

**Tumorspezifische chimäre Toxine: Konstruktion,
biochemische Charakterisierung und Analyse ihrer
therapeutischen Bedeutung**

Dissertation
von
Christopher Bachran

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Berlin, Februar 2006

Die praktischen Arbeiten wurden am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Charité — Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, in der Arbeitsgruppe von PD Dr. H. Fuchs angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. H. Fuchs
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
Charité — Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin

2. Gutachter: Prof. Dr. M. F. Melzig
Institut für Pharmazie
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
Freie Universität Berlin

Tag der Disputation: 20.06.2006

Die in dieser Arbeit verwendeten geschützten Warenzeichen sind innerhalb des laufenden Textes nicht als solche gekennzeichnet. Aus dem Fehlen der Kennzeichnung kann also nicht geschlossen werden, dass der entsprechende Produktname frei von Rechten Dritter ist.

Von der Stirne heiß
rinnen muß der Schweiß,
soll das Werk den Meister loben;
doch der Segen kommt von oben.

Das Lied von der Glocke
(Friedrich von Schiller)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungen	IX
1 Einleitung	1
1.1 Krebserkrankungen.....	1
1.2 Therapiemöglichkeiten	1
1.3 Antikörper in der Tumorthherapie.....	2
1.3.1 Tumorthherapie mit Antikörpern	3
1.3.2 Antikörperkonjugate.....	3
1.4 Immunotoxine und chimäre Toxine	5
1.4.1 Tumorassoziierte Antigene als Ziele der Tumorthherapie	6
1.4.1.1 Der Interleukin-2 Rezeptor.....	6
1.4.1.2 Der <i>epidermal growth factor receptor</i>	7
1.4.2 Proteinbiosynthese inhibierende Proteintoxine	8
1.4.2.1 Diphtheriatoxin.....	8
1.4.2.2 Saporin.....	10
1.5 Optimierungen von Immunotoxinen und chimären Toxinen	10
1.5.1 Molekularer Adapter	11
1.5.2 Membrantransferpeptide.....	13
1.6 Alternative Tumorthérapeutika.....	15
1.7 Zielsetzung.....	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Geräte	18
2.1.1.1 PCR und Elektrophorese	18
2.1.1.2 Zentrifugen	18
2.1.1.3 Westernblot und Filmentwicklung	18
2.1.1.4 Photometer.....	18

2.1.1.5	Sonstige Geräte	18
2.1.2	Chemikalien	19
2.1.3	Saponine	19
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	19
2.1.5	Kits	20
2.1.6	Bakterienstämme	20
2.1.7	Hefestamm	20
2.1.8	Vektoren	20
2.1.9	Oligonukleotide	21
2.1.10	Puffer, Medien und Marker	21
2.1.11	Antikörper	22
2.1.12	Enzyme und weitere Proteine	22
2.1.13	Zellkultur	22
2.1.14	Zelllinien	23
2.2	Molekularbiologische Methoden	23
2.2.1	PCR	23
2.2.2	Präparation von Plasmid-DNA	24
2.2.3	Phosphorylierung und Dimerisierung von Oligonukleotiden	24
2.2.4	DNA-Modifikationen durch Klenow-Polymerase	25
2.2.5	Gesamt-RNA-Isolierung aus Bakterien	26
2.2.6	Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)	26
2.2.7	Restriktionsverdau	27
2.2.8	DNA-Agarosegelelektrophorese	27
2.2.9	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	28
2.2.10	Ligation von DNA	28
2.2.10.1	Ligation mit T4-DNA-Ligase	28
2.2.10.2	Ligation mit dem »TOPO TA Cloning Kit«	29
2.2.11	Transformation	29
2.2.12	Sequenzierung von DNA	30
2.2.13	Lagerung von <i>E. coli</i> in Glycerol	31
2.3	Proteinbiochemische Methoden	31
2.3.1	Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	31
2.3.2	Proteinexpression in Hefe	31
2.3.3	Proteinaufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie	32
2.3.3.1	Native Aufreinigung aus <i>S. cerevisiae</i>	32
2.3.3.2	Aufreinigung aus <i>E. coli</i>	32
2.3.4	Anreicherung von EF2 aus Weizenkeimlingen	33
2.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	34

2.3.6	Coomassiefärbung von SDS–Gelen	34
2.3.7	Westernblot und Immunodetektion	35
2.3.8	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen.....	36
2.3.9	Proteinkonzentrationsbestimmung	36
2.4	Zellbiologische Methoden und Zellkultur	36
2.4.1	Nachweis der ADP-Ribosylierungsaktivität <i>in vitro</i>	36
2.4.2	Zellkultur	37
2.4.2.1	Zellkultur von HER14- und NIH-3T3-Zellen	37
2.4.2.2	Zellkultur von L540Cy-Zellen	38
2.4.3	Colorimetrischer Festphasenassay.....	38
2.4.3.1	Bindung chimärer Toxine an Zellen.....	39
2.4.3.2	Festphasennachweis der ADP-Ribosylierung	39
2.4.4	Cytotoxizitätsassays	40
2.4.4.1	Cytotoxizitätsassays an HER14- und NIH-3T3-Zellen.....	40
2.4.4.2	Cytotoxizitätsassay an L540Cy-Zellen.....	41
2.4.5	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (FACS)	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Colorimetrischer Festphasenassay zum Nachweis von ADP-Ribosylierungsaktivität.....	42
3.1.1	Aufreinigung von EF2 und ^{H6} EF2	42
3.1.2	Nachweis der ADP-Ribosylierung <i>in vitro</i> an EF2 und ^{H6} EF2	44
3.1.3	Colorimetrischer Festphasenassay zur Messung der ADP-Ribosylierung von ^{H6} EF2	45
3.1.4	Optimierung der ADP-Ribosylierung an ^{H6} EF2 <i>in vitro</i>	46
3.1.5	Optimierter colorimetrischer Festphasenassay zur Messung der ADP-Ribosylierung von ^{H6} EF2	47
3.2	Chimäre Toxine gegen Interleukin-2 Rezeptor	48
3.2.1	Klonierung der chimären Toxine.....	48
3.2.2	Expression und Aufreinigung der chimären Toxine	50
3.2.3	Nachweis der ADP-Ribosylierung durch die chimären Toxine	51
3.2.4	Analyse der Cytotoxizität der chimären Toxine in der Zellkultur	52
3.2.5	Charakterisierung der Bindung der chimären Toxine an Zielzellen	53
3.3	Analyse unterschiedlicher Membrantransferpeptide als Bestandteil des Adapters	55
3.3.1	Klonierung der chimären Toxine mit unterschiedlichen Membrantransferpeptiden.....	55

3.3.2	Expression und Aufreinigung der chimären Toxine	58
3.3.3	Analyse der <i>In-vitro</i> -ADP-Ribosylierung durch die chimären Toxine	59
3.3.4	Cytotoxische Wirkung auf HER14- und NIH-3T3-Zellen.....	60
3.3.5	Untersuchung der Zellbindung von chimären Toxinen mit unterschiedlichen Membrantransferpeptiden	63
3.4	Charakterisierung unterschiedlicher Saponine in Kombination mit chimären Toxinen.....	66
3.4.1	Expression und Aufreinigung der chimären Toxine und von Kontrollkonstrukten	67
3.4.2	Beschreibung der verwendeten Saponine	67
3.4.3	Cytotoxizität der Saponine	69
3.4.4	Cytotoxizität von ^{H10} SAP-Ad* _{TLM} -EGF in Kombination mit Saponinen.....	71
3.4.5	Cytotoxizität von ^{H6} SAP in Kombination mit Saponinen.....	74
4	Diskussion	77
4.1	Colorimetrischer Festphasenassay zum Nachweis von ADP- Ribosylierungsaktivität.....	77
4.2	Chimäre Toxine gegen Interleukin-2 Rezeptor.....	79
4.3	Analyse unterschiedlicher Membrantransferpeptide als Bestandteil des Adapters	81
4.4	Charakterisierung unterschiedlicher Saponine in Kombination mit chimären Toxinen.....	86
5	Zusammenfassung	90
6	Summary	92
7	Literaturverzeichnis	94
8	Anhang	108

Abkürzungen

α -L-Ara	α -L-Arabinose
α -L-Rha	α -L-Rhamnose
Ad _{HA2}	CSP1-HA2-ESP1
Ad _{HA2(4E)}	CSP1-HA2(4E)-ESP1
Ad _{MTS}	CSP1-MTS-ESP1
Ad _{ohne MTP}	CSP1-ESP1
Ad _{SynB1}	CSP1-SynB1-ESP1
Ad _{TLM}	CSP1-TLM-ESP1
Ad* _{TLM}	CSP1-TLM-ESP2
APS	Ammoniumperoxodisulfat
β -D-Api	β -D-Apiose
β -D-Fuc	β -D-Fucose
β -D-Gal	β -D-Galactose
β -D-Glc	β -D-Glucose
β -D-GlcA	β -D-Gluconsäure
β -D-Xyl	β -D-Xylose
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
<i>C. diphtheriae</i>	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
CSP	cytosolisch spaltbare Peptidsequenz
DT	Diphtheriatoxin
DTA	Diphtheriatoxin A-Kette
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF2	Elongationsfaktor 2
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor, human</i> EGFR = HER1
ESP	endosomal spaltbare Peptidsequenz
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GABiotin	Ziegen-IgG gegen Biotin
HA2	Teil der N-terminalen Sequenz der Hämagglutinin Untereinheit HA-2 des Influenzavirus
HA2(4E)	modifizierte HA2-Sequenz
His-tag, H ⁶ , H ¹⁰	Histidin-tag, His-tag aus sechs Histidinresten, His-tag aus zehn Histidinresten

IgG	Immunglobulin G
IL2	Interleukin-2
IL2R	Interleukin-2 Rezeptor
λ	Wellenlänge
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MTP	Membrantransferpeptid
MTS	Membrantransfersequenz
MTT	1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
PNK	T4-Polynukleotidkinase
RAG	Kaninchen-IgG gegen Ziegen-IgG, Peroxidase konjugiert
RAG-FITC	Kaninchen-IgG gegen Ziegen-IgG; FITC konjugiert
RIP	<i>ribosome-inactivating protein</i>
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SAP	Saporin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SynB1	Variante von Protegrin-1
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLM	Translokationsmotiv
Tris	Tris-hydroxymethylaminoethan
Triton X-100	T-octylphenoxypolyethoxyethanol
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
v/v	Konzentrationsangabe als Volumenanteil am Gesamtvolumen
v/w	Konzentrationsangabe als Volumenanteil in Millilitern am Gesamtvolumen in Gramm
w/v	Konzentrationsangabe als Gewichtsanteil in Gramm am Gesamtvolumen in Millilitern
x × g	x-faches der Erdbeschleunigung

5 Zusammenfassung

Krebs ist eine Krankheit, die durch unkontrolliertes Wachstum mutierter Zellen hervorgerufen wird. In den letzten Jahren wurden vielfach neue Medikamente entwickelt, die konventionelle Behandlungsmethoden von Krebserkrankungen verbessern. Diese als biologische Verfahren bezeichneten Methoden verwenden oft Antikörper oder Wachstumsfaktoren für eine spezifische Erkennung von Oberflächenstrukturen, die auf Tumorzellen überexprimiert werden. Während durch die Anwendung von Antikörpern bereits beachtliche Verbesserungen in den Therapiemöglichkeiten erreicht wurden, werden weitere vielversprechende Untersuchungen zu kombinierten Wirkstoffen vorangetrieben. Durch Kombination von Antikörpern oder Wachstumsfaktoren mit toxischen Substanzen entstehen Immunotoxine oder chimäre Toxine, die spezifisch an Tumorzellen binden und so eine Aufnahme der Toxine in die Zielzelle vermitteln, wodurch die Zelle stirbt. Damit kann die Behandlung von Krebs durch spezifische Wirkstoffe erheblich verbessert werden, während gleichzeitig Nebenwirkungen minimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden chimäre Toxine entwickelt und charakterisiert, bei denen das Toxin mit dem Liganden über einen spaltbaren Adapter verbunden ist. Der Adapter dient der Senkung von Nebenwirkungen und der Verbesserung der Toxinaufnahme. Zur Analyse von chimären Toxinen mit Diphtheriatoxin oder *Pseudomonas* Exotoxin wurde ein colorimetrischer Festphasenassay entwickelt, der eine quantitative Analyse der Enzymaktivität *in vitro* erlaubt und durch seine Flexibilität und hohe Sensitivität auch zur Diagnose von Patientenproben mit Diphtherieverdacht hervorragend geeignet ist.

Die Analyse von drei chimären Toxinen, die jeweils Liganden für den Interleukin-2 Rezeptor tragen, zeigte zwar Enzymaktivität der Toxine, jedoch keine Cytotoxizität und Bindung an Interleukin-2 Rezeptor exprimierende Zellen. Wahrscheinlich ist die für diese chimären Toxine gewählte Kombination von Toxin und Ligand zur Ausbildung aktiver chimärer Toxine durch sterische Effekte nicht geeignet.

Um die Verbesserung der Toxinaufnahme durch den Adapter in den chimären Toxinen weiter zu charakterisieren, wurden innerhalb des Adapters sechs unterschiedliche Membrantransferpeptide verwendet, für die eine Vermittlung der Wirkstoffaufnahme beschrieben wurde. Für diese Analysen wurden chimäre Toxine mit *epidermal growth factor* als Ligand verwendet. Die Einführung der unterschiedlichen Membrantransferpeptide in die chimären Toxine ergab in Cytotoxizitätsassays und Bindungsstudien keine erhöhte Aufnahme, jedoch konnte für einen Teil der Sequenzen eine gesteigerte

unspezifische Bindung an Zellen beschrieben werden, weshalb sie sich für die Verwendung in tumorspezifischen Wirkstoffen nicht eignen.

Mit dem Ziel, die Wirksamkeit der chimären Toxine zu verbessern, wurde die Steigerung der Cytotoxizität durch Kombination mit pflanzlichen steroidalen oder triterpenoidalen Glycosiden, sogenannten Saponinen, charakterisiert. Alle sieben verwendeten Saponine konnten in einem synergistischen Prozess die Cytotoxizität erhöhen, jedoch konnten nur Quillajasaponin und Saponinum album die Wirkung mehr als 10fach steigern. Saponinum album erhöhte die Cytotoxizität sogar 13 600fach. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente erwies sich nur Saponinum album als sehr geeignet, gezielt die Ligand abhängige und damit spezifische Cytotoxizität zu erhöhen, während die Ligand unabhängige, unspezifische Cytotoxizität nur wenig beeinflusst wurde. Damit bietet sich Saponinum album als Zusatz für spezifische Tumorwirkstoffe in Maus-Tumormodellen an. Durch die Kombination von Saponinen und spezifischen Wirkstoffen kann das therapeutische Fenster erweitert werden und damit die tumorspezifische Wirkung gesteigert und Nebenwirkungen gesenkt werden.

6 Summary

Mutation-based, uncontrolled growth of cells leads to cancer. Several innovative new treatments have been developed in the recent years to improve conventional cancer treatments. These biological treatments are based on the use of antibodies or growth factors for specific binding to over-expressed tumor-specific structures on the cell surface. Treatment with antibodies in cancer therapies is promising, but the development of new drugs is ongoing. By conjugating antibodies or growth factors to toxic substances, immunotoxins or chimeric toxins have been developed. These conjugates are able to bind specifically to tumor cells and the resulting uptake of the toxin causes cell death. Thus, immunotoxins or chimeric toxins can be designed to treat specific cancer types as well as reducing side effects on healthy cells.

In the present study chimeric toxins with a molecular adapter linking the toxin and the ligand were generated and characterized. The adapter has been developed to reduce side effects and to improve the uptake of the toxins into cells. A new colorimetric solid phase assay has been established to determine the enzymatic activity of chimeric toxins composed of diphtheria toxin or *pseudomonas* exotoxin. This colorimetric solid phase assay permits quantitative examinations *in vitro* and its enhanced sensitivity enables it for use in diagnostics.

The analyses of three chimeric toxins composed of diphtheria toxin A-chain and ligands for interleukin-2 receptor showed the enzymatic activity of diphtheria toxin but failed to elicit cytotoxicity. The combination of diphtheria toxin A-chain with the ligands probably produced a sterical effect that prevents the ligand binding to interleukin-2 receptor expressing cells.

Six different membrane transfer peptides within the adapter of chimeric toxins targeting the epidermal growth factor receptor were used to characterize the adapter-mediated improvement of toxin uptake into cells. The investigations of the chimeric toxins in cytotoxicity assays and binding studies revealed no increased uptake of the toxins into cells regardless of the membrane transfer peptide used. However, some of the sequences showed higher nonspecific binding to cells. This result demonstrates that these sequences are not suitable for use in tumor-specific drugs.

To further enhance the efficacy of chimeric toxins the combination with saponins, plant steroidal or triterpenoidal glycosides, was characterized. All seven analysed saponins caused higher cytotoxicity in a synergistic process, but only Quillajasaponin and Saponinum album elicited a more than 10-fold enhancing effect on cytotoxicity. Saponinum album even caused a 13 600-fold higher cytotoxicity of the chimeric toxin.

Furthermore, its enhancement of cytotoxicity is dependent on receptor-ligand interactions. Saponinum album is thus a suitable additive for tumor therapies with specific drugs in mouse tumor models.

The combination of saponins and tumor-specific compounds increases the prospect for therapeutic treatments, as tumor-specific compounds will have increased cytotoxicity and fewer side effects.

8 Anhang

Tab. 8.1: Primärsequenzen der verwendeten CSP1, ESP1 und ESP2.

Name	Aminosäuresequenz	Beschreibung
CSP1	YVHDEVDRGP	Erkennungssequenzen der Caspase 1 (YVHD), der Caspasen 3 und 7 (DEVVD) und einer cytosolischen Hefeprotease (RGP)
ESP1	RHRQPRGNRVRRS	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin Furinschnittstelle (RHRQPR) und DT Furinschnittstelle (GNRVRRS)
ESP2	RHRQPRGNRVGRS	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin Furinschnittstelle (RHRQPR) und modifizierte DT Furinschnittstelle (GNRVGRS), Unterschied zur ESP1 ist fett hervorgehoben

Tab. 8.2: Primärsequenzen der verwendeten MTPs mit Angabe des Ursprunges.

MTP	Aminosäuresequenz	Ursprung
DT Translokationsdomäne	Aminosäuren 201–384 von DT	Natürliche Translokationsdomäne von DT
HA2	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG	Hämagglutinin Untereinheit HA-2 aus Influenzavirus [156]
HA2(4E)	GLFEAIAGFIENGWEGMIDGWYG	Hämagglutinin Untereinheit HA-2 aus Influenzavirus [156]
MTS	AAVLLPVLLAAP	Humaner Kaposi Fibroblasten Wachstumsfaktor [165]
SynB1	RGGRLSYSRRRFSTTSTGR	Modifikation eines Peptides aus Protegrin-1 [167]
TLM	PLSSIFSRIGDP	Hepatitis Virus B Oberflächen Antigen [150]

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten (in Fachzeitschriften)

M. Sutherland, I. Heisler, H. Dürkop, **C. Bachran**, H. Fuchs.

A cleavable molecular adapter reduces side effects and concomitantly enhances efficacy in tumor treatment by targeted toxins in mice.

(submitted)

C. Bachran, M. Sutherland, I. Heisler, P. Hebestreit, M. F. Melzig, H. Fuchs.

The saponin-mediated enhanced uptake of targeted saporin-based drugs is strongly dependent on the saponin's structure.

Exp. Biol. Med. (Maywood) **231**(4):412-20 (2006)

P. Hebestreit, **C. Bachran**, H. Fuchs, M. F. Melzig.

Enhancement of cytotoxicity of lectins by Saponinum album.

Toxicon **47**(3):330-5 (2006)

C. Bachran, I. Heisler, H. Fuchs, M. Sutherland

Influence of protein transduction domains on target-specific chimeric proteins.

Biochem Biophys Res Commun **337**(2):602–609 (2005)

I. Heisler, M. Sutherland, **C. Bachran**, P. Hebestreit, A. Schnitger, M. F. Melzig, H. Fuchs.

Combined application of saponin and chimeric toxins drastically enhances the targeted cytotoxicity on tumor cells.

J. Control. Release **106**(1–2):123–137 (2005)

Patente

H. Fuchs, M. Sutherland, **C. Bachran**.

Verfahren zum Nachweis der Aktivität bakterieller ADP-ribosylierender Enzyme.

Patentanmeldung Nr. FB15664

H. Fuchs, M. Sutherland, **C. Bachran**, I. Heisler, M. F. Melzig, P. Hebestreit.

Kombinierte Verabreichung eines zielzellspezifischen Ligand tragenden Wirkstoffes und eines Saponins.

Patentanmeldung Nr. PCT/EP2005/007557

Übersichtsartikel in Büchern und Fachzeitschriften

H. Fuchs, **C. Bachran**, I. Heisler, M. Sutherland.

A closer look at protein transduction domains as a tool in drug delivery.

Current Nanoscience **1**(2):117–124 (2005)

M. Sutherland, **C. Bachran**, I. Heisler, H. Fuchs.

Techniques for the analyses of immunotoxin activity.

In: *Recent research developments in analytical biochemistry* **3**:1–20. Transworld Research Network, Kerala, India (2003)

Veröffentlichungen in Buchform

C. Bachran.

Optimierung und funktionelle Charakterisierung neuartiger Immunoadaptertoxine mit verschiedenen tumorspezifischen Liganden.

Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie, Freie Universität Berlin, Berlin 2002

Vorträge (Vortragender unterstrichen)

I. Heisler, J. Ervens, **C. Bachran**, A. Schnitger, M. Sutherland, H. Fuchs.

Cleavable adapter-containing immunotoxins targeted against squamous carcinoma cells exhibit increased cytotoxicity compared to conventional immunotoxins.

The Midnight Sun Meeting on Drug Transport and Drug Delivery, 01.–03.07.2004, Tromsø, Norwegen

03.07.2004

H. Fuchs, **C. Bachran**, M. Sutherland.

Variable Peptide Linkers Control the Efficiency of Recombinant Immunotoxins

Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, Aachen

11.07.2003

Abstracts (in Fachzeitschriften)

C. Bachran, I. Heisler, R. Tauber, M. F. Melzig, H. Fuchs, M. Sutherland.

Enhancement of specific drug uptake by different saponins.

Clin. Chem. Lab. Med. **43**:A51 A043 (2005)

M. Sutherland, **C. Bachran**, I. Heisler, R. Tauber, H. Fuchs.
An assay for the detection of active diphtheria toxin from *C. diphtheriae* infection.
Clin. Chem. Lab. Med. **43**:A51 A044 (2005)

C. Bachran, A. Schnitger, R. Tauber, H. Fuchs, M. Sutherland.
Validation of tumor-specific ligands in immunotoxins targeting the transferrin receptor.
Clin. Chem. Lab. Med. **42**:A146 I04 (2004)

M. Sutherland, **C. Bachran**, R. Tauber, I. Heisler, H. Fuchs.
Protein transduction domain function in immunotoxins.
Clin. Chem. Lab. Med. **42**:A147 I05 (2004)

Abstracts (in Tagungsbänden)

C. Bachran, M. Sutherland, I. Heisler, H. Fuchs.
Applying antibodies in chimeric toxins against tumors.
In: *The 2nd Glycan Forum in Berlin* (Charité, BioTOP Berlin Brandenburg, Hrsg.), Seite 81, Berlin 2005.

M. Sutherland, **C. Bachran**, H. Fuchs.
Protein transduction domain affects targeted-specific binding of immunotoxins.
In: *Biophysics of Membrane-Permeabilising and Membrane-Translocating Peptides* (FMP, Forschungsverbund Berlin e.V., Hrsg.), Seite 35, Berlin 2005.

C. Bachran, I. Heisler, A. Schnitger, H. Fuchs, M. Sutherland.
Efficacy of immunotoxins is influenced by the combination of tumor-specific ligand and protein transduction domain.
In: *The Midnight Sun Meeting on Drug Transport and Drug Delivery* (University of Tromsø, Hrsg.), Seite 30, Tromsø, Norwegen 2004.

I. Heisler, J. Ervens, **C. Bachran**, A. Schnitger, M. Sutherland, H. Fuchs.
Cleavable adapter-containing immunotoxins targeted against squamous carcinoma cells exhibit increased cytotoxicity compared to conventional immunotoxins.
In: *The Midnight Sun Meeting on Drug Transport and Drug Delivery* (University of Tromsø, Hrsg.), Seite 27, Tromsø, Norwegen 2004.

C. Bachran, I. Heisler, H. Fuchs, M. Sutherland.
Protein transduction domain and ligand influences immunotoxin uptake and internalisation.
In: *Targets, drugs and carriers: Novel therapeutic approaches*, Berlin 2004.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Bachran
Vorname: Christopher Holger
Anschrift: Londoner Str. 56
13349 Berlin
Geburtsdatum: 30.09.1976
Geburtsort: Berlin
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulische Ausbildung:

Aug. 1983 – Juni 1989 Till-Eulenspiegel-Grundschule
Aug. 1989 – Mai 1996 Friedrich-Engels-Gymnasium

Berufspraxis:

Jul. 1996 – Aug. 1997 Zivildienst in den Mosaik-Werkstätten für Behinderte gGmbH
Okt. 1997 – Aug. 2002 Biochemiestudium an der Freien Universität Berlin
Jan. 2000 Vordiplom Biochemie (Gesamtnote gut)
Sept. 2001 Bachelor Biochemie (Gesamtnote B (1,8))
Aug. 2002 Diplom Biochemie (Gesamtnote sehr gut)
Sept. 2002 – jetzt wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité — Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin

Danksagung

Herrn PD Dr. Hendrik Fuchs danke ich sehr für die Begutachtung der Arbeit und Herrn Prof. Melzig danke ich für die sehr freundliche und schnelle Übernahme des Koreferates.

Mein besonderer Dank gilt Hendrik für seine außerordentliche Hilfe bei allen Diskussionen, logischen Problemen und allem rund um den Computer. Jede Anregung zu Überholverbotsen auf der rechten Spur bis zur Suche nach dem kleinsten Säugetier der Welt war stets willkommen. Ohne Hendriks unermühtlichen Einsatz beim Beantragen von Drittmitteln hätte ich meine Doktorarbeit sicher auch nicht so sorgenfrei erlebt.

Bei Iring Heisler und Jutta Keller möchte ich mich für die vielen Vorarbeiten zu meinem Projekt bedanken. Auf Juttas Konstrukten basiert fast alles und ihre hervorragende Doktorarbeit dient als allgemeines Nachschlagewerk. Iring hat die einzig wahren Konstrukte zusammengebastelt. Bei Katrin Dassler und Matthias Kaup möchte ich mich für die tolle gemeinsame Zeit im Labor bedanken, es war immer lustig mit Euch. Ein Dankeschön auch an Martin Zydek und Krzysztof Wandzik für die gemeinsame Zeit im Labor. Dann möchte ich noch meinen Schäfchen danken, die mir so geduldig zugehört haben und auch so manche Arbeit abgenommen haben: Anne Nehring, Anna Schnitger, die BFK(FKK)-Schäfchen, Cathleen Fenner, Mehmedi Burhan, Patricia Fasold, Kristin Bick und Gottfried Drywa.

Mein großer Dank gilt insbesondere Dr. Mark Sutherland. Ohne Dich hätte ich in den letzten drei Jahren nicht einmal halb so viel Spaß an der Forschung gehabt. Gutes wissenschaftliches Arbeiten habe ich vor allem von Dir gelernt. Thanks, Master.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen aktiven und ehemaligen Mitarbeitern der Cadherine und Selektine für ihre freundliche Unterstützung bei anfallenden Problemen und für die tolle Atmosphäre im Labor und die willkommene Ablenkung nach der Arbeit durch das Fußball-Team.

Meinen emsigen Korrektoren Silke, Sebastian, Martin, Diana, Karsten, Daniel und Papa möchte ich auch vielmals danken. Ihr habt ja noch genügend Fehler herausgefischt. Und Sebastian, Dir danke ich, dass ich nicht so oft alleine ins Labor oder nach Hause fahren musste. Mama und Papa, vielen Dank, dass Ihr mir immer den Rücken freigehalten habt, ich immer einen angenehmen Rückenwind verspürt habe und niemals Steine im Weg hatte. Und Silke, Du hast am meisten auf mich verzichten müssen und dafür gebührt Dir das größte Dankeschön:

Danke