwischen 50 und 85 $\mu\text{g/ml}$ (\cong 265–450 nM bei einer Molekülmasse von 189 kDa; Harris *et al.*, 1982), das ebenfalls mit OmCI einen stabilen Komplex bilden kann, konnte mit diesem experimentellen Aufbau nur der freie Anteil an MKHis₆-OmCI bzw. MKHis₆-PAS(600)-OmCI im Mausplasma bestimmt werden. Dieser hat bekanntermaßen eine viel kürzere Plasma-Halbwertszeit als der Anteil, der mit dem murinen C5 im Komplex vorliegt (Hepburn *et al.*, 2007).

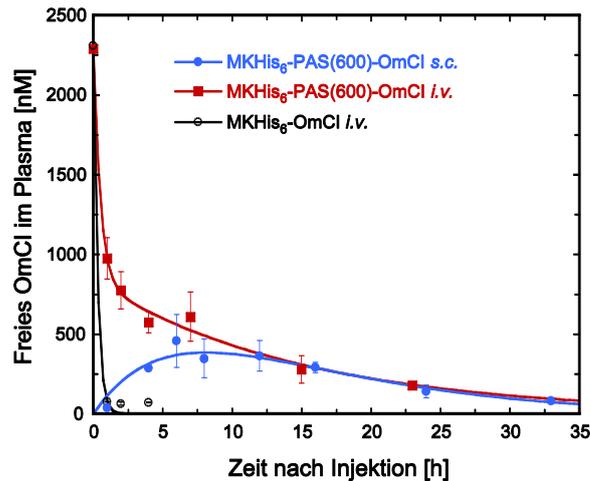


Abbildung 52. Pharmakokinetische Daten von PASyliertem und nicht PASyliertem OmCI in BALB/c Mäusen. BALB/c Mäuse erhielten eine Dosis von 137 nmol/kg (b.w.) entweder *i.v.* oder *s.c.*, das entsprach 2,5 mg MKHis₆-OmCI/kg (b.w.) bzw. 9,3 mg MKHis₆-PAS#1(600)-OmCI/kg (b.w.). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten von 1 bis 70,5 h wurden Blutproben entnommen, bis 33 h nach Injektion konnte die Plasmakonzentration des ungebundenen OmCI mittels ELISA nachgewiesen werden. Die pharmakokinetischen Daten wurden mittels WinNonlin-Software dem Verlauf eines zweiphasigen Konzentrationsabfalls für MKHis₆-PAS(600)-OmCI bzw. eines einphasigen Konzentrationsabfalls für MKHis₆-OmCI angepasst. Die terminale Plasma-Halbwertszeit lag im Fall der *i.v.* Injektion für MKHis₆-PAS(600)-OmCI bei $10,4 \pm 2,2$ h und für MKHis₆-OmCI bei $0,2 \pm 0,1$ h. Das PK-Profil nach *s.c.* Injektion wies die typischen Merkmale der Bateman-Funktion auf, die den Signalanstieg während der Verteilungsphase des Proteins vom Gewebe in das Blut und den Signalabfall während der Eliminierungsphase des Proteins aus dem Blut durch die Niere widerspiegelt.

Das Plasma-Konzentrationsprofil (Abbildung 52) zeigte einen zweiphasigen Konzentrationsabfall bei MKHis₆-PAS(600)-OmCI mit einer initialen Verteilungsphase gefolgt von einer terminalen Eliminierungsphase. Im Vergleich dazu wurde das MKHis₆-OmCI sehr zügig ausgeschieden und ließ sich durch einphasigen Konzentrationsabfall anpassen. Die experimentellen Daten wurden mittels WinNonlin-Software entsprechend den beschriebenen Modellen angepasst (für Gleichungen siehe Abschnitt 2.10.4).

Es ergab sich eine sehr kurze terminale Plasma-Halbwertszeit von $0,2 \pm 0,1$ h für das unmodifizierte OmCI und eine 52-fach längere terminale Plasma-Halbwertszeit von $10,4 \pm 2,2$ h für das PASylierte OmCI. Diese verbesserten PK-Eigenschaften des PASylierten OmCIs spiegelten sich ebenfalls in der verminderten *Clearance* von 201 ± 50 auf $10,3 \pm 1,4$ $\text{ml h}^{-1} \text{kg}^{-1}$ und in der um den Faktor 20 vergrößerten AUC von 682 ± 168 auf 13285 ± 1836 h nM wieder. Die AUC ist direkt proportional der Bioverfügbarkeit eines Medikamentes (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004; Chow, 2014)).

Für viele Biotherapeutika wie beispielsweise Peg-Intron[®], PEGASYS[®] und Adgen[®] wurde eine subkutane (*s.c.*) Darreichungsform entwickelt (Markovsky *et al.*, 2012). Diese Applikationsform kann im Vergleich zur intravenösen vom Patienten selbst durchgeführt werden, verbessert dadurch deren Lebensqualität und reduziert die allgemeinen Kosten für deren medizinische Versorgung (Jin *et al.*, 2015). Je nach Anwendung kann es vorteilhaft sein, dass das Medikament bei sukutanter Gabe langsamer als bei intravenöser in den Blutkreislauf gelangt (Markovsky *et al.*, 2012),

Daher wurden in einem weiteren Experiment wiederum 137 nmol/kg (b.w.) PASyliertes OmCI diesmal subkutan weiblichen C57BL/6J Mäusen verabreicht. In diesem Fall entsprach das Konzentrationsprofil einer Bateman-Funktion (Abbildung 52), mit anfänglicher Verteilungsphase des rekombinanten Proteins vom peripheren Gewebe in das Blut. Interessanterweise stimmte die terminale Eliminierungsphase mit der Konzentration-Zeit-Kurve der für die *i.v.* Verabreichung überein ($t_{1/2} = 9$ h). Dies zeigte eine hohe Bioverfügbarkeit des PASylierten OmCIs auch nach subkutaner Verabreichung.

Die Ergebnisse wurden bekräftigt durch *Western Blotting* (Abschnitt 2.8.5) der *i.v.* Plasmaprobe zu verschiedenen Zeitpunkten. Hierbei wurde die Gesamtkonzentration an MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI in Blutplasma mittels eines anti-His₆-HRP Antikörpers quantifiziert (Abbildung 53). Dadurch wurde also der Anteil des OmCI nachgewiesen, der im Komplex mit dem murinen C5-Protein vorlag.

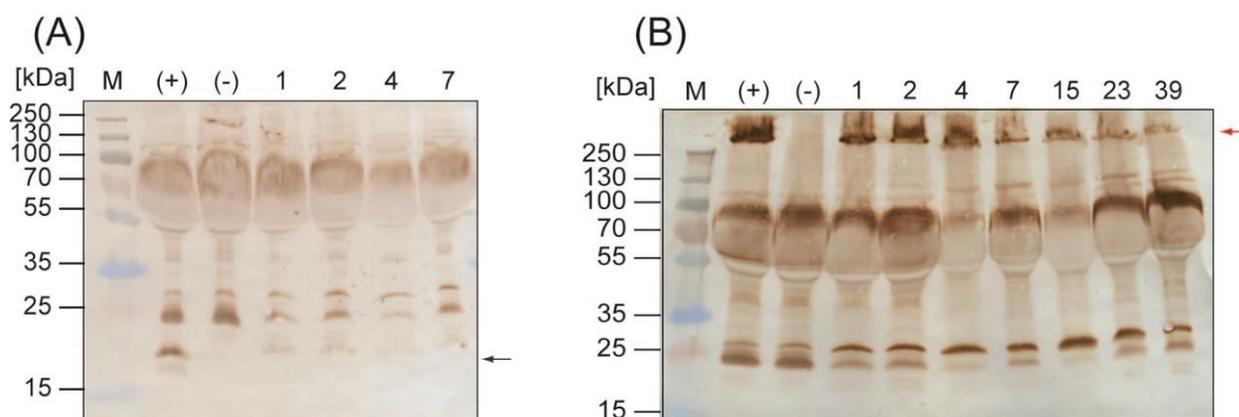


Abbildung 53: Immunchemischer Nachweis von MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI in Plasmaprobe durch *Western Blotting*. Western Blot Analyse von (A) MKHis₆-OmCI und (B) MKHis₆-PAS(600)-OmCI nach *i.v.* Injektion. Es wurden jeweils 4 µl der Plasmaprobe durch SDS-PAGE aufgetrennt, durch Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose-Membran überführt und das His₆-tag der OmCI-Proteine mittels anti-His₆-HRP und 3,3-Diaminobenzidin mit H₂O₂ nachgewiesen. M: Proteinmarker, a: Positive Referenzprobe mit Plasma von unbehandelten BALB/c Mäusen versetzt mit 168 ng MKHis₆-OmCI bzw. 620 ng MKHis₆-PAS(600)-OmCI, b: Negative Referenzprobe mit Plasma von unbehandelten BALB/c Mäusen, c-i: Plasmaprobe nach Injektion zu unterschiedlichen Zeitpunkten 1, 2, 4, 7, 15, 23 und 39 h. Die Bandenposition von MKHis₆-OmCI (Bande bei ca. 19 kDa; schwarz) und MKHis₆-PAS(600)-OmCI (Bande bei > 250 kDa; rot) ist jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Die Plasmaproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden mittels 12 %-tiger SDS-PAGE für MKHis₆-PAS(600)-OmCI und 15 %-tiger SDS-PAGE für MKHis₆-OmCI aufgetrennt. Plasma von unbehandelten BALB/c Mäusen diente als Referenzprobe, Plasma versetzt mit 168 ng MKHis₆-OmCI bzw. 620 ng MKHis₆-PAS(600)-OmCI diente als positive Referenz. Im Anschluß an die SDS-PAGE wurden die Proteine durch Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose-Membran überführt und die OmCI-Proteine über deren Hexahistidin-Anhängsel nachgewiesen.

Nach zwei Stunden war nur noch ein sehr schwaches Signal für das OmCI-Protein nachweisbar. Im Vergleich dazu zeigte das PASylierte OmCI auch 39 h nach Injektion ein starkes Signal. Außerdem gab es für das PASylierte OmCI Protein keine Anzeichen eines proteolytischen Abbaus. Dieses Experiment bestätigte die extrem verlängerte Zirkulationsdauer des PASylierten OmCI in intakter Form und damit dessen erheblich gesteigerte *In vivo*-Stabilität im Vergleich zu dem unmodifizierten OmCI.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist die Entwicklung von Wirkstoffkandidaten mit verlängerter Plasma-Halbwertszeit durch PASylierung. Die hierzu untersuchten Proteine stammen aus zwei Klassen, den Interferonen und den Lipocalinen, die aufgrund ihrer kleinen Molekülgrößen eine geringe Plasma-Halbwertszeit besitzen. Im Rahmen der Etablierung der PASylation-Technologie wurde die biophysikalische und pharmakokinetische Charakterisierung von Modellproteinen mit verschiedenen Längen des PAS-Polymers, von 200 bis 600 Resten, anhand von IFN- α 2b und einem Fab-Fragment beschrieben (Schlapschy *et al.*, 2013). PAS(600) zeigte bei IFN- α 2b mit einer Molekülgröße von ca. 20 kDa einen therapeutisch relevanten Verlängerungseffekt auf die Plasma-Halbwertszeit bei gleichzeitig guter Exprimierbarkeit in *E. coli* und effizienter Reinigung. Deshalb wurde in dieser Arbeit zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit der beiden genannten Proteine das PAS(600)-Polymer gewählt. Dabei wurde ein Fokus auf die Optimierung der Expressions- und Reinigungsstrategie sowie auf die vergleichende biophysikalische und funktionelle Charakterisierung der PASylierten Proteine gelegt. Die Untersuchung der Pharmakokinetik und der Wirksamkeit der PASylierten Proteine erfolgte außerdem in präklinischen Tiermodellen in Rahmen von Kooperationsprojekten.

4.1 Präparation PASylierter Proteine

4.1.1 Übersicht

PAS(600)-Varianten von drei Interferonen, also dem natürlichen IFN- α 2b, dem Superagonisten YNS α 8 und dem Antagonisten IFN-1ant, sowie von einem Lipocalin, dem Zecken-Lipocalin OmCI, wurden gentechnisch hergestellt. Die Herausforderung der heterologen Expression dieser eukaryotischen Proteine lag in den zwei, oder drei strukturellen Disulfidbrücken bei den Interferonen bzw. dem Lipocalin, die für eine korrekte Faltung und Funktionalität vollständig und korrekt ausgebildet sein mussten.

Hierzu wurden verschiedene Expressionsstrategien mit unterschiedlichen Organismen verglichen (Tabelle 16), darunter die periplasmatische sowie die cytoplasmatische Produktion in *E. coli* und die sekretorische Expression in *P. pastoris* und in HEK293-Zellen. Hierfür wurden verschiedene Expressionsplasmide konstruiert und dabei auch die Position der PAS-Sequenz sowie Art und Position von Affinitätsanhängseln für die Reinigung variiert. Darüber hinaus wurden die Expressionstemperatur und -dauer variiert, sowie teilweise die Koexpression mit verschiedenen Faltungshelfern untersucht (Abschnitt 4.1.2). In Bezug auf die anschließende Reinigung musste die Abfolge der einzelnen chromatographischen Schritte an die jeweilige Proteinvariante und Expressionsstrategie angepasst werden (Abschnitt 4.1.3).

Tabelle 16: Übersicht der in dieser Arbeit angewandten Expressions- und Reinigungsstrategien

Protein	Organismus und Expressionsort	Eingesetzte Faltungshelfer	pI	Reinigungsschritte	Kulturvolumen	Ausbeute [mg / l Kultur]	In vivo-Studie
Interferon-Varianten:							
His ₆ -PAS(600)-YNSa8	<i>E. coli</i> KS272 periplasmatisch	---	8,37	IMAC, SEC	2 l	0,3	---
His ₆ -PAS(600)-YNSa8	<i>E. coli</i> KS272 periplasmatisch	DsbA, DsbC, FkpA, SurA	8,37	IMAC, CEX, SEC	8 l	0,5-1,6	7 mg für PK/PD und EAE-Wirksamkeitsstudie in Mäusen
His ₆ -PAS(600)-IFN	<i>E. coli</i> KS272 periplasmatisch	DsbA, DsbC, FkpA, SurA	6,54	IMAC, AEX, SEC	8 l	1,3	1 mg für EAE-Wirksamkeitsstudie
ASHis ₆ -PAS(600)-IFN-1ant	<i>E. coli</i> KS272 periplasmatisch	DsbA, DsbC, FkpA, SurA	6,83	IMAC, AEX, SEC	8 l	2,1	14 mg PK in Rhesusaffen
MKHis ₆ -PAS(600)-IFN-1ant	<i>E. coli</i> Origami B cytoplasmatisch	---	7,12	AEX, IMAC, CEX, AEX	8 l	70	1 g für SIV-Infektionsstudie in Rhesusaffen
OmCI-Varianten:							
OmCI-His ₆	<i>E. coli</i> JM83 periplasmatisch	DsbA, DsbC, FkpA, SurA	4,98	IMAC, SEC	2 l	0,05	---
OmCI-PAS(200)-His ₆	<i>E. coli</i> JM83 periplasmatisch	DsbA, DsbC, FkpA, SurA	4,98	IMAC	2 l	0,04	---
MKHis ₆ -OmCI	<i>E. coli</i> Origami B cytoplasmatisch	PDI	5,07	IMAC, AEX, SEC	2 l	1,8	0,5 mg für PK in Mäusen
MKHis ₆ -PAS(600)-OmCI	<i>E. coli</i> Origami B cytoplasmatisch	PDI	5,07	IMAC, CEX, SEC	2 l	5	2 mg für PK in Mäusen
OmCI-His ₆	HEK293 sekretorisch	---	4,98	IMAC, AEX, SEC	0,5 l	17	---
OmCI-PAS(600)-His ₆	HEK293 sekretorisch	---	4,98	IMAC, AEX, SEC	0,5 l	9-27	---
pOmCI	<i>P. pastoris</i> , sekretorisch	---	4,55	AEX	0,3 l	640	---
pOmCI-PAS(600)	<i>P. pastoris</i> , sekretorisch	---	4,55	AEX	0,3 l	2600	---
PAS(600)-pOmCI	<i>P. pastoris</i> , sekretorisch	---	4,55	AEX	0,3 l	1300	---

4.1.2 Expressionsstrategien für PASylierte Proteine

4.1.2.1 Periplasmatische Expression in *E. coli*

Ein etabliertes System zur heterologen Produktion von Proteinen mit strukturellen Disulfidbrücken, was die Mehrzahl therapeutischer Proteine ausmacht, stellt die periplasmatische Expression in *E. coli* dar (Skerra, 1989). Durch das Anfügen der N-terminalen Signalsequenz eines bakteriellen periplasmatischen Proteins wie die des OmpA-Proteins an das mature rekombinante Protein wird dieses posttranslational in das bakterielle Periplasma geschleust, wo eine effiziente Ausbildung von Disulfidbrücken im oxidierenden Milieu gewährleistet ist. Nach Abspaltung der Signalsequenz durch die Signalpeptidase I wird der ursprüngliche N-Terminus des Proteins erhalten. Die periplasmatische Expression war für verschiedene PASylierte Modellproteine bereits erfolgreich angewendet worden (Schlapschy *et al.*, 2013), daher wurde diese Expressionsstrategie zunächst auch für die Herstellung der PASylierten Proteine IFN- α 2b, YNS α 8, IFN-1ant und OmCI gewählt.

Herstellung von Interferon-Varianten im Labormaßstab

In ersten Versuchen wurde der N-terminal PASylierte Interferon-Superagonist His₆-PAS(600)-YNS α 8 in *E. coli* KS272 im Batch-Verfahren im 2 l-Schüttelkolben hergestellt. Nach Reinigung mittels IMAC und SEC konnten 0,3 mg des gereinigten Proteins aus 1 l Kulturvolumen isoliert werden (Tabelle 16). Sowohl die Identität des Proteins als auch die Ausbildung der zwei Disulfidbrücken wurde mittels ESI-MS nachgewiesen. Die Proteinpräparation war jedoch nicht rein genug (< 95% Reinheit mittels SDS-PAGE) und die Ausbeute war zu gering für die geplante PK/PD-Studie in Mäusen und dessen Wirksamkeitsnachweis in einem murinen MS-Krankheitsmodell.

Daher wurde anschließend eine Fermentation im *Fed Batch*-Verfahren mit 8 l Kulturvolumen durchgeführt, wodurch sich eine deutlich höhere Zelldichte (OD₅₅₀ = 25) als im 2 l-Schüttelkolben (OD₅₅₀ = 1,3) erreichen ließ. Um zusätzlich die Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken zu unterstützen, wurden mit Hilfe des Faltungshelferplasmids pTUM4 die beiden *E. coli* eigenen Thiol/Disulfid-Oxidoreduktasen *DsbA* und *DsbC* sowie die beiden Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen *FkpA* und *SurA*, koexprimiert (Schlapschy *et al.*, 2006), was auch für das PASylierte IFN- α 2b bereits angewandt worden war (Schlapschy *et al.*, 2013). Nach Reinigung (Abschnitt 4.1.3) konnten mit bis zu 1,6 mg Protein pro Liter Kulturvolumen ausreichende Mengen für die geplanten *In vivo*-Studien mit dem Superagonisten hergestellt werden (Tabelle 16).

Analog dazu wurden das PASylierte Wildtyp-Interferon His₆-PAS(600)-IFN, das als Kontrolle für die *In vivo*-Studien des Superagonisten diente, und der PASylierte Antagonist ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant, der für PK- und Wirksamkeitsstudien in Rhesusaffen benötigt wurde, im 8 l-Fermenter hergestellt. Für beide Proteine konnten nach jeweilig angepassten

Reinigungsschritten (Abschnitt 4.1.3) vergleichbare Ausbeuten (1,3 mg/l bzw. 2,1 mg/l) erhalten werden (Tabelle 16).

Scale-up auf 400 l

Für den Einsatz des PASylierten Interferon-Antagonisten ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant in einer SIV-Infektionsstudie in Rhesusaffen wurde 1 g Protein benötigt; daher wurde ein weiteres *Scale-up* auf 400 l-Kulturvolumen durchgeführt. Bereits während der Reinigung des PASylierten Antagonisten im 8 l-Maßstab war in begrenztem Maße ein C-terminaler Abbau des rekombinanten Proteins beobachtet worden (Abschnitt 4.1.3). Im Rahmen des *Scale-ups* auf den 400 l-Maßstab war dieser Abbau durch die deutlich längere Dauer des gesamten Aufschluss- und Reinigungsprozesses stärker ausgeprägt, so dass nur eine vollständig C-terminal verkürzte Variante isoliert werden konnte. Somit war die periplasmatische Expression in diesem Maßstab nicht geeignet. Eine Alternative dazu bot die cytoplasmatische Produktion in *E. coli* Origami B (siehe Abschnitt 4.1.2.4).

Herstellung von OmCI im Labormaßstab

Auch das Lipocalin OmCI-His₆ und seine zunächst mit dem PAS(200)-Polymer fusionierte Variante OmCI-PAS(200)-His₆ waren im Rahmen einer Bachelorarbeit (Plescher, 2012) zunächst in einem periplasmatischen Ansatz hergestellt worden. Die Codonverteilung war zur Verbesserung der Expression für *E. coli* optimiert worden. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Überexpression von OmCI-His₆ für die *E. coli* KSK272-Zellen toxisch war, was an einer frühzeitigen Lyse der Bakterien erkennbar war. Diese Lyse konnte durch Wechsel des Expressionsstamms zu *E. coli* JM83 und Koexpression von Faltungshelfern mittels pTUM4 deutlich reduziert werden. Dennoch war die Ausbeute nach ersten Reinigungsversuchen mit 0,05 g pro l Kulturvolumen für OmCI-His₆ bzw. 0,04 g pro l Kulturvolumen für OmCI-PAS(200)-His₆ sehr gering (Tabelle 16).

Die Toxizität von heterolog exprimierten Proteinen folgt häufig aus inkorrektter Faltung und Aggregation des wirtsfremden Proteins (Plückthun & Skerra, 1989). Die Molekülklasse der Lipocaline ist nicht *per se* inkompatibel mit *E. coli* als Expressionswirt, wie anhand zahlreicher Beispiele in der Literatur gezeigt wurde (Breustedt *et al.*, 2006). Es war jedoch bereits am Beispiel des Retinol-bindenden Proteins (RBP), einem humanen Lipocalin mit drei Disulfidbrücken, beobachtet worden, dass Lipocaline mit mehr als zwei Disulfidbrücken bei Überexpression in *E. coli* JM83 offensichtlich toxisch wirken und zu frühzeitiger Zellyse führen. Durch die Koexpression des Faltungshelferplasmids pTUM4 konnte das Lyseverhalten dabei eingedämmt werden und lösliches RBP periplasmatisch produziert werden. Allerdings enthielt die gereinigte Proteinpräparation noch falsch verbrückte Disulfidisomere.

Unvollständige Periplasmasekretion

Bei allen periplasmatisch hergestellten PASylierten Interferon-Varianten wurde nach Überexpression im Gesamtzellextrakt eine prominente zweite Bande des PASylierten Proteins in der SDS-PAGE mit leicht erhöhter Mobilität als die Hauptbande beobachtet. Es ist bekannt, dass aufgrund der herabgesetzten SDS-Bindekapazität der hydrophilen PAS-Sequenz, PASylierte Proteine ein verlangsamtes elektrophoretisches Laufverhalten besitzen und dadurch bei einer anomal vergrößerten apparenten Molekülmassen in der SDS-PAGE erscheinen (Schlapschy *et al.*, 2013, Breibeck & Skerra, 2017).

Bei der zweiten Bande handelt es sich entweder um ein unerwünschtes Abbauprodukt oder aber um eine noch nicht ins Periplasma exportierte Spezies, bei der die OmpA-Signalsequenz noch vorhanden war. Ein Abbau im Teil des Superagonisten würde eine noch stärker verlangsamte Mobilität der abgebauten Spezies bedeuten, da noch weniger hydrophobe Aminosäuren für die SDS-Bindung zur Verfügung stehen würden. So eine abgebaute Spezies würde im SDS-Gel oberhalb der Hauptbande laufen, was in diesem Fall aber nicht zutrifft. Demgegenüber würde ein Abbau im PAS-Teil des Fusionsproteins aufgrund der repetitiven Aminosäurezusammensetzung des PAS-Polymers und folglich wiederkehrenden Proteaseschnittstelle eine Leiter an Banden unterhalb der Hauptbande bedeuten.

Da es sich aber um eine destinkte Bande unterhalb der Hauptbande handelt trifft höchstwahrscheinlich der letztgenannte Fall ein. Anders als das PAS-Polymer kann die hydrophobe OmpA-Signalsequenz gut mit SDS-Molekülen interagiert. Somit besitzt das „Präprotein“ eine stärkere negative Nettoladung als das mature Protein und zeigt trotz größerer Molekülmasse dennoch eine erhöhte Mobilität im SDS-Gel. Dieses Phänomen ist bereits seit den 80er Jahren bekannt. Schon bei der periplasmatischen Produktion von Ig-Fragmenten hatte sich gezeigt, dass die Signalsequenz nicht vollständig prozessiert wird (Skerra & Plückthun, 1988).

Zusammenfassend war die periplasmatische Expressionsstrategie zur Herstellung der PASylierten Interferon-Varianten für eine biochemische Charakterisierung und für erste präklinische Studien in Nagermodellen sehr gut geeignet (gute Ausbeute, korrekte Faltung, hohe Reinheit und Aktivität), weniger aber für präklinische Studien in größeren Tieren (z.B. in Rhesusaffen) oder gar klinische Studien. Das Lipocalin OmCI stellt aufgrund seiner drei Disulfidbrücken eine besondere Herausforderung für die Expression in *E. coli* dar, hier war die periplasmatische Expressionsstrategie ineffizient.

4.1.2.3 Sekretorische Expression von OmCI in eukaryotischen Zellen

Expression in HEK293-Zellen

Um die beobachtete Toxizität von OmCI in *E. coli* zu umgehen, wurden im Rahmen einer Masterarbeit (Kammerer, 2013) OmCI-His₆ und OmCI-PAS(600)-His₆ in HEK293-Zellen als eukaryotisches Expressionssystem produziert. Die Ausbeuten waren mit 17 mg pro l Kulturvolumen für OmCI-His₆ und 9–27 mg OmCI-PAS(600)-His₆ pro l Kulturvolumen sehr gut (Tabelle 16) und stellten eine deutliche Verbesserung gegenüber der periplasmatischen Expression dar. Dennoch ist das Expressionssystem vergleichsweise zeitaufwendig (Überexpressionsphase 5 bis 7 Tage) und aufgrund des komplexen Kulturmediums relativ teuer. Zu diesem Zeitpunkt waren die zwei potentiellen N-Glycosylierungsstellen (Erkennungssequenz Asn-X-Ser/Thr) von OmCI noch nicht deletiert, daher wiesen die OmCI-Präparationen aus HEK293-Zellen noch unerwünschte N-Glycosylierungen auf.

Expression in *P. pastoris*

Für die Herstellung größerer Mengen des PASylierten Wirkstoffkandidaten OmCI sollte die Hefe *P. pastoris* als schnelles und günstiges Expressionssystem etabliert werden. Im Rahmen einer Kooperation mit der Firma VTU Technology wurde OmCI und dessen N- und C-terminal PASylierte Varianten mit Hilfe eines proprietären Vektors hergestellt (Weis & Purkarthofer, 2013). Die beiden potentiellen N-Glycosylierungsstellen von OmCI waren hierfür durch Austausch von Asn gegen Gln in den entsprechenden Erkennungssequenzen eliminiert worden (pOmCI; Hepburn *et al.*, 2007). Die Ausbeuten mit optimierter Reinigungsstrategie lagen im Bereich von 640 bis 2600 mg pro l Kulturvolumen (Tabelle 16) und konnten also im Vergleich zu dem HEK293-Expressionssystem deutlich gesteigert werden (beispielsweise um den Faktor 96 für pOmCI-PAS(600)). Die gereinigten Proteine waren korrekt gefaltet und funktional. Jedoch trat eine unerwünschte O-Glycosylierung auf, die zu einem inhomogenen Produkt führte und die Reinigung und eindeutige Charakterisierung durch ESI-MS erschwerte. Zu Beginn war pOmCI mit dem His₆-Affinitätsanhängsel hergestellt worden; aufgrund eines teilweisen C-terminalen Abbaus des His₆-tags wurde im finalen Herstellungsprotokoll aber auf ein Affinitätsanhängsel verzichtet (Abschnitt 4.1.3.1). Da diese Proteinpräparationen aufgrund der O-Glycosylierung und Produktinhomogenität für eine weitergehende Wirkstoffentwicklung nicht geeignet waren, wurde die sekretorische Expression in *P. pastoris* im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

Zusammenfassend war OmCI in eukaryotischen Systemen (HEK293 und *P. pastoris*) im Gegensatz zur periplasmatischen bakteriellen Expression funktional und in großen Mengen exprimierbar; dies gilt auch für seine PASylierten Varianten. Die Faltungsenzyme und Chaperone im eukaryotischen Endoplasmatischen Retikulum (ER) scheinen die Ausbildung

der Disulfidbrücken von OmCI effizienter als die Proteine des Dsb-Systems im Periplasma von *E. coli* zu unterstützen. Eukaryotische Zellsysteme sind empfehlenswert, wenn die Produktion von komplexen Proteinen mit zahlreichen Disulfidbrücken in *E. coli* fehlschlägt bzw. das Protein glycosyliert werden soll. Die O-Glycosylierung in *P. pastoris* war allerdings nicht vorhersehbar und ist für therapeutische Proteine unerwünscht; daher erfordert der Einsatz von Hefen als Expressionssystem unter Umständen weitere Optimierungen der Aminosäuresequenz und/oder des Wirtsorganismus selbst.

4.1.2.4 Cytoplasmatische Expression in *E. coli* Origami B

Da der PASylierte Interferon-Antagonist ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant im Periplasma nicht in ausreichender Menge für präklinische Studien in Rhesusaffen herstellbar war, wurde dessen Expression in *E. coli*-Stamm Origami B, der bereits in der Literatur für eine effiziente heterologe Expression von Proteinen mit Disulfidbrücken beschrieben worden war (Rabhi-Essafi *et al.*, 2007), untersucht. Origami-Derivate von *E. coli* tragen Mutationen in den Genen für die Thioredoxin-Reduktase (*trxB*) und die Glutathion-Reduktase (*gor*), dadurch wird die Regenerierung von reduziertem Thioredoxin und Glutathion stark verlangsamt (Bessette *et al.*, 1999) und somit das intrazelluläre Redox-Milieu stärker oxidierend, was die Ausbildung von strukturellen Disulfidbrücken in heterolog exprimierten Proteinen im Cytoplasma begünstigt. Da vollständig Reduktase-defiziente Stämme allerdings ein stark gebremstes Wachstumsverhalten zeigen (Berkmen, 2012), enthalten alle Origami-Stämme zusätzliche eine Mutation im Gen der Alkyl-Hydroperoxid Reduktase C (*ahpC*), die einen funktionalen Wechsel des Enzyms zu einer schwachen Disulfid-Reduktase bewirkt und somit das Zellwachstum wieder normalisiert (Ritz *et al.*, 2001).

Herstellung des Interferon-Antagonisten im Labormaßstab

Nach versuchsweiser Biosynthese PASylierten Interferon-Antagonisten MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant in Origami B im 2 l-Maßstab zur Bestimmung der geeigneten Expressionstemperatur wurde das Protein schließlich im 8 l-Maßstab (*Fed Batch*-Verfahren) produziert. Aus einer solchen Fermentation konnten 70 mg Protein pro l Kulturvolumen (Tabelle 16) gereinigt werden; das entspricht im Vergleich zur periplasmatischen Produktion einer 33-fachen Ausbeutesteigerung. Auch die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken konnte mittels ESI-MS (für das intakte Protein wie auch nach tryptischem Verdau) nachgewiesen werden. Außerdem wiesen das cytoplasmatisch und das periplasmatisch produzierte Protein identische Bindungseigenschaften für IFNR2 auf (Abschnitt 0). Im Gegensatz zur periplasmatischen Herstellung erfolgte die Expression von MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant im Cytoplasma ohne Faltungshelfer und bei einer höheren Temperatur (30 °C statt 22 °C). Letztere trug möglicherweise zu der höheren Ausbeute bei.

Herstellung von OmCI im Labormaßstab unter Einsatz von Faltungshelfern

Da die cytoplasmatische Expressionsstrategie für den PASylierten Interferon-Antagonisten so erfolgreich war, sollte diese ebenfalls zur Herstellung von OmCI angewendet werden. Die Produktion erfolgte zunächst im 2 l-Maßstab, um Material für eine erste biochemische Charakterisierung zu erhalten und verschiedene Expressionsbedingungen zu vergleichen. In ersten Versuchen bei 30 °C zeigte sich, dass das OmCI-Gen sehr stark exprimiert wurde und keinerlei Toxizität aufwies. Durch SDS-PAGE wurde jedoch festgestellt, dass OmCI nach dem Zellaufschluss hauptsächlich in unlöslicher Form vorlag. Dieses Ergebnis bestätigte, dass die Faltung und Ausbildung der drei Disulfidbrücken des Proteins aufwendig ist und deshalb die Expressionsbedingungen noch optimiert werden mussten. Zu diesem Zeitpunkt war die Herstellung von OmCI in prokaryotischen Systemen in der Literatur nur mittels eines proprietären *E. coli* Sekretionsstamms (Wacker Chemie AG) möglich (Roversi *et al.*, 2013).

Allerdings war bekannt, dass die Thiol/Disulfid-Oxidoreduktasen DsbC und PDI als Faltungshelfer in Origami B die Ausbildung von Disulfidbrücken unterstützen können (Berkmen, 2012), daher wurden beide Faltungshelfer nach Deletion ihrer natürlichen Signalsequenzen jeweils in Form eines dicistronischen Operons mit OmCI kloniert und anschließend dessen Biosynthese untersucht. Daneben wurden die Expressionstemperatur und -dauer variiert. Es zeigte sich, dass die PDI einen effizienten Faltungshelfer für OmCI darstellte; die optimale Expressionsbedingung lag 22 °C und einer Induktionszeit von 24 h. Die damit einhergehende langsame Translationsgeschwindigkeit führte möglicherweise zu einer längeren Kontaktzeit mit der PDI, die damit genug Zeit bekam, alle Disulfidbrücken zu isomerisieren. Analog dazu wurde das N-terminal PASylierte MKHis₆-PAS(600)-OmCI mit der PDI unter den gleichen Bedingungen hergestellt. Die Ausbeuten an homogenem Produkt lagen nach Reinigung mit 1,8 mg pro 1 Kulturvolumen für His₆-OmCI und 5 mg pro 1 Kulturvolumen für His₆-PAS(600)-OmCI (Tabelle 16) auf einem ähnlichen Niveau wie bei der Produktion in HEK293-Zellkultur und waren damit ausreichend für eine PK-Studie in Mäusen. Die vollständige Ausbildung der Disulfidbrücken konnte mittels ESI-MS (anhand des intakten Proteins) bestätigt werden, und es wurde keinerlei proteolytischer Abbau beobachtet. Die biologische Aktivität der cytoplasmatisch produzierten Proteine war vergleichbar mit der Aktivität der eukaryotisch produzierten Proteine (Abschnitt 3.3.1.3). Es blieb die Frage, weshalb die PDI in diesem Expressionssystem mit Abstand der effizientere Faltungskatalysator war.

DsbC kommt normalerweise im *E. coli* Periplasma vor und ist ein 23 kDa Homodimer mit zwei Domänen, einer Thioredoxin-Domäne und einer Dimerisierungsdomäne. Die Thioredoxin-Domäne trägt vier Cysteinreste, das C-terminale Cysteinpaar ist als strukturelle Disulfidbrücke für die Stabilität von DsbC essentiell, hingegen bilden die zwei N-terminalen Cysteinreste das aktive Zentrum mit dem CXXC Motiv, dessen reduzierter Zustand durch das

Membranprotein DsbD aufrechterhalten wird (Berkmen, 2012). DsbD erhält sein Reduktionspotential durch die cytoplasmatischen Thioredoxine, die wiederum die Elektronen von NADPH erhalten. DsbC kann falsch gefaltete Disulfidbrücken reduzieren oder isomerisieren, wohingegen für die Oxidation bzw. eigentliche Ausbildung der Disulfidbrücken im Periplasma DsbA zuständig ist (Kadokura *et al.*, 2004).

PDI lässt sich in fast allen eukaryotischen Zellen in Endoplasmatischen Retikulum (ER) finden (Gilbert, 1998). Das Protein hat eine Masse von 55 kDa und besitzt fünf Domänen, darunter zwei Thioredoxin-Domänen mit unabhängigen aktiven Zentren jeweils am N- und C-Terminus. Die zwei aktiven Zentren tragen die Aminosäuresequenz WCGHCK, indem die Cysteinreste entweder in einer intramolekularen Disulfidbrücke (oxidiertes Zustand) oder in der Dithiolform (reduzierter Zustand) vorliegen können. Durch reduziertes Glutathion (GSH) und dessen oxidierte Form (GSSG) wird im ER der Redoxzustand der PDI aufrechterhalten. Die PDI besitzt neben der Reduktase- und Isomeraseaktivität auch eine Oxidaseaktivität und kombiniert somit die Funktion der beiden *E. coli* Proteine DsbC und DsbA in einem Enzym (Wilkinson & Gilbert, 2004). Das vergleichsweise niedrige Redoxpotential der PDI (-180 mV; Wilkinson & Gilbert, 2004) gegenüber DsbC (-129 mV; Bessette *et al.*, 2001) ermöglicht die zusätzliche Oxidase-Funktion.

Aus den Untersuchungen dieser Arbeit ergab sich, dass das DsbC-Protein trotz starker Überexpression keinen wesentlichen Effekt auf die OmCI-Löslichkeit hatte, hingegen führte die PDI zu einer deutlichen Verbesserung, trotz schwächerer Expression. Dies lässt vermuten, dass der unlösliche OmCI Anteil noch reduzierte Cysteinreste besaß und der eigentliche Schritt der Oxidation zur Disulfidbrücke notwendig war, was effizienter durch die PDI katalysiert werden konnte.

Zusammenfassend stellte die cytoplasmatische Expressionsstrategie in dem Stamm *E. coli* Origami B eine sehr gute Alternative zur periplasmatischen Expression von funktionellen PASylierten Proteinen mit zwei bis drei Disulfidbrücken dar. Eine zusätzliche Verbesserung der Faltung von OmCI ergab sich durch die Koexpression der PDI im Cytoplasma.

4.1.2.5 Betrachtung von Einzelaspekten bei der Produktion PASylierter Proteine

Einfluss des PAS-Polymers auf Zellwachstum, Biosynthese, Sekretion und Löslichkeit

Anhand der vorhandenen Daten kann kein grundlegender Einfluss des PAS-Polymers auf die periplasmatische Expression beobachtet werden. Bei den Expressionsversuchen mit OmCI-His₆ im Periplasma wurde eine verminderte Lyse der Zellen, die die PASylierte Variante OmCI-PAS(200)-His₆ produzierten, beobachtet.

Bei der cytoplasmatischen Expression im Origami B war hingegen ein verlangsamtes Wachstumsverhalten der Zellen zu beobachten, die das PASylierte Protein His₆-PAS(600)-OmCI exprimierten, trotzdem ergaben sich aber deutlich höhere Ausbeuten für das PASylierte

Protein im Vergleich zum unmodifizierten OmCI. Die höhere Ausbeute an gefaltetem löslichem Protein bei der PASylierten Variante belegt, dass das PAS-Polymer durch seine gute Löslichkeit einen förderlichen Effekt auf das modifizierte Protein haben kann, wie auch schon für andere Proteine beschrieben (Binder & Skerra, 2017).

Klonierung der PAS-Genkassette und genetische Stabilität

Im Zuge dieser Arbeit wurden unterschiedliche synthetische Gensequenzen zur Subklonierung der PAS-Kassette verwendet. Für die *E. coli* Expressionsvektoren von His₆-PAS(600)-YNS α 8 und His₆-PAS(600)-IFN wurde eine hoch-repetitive PAS#1(200)-Genkassette (Binder & Skerra, 2017) verwendet, die in wiederholten Zyklen hintereinander inseriert wurde, um schließlich die PAS#1(600)-Gensequenz zu erhalten. Die hoch-repetitive PAS#1(200)-Genkassette bestand noch aus repetitiven 60mer Nukleotidsequenzen (Schlapschy *et al.*, 2013). Zur Generierung des Expressionsplasmids für His₆-PAS(600)-YNS α 8 waren drei konsekutive Klonierungsschritte notwendig; bei His₆-PAS(600)-IFN gelang die Subklonierung in nur zwei Schritten, dem durch einen hohen molaren Überschuss an dem kleinen Genfragment gelang die gleichzeitige Insertion von zwei PAS#1(200)-Genkassetten.

Um das Risiko der genetischen Instabilität zu reduzieren wurden durch Reduktion des GC-Gehalts und Minimierung der Repetitivität auf DNA-Ebene bei gleichbleibender PAS-Aminosäuresequenz weniger repetitive PAS-Genkassetten entwickelt. Zunächst die PAS#1.2(200) Genkassette, von der immer noch drei Stück für die PAS#1(600) Genkassette benötigt werden (Binder & Skerra, 2017) und später eine vollständig nicht-repetitive PAS(600)-Genkassette, die aus drei aneinandergereihten Varianten einer jeweils 600 bp umfassenden PAS#1(200)-Genkassette, PAS#1.6(200), PAS#1.3(200) und PAS#1.2(200), mit unterschiedlicher Condonverwendung besteht. Neben der erhöhten genetischen Stabilität dieser zusammengesetzten PAS#1(600)-Genkassette bot diese außerdem den Vorteil einer einfachen Subklonierung in nur einem einzigen Ligierungsschritt. Diese optimierte PAS#1(600)-Genkassette wurde in den *E. coli* Expressionsvektoren zur Herstellung von ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant, MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant und MKHis₆-PAS(600)-OmCI verwendet.

Analog zu diesen optimierten PAS-Sequenzen für *E. coli* stehen ebenfalls PAS-Genkassetten zur Subklonierung auf Expressionsvektoren für die eukaryotische Zellexpression zur Verfügung wie beispielsweise die PAS#1.7(200)-Genkassette für *P. pastoris*, die bei der Produktion von PASylierten pOmCI-Varianten Anwendung fand (Binder & Skerra, 2017).

Eignung verschiedener Promotoren und Plasmidsysteme für PASylierte Proteine

Da die Herstellung des PASylierten Interferon-Antagonisten im Rahmen einer Kooperation zwischen dem NIH und der XL-protein GmbH stattfand, sollte für die cytoplasmatische

Expression nicht das seinerzeit noch unter Patentschutz stehende *tet*-Promotor/Operator-System verwendet werden. Daher erfolgte die cytoplasmatische Expression von MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant mit Hilfe des lacUV5 Promotors (Skerra & Plückthun, 1991); des weiteren enthielt das Expressionsplasmid eine ribosomale Bindestelle des Gens 10 aus dem T7-Phagen (T7RBS) zur Erhöhung der Translationseffizienz (Olins *et al.*, 1988). Bei Verwendung des lacUV5-Promotors war im Vergleich zum *tet*-Promotor die Zugabe von Glukose zur Repression der Basalexpression erforderlich (Plückthun & Skerra, 1989; Skerra & Plückthun, 1988).

Für alle anderen periplasmatischen und cytoplasmatischen Expressionsversuche wurde das dicht regulierte *tet*-Promotor/Operator-System verwendet. Für die cytoplasmatische Produktion von OmCI wurde zu dem ein dicistronisches Operon mit zwei verschiedenen ribosomalen Bindestellen verwendet.

4.1.3 Reinigung

4.1.3.1 Übersicht über die angewandten Reinigungsstrategien

Zu Beginn dieser Arbeit bestand die etablierte Reinigungsstrategie für PASylierte Proteine aus einem Zweitschrittverfahren, das aus einer *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie (SAC) gefolgt von einer Größenausschlußchromatographie (SEC) bestand (Schlapschy *et al.*, 2013). Für die *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie wurden die rekombinanten Proteine als Fusionsproteine mit einem *Strep*-tag II als Affinitätsanhängsel (Schmidt & Skerra, 2007) hergestellt. Da das *Strep*-tag II immunogen ist (Schlapschy *et al.*, 2013), wurde in dieser Arbeit das His₆-tag als Affinitätsanhängsel verwendet, für das keine ausgeprägte Immunogenität bekannt ist. Dementsprechend wurde bei den meisten in dieser Arbeit hergestellten Proteinen die IMAC als erster Reinigungsschritt angewendet. Aufgrund der geringeren Spezifität des His₆-tags war das IMAC-Eluat noch entsprechend verunreinigt, wie vor allem bei der initialen Reinigung von His₆-PAS(600)-YNSα8 beobachtet (Tabelle 16). Deshalb wurde eine Ionenaustauschchromatographie als weiterer Reinigungsschritt eingeführt. Die Wahl eines Anionenaustauschers (AEX) oder Kationenaustauschers (CEX) als Chromatographiematerial war vom pI-Wert des Zielproteins abhängig. Die sich aus den Untersuchungen dieser Arbeit ergebende optimale Reinigungsprozedur (Tabelle 16), die für die Aufarbeitung eines Cytoplasma-Extrakts aus 2 l Kulturvolumen (MKHis₆-OmCI und MKHis₆-PAS(600)-OmCI) und eines Periplasma-Extrakts aus bis 8 l Kulturvolumen (His₆-PAS(600)-YNSα8, His₆-PAS(600)-IFN und ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant) angewandt wurde, bestand demnach aus drei Schritten: IMAC, IEX, und SEC.

Reinigung von PAS(600)-IFN-1ant aus Fermentation mit Origami B

Eine Ausnahme stellte die Reinigung des cytoplasmatisch produzierten PASylierten IFN-Antagonisten dar. Hier war das Ziel, möglichst schnell den Cytoplasma-Extrakt aus einem

Kulturvolumen von 8 l aufzuarbeiten. Da das große Volumen des Cytoplasma-Extrakts viele Wirtszellproteine neben einer großen Menge des PASylierten Proteins (mindestens 560 mg) enthielt, musste die etablierte Reinigungsstrategie weiterentwickelt werden. Zunächst wurde ein subtraktiver AEX-Schritt vor der IMAC eingeführt, um bereits einen Teil der Wirtszellproteine abzutrennen, die möglicherweise an die IMAC-Säule binden und die Kapazität der Säule verringern. Als zweite Optimierung wurde nach der IMAC anstelle der SEC ein CEX-Schritt durchgeführt, um zeitaufwendige und ineffiziente Konzentrierung der Proteinlösung zu vermeiden. Danach war die Proteinpräparation noch nicht ausreichend rein, so dass ein zusätzlicher finaler AEX-Reinigungsschritt notwendig war.

Die präparative Reinigung der benötigten 560 mg des PASylierten Interferon-Antagonisten wurde durch die Firma XL-protein durchgeführt und die Reinigungsstrategie im Hinblick auf gute Proteinlöslichkeit und Skalierbarkeit weiter optimierte.

Reinigung von pOmCI-Varianten aus Hefekultur

Bei der Aufarbeitung von pOmCI-His₆ aus dem Hefekulturüberstand von der Firma VTU ist aufgefallen, dass das His₆-tag teilweise um drei Histidinreste verkürzt war, was für proteolytischen Abbau sprach. Da der Überstand insgesamt weniger Wirtszellproteine enthielt als Extrakte aus *E. coli*, konnte gänzlich auf die IMAC verzichtet werden. Es genügte ein AEX-Schritt um eine ausreichende Reinheit zu erhalten.

4.1.3.2 Einfluß der PASylierung auf die Proteinreinigung

Einfluss des PAS-Polymers auf die IMAC-Affinitätschromatographie

Zur IMAC-Reinigung PASylierter Proteine wurde, im Gegensatz zum am Lehrstuhl standardmäßig verwendeten Zn²⁺-IDA-System (Skerra & Plückthun, 1991), das Ni²⁺-NTA-System (Hochuli *et al.*, 1988) verwendet. Vergleichende Reinigungsexperimente haben gezeigt, dass zwar mehr unspezifische Wirtszellproteine an die gegenüber dem His₆-tag höher affine Ni²⁺-NTA-Säule binden, jedoch eine bessere Abtrennung der PASylierten Proteine als bei der Zn²⁺-IDA-Säule erreicht werden kann (Ergebnisse nicht gezeigt).

Bei der IMAC-Reinigung PASylierter Proteine zeigte sich, dass diese weniger gut an die IMAC-Säule banden als das unmodifizierte Protein. Folglich ergab sich eine geringere Kapazität als vom Hersteller angegeben. Als mögliche Ursache kann vor allem eine Blockierung benachbarter Bindestellen auf der Säule aufgrund sterischer Hinderung durch das PAS-Polymer in Betracht. Um eine Überladung der Chromatographiesäule zu vermeiden, wurden zur Reinigung PASylierter Proteine daher Säulen mit größerem Bettvolumen verwendet und die Flussrate in der Beladungsphase verringert, um einer langsameren Assoziationsgeschwindigkeit PASylierter Proteine Rechnung zu tragen. Bei der Elution wurde beobachtet, dass die PASylierten Varianten deutlich früher und in einem breiteren Peak

eluierten als nicht PASylierte Proteine; dadurch ergab sich mitunter eine unerwünschte Coelution mit Wirtszellproteinen. Die konnte durch einen Vorelutionsschritt mit 15–30 mM Imidazol weitgehend vermieden werden, was die Abtrennung eines großen Anteils an Wirtszellproteinen gestattete. Diese Vorelution wurde im Zuge der Reinigung von His₆-PAS(600)-YNS α 8 etabliert und für alle weiteren PASylierten Proteine durchgeführt.

Einfluss des PAS-Polymers auf die Ionenaustauschchromatographie

Bei der AEX-Reinigung der OmCI-Varianten (theoretischer pI-Wert: 4,55) aus *P. pastoris* bei pH 7,5 eluierten die PASylierten OmCI-Varianten früher (bei ca. 40 mM NaCl) als das nicht PASylierte Protein (bei ca. 200 mM NaCl), obwohl der pI-Wert durch die ungeladene PAS-Sequenz nicht beeinflusst wurde (Schlapschy *et al.*, 2013). Offensichtlich verringerte das PAS-Polymer jedoch die Bindung an die positiv geladenen, quartären Ammonium-Gruppen des verwendeten AEX-Säulenmaterials, möglicherweise aufgrund sterischer Effekte, wie schon oben diskutiert. Ganz anders verhielt sich das cytoplasmatisch produzierte PASylierte OmCI (theoretischer pI-Wert: 5,07) gegenüber einem Kationenaustauscher. Bei einem sauren pH-Wert von 6,0 wies das PASylierte Protein theoretisch eine leicht negative Nettoladung auf, die vom PAS-Polymer nicht verändert werden sollte. Dennoch band das PASylierte OmCI sehr gut an die negativ geladenen Methylsulfonat-Gruppen der CEX-Säule und eluierte erst bei einer hohen Salzkonzentration (220 bis 300 mM NaCl), wodurch der Kationenaustauscher besser zur Retention des PASylierten Proteins geeignet war als ein Anionenaustauscher. Zudem präzipitierten viele Wirtszellproteine im Dialyseschritt gegen den CEX-Puffer, womit dieser Dialyseschritt zusätzlich zur Reinigung genutzt werden konnte. Allerdings zeigte sich, dass in manchen Puffern mit sehr niedriger Ionenstärke (20 mM MES/NaOH pH 6,0–6,5, 1 mM EDTA) auch ein geringer Teil des PASylierten OmCI oder des PASylierten Interferon-Antagonisten ausfiel. Am Beispiel des PASylierten Interferon-Antagonisten wurde ein Phosphatpuffer (40 mM NaP_i pH 7,0, 1 mM EDTA) als geeignet identifiziert.

Es bleibt die Frage, warum das PASylierte OmCI unerwarteterweise so gut an den Kationenaustauscher band. Es ist bekannt, dass nicht nur die Nettoladung, sondern auch die lokale Verteilung geladener Gruppen bei der Ionenaustauschchromatographie eine Rolle spielt. Da aber der PASylierte Interferon-Antagonist ebenfalls sehr gut bei einem leicht sauren pH-Wert (pH ~ 6,5) an den Kationenaustauscher band, was im Widerspruch zum Verhalten PASylierter Proteine gegenüber dem Anionenaustauscher steht, könnte es auch eine andere Ursache geben. PASylierte Proteine besitzen eine ungewöhnlich hohe Zahl freiliegender Peptidbindungen (z.B. 600 für PAS(600)), deren Sauerstoffatome bei niedrigem pH-Wert teilweise protoniert vorliegen können und so die positive Nettoladung erhöhen (Bagno *et al.*, 1999). Dadurch könnte die Nettoladung des Fusionsproteins durch das PAS-Biopolymer ins Positive verschoben werden, was die Bindung selbst für Proteine mit niedrigerem pI als dem

pH-Wert der Lösung, wie für OmCI, an die negativ geladene CEX-Säule ermöglicht. Dieses Verhalten wurde bereits für „PAS-cal“-Peptide (Breibeck, 2016) im Zusammenhang mit ESI-MS Experimenten beobachtet.

Proteolytischer Abbau

Bei der Arbeit mit PASylierten Proteinen hatte sich gezeigt, dass diese unter bestimmten Bedingungen anfällig gegenüber proteolytischem Abbau sind. Es wurden bakterielle Umweltkeime isoliert, die in PBS-Puffer lebensfähig sind, und deren proteolytische Aktivität wurde durch systematische Inkubation mit His₆-PAS#1(600)-IFN- α 2b als Substrat getestet (siehe Abschnitt 3.1.1.2). Es wurden drei Stämme identifiziert, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Delftia tsuruhatensis* und *Pseudomonas sp.*, die Proteasen sekretieren, welche das PAS-Polymer sequenzspezifisch abbauen. Die höchste proteolytische Aktivität wurde für den Stamm *Stenotrophomonas maltophilia* nachgewiesen.

Als geeignete Protease-Inhibitoren (siehe Abschnitt 3.1.1.2) erwiesen sich folgende:

- NaN₃ ($\geq 0,01$ %), inhibiert die mitochondriale Atmungskette und verhindert dadurch mikrobielles Wachstum (Ishii *et al.*, 2014/Lichstein & Soule, 1944).
- AEBSF (≥ 1 mM), inaktiviert irreversible Thrombin und andere Serinproteasen durch Sulfonylierung des aktiven Serinrests (Powers *et al.*, 2002).
- B(OH)₃ (≥ 50 mM), inhibiert Serinproteasen indem es mit dem aktiven Serinrest einen tetrahedralen Komplex bildet (Bauer & Pettersson, 1974).
- 2,2-Dithiodipyridin (≥ 1 mM), inhibiert Cysteinproteasen indem es mit dem aktiven Cysteinrest ein gemischtes Dulfid bildet (Maruyama *et al.*, 1999).
- ETDA (≥ 1 mM), komplexiert verschiedene Übergangsmetallionen und wirkt so als Metalloprotease-Inhibitor (Auld, 1995).
- EGTA (≥ 1 mM), komplexiert Calciumionen mit stärkerer Affinität als EDTA und wirkt so ebenfalls als Metalloprotease-Inhibitor (Al-Jobore & Roufogalis, 1981).

Obwohl keine spezifische Protease aus *E. coli* mit Aktivität gegenüber dem PAS-Polymer identifiziert werden konnte, wurde zu dessen Schutz das etablierte Protokoll zur periplasmatischen Extraktion optimiert, indem verschiedene Protease-Inhibitoren (Borat -, EDTA und Dithiodipyridin; siehe Abschnitt 2.5.1) zugesetzt wurden.

Außerdem wurden weitere Maßnahmen zur Vermeidung der Proteolyse bzw. bakteriellen Kontamination ergriffen: Äkta-Anlagen und Pump-Systeme wurden mit 0,02 % NaN₃ / 1 mM EDTA pH 8,0 gespült und Säulen wenn möglich in dieser Lösung gelagert (siehe Abschnitt 3.1.1.2). Darüber hinaus wurde allen Reinigungspuffern – abgesehen von IMAC-Puffern – mindestens 1 mM EDTA zugesetzt, und alle Proteinlösungen wurden so schnell wie möglich bei 0,22 μ m sterilfiltriert, um möglichst eine mikrobielle Verunreinigung zu verhindern.

4.3 Biophysikalische Eigenschaften PASylierter Proteine

4.3.1 Sekundärstruktur und hydrophile Eigenschaften

Bei der Entwicklung von Aminosäurepolymeren mit PEG-ähnlichen Eigenschaften, insbesondere den wie PAS-Polypeptide („PEG-Mimetika“), war ein Ziel, dass diese Biopolymere in wässriger Lösung eine *Random-Coil*-Struktur annehmen und durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Lösungsmittelmolekülen hohe Solvatisierung zeigen (Breibeck, 2016; Binder & Skerra, 2017).

4.3.1.1 Charakterisierung der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie

Die Sekundärstruktur von Proteinen lässt sich mittels CD-Spektroskopie analysieren. Im Zusammenhang mit der Entwicklung der PASylation-Technologie wurde mittels CD-Spektroskopie für verschiedene Proteine, wie hGH, IFN und Leptin gezeigt, dass die Konformation des PAS-Polypeptids und mit unterschiedlichen Längen unabhängig vom Fusionspartner immer ungeordnet ist (Schlapschy *et al.*, 2013; Morath *et al.*, 2015). In CD-Differenzspektren für die PAS-Biopolymere alleine wurde jeweils ein Minimum zwischen 198 und 200 nm gefunden. Ein solches Minimum ist charakteristisch für ungefaltete Proteine (Fändrich & Dobson, 2002) und wird – auf molarer Basis – erwartungsgemäß ausgeprägter mit zunehmender PAS-Länge. In dieser Arbeit konnten diese Beobachtungen am Beispiel von MHis₆-PAS(600)-OmCI bestätigt werden. Das CD-Differenzspektrum für PAS(600) wies auch hier ein Minimum bei 199 nm auf (siehe Abschnitt 3.3.3.2).

In neueren Untersuchungen zur Sekundärstruktur von PAS-Biopolymeren (Breibeck & Skerra, 2017) wurde festgestellt, dass den PAS-Spektren jedoch ein Maximum mit niedriger Amplitude bei etwa 225 nm fehlt, welches für eine *Random-Coil*-Struktur von Polypeptiden neben dem ausgeprägten Minimum bei 195 nm zu erwarten wäre (Tiffany & Krimm, 1969). Deshalb wurde das CD-Spektrum von PAS-Biopolymeren einer „ungeordneten Polyprolin-Struktur“ zugeordnet, die sich durch nur durch ein starkes Minimum bei etwa 200 nm auszeichnet (Tiffany & Krimm, 1968) und Sekundärstrukturanteile der *Random-Coil*-Konformation und der Polyprolin(II)-Helix vereinigt (Kakinoki *et al.*, 2005). Außerdem ist es eher unwahrscheinlich, dass repetitive Aminosäuresequenzen ein perfektes *Random-Coil* annehmen, ohne zumindest auf lokaler Ebene Sekundärstrukturen auszubilden.

CD-Untersuchungen des gänzlich anders zusammengesetzten und nicht repetitiven XTEN864-Polypeptids ergaben ebenfalls nur ein einfaches Minimum bei 200 nm (Schellenberger *et al.*, 2009). Demnach bildet auch das XTEN-Biopolymer keine perfekte *Random-Coil*-Struktur aus und besitzt offenbar eine ähnliche Sekundärstruktur wie das PAS-Polypeptid, wobei es aufgrund der zahlreichen Glu-Reste jedoch insgesamt Eigenschaften eines anionischen Polymers zeigt.

4.3.1.2 Charakterisierung der hydrophilen Eigenschaften mittels RPC

Aus den früheren Experimenten im Rahmen der Entwicklung der PASylation-Technologie war bekannt, dass das PAS(600)-Biopolymer sehr hydrophil ist und nach kovalenter Kopplung mit einem Bindungspartner dessen Wasserlöslichkeit nicht beeinträchtigt (Schlapschy *et al.*, 2013). Diese Beobachtungen wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Hierzu wurden die Bindeeigenschaften von nicht PASyliertem und PASyliertem OmCI gegenüber einer hydrophoben stationären Phase (Polystyrol-Matrix) untersucht, wobei mit Hilfe des organischen Lösungsmittels Acetonitril (im Konzentrationsgradienten) eluiert wurde. Beide Proteine zeigten ein nahezu gleiches Retentionsvolumen, was bestätigte, dass das PAS-Biopolymer die Hydrophilie des Kopplungspartners nicht beeinflusst oder sogar geringfügig erhöht.

Neuere Betrachtungen gingen der Ursache für die Hydrophilie von PAS-Biopolymeren auf den Grund und verglichen dessen hydrophile Eigenschaften mit PEG (Breibeck & Skerra, 2017). Es konnte gezeigt werden, dass das PAS-Biopolymer und seine Ser-freie Variante „P/A“ vergleichbare Hydrophilie zeigten und somit die polare Seitenkette der Aminosäure Serin keinen wesentlichen Beitrag zur Hydrophilie von PAS-Biopolymeren leistet. Außerdem waren beide Biopolymere hydrophiler als das chemische Polymer PEG mit vergleichbarer Molekülmasse. Der Hauptgrund für die hohe Hydrophilie des PAS-Biopolymers liegt demnach in dessen polaren Peptidbindungen mit Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren, die aufgrund der ungeordneten Sekundärstruktur eine hohe Lösungsmittlexposition aufweisen (Breibeck & Skerra, 2017).

4.3.2 Hydrodynamisches Volumen

Die Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens eines therapeutischen Proteins durch PASylierung ist entscheidend für die Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit durch Verlangsamung der Nierenfiltration (Abschnitt 4.4.1). Aus vorhergehenden Untersuchungen (Schlapschy *et al.*, 2013; Morath *et al.*, 2015) anhand verschiedener Modellproteine (IFN- α 2b, Fab und Leptin), die mit unterschiedlich langen PAS-Biopolymeren modifiziert wurden, war bekannt, dass zwischen der gewählten PAS-Länge und der resultierenden Volumenvergrößerung ein Zusammenhang besteht. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die weitere Charakterisierung des Vergrößerungseffekts des PAS(600)-Biopolymers anhand neuer Wirkstoffkandidaten mit annähernd gleicher Molekülmasse aus zwei Proteinklassen. Die apparente Molekülmasse diente hierbei als Maß für das hydrodynamische Volumen.

Um diese apparente Molekülmasse experimentell zu bestimmen, eignen sich vor allem zwei Methoden. Erstens, die analytische SEC, bei der die apparente Größe durch Vergleich mit Retentionszeiten globulärer Proteine mit bekannter Molekülmasse ermittelt wird. Der Nachteil dieser Methode besteht daran, dass unspezifische Interaktionen mit dem hydrophilen

Tabelle 17: Übersicht hydrodynamische Charakterisierung PASylierter Proteine mittels SEC

Molekül	Modifizierung	M _{theor} [kDa]	Zunahme in M _{theor} [kDa]	M _{app} SEC [kDa]	Zunahme in M _{app} [kDa]	Faktor M _{app} /M _{theor}	Faktor M _{mod} /M _{unmod}	Referenz
In dieser Arbeit bzw. im Zusammenhang mit dieser Arbeit hergestellte Proteinvarianten: Modifizierung mit PAS(600)								
<i>Strep</i> -tag II-IFN	---	20,9	---	25,0	---	1,2	---	diese Arbeit
His ₆ -PAS(600)-IFN	N-Term	70,3	49,4	642	617	9,1	25,7	diese Arbeit
His ₆ -PAS(600)-YNSα8	N-Term	70,3	49,4	607	582	8,6	24,3	diese Arbeit
ASHis ₆ -PAS(600)-IFN-Iant	N-Term	70,3	49,4	681	656	9,7	27,2	diese Arbeit
MKHis ₆ -PAS(600)-IFN-Iant	N-Term	70,2	49,3	666	641	9,5	26,6	diese Arbeit
MKHis ₆ -OmCI	N-Term	18,2	---	23,6	---	1,3	---	diese Arbeit
MKHis ₆ -PAS(600)-OmCI	N-Term	67,8	49,6	580	556	8,6	24,6	diese Arbeit
OmCI-His ₆	glycosyliert	18,1	---	37,1	---	2,0	---	Kammerer, 2013
OmCI-PAS(600)-His ₆	C-Term + glycosyliert	67,6	49,5	727	690	10,8	19,6	Kammerer, 2013
In der Literatur beschriebene Proteinvarianten: Modifizierung mit PAS(600), Fc, ABD, PEG und XTEN								
pOmCI-Fc	C-Term	83	---	174	---	1,8	---	Ruseva, 2010
Fab	---	48,0	---	31	---	0,6	---	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
Fab-PAS(600)	C-Term	99,0	51	691	660,0	7,0	22,3	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
Fab-ABD	C-Term	53,3	5,3	40,1	9,1	0,8	1,3	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
Fab-PEG(20) ₂	C-Term	88,1	40,1	478	447	5,4	15,4	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
hGH	---	23,6	---	22,5	---	1,0	---	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
PAS(600)-hGH	N-Term	73,1	49,5	612	590	8,4	27,2	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
Leptin	---	17,4	---	22,9	---	1,3	---	Morath <i>et al.</i> , 2015
PAS(600)-Leptin	N-Term	67,0	49,6	628	606	9,4	27,4	Morath <i>et al.</i> , 2015
N7A.19-CL31d	---	42,7	---	37,0	---	0,9	---	Eggenstein, 2017
N7A.19-PAS(600)-CL31d	Linker	92,3	49,6	610	573	6,6	16,5	Eggenstein, 2017
GLP2-2G	---	3,7	---	---	---	---	---	Alters <i>et al.</i> , 2012
GLP2-2G-XTEN864	C-Term	83,1	79,4	> 670 kDa	---	> 8,1	---	Alters <i>et al.</i> , 2012
rhGH	---	22	---	---	---	---	---	Cleland <i>et al.</i> , 2012
XTEN1-rhGH-XTEN2 (VRS-317)	N- und C-Term	119	97	> 670 kDa	---	> 5,6	---	Cleland <i>et al.</i> , 2012
EcI	---	19,3	---	29	---	1,5	---	Brandl <i>et al.</i> , 2019
PAS600-EcI	N-Term	69,5	50,2	591	562	8,5	20,4	Brandl <i>et al.</i> , 2019
XTEN576-EcI	N-Term	73,2	53,9	686	657	9,4	23,7	Brandl <i>et al.</i> , 2019
XTEN864-EcI	N-Term	99,6	80,3	891	862	8,9	30,7	Brandl <i>et al.</i> , 2019
mIFNα11	---	20,8	---	19	---	0,9	---	Xia <i>et al.</i> , 2019
PAS(600)-mIFNα11	N-Term	70,1	49,3	577	558	8,2	30,4	Xia <i>et al.</i> , 2019
In der Literatur beschriebene reine und PAS- und XTEN-Biopolymere								
PAS(600)	---	49,6	---	578	---	11,7	---	Breibeck, 2016
XTEN576	---	53	---	670	---	12,6	---	Podust <i>et al.</i> , 2016
XTEN864	---	79	---	1500	---	19,0	---	Podust <i>et al.</i> , 2016

Säulenmaterial das Ergebnis im Einzelfall verfälschen können. Zweitens, die Methode der DLS, bei der die apparente Größe anhand der Lichtstreuung unter dem Einfluss der Brown'schen Molekularbewegung bestimmt wird. Vorteilhaft ist, dass sich die untersuchten Proteine in Lösung befinden und nicht mit einer Matrix interagieren, jedoch ist die Methode sehr empfindlich gegenüber Verunreinigungen. Für beide Meßprinzipien wird zur Berechnung der apparenten Masse eine globuläre Molekülform der untersuchten Proteine zugrundegelegt.

4.3.2.1 Bestimmung der apparenten Masse mittels SEC

Die Untersuchungen zur apparenten Molekülmasse mittels analytischer SEC (Tabelle 17) ergaben für die im Rahmen dieser Arbeit mit PAS(600) modifizierten Proteinvarianten eine größte apparente Molekülmasse von 727 kDa für das eukaryotisch produzierte OmCI-PAS(600)-His₆ und eine kleinere apparente Molekülmasse von 580 kDa für das prokaryotisch produzierte MKHis₆-PAS(600)-OmCI (Tabelle 17); somit variierten die apparenten Molekülmassen deutlich.

Um die Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens des Fusionsproteins durch das PAS(600)-Biopolymer zu quantifizieren, wurden zwei Verhältnisfaktoren definiert: erstens, der Faktor $M_{app}^{mod} / M_{theor}^{mod}$, der das Verhältnis der apparenten Molekülmasse zur theoretischen Molekülmasse des PASylierten Proteins beschreibt und zweitens, der Faktor $M_{app}^{mod} / M_{app}^{unmod}$, der das Verhältnis zwischen apparerter Molekülmasse des PASylierten Proteins zur apparenten Molekülmasse des nicht PASylierten Proteins darstellt. Praktisch relevanter ist der zweite Faktor, da dieser die eigentliche Vergrößerung des nicht PASylierten Proteins durch das PAS(600)-Biopolymer wiedergibt.

Für diesen Faktor ($M_{app}^{mod} / M_{app}^{unmod}$) ergaben sich Werte von 19,6 für OmCI-PAS(600)-His₆ und von 27,2 für ASHis₆-PAS(600)-IFN-1ant; was eine signifikante Vergrößerung der apparenten Molekülmasse darstellt. OmCI-PAS(600)-His₆ zeigt hier den kleinsten Faktor vor allem deshalb, weil die apparente Masse des nicht PASylierten Proteins bereits um den Faktor zwei gegenüber der theoretischen Masse vergrößert war (siehe Tabelle 17).

Die massiven Vergrößerungsfaktoren durch die PASylierung ergeben sich aus zwei Effekten: zum einen durch die reale Zunahme der Molekülmasse (Verlängerung um 600 Aminosäuren entsprechend etwa 50 kDa) und zum anderen aufgrund der scheinbaren Zunahme der Masse durch die ungeordnete, expandierte Struktur des PAS(600)-Biopolymers. Vergleichbare Vergrößerungsfaktoren wie in dieser Arbeit wurden auch für andere PAS(600)-Fusionsproteine in der Literatur beschrieben: 20,4 für PAS(600)-Ec1, 27,2 für PAS(600)-hGH und 30,4 für PAS(600)-mIFN α 11 (siehe Tabelle 17).

Eine Abhängigkeit von der N- bzw. C-terminalen Anordnung des PAS-Polypeptids kann aufgrund der wenigen Daten für C-terminale PAS(600)-Fusionsproteine nicht festgestellt werden. Ein auffällig kleiner Verhältnisfaktor von 16,5 wurde für das Fusionsprotein N7A-PAS(600)-CI31d beschrieben (Eggenstein, 2017). Hierbei diente das PAS(600)-Biopolymer als Linkersequenz, was die Flexibilität der Polypeptidkette offenbar einschränkt und sich in einem kleineren hydrodynamischen Volumen widerspiegelt. Eine zur PASylierung zusätzliche Glycosylierung, wie bei OmCI-PAS(600)-His₆ aus der Hefekultur, führt zu einer weiteren Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens. Die Glycosylierung selbst bietet ebenfalls eine Methode zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit von Proteinen (Egrie & Browne, 2002).

Betrachtet man die veröffentlichten Daten zur hydrodynamischen Charakterisierung von XTEN-Biopolymeren (siehe Tabelle 17), bietet sich ein Vergleich der apparenten Molekülmassen des reinen Aminosäurepolymers XTEN576 mit der apparenten Molekülmassen des PAS(600)-Biopolymers an. Für XTEN576 ist eine apparente Masse von 670 kDa bei einer theoretischen Masse von 53 kDa beschrieben, für PAS(600) eine vergleichbare apparente Masse von 578 kDa bei einer theoretischen Masse von 49,6 kDa (Podust *et al.*, 2016).

Andere Strategien wie die ABD- und Fc-Fusion zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit machen sich weniger eine Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens als einen biologischen Effekt (endosomales *Recycling*) zu Nutze. Hier stellen die Fusionspartner definiert gefaltete Proteine mit spezifischen Effektorfunktionen dar (Binder & Skerra, 2015), sodass ein Vergleich der apparenten Molekülgrößen nur von begrenzten Wert ist.

4.3.2.2 Bestimmung der apparenten Masse mittels DLS

Aus den Untersuchungen der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten PAS(600)-Fusionsproteine mittels DLS (Tabelle 18) ergab sich der kleinste hydrodynamische Radius mit 9,7 nm für His₆-PAS(600)-YNSα8 und der größte mit 15,1 nm für MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant; die sich daraus ergebenden apparenten Molekülmassen lagen bei 686 kDa bzw. 1931 kDa und waren teilweise deutlich größer als mittels SEC bestimmt (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Bezogen auf die apparente Molekülmasse des nicht PASylierten Proteins ergab sich der größte Faktor $M_{app}^{mod} / M_{app}^{unmod}$ von 25,2 ebenfalls für MKHis₆-PAS(600)-IFN-1ant und der kleinste von 9,0 für His₆-PAS(600)-YNSα8.

Die in dieser Arbeit ermittelten hydrodynamischen Radien für PAS(600)-Fusionsproteine waren ähnlich, teilweise aber auch größer als der hydrodynamische Radius von 9,2 nm, der für PAS#1(600)-Leptin in der Literatur beschrieben war (Tabelle 18).

Tabelle 18: Übersicht hydrodynamische Charakterisierung PASylierter Proteine mittels DLS

Molekül	Modifizierung	M_{theor} [kDa]	r_h [nm]	M_{app} DLS [kDa]	Faktor $M_{\text{app}}^{\text{mod}}/M_{\text{theor}}^{\text{mod}}$	Faktor $M_{\text{app}}^{\text{mod}}/M_{\text{app}}^{\text{unmod}}$	Referenz
In dieser Arbeit hergestellte Proteinvarianten: Modifizierung mit PAS(600)							
<i>Strep</i> -tag II-IFN	---	20,9	3,8	76,5	3,7	---	diese Arbeit
His ₆ -PAS(600)-IFN	N-Term	70,3	10,2	771	11,0	10,1	diese Arbeit
His ₆ -PAS(600)-YNS α 8	N-Term	70,3	9,7	686	9,8	9,0	diese Arbeit
ASHis ₆ -PAS(600)-IFN-1ant	N-Term	70,3	14,3	1700	24,2	22,2	diese Arbeit
MKHis ₆ -PAS(600)-IFN-1ant	N-Term	70,2	15,1	1931	27,5	25,2	diese Arbeit
MKHis ₆ -OmCI	N-Term	18,2	2,8	37,4	2,1	---	diese Arbeit
MKHis ₆ -PAS(600)-OmCI	N-Term	67,8	9,3	621	9,2	16,6	diese Arbeit
In der Literatur beschriebene Proteinvarianten: Modifizierung mit PAS(600) und PEG							
Leptin	N-Term	17,4	2,5	28,7	1,6	---	Morath <i>et al.</i> , 2015
PAS#1(600)-leptin	N-Term	67,0	9,2	606	9,0	21,1	Morath <i>et al.</i> , 2015
HEWL	---	14,3	2,1	19,1	1,3	---	Gokarn <i>et al.</i> , 2012
PEG1-HEWL (1xPEG20)	Lysin	34,5	4,8	132	3,8	6,9	Gokarn <i>et al.</i> , 2012
PEG2-HEWL (2xPEG20)	Lysin	54,3	6,6	279	5,1	14,6	Gokarn <i>et al.</i> , 2012
PEG3-HEWL (3xPEG20)	Lysin	74,3	7,4	364	4,9	19,1	Gokarn <i>et al.</i> , 2012
In der Literatur beschriebene reine PEG-Polymere							
PAS#1(600)	---	49,6	9,2	606	12,2	---	Breiback & Skerra, 2017
PEG 180 kDa	---	180	12	1128	6,3	---	Caliceti & Veronese, 2003
PEG 220 kDa	---	220	13,5	1486	6,8	---	Caliceti & Veronese, 2003

Des Weiteren wurde in der Literatur bereits häufiger der Einfluss der PEGylierung von Proteinen auf den hydrodynamischen Radius mittels DLS untersucht (Khameneh *et al.*, 2016; Bailon *et al.*, 2001). Beispielsweise wurde Lysozym (HEWL) (Gokarn *et al.*, 2012) aus Hühnereiweiß mit ein bis drei linearen PEG(20)-Molekülen über Lysinseitenketten gekoppelt. Das unfusionierte HEWL besaß einen hydrodynamischen Radius von 2,1 nm, nach Kopplung mit zwei PEG(20)-Molekülen (PEG2-HEWL) bzw. drei PEG(20)-Molekülen (PEG3-HEWL) ergaben sich hydrodynamische Radien von 6,6 nm und 7,4 nm (Tabelle 18). Beide Werte sind wesentlich kleiner als die für die hier untersuchten PAS(600)-Fusionsproteine. Das könnte daran liegen, dass das PAS(600)-Biopolymer zu einer leicht gestreckten Molekülform führt (Breibeck & Skerra, 2017) – im Gegensatz zu den drei linearen 20 kDa PEG-Ketten, die sich über das Protein verteilen und das Konjugat insgesamt runder und kompakter erscheinen lassen. Interessanterweise besitzen reine PEG-Polymere mit großen Molekülmassen von 180 kDa und 220 kDa zu PAS(600)-Fusionsproteinen vergleichbare hydrodynamische Radien von 12 bzw. 13,5 nm (Tabelle 18). Für XTEN-, Fc- oder ABD-Fusionsproteine sind keine DLS-Daten in der Literatur beschrieben.

Die durch DLS ermittelten apparenten Molekülmassen variierten deutlich stärker als die apparenten Molekülmassen, die durch die analytische SEC bestimmt wurden, und sie waren teilweise deutlich größer. Allerdings ist für das PAS(600)-Biopolymer eine elongierte Molekülform beschrieben (Breibeck & Skerra, 2017), was zur Überschätzung der apparenten Masse des Fusionsproteins sowohl in der DLS als auch in der SEC führt. Die DLS ist bezüglich der Form sogar noch deutlich sensitiver, was die Beobachtungen in dieser Arbeit bestätigen. Die SEC ist zudem die aussagekräftigere Methode, um das hydrodynamische Volumen PASylierter Proteine abzuschätzen, da sie in gewisser Weise den Filtrationsschritt durch die Nierenporen imitiert.

4.3.3 Affinität und Funktionalität

Die biologische Aktivität des Fusionspartners wird entscheidend durch den Modifizierungsort beeinflusst. Eine genetische Kopplung mit dem PAS-Biopolymer ist entweder am N- oder C-Terminus des Fusionspartners möglich. Der Einfluss des PAS(600)-Biopolymers auf die *In vitro*-Aktivität wurde in dieser Arbeit mit zwei unterschiedlichen Methoden untersucht: einerseits mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR), bei der der jeweilige Interaktionspartner auf einem *Sensorchip* immobilisiert war, und andererseits mittels Zell-Assays, in denen die *In vitro*-Aktivität gegenüber dem natürlichen Interaktionspartner auf Zellen untersucht wurde.

4.3.3.1 Bestimmung der biochemischen Aktivität mittels SPR

Die Affinitäten der in dieser Arbeit hergestellten PASylierten Proteine im SPR-Experiment gegenüber IFNR2 als Bindungspartner blieben im Vergleich zu den Affinitäten der nicht modifizierten Proteine nahezu unverändert (Tabelle 19). Lediglich für das N-terminal PASylierte Wildtyp-Protein His₆-PAS(600)-IFN wurde eine leichte Verminderung der Affinität um den Faktor 3,7 festgestellt, was für den ebenfalls N-terminal PASylierten Interferon-Superagonisten wie auch den -Superantagonisten jedoch nicht zutraf. Im Gegensatz dazu wurde für das PEGylierte Interferon PEGASYS[®] sogar eine Verschlechterung der Bindungsaktivität um den Faktor 7 beschrieben (Schlapschy *et al.*, 2013); also ein deutlich stärkerer Abfall als bei der PASylierung.

OmCI ist ein gutes Beispiel dafür, dass der Terminus, der mittels PASylierung modifiziert wird, demnach eine entscheidende Rolle spielen kann. Für das C-terminal PASylierte pOmCI wurde eine Verschlechterung der Bindungsaktivität um den Faktor 18 festgestellt; hingegen blieb die der N-terminal PASylierten Variante MKHis₆-PAS(600)-OmCI praktisch unverändert. Später veröffentlichte proteinkristallographische Daten geben Hinweise darauf, dass die C-terminale Region von OmCI an der Bindung zum C5-Protein beteiligt und deshalb sensitiv gegenüber sterischer Hinderung ist (Jore *et al.*, 2016).

Ausschlaggebend für die Machbarkeit der SIV-Infektionsstudie war der Vergleich der Affinitäten von periplasmatisch und cytoplasmatisch produziertem PAS(600)-IFN-1ant. Da beide Proteine annähernd identische Affinitäten gegenüber IFNR2 besaßen, konnte von einer korrekten Verknüpfung der zwei Disulfidbrücken in dem cytoplasmatisch produzierten Protein ausgegangen werden, was den Erfolg der cytoplasmatischen Produktion in dem *E. coli*-Stamm Origami B bestätigte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit entsprechen allgemein den Befunden für andere PASylierte Proteine (siehe Tabelle 19), mit leichter Verminderung der Affinität um einen Faktor zwischen 2,1 für Fab-PAS(600) und 17 für N7A.19-PAS(600)-CL31d. Die Ursache dafür liegt hauptsächlich an einer langsameren Assoziationskinetik aufgrund einer verlangsamten Diffusion des hydrodynamisch vergrößerten Proteins in die Dextranmatrix des SPR-Sensorchips (Eggenstein, 2017, Schlapschy *et al.*, 2013). Dieses Phänomen wurde ebenfalls für PEGylierte Proteine beschrieben (Kubetzko *et al.*, 2005).

Tabelle 19: Übersicht Affinitäten gemessen mittels SPR. Werte in Klammern entsprechen der Affinität des nicht modifizierten Proteins

Molekül	Modifizierung	Target	Affinität SPR [nM]	Faktor K_D^{mod}/K_D^{unmod}	Referenz
In dieser Arbeit bzw. im Zusammenhang mit dieser Arbeit hergestellte Proteinvarianten: Modifizierung mit PAS(600)					
His ₆ -PAS(600)-IFN	N-Term	Humaner IFNR2	8,67 (2,37)	3,7	diese Arbeit
His ₆ -PAS(600)-YNS α 8	N-Term	Humaner IFNR2	0,435 (0,4)	1,1	diese Arbeit, Levin et al., 2011
ASHis ₆ -PAS(600)-IFN-1ant	N-Term	Humaner IFNR2	0,371 (0,28)	1,3	diese Arbeit Pan et al., 2008
MKHis ₆ -PAS(600)-IFN-1ant	N-Term	Humaner IFNR2	0,388 (0,28)	1,4	diese Arbeit Pan et al., 2008
MKHis ₆ -PAS(600)-OmCI	N-Term	Humaner IFNR2	1,25 (1,21)	1,0	diese Arbeit
pOmCI-PAS(600)	C-Term + glycosyliert	Humaner IFNR2	31,9 (1,81)	17,6	diese Arbeit
In der Literatur beschriebene Proteinvarianten: Modifizierung mit PAS(600), PEG, XTEN und Fc					
PEG-IFN- α 2a (PEGASYS [®])	PEG(40); Lys verzweigt	Humaner IFNR2	16,7 (2,37)	7,0	Schlapschy et al., 2013
pOmCI-Fc	C-Term	Humanes C5	11 (4,7)	2,3	Ruseva, 2010
		Murines C5	5,3 (0,4)	13,3	
Fab-PAS(600)	C-Term	Her2/ErbB2 Ektodomäne	0,244 (0,114)	2,1	Schlapschy et al., 2013
Fab-PEG(20) ₂	PEG(20) ₂ ; Cys am C-Term	Her2/ErbB2 Ektodomäne	0,198 (0,114)	1,7	Schlapschy et al., 2013
PAS(600)-hGH	N-Term	Humaner Wachstums-hormonrezeptor	$77,8 \times 10^{-3}$ ($29,2 \times 10^{-3}$)	2,7	Schlapschy et al., 2013
PAS(600)-Leptin	N-Term	Muriner Leptinrezeptor	4,2 (0,6)	7	Morath et al., 2015
N7A.19-PAS(600)-CL31d	Linker	Y*DTPA-RNase	1,22 (0,12)	10,2	Eggenstein, 2017
		Fibronektin-domäne Fn7B8	0,686 (0,041)	16,7	
PAS600-Ec1	N-Term	Humanes EpCAM	0,194 (0,0878)	2,2	Brandl et al., 2019
XTEN576-Ec1	N-Term	Humanes EpCAM	0,108 (0,0878)	1,2	Brandl et al., 2019
PAS600-IL-1Ra	N-Term	Humaner IL-1R1	0,142 (0,0185)	7,7	Powers et al., 2020

4.3.3.2 Bestimmung der Aktivität im Zell-Assay

Die Ergebnisse der Zell-Assays bestätigen die Resultate aus den SPR-Experimenten. Die antivirale und antiproliferative Aktivität des N-terminal PASylierten Superagonisten blieb nach der PASylierung erhalten; für N-terminal PEGylierte Interferone sind hingegen zum Teil deutliche Abnahmen der antiviralen Aktivität beschrieben, beispielsweise bis zu einem Faktor von 14,3 für PEGASYS[®] (Tabelle 20). Interessanterweise beeinflusst die N-terminale PASylierung die antivirale Aktivität des murinen mIFN α 11 stärker als die der humanen Interferone.

Tabelle 20: Übersicht Aktivitäten gemessen mittels Bioassay. Werte in Klammern entsprechen der Affinität des nicht modifizierten Proteins

Molekül	Modifizierung	Assay	IC ₅₀ /EC ₅₀ /Spezifische Aktivität im Bioassay	Faktor EC ₅₀ ^{mod} /E ₅₀ ^{unmod}	Referenz
In dieser Arbeit bzw. im Zusammenhang mit dieser Arbeit hergestellte Proteinvarianten: Modifizierung mit PAS(600)					
His ₆ -PAS(600)-YNSα8	N-Term	Antiproliferativ	7,7 (6,6) pM	1,2	Harari <i>et al.</i> , 2014b
		Antiviral	0,50 (0,46) pM	1,1	
MKHis ₆ -PAS(600)-OmCI	N-Term	AP ELISA	17,5 (24,5) nM	0,7	diese Arbeit Kuhn <i>et al.</i> , 2016
		CP ELISA	6,0 (7,1) nM	0,8	
		PNH-Zell-Assay	216 (208) nM	1,0	
OmCI-PAS(600)-His ₆	C-Term + glycosyliert	CH ₅₀ -Zell-Assay	81 (38) nM	2,1	Kammerer, 2013
In der Literatur beschriebene Proteinvarianten: Modifizierung mit PAS(600), PEG, Fc und XTEN					
PEG-IFN-α2a (PEGASYS®)	PEG(40) ₂ ; Lys, verzweigt	Antiviral	0,14x10 ⁸ (2x10 ⁸) IU/mg	14,3	Bailon <i>et al.</i> , 2001
PEG-IFN-α2b (PEG-Intron®)	PEG(12); Lys	Antiviral	0,73x10 ⁸ (2,6x10 ⁸) IU/mg	3,6	Grace <i>et al.</i> , 2001
PEG-IFN-β1a (Plegridy®)	PEG(20); Lys am N-Term	Antiviral	11,9 (5,7) pg/ml	2,1	Baker <i>et al.</i> , 2006
PAS(600)-mIFNα11	N-Termin	Antiviral	2,5x10 ⁻³ (1,2x10 ⁻⁴) pM	21	Xia <i>et al.</i> , 2019
OmCI-Fc	C-Term	CH ₅₀ -Zell-Assay (humanes Serum)	1,67 (1,94) nM	1,2	Ruseva, 2010
PEG-hGH	PEG(20); Cys	Proliferativ	3,7 (1,4) ng/ml	2,6	Cox 2007
XTEN1-rhGH-XTEN2 (VRS-317)	N- und C-Term	Proliferativ	6,8 (0,6) nM	11,3	Cleland <i>et al.</i> , 2012
PAS(600)-Leptin	N-Term	Renilla Luciferase	6,1 (0,8) nM	7,6	Morath <i>et al.</i> , 2015
PEG-Leptin Varianten	PEG(20)-PEG(40)	Proliferativ	3 bis 19,5 % der Aktivität des unmodifizierten Leptins	5-33	Elinav <i>et al.</i> , 2009
Gcg-XTEN144	C-Term	Calcium-Fluss-Assay	71,0 (10,7) nM	6,6	Geething <i>et al.</i> , 2010
GLP2-2G-XTEN864	C-Term	Calcium-Fluss-Assay	380 (7) nM	54	Alters <i>et al.</i> , 2012

Ebenfalls blieb die inhibitorische Wirkung von OmCI auf den alternativen und klassischen Komplementweg nach N-terminaler PASylierung erhalten. Unerwarteterweise wurden sogar etwas kleinere IC₅₀-Werte für die N-terminal PASylierte Variante im Vergleich zur nicht modifizierten Version festgestellt. Dies könnte mit einer zusätzlichen sterischen Hinderung der C5-Protease im Fall der Komplexbildung mit OmCI durch das PAS-Polymer erklärt werden. Hingegen zeigte die C-terminal fusionierte OmCI-Variante abermals eine Verminderung der Aktivität, jedoch diesmal nur um den Faktor 2,1; also nicht mehr so stark wie im SPR-Experiment (siehe Tabelle 19). Das ist ein Beispiel dafür, dass eine verminderte Affinität im SPR-Experiment nicht unbedingt eine niedrige Aktivität im Zell-Assay zur Folge haben muss.

Für das N-terminal modifizierte Leptin bestätigte sich die verminderte Affinität aus dem SPR-Experiment im Zell-Assay (Morath *et al.*, 2015). Demgegenüber ist der Einfluss von anderen Methoden zur Plasma-Halbwertszeitverlängerung noch stärker (Beispiel: PEGylierte Leptin-Varianten, Tabelle 20).

Zusammenfassend betrachtet geht aus den hier gemachten Beobachtungen zur *In vitro*-Aktivität hervor, dass das PAS(600)-Biopolymer die Affinität und Aktivität im Zell-Assay im Vergleich zu PEG und XTEN besser erhält. Zudem ist eine gezielte genetische Kopplung (N- oder die C-terminale Fusion) mit einem Fusionspartner leicht möglich. Falls die biologische Aktivität zu stark beeinflusst wird, wäre auch eine spezifische chemische Kopplung des isolierten PAS-Polypeptids über Cystein-Seitenketten (Breibeck, 2016) möglich. Jedoch sollte die Verminderung der Aktivität des Fusionspartners nicht überbewertet werden, da diese durch eine höhere Dosis und vor allem die wesentlich längere Plasma-Halbwertszeit mehr als ausgeglichen werden kann (Morath *et al.*, 2015; Powers *et al.*, 2020).

4.4 *In vivo*-Charakterisierung

4.4.1 Pharmakokinetik in Tiermodellen

In Abschnitt 4.3.2 wurde die signifikante Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens von kleinen therapeutischen Proteinen durch das PAS(600)-Biopolymer gezeigt, was die Nierenfiltration verlangsamt und folglich die Plasma-Halbwertszeit verlängert. Dennoch werden auch PASylierte Proteine nach einer gewissen Zeit aus dem Blutplasma eliminiert. Aufgrund ihrer flexiblen ungeordneten Struktur und ihrer zeitweise elongierten Molekülform können PASylierte Proteine dennoch die Poren der glomerulären Basalmembran durchdringen (Breibeck, 2016; Markovsky *et al.*, 2012), oder sie werden durch Endozytose und/oder Metabolisierung in Geweben abgebaut (Gebauer & Skerra, 2018). Die PASylation-Technologie ist bei der Entwicklung von *Biobetters*, also Weiterentwicklungen bereits zugelassener Biopharmazeutika mit beispielsweise verringerter Immunogenität, optimiertem Glycosylierungsmuster oder eben verlängerter Plasma-Halbwertszeit wie auch bei der Entwicklung neuer innovativer Therapeutika besonders vielversprechend.

Bereits bei mehr als zehn zuvor zugelassenen Biopharmazeutika wurde die PASylierung erfolgreich angewendet (siehe Tabelle 21; Binder & Skerra, 2017). Außerdem wurden neue PASylierte Wirkstoffkandidaten entwickelt; darunter fallen die drei in dieser Doktorarbeit charakterisierten PASylierten Varianten des Interferon-Superagonisten YNS α 8, des Interferon-Antagonisten IFN-1ant sowie von OmCI (Coversin).

Tabelle 21: Übersicht Pharmakokinetik

Molekül	Fusionspartner	Spezies	PK-Effekt	Indikation	Referenz
In dieser Arbeit hergestellt Proteinvarianten mit PAS(600)					
YNS48	PAS(600)	Maus	10	Multiple Sklerose	diese Arbeit
IFN-1ant	PAS(600)	Affe	3,2	HIV	diese Arbeit
OmCI	PAS(600)	Maus	52	PNH	diese Arbeit
In der Literatur beschriebene Proteinvarianten mit unterschiedlichen PAS-Längen					
Interferon- α 2a	PAS(200)	Maus	>10	Infektionen und Entzündungen	Binder & Skerra, 2017
Interferon- α 2b	PAS(200)	Maus	5	Hepatitis B	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
Interferon- α 2b	PAS(400)	Maus	15	Hepatitis B	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
Interferon- α 2b	PAS(600)	Maus	30	Hepatitis B	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
α Her-Fab	PAS(100)	Maus	2	Onkologie	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
α Her-Fab	PAS(200)	Maus	4	Onkologie	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
α Her-Fab	PAS(400)	Maus	11	Onkologie	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
α Her-Fab	PAS(600)	Maus	22	Onkologie	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
α Her-Fab	2xPAS(200)	Maus	28	Tumor Imaging	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
hGH	PAS(600)	Maus	94	Wachstumsverzögerung	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
Erythropoetin	PAS(200)	Maus	16	Blutarmut	Hedayati <i>et al.</i> , 2017
Leptin	PAS(200)	Maus	8	Lipodystrophie, Diabetes, Alzheimer	Morath <i>et al.</i> , 2015
Leptin	PAS(400)	Maus	16	Lipodystrophie, Diabetes, Alzheimer	Morath <i>et al.</i> , 2015
Leptin	PAS(600)	Maus	46	Lipodystrophie, Diabetes, Alzheimer	Morath <i>et al.</i> , 2015
Mit Doxorubicin geladenes Ferritin	PAS(40)	Maus	44	Krebs	Falvo <i>et al.</i> , 2016
Mit Doxorubicin geladenes Ferritin	PAS(75)	Maus	56	Krebs	Falvo <i>et al.</i> , 2016
N7A.19-PAS(200)-CL31d	PAS(200)	Maus	5	Tumor Imaging	Eggenstein, 2017
N7A.19-PAS(400)-CL31d	PAS(400)	Maus	11	Tumor Imaging	Eggenstein, 2017
N7A.19-PAS(600)-CL31d	PAS(600)	Maus	16	Tumor Imaging	Eggenstein, 2017
T84.66-PAS(200)-CL31d	PAS(200)	Maus	17	Pre-Targeting	Eggenstein, 2017
T84.66-PAS(400)-CL31d	PAS(400)	Maus	29	Pre-Targeting	Eggenstein, 2017
Exenatide	PAS(600)	Maus	100	Diabetes	Gebauer & Skerra, 2018
EcI	PAS(300)	Maus	30	Tumor Imaging	Brandl <i>et al.</i> , 2019
EcI	PAS(600)	Maus	70	Tumor Imaging	Brandl <i>et al.</i> , 2019
EcI	PAS(900)	Maus	94	Tumor Imaging	Brandl <i>et al.</i> , 2019
Nanoghost	PAS40	Maus	7	Nanotherapie	Krishnamurthy <i>et al.</i> , 2019
Adnectin C	PAS(200)	Maus	5	Onkologie	Aghaabdollahian <i>et al.</i> , 2019
Anti-VEGFA Nanobody	PAS(200)	Maus	14	Onkologie	Khodabakhsh <i>et al.</i> , 2018
IL-1Ra	PAS(600)	Maus	339	Autoimmunerkrankungen	Powers <i>et al.</i> , 2020

Tabelle 21: Übersicht Pharmakokinetik (fortgesetzt)

Molekül	Fusionspartner	Spezies	PK-Effekt	Indikation	Referenz
In der Literatur beschriebene Proteinvarianten mit unterschiedlichen XTEN-Längen					
Exenatide (VRS859)	XTEN864	Mensch	52	Diabetes	Podust <i>et al.</i> , 2016
Exenatide (VRS859)	XTEN864	Maus	71	Diabetes	Podust <i>et al.</i> , 2016
Exenatide (VRS859)	XTEN864	Ratte	65	Diabetes	Podust <i>et al.</i> , 2016
Exenatide (VRS859)	XTEN864	Affe	125	Diabetes	Podust <i>et al.</i> , 2016
XTEN288-Ec1	XTEN288	Maus	35	Tumor Imaging	Brandl <i>et al.</i> , 2019
XTEN576-Ec1	XTEN576	Maus	82	Tumor Imaging	Brandl <i>et al.</i> , 2019
XTEN864-Ec1	XTEN864	Maus	114	Tumor Imaging	Brandl <i>et al.</i> , 2019
hGH (VRS317)	XTEN912 + 144	Mensch	44-66	Wachstumsverzögerung	Podust <i>et al.</i> , 2016
hGH (VRS317)	XTEN912 + 144	Ratte	28	Wachstumsverzögerung	Podust <i>et al.</i> , 2016
hGH (VRS317)	XTEN912 + 144	Affe	37-55	Wachstumsverzögerung	Podust <i>et al.</i> , 2016
Literatur beschriebene Proteinvarianten mit unterschiedlichen PEG-Längen					
α Her-Fab	PEG(20) ₂ , verzweigt, via Cys C-Term	Maus	26	Onkologie	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
IFN- α 2a (PEGASYS [®])	1x40 kDa PEG, verzweigt, via Lys	Maus	73	Hepatitis C	Fishburn, 2008
IFN- α 2a (PEGASYS [®])	1x40 kDa PEG, verzweigt, via Lys	Mensch	8-22	Hepatitis C	Zeuzem <i>et al.</i> , 2003
IFN- α 2b (PEG-Intron [®])	12 kDa PEG, linear, via His	Mensch	10	Hepatitis C	Zeuzem <i>et al.</i> , 2003
IFN- β 1a (Plegridy TM)	1x20 kDa PEG, linear, N-Terminus	Ratte	13	Multiple Sklerose	Fishburn, 2008
IFN- β 1a (Plegridy TM)	1x20 kDa PEG, linear, N-Terminus	Mensch	2	Multiple Sklerose	Hu <i>et al.</i> , 2012
hGH	1x20 kDa PEG, linear, via Cys	Ratte	8	Wachstumsverzögerung	Fishburn, 2008
hGH (ARX201)	1x30 kDa PEG, linear, Keto-Gruppe	Mensch	30	Wachstumsverzögerung	Binder & Skerra, 2015
Leptin	42 kDa, verzweigt	Mensch	>12	Lipodystrophie, Diabetes, Alzheimer	Hukshorn <i>et al.</i> , 2003
Erythropoetin (Micera [®])	30 kDa, linear, via Lys	Mensch	3-19	Anämie / chronische Nierenerkrankung	Macdougall <i>et al.</i> , 2006
Literatur beschriebene Proteinvarianten mit Fc- und HSA-Fusion					
hGH-hyFc	Chimäres Protein	Ratten	93	Wachstumsverzögerung	Kim <i>et al.</i> , 2015
α Her-Fab	ABD, C-Term	Maus	22	Onkologie	Schlapschy <i>et al.</i> , 2013
IFN- α 2b (Albinterferon)	HSA, C-Term	Mensch	35	Hepatitis C	Binder & Skerra, 2015
hGH (Albutropin)	HSA, N-Term	Affe	6	Wachstumsverzögerung	Osborn <i>et al.</i> , 2002

Im Rahmen der Etablierung der PASylation-Technologie wurde der Einfluss der gewählten PAS-Länge auf die Pharmakokinetik des Fusionspartners untersucht und nachgewiesen, dass der PK-Effekt mit zunehmender PAS-Länge stetig größer wird, wobei der Effekt jedoch stark vom Fusionspartner abhängt. Es ergeben sich in der Regel Verlängerungsfaktoren im Bereich von 4 bis 17 für PAS(200), 11 bis 29 für PAS(400) und 22 bis 339 für PAS(600) (siehe Tabelle 21). In weiteren Studien hat sich gezeigt, dass sich ein PAS-Polymer mittellanger Länge (PAS(200)/PAS(400)) gut zur *In vivo*-Bildgebung (Mendler *et al.*, 2015) und für das *In vivo Pretargeting* (Eggenstein, 2017) eignen, wobei ein hohes Tumor/Blut-Verhältnis innerhalb kurzer Zeit erreicht wird. Längere PAS(600)-Polymere eignen sich dagegen vor allem für Therapeutika mit besonders langen Plasma-Halbwertszeiten.

Aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten PK-Studien ergab sich für MKHis₆-PAS(600)-OmCI in Mäusen eine zu PAS(600)-Leptin vergleichbare Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit mit einem beachtlichen PK-Effekt von 52. Für den PASylierten Interferon-Superagonisten (His₆-PAS(600)-YNS α 8) ergab sich hingegen ein deutlich niedrigerer PK-Effekt von 10. Allerdings erfolgte in diesem Fall die Quantifizierung des rekombinanten Proteins anhand der Aktivierung des chimären (Maus/Human) IFNR-Rezeptors im Tiermodell (Harari *et al.*, 2014b). Für mit 40 kDa PEGylierte Fusionsproteine (verzweigt PEG(20)₂ oder linear mit α Her-Fab und IFN- α 2a; PEGASYS[®]) wurden zur PASylierung vergleichbare PK-Effekte von 26 und 73 in der Maus beschrieben (Tabelle 21).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Human Immunology Section/Vaccine Research Center*, NIH der USA, die erste PK-Studie mit einem PASylierten Protein an Affen durchgeführt. Hierbei ergab sich ein relativ geringer PK-Effekt von 3,2; jedoch ist für die Wirksamkeit des Proteins die 70-fache Vergrößerung der AUC entscheidend. Es bleibt die Frage, welchen PK-Effekt die PASylierung im Menschen haben könnte. Es ist schwierig, allein von der Plasma-Halbwertszeit gemessen in der Maus den Effekt im Menschen abzuschätzen, da die Plasma-Halbwertszeiten zwischen den Organismen sehr stark variieren und eine allometrische Skalierung noch nicht beschrieben wurde (siehe Tabelle 21).

Bei der allometrischen Skalierung wird der Zusammenhang zwischen Körpergewicht und PK-Parametern anhand von Experimenten in unterschiedlichen Organismen als Potenzfunktion modelliert, um auf den PK-Effekt im Menschen extrapolieren zu können (Mahmood, 2007). Dazu gibt es für PASylierte Proteine jedoch noch nicht genügend Datenpunkte. Für das mit 30 kDa PEGylierte hGH (ARX201) ist ein Verlängerungsfaktor von 30 im Menschen beschrieben (Tabelle 21), was für das PAS(600)-Fusionsprotein als plausibler Vergleichswert erscheint.

Zusammenfassend betrachtet ist der durch die PASylierung erzielte PK-Effekt skalierbar und je nach Anwendung anpassbar. Die PK-Effekte variieren sehr stark zwischen den getesteten Wirkstoffen – die sie sich im Metabolisierungsmechanismus unterscheiden – sind aber vergleichbar mit denen, die durch PEGylierung oder XTEN erreicht werden. In der Maus kann die terminale Halbwertszeit eines nicht PASylierten Proteins (Beispiel: OmCI) sehr kurz und damit kaum nachweisbar sein, was mit der PASylierung erheblich verbessert wird und so überhaupt Experimente im Nagermodell möglich macht (Sezin *et al.*, 2019).

4.4.2 Wirksamkeit in präklinischen Krankheitsmodellen

4.4.2.1 IFN-Superagonist zur Behandlung von MS

Die biologische Aktivität des PASylierten Interferon-Superagonisten, der im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert wurde, wurde in Kooperation mit dem Weizmann-Institut für Wissenschaften, Israel, in einem Mausmodell der Experimentellen Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE) untersucht und mit der Aktivität von Interferon- β als etabliertem Therapeutikum verglichen (Harari *et al.*, 2014b). Hierfür wurde zunächst die Plasma-Halbwertszeit bestimmt, um die geeignete Dosisierung zu bestimmen.

Mittels einer zweifach transgenen Maus, der „HyBNAR/MX2-Luc“-Maus, war es möglich, die Interferon-Aktivität anhand eines induzierten Luziferase-Signals in Echtzeit zu verfolgen (Harari *et al.*, 2014a). Für den PASylierten IFN-Superagonisten wurde eine um den Faktor 10 verlängerte Plasma-Halbwertszeit gegenüber dem unmodifizierten Protein nach *i.p.* Verabreichung nachgewiesen, wobei die Biodistribution unverändert erschien. Die ermittelten Halbwertszeiten lagen für das nicht PASylierte Protein bei 3 h, hingegen für das PASylierte Protein bei 30 h. Dies könnte im Menschen ein einmonatliches Dosierungsintervall von His₆-PAS(600)-YNS α 8 gegenüber einer bisher dreifach wöchentlichen Dosierung von IFN- β ermöglichen (Harari *et al.*, 2014b).

Daraufhin wurde in dem EAE-Mausmodell die biologische Aktivität des PASylierten IFN-Superagonisten untersucht. Der PASylierte Superagonist zeigte einen wesentlich stärkeren Effekt als IFN- β . Der klinische *Score* war nach 18 Tagen immer noch $<0,5$, und die Mäuse verloren auch nicht an Gewicht. Das Ergebnis war erstaunlich, da der PASylierte Superagonist nur mit 1/4 der IFN- β Frequenz (alle zwei Tage) und nur mit 1/16 der IFN- β Dosis verabreicht wurde.

Erst vor kurzem wurde ein mit 20 kDa N-terminal PEGyliertes IFN- β Molekül (Plegridy[®]) zugelassen, das mit zweiwöchentlicher Verabreichung für Patienten mit schubförmig remittierender Multipler Sklerose (MS) eingesetzt wird (Newsome *et al.*, 2017). Der PASylierte Superagonist wäre vor allem ein alternatives Medikament für Patienten, die nicht auf die IFN- β Therapie reagieren oder Antikörper gegen IFN- β gebildet haben. Zudem hat der

PASylierte Superagonist eine möglicherweise verlängerte pharmakodynamische Wirkung als IFN- β , wie in dem EAE-Mausexperiment gezeigt wurde.

4.4.2.2 IFN-Antagonist zur Behandlung von Entzündungsreaktionen bei chronischer HIV/SIV-Infektion

Das IFN-1ant Projekt wurde in Kooperation mit Arbeitsgruppen am NIH, dem Weizmann-Institut für Wissenschaften, sowie der XL-protein GmbH durchgeführt. Ziel des Projekts war es, den Effekt des IFN-1ant Proteins mit verlängerter Plasma-Halbwertszeit auf den Krankheitsverlauf einer SIV-Infektion (verwendeter Virusstamm: SIVmac251) in Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) zu untersuchen, um ein neuen Wirkstoff zur Behandlung pathologischer Begleiterscheinungen bei der HIV-Infektion von Menschen zu entwickeln.

Typ I Interferone – sowohl endogen als auch exogen verabreicht – beeinflussen den Verlauf einer HIV-Infektion auf unterschiedliche Weise, wobei ihre Wirkung vom Zeitpunkt im Infektionsverlauf abhängig ist (Utay & Douek, 2016). So zeichnen sich die ersten Wochen einer HIV-Infektion im Menschen durch ein erhöhtes Plasmalevel verschiedener IFN- α Subtypen aus. Auch während der akuten Phase einer Infektion von Rhesusaffen mit dem *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) werden IFN-stimulierte Gene (ISGs) im peripheren Blut und Lymphgewebe hochreguliert. Zudem wurde gezeigt, dass eine erhöhte Typ I Interferon-Aktivität während der akuten Phase der SIV/HIV-Infektion die Virusreplikation unterdrückt. Hingegen führte die Behandlung mit dem Typ I Interferon-Antagonisten zu einer verminderten Expression antiviraler Gene, einer erhöhten Virusreplikation und zum Abbau von CD4⁺ T Zellen einhergehend mit einem zügigerem Fortschreiten der Erkrankung (Sandler *et al.*, 2014; Telenti, 2014).

Die Expression von ISGs bleibt allerdings auch im weiteren Verlauf der chronischen SIV-Infektion gegenüber dem Niveau vor der Infektion erhöht. Dabei ist kontrovers, ob die erhöhte Expression der ISGs der Kontrolle der chronischen Infektion durch das Immunsystem dient oder ob sie direkt zur Erhöhung einer systemischen Entzündungsreaktion beiträgt und damit dem Krankheitsverlauf sogar Vorschub leistet (Utay & Douek, 2016). Eine erhöhte Typ I Interferon-Aktivität während der chronischen Phase der SIV/HIV-Infektion geht auch mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber dem Virus und einem Fortschreiten der Krankheit einher; es kommt zu einem erhöhten Abbau von CD4⁺ T Zellen – und im Rahmen eines sogenannten Interferon-Desensibilisierungszustands – paradoxerweise wieder zu einer verringerten Expression von Typ I IFN stimulierten Genen (Sandler *et al.*, 2014; Telenti, 2014). Durch die Gabe eines Typ I Interferon-Antagonisten, wie des IFN-1ant Proteins, während der chronischen Phase der SIV/HIV-Infektion sollte diese Typ I Interferon-Aktivität unterdrückt werden, was zu einer Abschwächung des Krankheitsverlaufs beitragen bzw. unerwünschte pathologische Begleiterscheinungen verhindern kann (Nganou-Makamdop *et al.*, 2018).

In einer ersten Studie wurde die Pharmakokinetik des PASylierten Interferon-Antagonisten IFN-1ant in Rhesusaffen untersucht. Die terminale Plasma-Halbwertszeit war für den PASylierten Interferon-Antagonisten um den Faktor 3,2 verlängert (von $6,06 \pm 0,74$ h auf $19,4 \pm 2,6$ h) (Nganou-Makamdop *et al.*, 2018). Entscheidender war jedoch der Effekt auf die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC), die ein Maß für die Bioverfügbarkeit des Therapeutikums ist und für das PASylierte IFN-1ant Protein um den Faktor 70 vergrößert war.

In der anschließenden SIV-Infektionsstudie von PASyliertem IFN-1ant während der chronischen Phase der Erkrankung an Rhesusaffen unter zusätzlicher antiviraler Therapie oder ohne weitere Behandlung konnte gezeigt werden, dass eine zweiwöchentliche Gabe in beiden Gruppen die Expression von ISGs signifikant reduziert ohne dabei das Niveau von proinflammatorischen Cytokinen zu verändern. Im Gegensatz zur vorherigen Studie (Sandler *et al.*, 2014) stieg die Virusreplikation nicht an, so dass die Infektion weiterhin unter Kontrolle war.

Da durch die Behandlung von HIV-Infektionen in der chronischen Phase mit antiviralen Medikamenten die Typ I Interferon-Aktivität und damit verbundenen unerwünschten pathologischen Begleiterscheinungen nicht komplett normalisiert werden können, könnte die zusätzliche Gabe des PASylierte Interferon Antagonisten hier Abhilfe leisten (Nganou-Makamdop *et al.*, 2018).

4.4.2.3 OmCI als Alternative zu Eculizumab zur Behandlung von PNH

OmCI („Coversin“) ist ein bi-funktionelles Protein mit einem breiten Anwendungsbereich in der Behandlung komplement-vermittelter Erkrankungen. In einer Phase Ia Studie in Menschen führte die einfache Gabe von Coversin (0,57 mg/kg) zur kompletten Blockade der terminalen Komplementkaskade in Serumproben für mindestens 24 Stunden. Daher wird angenommen, dass ein tägliches Dosierungsintervall zur einer effektiven Inhibierung des Komplementsystems führen sollte (Weston-Davies *et al.*, 2014).

Diese verhältnismäßig kurze Zeitspanne der Inhibierung der hämolytischen Aktivität im Menschen geht einher mit den Beobachtungen aus früheren PK-Studien an Mäusen. Die Plasma-Halbwertszeit von OmCI zeigte sich dabei abhängig vom Komplementfaktor C5 (Hepburn *et al.*, 2007). In Experimenten mit C5-defizienten und C5-suffizienten Mäusen waren 30 min nach Verabreichung nur noch geringe Mengen OmCI mittels Western Blot nachweisbar. Dahingegen war das OmCI-Signal in C5-suffizienten Mäusen nach 30 min noch sehr hoch und immer noch nachweisbar nach 48 Stunden. Folglich wird die Zirkulation von OmCI im Blut durch Komplexbildung mit dem C5-Protein verlängert. Demgegenüber wird freies OmCI jedoch zu schnell aus dem Blutstrom entfernt, so dass es nicht den vollen pharmakologischen Effekt erreichen kann.

Analog sollte auch im Menschen ein stabiler Komplex zwischen OmCI und C5 gebildet werden, was zu einer Plasma-Halbwertszeit von 63 h, also der des C5-Proteins, führen sollte (Sissons *et al.*, 1977). Da jedoch überschüssiges OmCI schnell aus dem Blutstrom entfernt wird, kann neu synthetisiertes C5 nicht blockiert werden, was zu einer Wiederherstellung der terminalen Komplementkaskade führt. Der Komplementfaktor C5 wird konstitutiv in der Leber und anderen Geweben mit einer Rate von 90 µg/kg x h hergestellt (Hepburn *et al.*, 2007). Daher wäre ein OmCI-Molekül mit verlängerter Plasma-Halbwertszeit von Vorteil, um neu synthetisiertes C5 effizient abzufangen. Dies ginge einher mit einem wesentlich längeren Dosierungsintervall für das PASylierte OmCI (Hepburn *et al.*, 2007; Ruseva, 2010).

Die N-terminale Fusion von OmCI mit einer PAS-Sequenz von 600 Aminosäuren führte zu einer 52-fachen Verlängerung der terminalen Plasma-Halbwertszeit des unkomplexierten OmCI Proteins nach *i.v.* Verabreichung in Balb/c Mäusen. Dies wurde von einer 20-fach vergrößerten AUC begleitet. Mit Hilfe der pharmakokinetischen Daten wird ein wöchentliches Dosierungsintervall für das PASylierte OmCI in Menschen vorgeschlagen (Binder & Skerra, 2017). Auch eine subkutane Anwendung des PASylierten Proteins erscheint möglich, was weniger schmerzhaft ist und vom Patienten selbst durchgeführt werden kann.

Interessanterweise wies das PASylierte OmCI in einem klinisch relevanten AP-spezifischen Zell-Lysetest an Erythrozyten mit PNH-induziertem Phänotyp eine stärkere Inhibitoraktivität auf als das nicht PASylierte OmCI. Außerdem führte das PASylierte OmCI zu einem niedrigeren Plateau der Restlyse im Konzentrationsbereich oberhalb der C5-Sättigung. Die verbliebene Aktivierung der Komplementkaskade (Restlyse) trotz maximaler Inhibitorkonzentration wurde zuvor auch in der Literatur für verschiedene AP-vermittelte Hämolyse-Assays an nicht-sensibilisierten Erythrozyten aus Kaninchen beschrieben (Nunn *et al.*, 2005; Weston-Davies *et al.*, 2014; Blom *et al.*, 2014).

In anschließenden Untersuchungen am Institut für Naturheilkunde & Klinische Pharmakologie in Ulm an Erythrozyten mit PNH-ähnlichen Phänotypen (Ezzell *et al.*, 1991) wurde gezeigt, dass die beschriebene Restlyse auch unter Eculizumab-Inhibition beobachtet wird (Harder *et al.*, 2017). Eine Kombination aus den Inhibitoren OmCI und Eculizumab führte zur kompletten Unterdrückung der Restlyse. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Restlyse proportional zur Konzentration an vorhandenen C3b-Molekülen ist, welche wiederum von der Intensität der Komplementaktivierung abhängig ist. Nach neuesten Ergebnissen wird angenommen, dass die proteolytische C5-Aktivierung durch die C5-Convertase zunächst ein *Priming Event* mit C3b benötigt, was eine konformationelle Änderung des C5-Proteins bewirkt und daraufhin dessen proteolytische Aktivierung durch die Proteasen Bb oder C2a möglich macht (Jore *et al.*, 2016). Selbst in Gegenwart der einzelnen C5-Inhibitoren OmCI oder Eculizumab ist es dem C5-Protein offenbar noch möglich, zu

einem geringen Anteil mit den C3b-Molekülen zu interagieren und somit den MAC-Komplex auszulösen (Harder *et al.*, 2017). Durch die PASylierung von OmCI kann die Restlyse jedoch wesentlich reduziert werden, vermutlich durch einen sterischen Effekt des strukturell expandierten PAS-Polymers, was die Assoziation mit C3b behindert. Dies führt also nicht nur zu verlängerter sondern auch zu verstärkter pharmakologischer Aktivität.

Um das Problem der kurzen Plasma-Halbwertszeit von OmCI zu adressieren, wurde in der Literatur eine rekombinante OmCI-Variante (pOmCI) beschrieben, die C-terminal mit einer murinen IgG2a Fc-Domäne fusioniert wurde. Dabei konnte eine 2,5-fache Verlängerung der terminalen Plasma-Halbwertszeit in C5-suffizienten Mäusen gezeigt werden. In C5-defizienten Mäusen war der Effekt noch ausgeprägter; OmCI-Fc konnte sogar noch 96 Stunden nach Verabreichung mittels Western Blot detektiert werden. Allerdings besitzt die Fc-Fusionstrategie einige Nachteile, insbesondere die aufwendige Produktion in CHO-Zellen wie auch potentiell nachteilige Effektorfunktionen (Ruseva, 2010).

Die PEGylierung von OmCI würde im Prinzip eine Alternative zur PASylierung bieten, jedoch führt die fehlende biologische Abbaubarkeit von PEG zu dessen Anreicherung in Geweben und in der Niere, was zu Problemen gerade bei der Behandlung von chronischen Erkrankungen wie PNH oder aHUS führen kann. Außerdem ergibt sich ein erhöhtes Entzündungspotential, das durch anti-PEG Antikörper sowie PEG-induzierte Komplementaktivierung verursacht werden kann (Verhoef *et al.*, 2014).

Deshalb stellt das PASylierte Protein eine vielversprechende Alternative zur Eculizumab-Therapie von PNH und anderen komplement-vermittelten Erkrankungen dar. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die PASylation-Technologie auf ein Lipocalin angewendet. In Anbetracht der positiven Ergebnisse, ist die PASylierung ebenfalls eine vielversprechende Technologie zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit von Anticalinen, einer Proteinklasse von genetisch veränderten Lipocalinen mit Spezifität gegenüber therapeutischen Zielstrukturen (Richter *et al.*, 2014).

4.4.3 Immunogenität

Bei der Entwicklung von Biopharmazeutika spielt die potentielle Immunogenität als körperfremde Stoffe eine große Rolle. Biopharmazeutika sollten möglichst gut verträglich sein und keinerlei Immunreaktionen auslösen. Außerdem sollte eine zusätzliche Modifizierung zwecks Plasma-Halbwertszeitverlängerung diese Eigenschaften nicht verändern. Trotz der guten Verträglichkeit und hohen Sicherheit des chemischen PEG-Polymers wurde in verschiedenen Fällen gezeigt, dass PEGylierte Proteine eine Immunantwort auslösen können (EMA, 2013; Armstrong *et al.*, 2007). So wurden beispielsweise bei mit Krystexxa[®] oder Oncaspar[®] behandelten Patienten Anti-PEG-Antikörper nachgewiesen. Darüber hinaus wurden Anti-PEG-Antikörper auch im Blut

gesunder Blutspender gefunden, vermutlich aufgrund von regelmäßigem Kontakt mit PEG aus unterschiedlichen Quellen wie z.B. Kosmetika, verarbeiteten Lebensmitteln oder zuvor verabreichten PEGylierten Biotherapeutika (Garay *et al.*, 2012). PEG kann im menschlichen Körper nicht abgebaut werden und wird nur langsam oder unvollständig ausgeschieden und akkumuliert beispielsweise in der Leber, der Niere (Bendele *et al.*, 1998) oder in Makrophagen (Young *et al.*, 2007). Die möglichen langfristigen physiologischen Effekte dieser PEG-Akkumulation sind noch nicht untersucht.

Bei der Entwicklung von alternativen Strategien zur Plasma-Halbwertszeitverlängerung ist das Ziel, genau diese Nachteile von PEG zu umgehen. Allerdings können auch Strategien wie die der Fc- oder HSA-Fusion nachteilige immunologische Effekte hervorrufen. Fc-Fusionen können neben ungewollten Effektorfunktionen zu Zytotoxizität führen, und HSA neigt aufgrund seiner komplexen Struktur bei Fusionsproteinen zur Aggregation, was Immunreaktionen auslösen kann. Außerdem bindet HSA nicht nur an den FcRn sondern auch an andere Zellrezeptoren, was zu Nebenwirkungen führen kann (Binder & Skerra, 2017).

Für PAS-Polypeptide wurde in einigen Mausstudien gezeigt, dass diese nicht immunogen sind (Schlapschy *et al.*, 2013; Bolze *et al.*, 2016). Außerdem sind sie biologisch abbaubar durch intrazelluläre Proteasen und unterliegen dem natürlichen Proteinmetabolismus (Schlapschy *et al.*, 2013; Binder & Skerra, 2012). In der ersten Studie im Menschen mit einem PASylierten Fab Fragment (^{89}Zr -Df-HER2-Fab-PAS₂₀₀) im Bereich der medizinischen Bildgebung konnte ebenfalls eine gute Verträglichkeit des PASylierten Proteins nachgewiesen werden (Richter *et al.*, 2020). Schließlich ist die Bildung von Antikörpern gegen PAS-Polypeptide aufgrund ihrer ungeordneten Struktur und den fehlenden T-Zell Epitope wenig wahrscheinlich. Allerdings ist es XL protein gelungen einzelne monoklonale Antikörper gegen das PAS-Polypeptid zu generieren (Binder & Skerra, 2020).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten am Beispiel des PASylierten IFN-Superagonisten die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente bestätigt werden, indem abermals gezeigt wurde, dass auch nach 18-tägiger Behandlung in den behandelten Mäusen keine Antikörper gegen das rekombinante PASylierte Protein nachgewiesen werden konnten (Harari *et al.*, 2014b). Interessanterweise haben jedoch einige Tiere Antikörper gegen das Vergleichsprotein Mu-IFN- β gebildet (Harari *et al.*, 2014b). Höchstwahrscheinlich lag dies an der fehlenden Glycosylierung des verwendeten rekombinanten Proteins aus *E. coli*. Darüber hinaus konnte in den Experimenten mit SIV-infizierten Rhesusaffen, die über einen Zeitraum von 8 Wochen mehrmals mit PASyliertem IFN-Antagonisten (3,5 mg/Tier) behandelt worden sind, ebenfalls eine gute Verträglichkeit des PASylierten Proteins nachgewiesen werden (Nganou-Makamdop *et al.*, 2018).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden Cynomolgus-Affen mehrmals mit Dosen im Bereich von 0,1 bis 100 mg/kg eines mit PA(600) fusionierten i-body behandelt und

ebenfalls keine negativen Effekte des rekombinanten Proteins beschrieben (Griffiths *et al.*, 2019).

Für OmCI ist ebenfalls nur eine geringe Immunogenität zu erwarten, da Proteine im Speichel von Zecken auf Verträglichkeit durch den Wirt evolutionär angepasst sind (Ribeiro, 1995). Während der Phase Ia Studie mit Menschen zeigte OmCI eine gute Verträglichkeit und keinerlei Nebenwirkungen. Allerdings entwickelten in einer Immunogenitätsstudie, nach täglicher Gabe von OmCI (0,57 mg/kg) über 28 Tage 75 % der Mäuse, geringe Antikörpertiter gegen das rekombinante Protein (Weston-Davies *et al.*, 2014). Diese Antikörper waren allerdings nicht neutralisierend, und die behandelten Tiere zeigten auch keinerlei Anzeichen von Allergien oder Reaktionen an der Injektionsstelle. Mittlerweile wurde für OmCI aus vier klinischen Studien mit insgesamt 14 PNH-Patienten eine gute Verträglichkeit, Effektivität und keinerlei schwerwiegenden Nebenwirkungen beschrieben (Akari Press Release 10 Januar 2020; <http://akaritx.com>).

5 Zusammenfassung

Die PASylierung stellt eine vielversprechende neue Technologie zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit von Proteinen und anderen therapeutischen Wirkstoffen dar. Dabei werden die Eigenschaften des chemischen Polymers PEG durch ein biologisches Polypeptid, das aus den drei kleinen *L*-Aminosäuren Pro, Ala und/oder Ser (PAS) besteht, imitiert. Das PAS-Polymer ist chemisch inert, hydrophil und vor allem ungeladen und biologisch abbaubar. Es nimmt in wässriger Lösung eine ungeordnete Struktur an und vergrößert dadurch das hydrodynamische Volumen eines konjugierten Therapeutikums, was zur Verlangsamung seiner Nierenfiltration führt und folglich zur Verbesserung der pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften. Die PASylierung wurde bereits zuvor erfolgreich für einzelne therapeutische Proteine wie das Wachstumshormon oder Leptin eingesetzt. Durch die genetische Fusion mit dem N- oder C-Terminus des Therapeutikums und Anpassung der PAS-Kettenlänge können die pharmakokinetischen Eigenschaften auf einfache Weise an die jeweiligen Anforderungen angepasst werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die PASylation-Technologie bei weiteren medizinisch relevanten Modellproteinen anzuwenden, um so neue Wirkstoffkandidaten zu entwickeln. Dazu wurden ein humaner Interferon- α 2b-Superagonist (YNS α 8) und ein -Superantagonist (IFN-1ant) sowie der C5-spezifische Komplementinhibitor OmCI jeweils mit einem PAS(600)-Biopolymer modifiziert.

Hierfür wurden unterschiedliche Expressions- und Reinigungsstrategien etabliert und hinsichtlich der Ausbeute an rekombinantem PASyliertem Protein optimiert. Neben der bislang üblichen periplasmatischen Produktion PASylierter Proteine in *E. coli*, die zur Herstellung der PASylierten IFN-Varianten (YNS α 8 und IFN-1ant) angewandt wurde, wurde in dieser Arbeit das erste Mal die cytoplasmatische Produktion PASylierter Proteine mit zwei bis drei Disulfidbrücken in dem *E. coli*-Stamm Origami B für IFN-1ant und OmCI in hoher Ausbeute beschrieben. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch die Koexpression der eukaryotischen PDI im Cytoplasma von *E. coli* die Ausbeute an löslichem OmCI signifikant gesteigert werden konnte. Mit Hilfe massenspektrometischer Methoden wurde die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken in dem cytoplasmatisch hergestellten Protein nachgewiesen.

Von den verschiedenen gereinigten Proteinen wurden die hydrodynamischen Eigenschaften mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) und dynamischer Lichtstreuung (DLS) untersucht. Die Fusion aus dem PAS#1(600)-Polypeptid und den Interferon-Varianten wie auch OmCI führte jeweils zu einer drastischen Vergrößerung der apparenten Molekülmasse in der SEC mit einem 9 bis 10-fach vergrößerten hydrodynamischen Volumen. Im Vergleich zu den nicht PASylierten Proteinen ergaben sich sogar Vergrößerungsfaktoren zwischen 20 und 27. Diese Ergebnisse wurden gestützt durch DLS-Messungen, bei denen der

hydrodynamische Radius der PAS#1(600)-Fusionsproteine im Vergleich zu den nicht PASylierten Proteinen durchschnittlich um den Faktor 3 bis 4 vergrößert erschien.

Die *In vitro*-Aktivität der PASylierten Proteine wurde mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR), in anti-viralen und anti-proliferativen Zell-Assays (IFN-Varianten) oder in Hämaolyse-Assays (OmCI-Varianten) charakterisiert. Bemerkenswerterweise war diese durch die PASylierung kaum bis gar nicht beeinflusst. Die Auswahl des geeigneten Terminus für die genetische Kopplung mit dem PAS-Polymer war hierbei allerdings entscheidend. Die N-terminale PAS-Fusion zeigte sich für die IFN-Varianten wie auch für das OmCI als optimale Anordnung; hingegen war der K_D -Wert gegenüber C5 für das C-terminale OmCI PAS-Fusionsprotein gegenüber dem C5-Zielprotein um den Faktor 18 verschlechtert. In Assays zur Komplement-Inaktivierung zeigte das N-terminal PASylierte OmCI überraschenderweise sogar eine bessere inhibitorische Aktivität als das nicht PASylierte Protein.

Die pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften der in dieser Arbeit entwickelten PASylierten Wirkstoffkandidaten wurde vor allem im Rahmen von Kooperationsprojekten in Mäusen und Rhesusaffen untersucht. Für das PASylierte IFN- γ wurde eine um den Faktor 10 verlängerte Plasma-Halbwertszeit in Mäusen nachgewiesen, ohne dass die Biodistribution des Proteins verändert war. Zudem übertraf der PASylierte IFN-Superagonist die Wirkung des humanen IFN- β in einem MOG35-55-induzierten EAE-Mausmodell für Multiple Sklerose (MS) mit einer 16-fach geringeren Dosis bei 4-fach reduziertem Dosierungsintervall.

Die pharmakokinetischen Eigenschaften des PASylierten IFN-1ant Proteins wurde erstmals in Rhesusaffen charakterisiert. Die terminale Plasma-Halbwertszeit war für PAS(600)-IFN-1ant um den Faktor 3,2 verlängert, bei einer sogar 70-fachen Vergrößerung der Bioverfügbarkeit (AUC) des Therapeutikums. In der chronischen Phase des SIV-Krankheitsverlaufs in den Rhesusaffen konnte das PASylierte Protein unerwünschte Entzündungsreaktionen unterdrücken. Zudem zeigte das N-terminal PASylierte OmCI zeigte eine 52-fach verlängerte terminale Plasma-Halbwertszeit in Mäusen nach intravenöser Injektion. Dies ging einher mit einer 20-fach vergrößerten Bioverfügbarkeit (AUC).

Somit wurden aus dieser Arbeit drei Wirkstoffkandidaten mit verbesserter Pharmakokinetik und teilweise sogar verbesserter pharmakologischer Aktivität für Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose, HIV und paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie entwickelt und charakterisiert.

6 Abkürzungsverzeichnis

AEX	<i>Anion Exchange Chromatography,</i> Anionenaustauschchromatographie
Amp	Ampicillin
AP	Alternativer Komplementweg
aTc	Anhydrotetracyclin
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
bp	Basenpaar
Bla	β -Lactamase
BSA	Rinderserumalbumin
Cam	Chloramphenicol
CD	Circulardichroismus
CEX	<i>Cation Exchange Chromatography,</i> Kationenaustauschchromatographie
CP	Klassischer Komplementweg
DMF	Dimethylformamid
DLS	Dynamische Lichtstreuung
EC ₅₀	Halbmaximale effektive Konzentration
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
Fab	Antigen-bindendes Fragment eines Immunglobulins
FcRn	Neonataler Fc-Rezeptor
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IC ₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
IEX	<i>Ion Exchange Chromatography,</i> Ionenaustauschchromatographie
IFN	Interferon- α 2b
IFNAR	Interferon- α/β Rezeptor
IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-galactopyranosid
<i>i.v.</i>	<i>Intravenös</i>
<i>i.p.</i>	<i>Intraperitoneal</i>
K _{av}	Partitionskoeffizient
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
MAb	Monoklonaler Antikörper
MAC	<i>Membrane Attack Complex</i>

M	Molekülmasse
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD ₅₅₀	Optische Dichte bei 550 nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>PDB</i>	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
PK	Pharmakokinetik
⊖	Elliptizität
RPC	<i>Reversed Phase Chromatography</i> , Umkehrphasenchromatographie
rpm	<i>Rounds per Minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>s.c.</i>	Subkutan
σ	Standardabweichung
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	<i>Size-Exclusion Chromatography</i> , Größenausschlusschromatographie
SIV	Simian (=affenartig) Immundefizienz-Virus
SPR	Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie
SS	Signalsequenz
Tet	Tetracyclin
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>Unit</i>)
UV/Vis	Wellenlängen des sichtbaren sowie nahen ultravioletten Lichts
V ₀	Ausschlußvolumen
V _t	Säulenvolumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

7 Literaturverzeichnis

- Abuchowski, A., McCoy, J.R., Palczuk, N.C., van Es, T. & Davis, F.F. (1977a) Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J Biol Chem* 252, 3582-3586.
- Abuchowski, A., van Es, T., Palczuk, N.C. & Davis, F.F. (1977b) Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J Biol Chem* 252, 3578-3581.
- Aghaabdollahian, S., Ahangari Cohan, R., Norouzian, D., Davami, F., Asadi Karam, M.R., Torkashvand, F., Vaseghi, G., Moazzami, R. & Latif Dizaji, S. (2019) Enhancing bioactivity, physicochemical, and pharmacokinetic properties of a nano-sized, anti-VEGFR2 Adnectin, through PASylation technology. *Sci Rep* 9, 2978.
- Al-Jobore, A. & Roufogalis, B.D. (1981) Influence of EGTA on the apparent Ca^{2+} affinity of Mg^{2+} -dependent, Ca^{2+} -stimulated ATPase in the human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 645, 1-9.
- Alters, S.E., McLaughlin, B., Spink, B., Lachinyan, T., Wang, C.W., Podust, V., Schellenberger, V. & Stemmer, W.P. (2012) GLP2-2G-XTEN: a pharmaceutical protein with improved serum half-life and efficacy in a rat Crohn's disease model. *PloS one* 7, e50630.
- Amara, U., Flierl, M.A., Rittirsch, D., Klos, A., Chen, H., Acker, B., Bruckner, U.B., Nilsson, B., Gebhard, F., Lambris, J.D. & Huber-Lang, M. (2010) Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J Immunol* 185, 5628-5636.
- 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.
- Auld, D.S. (1995) Removal and replacement of metal ions in metallopeptidases. *Methods Enzymol* 248, 228-242.
- 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.
- Bailon, P., Palleroni, A., Schaffer, C.A., Spence, C.L., Fung, W.J., Porter, J.E., Ehrlich, G.K., Pan, W., Xu, Z.X., Modi, M.W., Farid, A., Berthold, W. & Graves, M. (2001) Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjug Chem* 12, 195-202.

- Baker, D.P., Lin, E.Y., Lin, K., Pellegrini, M., Petter, R.C., Chen, L.L., Arduini, R.M., Brickelmaier, M., Wen, D., Hess, D.M., Chen, L., Grant, D., Whitty, A., Gill, A., Lindner, D.J. & Pepinsky, R.B. (2006) N-terminally PEGylated human interferon- β 1a with improved pharmacokinetic properties and in vivo efficacy in a melanoma angiogenesis model. *Bioconjug Chem* 17, 179-188.
- Bamford, C.H., Elliott, A. & Hanby, W.E. (1956) *Synthetic polypeptides: preparation, structure, and properties*, New York, Academic Press.
- Baud, M. (1993) Data analysis, mathematical modeling. *Methods of Immunological Analysis Volume 1: Fundamentals (Masseyeff RF et al., eds)*. New York, VCH.
- Bauer, C.A. & Pettersson, G. (1974) Effect of boric acid on the catalytic activity of *Streptomyces griseus* protease 3. *Eur J Biochem* 45, 473-477.
- 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.
- Berkmen, M. (2012) Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 82, 240-251.
- Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62, 293-300.
- 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.
- Bessette, P.H., Qiu, J., Bardwell, J.C., Swartz, J.R. & Georgiou, G. (2001) Effect of sequences of the active-site dipeptides of DsbA and DsbC on in vivo folding of multidisulfide proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 980-988.
- Binder, U. & Skerra, A. (2012) Half-life extension of therapeutic proteins via genetic fusion to recombinant PEG mimetics. *Therapeutic Proteins: Strategies to Modulate Their Plasma Half-Lives*. Kontermann, R. ed., Wiley-VCH, Weinheim, pp. 63-80.
- Binder, U. & Skerra, A. (2015) Current Strategies for Pharmacokinetic Optimization. *Biobetters - Protein Engineering to Approach the Curative*. Rosenberg, A. & Demeule, B. ed., AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series, Vol. 19, Springer, New York, pp. 269-311.
- Binder, U. & Skerra, A. (2017) PASylation[®]: A versatile technology to extend drug delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 31, 10-17.
- Binder, U. & Skerra, A. (2020) PASylated Thymosin α 1: A Long-Acting Immunostimulatory Peptide for Applications in Oncology and Virology. *Int J Mol Sci* 22, 1-17.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Blick, S.K. & Curran, M.P. (2007) Certolizumab pegol: in Crohn's disease. *BioDrugs* 21, 195-201; discussion 202-193.

- Blom, A.M., Volokhina, E.B., Fransson, V., Strömberg, P., Berghard, L., Viktorelius, M., Mollnes, T.E., López-Trascasa, M., van den Heuvel, L.P., Goodship, T.H., Marchbank, K.J. & Okroj, M. (2014) A novel method for direct measurement of complement convertases activity in human serum. *Clin Exp Immunol* 178, 142-153.
- Bolze, F., Morath, V., Bast, A., Rink, N., Schlapschy, M., Mocek, S., Skerra, A. & Klingenspor, M. (2016) Long-Acting PASylated Leptin Ameliorates Obesity by Promoting Satiety and Preventing Hypometabolism in Leptin-Deficient *Lep^(ob/ob)* Mice. *Endocrinology* 157, 233-244.
- Braman, J., Papworth, C. & Greener, A. (1996) Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods Mol Biol* 57, 31-44.
- Brandl, F., Merten, H., Zimmermann, M., Behe, M., Zangemeister-Wittke, U. & Plückthun, A. (2019) Influence of size and charge of unstructured polypeptides on pharmacokinetics and biodistribution of targeted fusion proteins. *J Control Release* 307, 379-392.
- Breibeck, J. (2016) Studien zum biophysikalischen Verhalten von rekombinanten Aminosäurepolymeren definierter Zusammensetzung. Dissertation. *Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan*. Technische Universität München.
- Breibeck, J. & Skerra, A. (2017) The polypeptide biophysics of proline/alanine-rich sequences (PAS): Recombinant biopolymers with PEG-like properties. *Biopolymers*, e23069.
- Bretthauer, R.K. & Castellino, F.J. (1999) Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol Appl Biochem* 30, 193-200.
- Breustedt, D.A., Schönfeld, D.L. & Skerra, A. (2006) Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochim Biophys Acta* 1764, 161-173.
- 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.
- Caliceti, P. & Veronese, F.M. (2003) Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1261-1277.
- Callec, G., Anderson, A.W., Tsao, G.T. & Rollings, J.E. (1984) System-Development for Aqueous Gel-Permeation Chromatography. *J Polym Sci Pol Chem* 22, 287-293.
- Chatelain, P., Malievskiy, O., Radziuk, K., Senatorova, G., Abdou, M.O., Vlachopapadopoulou, E., Skorodok, Y., Peterkova, V., Leff, J.A. & Beckert, M. (2017) A Randomized Phase 2 Study of Long-Acting TransCon GH vs Daily GH in Childhood GH Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 102, 1673-1682.
- Chen, D.Q. & Texada, D.E. (2006) Low-usage codons and rare codons of *Escherichia coli*. *Gene Ther Mol Biol* 10A, 1-12.
- Cho, H., Daniel, T., Buechler, Y.J., Litzinger, D.C., Maio, Z., Putnam, A.M., Kraynov, V.S., Sim, B.C., Bussell, S., Javahishvili, T., Kaphle, S., Viramontes, G., Ong, M., Chu, S., Becky, G.C., Lieu, R., Knudsen, N., Castiglioni, P., Norman, T.C., Axelrod, D.W., Hoffman, A.R., Schultz, P.G., DiMarchi, R.D. & Kimmel, B.E. (2011) Optimized

- clinical performance of growth hormone with an expanded genetic code. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 9060-9065.
- Chow, S.C. (2014) Bioavailability and Bioequivalence in Drug Development. *Wiley Interdiscip Rev Comput Stat* 6, 304-312.
- Cleland, J.L., Geething, N.C., Moore, J.A., Rogers, B.C., Spink, B.J., Wang, C.W., Alters, S.E., Stemmer, W.P. & Schellenberger, V. (2012) A novel long-acting human growth hormone fusion protein (VRS-317): enhanced in vivo potency and half-life. *J Pharm Sci* 101, 2744-2754.
- Cohen, B., Novick, D., Barak, S. & Rubinstein, M. (1995) Ligand-induced association of the type I interferon receptor components. *Mol Cell Biol* 15, 4208-4214.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. & 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.
- Creighton, T.E. (1992) *Proteins: Structures and Molecular Properties*, New York, W.H. Freeman and Company.
- Creighton, T.E. (1997) *Protein Structure: A Practical Approach*, Oxford, University Press.
- Danielsson, A., Ljunglof, A. & Lindblom, H. (1988) One-step purification of monoclonal IgG antibodies from mouse ascites. An evaluation of different adsorption techniques using high performance liquid chromatography. *J Immunol Methods* 115, 79-88.
- DeFrees, S., Wang, Z.G., Xing, R., Scott, A.E., Wang, J., Zopf, D., Gouty, D.L., Sjoberg, 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.
- Devereux, J., Haeberli, P. & Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* 12, 387-395.
- Dhalluin, C., Ross, A., Huber, W., Gerber, P., Brugger, D., Gsell, B. & Senn, H. (2005) Structural, kinetic, and thermodynamic analysis of the binding of the 40 kDa PEG-interferon-alpha2a and its individual positional isomers to the extracellular domain of the receptor IFNAR2. *Bioconjug Chem* 16, 518-527.
- 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.
- Ding, S., Song, M., Sim, B.C., Gu, C., Podust, V.N., Wang, C.W., McLaughlin, B., Shah, T.P., Lax, R., Gast, R., Sharan, R., Vasek, A., Hartman, M.A., Deniston, C., Srinivas, P. & Schellenberger, V. (2014) Multivalent antiviral XTEN-peptide conjugates with long in vivo half-life and enhanced solubility. *Bioconjug Chem* 25, 1351-1359.
- Dozier, J.K. & Distefano, M.D. (2015) Site-Specific PEGylation of Therapeutic Proteins. *Int J Mol Sci* 16, 25831-25864.

- Eggenstein, E. (2017) Konstruktion von bifunktionellen Anticalin-Fusionsproteinen für die gerichtete Diagnostik/Therapie. Dissertation. *Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan Technische Universität München*.
- Egrie, J.C. & Browne, J.K. (2002) Development and characterization of darbepoetin alfa. *Oncology* 16, 13-22.
- Ehrnthaller, C., Ignatius, A., Gebhard, F. & Huber-Lang, M. (2011) New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med* 17, 317-329.
- 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.
- Elinav, E., Niv-Spector, L., Katz, M., Price, T.O., Ali, M., Yacobovitz, M., Solomon, G., Reicher, S., Lynch, J.L., Halpern, Z., Banks, W.A. & Gertler, A. (2009) Pegylated leptin antagonist is a potent orexigenic agent: preparation and mechanism of activity. *Endocrinology* 150, 3083-3091.
- EMA (2010) European Public Assessment Report (EPAR) Cimzia®. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001037/WC500069763.pdf.
- EMA (2012) CHMP safety working party's response to the PDCO regarding the use of PEGylated drug products in the paediatric population. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/11/WC500135123.pdf.
- EMA (2013) Krystexxa: summary of product characteristics. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/krystexxa-epar-product-information_en.pdf.
- Ezzell, J.L., Wilcox, L.A., Bernshaw, N.J. & Parker, C.J. (1991) Induction of the paroxysmal nocturnal hemoglobinuria phenotype in normal human erythrocytes: effects of 2-aminoethylisothiuronium bromide on membrane proteins that regulate complement. *Blood* 77, 2764-2773.
- Falvo, E., Tremante, E., Arcovito, A., Papi, M., Elad, N., Boffi, A., Morea, V., Conti, G., Toffoli, G., Fracasso, G., Giacomini, P. & Ceci, P. (2016) Improved Doxorubicin Encapsulation and Pharmacokinetics of Ferritin-Fusion Protein Nanocarriers Bearing Proline, Serine, and Alanine Elements. *Biomacromolecules* 17, 514-522.
- Fändrich, M. & Dobson, C.M. (2002) The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *Embo J* 21, 5682-5690.
- Fath, S., Bauer, A.P., Liss, M., Priestersbach, A., Maertens, B., Hahn, P., Ludwig, C., Schäfer, F., Graf, M. & Wagner, R. (2011) Multiparameter RNA and codon optimization: a standardized tool to assess and enhance autologous mammalian gene expression. *PloS one* 6, e17596.
- Filpula, D. & Zhao, H. (2008) Releasable PEGylation of proteins with customized linkers. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 29-49.

- Fishburn, C.S. (2008) The pharmacology of PEGylation: balancing PD with PK to generate novel therapeutics. *J Pharm Sci* 97, 4167-4183.
- 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.
- 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.
- Garcia, C.C., Weston-Davies, W., Russo, R.C., Tavares, L.P., Rachid, M.A., Alves-Filho, J.C., Machado, A.V., Ryffel, B., Nunn, M.A. & Teixeira, M.M. (2013) Complement C5 activation during influenza A infection in mice contributes to neutrophil recruitment and lung injury. *PloS one* 8, e64443.
- Gebauer, M. & Skerra, A. (2009) Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 13, 245-255.
- Gebauer, M. & Skerra, A. (2018) Prospects of PASylation[®] for the design of protein and peptide therapeutics with extended half-life and enhanced action. *Bioorg Med Chem* 26, 2882-2887.
- Geething, N.C., To, W., Spink, B.J., Scholle, M.D., Wang, C.W., Yin, Y., Yao, Y., Schellenberger, V., Cleland, J.L., Stemmer, W.P. & Silverman, J. (2010) Gcg-XTEN: an improved glucagon capable of preventing hypoglycemia without increasing baseline blood glucose. *PloS one* 5, e10175.
- Gilbert, H.F. (1998) Protein disulfide isomerase. *Methods Enzymol* 290, 26-50.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-326.
- Gokarn, Y.R., McLean, M. & Laue, T.M. (2012) Effect of PEGylation on protein hydrodynamics. *Mol Pharm* 9, 762-773.
- Grace, M., Youngster, S., Gitlin, G., Sydor, W., Xie, L., Westreich, L., Jacobs, S., Brassard, D., Bausch, J. & Bordens, R. (2001) Structural and biologic characterization of pegylated recombinant IFN- α 2b. *J Interferon Cytokine Res* 21, 1103-1115.
- Graham, M.L. (2003) Pegaspargase: a review of clinical studies. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1293-1302.
- Griffiths, K., Binder, U., McDowell, W., Tommasi, R., Frigerio, M., Darby, W.G., Hosking, C.G., Renaud, L., Machacek, M., Lloyd, P., Skerra, A. & Foley, M. (2019) Half-life extension and non-human primate pharmacokinetic safety studies of i-body AD-114 targeting human CXCR4. *MAbs* 11, 1331-1340.
- Haeckel, A., Appler, F., Figge, L., Kratz, H., Lukas, M., Michel, R., Schnorr, J., Zille, M., Hamm, B. & Schellenberger, E. (2014) XTEN-annexin A5: XTEN allows complete expression of long-circulating protein-based imaging probes as recombinant alternative to PEGylation. *J Nucl Med* 55, 508-514.

- Haraldsson, B., Nyström, J. & Deen, W.M. (2008) Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 88, 451-487.
- Harari, D., Abramovich, R., Zozulya, A., Smith, P., Pouly, S., Köster, M., Hauser, H. & Schreiber, G. (2014a) Bridging the species divide: transgenic mice humanized for type-I interferon response. *PloS one* 9, e84259.
- Harari, D., Kuhn, N., Abramovich, R., Sasson, K., Zozulya, A.L., Smith, P., Schlapschy, M., Aharoni, R., Köster, M., Eilam, R., Skerra, A. & Schreiber, G. (2014b) Enhanced *in vivo* efficacy of a type I interferon superagonist with extended plasma half-life in a mouse model of multiple sclerosis. *J Biol Chem* 289, 29014-29029.
- Harder, M.J., Kuhn, N., Schrezenmeier, H., Höchsmann, B., von Zabern, I., Weinstock, C., Simmet, T., Ricklin, D., Lambris, J.D., Skerra, A., Anliker, M. & Schmidt, C.Q. (2017) Incomplete inhibition by eculizumab: mechanistic evidence for residual C5 activity during strong complement activation. *Blood* 129, 970-980.
- Harris, D.E., Cairns, L., Rosen, F.S. & Borel, Y. (1982) A natural model of immunologic tolerance. Tolerance to murine C5 is mediated by T cells, and antigen is required to maintain unresponsiveness. *J Exp Med* 156, 567-584.
- Heathcote, E.J., Shiffman, M.L., Cooksley, W.G., Dusheiko, G.M., Lee, S.S., Balart, L., Reindollar, R., Reddy, R.K., Wright, T.L., Lin, A., Hoffman, J. & De Pamphilis, J. (2000) Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N Engl J Med* 343, 1673-1680.
- Hedayati, M.H., Norouzian, D., Aminian, M., Teimourian, S., Ahangari Cohan, R., Sardari, S. & Khorramizadeh, M.R. (2017) Molecular Design, Expression and Evaluation of PASylated Human Recombinant Erythropoietin with Enhanced Functional Properties. *Protein J* 36, 36-48.
- Heitlinger, E. (2013) Learnings from over 25 years of PNH experience: the era of targeted complement inhibition. *Blood Rev* 27 Suppl 1, S1-6.
- Hepburn, N.J., Williams, A.S., Nunn, M.A., Chamberlain-Banoub, J.C., Hamer, J., Morgan, B.P. & Harris, C.L. (2007) *In vivo* characterization and therapeutic efficacy of a C5-specific inhibitor from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J Biol Chem* 282, 8292-8299.
- Hill, A., Kelly, R.J. & Hillmen, P. (2013) Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 121, 4985-4996; quiz 5105.
- Hillmen, P., Muus, P., Roth, A., Elebute, M.O., Risitano, A.M., Schrezenmeier, H., Szer, J., Browne, P., Maciejewski, J.P., Schubert, J., Urbano-Ispizua, A., de Castro, C., Socié, G. & Brodsky, R.A. (2013) Long-term safety and efficacy of sustained eculizumab treatment in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 162, 62-73.
- Hillmen, P., Young, N.S., Schubert, J., Brodsky, R.A., Socié, G., Muus, P., Roth, A., Szer, J., Elebute, M.O., Nakamura, R., Browne, P., Risitano, A.M., Hill, A., Schrezenmeier, H., Fu, C.L., Maciejewski, J., Rollins, S.A., Mojcik, C.F., Rother, R.P. & Luzzatto, L. (2006) The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 355, 1233-1243.

- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R. & Stüber, D. (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio/Technology* 6, 1321-1325.
- Holliger, P. & Hudson, P.J. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23, 1126-1136.
- 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, X., Miller, L., Richman, S., Hitchman, S., Glick, G., Liu, S., Zhu, Y., Crossman, M., Nestorov, I., Gronke, R.S., Baker, D.P., Rogge, M., Subramanyam, M. & Davar, G. (2012) A novel PEGylated interferon beta-1a for multiple sclerosis: safety, pharmacology, and biology. *J Clin Pharmacol* 52, 798-808.
- Huber-Lang, M., Barratt-Due, A., Pischke, S.E., Sandanger, O., Nilsson, P.H., Nunn, M.A., Denk, S., Gaus, W., Espevik, T. & Mollnes, T.E. (2014) Double blockade of CD14 and complement C5 abolishes the cytokine storm and improves morbidity and survival in polymicrobial sepsis in mice. *Journal of immunology* 192, 5324-5331.
- Hukshorn, C.J., Westerterp-Plantenga, M.S. & Saris, W.H. (2003) Pegylated human recombinant leptin (PEG-OB) causes additional weight loss in severely energy-restricted, overweight men. *Am J Clin Nutr* 77, 771-776.
- Humphreys, D.P., Weir, N., Lawson, A., Mountain, A. & Lund, P.A. (1996) Co-expression of human protein disulphide isomerase (PDI) can increase the yield of an antibody Fab' fragment expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 380, 194-197.
- Hustoft, H.K., Malerod, H., Wilson, S.R., Reubsaet, L., Lundanes, E. & Greibrokk, T. (2012) A Critical Review of Trypsin Digestion for LC-MS Based Proteomics, Integrative Proteomics, Hon-Chiu Eastwood Leung, Tsz-Kwong Man and Ricardo J. Flores. <https://www.intechopen.com/books/integrative-proteomics/a-critical-review-of-trypsin-digestion-for-lc-ms-based-proteomics>.
- Infante, J.R., Korn, R.L., Rosen, L.S., LoRusso, P., Dychter, S.S., Zhu, J., Maneval, D.C., Jiang, P., Shepard, H.M., Frost, G., Von Hoff, D.D., Borad, M.J. & Ramanathan, R.K. (2018) Phase 1 trials of PEGylated recombinant human hyaluronidase PH20 in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* 118, e3.
- Ishii, H., Shirai, T., Makino, C. & Nishikata, T. (2014) Mitochondrial inhibitor sodium azide inhibits the reorganization of mitochondria-rich cytoplasm and the establishment of the anteroposterior axis in ascidian embryo. *Dev Growth Differ* 56, 175-188.
- Jarasch, A., Kopp, M., Eggenstein, E., Richter, A., Gebauer, M. & Skerra, A. (2016) ANTICALiGN: visualizing, editing and analyzing combined nucleotide and amino acid sequence alignments for combinatorial protein engineering. *Protein Eng Des Sel* 29, 263-270.
- Jin, J.F., Zhu, L.L., Chen, M., Xu, H.M., Wang, H.F., Feng, X.Q., Zhu, X.P. & Zhou, Q. (2015) The optimal choice of medication administration route regarding intravenous, intramuscular, and subcutaneous injection. *Patient Prefer Adherence* 9, 923-942.

- Jore, M.M., Johnson, S., Sheppard, D., Barber, N.M., Li, Y.I., Nunn, M.A., Elmlund, H. & Lea, S.M. (2016) Structural basis for therapeutic inhibition of complement C5. *Nat Struct Mol Biol* 23, 378-386.
- Kadokura, H., Tian, H., Zander, T., Bardwell, J.C. & Beckwith, J. (2004) Snapshots of DsbA in action: detection of proteins in the process of oxidative folding. *Science* 303, 534-537.
- Kakinoki, S., Hirano, Y. & Oka, M. (2005) On the stability of polyproline-I and II structures of proline oligopeptides. *Polym Bull* 53, 109-115.
- Kalie, E., Jaitin, D.A., Abramovich, R. & Schreiber, G. (2007) An interferon alpha2 mutant optimized by phage display for IFNAR1 binding confers specifically enhanced antitumor activities. *J Biol Chem* 282, 11602-11611.
- Kammerer, P. (2013) Optimierung von therapeutisch interessanten Proteinen hinsichtlich der Plasmahalbwertszeit unter Verwendung eines Zellkultur-Produktionssystems. Masterarbeit. *Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan*. Technische Universität München.
- Karlsson, R. & Falt, A. (1997) Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. *J Immunol Methods* 200, 121-133.
- Kelly, R.J., Hill, A., Arnold, L.M., Brooksbank, G.L., Richards, S.J., Cullen, M., Mitchell, L.D., Cohen, D.R., Gregory, W.M. & Hillmen, P. (2011) Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood* 117, 6786-6792.
- 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.
- Khameneh, B., Saberi, M.R., Hassanzadeh-Khayyat, M., Mohammadpanah, H., Ghandadi, M., Iranshahi, M., Baratian, A. & Jaafari, M.R. (2016) Evaluation of physicochemical and stability properties of human growth hormone upon enzymatic PEGylation. *J Appl Biomed* 14, 257-264.
- Khodabakhsh, F., Norouziyan, D., Vaziri, B., Ahangari Cohan, R., Sardari, S., Mahboudi, F., Behdani, M., Mansouri, K. & Mehdizadeh, A. (2018) Development of a novel nano-sized anti-VEGFA nanobody with enhanced physicochemical and pharmacokinetic properties. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 46, 1402-1414.
- Kieseier, B.C. (2011) The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis. *CNS drugs* 25, 491-502.
- Kim, S.J., Kwak, H.H., Cho, S.Y., Sohn, Y.B., Park, S.W., Huh, R., Kim, J., Ko, A.R. & Jin, D.K. (2015) Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Efficacy of a Novel Long-Acting Human Growth Hormone: Fc Fusion Protein. *Mol Pharm* 12, 3759-3765.
- Kling, J. (2013) PEGylation of Biologics. *BioProcess Int.* 11, 34-43.
- Kolate, A., Baradia, D., Patil, S., Vhora, I., Kore, G. & Misra, A. (2014) PEG - a versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems. *J Control Release* 192, 67-81.

- 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.
- Krainer, F.W., Dietzsch, C., Hajek, T., Herwig, C., Spadiut, O. & Glieder, A. (2012) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microb Cell Fact* 11, 22.
- Krishnamurthy, S., Muthukumaran, P., Jayakumar, M.K.G., Lisse, D., Masurkar, N.D., Xu, C., Chan, J.M. & Drum, C.L. (2019) Surface protein engineering increases the circulation time of a cell membrane-based nanotherapeutic. *Nanomedicine* 18, 169-178.
- Kubetzko, S., Sarkar, C.A. & Plückthun, A. (2005) Protein PEGylation decreases observed target association rates via a dual blocking mechanism. *Mol Pharmacol* 68, 1439-1454.
- Kuhn, N., Schmidt, C.Q., Schlapschy, M. & Skerra, A. (2016) PASylated Coversin, a C5-Specific Complement Inhibitor with Extended Pharmacokinetics, Shows Enhanced Anti-Hemolytic Activity in Vitro. *Bioconjug Chem* 27, 2359-2371.
- Kuo, T.T. & Aveson, V.G. (2011) Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics. *mAbs* 3, 422-430.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lakub, J.C., Shipman, J.T. & Desaire, H. (2018) Recent mass spectrometry-based techniques and considerations for disulfide bond characterization in proteins. *Anal Bioanal Chem* 410, 2467-2484.
- Lamken, P., Lata, S., Gavutis, M. & Piehler, J. (2004) Ligand-induced assembling of the type I interferon receptor on supported lipid bilayers. *J Mol Biol* 341, 303-318.
- Lavoie, T.B., Kalie, E., Crisafulli-Cabatu, S., Abramovich, R., DiGioia, G., Moolchan, K., Pestka, S. & Schreiber, G. (2011) Binding and activity of all human alpha interferon subtypes. *Cytokine* 56, 282-289.
- Lee, A.J. & Ashkar, A.A. (2018) The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front Immunol* 9, 2061.
- Legendre, C.M., Licht, C., Muus, P., Greenbaum, L.A., Babu, S., Bedrosian, C., Bingham, C., Cohen, D.J., Delmas, Y., Douglas, K., Eitner, F., Feldkamp, T., Fouque, D., Furman, R.R., Gaber, O., Herthelius, M., Hourmant, M., Karpman, D., Lebranchu, Y., Mariat, C., Menne, J., Moulin, B., Nürnberger, J., Ogawa, M., Remuzzi, G., Richard, T., Sberro-Soussan, R., Severino, B., Sheerin, N.S., Trivelli, A., Zimmerhackl, L.B., Goodship, T. & Loirat, C. (2013) Terminal complement inhibitor eculizumab in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 368, 2169-2181.
- Lengyel, P. (1982) Biochemistry of interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 51, 251-282.
- Levin, D., Harari, D. & Schreiber, G. (2011) Stochastic receptor expression determines cell fate upon interferon treatment. *Mol Cell Biol* 31, 3252-3266.

- Levin, D., Schneider, W.M., Hoffmann, H.H., Yarden, G., Busetto, A.G., Manor, O., Sharma, N., Rice, C.M. & Schreiber, G. (2014) Multifaceted activities of type I interferon are revealed by a receptor antagonist. *Sci Signal* 7, ra50.
- Levy, Y., Hershfield, M.S., Fernandez-Mejia, C., Polmar, S.H., Scudiery, D., Berger, M. & Sorensen, R.U. (1988) Adenosine deaminase deficiency with late onset of recurrent infections: response to treatment with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase. *J Pediatr* 113, 312-317.
- Lichstein, H.C. & Soule, M.H. (1944) Studies of the Effect of Sodium Azide on Microbic Growth and Respiration: I. The Action of Sodium Azide on Microbic Growth. *J Bacteriol* 47, 221-230.
- Liedberg, B., Nylander, C. & Lundstrom, I. (1995) Biosensing with surface plasmon resonance-how it all started. *Biosens Bioelectron* 10, i-ix.
- Lin-Cereghino, G.P., Stark, C.M., Kim, D., Chang, J., Shaheen, N., Poerwanto, H., Agari, K., Moua, P., Low, L.K., Tran, N., Huang, A.D., Nattestad, M., Oshiro, K.T., Chang, J.W., Chavan, A., Tsai, J.W. & Lin-Cereghino, J. (2013) The effect of alpha-mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene* 519, 311-317.
- Lin, Z., Schmidt, C.Q., Koutsogiannaki, S., Ricci, P., Risitano, A.M., Lambris, J.D. & Ricklin, D. (2015) Complement C3dg-mediated erythrophagocytosis: implications for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 126, 891-894.
- Maccougall, I.C., Robson, R., Opatrna, S., Liogier, X., Pannier, A., Jordan, P., Dougherty, F.C. & Reigner, B. (2006) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and subcutaneous continuous erythropoietin receptor activator (C.E.R.A.) in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 1, 1211-1215.
- Mahmood, I. (2007) Application of allometric principles for the prediction of pharmacokinetics in human and veterinary drug development. *Adv Drug Deliv Rev* 59, 1177-1192.
- Malyala, P. & Singh, M. (2008) Endotoxin limits in formulations for preclinical research. *J Pharm Sci* 97, 2041-2044.
- 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.
- Maruyama, K., Nagasawa, H. & Suzuki, A. (1999) 2,2'-Bispyridyl disulfide rapidly induces intramolecular disulfide bonds in peptides. *Peptides* 20, 881-884.
- Meager, A. (2002) Biological assays for interferons. *J Immunol Methods* 261, 21-36.
- 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. *Nat. Biotechnol.* 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.
- 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, Science+Business Media.
- Morton, T.A. & Myszka, D.G. (1998) Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Methods Enzymol* 295, 268-294.
- Movva, N.R., Nakamura, K. & Inouye, M. (1980) Amino acid sequence of the signal peptide of ompA protein, a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 255, 27-29.
- Myszka, D.G. (1999) Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit* 12, 279-284.
- Nagorsen, D., Bargou, R., Ruttinger, D., Kufer, P., Baeuerle, P.A. & Zugmaier, G. (2009) Immunotherapy of lymphoma and leukemia with T-cell engaging BiTE antibody blinatumomab. *Leuk Lymphoma* 50, 886-891.
- NEB (Version 8.0 - 9/15) PCR Reagents Polymerases, Nucleotides, & DNA Ladders.
- Newsome, S.D., Kieseier, B.C., Liu, S., You, X., Kinter, E., Hung, S. & Sperling, B. (2017) Peginterferon beta-1a reduces disability worsening in relapsing-remitting multiple sclerosis: 2-year results from ADVANCE. *Ther Adv Neurol Disord* 10, 41-50.
- Nganou-Makamdop, K., Billingsley, J.M., Yaffe, Z., O'Connor, G., Tharp, G.K., Ransier, A., Laboune, F., Matus-Nicodemos, R., Lerner, A., Gharu, L., Robertson, J.M., Ford, M.L., Schlapschy, M., Kuhn, N., Lensch, A., Lifson, J., Nason, M., Skerra, A., Schreiber, G., Bosinger, S.E. & Douek, D.C. (2018) Type I IFN signaling blockade by a PASylated antagonist during chronic SIV infection suppresses specific inflammatory pathways but does not alter T cell activation or virus replication. *PLoS pathogens* 14, e1007246.
- Nishimura, J., Yamamoto, M., Hayashi, S., Ohyashiki, K., Ando, K., Brodsky, A.L., Noji, H., Kitamura, K., Eto, T., Takahashi, T., Masuko, M., Matsumoto, T., Wano, Y., Shichishima, T., Shibayama, H., Hase, M., Li, L., Johnson, K., Lazarowski, A., Tamburini, P., Inazawa, J., Kinoshita, T. & Kanakura, Y. (2014) Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. *N Engl J Med* 370, 632-639.
- Noris, M. & Remuzzi, G. (2013) Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol* 33, 479-492.
- Nunn, M.A., Sharma, A., Paesen, G.C., Adamson, S., Lissina, O., Willis, A.C. & Nuttall, P.A. (2005) Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J Immunol* 174, 2084-2091.
- Ober, R.J., Martinez, C., Vaccaro, C., Zhou, J. & Ward, E.S. (2004) Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I-related receptor, FcRn. *J Immunol* 172, 2021-2029.

- 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.
- 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.
- Pan, M., Kalie, E., Scaglione, B.J., Raveche, E.S., Schreiber, G. & Langer, J.A. (2008) Mutation of the IFNAR-1 receptor binding site of human IFN-alpha2 generates type I IFN competitive antagonists. *Biochemistry* 47, 12018-12027.
- Parker, C.J., Kar, S. & Kirkpatrick, P. (2007) Eculizumab. *Nat Rev Drug Discov* 6, 515-516.
- Piehler, J. & Schreiber, G. (1999) Mutational and structural analysis of the binding interface between type I interferons and their receptor Ifnar2. *J Mol Biol* 294, 223-237.
- Pihlajaniemi, T., Helaakoski, T., Tasanen, K., Myllyla, R., Huhtala, M.L., Koivu, J. & Kivirikko, K.I. (1987) Molecular cloning of the beta-subunit of human prolyl 4-hydroxylase. This subunit and protein disulphide isomerase are products of the same gene. *Embo J* 6, 643-649.
- Plescher, M.C. (2012) Gentechnische Herstellung und biophysikalische Charakterisierung PASylierter Varianten des Tumorsuppressors DCC-5Fbn und des Komplementinhibitors OmCI. Bachelorarbeit. *Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan Technische Universität München*.
- Plückthun, A. & Skerra, A. (1989) Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 178, 497-515.
- Podust, V.N., Balan, S., Sim, B.C., Coyle, M.P., Ernst, U., Peters, R.T. & Schellenberger, V. (2016) Extension of *in vivo* half-life of biologically active molecules by XTEN protein polymers. *J Control Release* 240, 52-66.
- 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.
- Powers, J.C., Asgian, J.L., Ekici, Ö.D. & James, K.E. (2002) Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev* 102, 4639-4750.
- Powers, N.E., Swartzwelter, B., Marchetti, C., de Graaf, D.M., Lerchner, A., Schlapschy, M., Datar, R., Binder, U., Edwards, C.K., 3rd, Skerra, A. & Dinarello, C.A. (2020) PASylation of IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) retains IL-1 blockade and extends its duration in mouse urate crystal-induced peritonitis. *J Biol Chem* 295, 868-882.
- Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A. & Beckwith, J. (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem* 272, 15661-15667.
- Quadrifoglio, F. & Urry, D.W. (1968) Ultraviolet rotatory properties of polypeptides in solution. II. Poly-L-serine. *J Am Chem Soc* 90, 2760-2765.

- Rabhi-Essafi, I., Sadok, A., Khalaf, N. & Fathallah, D.M. (2007) A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon alpha as a GST-fusion protein in *E. coli*. *Protein Eng Des Sel* 20, 201-209.
- Radwanski, E., Perentesis, G., Jacobs, S., Oden, E., Affrime, M., Symchowicz, S. & Zampaglione, N. (1987) Pharmacokinetics of interferon alpha-2b in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 27, 432-435.
- Ramos-de-la-Peña, A.M. & Aguilar, O. (2019) Progress and Challenges in PEGylated Proteins Downstream Processing: A Review of the Last 8 Years. *Int J Pept Res Ther*, <https://doi.org/10.1007/s10989-10019-09840-10984>.
- Rath, T., Baker, K., Dumont, J.A., Peters, R.T., Jiang, H., Qiao, S.W., Lencer, W.I., Pierce, G.F. & Blumberg, R.S. (2015) Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics. *Crit Rev Biotechnol* 35, 235-254.
- Ribeiro, J.M.C. (1995) How Ticks Make a Living. *Parasitology Today* 11, 91-93.
- Richter, A., Eggenstein, E. & Skerra, A. (2014) Anticalins: exploiting a non-Ig scaffold with hypervariable loops for the engineering of binding proteins. *FEBS Lett* 588, 213-218.
- Richter, A., Knorr, K., Schlapschy, M., Robu, S., Morath, V., Mandler, C., Yen, H.Y., Steiger, K., Kiechle, M., Weber, W., Skerra, A. & Schwaiger, M. (2020) First In-Human Medical Imaging with a PASylated (89)Zr-Labeled Anti-HER2 Fab-Fragment in a Patient with Metastatic Breast Cancer. *Nucl Med Mol Imaging* 54, 114-119.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. & Lambris, J.D. (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11, 785-797.
- Ricklin, D. & Lambris, J.D. (2013) Complement in immune and inflammatory disorders: therapeutic interventions. *J Immunol* 190, 3839-3847.
- Risitano, A.M. (2015) Current and Future Pharmacologic Complement Inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am* 29, 561-582.
- 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.
- Romay-Penabad, Z., Carrera Marin, A.L., Willis, R., Weston-Davies, W., Machin, S., Cohen, H., Brasier, A. & Gonzalez, E.B. (2014) Complement C5-inhibitor rEV576 (coversin) ameliorates in-vivo effects of antiphospholipid antibodies. *Lupus* 23, 1324-1326.
- Roopenian, D.C. & Akilesh, S. (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7, 715-725.
- Rosenblum, B.B., Lee, L.G., Spurgeon, S.L., Khan, S.H., Menchen, S.M., Heiner, C.R. & Chen, S.M. (1997) New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res* 25, 4500-4504.
- Roversi, P., Lissina, O., Johnson, S., Ahmat, N., Paesen, G.C., Ploss, K., Boland, W., Nunn, M.A. & Lea, S.M. (2007) The structure of OMCI, a novel lipocalin inhibitor of the complement system. *J Mol Biol* 369, 784-793.

- Roversi, P., Ryffel, B., Togbe, D., Maillet, I., Teixeira, M., Ahmat, N., Paesen, G.C., Lissina, O., Boland, W., Ploss, K., Caesar, J.J., Leonhartsberger, S., Lea, S.M. & Nunn, M.A. (2013) Bifunctional lipocalin ameliorates murine immune complex-induced acute lung injury. *J Biol Chem* 288, 18789-18802.
- Ruseva, M.M. (2010) Membrane attack and therapy in autoimmune disease: modulating pathology whilst retaining physiology. Dissertation. *Department of Infection, Immunity and Biochemistry, School of Medicine*. Cardiff University.
- Saifer, M.G., Williams, L.D., Sobczyk, M.A., Michaels, S.J. & Sherman, M.R. (2014) Selectivity of binding of PEGs and PEG-like oligomers to anti-PEG antibodies induced by methoxyPEG-proteins. *Mol Immunol* 57, 236-246.
- 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (2001) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandler, N.G., Bosinger, S.E., Estes, J.D., Zhu, R.T., Tharp, G.K., Boritz, E., Levin, D., Wijeyesinghe, S., Makamdop, K.N., del Prete, G.Q., Hill, B.J., Timmer, J.K., Reiss, E., Yarden, G., Darko, S., Contijoch, E., Todd, J.P., Silvestri, G., Nason, M., Norgren, R.B., Jr., Keele, B.F., Rao, S., Langer, J.A., Lifson, J.D., Schreiber, G. & Douek, D.C. (2014) Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature* 511, 601-605.
- Santos, J.H.P.M., Torres-Obreque, K.M., Meneguetti, G.P., Amaro, B.P. & Rangel-Yagui, C.O. (2018) Protein PEGylation for the design of biobetters: from reaction to purification processes. *Braz J Pharm Sci* 54, e01009.
- Sato, H. (2002) Enzymatic procedure for site-specific pegylation of proteins. *Adv Drug Deliv 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.
- Schiefner, A. & Skerra, A. (2015) The menagerie of human lipocalins: a natural protein scaffold for molecular recognition of physiological compounds. *Acc Chem Res* 48, 976-985.
- 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., Binder, U., Börger, 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., Grimm, S. & Skerra, A. (2006) A system for concomitant overexpression of four periplasmic folding catalysts to improve secretory protein production in *Escherichia coli*. *Protein Eng Des Sel* 19, 385-390.

- 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, A.M., Bloß, I. & Skerra, A. (1998) Improved folding of apo-retinol-binding protein in the periplasm of *Escherichia coli*: positive influences of dsbC coexpression and of an amino acid exchange in the vitamin A binding site. *Protein Eng* 11, 601-607.
- Schmidt, T.G. & Skerra, A. (2007) The *Strep*-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* 2, 1528-1535.
- Schreiber, G. (2017) The molecular basis for differential type I interferon signaling. *J Biol Chem* 292, 7285-7294.
- Schreiber, G. & Piehler, J. (2015) The molecular basis for functional plasticity in type I interferon signaling. *Trends Immunol* 36, 139-149.
- Schrezenmeier, H. & Höchsmann, B. (2012) Drugs that inhibit complement. *Transfus Apher Sci* 46, 87-92.
- Schulz, G.E. & Schirmer, R.H. (1979) *Principles of Protein Structure*, New York, Springer.
- Seelen, M.A., Roos, A., Wieslander, J., Mollnes, T.E., Sjöholm, A.G., Wurzner, R., Loos, M., Tedesco, F., Sim, R.B., Garred, P., Alexopoulos, E., Turner, M.W. & Daha, M.R. (2005) Functional analysis of the classical, alternative, and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J Immunol Methods* 296, 187-198.
- Sezin, T., Murthy, S., Attah, C., Seutter, M., Holtsche, M.M., Hammers, C.M., Schmidt, E., Meshrkey, F., Mousavi, S., Zillikens, D., Nunn, M.A. & Sadik, C.D. (2019) Dual inhibition of complement factor 5 and leukotriene B₄ synergistically suppresses murine pemphigoid disease. *JCI Insight* 4, 1-13.
- 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.
- Simha, R. (1940) The Influence of Brownian Movement on the Viscosity of Solutions. *J. Phys. Chem* 44, 25-34.
- Sissons, J.G., Liebowitch, J., Amos, N. & Peters, D.K. (1977) Metabolism of the fifth component of complement, and its relation to metabolism of the third component, in patients with complement activation. *J Clin Invest* 59, 704-715.
- Skerra, A. (1989) Funktionelle Expression Antigen bindender Immunglobulinfragmente in *Escherichia coli*. Dissertation. *Fakultät für Chemie und Pharmazie*. 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., Pfitzinger, I. & Plückthun, A. (1991) The functional expression of antibody Fv fragments in *Escherichia coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. *Biotechnology* 9, 273-278.

- 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.
- Skerra, A., Theobald, I. & Schlapschy, M. (2008) Biological active proteins having increased *in vivo* and/or *in vitro* stability. WO/2008/155134.
- Slutzki, M., Jaitin, D.A., Yehezkel, T.B. & Schreiber, G. (2006) Variations in the unstructured C-terminal tail of interferons contribute to differential receptor binding and biological activity. *J Mol Biol* 360, 1019-1030.
- Soltys, J., Kusner, L.L., Young, A., Richmonds, C., Hatala, D., Gong, B., Shanmugavel, V. & Kaminski, H.J. (2009) Novel complement inhibitor limits severity of experimentally myasthenia gravis. *Ann Neurol* 65, 67-75.
- Stapley, B.J. & Creamer, T.P. (1999) A survey of left-handed polyproline II helices. *Protein Sci* 8, 587-595.
- Stetefeld, J., McKenna, S.A. & Patel, T.R. (2016) Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev* 8, 409-427.
- 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.
- Tabor, S. & Richardson, C.C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 4767-4771.
- Tabrizi, M.A., Tseng, C.M. & Roskos, L.K. (2006) Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Discov Today* 11, 81-88.
- Tang, L., Persky, A.M., Hochhaus, G. & Meibohm, B. (2004) Pharmacokinetic aspects of biotechnology products. *J Pharm Sci* 93, 2184-2204.
- Tanner, W. & Lehle, L. (1987) Protein glycosylation in yeast. *Biochim Biophys Acta* 906, 81-99.
- Telenti, A. (2014) HIV: The mixed blessing of interferon. *Nature* 511, 537-538.
- Thomas, C., Moraga, I., Levin, D., Krutzik, P.O., Podoplelova, Y., Trejo, A., Lee, C., Yarden, G., Vleck, S.E., Glenn, J.S., Nolan, G.P., Piehler, J., Schreiber, G. & Garcia, K.C. (2011) Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons. *Cell* 146, 621-632.
- Tiffany, M.L. & Krimm, S. (1968) Circular dichroism of poly-L-proline in an unordered conformation. *Biopolymers* 6, 1767-1770.
- Tiffany, M.L. & Krimm, S. (1969) Circular Dichroism of "Random" Polypeptide Chain. *Biopolymers* 8, 347-359.
- Toutain, P.L. & Bousquet-Mélou, A. (2004) Bioavailability and its assessment. *J Vet Pharmacol Ther* 27, 455-466.

- Tsuge, M., Uchida, T., Hiraga, N., Kan, H., Makokha, G.N., Abe-Chayama, H., Miki, D., Imamura, M., Ochi, H., Hayes, C.N., Shimoazono, R., Iwamura, T., Narumi, H., Suzuki, T., Kainoh, M., Taniguchi, T. & Chayama, K. (2017) Development of a Novel Site-Specific Pegylated Interferon Beta for Antiviral Therapy of Chronic Hepatitis B Virus. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
- Turner, M.D., Nedjai, B., Hurst, T. & Pennington, D.J. (2014) Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 1843, 2563-2582.
- Urin, V., Levin, D., Sharma, N., Harari, D. & Schreiber, G. (2015) Fine Tuning of a Type 1 Interferon Antagonist. *PloS one* 10, e0130797.
- Utay, N.S. & Douek, D.C. (2016) Interferons and HIV Infection: The Good, the Bad, and the Ugly. *Pathog Immun* 1, 107-116.
- Verhoef, J.J., Carpenter, J.F., Anchordoquy, T.J. & Schellekens, H. (2014) Potential induction of anti-PEG antibodies and complement activation toward PEGylated therapeutics. *Drug Discov Today* 19, 1945-1952.
- Veronese, F.M. & Pasut, G. (2005) PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today* 10, 1451-1458.
- Vieira, P. & Rajewsky, K. (1988) The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur J Immunol* 18, 313-316.
- Walsh, G. (2003) *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*, Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
- Wang, W. & Malcolm, B.A. (1999) Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques* 26, 680-682.
- Weinacker, D., Rabert, C., Zepeda, A.B., Figueroa, C.A., Pessoa, A. & Farias, J.G. (2013) Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Braz J Microbiol* 44, 1043-1048.
- Weis, R. & Purkarthofer, T. (2013) Protein Expression. WO/2013/030329.
- Weston-Davies, W.H., Nunn, M.A., Pinto, F., Mackie, J.I., Richards, S.J., Machin, S.J., Prudo, R. & Hillmen, P. (2014) Clinical and Immunological Characterisation of Coversin, a Novel Small Protein Inhibitor of Complement C5 with Potential As a Therapeutic Agent in PNH and Other Complement Mediated Disorders. *56th ASH Annual Meeting and Exposition*. San Francisco, CA.
- Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.C., Williams, K.L., Appel, R.D. & Hochstrasser, D.F. (1999) Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol* 112, 531-552.
- Wilkinson, B. & Gilbert, H.F. (2004) Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta* 1699, 35-44.

- Witholt, B., Boekhout, M., Brock, M., Kingma, J., Heerikhuizen, H.V. & Leij, L.D. (1976) An efficient and reproducible procedure for the formation of spheroplasts from variously grown *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 74, 160-170.
- Xia, Y., Schlapschy, M., Morath, V., Roeder, N., Vogt, E.I., Stadler, D., Cheng, X., Dittmer, U., Sutter, K., Heikenwalder, M., Skerra, A. & Protzer, U. (2019) PASylated interferon α efficiently suppresses hepatitis B virus and induces anti-HBs seroconversion in HBV-transgenic mice. *Antiviral Res* 161, 134-143.
- 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.
- 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.
- Zeuzem, S., Welsch, C. & Herrmann, E. (2003) Pharmacokinetics of peginterferons. *Semin Liver Dis* 23 Suppl 1, 23-28.
- Zündorf, I. & Dingermann, T. (2014) PEGylation--a well-proven strategy for the improvement of recombinant drugs. *Pharmazie* 69, 323-326.