

**ENTWICKLUNG
MOLEKULARER ADAPTER
ZUR OPTIMIERUNG VON
IMMUNOTOXINEN**

Inauguraldissertation

vorgelegt am

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Jutta Keller

Berlin 2002

Die praktischen Arbeiten für die hier vorliegende Dissertation wurden am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. M. Schäfer-Korting

Univ.-Prof. Dr. R. Tauber

Tag der Disputation: 22. Oktober 2002

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

VIII

1 EINLEITUNG

1

1.1	Häufigkeit von Krebserkrankungen	1
1.2	Therapie von Tumorerkrankungen.....	2
1.3	Neue Ansätze in der Tumorthherapie	3
1.4	Immunologische Therapiekonzepte.....	5
1.5	Zytostatikaimmunokonjugate.....	6
1.6	Immunotoxine	7
1.6.1	Ligandenauswahl und Zielzellerkennung.....	7
1.6.2	Proteintoxine und ihre Wirkungsmechanismen.....	9
1.6.3	Zelluläre Aufnahmemechanismen von Proteintoxinen.....	12
1.6.4	Aktuelle Entwicklungen im Bereich der Immunotoxine	14
1.6.5	Therapielimitierende Eigenschaften von Immunotoxinen.....	15
1.7	Crosslinker für Immunokonjugate.....	16
1.7.1	Endosomal/ lysosomal spaltbare Sequenzen.....	17
1.7.2	Cytosolisch spaltbare Sequenzen	17
1.8	Toxinunabhängiger Membrantransfer	19
1.9	Zielsetzung für die vorliegende Arbeit.....	21

2 MATERIAL UND METHODEN

24

2.1	Allgemeine Hinweise	24
2.2	Geräte	24
2.2.1	Zell- und Bakterienkultur	24
2.2.2	Elektrophorese und Westernblot	24
2.2.3	Zentrifugen.....	25
2.2.4	Sonstige Geräte.....	25
2.3	Verbrauchsmaterialien.....	26

2.3.1	Zell- und Bakterienkultur	26
2.3.2	Chemikalien.....	26
2.3.3	Antikörper.....	27
2.3.4	Enzyme	28
2.3.5	Weitere Proteine und Peptide	28
2.3.6	Sonstiges Verbrauchsmaterial	28
2.4	Material für die Chromatographie	29
2.5	Reagenziensätze und Molekulargewichtsmarker	29
2.6	Nukleotide und Primer	29
2.7	Vektoren.....	30
2.8	Bakterienstämme	31
2.9	Zelllinien.....	31
2.10	Pufferlösungen und Bakterienmedien	31
2.11	Zellbiologische Methoden.....	32
2.11.1	Zellkultur	32
2.11.2	Collagen A-Beschichtung von Zellkulturplatten.....	32
2.11.3	Passagieren der Zellen.....	32
2.11.4	Kultivierung von HepG2-Zellen.....	32
2.11.5	Kultivierung von TRVb-Zellen.....	32
2.11.6	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	33
2.11.7	Zellfraktionierung.....	33
2.11.8	Solubilisierung von Zellen	35
2.11.9	Quantifizierung von funktionellen Transferrinbindungsstellen an der Zelloberfläche	35
2.11.10	Immunfluoreszenz mit TRBP-Proteinen.....	36
2.12	Proteinchemische Methoden	37
2.12.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	37
2.12.2	Pufferwechsel und Konzentrierung von Proteinlösungen.....	37
2.12.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.12.4	Gelfärbungen und Trocknen von Gelen.....	39
2.12.5	Westernblot.....	40
2.12.6	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest	41
2.12.7	Biotinylierung.....	43
2.13	Toxinspezifische Methoden.....	43
2.13.1	Toxizitätsassays	43
2.13.2	Anreicherung von Elongationsfaktor II aus Weizenkeimen	45
2.13.3	ADP-Ribosylierung von Elongationsfaktor II.....	45
2.13.4	Proteolytische Spaltung von Diphtheriatoxin.....	46
2.13.5	Kopplung an Transfersequenzen.....	46
2.13.6	Proteolytische Spaltung mit Furin	47
2.14	Chromatographische Methoden.....	47
2.14.1	Gelfiltration	47

2.14.2	Anionenaustauschchromatographie.....	48
2.14.3	Hydrophobe Chromatographie	48
2.14.4	Affinitätschromatographie.....	49
2.15	Molekularbiologische Methoden.....	51
2.15.1	Agarosegelelektrophorese	51
2.15.2	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	51
2.15.3	Restriktionsverdau.....	51
2.15.4	Ligation von DNA-Fragmenten	52
2.15.5	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	52
2.15.6	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	53
2.15.7	Gefrierkulturen von <i>E. coli</i>	53
2.15.8	Minipräparation von Plasmid-DNA	53
2.15.9	Natriumacetatfällung von Plasmid-DNA	54
2.15.10	DNA-Sequenzierung	54
2.15.11	Vorbereitung von Oligonukleotiden zur Klonierung	54
2.15.12	Polymerasekettenreaktion.....	55
2.15.13	Reinigung von PCR-Produkten.....	56
2.16	Methoden zur bakteriellen Proteinexpression.....	56
2.16.1	Anzucht von Bakterien zur Expression.....	56
2.16.2	Optimierung der Proteinexpression.....	57
2.16.3	Bakterienaufschluß	57
2.16.4	Enterokinasespaltung von Fusionsproteinen.....	58
3	ERGEBNISSE	59
3.1	Charakterisierung geeigneter Zelllinien.....	59
3.1.1	Qualitativer Nachweis des Transferrinrezeptors	59
3.1.2	Quantitativer Nachweis des Transferrinrezeptors	60
3.2	Aktivitätsbestimmungen für Toxine	61
3.2.1	ADP-Ribosylierung	61
3.2.2	Cytotoxizitätstest	63
3.3	Toxinfindung und Darstellung der funktionellen Domänen	64
3.3.1	Proteinsyntheseinhibitoren.....	64
3.3.2	Isolierung der aktiven Domäne von Diphtheriatoxin	64
3.3.3	Rekombinante Synthese von <i>Pseudomonas</i> Exotoxin-Fragmenten.....	65
3.3.4	Darstellung von GFP als Pseudotoxin.....	69
3.4	Chemische Kopplung von Transfersequenzen und Toxinfragmenten.....	70
3.4.1	Kopplungen an verschiedene Toxinfragmente	70
3.4.2	Kopplung von Penetratin an GFP	70
3.4.3	Funktionsanalyse der gekoppelten DT-Konstrukte.....	72
3.5	Rekombinante Synthese von Toxinfragmenten mit Transfersequenz.....	76
3.5.1	Klonierung von DTA.....	77
3.5.2	Klonierung von DTA-MTS	77
3.5.3	Expression der DTA-MTS-Konstrukte	78

3.5.4	Reinigung rekombinanter DTA-MTS-Konstrukte	79
3.5.5	Funktionsanalyse von rekombinanten DTA-MTS-Konstrukten	82
3.6	Klonierung, Expression und Reinigung von Adaptertoxinen.....	85
3.6.1	Klonierung von DTA-MTS-Adaptertoxinen.....	86
3.6.2	Klonierung weiterer DTA-Adaptertoxine	89
3.6.3	Klonierung der DTA-Kontrollen.....	89
3.6.4	Expression der Adaptertoxine	91
3.6.5	Reinigung der Adaptertoxine	96
3.6.6	Darstellung von eGFP-Adaptertoxinen.....	97
3.7	Funktionsanalyse der Adaptertoxine	99
3.7.1	Funktionsanalyse der enzymatischen Aktivität von Adaptertoxinen.....	99
3.7.2	Funktionsanalyse der spaltbaren Sequenzen im Adapter	100
3.8	Immunoadaptertoxine mit Transferrinrezeptor-Bindungspeptid.....	104
3.8.1	Klonierung von DTA-Immunoadapterkonstrukten.....	105
3.8.2	Expression und Reinigung von DTA-Immunoadapterkonstrukten.....	106
3.8.3	Klonierung, Expression und Reinigung von eGFP- Immunoadapterkonstrukten.....	109
3.8.4	TRBP-Bindung an Transferrinrezeptoren	110
3.8.5	Funktionsanalyse von Immunoadaptertoxinen.....	113
4	DISKUSSION	118
4.1	Charakterisierung geeigneter Testsysteme	118
4.1.1	Geeignete Zelllinien mit tumorspezifischem Antigen.....	118
4.1.2	Bestimmung der cytotoxischen Aktivität	119
4.1.3	Zellfreies Testsystem zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der toxischen Domänen.....	120
4.2	Proteinchemische Kopplungsprodukte	121
4.2.1	Darstellung chemisch gekoppelter Adaptertoxine.....	121
4.2.2	Funktionalität der chemisch gekoppelten Adapterkonstrukte	123
4.3	Rekombinante Darstellungsweise	123
4.4	Funktionsanalysen.....	125
4.4.1	ADP-Ribosylierung mittels Diphtheriatoxin A-Kette	125
4.4.2	Charakterisierung des endosomal spaltbaren Peptids.....	126
4.4.3	Charakterisierung des cytosolisch spaltbaren Peptids	127
4.4.4	Transferrinrezeptorbindung des TRBP	127
4.4.5	Charakterisierung des Membrantransfers	130
4.5	Ausblick.....	133
5	ZUSAMMENFASSUNG	135
6	LITERATURVERZEICHNIS	138
7	ANHANG	147
7.1	Hergestellte pJK- und andere Plasmide.....	147

7.2	Adaptersequenzen.....	148
7.3	Allgemeines	149
7.3.1	Genetischer Code.....	149
7.3.2	Kurzbezeichnungen für Aminosäuren.....	149
PUBLIKATIONSVERZEICHNIS		150
DANKSAGUNG		152

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

λ	Wellenlänge
% (v/v)	Prozentgehalt Volumen am Gesamtvolumen (ml/100 ml)
% (w/v)	Prozentgehalt Masse am Gesamtvolumen (g/100 ml)
*	peroxidasekonjugiert
Abb.	Abbildung
Anti-Biotin	polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen Biotin
Anti-DT	polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen Diphtheriatoxin
Anti-GFP	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen grünfluoreszierendes Protein
Anti-PE	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen <i>Pseudomonas</i> Exotoxin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	2,2'-Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
CCU	cytosolisch spaltbare Einheit (allgemeine Bezeichnung)
cDNA	die der <i>Messenger</i> -RNA komplementäre DNA
CHO	Ovarien des chinesischen Hamsters
CSP	cytosolisch spaltbares Peptid
CV	Säulenvolumen
Da	Dalton (g/mol)
Desferal	Handelsbezeichnung für Deferoxaminmesylat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium mit L-Alanyl-L-Glutamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DT	Diphtheriatoxin
DTA	enzymatisch aktive A-Kette von Diphtheriatoxin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , Sicherheitsstamm K 12
ECU	endosomal spaltbare Einheit (allgemeine Bezeichnung)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EF II	eukaryontischer Elongationsfaktor II
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
eGFP	in seinen Fluoreszenzeigenschaften verändertes GFP
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ESP	endosomal spaltbares Peptid
FCS	fetales Kälberserum
FDA	Fluoresceindiacetat
$x \times g$	x-faches der Erdbeschleunigung ($g = 9.80665 \text{ m/s}$)
GFP	grünfluoreszierendes Protein (<i>Green-Fluorescent-Protein</i>)
HRP	Peroxidase aus Meerrettich
hTfR	humaner Transferrinrezeptor
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IL 2	Interleukin 2
IPTG	Isopropyl- β -D-Thio-Galaktopyranosid
M	(mol/l)
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MTS	Membrantransfersequenz nach Rojas <i>et al.</i> (1996) ¹
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
OD _x	Optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge $\lambda = x \text{ nm}$
OKT 9	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen humanen Transferrinrezeptor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin
PEN	Penetratin nach Derossi <i>et al.</i> (1998) ²
RIP	ribosomeninaktivierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Ricin, Ricintoxin
RTA	enzymatisch aktive A-Kette von Ricin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Tf	Transferrin
TfR	Transferrinrezeptor
TLM	Translokationsmotiv nach Oess und Hildt (2000) ³
TRBP	Transferrinrezeptor-Bindungspeptid
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
TRX	Thioredoxin bzw. His-Patch-Thioredoxin
U	die für einzelne Substanzen und Enzyme in spezifischen Testsystemen ermittelte Aktivität in Einheiten (Unit)
wt	Wildtyp

Als Dezimaltrennzeichen wird ein Punkt verwendet.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund der schwerwiegenden Nebenwirkungen von herkömmlichen Zytostatika gewinnen immuntherapeutische Verfahren bei der Behandlung von Krebserkrankungen zunehmend an Bedeutung. Die Verwendung von Immunotoxinen stellt dabei ein vielversprechendes Konzept dar. Das antitumorale Potential dieser Verbindungen, die sich aus einem tumorspezifischen Antikörper, Antikörperfragment oder Liganden und einer hochaktiven, toxischen Domäne eines Proteintoxins zusammensetzen, wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Dies sind beispielsweise die Selektivität des zielzellspezifischen Liganden, die cytotoxische Aktivität der katalytisch aktiven Domäne eines Proteintoxins, die Immunogenität, Toxizität und Stabilität des Gesamtkonstruktes und dessen Fähigkeit zur effektiven Tumorpenetration, die sich umgekehrt proportional zu seiner Größe verhält.

Bereits vorhandene Immunotoxine auf der Basis von Diphtheriatoxin oder *Pseudomonas* Exotoxin beinhalten sowohl die cytotoxische Domäne als auch die toxineigene Translokationsdomäne. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten molekulare Adapter entwickelt werden, die die toxineigene Translokationsdomäne ersetzen und zu einer effektiven sowie irreversiblen Aufnahme der reinen toxischen Domäne ins Cytosol der Zielzellen führen. Der Adapter besteht aus einem toxinunabhängigen Membrantransferpeptid (Trojanisches Peptid), das N-terminal von einer cytosolisch und C-terminal von einer endosomal spaltbaren Bindung flankiert wird.

Die zelluläre Aufnahme eines derartigen Immunoadaptertoxins kann man sich somit wie folgt vorstellen: Bedingt durch den tumorspezifischen Liganden erfolgt zunächst die Internalisierung des Gesamtkonstruktes mit anschließender Spaltung der endosomal spaltbaren Bindung. Dadurch wird das Trojanische Peptid aktiviert und vermittelt den Transfer der cytotoxischen Domäne ins Cytosol. Nach Spaltung der cytosolisch spaltbaren Bindung akkumuliert die cytotoxische Komponente, da sie durch die Freisetzung der Transfersequenz nicht mehr membrangängig ist. Angelangt an ihrem Wirkort, dem Cytosol, führt eine durch die toxische Domäne vermittelte Inhibition der Proteinbiosynthese schließlich zum Zelltod.

Als cytotoxisches Agens wurde Diphtheriatoxin verwendet, dessen enzymatisch aktive A-Kette sowohl mittels proteinchemischer als auch mittels rekombinanter Methoden erfolgreich

dargestellt werden konnte. Mit einem einfach und schnell durchführbaren, nichtradioaktiven Assay konnte für alle Diphtheriatoxinkonstrukte eine toxinvermittelte ADP-Ribosylierung von Elongationsfaktor II nachgewiesen werden, durch die *in vivo* die Proteinbiosynthese inhibiert wird. Dabei konnte erstmalig gezeigt werden, daß C-terminale Fusionsanteile mit einer Größe von bis zu 5 kDa ohne Einfluß auf die enzymatische Aktivität der A-Kette von Diphtheriatoxin bleiben.

Als tumorspezifisches Antigen wurde im Rahmen dieser Arbeit der Transferrinrezeptor verwendet. Mit Hilfe eines neu entwickelten, nichtradioaktiven Assays zur Quantifizierung von Transferrinbindungsstellen konnten bekannte, mit Radioliganden ermittelte Rezeptordichten auf einer humanen Hepatokarzinomzelllinie und zwei weiteren Zelllinien bestätigt werden. Für ein aus zwölf Aminosäuren bestehendes, transferrinunabhängiges Peptid, welches im Rahmen dieser Arbeit den natürlichen, tumorspezifischen Liganden Tf ersetzen konnte, ließ sich in Verbindung mit verschiedenen Toxinkonstrukten erstmalig eine konzentrationsabhängige Transferrinrezeptorbindung in einem zellfreien System zeigen.

Aufgrund der Instabilität der proteinchemisch synthetisierten Adapterkonstrukte wurde eine rekombinante Darstellungsweise entwickelt, mit der Immunoadaptortoxine effizient und mit einheitlicher Zusammensetzung dargestellt werden konnten. Die einzelnen Bestandteile des Adapters konnten erfolgreich über gerichtete Klonierungsprozesse synthetisiert werden. Die cytosolisch spaltbare Sequenz wurde dabei durch die Erkennungsmotive von Caspase 1 und 3 und einem in Hefezellen spaltbaren Tripeptid repräsentiert. Die endosomal spaltbare Sequenz setzte sich aus den in *Pseudomonas* Exotoxin und Diphtheriatoxin enthaltenen Erkennungsmotiven für die Protease Furin zusammen. Als Membrantransfersequenz fanden drei verschiedene Trojanische Peptide Verwendung (Penetratin, MTS und TLM).

Mit Hilfe von rekombinanter, humaner Furinconvertase konnte die beabsichtigte Spaltung der im Adapter verwendeten, endosomal spaltbaren Sequenz durch Furin oder furinähnliche Enzyme aus Membranfraktionen der Hepatokarzinomzelllinie HepG2-Zellen nachgewiesen werden, wobei die cytosolisch spaltbare Sequenz wie gewünscht unverändert blieb. Mit einer Halbwertszeit im Zellkulturmedium von circa vier Stunden konnte die Stabilität der rekombinant hergestellten, endosomal spaltbaren Sequenz gegenüber einem zuvor getesteten chemischen Crosslinker erheblich verbessert werden. In MTS-basierten Adapterkonstrukten konnte außerdem gezeigt werden, daß ein C-terminal fusionierter Ligand mit einer Größe bis zu 25 kDa ohne Einfluß auf die Spaltung der endosomal spaltbaren Sequenz bleibt.

Nach der erfolgreichen Darstellung verschiedener, vollständiger Immunoadapterkonstrukte wurden diverse Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung der verwendeten Membrantransfersequenzen durchgeführt. Mittels eines auf der Umsetzung von Fluoresceindiacetat basierenden Cytotoxizitätsassays, mit dem im Rahmen dieser Arbeit an verschiedenen Zelllinien literaturkonforme IC_{50} -Werte für Diphtheriatoxin ermittelt werden konnten, wurde die Funktionalität des gesamten Adapters und insbesondere der verwendeten Membrantransfersequenzen untersucht. Dabei verfügten vollständige Immunoadaptortoxine interessanterweise nicht über die von ihnen erwartete cytotoxische Aktivität. Dieses Ergebnis kann

einerseits auf eine relativ schwache Rezeptoraffinität des verwendeten Liganden oder auf die von Beginn an als sehr kritischer Parameter geltende Transferaktivität der verwendeten Trojanischen Peptide zurückgeführt werden. Für die Zukunft ist daher die Untersuchung des cytotoxischen Potentials weiterer Konstrukte mit anderen tumorspezifischen Liganden und den verwendeten Transfersequenzen von großem Interesse. Erste, vielversprechende Hinweise diesbezüglich erbrachte in der Zwischenzeit ein auf den Daten dieser Arbeit basierendes Immunoadaptertoxin mit epidermalem Wachstumsfaktor als tumorspezifischer Ligand. Es zeigte neben einer ausgeprägten Zielzellspezifität auch die erhoffte cytotoxische Aktivität. Ebenfalls sehr aussichtsreich erscheint die Verwendung solcher Transfersequenzen, die erst unter den in den Endosomen vorherrschenden Bedingungen aktiviert werden.

Das hier erstmalig vorgestellte Adapterkonzept zur Optimierung von Immunotoxinen gestattet unter Zuhilfenahme von toxinunabhängigen, universellen Membrantransfermechanismen eine Akkumulation völlig unterschiedlicher polarer Biomoleküle in diversen Zielzellen und bietet damit die Möglichkeit seiner Anwendung auch im Rahmen anderer *Drug-Targeting*-Konzepte. In der vorliegenden Arbeit gelang es mit Hilfe von verschiedenen Modellsystemen für die einzelnen Adapterkomponenten und deren Liganden, wertvolle Erkenntnisse und hoffnungsvolle Ansätze für zukünftige Entwicklungen im Bereich der Tumorthherapie zu gewinnen.

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Originalarbeiten

Keller, J., Heisler, I., Tauber, R. & Fuchs, H. Development of a novel molecular adapter for the optimization of immunotoxins. *J Control Release* **74**, 259–261 (2001).

Heisler, I., Keller, J., Tauber, R., Sutherland, M. & Fuchs, H. A colorimetric assay for the quantitation of free adenine applied to determine the enzymatic activity of ribosome-inactivating proteins. *Anal Biochem* **302**, 114–122 (2002).

Heisler, I., Keller, J., Tauber, R., Sutherland, M. & Fuchs, H. A cleavable adapter to reduce non-specific cytotoxicity of recombinant immunotoxins. *Int J Cancer* (eingereicht).

Poster und Vorträge

Keller, J., Heisler, I., Tauber, R. & Fuchs, H. Development of a novel molecular adapter for the optimization of immunotoxins. *The National Cancer Institute and Controlled Release Society „International Symposium on Tumor Targeted Delivery Systems“* Bethesda, Maryland USA (2000).

Keller, J., Heisler, I., Sutherland, M., Schäfer-Korting, M., Tauber, R. & Fuchs, H. A unique linker for retaining diphtheria toxin in cancer cells. *Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft, Landesgruppe Berlin „Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor“* Berlin (2001).

Keller, J., Sutherland, M., Heisler, I., Schäfer-Korting, M., Tauber, R. & Fuchs, H. Immunotoxins containing a transferrin receptor binding peptide as tumor-specific ligand. *Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft, European Federation for Pharmaceutical Sciences and International Association for Pharmaceutical Technology „4th European Graduate Student Meeting“* Frankfurt / Main (2002).

Heisler, I., Keller, J., Sutherland, M., Tauber, R. & Fuchs, H. A specific cytosolic cleavable peptide for improved trapping inside the cytosol. *Federation of European Biochemical*

Societies „27th FEBS Meeting“ Lissabon, Portugal (2000). *Eur J Biochem* **268 S 1**, 178 (2001).

Sutherland, M., Keller, J., Heisler, I., Tauber, R. & Fuchs, H. A novel molecular adaptor for the site-specific trapping of Immunotoxins – Is it functional? *Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie und Deutsche Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin „Jahrestagung 2001“* Rostock (2001). *Clin Chem Lab Med* **39**, A76 (2001).

Sutherland, M., Heisler, I., Keller, J., Tauber, R. & Fuchs, H. Cleavable adapters reduce non-specific cytotoxicity of recombinant immunotoxins. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology „7th IUBMB Conference“* Bergen, Norwegen (2002).

Kurzfassungen

Keller, J., Heisler, I., Tauber, R. & Fuchs, H. A novel molecular adapter for improving immunotoxins. *Fachbereich Humanmedizin, Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin „Jahrbuch 2000“* Berlin (2000).

Heisler, I., Keller, J., Tauber, R., Sutherland, M. & Fuchs, H. Development of an assay for the quantitation of free adenine. *Fachbereich Humanmedizin, Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin „Jahrbuch 2001“* Berlin (2001).

Sutherland, M., Keller, J., Heisler, I., Tauber, R. & Fuchs, H. Functionality of diphtheria toxin-based constructs for improved site-specific immunotoxin trapping. *Fachbereich Humanmedizin, Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin „Jahrbuch 2001“* Berlin (2001).

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Rudolf Tauber unter der Anleitung von Dr. Hendrik Fuchs angefertigt.

Herrn Prof. Rudolf Tauber danke ich für seine stets vorhandene Hilfsbereitschaft, seine zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge und für die großzügige finanzielle Unterstützung des Vorhabens.

Herrn Dr. Hendrik Fuchs danke ich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und für die ausgezeichnete Betreuung. Seine vielfältigen wissenschaftlichen Anregungen und seine konstruktiven Vorschläge haben mir stets weitergeholfen. In jeder Phase meiner Arbeit konnte ich mich auf seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie auf die Sicherstellung meiner Finanzierung verlassen.

Bei Frau Prof. Monika Schäfer-Korting möchte ich mich für ihre Betreuung und für die Begutachtung meiner Arbeit am Fachbereich Pharmazie der Freien Universität Berlin bedanken.

Mein Dank gilt ferner Frau Babara Kosel, Herrn Matthias Kaup und Herrn Priv.-Doz. Dr. Otmar Huber. Gerade zu Beginn meiner Arbeit waren sie mir eine unschätzbare Hilfe beim Erlernen der verschiedenen Arbeitstechniken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. Mark Sutherland und Herrn Iring Heisler für die kooperative Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Immunotoxine. Frau Katrin Dassler und Frau Sabrina Röttger danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Darüber hinaus danke ich allen nicht namentlich genannten Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die zahlreichen Anregungen und für das ausgesprochen nette Arbeitsklima.