

**Funktion basischer Aminosäuren für die
synergistische Zytotoxizität von
Ribosomen-inaktivierenden Proteinen und
Triterpensaponinen**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

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

vorgelegt von

Louisa Schlaak

2023

Die vorliegende Arbeit wurde vom 15.11.2019 bis 24.11.2023 unter der Leitung von PD Dr. Alexander Weng am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Alexander Weng

2. Gutachter: Prof. Dr. Timo Niedermeyer

Datum der Disputation: 28.02.2024

Selbstständigkeitserklärung

Hierdurch versichere ich, dass ich meine Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Geistiges Eigentum anderer Autoren wurde als entsprechend gekennzeichnet. Ebenso versichere ich, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form an keiner anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Berlin, den 24.11.2023

Louisa Schlaak

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIP)	1
1.2 Der Triterpensaponin-vermittelte <i>endosomal escape</i>	3
1.3 Triterpensaponine.....	5
1.4 Zielsetzung	7
2 Material und Methoden.....	8
2.1 Bakterienstämme.....	8
2.2 Chemikalien, Medien und Puffer	8
2.3 Geräte	12
2.4 Software	15
2.5 Verbrauchsmaterial	15
2.6 Zelllinien	17
2.7 Methoden.....	18
2.7.1 Isolierung von Sapovaccarin-S1 und -S2.....	18
2.7.1.1 Samenmaterial.....	18
2.7.1.2 Extraktion der Samen und Proteinisolierung	18
2.7.2 Molekularbiologische Methoden	19
2.7.2.1 DNA-Sequenzierung der DNA aus den Samen der <i>Gypsophila vaccaria</i> (L.) Sm. ..	19
2.7.2.2 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	20
2.7.2.3 Plasmidpräparation und Sequenzierung.....	20
2.7.2.4 Restriktionsverdau.....	21
2.7.2.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	22
2.7.2.6 Zielgerichtete Mutagenese	22
2.7.2.7 Proteinexpression	23
2.7.2.8 Zellaufschluss und Extraktion der Proteine	24
2.7.2.9 Proteinaufreinigung mit dem Amicon® Pro Affinitätskonzentrationskit	25

2.7.2.10	Proteinaufreinigung <i>via</i> Ni-NTA und Kationenaustauschchromatographie	25
2.7.3	Proteinchemische Methoden	26
2.7.3.1	Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninsäure-Assay	26
2.7.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford	27
2.7.3.3	Pufferwechsel und Konzentrierung von Proteinlösungen.....	27
2.7.3.4	Proteinmarkierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff CF®568	27
2.7.4	Proteincharakterisierung	29
2.7.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.7.4.2	Bestimmung der Adeninfreisetzung (<i>adenine-releasing assay</i>)	29
2.7.4.3	Dynamische Differenzkalorimetrie	30
2.7.5	Massenspektrometrische Methoden	30
2.7.5.1	In-Gel-Verdau	30
2.7.5.2	MALDI-TOF-MS.....	31
2.7.5.3	LC-ESI-MS/MS	32
2.7.5.4	Native MS	33
2.7.6	Zellbiologische Methoden.....	33
2.7.6.1	Kultivierung und Aussaat der Zellen	33
2.7.6.2	Screening der ^{His} Dianthin-Mutanten auf zytotoxische Aktivität.....	34
2.7.6.3	Untersuchung der Zytotoxizität verschiedener Proteinproben.....	35
2.7.6.4	MTT-Assay	35
2.7.6.5	Fluoreszenzaufnahmen von ^{His} Dianthin-CF568 und ^{His} Dianthin Arg24Ala-CF568 ..	36
2.7.6.6	Endozytose-Assay	36
2.7.7	Statistische Methoden	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Isolierung und Sequenzierung von Sapovaccarin-S1 und -S2	38
3.1.1	Proteinisolierung aus den Samen der <i>Gypsophila vaccaria</i> (L.) Sm.	38
3.1.2	MALDI-TOF-MS-Analyse des In-Gel-Verdaus mit Trypsin	40
3.1.3	Sequenzierung von Sapovaccarin-S1 und -S2 mittels PCR.....	41
3.1.4	Differenzierung zwischen Sapovaccarin-S1 und -S2.....	42

3.1.5	Vervollständigung der kompletten Sequenz von Sapovaccarin-S1 und -S2.....	44
3.1.6	Homologiemodell von Sapovaccarin-S1.....	45
3.1.7	Enzymatische Charakterisierung von Sapovaccarin-S1 und -S2.....	47
3.1.8	Thermostabilität von Sapovaccarin-S1 und -S2.....	48
3.1.9	Proteinexpression und Aufreinigung von ^{His} Sapovaccarin-S1.....	49
3.1.10	Enzymatische und zytotoxische Charakterisierung von ^{His} Sapovaccarin-S1.....	51
3.2	Untersuchung der Beteiligung basischer Aminosäuren an der Interaktion zwischen ^{His} Dianthin und SO1861.....	52
3.2.1	Proteinexpression und Aufreinigung von ^{His} Dianthin.....	52
3.2.2	Massenspektrometrische Analyse von ^{His} Dianthin.....	53
3.2.3	Bestätigung der Bindung von SO1861 an ^{His} Dianthin mittels nativer MS.....	55
3.2.4	Auswahl der basischen Aminosäuren.....	57
3.2.5	Einfügen der Mutationen im ^{His} Dianthin-Vektor.....	58
3.2.6	Proteinexpression und Aufreinigung der ^{His} Dianthin-Mutanten.....	59
3.2.7	Bestimmung der Auswirkung der Mutationen auf die <i>N</i> -Glykosydaseaktivität.....	62
3.2.8	Screening der ^{His} Dianthin-Mutanten auf zytotoxische Aktivität in Neuro-2A-Zellen...	63
3.2.9	Vergleichende Toxizitätsuntersuchung von ^{His} Dianthin Arg24Ala in drei Zelllinien ...	65
3.2.10	Zytotoxizität von Arg24Ala im höheren Konzentrationsbereich.....	66
3.2.11	Auswirkung der Arg24Ala-Mutation auf die Proteinstabilität.....	68
3.3	Untersuchung der Endozytose von ^{His} Dianthin und ^{His} Dianthin Arg24Ala.....	69
3.3.1	Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff CF®568.....	69
3.3.2	Charakterisierung von ^{His} Dianthin-CF568 und ^{His} Dianthin Arg24Ala-CF568.....	71
3.3.3	Fluoreszenzaufnahmen von ^{His} Dianthin-CF568 und ^{His} Dianthin Arg24Ala-CF568.....	73
3.3.4	Endozytose von ^{His} Dianthin-CF568 und ^{His} Dianthin Arg24Ala-CF568.....	74
3.4	Untersuchung der Arg24Ala-Mutation an ^{His} Sapovaccarin-S1 und ^{His} Agrostin.....	76
3.4.1	Einfügen der Arg24Ala-Mutation im ^{His} Sapovaccarin-S1 und ^{His} Agrostin.....	76
3.4.2	Proteinexpression in <i>E. coli</i> und Aufreinigung der mutierten Typ I RIPs.....	78
3.4.3	Identitätsbestimmung von ^{His} Agrostin Arg23Ala und ^{His} Sapovaccarin-S1 Arg24Ala...	78
3.4.4	<i>N</i> -Glykosydaseaktivität von ^{His} Sapovaccarin-S1 Arg24Ala und ^{His} Agrostin Arg23Ala	81

3.4.5	Zytotoxizität von ^{His} Agrostin Arg23Ala und ^{His} Sapovaccarin-S1 Arg24Ala.....	82
4	Diskussion	84
4.1	Isolierung, Sequenzierung und Proteinexpression von Typ I RIPs aus der <i>Gypsophila vaccaria</i> (L.) Sm.	84
4.1.1	Proteincharakterisierung des isolierten Sapovaccarin-S1 und -S2.....	84
4.1.2	Proteincharakterisierung des rekombinant hergestellten ^{His} Sapovaccarin-S1	86
4.2	Beteiligung basischer Aminosäuren an der zytotoxizitätssteigernden Interaktion zwischen Typ I RIPs und Triterpensaponinen	87
4.2.1	Untersuchungen am Beispiel von ^{His} Dianthin und SO1861	87
4.2.2	Massenspektrometrische Analyse von ^{His} Dianthin.....	88
4.2.3	Die Bindung von SO1861 an ^{His} Dianthin.....	89
4.2.4	Auswahl geeigneter, basischer Aminosäuren	91
4.2.5	Herstellung der ^{His} Dianthin-Mutanten.....	93
4.2.6	Enzymatische Charakterisierung der ^{His} Dianthin-Mutanten	94
4.2.7	Zytotoxische Charakterisierung der ^{His} Dianthin-Mutanten.....	95
4.3	Erweiterte Untersuchungen zur Zytotoxizität und Stabilität von ^{His} Dianthin Arg24Ala	96
4.4	Einfluss der Arg24Ala-Mutation auf die Endozytose von ^{His} Dianthin	99
4.4.1	^{His} Dianthin-CF568 und ^{His} Dianthin Arg24Ala-CF568	99
4.4.2	Endozytose von ^{His} Dianthin-CF568 und ^{His} Dianthin Arg24Ala-CF568.....	100
4.5	Validierung der Funktion von Arg24 an anderen Typ I RIPs.....	101
5	Zusammenfassung.....	106
6	Summary.....	108
7	Literaturverzeichnis.....	109
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	119
9	Anhang	123
10	Publikationsverzeichnis	136
11	Danksagung	137

Abkürzungsverzeichnis

A30	Oligonukleotid Adenin-30
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ArnA	Bifunktionelles Polymyxinresistenzprotein
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cirkulardichroismus-Spektroskopie
Crp	<i>DNA-binding transcriptional dual regulator protein</i> (DNA-bindendes Regulatorprotein)
1,5-DAN	1,5-Diaminonaphthalen
DC	Dünnschichtchromatographie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung)
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i> (dynamische Differenzkalorimetrie)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (fetales Kälberserum)
FSC	<i>Forward scatter</i>
GlmS	Glutamin-Fructose-6-Phosphataminotransferase
HCCA	α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure
^{His} Agrostin	Agrostin, mit einem 8-fach His-Tag
^{His} Dianthin	Dianthin-30, mit einem 6-fach His-Tag
^{His} Sapovaccarin-S1	Sapovaccarin-S1, mit einem 6-fach His-Tag
His-Tag	Polyhistidin-Tag
IEP	Isoelektrischer Punkt
ISD	<i>In-source decay</i>
LC-ESI-MS/MS	<i>Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry</i> (Flüssigchromatographie-Elektrosprayionisation-Tandem-Massenspektrometrie)
LP_ProMix	Positiver Linear-Modus

MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry</i> (Matrix-unterstützte Laserdesorption/-ionisation Flugzeitanalyse-Massenspektrometrie)
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (Messenger-Ribonukleinsäure)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
M/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
NEAA	Nicht-essenzielle Aminosäuren
Ni-NTA	Nickelgeladenes Affinitätsharz
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
RIP	Ribosomen-inaktivierendes Protein
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i> (Wurzel der mittleren Abweichungsquadrate)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RP_PepMix	Postiver Reflekttron-Modus
rRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i> (ribosomale Ribonukleinsäure)
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient)
SA	Sinapinsäure
SDM	<i>Side-directed mutagenesis</i> (zielgerichtete Mutagenese)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
+ SO1861	Zytotoxizität unter Zugabe von 1 µg/ml SO1861
– SO1861	Zytotoxizität ohne Zugabe von SO1861
SPR	<i>Surface plasmon resonance spectroscopy</i> (Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie)
SSC	<i>Side scatter</i>
Ta	Annealing-Temperatur
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>Transfer ribonucleic acid</i> (Transfer-Ribonukleinsäure)

1 Einleitung

1.1 Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIP)

RIPs sind Enzyme, die eine sie charakterisierende *N*-Glykosidaseaktivität ausüben (Endo & Tsurugi, 1987). Sie kommen hauptsächlich in Pflanzen, daneben aber auch in Algen, Bakterien und Pilzen vor (Girbes *et al.*, 2004; Stirpe, 2013). Pflanzliche RIPs sind für mehr als 100 Arten in 24 Familien beschrieben. Besonders präsent sind sie in den Familien Caryophyllaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae und Fabaceae (Schrot *et al.*, 2015). Viele RIPs sind dabei gleichzeitig mit mehreren Isoformen in einer Art vertreten (Bolognesi *et al.*, 2016). RIPs werden nach ihrem Aufbau hauptsächlich in zwei Typen eingeteilt: Typ II RIPs (ca. 60 kDa) bestehen aus zwei Polypeptiden, einer A- und einer B-Kette, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die A-Kette ist das enzymatisch aktive Polypeptid. Die B-Kette bindet lektinartig an *N*-Acetylgalactosamin- oder Galactosereste auf der Zelloberfläche (Olsnes & Pihl, 1973). Typ I RIPs (ca. 30 kDa) sind aus einem Polypeptid aufgebaut, das äquivalent zur A-Kette der Typ II RIPs die *N*-Glykosidaseaktivität ausübt. Ihnen fehlt die zellbindende B-Kette (Barbieri *et al.*, 1993). Gemeinsam haben Typ I und Typ II RIPs die ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA) *N*-Glykosidaseaktivität (EC 3.2.2.22), die auf der Abspaltung eines spezifischen Adeninrestes (A4323, Ribosomen der Ratte) der 28S-Untereinheit der rRNA beruht und das Erliegen der Proteinsynthese sowie den Zelltod zur Folge hat (Endo & Tsurugi, 1987). Die Adeninfreisetzung erfolgt auch aus verschiedensten Polynuklotidsubstraten wie Desoxyribonukleinsäure (DNA), poly(A), *messenger* RNA (mRNA), Transfer-RNA (tRNA) und bakterieller rRNA (Barbieri *et al.*, 1994; Barbieri *et al.*, 1997). Weitere Enzymaktivitäten wie die DNase- und RNase-Aktivität wurden ebenfalls RIPs zugeordnet (Mock *et al.*, 1996; Nicolas *et al.*, 1997; Roncuzzi & Gasperi-Campani, 1996). Diese bleiben jedoch kontrovers umstritten, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Aktivitäten durch Nukleaseverunreinigungen verursacht wurden (Valbonesi *et al.*, 1999).

Typ I und Typ II RIPs unterscheiden sich in ihrem Aufnahmemechanismus in die Zelle, der maßgebend für das Ausmaß der Zytotoxizität ist. Ricin, ein Typ II RIP isoliert aus dem *Ricinus communis* L., wird durch die lektinartige Bindung der B-Kette rezeptorvermittelt endozytiert und gelangt *via* retrograden Transport vom Golgi-Apparat zu dem endoplasmatischen Retikulum. Nach hydrolytischer Trennung der beiden Ketten wird die A-Kette ins Zytosol translokalisiert (Rapak *et al.*, 1997; Sandvig *et al.*, 2002). Dieser Schritt ist Voraussetzung für die Ausübung der *N*-Glykosidaseaktivität. Eine Ricin A-Kette kann so einige Tausend Ribosomen pro Minute inaktivieren (Sandvig & van Deurs, 1996). Die Aufnahmemechanismen der Typ I RIPs wurden bisher weniger untersucht (Bolognesi *et al.*, 2016). Es wurden in Abhängigkeit der Zelllinie verschiedene Endozytosemechanismen für unterschiedliche RIPs beschrieben, z. B. Pinozytose für Gelonin, aus *Gelonium multiflorum* A. Juss., und LDL-rezeptorvermittelte Endozytose für Saporin-S6, aus *Saponaria officinalis* L. (Cavallaro *et al.*,

1995; Goldmacher *et al.*, 1986). Nach Aufnahme in intrazelluläre Vesikel akkumulieren Typ I RIPs in den späten Endosomen und Lysosomen und werden dort abgebaut (Gilbert-Oriol *et al.*, 2017; Gilbert-Oriol *et al.*, 2015). Typ I RIPs können somit nicht bzw. nur in ganz geringen Mengen das Zytosol erreichen und wirken dementsprechend nicht zytotoxisch.

Die Funktionen, die RIPs in der Pflanze erfüllen, sind nicht vollständig geklärt. Sie dienen vor allem dem Schutz der Pflanze vor Pathogenen und Prädatoren. Antibakterielle, antifungale, antivirale sowie insektizide Eigenschaften konnten den RIPs zugeordnet werden (Girbes *et al.*, 2004; Nielsen & Boston, 2001). Des Weiteren scheinen RIPs bei Stress und bei der Seneszenz der Pflanze beteiligt zu sein (Stirpe *et al.*, 1996). Vielversprechend ist die Anwendung der RIPs in der zielgerichteten Tumorthherapie. Gekoppelt an einen zellbindenden Antikörper, sogenannte Immunotoxine, erreichen die RIPs zielgerichtet die Zelle. Über 500 Immunotoxine wurden in den letzten Jahren in der Tumorthherapie erforscht. Kein Kandidat wurde durch eine Arzneimittelbehörde zugelassen (Flavell & Flavell, 2022; Fuchs *et al.*, 2016). Trotz ihrer Zellspezifität und ihrer hohen Toxizität weisen sie eine Schwachstelle auf: Um ihre Ribosomen-inaktivierende Wirkung ausüben zu können, müssen Immunotoxine nach der Endozytose aus den Endosomen bzw. Lysosomen ins Zytosol freigesetzt werden. Dies passiert wie oben für Typ I RIPs beschrieben nur in sehr geringem Ausmaß. Der Großteil wird lysosomal abgebaut (Olsnes *et al.*, 1989; Ravel *et al.*, 1992). Sehr hohe Dosen an Immunotoxin müssten appliziert werden, um eine zytotoxische Wirkung zu entfalten. Hohe Dosen gehen jedoch mit starken Nebenwirkungen wie vor allem dem *Vascular-Leak*-Syndrom einher (Baluna & Vitetta, 1997).

Tabelle 1. Typ I und Typ II RIPs, deren Proteinsequenzen im Rahmen dieser Arbeit Verwendung finden.

RIP	Pflanze	Pflanzenteil	Proteinsequenz
Typ I RIPs			
Agrostin	<i>Agrostemma githago</i> L., Caryophyllaceae	Samen	(Weise <i>et al.</i> , 2020)
Dianthin-30	<i>Dianthus caryophyllus</i> L., Caryophyllaceae	Samen	(Legname <i>et al.</i> , 1991)
Gypsophilin-S	<i>Gypsophila paniculata</i> L., Caryophyllaceae	Samen	(Kokorin <i>et al.</i> , 2019)
Saporin-S6	<i>Saponaria officinalis</i> L., Caryophyllaceae	Samen	(Maras <i>et al.</i> , 1990)
Sapovaccarin-S1 und -S2	<i>Gypsophila vaccaria</i> (L.) Sm., Caryophyllaceae	Samen	(Schlaak <i>et al.</i> , 2022)
Typ II RIPs			
Ebulin A-Kette	<i>Sambucus ebulus</i> L., Caprifoliaceae	Blatt	(Pascal <i>et al.</i> , 2001)
Ricin A-Kette	<i>Ricinus communis</i> L., Euphorbiaceae	Samen	(Halling <i>et al.</i> , 1985)

1.2 Der Triterpensaponin-vermittelte *endosomal escape*

Das kombinierte Auftreten von Saponinen und RIPs ist ein Phänomen der Natur, das vermutlich der Verteidigung der Pflanzen dient (Francis *et al.*, 2002; Thakur *et al.*, 2013). Auch in der Pflanzenfamilie der Caryophyllaceae, in der Typ I RIPs besonders häufig auftreten, sind unter anderem Triterpensaponine im Inhaltsspektrum präsent. 2003 wurde das erste Mal von Hebestreit & Melzig beschrieben, dass Agrostemmasaponine die Zytotoxizität von Agrostin, ein Typ I RIP aus *Agrostemma githago* L., synergistisch steigern (Hebestreit & Melzig, 2003). Auch die Zytotoxizität von weiteren Typ I RIPs wie Dianthin-30, Saporin-S6 und Gypsophilin-S ließ sich synergistisch durch Triterpensaponine verstärken (Gilbert-Oriol *et al.*, 2015; Holmes *et al.*, 2015; Kokorin *et al.*, 2019). Anfangs wurden Saponingemische wie das Saponinum album, gewonnen aus der *Gypsophila arrostii* GUSS. und *Gypsophila paniculata* L. (Caryophyllaceae), verwendet (Hebestreit *et al.*, 2006). Inzwischen wurden spezifische Triterpensaponine wie SA1641, SA1657 (beide isoliert aus Saponinum album) und SO1861 (isoliert aus den Wurzeln der *Saponaria officinalis* L.) als aktiv identifiziert (Weng, Thakur, Beceren-Braun, *et al.*, 2012; Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Um zytotoxizitätsverstärkend zu sein, muss das Saponin nicht aus der gleichen Pflanze wie das Typ I RIP stammen (Melzig *et al.*, 2005). In Abhängigkeit der Zelllinie und des Triterpensaponins wurde die Zytotoxizität der Typ I RIPs um das 1100- bis über 100000-fache gesteigert (C. Bachran *et al.*, 2006; Hebestreit & Melzig, 2003; Hebestreit *et al.*, 2006; Holmes *et al.*, 2015).

In Anwesenheit der Saponine wurden erhöhte RIP-Konzentrationen im Zytosol gemessen (Weng *et al.*, 2009). Die Ursache der Zytotoxizitätssteigerung konnte schließlich mit fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen aufgezeigt werden. Die synergistische Zytotoxizität beruht auf einer Triterpensaponin-vermittelten endosomalen Freisetzung der Typ I RIPs, dem sogenannten *endosomal escape* (Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Kolokalisationsstudien mit ^{Alexa}Saporin-3 und pHrodoTM Rot Dextran, einem pH-sensitiven Farbstoff, zeigten, dass der Triterpensaponin-vermittelte *endosomal escape* der RIPs aus den späten Endosomen und Lysosomen erfolgt (Thakur *et al.*, 2013; Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Bereits zuvor wurde beschrieben, dass eine Hemmung des Transportes der RIPs von den frühen zu den späten Endosomen keine synergistische Zunahme der Zytotoxizität zur Folge hat (Weng *et al.*, 2008). Folglich werden RIPs nicht aus den frühen, sondern aus den späten Endosomen und Lysosomen freigesetzt. Der saure pH-Wert der späten Endosomen und Lysosomen spielt bei der Freisetzung eine entscheidende Rolle. In den frühen Endosomen liegt er bei ca. 6,2, in den späten bei 5,0–5,5 und in den Lysosomen beträgt der pH-Wert zwischen 4,5–5,0 (Scott & Gruenberg, 2011). Eine Anhebung des endosomalen/lysosomalen pH-Wertes mittels Chloroquin und Bafilomycin A1 bewirkte eine reduzierte synergistische Zytotoxizität (D. Bachran *et al.*, 2011). Die Anhebung des endosomalen/lysosomalen pH-Wertes wurde auch in der oben genannten Kolokalisationsstudie untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass sich ^{His}Saporin-3, die rekombinante Form von Saporin-3, wie bereits beschrieben, in den späten Endosomen und Lysosomen

anreicherte, aber der Triterpensaponin-vermittelte *endosomal escape* in Anwesenheit von Chloroquin ausblieb (Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Die Bedeutung des pH-Wertes für die Freisetzung aus den späten Endosomen und Lysosomen steht im Einklang mit den Bindungsdaten, die für SO1861, SA1641 und SA1657 und ^{His}Saporin-3, dessen isoelektrischer Punkt (IEP) bei ca. 9 liegt, generiert wurden. Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) wurde bei pH 5,0, 6,0 und 7,4 durchgeführt. Die Bindung der untersuchten Saponine an ^{His}Saporin-3 war pH-abhängig. Die stärkste Assoziation wurde bei pH 5 gemessen. Als Mechanismus wurde eine pH-induzierte Bindung des Saponins an ^{His}Saporin-3, die ein Transport durch die endosomale und lysosomale Membran folgt, vorgeschlagen (Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012).

Der Einfluss der Saponine auf die *N*-Glykosidaseaktivität von ^{His}Saporin-3 wurde in Anwesenheit von SA1641 überprüft. Die Adeninfreisetzung aus Heringsperma-DNA war mit und ohne Zugabe von SA1641 identisch. Daraus wurde geschlossen, dass SA1641 unter sauren Bedingungen die Enzymaktivität nicht beeinflusst und somit nicht im aktiven Zentrum bindet (Gilabert-Oriol *et al.*, 2016). Eine Zytotoxizität seitens der eingesetzten Saponinkonzentrationen sowie die Beeinflussung der Membranintegrität konnten ebenfalls ausgeschlossen werden. Erst bei weit höheren, als den verwendeten Konzentrationen, wurde eine Beeinträchtigung der Plasmamembran beobachtet. Am Beispiel von SA1641 betrachtet, bedeutet das, dass ein Zytotoxizitäts-steigernder Effekt bei einer Konzentration von 2,5 µg/ml auftritt. Bei Konzentrationen bis zu 10 µg/ml wurde keine Beeinträchtigung der Plasmamembran beobachtet. Hohe SA1641-Konzentrationen von 40 µg/ml führten schließlich zu einer Zunahme der Plasmapermeabilität (Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Sowohl Böttger *et al.* als auch Thakur *et al.*, die verschiedenste Saponine untersuchten, konnten bei den angewendeten Konzentrationen eine Membran-Permeabilisierung ausschließen (Böttger *et al.*, 2013; Thakur *et al.*, 2013). Auch für SO1861 wurde bestätigt, dass bei den eingesetzten Konzentrationen die Zellmembran intakt blieb (Gilabert-Oriol *et al.*, 2013).

Damit Triterpensaponine die endosomale Freisetzung der Typ I RIPs vermitteln können, müssen sowohl Triterpensaponine als auch RIPs im selben Vesikel co-lokalisiert sein. Auswaschversuche mit ³[H]Saponinum album deuteten darauf hin, dass Saponine internalisiert oder in die Zellmembran eingelagert werden (Weng, 2009). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Saponine in das gleiche endolysosomale Kompartiment wie RIPs aufgenommen werden (Holmes *et al.*, 2015; Weng, Thakur, Beceren-Braun, *et al.*, 2012). Die zelluläre Aufnahme und der intrazelluläre Transport spezifischer Saponine wurden bisher nicht intensiver charakterisiert (Wensley *et al.*, 2021).

Der postulierte Mechanismus, dass der *endosomal escape* durch eine Bindung der Saponine an die RIPs im Sauren initiiert wird, bleibt fraglich (Fuchs *et al.*, 2017). Dagegen spricht, dass für das Typ I RIP Gelonin (IEP von 9) bei vorhandener synergistischer Zytotoxizität nur eine schwache Bindung mit SO1861 und SA1641 bei pH 5 gemessen wurde. Wie oben beschrieben, lag der IEP des ^{His}Saporin-3, für das eine pH-abhängige Bindung gemessen wurde, ebenfalls bei ca. 9. Die Autoren schlossen daher

eine rein elektrostatische Wechselwirkung aus (Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Hinzukommt, dass für Triterpensaponine auch eine transfektionsverstärkende Wirkung nachgewiesen wurde. Sie verstärken somit auch den *endosomal escape* anderer Moleküle als RIPs, wie Nukleinsäuren (Clochard *et al.*, 2020; Fuchs *et al.*, 2017; Sama *et al.*, 2017; Weng *et al.*, 2015).

1.3 Triterpensaponine

Saponine sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, deren Name sich aufgrund ihrer schaumbildenden Eigenschaft vom lateinischen Begriff *sapo* (Seife) ableitet. Sie werden anhand ihres Aglykons, Sapogenin genannt, in Steroidsaponine und Triterpensaponine eingeteilt (Vincken *et al.*, 2007). Triterpensaponine kommen hauptsächlich in den Eudikotyledonen vor und sind in den Pflanzenfamilien wie der Caryophyllaceae und der Fabaceae besonders häufig vertreten. Sie dienen den Pflanzen vor allem als Schutz vor Pathogenen und Herbivoren (Sparg *et al.*, 2004). Triterpensaponine sind Glykoside, die aus einem hydrophoben Aglykon (C₃₀-Grundgerüst) und einer oder mehreren kovalent gebundenen Zuckerketten, die den Saponinen ihre hydrophilen Eigenschaften verleihen, aufgebaut sind. In Abhängigkeit der Anzahl der Zuckerketten wird zwischen Mono- (eine), Bis- (zwei) und Trisdesmosiden (drei Zuckerketten) unterschieden. Die Zuckerketten können linear oder verzweigt angeordnet sein. Häufig vorkommende Zucker sind Glucose, Fucose, Xylose, Galaktose, Rhamnose und die Uronsäuren Galakturonsäure und Glucuronsäure (Vincken *et al.*, 2007).

Ihrer amphiphilen Struktur verdanken die Saponine viele ihrer Eigenschaften. Sie interagieren sowohl mit hydrophilen als auch mit lipophilen Verbindungen und sind daher oberflächen- und grenzflächenaktiv. In Wasser haben sie schaumbildende und lösungsvermittelnde Eigenschaften (Vincken *et al.*, 2007). An Membranen wirken sie ab bestimmten Konzentrationen durch Porenbildung permeabilisierend (Baumann *et al.*, 2000; Melzig *et al.*, 2001). In hohen Konzentrationen wirken sie außerdem hämolytisch (Vo *et al.*, 2017). Auch antimikrobielle, antimykotische und insektizide Eigenschaften wurden ihnen zugeschrieben (Favel *et al.*, 1994; Sparg *et al.*, 2004). Aufgrund ihrer immunstimulierenden Wirkung finden sie Anwendung als Immunadjuvantien, wie zum Beispiel die Quillaja-Saponine in dem Corona-Impfstoff Nuvaxovid® (Stertman *et al.*, 2023).

Eine *endosomal escape* verstärkende Wirkung konnte nur für spezifische Triterpensaponine nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 1 dargestellt, müssen hier bestimmte Strukturvoraussetzungen erfüllt sein (Böttger *et al.*, 2013). Melzig *et al.* identifizierten strukturelle Merkmale, die Triterpensaponine erfüllen müssen: eine Aldehydgruppe an C-4, ein verzweigtes, saures Trisaccharid an C-3 und eine saure Zuckerkette an C-28 (Ester). Für Bisdesmoside wurde ein stärkerer Effekt als für Monodesmoside nachgewiesen. Die OH-Gruppe an C-16 hat keinen Einfluss auf die Aktivität (Melzig *et al.*, 2005). Bachran *et al.* konnten diese Strukturvoraussetzungen ebenfalls bestätigen (C. Bachran *et al.*, 2006). Böttger *et al.* ergänzten die Strukturmerkmale u. a. um eine genauere Komposition der Zucker. An C-3 muss eine Glucuronsäure Teil des verzweigten Trisaccharids sein. Die Zuckerkette an

C-28 sollte verzweigt und aus min. vier Zuckern, darunter Desoxyzucker wie Fucose/Rhamnose und Acetylreste, zusammengesetzt sein. Als Grundgerüst haben sich Triterpensaponine vom Oleanan-Typ (pentazyklisch) und hier vor allem das Gypsogenin und die Quillajasäure als am effizientesten erwiesen. Die Größe der Triterpensaponine (> 1600 Da) spielt ebenfalls eine Rolle (Böttger *et al.*, 2013). Wie unter 1.2 beschrieben, wurden anfangs Saponingemische untersucht. Inzwischen wurden einige aktive Saponine aus *Saponinum album* (SA1641 und SA1657), der *Saponaria officinalis* L. (SO1861), *Agrostemma githago* L. (AG1856) sowie *Gypsophila elegans* M. Bieb. (GE1741) isoliert und deren Struktur aufgeklärt (Clochard *et al.*, 2020; Sama *et al.*, 2019; Weng, Thakur, Beceren-Braun, *et al.*, 2012; Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Für AG1856 und GE1741 wurden bisher nur Daten als Transfektionsverstärker publiziert. Erste Versuche zeigten jedoch, dass AG1856 auch den *endosomal escape* von Typ I RIPs vermittelt (Daten nicht publiziert). Wie in Abbildung 1 dargestellt, erfüllt das aus der *Saponaria officinalis* L. isolierte SO1861 alle beschriebenen strukturellen Merkmale inkl. der Glucuronsäure an C-3.

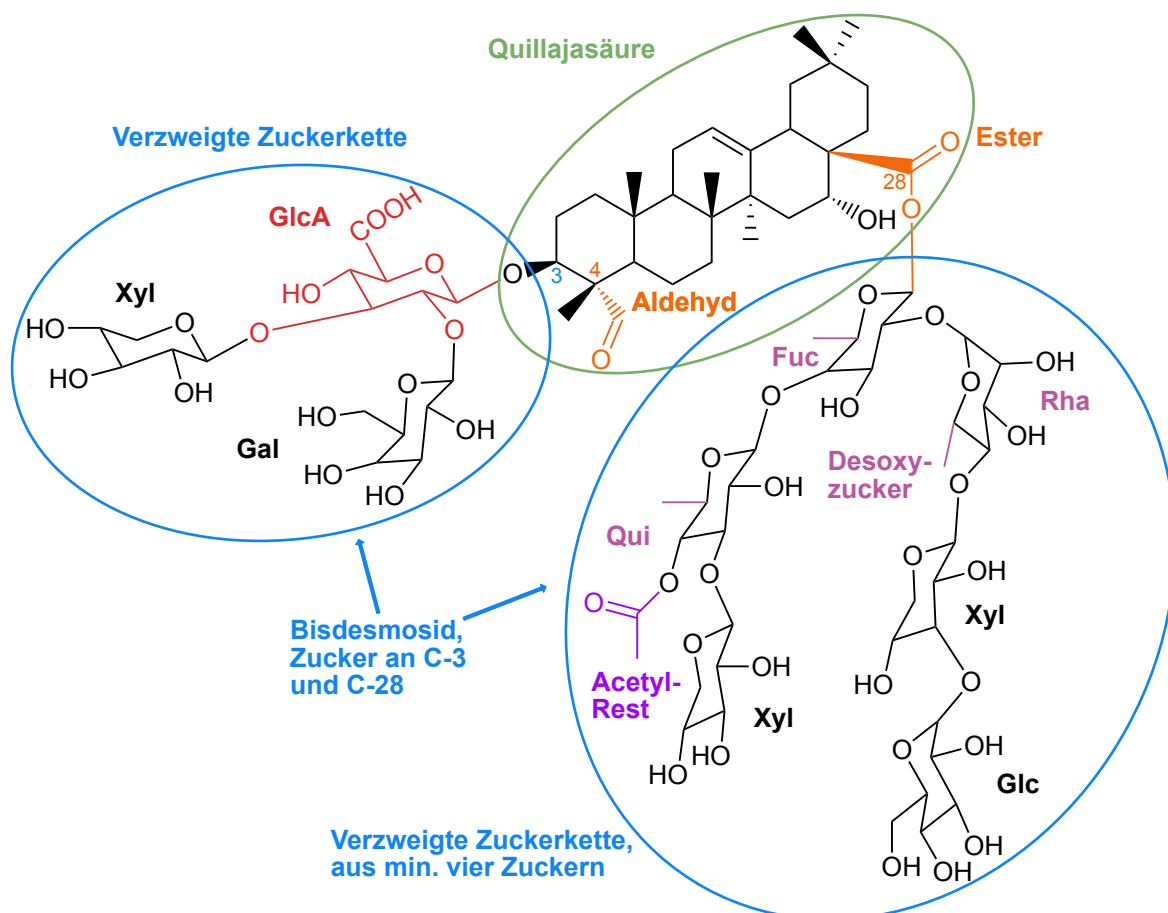


Abbildung 1. Essenzielle Strukturmerkmale, die Triterpensaponine für einen erfolgreichen *endosomal escape* von Typ I RIPs erfüllen müssen, am Beispiel von SO1861. SO1861 erfüllt alle Strukturvoraussetzungen (farbig hervorgehoben), die in der Literatur als Voraussetzung beschrieben wurden: Quillajasäure als Aglykon, Aldehyd an C-4, bisdesmosidisch (zwei verzweigte Zuckerketten), eine Glucuronsäure an C-3, Ester an C-28, Desoxyzucker und ein Acetyl-Rest (Böttger *et al.*, 2013). Neben den häufig auftretenden Zuckern Xylose (Xyl), Galaktose (Gal), Fucose (Fuc), Rhamnose (Rha) und Glucose (Glc) war auch die Quinovopyranose (Qui) vertreten.

1.4 Zielsetzung

Triterpensaponine verstärken synergistisch die Zytotoxizität von Typ I RIPs, indem sie ihre endosomale/lysosomale Freisetzung fördern. Diese erfolgt aus den späten Endosomen und Lysosomen. Der saure pH-Wert muss dabei aufrecht erhalten bleiben (Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Für die isolierten Saponine SA1641, SA1657 und SO1861 konnte eine pH-abhängige Bindung an ^{His}Saporin-3 gemessen werden. Diese war bei pH 5 am ausgeprägtesten (Weng, Thakur, Beceren-Braun, *et al.*, 2012; Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Bei entsprechendem pH-Wert liegen RIPs wie ^{His}Saporin-3 und ^{His}Dianthin (IEP ca. 9) positiv geladen vor. Die Glucuronsäure, ein essenzielles Strukturmerkmal der Saponine, ist bei diesem pH-Wert negativ geladen (Böttger *et al.*, 2013). Eine Bindung könnte durch die Interaktion der negativ geladenen Glucuronsäure und den positiv geladenen Typ I RIPs zustande kommen (Gilabert-Oriol *et al.*, 2015). Hier würden für die Interaktion vor allem die basischen Aminosäuren, die im Sauren positiv geladen sind, in Frage kommen. Der zugrunde liegende Mechanismus bleibt weiterhin ungeklärt.

In der vorliegenden Dissertation sollte die Interaktion zwischen Triterpensaponinen und Typ I RIPs durch Analyse einzelner basischer Aminosäurereste untersucht werden. Die Untersuchung sollte an mehreren Typ I RIPs stattfinden. Zunächst sollte aus der *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm. ein neues Typ I RIP isoliert, sequenziert und das sequenzierte Protein rekombinant hergestellt werden.

Die Auswirkung basischer Aminosäurereste auf die synergistische Zytotoxizität sollte anhand dem gut charakterisierten Typ I RIP Dianthin-30 analysiert werden. Basische Aminosäurereste sollten durch Änderung des entsprechenden Codons auf DNA-Ebene gegen Alanin ausgetauscht und RIP-Mutanten durch Proteinexpression hergestellt werden. Die Auswirkung der Alanin-Mutationen sollte anhand der synergistischen Zytotoxizität mit SO1861 untersucht werden. RIP-Mutanten mit veränderter synergistischer Zytotoxizität sollten einer Charakterisierung unterzogen werden. Darüber hinaus sollten die sich als signifikant erwiesenen Mutationen in zwei weiteren Typ I RIPs, dem neu sequenzierten RIP aus der *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm. und Agrostin aus *Agrostemma githago* L., betrachtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

- DH5 α , Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
- BL21(DE3)pLysS, Merck Millipore, Burlington, USA
- NiCo21(DE3), New England Biolabs, Ipswich, USA
- RosettaTM2(DE3), Merck Millipore, Burlington, USA

2.2 Chemikalien, Medien und Puffer

Die Puffer wurden, falls nicht anders angegeben, mit Milli-Q® Reinstwasser hergestellt.

Adenine-releasing assay

- Adenin A30, metabion, Planegg/Steinkirchen, Deutschland
- Ammoniak (32 %), VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland
- Kaliumchlorid (KCl), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Natriumacetat, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Puffer

- *N*-Glykosidasepuffer: 50 mM Natriumacetat und 100 mM KCl, pH 5

Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese:

- Agarose, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Essigsäure, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Ethidiumbromidlösung 0,5 %, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), FLUKA, Buchs, Schweiz
- *Gel Loading Dye, Purple (6x)*, New England Biolabs, Ipswich, USA
- 1 kb Plus DNA Leiter, New England Biolabs, Ipswich, USA
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) PUFFERAN®, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Puffer

- 50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer):
2 M Tris, 1 M CH₃COOH, 50 mM EDTA, pH 6,8

SDS-PAGE:

- 30 % Acrylamid/bis-Lösung (Verhältnis 37,5:1), SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
- Ammoniumperoxodisulfat (APS), SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
- Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Brilliant Blau G250, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Glycerin, VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland
- Glycin, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Isopropanol, VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland
- *Laemml Sample Buffer* (4x), Bio-Rad, Hercules, USA
- 2-Mercaptoethanol, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Methanol, VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland
- Natriumdodecylsulfat (SDS), VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland
- Phosphorsäure (H₃PO₄) 85 %, VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland
- Tetramethylethylendiamin (TEMED), SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
- *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Proteinmarker), Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

Puffer & Lösungen

- Elektrodenpuffer: 2,5 mM Tris, 19,2 mM Glycin, 0,1 % (m/V) SDS, pH 8,3
- Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
- Färbelösung: 1 ml 5 % (w/v) Brillant Blau G-250
40 ml Stock A (10 % (w/v) (NH₄)₂SO₄ in 2 % H₃PO₄)
10 ml Methanol

Plasmide

- pET11d^{-His}Agrostin, entspricht Agrostin mit einem 8-fach Histidin-Tag (Weise *et al.*, 2020), General Biosystems, Durham, USA
- pET11d^{-His}Dianthin, entspricht Dianthin-30 mit einem 6-fach Histidin-Tag (Gilabert-Oriol *et al.*, 2015)
- pET11d^{-His}Dianthin-Mutanten (ausgenommen Lys195Ala, Lys227Ala, Arg24Ala), BioCat, Heidelberg, Deutschland
- pET11d^{-His}Sapovaccarin-S1, entspricht Sapovaccarin-S1 mit einem 6-fach Histidin-Tag, BioCat, Heidelberg, Deutschland

Molekularbiologie

- α -Lactose, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Ampicillin Natriumsalz, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- D-Glucose, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Glycerol aus Pflanzen, SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Karlsruhe
- Imidazol, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, AppliChem, Darmstadt, Deutschland
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Merck, Darmstadt, Deutschland
- LB-Medium (Luria/Miller), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- LB-Medium mit Agar (Lennox), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Magnesiumsulfat (MgSO_4), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Natriumchlorid (NaCl), VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland
- Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), Merck, Darmstadt, Deutschland
- 2-(*N*-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES) PUFFERAN®, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- PCR-Primer (Individualsynthesen), metabion, Planegg/Steinkirchen, Deutschland
- Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs, Ipswich, USA
- Pierce™ Protease Inhibitor Mini Tablets, EDTA-free, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
- Restriktionsenzym EcoRI-HF®, New England Biolabs, Ipswich, USA
- Restriktionsenzym XbaI®, New England Biolabs, Ipswich, USA
- SOC *Outgrowth Medium*, New England Biolabs, Ipswich, USA

LB_{Amp}-Agarplatten

- 35 g/l LB-Medium mit Agar (Lennox); autoklaviert
- 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin; Stammlösung (1000-fach in H_2O), steril filtriert

LB_{Amp}-Medium

- 25 g/l LB-Medium (Luria/Miller); autoklaviert
- 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin; Stammlösung (1000-fach in H_2O), steril filtriert

Autoinduzierendes LB_{Amp}-Medium

- 25 g/l LB-Medium (Luria/Miller); autoklaviert
- 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin; Stammlösung (1000-fach in H_2O), steril filtriert
- 1 mM MgSO_4
- 5052: 500 mg/l Glycerol, 50 mg/l D-Glucose, 200 mg/l α -Lactose
- NPS: 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mM KH_2PO_4 , 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Puffer Nickel-Affinitätschromatographie (manuell)

- Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0
- Elutionspuffer:
 - 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 125 mM Imidazol, pH 8,0
 - 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

Puffer Kationenaustauschchromatographie

- Startpuffer: 50 mM MES, pH 5,6
- Elutionspuffer: 50 mM MES, 1 M NaCl, pH 5,6

RIPs

- Gypsophilin-S, isoliert aus den Samen der *Gypsophila paniculata* L. von Arsenij Kokorin (Kokorin *et al.*, 2019)
- ^{His}Agrostin, MOLOX GmbH, Berlin, Deutschland

Saponine

- SO1861, isoliert aus den Wurzeln der *Saponaria officinalis* L. von Simko Sama (Sama *et al.*, 2017)

Zellkultur

- BioWhittaker[®] DMEM ohne Glutamin (4,5 g/l D-Glucose), Lonza, Walkersville, USA
- BioWhittaker[®] DPBS (w/o Ca²⁺ und w/o Mg²⁺), Lonza, Walkersville, USA
- BioWhittaker[®] Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Glutamin (1,0 g/l D-Glucose), Lonza, Walkersville, USA
- BioWhittaker[®] Trypsin-Versene[™] Mixture, Lonza, Walkersville, USA
- BioWhittaker[®] UltraGlutamin[™] I 200 mM, Lonza, Walkersville, USA
- Fetales Kälberserum (FBS) SUPERIOR stabil[®], Bio&SELL, Feucht/Nürnberg, Deutschland
- Gibco[™] McCoy (Modifiziertes) Medium 5A, Life Technologies, Carlsbad, USA
- MEM Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA) 100x, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Sonstige Chemikalien

- Acetonitril, VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland
- Ammoniumacetat-Lösung (5 M), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Ammoniumbicarbonat (NH₄HCO₃), Fluka Analytical, Morris Plains, USA
- Asp-N Endoproteinase MS Grade, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
- α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (HCCA), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- CF[™]568 N-Hydroxysuccinimid-Ester, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

- Dimethylsulfoxid (DMSO), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Dithioerythritol, SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Karlsruhe
- Iodoacetamid, SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
- Natriumhydroxid, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- n-Hexan, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard, 2 mg/ml, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
- ROTI® Cell 10x PBS (w/o Ca²⁺ und w/o Mg²⁺, pH 7,4 ± 0,1), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Salzsäure 37 %, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Sinapinsäure (SA), TCI Europe N.V., Zwijndrecht, Belgien
- Thiazolylblau (MTT), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Trifluoressigsäure, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Triton® X 100, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Trypsin MS approved, SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
- Wasser für die Biotechnologie Nuklease-frei, steril, VWR Chemicals, Radnor, USA

2.3 Geräte

Absorptionsmessung

- Biospectrometer® basic, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- NanoDrop™ One, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

Dünnschichtchromatographie

- CAMAG® Horizontal-Entwicklungskammer, CAMAG, Berlin, Deutschland
- CAMAG® Linomat IV System, CAMAG, Berlin, Deutschland
- CAMAG® TLC Scanner 4, CAMAG, Berlin, Deutschland
- CAMAG® UV-Lampe mit Kabinett, CAMAG, Berlin, Deutschland

Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese:

- Mikrowelle, Severin Elektrogeräte GmbH, Sunden, Deutschland
- Mini-Sub® Cell GT Gel Caster, Bio-Rad, Hercules, USA
- Mini-Sub® Cell GT System, Bio-Rad, Hercules, USA
- PowerPac™ Basic Labornetzgerät, Bio-Rad, Hercules, USA

Geldokumentation:

- Biostep® UV-Transilluminator, biostep GmbH, Burkhardtsdorf, Deutschland
- Dark Hood DH-10, Biostep GmbH, Burkhardtsdorf, Deutschland
- EOS 700 D Kamera, Canon, Tokio, Japan

SDS-PAGE:

- Kühl/ThermoMixer HLC MKR 13, DITABIS AG, Pforzheim, Deutschland
- Mikroplatten-Schüttler, VWR, Darmstadt, Deutschland
- Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems, Bio-Rad, Hercules, USA
- PowerPac™ 300 Labornetzgerät, Bio-Rad, Hercules, USA

Geldokumentation:

- Epson Perfection V700 Fotoscanner, Epson, Suwa, Japan

Massenspektrometrie

- Orbitrap Q Exactive™ HF, Thermo Scientific, Rockford, USA
- Ultraflex-II TOF/TOF (MALDI), Bruker, Billerica, USA
- UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF, Bruker, Billerica, USA

Proteinexpression und –aufreinigung

- ÄKTA™ start, Cytiva, Washington D.C., USA
- Grant Instruments™ PHMT Thermoschüttler, Grant Instruments, Shepreth, Vereinigtes Königreich
- Grant™ QBT1 Thermoblock, Grant Instruments, Shepreth, Vereinigtes Königreich
- Inkubator MaxQ™ 5000, Thermo Scientific, Rockford, USA
- Laboklav ECO 80, SHP Steriltechnik, Detzel Schloss, Deutschland
- Multi-Rotator PTR 60, Grant Instruments, Shepreth, Vereinigtes Königreich
- SONOPULS™ HD 2070 Ultraschall-Homogenisator, BANDELIN electronic, Berlin, Deutschland
- Trockenschrank, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Waagen

- Analysenwaage CP2245-OCE, Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Analysenwaage XS205, Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
- Präzisionswaage Sartorius portable, Sartorius, Göttingen, Deutschland

Zellkultur

- Autoklav Varioklav, H+P Labortechnik, Hackermos, Deutschland
- CO₂-Brutschrank ICO105med, Memmert, Schwabach, Deutschland
- CytoSMART™ Lux3 FL, CytoSMART Technologies B.V., Eindhoven, Niederlande
- CytoSMART™ Omni, CytoSMART Technologies B.V., Eindhoven, Niederlande
- Durchflusszytometer CytoFLEX, Beckman Coulter, Brea, USA
- Präzisionsheizplatte PZ 28-1, Harry Gestigkeit, Düsseldorf, Deutschland
- Sicherheitswerkbank HERAsafe, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
- Tischmikroskop Nikon TMS, Nikon, Tokio, Japan
- Vakuumabsaugsystem A2 104, VWR, Darmstadt, Deutschland
- Vortex-Schüttler IKA™ Lab Dancer, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
- Wasserbad WB 14 mit Schüttelvorrichtung, Memmert, Schwabach, Deutschland
- Zählkammer nach Neubauer, Brand, Wertheim, Deutschland

Zentrifugen

- Hochgeschwindigkeitszentrifuge Avanti® J-26S XP (Rotoren: JA 25.50 & JA 10), Beckman Coulter, Brea, USA
- Kühlzentrifuge Allegra® X-30R (Rotor: SX4400), Beckman Coulter, Brea, USA
- Kühlzentrifuge Mikro 200 R (Rotor: 2424), Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
- Kühlzentrifuge ROTINA 380 R (Rotor: 1720, Einsätze: 1454 & 1466), Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
- Mini-Zentrifuge ROTILABO®, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Tischzentrifuge MIKRO 20 (Rotor: 2073), Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Sonstige Geräte

- Kolbenhubpipetten (diverse Volumina), Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Magnetrührer IKA™ Combimag RCH, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
- Mikroplatten-Reader Infinite® 200, Tecan, Männedorf, Schweiz
- M20-Universalmühle, IKA, Staufen, Deutschland
- Nano DSC, TA Instruments, Milford, USA
- pH-Meter 766 Calimatic, Knick Elektronische Messgeräte GmbH, Berlin, Deutschland
- Pipettierhilfe, Mikura, London, Großbritannien
- Reinstwasseranlage Labostar UV 2 Reinswassersystem®, Siemens, Barsbüttel, Deutschland
- Savant SPD111 V SpeedVac™, Thermo Scientific, Rockford, USA
- Thermocycler, Biometra TOne, Analytik Jena, Jena, Deutschland
- Ultraschallbad SONOREX RK 100, BANDELIN electronic, Berlin, Deutschland
- Vortex-Genie™ 2, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

2.4 Software

- BioPharma Finder™ (Version 3.2), Thermo Scientific, Rockford, USA
- ChemDraw® Professional (Version 18.1.0.535), PerkinElmer, Waltham, USA
- CytExpert (Version 2.5.0.77), Beckman Coulter, Brea, USA
- EPSON Scan (Version 1.1.0.0), Epson, Suwa, Japan
- FreeStyle™ (Version 1.6), Thermo Scientific, Rockford, USA
- GelAnalyzer (Version 19.1), Istvan Lazar Jr., PhD & Istvan Lazar Sr., PhD, CSc
- I-control™ 2.0 (Version 3.9.1.0), Tecan, Männedorf, Schweiz
- Mascot Daemon (Version 2.7.0), Matrix Science, London, Großbritannien
- Mascot Distiller (Version 2.8.4), Matrix Science, London, Großbritannien
- Mascot Server (Version 2.8.3), Matrix Science, London, Großbritannien
- MOE (Version 2019.01.01), Chemical Computing Group, Montreal, Kanada
- NanoAnalyze (Version 3.11.0), TA Instruments, Milford, USA
- Nano DSCRun (Version 4.5.0), TA Instruments, Milford, USA
- NEBaseChanger® (Version 1.3.3), New England Biolabs, Ipswich, USA
- UNICORN™ start (Version 1.1.0.2), GE Healthcare, Chicago, USA
- PlasmaDNA, Helsinki, Finnland
- winCATS (Version 1.4.9.2001), CAMAG, Berlin, Deutschland

2.5 Verbrauchsmaterial

Kits

- Amicon® Pro Affinitätskonzentrationskit Ni-NTA mit Amicon® Ultra-0.5 Gerät, Merck Millipore, Burlington, USA
- Monarch® Genomic DNA Purification Kit, New England Biolabs, Ipswich, USA
- Monarch® Plasmid DNA Miniprep Kit, New England Biolabs, Ipswich, USA
- Pierce™ Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, USA
- PureLink® Plant Total DNA Purification Kit, Invitrogen, Waltham, USA
- Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit, New England Biolabs, Ipswich, USA
- ROTI® Nanoquant, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- ROTI® Transform, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep Kit, Zymo Research, Freiburg, Deutschland

Proteinexpression und -aufreinigung

- Amicon® Ultra (0,5; 2; 15 ml) 10 K Zentrifugen-Filtereinheiten, Merck Millipore, Burlington, USA
- Econo-Pac® Chromatographiesäule, Bio-Rad, Hercules, USA

- Einwegküvetten UV-Küvette, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
- HiTrap™ SP XL, GE Healthcare, Chicago, USA
- Kryoröhrchen (2 ml, steril), Greiner, Frickenhausen, Deutschland
- MS® PES Spritzenfilter (Porengröße 0,22 µm, steril), Membrane Solutions, Auburn, USA
- Petrischalen 100 mm x 20 mm, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
- Protino™ Ni-NTA Agarose, Machery-Nagel, Düren, Deutschland
- Slide-A-Lyzer™ Dialysekassetten 10000 MWCO 15 & 30 ml, Thermo Scientific, Rockford, USA
- Zentrifugenflaschen Polypropylen 50 ml & 500 ml, Beckman Coulter, Brea, USA

Zellkultur

- CELLSTAR® Deckel mit Kondensationsringen (steril), Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
- CELLSTAR® Mikroplatte, 96 Well (transparent, steril), Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
- CELLSTAR® Zellkulturflasche 50 ML, 25 CM², Filter-Schraubverschluss rot, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
- Flüssigkeitsreservoirs (50 ml, steril), NeoLab, Heidelberg, Deutschland
- MILLEX®-GV 0 Filter (Porengröße 0,22 µm, steril), Merck Millipore, Burlington, USA

Sonstige Verbrauchsmaterialien

- DC-Fertigplatten ADAMANT™ UV₂₅₄ (Kieselgel 60), Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
- Greiner 96 Well Mikroplatten (transparent, F-Boden, Polypropylen), Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
- Greiner 384 Well Mikroplatte mit Deckel (schwarz, klarer µCLEAR® F-Boden, steril), Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
- Omnifix® 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10°ml, 20 ml Spritze (steril), B. Braun, Melsungen, Deutschland
- PCR Einzelgefäße 0,2 ml, Brand, Wertheim, Deutschland
- Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl), Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Pipettenspitzen (2,5 ml, 5 ml), Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Reagiergefäße SafeSeal (0,5 ml, 1 ml, 2 ml, 5 ml), Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Rotilabo®-Spritzenfilter 0,22 µm, PVDF, unsteril, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Schraubröhre 15 ml und 50 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml), Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Slide-A-Lyzer™ Dialysekassetten 2000 MWCO 0,5 ml, Thermo Scientific, Rockford, USA
- Slide-A-Lyzer™ Dialysekassetten 10000 MWCO 15 ml & 30 ml, Thermo Scientific, Rockford, USA

2.6 Zelllinien

- A2058 (Humanes amelanotisches Melanom, CRL-11147TM), ATCC[®], Manassas, USA
- HCT116 (Humanes Kolonkarzinom, CCL-247TM), ATCC[®], Manassas, USA
- Neuro-2A (Murines Neuroblastom, ACC 148), DSMZ, Braunschweig, Deutschland

2.7 Methoden

2.7.1 Isolierung von Sapovaccarin-S1 und -S2

2.7.1.1 Samenmaterial

Die *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm. (ehemals *Saponaria vaccaria* L.), auch bekannt als Kuhnelke, gehört der Familie der Caryophyllaceae an (Abbildung 2A). Die blühende Pflanze ist die einzige Art der Gattung *Vaccaria* (Zhou G., 2016). In den Samen, die knapp 2 mm groß und rund sind, sind neben RIPs auch Triterpensaponine, zyklische Peptide, Flavonoide, Polysaccharide und Lipide aufzufinden (Abbildung 2B) (Efthimiadou, 2012; Zhou G., 2016). Das Samenmaterial der *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm. wurde von der Canadian Carnation BioProducts Company (Saskatoon, S7H 3R2, Kanada) zur Verfügung gestellt. Das Unternehmen baut die Pflanzen in Kanada an und verarbeitet die Samen der *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm., um daraus Stärke und Saponine für Bioprodukte wie biologischen Pflanzenschutz und Adjuvantien für Impfstoffe zu gewinnen.

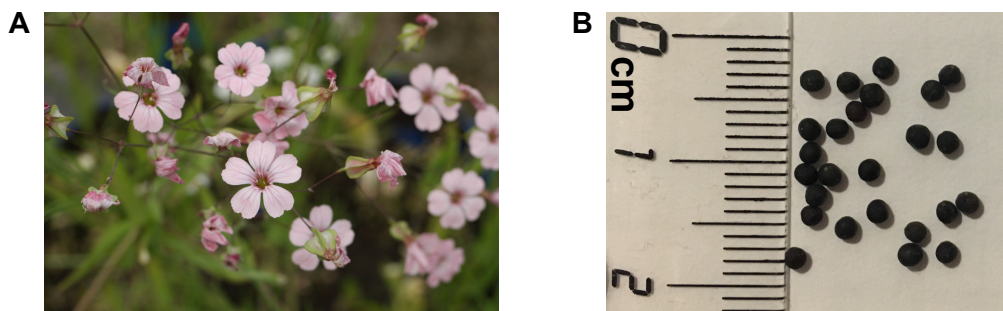


Abbildung 2. *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm. (A) Blüte (Ensinger, 2023) und (B) Samen im dargestellten Maßstab.

2.7.1.2 Extraktion der Samen und Proteinisolierung

Die Samen der *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm. wurden zunächst portionsweise zu einem feinen Pulver zermahlen. Zum Entfetten wurde das Samenpulver zweimal mit 10 ml n-Hexan pro Gramm Pulver bei 4 °C je 30 min lang behandelt und anschließend bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Das entfettete Samenmaterial wurde im Verhältnis 8 ml *phosphate-buffered saline* (PBS, pH 7,4) pro 1 g Droge unter Rühren bei 4 °C 24 h lang extrahiert. Der resultierende Rohextrakt wurde durch Zentrifugation (8000 x g, 20 min, 4 °C) vom Samenmaterial abgetrennt und bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Die Isolierung der RIPs aus dem unter 2.7.1.2 erhaltenen Rohextrakt erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurde der Rohextrakt mittels Ammoniumsulfatfällung fraktioniert. Die Fraktion mit der höchsten *N*-Glykosidaseaktivität (2.7.4.2) wurde mittels Kationenaustauschchromatographie weiter aufgereinigt. Die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung wurde mit einer Ammoniumsulfatsättigungen von 30 %, 60 % und 90 % durchgeführt. Die entsprechende Menge (bestimmt mit dem Online-Tool

<http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>, abgerufen am 18.09.2019) fein gemörsertes Ammoniumsulfat wurde vorsichtig unter Rühren im Eisbad zugegeben. Die Fällung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Durch Zentrifugation bei 10000 x g bzw. 30000 x g (30 min, 4 °C) wurden die ausgefallenen Proteine abgetrennt. Mit dem Überstand wurde die nächste Ammoniumsulfatfällung mit der jeweils höheren Konzentration durchgeführt. Ausgefallene Proteine wurden in PBS resuspendiert. Die Fraktion, die bei 90 % Ammoniumsulfat erhalten wurde, zeigte die höchste Enzymaktivität. Sie wurde für die Aufreinigung mit dem HiTrapTM SP XL Kationenaustauscher, welcher über die ÄKTATM start betrieben wurde, verwendet. Das resuspendierte Präzipitat (1 ml) wurde mit Startpuffer (50 mM HEPES, pH 7,0) zu einer klaren Lösung verdünnt, durch einen 0,22 µm Filter (PVDF) filtriert und mit einem Fluss von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Elution von der Säule erfolgte ebenfalls mit einem Fluss von 1 ml/min mit 100, 200, 300, 400 und 1000 mM NaCl in 50 mM HEPES, pH 7,0. Die bei 280 nm detektierten Fraktionen wurden aufgefangen und der Elutionspuffer wurde durch Ultrafiltration gegen PBS ausgetauscht (2.7.3.3).

2.7.2 Molekularbiologische Methoden

2.7.2.1 DNA-Sequenzierung der DNA aus den Samen der *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm.

Um die Aminosäuresequenz der isolierten RIPs aus der *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm. zu bestimmen, wurden massenspektrometrische Methoden auf Proteinebene (2.7.5) mit molekularbiologischen Methoden auf DNA-Ebene kombiniert. Die Ergebnisse der Massenspektrometrie (MS) ermöglichten das Designen spezifischer Primer, die für eine Sequenzierung auf DNA-Ebene Verwendung finden sollten. Zwei Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurden durchgeführt. Das Primerpaar A, das in der ersten PCR-Runde Anwendung fand, wurde mittels der Peptidmassenfingerprints der MS-Analyse designt (Tabelle 2). Das in Tabelle 2 gelistete Primerpaar B für die zweite PCR-Runde wurde von den Ergebnissen der ersten Runde abgeleitet und von dem N-Terminus, der von Bolognesi *et al.* bestimmt wurde (Bolognesi *et al.*, 1995). Die Individualsynthese der Primer erfolgte durch das Unternehmen metabion. Für die Isolierung der Template-DNA wurde das PureLink[®] Plant Total DNA Purification Kit verwendet. Die Template-DNA wurde aus 75 mg gefrorenen, ganzen Samen, wie vom Hersteller angegeben, isoliert. Die DNA-Konzentration wurde mit dem NanoDropTM One photometrisch bestimmt. 64,8 ng Template-DNA wurden für die PCR mit der High-Fidelity DNA Polymerase verwendet. Das Protokoll wurde den Herstellerangaben folgend mit den Annealing-Temperaturen der Tabelle 2 durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden über ein 1 %iges Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.7.2.5). Resultierende Banden wurden mit dem Monarch[®] Genomic DNA Purification Kit aus dem Gel extrahiert. Die extrahierte DNA wurde durch LGC Genomics (Berlin) mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Hierfür wurden die Proben entsprechend der Vorschriften von LGC Genomics mit den entsprechenden Primern der Tabelle 2 vorbereitet.

Tabelle 2. Primerpaare für die DNA-Sequenzierung der DNA, isoliert aus den Samen der *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm. Die Annealing-Temperaturen (Ta) wurden mit dem Online-Tool NEB Tm Calculator[®] bestimmt.

Primerpaar	Primersequenz	Ta (°C)
A	<i>forward</i> 5'-AAT GCT AAG ATT ACA CAA GGG-3' <i>reverse</i> 5'-GCC CAA ATA CAT AAG GAG TCC C-3'	59
B	<i>forward</i> 5'-CAT TAA ATC TCG CAA ATC C-3' <i>reverse</i> 5'-GAC TCC ATC AAT TGA CGT TAC-3'	55

2.7.2.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Die Nukleotidsequenzen der einzelnen RIPs lagen mit einem 6-fach Polyhistidin-Tag (His-Tag) in einem pET11d-Vektor vor. Ausgenommen davon war ^{His}Agrostin, das mit einem 8-fach His-Tag versehen war. Die für die Transformationen eingesetzten Vektoren waren teils bereits im Bestand des Arbeitskreises oder wurden sowohl kommerziell erworben als auch durch zielgerichtete Mutagenese, wie unter 2.7.2.6 beschrieben, hergestellt. Der *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm wurde in Abhängigkeit der weiteren Verwendung der transformierten Zellen ausgewählt: Für Plasmidpräparationen wurden DH5 α -Zellen und für Proteinexpressionen spezielle Expressionstämme (BL21(DE3)pLysS, NiCo21(DE3), und RosettaTM2(DE3)) eingesetzt. Die Transformation von Plasmid-DNA in zuvor mit dem ROTI[®] Transform Kit kompetent gemachten *E. coli* Zellen erfolgte mit der Hitzeschock-Methode. 20 μ l auf Eis aufgetaute Bakterienzellen wurden mit 100 ng Plasmid-DNA versetzt und vorsichtig gemischt. Im Anschluss wurden die Ansätze 30 min auf Eis, 90 s bei 42 °C im Wasserbad und nochmal 1 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 μ l SOC-Medium (Medium mit spezieller Zusammensetzung, um maximale Transformationseffizienz zu erzielen) wurden die Ansätze erneut inkubiert (1 h, 37 °C, 200 rpm). Je 75 μ l der Ansätze wurden auf 37 °C temperierte LB_{Amp}-Agarplatten ausgestrichen und im Inkubator bei 37 °C über Nacht bebrütet. Als Kontrolle wurden parallel *E. coli* ohne Plasmid-Zugabe bearbeitet. Zur Lagerung der transformierten Zellen wurden Glycerol-Stocks aus 500 μ l Vorkultur (3 ml LB_{Amp}-Medium inokuliert mit einer Einzelkolonie, 6 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert) und 500 μ l 50 % Glycerol-Lösung hergestellt und bei –80 °C eingefroren.

2.7.2.3 Plasmidpräparation und Sequenzierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten DH5 α -Bakterienkulturen erfolgte in Abhängigkeit der gewünschten Produktmenge mit zwei unterschiedlichen Kits. Für die Plasmidpräparation des pET11d-^{His}Dianthin-Vektors wurde das ZymoPURETM II Plasmid Midiprep Kit und für die Plasmidpräparationen des pET11d-^{His}Sapovaccarin-S1-Vektors und der mittels zielgerichteter Mutagenese hergestellten Mutanten das Monarch[®] Plasmid DNA Miniprep Kit

verwendet. Zunächst wurden 3 ml LB_{Amp}-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und 6 h bei 27 °C und 200 rpm inkubiert. Nach Verdünnung von 1:500 mit LB_{Amp}-Medium erfolgte die Hauptkultur (100 rpm, 37 °C) bis zu dem Erreichen der entsprechenden optischen Dichte (OD 600), angegeben in den Kit-Herstellerangaben, über Nacht. Die weitere Durchführung erfolgte gemäß der Herstellerangaben des jeweiligen Kits. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit dem NanoDrop™ One bestimmt.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde entweder mittels Restriktionsverdau und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung (2.7.2.4) oder durch das Unternehmen LGC Genomics (Berlin) mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Hierfür wurden 100 ng/µl Plasmid-DNA in Nuklease-freiem Wasser vorbereitet. Die Zugabe der Primer erfolgte durch LGC Genomics (Tabelle 3).

Tabelle 3. Sequenzierungsprimer. Die Sequenzierungsprimer wurden so ausgewählt, dass die für das Zielprotein kodierende DNA-Sequenz der Plasmid-DNA vollständig sequenziert werden konnte. Der *forward* Primer war für alle Analysen gleich, der *reverse* Primer variierte. Zusätzlich wurde der Primer pGEX3 ausgewählt, um die Sequenz des nicht für das Zielprotein kodierenden Bereichs zu überprüfen.

Primer	Sequenz	Plasmid-DNA
T7prom <i>forward</i>	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG G-3'	pET11d- ^{His} Dianthin Lys195/Lys227/Arg24Ala pET11d- ^{His} Sapovaccarin-S1 & Arg24Ala pET11d- ^{His} Agrostin Arg23Ala
pGEX3 <i>forward</i>	5'-CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG-3'	pET11d- ^{His} Dianthin Lys195/Lys227/Arg24Ala pET11d- ^{His} Sapovaccarin-S1 & Arg24Ala pET11d- ^{His} Agrostin Arg23Ala
sCOS1F <i>reverse</i>	5'-CAA ATA GGG GTT CCG CGC AC-3'	pET11d- ^{His} Dianthin Lys195/Lys227/Arg24Ala
T7term <i>reverse</i>	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'	pET11d- ^{His} Sapovaccarin-S1 & Arg24Ala pET11d- ^{His} Agrostin Arg23Ala

2.7.2.4 Restriktionsverdau

Um die Identität und Reinheit der Plasmidpräparation von ^{His}Dianthin zu überprüfen, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Hierfür wurden die Restriktionsenzyme XbaI und EcoRI-HF, die je vor und nach dem für ^{His}Dianthin kodierenden Abschnitt (Insert) schneiden, ausgewählt. Die Restriktionsansätze wurden als linearer Verdau (EcoRI-HF), als Doppelverdau (XbaI und EcoRI-HF) und als Kontrolle ohne Restriktionsenzyme den Herstellerangaben folgend vorbereitet. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

2.7.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde angewendet, um Nukleinsäuren nach ihrer Größe aufzutrennen. Die Trennung erfolgt im elektrischen Feld. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern in Abhängigkeit ihrer Größe mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch das porige Agarosegel zur Anode. Die Gelelektrophorese wurde mit 1%igen Agarosegelen durchgeführt (Armstrong, 2015). Hierfür wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer suspendiert und unter Wärme in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wurde Ethidiumbromidlösung zu einer Endkonzentration von 2 µg/ml zugesetzt und in die Gießapparatur überführt. Ethidiumbromid wird zur Visualisierung der DNA-Banden eingesetzt. Der Farbstoff interkaliert in die beiden Stränge der DNA. Er absorbiert UV-Licht mit einem Maximum im Anregungsspektrum bei 302 nm und emittiert sichtbares Licht mit einer Wellenlänge von 590 nm. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Gel-Ladefarbstoff (6x) versetzt und in die Taschen der frisch hergestellten Gele gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte 1 h lang bei 120 V.

2.7.2.6 Zielgerichtete Mutagenese

Um gezielt die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin durch Alanin im Zielprotein zu ersetzen, wurde eine zielgerichtete Mutagenese (SDM) auf Ebene des nativen Plasmids durchgeführt (Wang & Malcolm, 1999). Die Methodik basiert auf einer PCR-Reaktion, in der der *forward* Primer die gewünschte Basensubstitution enthält und der *reverse* Primer äquivalent zu dem nativen Plasmid aufgebaut ist (Abbildung 3). Hierfür wurde das Q5[®] Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren. Dabei wurde zunächst eine PCR-Reaktion durchgeführt und die Plasmid-DNA mit der gewünschten Basensubstitution vermehrt. Das Designen der notwendigen Primer und die Berechnung ihrer Annealing-Temperaturen erfolgte mit dem Online-Tool NEBaseChanger[®] (Tabelle 4). Die Individualsynthese der Primer erfolgte durch die Firma metabion.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Reaktion wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit den PCR-Produkten durchgeführt. Anschließend wurde unter Zugabe einer Enzymmischung aus Kinase, Ligase und der Restriktionsendonuklease DpnI das lineare Plasmid phosphoryliert, zirkularisiert und das native Plasmid abgebaut. Das resultierende Reaktionsprodukt konnte im Anschluss direkt zur Transformation von NEB[®] 5-alpha *E. coli* eingesetzt werden. Mittels Plasmidpräparationen (2.7.2.3) wurde sowohl überprüft, ob die gezielte Mutation erfolgreich war, als auch ob die restliche Sequenz des pET11d-Vektors intakt war. Drei pET11d-^{His}Dianthin-Mutanten wurden durch SDM hergestellt. Die restlichen pET11d-Vektoren der ^{His}Dianthin-Mutanten wurden aufgrund des zeitlichen Aufwandes, den es bei der hohen Anzahl an Vektoren bedarf, kommerziell bei BioCat (Heidelberg) erworben.

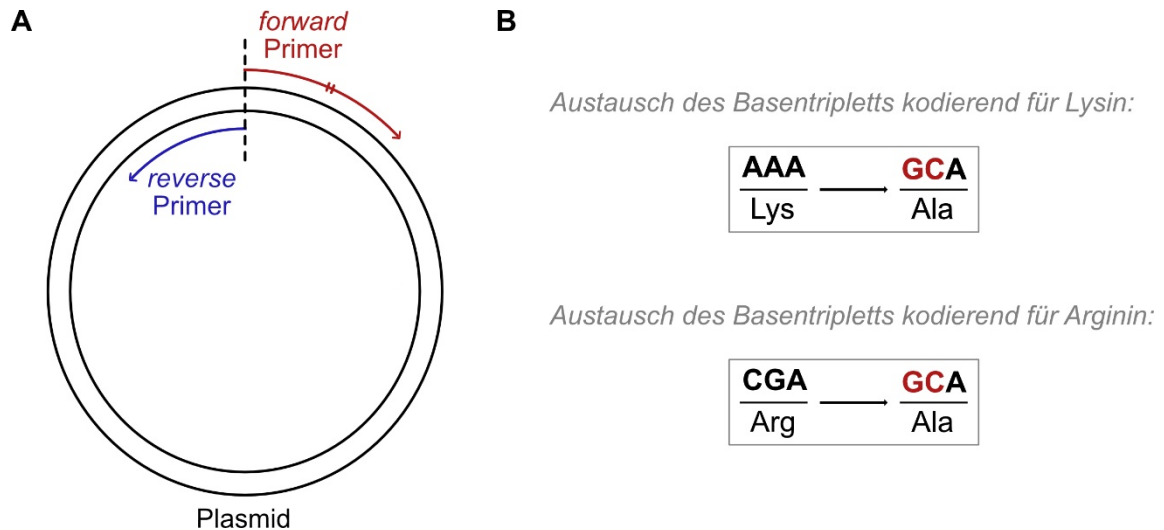


Abbildung 3. Schematische Darstellung der zielgerichteten Mutagenese. (A) Während der *forward* Primer die gewünschte Mutation trägt, ist der *reverse* Primer äquivalent zu dem nativen Plasmid aufgebaut. So entsteht während der PCR-Reaktion ein lineares Reaktionsprodukt, das die gewünschte Basensubstitution aufweist. (B) Beispielhafter Basenaustausch für Lysin bzw. Arginin. Der *forward* Primer wird so designt, dass die für Lysin bzw. Arginin kodierenden Basentriplets zu einem für Alanin kodierenden Triplet verändert werden.

Tabelle 4. Primer für die zielgerichtete Mutagenese von ^{His}Dianthin, ^{His}Sapovaccarin-S1 und ^{His}Agrostin. In **rot** hervorgehoben, sind die Basen, die auf Proteinebene den Austausch von Arginin zu Alanin bzw. Lysin zu Alanin bewirken. Ta: für die Primerpaare empfohlene Annealing-Temperatur (Ta), berechnet mit dem Online-Tool NEBaseChanger®.

Protein	Mutation	Primersequenz	Ta (°C)
^{His} Dianthin	Arg24Ala	<i>forward</i> 5'-GGA TCA AAT CGC AAA CAA TGT GAG G-3' <i>reverse</i> 5'-AGA AAA GAT GAG TAT TGA CTC-3'	56
^{His} Dianthin	Lys195Ala	<i>forward</i> 5'-CTT GGT TAC CGC GAA CTT CCC AAA C-3' <i>reverse</i> 5'-TTC TGT ATG TAC CTA AAT CG-3'	58
^{His} Dianthin	Lys227Ala	<i>forward</i> 5'-CGT GTT TAA TGC AGA TTA TGA TTT CGG G-3' <i>reverse</i> 5'-AGA AAA GAT GAG TAT TGA CTC-3'	59
^{His} Sapo- vaccarin-S1	Arg24Ala	<i>forward</i> 5'-GGA CAG GAT CGC GAA CAA CGT GAG GG-3' <i>reverse</i> 5'-ACG AAG CTG CTG TAC TGG-3'	63
^{His} Agrostin	Arg23Ala	<i>forward</i> 5'-TGC AAG TCT GGC CAA AGA ACT GGG C-3' <i>reverse</i> 5'-ACC AGC TGA CCA TAC TGC-3'	63

2.7.2.7 Proteinexpression

Für die Expression der rekombinanten Proteine wurden verschiedene *E. coli* Stämme, die für die Proteinexpression optimiert wurden, eingesetzt (Tabelle 5). Die Expression von ^{His}Dianthin und der ^{His}Dianthin-Mutanten erfolgte weitestgehend nach publizierter Methode (Bhargava *et al.*, 2017). Beim Kulturvolumen der ^{His}Dianthin-Mutanten und bei der Konzentration des Ampicillins (100 µg/ml statt 50 µg/ml) im Medium wurde von der Methode abgewichen. Ein Kulturvolumen von 500 ml war ausreichend, um genug mutiertes Protein für die Durchführung des Screenings auf zytotoxische

Aktivität zu erhalten (2.7.6.2). Nach dem Screening wurde ^{His}Dianthin Arg24Ala nochmals mit einem Kulturvolumen von 2 L exprimiert.

Die Expressionen von ^{His}Sapovaccarin-S1, ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala und ^{His}Agrostin Arg23Ala waren mit der oben genannten Methode nicht möglich. Hier wurde die Expression mit autoinduzierendem Medium durchgeführt. Autoinduzierendes Medium enthält neben Glucose auch α -Lactose. Sobald die Glucose von den *E. colis* aufgebraucht wurde, nehmen die Bakterienzellen α -Lactose auf und die Proteinexpression wird induziert. Die Vorkultur erfolgte in 3 ml LB_{Amp}-Medium (6 h, 37 °C, 200 rpm). Im Anschluss wurde die Vorkultur 1:10000 in 100 ml LB_{Amp}-Medium verdünnt und über Nacht bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Daraus erfolgte die Hauptkultur durch 1:100 Verdünnung in 500 ml autoinduzierendem LB_{Amp}-Medium 9 h bei 37 °C und 100 rpm. Anschließend wurde die Temperatur über Nacht auf 25 °C (^{His}Agrostin Arg23Ala 18 °C) reduziert. Die Expression wurde durch 6-minütige Zentrifugation bei 6000 x g und 4 °C gestoppt. Die resultierenden Bakterienpellets aller Expressionen wurden bei -20 °C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

Tabelle 5. *E. coli* Stämme für die Proteinexpression. ^{His}Dianthin und ein Großteil der Mutanten wurde wie in der Literatur angegeben in NiCo21(DE3) exprimiert (Bhargava *et al.*, 2017). Für rekombinante Proteine, die sich nicht in NiCo21(DE3) exprimieren ließen, wurden weitere *E. coli* Stämme getestet und der Stamm (BL21(DE3)pLysS und RosettaTM2(DE3)) mit der besten Ausbeute ausgewählt. Alle drei Stämme leiten sich von dem BL21(DE3) Stamm ab. NiCo21(DE3) wurde für die Aufreinigung über Nickel-Affinitätschromatographie, BL21(DE3)pLysS wurde für die Expression von toxischen Proteinen und RosettaTM2(DE3) wurde für die verstärkte Expression von eukaryotischen Proteinen optimiert.

Rekombinantes Protein	<i>E. coli</i> Stamm
^{His} Dianthin	NiCo21(DE3)
^{His} Dianthin Lys50Ala, Lys92Ala, Lys113Ala, Lys126Ala, Lys129Ala, Lys162Ala, Lys190Ala, Lys195Ala, Lys201Ala, Lys221Ala, Lys227Ala, Lys254Ala, Lys50/92Ala, Arg24Ala	NiCo21(DE3)
^{His} Dianthin Lys156Ala, Lys157Ala, Lys235Ala, Lys240Ala, Lys50/92/126Ala	BL21(DE3)pLysS
^{His} Sapovaccarin-S1	BL21(DE3)pLysS
^{His} Sapovaccarin-S1 Arg24Ala	Rosetta TM 2(DE3)
^{His} Agrostin Arg23Ala	BL21(DE3)pLysS

2.7.2.8 Zellaufschluss und Extraktion der Proteine

Für die Proteinaufreinigung mussten die Bakterien zunächst lysiert werden. Die gefrorenen Bakterienpellets wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut und abhängig von der Größe des Kulturansatzes in 20 ml (2 L Kulturen) oder 10 ml (500 ml Kulturen) Lysepuffer (1 % Triton X in PBS inkl. Proteaseinhibitor) resuspendiert. Der Zellaufschluss der Bakterien erfolgte mit dem Ultraschall-Homogenisator. 6 Zyklen à 20 s mit einer Amplitude von 75–80 % wurden durchgeführt.

Der resultierende Proteinextrakt wurde durch Zentrifugation von den nicht lysierten Zellen und den Zelltrümmerteilen abgetrennt (30 min, 16000 x g, 4 °C).

2.7.2.9 Proteinaufreinigung mit dem Amicon® Pro Affinitätskonzentrationskit

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte mittels Nickel-Affinitätschromatographie. Alle in dieser Arbeit exprimierten Proteine verfügten über einen His-Tag, der es ermöglicht die mit His-Tag markierten Proteine von unmarkierten, bakteriellen Proteinen größtenteils abzutrennen. His-Tags bilden mit zweiwertigen Nickel-Ionen Chelatkomplexe, wodurch das Zielprotein an der Säule, die mit einem nickelgeladenen Affinitätsharz (Ni-NTA) gefüllt ist, immobilisiert wird. Die Elution erfolgte mittels Imidazol, welches eine höhere Affinität zu den Nickel-Ionen aufweist.

Die ^{His}Dianthin-Mutanten für das Screening auf zytotoxische Aktivität, ^{His}Sapovaccarin-S1 und ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala wurden mit dem Amicon® Pro Affinitätskonzentrationskit Ni-NTA aufgereinigt. Das Kit ermöglicht eine schnelle Aufreinigung durch Zentrifugalkraft. Sechs Proteine konnten parallel bearbeitet werden. Die Ausbeuten mit dem Kit waren allerdings sehr klein und variierten zwischen 103–355 µg Protein. 3 ml der nach der Lyse erhaltenen Proteinextrakte wurden zunächst auf eine Konzentration von 50 mM Imidazol eingestellt und erneut für 30 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde komplett für die weitere Aufreinigung, bei der wie vom Hersteller angegeben vorgegangen wurde, verwendet. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde der Waschschrift dreimal mit 3 ml Waschpuffer wiederholt. Nach Elution des Zielproteins wurde direkt ein Pufferwechsel gegen DPBS in der Amicon® Pro Einheit, in die nach den Waschschriften eine Ultrafiltrationseinheit (Ausschlussgrenze 10 kDa) eingebaut wurde, vorgenommen.

2.7.2.10 Proteinaufreinigung *via* Ni-NTA und Kationenaustauschchromatographie

Sowohl die großen 2 L Kulturansätze von ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala als auch von ^{His}Agrostin Arg23Ala wurden mittels manueller Ni-Affinitätschromatographie, gefolgt von einer Kationenaustauschchromatographie, aufgereinigt. Hierfür wurden zunächst die Proteinextrakte auf eine Imidazolkonzentration von 20 mM eingestellt und 30 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Ni-Affinitätschromatographie wurde nach einem Protokoll, das von der AG Fuchs (Charité, Berlin) entwickelt wurde, durchgeführt. 5 ml Protino™ Ni-NTA-Agarose wurden in eine Econo-Pac® Chromatographiesäule gefüllt, mit 2 x 10 ml Reinstwasser gespült und mit 5 x 10 ml Waschpuffer equilibriert. Im Anschluss wurde die vorbereitete Ni-NTA-Agarose mit dem Proteinextrakt 1 h bei 4 °C im Umkehrschüttler vorsichtig rotiert. Nach dem Waschen mit 50 ml Waschpuffer erfolgte die Elution in vier Schritten. Eluiert wurde mit 1 x 10 ml, 1 x 5 ml und 1 x 15 ml 125 mM Imidazol-Elutionspuffer

sowie mit 1 x 30 ml 250 mM Imidazol-Elutionspuffer. Je Schritt wurde eine Fraktion aufgefangen, die nach ihrer Auffangreihenfolge wie folgt bezeichnet wurden: E125-1, E125-2, E125-3 und E250. Die Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert. Fraktionen, die das Zielprotein aufwiesen, wurden vereint und gegen 50 mM MES-Puffer (pH 5,6) dialysiert (Ausschlussgrenze 10 kDa).

Die *via* Ni-NTA erhaltenen Fraktionen enthielten bakterielle Verunreinigungen. Um reines Protein zu erhalten, folgte ein weiterer Aufreinigungsschritt mittels Kationenaustauschchromatographie. Die Kationenaustauschchromatographie wurde mit einer HiTrapTM SP XL Säule an der ÄKTATM start durchgeführt. 1 ml der Ni-NTA-Fraktionen (filtriert durch einen 0,22 µm Filter, PVDF) wurden mit einem Fluss von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte in vier Stufen mit 100, 200, 300 und 400 mM NaCl in 50 mM MES-Puffer. Die Fraktionen wurden erneut aufgefangen und mittels SDS-PAGE analysiert. Die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden vereint. Mittels Ultrafiltration (Ausschlussgrenze 10 kDa) wurde der Puffer gewechselt und die Proteinprobe gleichzeitig aufkonzentriert.

2.7.3 Proteinchemische Methoden

Alle Arbeiten mit Proteinlösungen erfolgten soweit nicht anders angegeben bei 4 °C.

2.7.3.1 Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninsäure-Assay

Die Proteinkonzentrationen der rekombinant hergestellten Proteine wurden mit dem Bicinchoninsäure-Assay (BCA) bestimmt. Der BCA-Assay beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ an der Peptidbindung von Proteinen. Cu¹⁺ bildet mit BCA einen blau-violetten Komplex, der bei 562 nm quantifiziert wird (Smith *et al.*, 1985). Für die Bestimmung wurden die Reagenzien des PierceTM BCA Protein Assay Kits verwendet. Das Arbeitsreagenz wurde, wie vom Hersteller angegeben, hergestellt. Für die Erstellung der Kalibriergeraden wurde eine Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA, 125–2000 µg/ml) erstellt. Hierfür wurde der BSA-Proteinstandard mit PBS verdünnt. Die Durchführung erfolgte mit leichter Abwandlung nach einem Protokoll von Thermo Fisher Scientific, welches für die Messung mit dem Photometer NanoDropTM One entwickelt wurde (ThermoFisher, 2017). Je 20 µl Arbeitsreagenz wurden mit 1 µl Standard bzw. Proteinprobe versetzt, 30 min bei 37 °C und 1 min bei 10 °C inkubiert. Anschließend wurden innerhalb von 10 min die Standards der Kalibriergeraden und die Proben als Triplikat vermessen.

2.7.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Experimente für die Isolierung und Charakterisierung von Sapovaccarin-S1 und -S2 wurde das ROTI[®]Nanoquant Kit verwendet. Dabei wurde genau nach Herstellerangaben für das Mikrotiterplattenverfahren vorgegangen. Das Kit beruht auf der Bradford-Reaktion, bei der der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 im Sauren mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet (Bradford, 1976). Das Kit fordert zwei Absorptionsmessungen bei 450 nm und 590 nm, welche mit dem Mikroplatten-Reader Infinite[®] 200 gemessen wurden. Die Kalibriergerade mit BSA (1–100 µg/ml) wurde, wie vom Hersteller für das Mikrotiterplattenverfahren angegeben, hergestellt.

2.7.3.3 Pufferwechsel und Konzentrierung von Proteinlösungen

Der Pufferwechsel von Proteinproben erfolgte entweder per Dialyse oder bei gleichzeitig gewünschter Konzentrierung der entsprechenden Proteinproben mittels Ultrafiltration. Die Dialyse wurde mit Slide-A-Lyzer[™] Dialysekassetten (200 µl, 15 oder 30 ml Fassungsvermögen) mit einer Ausschlussgrenze von 2 und 10 kDa bei 4 °C durchgeführt. Das Volumen des Dialysepuffers entsprach dem 30-fachen Volumen der Probe. Der Puffer wurde zweimal je nach 3 h gewechselt und anschließend erfolgte die Dialyse über Nacht. Für Proteinproben, die gleichzeitig aufkonzentriert werden sollten, wurden die Amicon[®] Ultra Ultrafiltrationseinheiten (Fassungsvermögen 0,5; 2; 15 ml) ebenfalls mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa verwendet. Die Zentrifugiergeschwindigkeiten und -zeiten erfolgten, wie vom Hersteller angegeben. Beim Umpuffern wurde die Proteinprobe zunächst aufkonzentriert und anschließend dreimal mit dem Zielpuffer ultrafiltriert.

2.7.3.4 Proteinmarkierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff CF@568

Um die Endozytose von His⁶Dianthin und His⁶Dianthin Arg24Ala zu untersuchen (2.7.6.6), wurden beide Proteine mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Auswahl des Farbstoffes war an drei Bedingungen geknüpft: Die Anregungs- und Emissionswellenlänge sollten von dem Laser und den Filtern des CytoFLEX Durchflusszytometers und von dem Filter des Lux3 FL Fluoreszenzmikroskops abgedeckt sein und die Fluoreszenz des Farbstoffes sollte möglichst weit entfernt von der Eigenfluoreszenz der Zellen liegen (Abbildung 4A).

Der Fluoreszenzfarbstoff CF@568 erfüllte diese Bedingungen. Die Proteinmarkierung erfolgte mit dem *N*-Hydroxysuccinimid-Ester des Farbstoffes, welcher mit Lysin-Resten des Proteins zu einer stabilen Amid-Bindung reagiert (Abbildung 4B). Für die Markierungsreaktion wurde eine Ansatzgröße von 300 µl gewählt (Tabelle 6). Laut Hersteller soll das Verhältnis von Farbstoff zu Protein zwischen 9:1 und 15:1 liegen. Bei niedrig konzentrierten Proteinlösungen kann das Verhältnis höher gewählt werden.

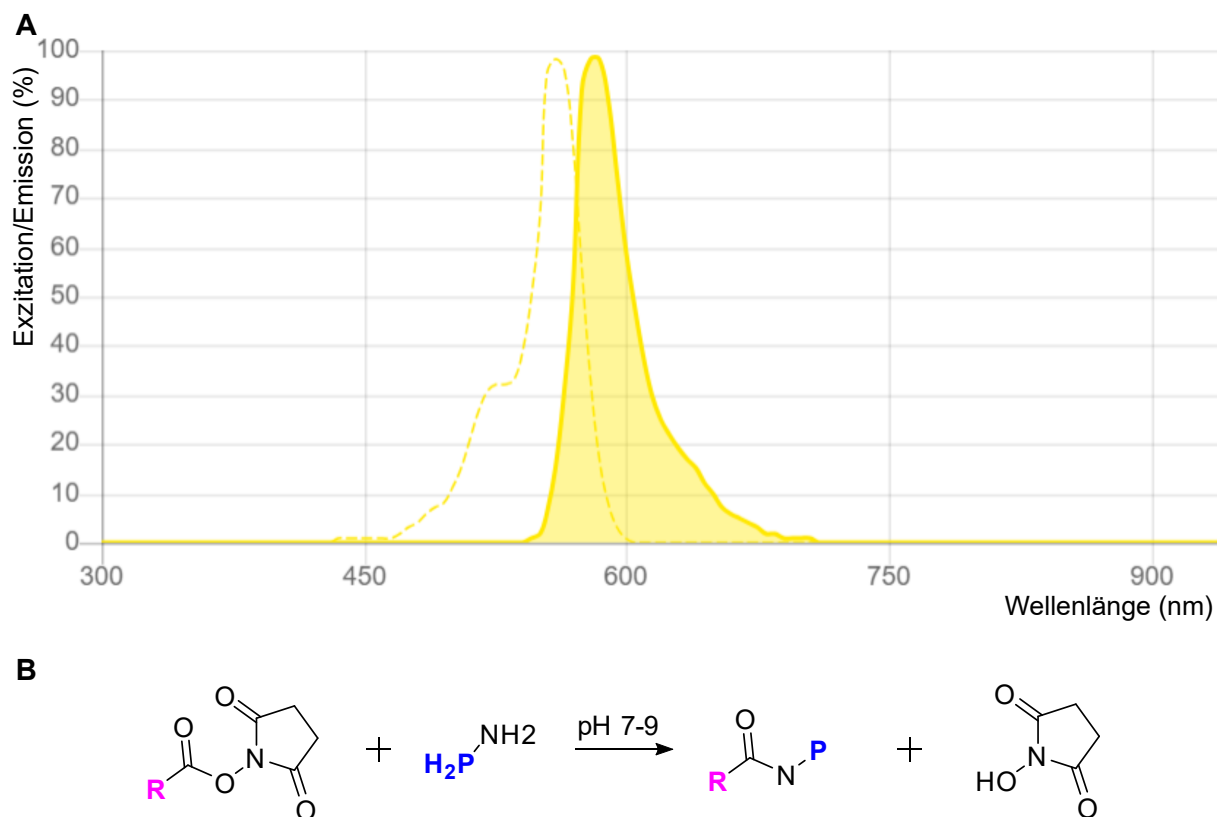


Abbildung 4. Markierung von ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala mit dem Fluoreszenzfarbstoff CF®568. (A) Exzitations- (gestrichelte Linie) und Emissionsspektrum von CF®568 (SpectraViewer, 2023). Das Exzitationsmaximum liegt bei 562 nm, das Emissionsmaximum bei 583 nm. (B) Reaktionsmechanismus der Markierungsreaktion. Der Succinimidylester des Fluoreszenzfarbstoffes (R) reagiert bei pH 7–9 mit primären Aminen der Lysin-Reste (P) unter Bildung einer Amid-Bindung zu einem stabilen Konjugat. Dabei wird N-Hydroxysuccinimid freigesetzt.

Tabelle 6. Reaktionsansätze der Markierungsreaktion mit CF®568. Für die Markierungsreaktion wurden unter Zugabe von 1 M NaHCO₃-Puffer (pH 8,3) Protein und Marker im molaren Verhältnis von 1:15 gemischt. Die finale Proteinkonzentration wurde auf 1,5 mg/ml eingestellt.

Ansatz	10 mM CF®568 in DMSO (µl)	1 M NaHCO ₃ -Puffer, pH 8,3	1,82 mg/ml Protein (µl)
^{His} Dianthin	22,8	30	247,2
Arg24Ala	22,9	30	247,1

Auf Vorversuche zur Bestimmung des optimalen Farbstoff-Protein-Verhältnisses wurde aufgrund von limitierter Proteinmenge und kostenintensivem Farbstoff verzichtet. Aufgrund der niedrigen Proteinkonzentrationen (1,5 mg/ml) wurde ein Verhältnis von 15:1 festgelegt. Die Durchführung erfolgte den Herstellerangaben folgend und möglichst unter Lichtausschluss. Am Ende der Reaktion wurden die Reaktionsprodukte, wie in 2.7.3.3 beschrieben, mittels Ultrafiltration aufgereinigt und der Puffer gegen PBS ausgetauscht. Die Konzentration und der Markierungsgrad der mit CF®568 markierten Proteine wurden, wie vom Hersteller angegeben, aus den Absorptionswerten bei 280 und 562 nm, die mit dem Photometer Biospectrometer® basic bestimmt wurden, errechnet. Um sicher zu gehen, dass beide Proteine bei gleicher Konzentration die gleiche Fluoreszenzintensität aufwiesen,

wurde zusätzlich die Fluoreszenz von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 (100 und 1000 nM) mit dem Mikropplatten-Reader Infinite® 200 (Filter mit Exzitationswellenlänge bei 560/10 nm und Emissionswellenlänge bei 595/35 nm) bestimmt. Hierfür wurden 30 µl jeder Konzentration und PBS als Kontrolle als Triplikat in einer 384-Well-Mikrotiterplatte (schwarz, transparenter Boden) vermessen.

2.7.4 Proteincharakterisierung

2.7.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Darstellung und Auftrennung von Proteinproben erfolgte gelelektrophoretisch mittels SDS-PAGE. Unter Anlegung elektrischer Spannung wandern die Proteine, die durch Anlagerung von SDS negativ geladen sind, abhängig von ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die Poren des Polyacrylamidgels. Durchgeführt wurde die Elektrophorese unter denaturierenden und diskontinuierlichen Bedingungen nach Lämmli (Jansohn & Rothhämel, 2012; Laemmli, 1970). 12,5%ige Trenn- und 5%ige Sammelgele wurden, wie in Tabelle 7 dargestellt, hergestellt. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 4:1 mit Lämmli Auftragepuffer, welcher zur Reduktion der Disulfidbrücken mit 2-Mercaptoethanol nach Herstellerangaben versetzt wurde, gemischt und 15 min bei 95 °C denaturiert. Neben den Proben wurde als Proteinmarker der *Unstained Protein Molecular Weight Marker* aufgetragen. Nach Befüllen der Taschen wurde die SDS-PAGE bei 180 V für 1 h laufen gelassen. Die Färbung der Gele erfolgte über Nacht in einer Coomassie Färbelösung nach Neuhoff *et al.* (Neuhoff *et al.*, 1988). Entfärbt wurden die Gele in 25 % (V/V) Methanol.

Tabelle 7. Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele. Mengen ausreichend zum Herstellen von 4 Gelen.

Reagenz	Trenngel, 12,5 % (ml)	Sammelgel, 5 % (ml)
Acrylamid/Bis-Lösung 37,5:1 (30 % w/v)	8,33	0,834
Trenngel- /Sammelgelpuffer	7,5	0,626
Wasser	3,79	3,42
10 % APS	0,16	0,025
10 % TEMED	0,16	0,05

2.7.4.2 Bestimmung der Adeninfreisetzung (*adenine-releasing assay*)

Die *N*-Glykosidaseaktivität der isolierten und exprimierten RIPs wurde mit dem *adenine-releasing assay* bestimmt (Weng, 2018). Der Assay beruht auf der dünnschichtchromatographischen (DC) Detektion von Adenin, welches durch RIPs von dem künstlichen Oligonukleotid Adenin-30 5'-A₃₀-3'(A30), ein Substrat der *N*-Glykosidasen, abgespalten wird (Barbieri *et al.*, 1997). Dabei wurde nach publizierter Methode vorgegangen (Weng, 2018). Zu Abweichungen kam es bei den

Proteinkonzentrationen, der Inkubationszeit und der Inkubationstemperatur. 169 nM RIP wurden mit 21,4 μ M A30-Substrat in *N*-Glykosidasepuffer (50 mM NaOAc, 100 mM KCl, pH 5; ad 50 μ l) bei 37 °C über Nacht (16,5 h) inkubiert. 10 μ l der Proben wurden mit dem CAMAG® Linomat IV System auf DC-Fertigplatten (Kieselgel 60) mit Fluoreszenzindikator UV₂₅₄ aufgetragen. Die DC wurde mit einem Fließmittelgemisch aus ACN/H₂O/NH₃ (32 %) im Verhältnis 18:1,6:0,6 durchgeführt. Die Messung des freigesetzten Adenins erfolgte densitometrisch bei 260 nm mit dem CAMAG® TLC Scanner 4.

2.7.4.3 Dynamische Differenzkalorimetrie

Die thermische Stabilität verschiedener Proteinproben wurde mit der dynamischen Differenzkalorimetrie (DSC) gemessen. Während der DSC-Messung werden eine Mess- und eine Referenzzelle kontinuierlich gleich erwärmt. In Abhängigkeit der Wärmekapazität der Proteinprobe, wird für die Messzelle mehr (endothermer Prozess) oder weniger (exothermer Prozess) Energie benötigt, um Mess- und Referenzzelle auf gleicher Temperatur zu halten. Dieser Energieunterschied kann als Leistungsausgleich gemessen werden. Die hier beschriebenen Messungen wurden mit einem Nano DSC-Gerät (TA Instruments) durchgeführt. Die Kapillarzellen des Nano DSC fassen ein Volumen von 300 μ l. Proteinproben unterschiedlicher Konzentrationen wurden in PBS vorbereitet. Direkt vor den Messungen wurden sowohl Proben als auch PBS-Puffer 15 min unter Vakuum entgast. Zunächst wurde die Basislinie über Nacht aufgenommen. Hierfür wurden Heiz- und Kühlscans von PBS gegen PBS in einem Temperaturbereich von 10–100 °C und mit einer Abtaste von 1 °C/min dreimal vermessen. Die Messungen erfolgten unter einem Druck von 3,0 atm. Nach Aufnahme der Basislinie wurde der Heizscan der Proteinproben ebenfalls in einem Temperaturbereich von 10–100 °C und mit einer Abtaste von 1 °C/min durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Software NanoAnalyse (TA Instruments).

2.7.5 Massenspektrometrische Methoden

2.7.5.1 In-Gel-Verdau

Der In-Gel-Verdau von Proteinen mit proteolytischen Enzymen ist eine massenspektrometrische Methode in der Proteomik, die es sowohl ermöglicht Proteine zu identifizieren als auch bei der Aufklärung von Proteinsequenzen zu unterstützen. Hauptsächlich wurde in dieser Arbeit das Enzym Trypsin eingesetzt, welches spezifisch Peptidbindungen am Carboxyende der Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet. Bei einigen Proteinproben kamen zusätzlich die Proteasen AspN (spaltet *N*-terminal an Asparaginsäure), LysC (spaltet spezifisch am Carboxyende von Lysin), Chymotrypsin (spaltet am Carboxyende von aromatischen Aminosäuren) und Elastase (spaltet *C*-terminal an Alanin, Valin, Serin, Glycin, Leucin oder Isoleucin) zum Einsatz (Tabelle 8). Der aus dem Verdau resultierende, für das

Protein charakteristische Peptidmassenfingerprint wurde, wie unter 2.7.5.2 beschrieben, vermessen und zur Identifizierung mit Hilfe der Software Mascot Server mit der Proteinsequenzdatenbank Swiss-Prot (568744 Sequenzen; 205548017 Reste) verglichen. Die Suchparameter waren wie folgt festgelegt: Proteinmasse <40 kDa, Peptidmassentoleranz ± 75 ppm, fixe Modifikation Carbamidomethyl (C), variable Modifikation Oxidation (M) und max. eine entgangene Spaltstelle. Mascot Server sucht nach Übereinstimmungen zwischen dem untersuchten Peptidmassenfingerprint und den in der Datenbank hinterlegten Proteinen. Bei Übereinstimmungen wird das identifizierte Protein mit einem Protein Score, der für die in dieser Arbeit untersuchten Proteinproben ab einem Wert von 70 ($p < 0,05$) signifikant war, versehen. Die SDS-Gele wurden, wie in 2.7.4.1 beschrieben, vorbereitet. Im Anschluss erfolgte die In-Gel-Spaltung der Proteinproben nach publizierter Methode (Shevchenko *et al.*, 1996).

2.7.5.2 MALDI-TOF-MS

Die Matrix-unterstützte Laserdesorption/-ionisation Flugzeitanalyse-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) ist ein massenspektrometrisches Verfahren, bei dem der Analyt in einer Matrix auf einem Träger aufgetragen und durch Laserbeschuss unter Vakuum ionisiert wird. Die erzeugten Ionen haben unter hoher angelegter elektrischer Spannung in Abhängigkeit ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) spezifische Flugzeiten und erreichen unterschiedlich schnell den Detektor. Sowohl Massenspektren von In-Gel-verdauten Proteinproben als auch Gesamtproteinmassen wurden mit der MALDI-TOF-MS aufgenommen. Das Auftragen aller Proben erfolgte mit der *dried dropelt* Methode, bei der je 1 μl Matrix mit 1 μl Probe auf einem Parafilm gemischt und 1 μl der Mischung auf den Träger aufgetragen wurden. In Abhängigkeit der Probe wurden hierfür unterschiedliche Matrices (HCCA, 1,5-DAN und SA) verwendet. In Tabelle 8 und Tabelle 9 sind die vermessenen Proteinproben und die verwendeten Messparameter aufgeführt. Ausgewählte tryptische Peptide wurden zusätzlich mittels Tandem-Massenspektroskopie (MS/MS) analysiert. Hierfür wurde das MALDI-Gerät in den LIFT Modus versetzt und MS/MS-Spektren wurden aufgezeichnet. Für die in Tabelle 9 aufgeführten intakten Proteinproben wurde entweder die Gesamtmasse des intakten Proteins oder die *N*-terminalen c-Ionen und *C*-terminalen ($z + 2$)-Ionen mittels *in-source decay* (ISD) bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FlexAnalysis. Die Messungen an der MALDI-TOF-MS und die Auswertung der Massenspektren wurden von Dr. Christoph Weise (Institut für Chemie und Biochemie, FU Berlin) durchgeführt.

Tabelle 8. MALDI-Messungen der In-Gel-verdauten Proteinproben und deren Parameter. Für alle Messungen wurde HCCA als Matrix eingesetzt. Die Massenspektren wurden im positiven Reflektron-Modus (RP_PepMix) aufgenommen.

Probe	Proteasen	Aufgenommener Massenbereich	Gerät
Sapovaccarin-S1 und -S2	Trypsin, Chymotrypsin, LysC, AspN	600–4000 Da	Ultraflex II
^{His} Dianthin	Trypsin, Chymotrypsin, Elastase	700–3500 Da	Ultraflex II & UltrafleXtreme
^{His} Dianthin Arg24Ala	Trypsin, AspN	700–3500 Da	Ultraflex II
^{His} Agrostin	Trypsin	700–3500 Da	UltrafleXtreme
^{His} Agrostin Arg23Ala	Trypsin	700–3500 Da	UltrafleXtreme
^{His} Sapovaccarin-S1	Trypsin	700–3500 Da	UltrafleXtreme
^{His} Sapovaccarin-S1 Arg24Ala	Trypsin	700–3500 Da	UltrafleXtreme

Tabelle 9. MALDI-Messungen intakter Proteinproben und deren Parameter. Die Matrix und der Aufnahme-Modus variierten in Abhängigkeit der Probe. Neben dem Modus RP_PepMix wurde auch der positive Linear-Modus (LP_ProtMix) verwendet.

Probe	Matrix	Modus	Aufgenommener Massenbereich	Gerät
Sapovaccarin-S1 und -S2	1,5-DAN	RP_PepMix (ISD)	600–6000 Da	Ultraflex II
^{His} Dianthin	1,5-DAN	RP_PepMix (ISD)	700–4000 Da	UltrafleXtreme
^{His} Dianthin	SA	LP_ProtMix (Gesamtmasse)	5–55 kDa	UltrafleXtreme
^{His} Dianthin-CF568	SA	LP_ProtMix (Gesamtmasse)	5–55 kDa	UltrafleXtreme
^{His} Dianthin Arg24Ala-CF568	SA	LP_ProtMix (Gesamtmasse)	5–55 kDa	UltrafleXtreme

2.7.5.3 LC-ESI-MS/MS

Die *liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry* (LC-ESI-MS/MS) wurde angewendet, um die intakte Proteinmasse des isolierten Sapovaccarin-S1 und -S2 zu bestimmen und durch In-Gel-Verdau erhaltene Peptide zu vermessen. Bei diesem Verfahren ist dem Massenspektrometer eine Flüssigkeitschromatographie vorgeschaltet und die Ionisierung der flüssigen Probe erfolgt durch Verneblung bei Atmosphärendruck in einem Hochspannungsfeld. Die Messung wurde wie publiziert durchgeführt (Schlaak *et al.*, 2022). Zur Auswertung der Spektren wurde das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis in die wirkliche Masse des Proteins umgewandelt. Diese Umwandlung wird Dekonvolution genannt. Die Messungen an der Orbitrap Q ExactiveTM HF und die Auswertung der

Massenspektren mit der Software BioPharma Finder™ wurden von Dr. Benno Kuropka (Institut für Chemie und Biochemie, FU Berlin) durchgeführt.

2.7.5.4 Native MS

Mit der nativen MS können Proteine und auch Protein-Liganden-Komplexe in ihrer nativen Konformation gemessen und ihre Stöchiometrie bestimmt werden. Die native MS wurde angewendet, um die Bindung von HisDianthin und SO1861 zu charakterisieren. Für die Messung müssen Protein und Ligand in einem flüchtigen Puffer vorliegen, damit sie in ihrem nativen Zustand gemessen werden können. Hierfür wurde HisDianthin mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer pH 6,24 dialysiert (2.7.3.3) und auf eine Konzentration von 10 µM eingestellt. 100 µM SO1861 wurden direkt in 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6,24) gelöst. Zunächst wurden die Massenspektren von HisDianthin und SO1861 separat aufgenommen. Anschließend wurden die gemeinsamen Massenspektren HisDianthin und SO1861 im Verhältnis 1:3, 1:5 und 1:10 (10 µM HisDianthin + 30 µM, + 50 µM, + 100 µM SO1861) aufgenommen. Die Aufnahme der nativen Massenspektren erfolgte an der Orbitrap Q Exactive™ HF im intakten Proteinmodus. Die direkte Injektion erfolgte im offline nanoESI Modus. Gemessen wurde über einen Massenbereich von 1000–4000 m/z und mit einer Auflösung von $R = 15000$, um die Durchschnittsmassen zu bestimmen. Die ISD war auf 100 eV eingestellt. Für die Datenanalyse und die Dekonvolution wurden die Softwares FreeStyle™ und BioPharma Finder™ verwendet.

Die nativen MS-Messungen an der Orbitrap Q Exactive™ HF und die Auswertung der Massenspektren wurden von Dr. Benno Kuropka (Institut für Chemie und Biochemie, FU Berlin) durchgeführt.

2.7.6 Zellbiologische Methoden

2.7.6.1 Kultivierung und Aussaat der Zellen

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in 25 cm²-Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37 °C, unter gesättigter Wasserdampf-atmosphäre und 5 % CO₂. Dreimal pro Woche wurden die Zellen in Abhängigkeit ihrer Dichte im Verhältnis 1:6 oder 1:8 passagiert. Hierfür wurde das alte Medium entfernt, die Zellen mit 10 ml DPBS gespült und mit 1,5 ml Trypsin-Lösung für 5–10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Kulturmedium versetzt, vereinzelt und anteilig in eine neue Kulturflasche überführt. Die Zusammensetzung der Kulturmedien ist in Tabelle 10 dargestellt. Für die Zytotoxizitätsuntersuchungen wurde die in Tabelle 10 aufgelistete Zellanzahl in einer transparenten 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und 24 h anwachsen gelassen. Für das Monitoring des Zellwachstums wurde das CytoSMART™ Omni System verwendet. Das optische Hellfeldmikroskop nimmt in zeitlichem Abstand Bilder der Mikrotiterplatte auf und errechnet auf Grundlage eines Algorithmus die Zellkonfluenz. Um zu verhindern, dass sich Kondensationstropfen am Deckel der Mikrotiterplatte bilden und diese die Qualität der Aufnahmen beeinträchtigen, wurde der Deckel der Platte mit 0,1 %

Triton X in DPBS behandelt. Alle Experimente im Inkubator (2.7.6.2 bis 2.7.6.6) wurden unter den gleichen Bedingungen (37 °C, unter gesättigter Wasserdampfatmosphäre und 5 % CO₂) durchgeführt.

Tabelle 10. Für die Zytotoxizitätsuntersuchungen verwendete Zelllinien. Zu Beginn jeden Experimentes wurde eine für jede Zelllinie spezifische Zellanzahl, die in Vorversuchen bestimmt wurde, in einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät.

Zelllinie	Zusammensetzung Kulturmedium	Aussaat Zellen/Well	Volumen Medium/Well (µl)
Neuro-2A	DMEM (1,0 g/l Glucose) + 2 mM Glutamin + 10 % FBS + 1 % NEAA	4000	100
HCT116	McCoy's 5A Medium + 10 % FBS + 2 mM Glutamin	5000	100
A2058	DMEM (4,5 g/l Glucose) + 2 mM Glutamin + 10 % FBS + 1 % NEAA	5000	100

2.7.6.2 Screening der ^{His}Dianthin-Mutanten auf zytotoxische Aktivität

Der Einfluss der substituierten basischen Aminosäuren des ^{His}Dianthins auf die Interaktion mit SO1861 wurde anhand der synergistischen Zytotoxizität bestimmt. Die Zugabe von SO1861 verstärkt die endosomale Freisetzung der RIPs und ermöglicht die Messung eines zytotoxischen Effektes auch bei geringen Proteinkonzentrationen (Gilabert-Oriol *et al.*, 2015). Eine reduzierte Wechselwirkung zwischen ^{His}Dianthin-Mutante und SO1861 hätte eine reduzierte endosomale Freisetzung der ^{His}Dianthin-Mutante zur Folge. Der zytotoxische Effekt wäre demzufolge geringer ausgeprägt. Um eine Reduktion der Zytotoxizität messen zu können, wurden zunächst die ^{His}Dianthin- und die SO1861-Konzentration optimiert. Es wurde die niedrigste ^{His}Dianthin-Konzentration bestimmt, für die die synergistische Zytotoxizität in Neuro-2A-Zellen noch maximal war. Entsprechend wurde mit der SO1861-Konzentration verfahren: In Kombination mit ^{His}Dianthin sollte der maximale zytotoxische Effekt erreicht werden, gleichzeitig sollte die eigene SO1861-Toxizität möglichst gering sein. Konzentrationen von 1 nM Protein und 1 µg/ml SO1861 erwiesen sich als optimale Bedingungen. Die Zytotoxizität jeder ^{His}Dianthin-Mutante wurde sowohl mit (+) als auch ohne (–) Zugabe von 1 µg/ml SO1861 bestimmt. Als Kontrollen wurden sowohl ^{His}Dianthin ± SO1861 (Positivkontrolle) und PBS ± SO1861 (Negativkontrolle) vermessen. Nachdem, wie in 2.7.6.1 beschrieben, ausgesät wurde, wurde nach 24 h 55 µl Medium aus jedem Well entfernt, die in 55 µl frischem Medium vorbereiteten Proben (je als Triplikat) hinzugefügt und für weitere 48 h inkubiert. Zusätzlich zu den Konfluenzaufnahmen des CytoSMART™ Omni Systems wurde die Zytotoxizität mit dem MTT-Assay (s. 2.7.6.4) ausgewertet.

2.7.6.3 Untersuchung der Zytotoxizität verschiedener Proteinproben

Die Zytotoxizität verschiedener Proteinproben und ihrer Referenzproteine wurde mit Zugabe von 1 µg/ml SO1861 (+ SO1861) und ohne Zugabe von SO1861 (– SO1861) untersucht. Die Zellen wurden, wie in 2.7.6.1 beschrieben, ausgesät und 24 h anwachsen gelassen. Nach 24 h wurden 55 µl Medium aus jedem Well entfernt und durch Proteinprobe ± SO1861 bzw. Referenzprotein ± SO1861, je in frischem Medium vorbereitet, ersetzt. Die Inkubation wurde für weitere 48 h fortgeführt. PBS ± SO1861 wurde äquivalent zu den Proben als Kontrolle mitbearbeitet. Ein MTT-Assay (s. 2.7.6.4) wurde zusätzlich zu den Konfluenzaufnahmen mit dem CytoSMART™ Omni System durchgeführt.

Tabelle 11. Durchgeführte Zytotoxizitätsuntersuchungen.

Proteinprobe	Referenzprotein	Konzentration (nM)	Zelllinie
^{His} Sapovaccarin-S1	Isoliertes Sapovaccarin-S1/-S2	0,1 und 1	Neuro-2A
^{His} Dianthin Arg24Ala	^{His} Dianthin	0,1 und 1	Neuro-2A, HCT116, A2058
^{His} Dianthin Arg24Ala	^{His} Dianthin	10, 100 und 1000	Neuro-2A
^{His} Dianthin Arg24Ala-CF568	^{His} Dianthin-CF568	0,1; 1, 10 und 100	Neuro-2A
^{His} Sapovaccarin-S1 Arg24Ala	^{His} Sapovaccarin-S1	0,1 und 1	Neuro-2A
^{His} Agrostin Arg23Ala	^{His} Agrostin	0,1 und 1	Neuro-2A

2.7.6.4 MTT-Assay

Der MTT-Assay, eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Zellviabilität, wurde am Ende jeder zytotoxischen Untersuchung als Endpunkt-Assay durchgeführt. Lebende, stoffwechselaktive Zellen reduzieren 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu blau-violetter Formazan (Abbildung 5), welches photometrisch quantifiziert werden kann (Mosmann, 1983). Als Erstes wurde das komplette Kulturmedium aus der 96-Well-Mikrotiterplatte abgezogen. Das MTT-Reagenz wurde mit einer finalen Konzentration von 0,5 mg/ml in dem der Zelllinie entsprechenden Kulturmedium (Tabelle 10) hergestellt. In jedes Well wurden 100 µl MTT-Reagenz gefüllt. Die Inkubation erfolgte 2 h im Inkubator. Nach Abziehen des MTT-Reagenzes wurde das wasserunlösliche Formazan-Produkt, welches sich in den adhären Zellen am Boden des Wells bildet, mit 100 µl/Well DMSO 25 min lang in Lösung gebracht. Zum Homogenisieren des Farbstoffes wurde die 96-Well-Mikrotiterplatte vor der Messung mit dem Mikroplatten-Reader 5 min geschüttelt. Die Messung erfolgte bei zwei Wellenlängen: einer Messwellenlänge von 560 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Nach Subtraktion der Absorptionen der Referenzwellenlänge von den Absorptionen der Messwellenlänge wurde die Absorption der Testsubstanzen mit der Absorption der Kontrollzellen (Behandlung nur mit DPBS) verglichen und daraus die Zytotoxizität ermittelt.

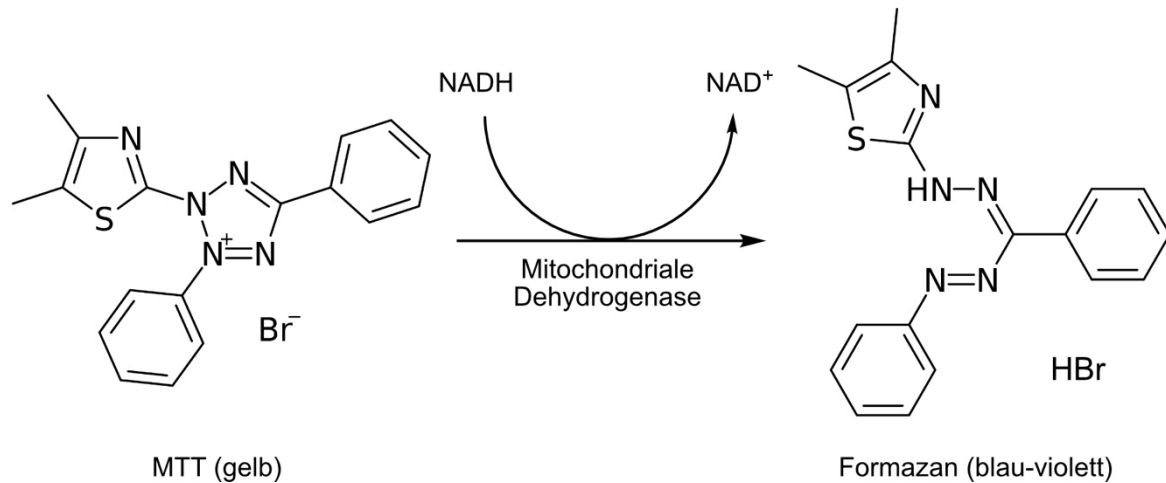


Abbildung 5. Bildung des Formazan-Produktes aus MTT. Wasserlösliches MTT wird in lebenden Zellen durch die mitochondriale Dehydrogenase zu wasserunlöslichem Formazan reduziert (Mosmann, 1983).

2.7.6.5 Fluoreszenzaufnahmen von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568

Für die Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop Lux3 FL wurden 10000 Zellen/Well (in 100 μl Medium) in einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und 24 h im Inkubator wachsen gelassen. Nach 24 h wurden je Well 55 μl Medium entfernt und durch in frischem Medium vorbereitetes ^{His}Dianthin-CF568 + SO1861 bzw. ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 + SO1861 (finale Konzentrationen: 100 nM Protein, 1 $\mu\text{g/ml}$ SO1861) ersetzt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde das komplette Medium entfernt, durch 100 μl frisches, probenfreies Medium ersetzt und die Aufnahmen mit dem Lux3 FL durchgeführt. Hierbei wurde zunächst der Fokus des Hellfeldmikroskops (*brightfield*) und anschließend darauf angepasst der Fokus des Fluoreszenzmikroskops eingestellt. Für die Messung wurde der rote Fluoreszenzfilter (Anregung: 561/14 nm, Emission: 630/90 nm) verwendet. Die Messparameter waren die folgenden: Expositionszeit 500 ms, *Gain* 45 und Intensität 90 %.

2.7.6.6 Endozytose-Assay

Die Endozytose von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 wurde mit dem CytoFLEX mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Durchflusszytometrie untersucht Zellen, die einzeln eine Flusszelle passieren und dabei von einem Laser angestrahlt werden. Dabei wird sowohl die Lichtstreuung an den Zellen als auch die Fluoreszenz gemessen. Die beiden optischen Detektoren sind der *forward scatter* (FSC), der die Streuung entlang der Laserlinie detektiert und der *side scatter* (SSC), der die Streuung im 90° Winkel zur Laserlinie misst. Der CytoFLEX verwendet zur Messung der Fluoreszenz verschiedene Bandpassfilter. Für den Endozytose-Assay wurden 10000 Zellen/Well (in 100 μl) in einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und 24 h im Inkubator wachsen gelassen. Um die Endozytose zeitabhängig (nach 0, 2, 6, 16 und 24 h) zu untersuchen, erfolgte die Zugabe der Proben in umgekehrter Reihenfolge zu verschiedenen Zeitpunkten. Je 24, 32, 42, 46 und 48 h (entsprechend einer

24-, 16-, 6-, 2- und 0-stündigen Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Protein) nach der Aussaat der Zellen wurden 55 µl Medium aus jedem Well entfernt und 100 nM ^{His}Dianthin-CF568 bzw. ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 in 55 µl frischem Medium hinzugefügt. Im Vorversuch erwies sich eine Konzentration von 100 nM als die am besten am Durchflusszytometer messbare Konzentration. Als Kontrolle wurde DPBS äquivalent zu den Proben in 55 µl frischem Medium 24 h nach Aussaat hinzugegeben. 48 h nach Aussaat wurde das Medium aus allen Wells entfernt und gegen je 150 µl Trypsin-Lösung ausgetauscht. Nach 10-minütiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen jedes Wells vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren abgelöst, vereinzelt und bis zur Messung auf Eis gelagert. Je Probe wurden 10000 Zellen mit einer Flussrate von 60 µl/min am CytoFLEX vermessen. Die Auswertung der Fluoreszenzintensität erfolgte mit der Software CytExpert über den Median der Peakhöhe im PE-Kanal, einem 585/42 nm Bandpassfilter. Nur Einzelzellen wurden in die Analyse eingeschlossen. Doubletten wurden mittels FSC-H (Höhe) gegen FSC-A (Fläche) Plot und Zelltrümmer mittels SSC-A gegen FSC-A Plot ausgeschlossen.

2.7.7 Statistische Methoden

Alle Daten wurden zunächst mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Ausreißer normalverteilter Daten wurden mit dem Ausreißertest nach Grubbs ermittelt und von der Analyse ausgeschlossen. Die statistische Signifikanz normalverteilter Daten wurde mit dem Student's *t*-Test bestimmt. Nicht normalverteilte Daten wurden mit dem U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney auf Signifikanz geprüft. Alle Werte sind als arithmetische Mittel ± Standardabweichung dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung und Sequenzierung von Sapovaccarin-S1 und -S2

Die in 3.1.1 bis 3.1.8 folgenden Daten wurden 2022 im Journal *Toxins* publiziert (Schlaak *et al.*, 2022). Dargestellte Abbildungen entsprechen den Abbildungen der Publikation. Teilweise wurden die Abbildungen für diese Arbeit angepasst.

3.1.1 Proteinisolierung aus den Samen der *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm.

Die Isolierung der RIPs aus der *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm. wurde mit ganzen, getrockneten Samen durchgeführt (2.7.1.1). Um zu vermeiden, dass die Fette, die sich in großer Menge (Gehalt 2–3 %) im Samen befinden, die Proteinisolierung stören, wurde das gemahlene Samenpulver entfettet (Efthimiadou, 2012; Zhou G., 2016). Aus den entfetteten Samen wurde anschließend durch wässrige Extraktion (PBS, pH 7,4, 4 °C) der Rohextrakt gewonnen (2.7.1.2). Die SDS-PAGE der einzelnen Isolierungsschritte ist in Abbildung 6 dargestellt. Der Rohextrakt setzte sich aus zahlreichen, verschiedenen Proteinen zusammen und zeigte im Massenbereich von 20–35 kDa, dem Massenbereich der charakteristisch für Typ I RIPs ist, vielversprechende Proteinbanden (Abbildung 6, Spur III) (Shi *et al.*, 2016). Die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (2.7.1.2). führte zur Aufkonzentrierung der Proteine und gleichzeitigen Aufteilung in Proteinfractionen. Die bei 30 %, 60 % und 90 % Ammoniumsulfatsättigung erhaltenen Fraktionen enthielten genauso wie der Rohextrakt Proteine im Massenbereich der Typ I RIPs (Abbildung 6, Spuren IV–VI).

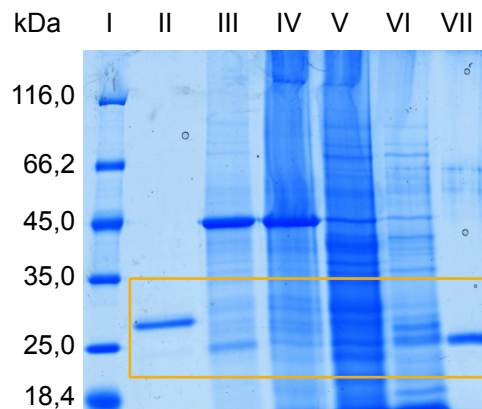


Abbildung 6. 12,5 %iges Polyacrylamidgel der Isolierungsschritte von Sapovaccarin-S1 und -S2 aus den Samen der *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm. (angefärbt mit Coomassie). Orange hervorgehoben ist der für Typ I RIPs charakteristische Massenbereich von 20–35 kDa (Shi *et al.*, 2016). I: Proteinmarker. II: Referenzprotein ^{His}Dianthin (0,66 µg). III: Wässriger Rohextrakt (4,83 µg). IV: 30 %-Fraktion der Ammoniumsulfatfällung (40,03 µg). V: 60 %-Fraktion der Ammoniumsulfatfällung (45,76 µg). VI: 90 %-Fraktion der Ammoniumsulfatfällung (28,6 µg). VII: Isoliertes Sapovaccarin-S1 und -S2 (0,55 µg), gewonnen mittels Kationenaustauschchromatographie (Elution bei 300 mM NaCl) aus der 90 %-Fraktion der Ammoniumsulfatfällung. *Abb. modifiziert nach Schlaak et al.*

Am intensivsten war die Bande des entsprechenden Massenbereichs der 90 %-Fraktion (Abbildung 6, Spur VI). Die erhaltenen Ammoniumsulfat-Fractionen wurden in einer früheren Arbeit bereits auf ihre *N*-Glykosidaseaktivität überprüft (Schlaak, 2020). In allen drei Fraktionen konnte *N*-Glykosidaseaktivität nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der SDS-PAGE, wies die 90 %-Fraktion die höchste Enzymaktivität auf und wurde für die weitere Isolierung mittels Kationenaustauschchromatographie ausgewählt (Schlaak, 2020). Der bei 300 mM NaCl erhaltene Peak wies eine Proteinbande bei ca. 25 kDa (geschätzt aus der SDS-PAGE), der charakteristischen Größe von Typ I RIPs, auf (Abbildung 7 & Abbildung 6, Spur VII). Insgesamt konnten aus der 90 %-Fraktion 8,56 mg Sapovaccarin-S1 und -S2 pro 100 g Samen isoliert werden.

Aufnahmen mittels hochauflösender MS zeigten für die isolierte Proteinfraction zwei monoisotopische Massen mit einer Massendifferenz von 30 Da: ein Hauptpeak bei 28763,24 Da und ein zusätzlicher Peak mit schwächerer Intensität (43 %) bei 28793,24 Da (Abbildung 8). Aufgrund der Massenpeaks im dekonvuliertem Massenspektrum wurde davon ausgegangen, dass die isolierte Proteinfraction aus zwei RIPs zusammengesetzt war. Die sehr ähnlichen Massen deuteten darauf hin, dass es sich möglicherweise um Isoformen handelte. Den beiden RIPs wurde der Name Sapovaccarin-S1 und -S2 zugeordnet.

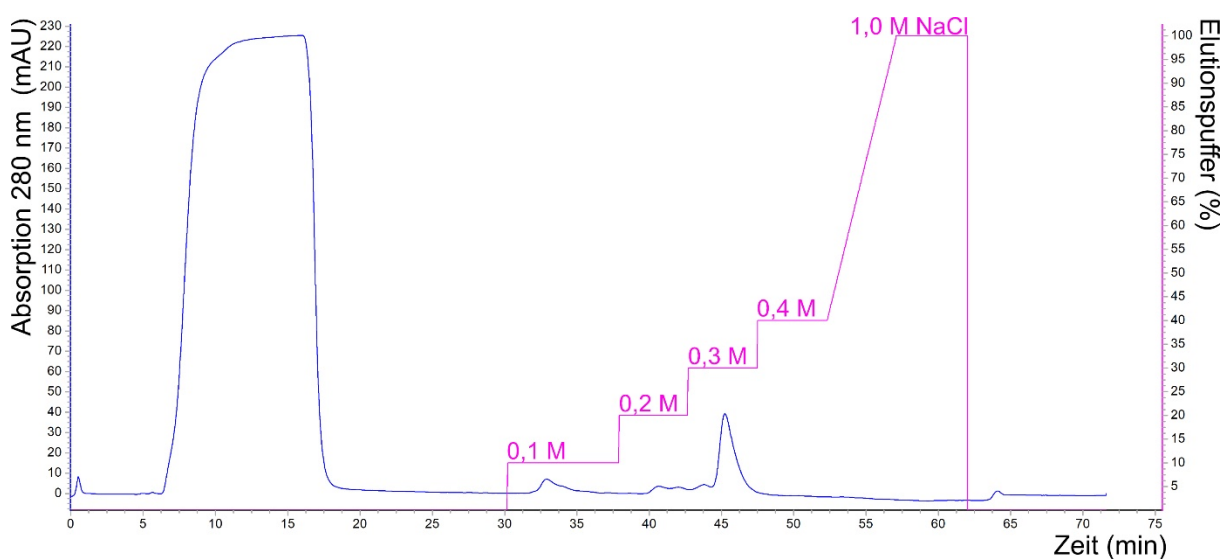


Abbildung 7. Chromatogramm der Kationenaustauschchromatographie der Isolierung von Sapovaccarin-S1 und -S2 (2.7.1.2). Nach Anpassung des Puffers der 90 %-Fraktion der Ammoniumsulfatfällung an den Startpuffer (50 mM HEPES, pH 7,0) wurde diese auf eine HiTrapTM SP XL Säule (betrieben mit der ÄKTATM start) aufgetragen. Die Elution erfolgte als Stufengradient mit 1 M NaCl in 50 mM HEPES, pH 7,0. Sapovaccarin-S1 und -S2 eluierten bei 0,3 M NaCl (s. Abbildung 6, Spur VII). *Abb. modifiziert nach Schlaak et al.*

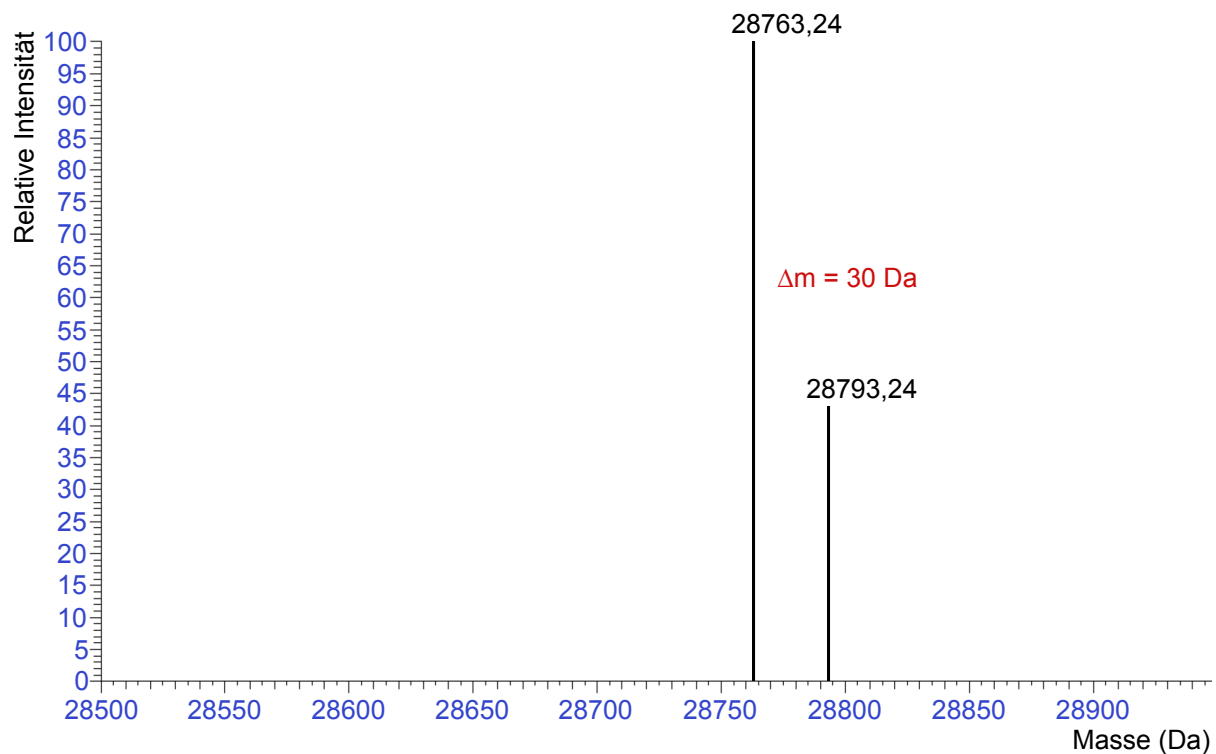


Abbildung 8. Dekonvolviertes Massenspektrum der isolierten Proteinfraction (entspricht Spur VII der SDS-PAGE). Zwei monoisotopische Massen, 28763,24 Da und 28793,24 Da mit einer Massendifferenz (Δm) von 30 Da, wurden mittels hochauflösender MS-Messung (Orbitrap Q Exactive™ HF) ermittelt. Auf der y-Achse ist die relative Intensität und auf der x-Achse die dekonvolvierte Masse in Da dargestellt. *Abb. modifiziert nach Schlaak et al.*

3.1.2 MALDI-TOF-MS-Analyse des In-Gel-Verdaus mit Trypsin

Die in diesem Abschnitt gezeigten Daten wurden bereits im Rahmen meiner Masterarbeit dargelegt (Schlaak, 2020). Damit die restliche Sequenzierung von Sapovaccarin-S1 und -S2, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, nachvollziehbar bleibt, werden die Daten kurz erläutert. Die Proteinbande von Sapovaccarin-S1 und -S2 wurde mittels In-Gel-Verdau mit Trypsin und anschließender MALDI-TOF-MS analysiert (2.7.5.1 & 2.7.5.2). Die resultierenden Peptide konnten einerseits die Identität von Sapovaccarin-S1 und -S2 als Typ I RIP bestätigen und dienten gleichzeitig der *de novo* Analyse von sechs Peptiden. Für die Identitätsprüfung wurden die Peptidmassenfingerprints mit der Software Mascot Server mit der Swiss-Prot-Datenbank verglichen. Einige Peptide stimmten mit den Sequenzen bekannter Typ I RIPs überein, wodurch Sapovaccarin-S1 und -S2 als Typ I RIP identifiziert werden konnten. Gleichzeitig konnten einige dominierende Peptide nicht den Sequenzen bekannter Typ I RIPs zugeordnet werden. Die Sequenzen von Sapovaccarin-S1 und -S2 wichen demzufolge von den bisher identifizierten Sequenzen der Typ I RIPs ab. Mittels MS/MS-Analyse wurden die Sequenzen von sechs tryptischen Peptiden *de novo* bestimmt (Tabelle 12). Insgesamt wurden mit der Methode 64 Aminosäuren von Sapovaccarin-S1 und -S2 identifiziert.

Tabelle 12. Sequenzierung der Peptidmassenfingerprints von Sapovaccarin-S1 und -S2. Mit der Proteinbande von Sapovaccarin-S1 und -S2 (Abbildung 6, Spur VII) wurde ein In-Gel-Verdau mit Trypsin durchgeführt (2.7.5.1). Peptidmassenfingerprints wurden mit der MALDI-TOF-MS (Ultraflex-II TOF/TOF) aufgenommen. Sechs tryptische Peptide bestehend aus insgesamt 64 Aminosäuren wurden *de novo* mittels MS/MS-Analyse und durch manuelle Interpretation der MS/MS-Spektren durch Dr. Christoph Weise (Biochemie, FU Berlin) bestimmt (2.7.5.2).

M + H	Peptidsequenz
1058,51	GQYSSFVDR
1487,78	YGGTDIAVIGAPPTR
797,46	INLQGPR
1731,88	AYYFRNQITSAELR
1189,61	NAQITQGSQSR
948,41	DYDFGFGK

3.1.3 Sequenzierung von Sapovaccarin-S1 und -S2 mittels PCR

Für die vollständige Bestimmung der Sequenzen von Sapovaccarin-S1 und -S2, wurden massenspektrometrische mit molekularbiologischen Methoden kombiniert. Die unter 3.1.2 mittels MS/MS-Analyse identifizierten Peptidsequenzen wurden als Grundlage für das Designen von PCR-Primern verwendet. Hierfür wurden die identifizierten Peptidsequenzen mit bekannten Typ I RIP-Sequenzen auf Übereinstimmungen überprüft. Die DNA der bekannten Typ I RIPs, die für übereinstimmende Aminosäureabschnitte kodiert, wurde für das Designen der Primer verwendet. Die für Typ I RIPs kodierende DNA enthält in den meisten Fällen keine Introns (Bolognesi *et al.*, 2016). Daher wurde die Template-DNA direkt aus den Samen der *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm. isoliert (2.7.2.1). Zwei PCR-Runden wurden durchgeführt, bis der in Abbildung 9 dargestellte DNA-Abschnitt erhalten wurde. Der *forward* Primer A (Abbildung 9, grün markiert) wurde abgeleitet von der DNA von Gypsophilin-S und der *reverse* Primer A wurde auf Basis der DNA von Saporin-S6 designt (Kokorin *et al.*, 2019; Maras *et al.*, 1990). Mit dem Primerpaar A konnten 351 bp sequenziert werden. Um die Sequenz zu vervollständigen, wurde eine zweite PCR-Runde durchgeführt. Der eingesetzte *reverse* Primer B (Abbildung 9, rot markiert) wurde mit Hilfe der sequenzierten Sapovaccarin-DNA der ersten PCR-Runde designt. Vor Beginn dieser Arbeit wurden von Bolognesi *et al.* die 30 *N*-terminalen Aminosäuren eines RIPs aus der *Vaccaria pyramidata* Medik. sequenziert (Bolognesi *et al.*, 1995). Diese *N*-terminalen Aminosäuren wiesen hohe Übereinstimmungen mit dem *N*-Terminus von Dianthin-30 auf. Daher wurde der *forward* Primer B aus der DNA des *N*-Terminus von Dianthin-30 abgeleitet (Legname *et al.*, 1991). Mit der zweiten PCR-Runde konnten 449 bp, die sich in 72 bp mit dem ersten PCR-Produkt überlappten, sequenziert werden. Beide Sequenzen wurden kombiniert und ergaben eine 727 bp große DNA-Sequenz, die mit dem Online-Tool ExPASy Translate in 242 Aminosäuren übersetzt werden konnte (Gasteiger *et al.*, 2003). Der identifizierte Abschnitt wurde Sapovaccarin-S1 zugeordnet und machte über 95 % der finalen Aminosäuresequenz aus. Mit den zwei PCR-Runden konnten *N*-terminal fünf und *C*-terminal sieben Aminosäuren nicht identifiziert werden.

Alle sechs Peptide der Tabelle 12 wurden in der mittels PCR bestimmten Aminosäuresequenz wiedergefunden. So konnte bestätigt werden, dass die sequenzierte DNA mit den sequenzierten, tryptischen Peptiden übereinstimmte.

```

ATTAAATCTCGCAAATCCGAGCAAGGGTCAGTACTCGTCTTTTGTGGATAGAATCCGAAA 60
Forward Primer B
CAATGTAAGGGATCCGAAACTGAAATACGGTGGGACTGATATAGCCGTGATAGGGGCGCC 120
GCCTACTCGAGAAAAATACCTTAGAATAAATTTGCAAGGTCTTAGAGGAACAGTCTCACT 180
TGGGCTGAGACGAGAGAATTTGTACGTAGTCGCGTATTTGGCAATGGATAACACGAATAC 240
TAATAAGGCATATTACTTTAGAAATCAAATTACTAGTGCCGAGTTAAGGACCGTTTTTCCC 300
CGAGGCCACAGCCGCGAATCAGATAGTTATACAGTACGGGGAAGATTATCAGTCGATAGA 360
AAGGAATGCCCAGATTACACAAGGGAGTCAAAGTAGAAAAGAAGTCCGGGTTGGGGATCGA 420
Forward Primer A
TTTACTTGTAAACGTCAATTGATGGAGTCAACAGGAAGGCACGTGTGGTTAGAAACGAAGC 480
Reverse Primer B
TAGGTTTCTACTTATCGCTATTCAAATGACGGCTGAGGCAGCGCGTTTTAGGTACATACA 540
GAATTTGGTGACCTTCAACTTTCCTAAGAAGTTCGACTCTGATAACAAGGTGATTCAGTT 600
TGAAGTTAGCTGGGGAAAGATTTCTAGGGCGATATATGGGGATTGCAAAAACGGCGTGTT 660
TAATAAAGATTATGATTTCCGGGTTGGGAAAGTGAGGCAGGCGAAGCAACTCCAAATGGG 720

ACTCCTT 727
Reverse Primer A

```

Abbildung 9. Sequenzierung von Sapovaccarin-S1 mittels PCR. Mittels PCR konnte der abgebildete DNA-Abschnitt von Sapovaccarin-S1 bestimmt werden. Der *forward* Primer A (grün markiert) wurde abgeleitet von der DNA von Gypsophilin-S und der *reverse* Primer A von der DNA von Saporin-S6 (Kokorin *et al.*, 2019; Maras *et al.*, 1990). Mit der ersten PCR-Runde wurden 351 bp sequenziert. Die zweite PCR-Runde wurde mit dem *reverse* Primer B (rot markiert), der auf Grundlage der sequenzierten Sapovaccarin-DNA der ersten PCR-Runde designiert wurde und dem *forward* Primer B, der vom N-Terminus von Dianthin-30 abgeleitet wurde, durchgeführt (Legname *et al.*, 1991). Mit der zweiten PCR-Runde konnten 449 bp, die sich in 72 bp mit dem ersten PCR-Produkt überlappten, sequenziert werden. *Abb. modifiziert nach Schlaak et al.*

3.1.4 Differenzierung zwischen Sapovaccarin-S1 und -S2

Wie in Abbildung 8 dargestellt, wurden für die isolierte Proteinfraction der Kationenaustauschchromatographie mittels MS zwei monoisotopische Massen im Verhältnis von ungefähr 3:1 und mit einer Massendifferenz von 30 Da gemessen. In dem Massenspektrum der tryptischen Peptide war bei dem Peptid mit einer Masse von 2842,2 Da (Aminosäureposition 102–126, TVFPEATAANQIVIQYGEDYQSIER) ein weiteres, schwächeres Signal (ca. ein Drittel des Hauptsignals) mit einer Masse von 2872,4 Da (Aminosäureposition 102–126, TVFPEATATNQIVIQYGEDYQSIER) zu verzeichnen (Abbildung 10). Die Peptide unterschieden sich, wie auch die monoisotopischen Massen, um genau 30 Da.

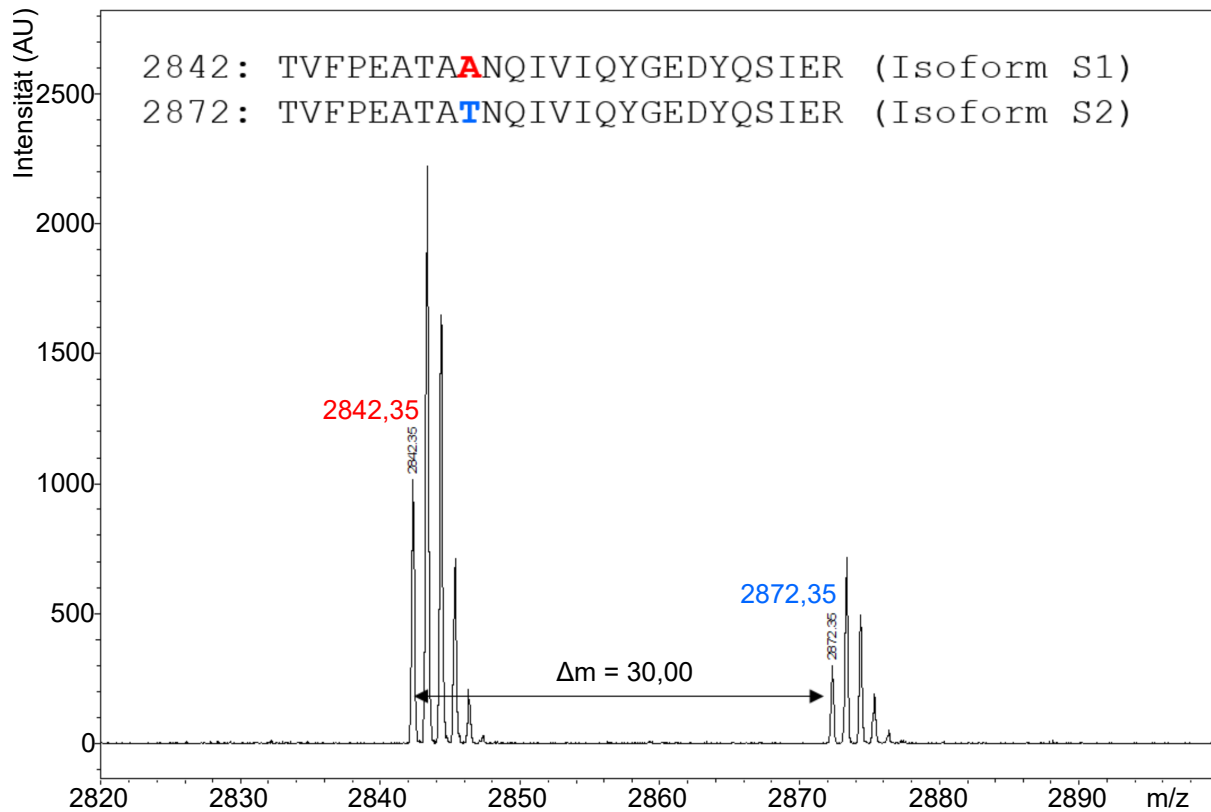


Abbildung 10. Differenzierung der Sapovaccarin-S1 und -S2 Isoformen auf Proteinebene. Zoom in den Bereich des Massenspektrums des tryptischen Verdau von Sapovaccarin-S1 und -S2. Dargestellt ist das tryptische Peptid der Positionen 102–126, aus dem der Unterschied der Aminosäure an Position 110 hervorgeht. *Abb. modifiziert nach Schlaak et al.*

Die Analyse des Peptides mittels MS/MS zeigte, dass die b-Ionen und die y-Ionen hinter y16 genau um 30 Da verschoben waren (s. Abbildung A1 & Abbildung A2). Daraus ließ sich für die zwei Isoformen ableiten, dass bei der zweiten Isoform Alanin an Position 110 durch Threonin substituiert war. Sapovaccarin-S1 wurde der Isoform zugeordnet, die Alanin an Position 110 und eine monoisotopische Masse von 28763,24 Da aufwies. Die Isoform, die Theronin an Position 110 enthielt, wurde Sapovaccarin-S2 (monoisotopische Masse von 28793,24 Da) zugeordnet. Die Sequenzierungsdaten der DNA von Sapovaccarin-S1 und -S2 bestätigten den auf Peptidlevel identifizierten Massenunterschied von Sapovaccarin-S1 und -S2. Das Chromatogramm der DNA-Sequenzierung der Nukleotide, die für die Aminosäuren 107 bis 113 kodieren, wies an Position 328 zwei überlappende Peaks auf, einen Guanin-Peak und einen Adenin-Peak (Abbildung 11). Der Austausch des Codons GCG (Sapovaccarin-S1) durch ACG (Sapovaccarin-S2), bewirkt auf Proteinebene eine Aminosäuresubstitution an Position 110 von Alanin zu Threonin. Die Massendifferenz von Alanin und Threonin entspricht 30 Da, die auch mittels MS-Analyse der intakten Proteinmassen ermittelt wurde (Abbildung 8). In Übereinstimmung mit dem Verhältnis der monoisotopischen Massenpeaks der Abbildung 8 und den Massenpeaks der Peptide der Abbildung 10, ist der Guanin-Peak des Sapovaccarin-S1 größer als der Adenin-Peak des Sapovaccarin-S2.

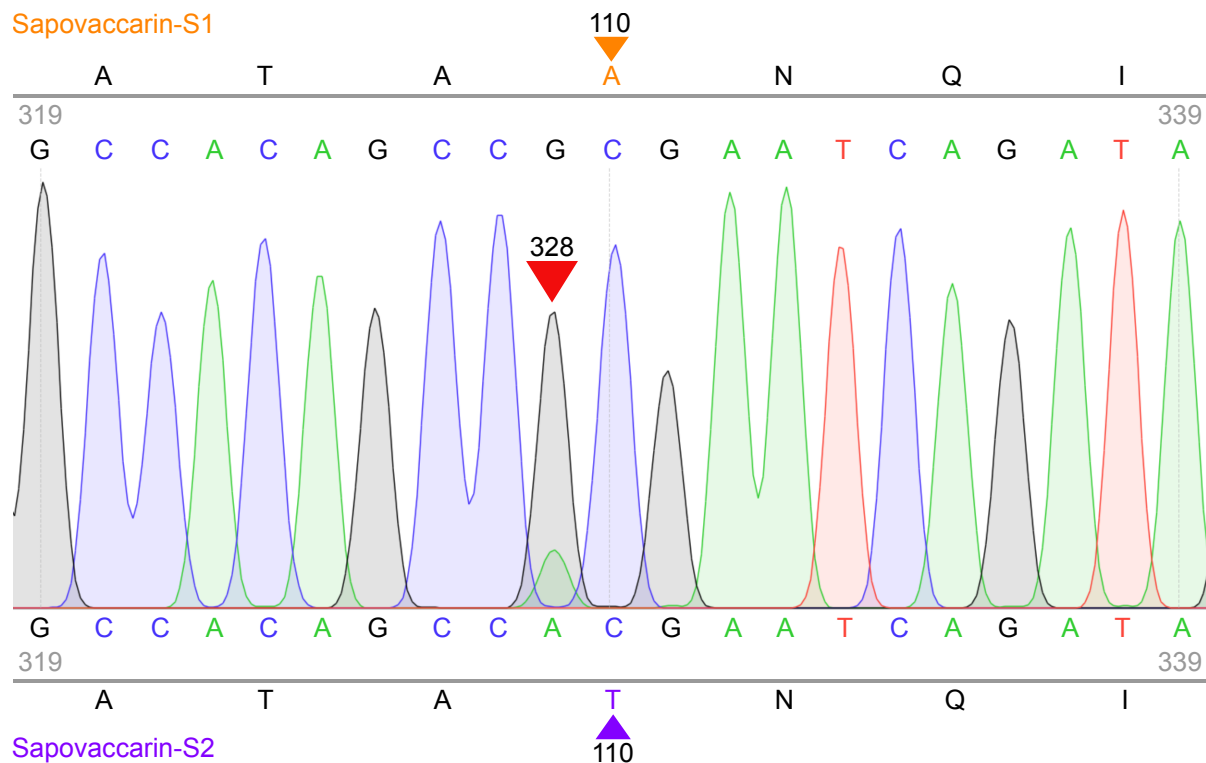


Abbildung 11. Chromatogramm der DNA-Sequenzierung des für die Aminosäuren 107–113 kodierenden DNA-Abschnittes. An Nukleotidposition 328 überlappen sich ein großer Guanin-Peak und ein kleinerer Adenin-Peak. Während GCG für Alanin kodiert, kodiert ACG für Threonin. Sapovaccarin-S1 (Alanin) und -S2 (Threonin) unterscheiden sich an Aminosäureposition 110. *Abb. modifiziert nach Schlaak et al.*

3.1.5 Vervollständigung der kompletten Sequenz von Sapovaccarin-S1 und -S2

Wie unter 3.1.3 beschrieben, veröffentlichten Bolognesi *et al.* 1995 eine *N*-terminale Sequenz (30 Aminosäuren, die mittels Edman-Abbau sequenziert wurden) eines Typ I RIPs isoliert aus der *Vaccaria pyramidata* Medik. (Bolognesi *et al.*, 1995). Diese Sequenz stimmte perfekt mit der unter 3.1.3 mittels PCR ermittelten Sequenz überein (Abbildung 12). Die fünf fehlenden *N*-terminalen Aminosäuren VVTIT, die aus der Sequenz von Bolognesi *et al.* abgeleitet werden konnten, wurden durch MALDI-MS-Messung bestätigt (Abbildung A3). Die fehlende *C*-terminale Sequenz MYLGRPG konnte ebenfalls durch Interpretation der *C*-terminalen Ionenreihe der MALDI-MS-Daten identifiziert werden (Abbildung A3). Für die vollständigen Sequenzen wurden theoretische Massen von 28763,12 Da für Sapovaccarin-S1 und 28793,12 Da für Sapovaccarin-S2 berechnet (Wilkins *et al.*, 1999). Diese stehen in Übereinstimmung mit den in Abbildung 8 dargestellten monoisotopischen Massen von 28763,24 Da (Sapovaccarin-S1) und 28793,24 Da (Sapovaccarin-S2). Zur Verifizierung der in Abbildung 12 dargestellten Sequenzen wurde ein In-Gel-Verdau mit Trypsin, AspN, Chymotrypsin und LysC durchgeführt (2.7.5.1). Die resultierenden Peptide wurden mittels LC-ESI-MS/MS (Orbitrap Q Exactive™ HF) vermessen (2.7.5.2). Die erhaltenen MS/MS-Daten wurden gegen die vollständige Sequenz von Sapovaccarin-S1 verglichen.

Sapovaccarin-S1	VVTITLNLNLANPSKGGYSSFVDRI RNNVRDPKLYGGTDIAVIGAPPTREKYLRINLQGPR	60
Sapovaccarin-S2	VVTITLNLNLANPSKGGYSSFVDRI RNNVRDPKLYGGTDIAVIGAPPTREKYLRINLQGPR	60
<i>V. pyramidata</i>	VVTITLNLNLANPSKGGYSSFVDRI RNNVRDP-----	30
Sapovaccarin-S1	GTVSLGLRRENLYVVAYLAMDNNTNTNKAYYFRNQITSAELRITVFPEATAANQIIVIYQGED	120
Sapovaccarin-S2	GTVSLGLRRENLYVVAYLAMDNNTNTNKAYYFRNQITSAELRITVFPEATAANQIIVIYQGED	120
▲ 110		
Sapovaccarin-S1	YQSIERNQAITQGSQSRKELGLGIDLLVTSIDGVNRKARVVRNEARFLLIAIQMTAEAAAR	180
Sapovaccarin-S2	YQSIERNQAITQGSQSRKELGLGIDLLVTSIDGVNRKARVVRNEARFLLIAIQMTAEAAAR	180
Sapovaccarin-S1	FRYIQNLVTFNFPKFKFSDSNKVIQFEVSWGKISRAIYGDCKNGVFNKDYDFGFGKVRQAK	240
Sapovaccarin-S2	FRYIQNLVTFNFPKFKFSDSNKVIQFEVSWGKISRAIYGDCKNGVFNKDYDFGFGKVRQAK	240
Sapovaccarin-S1	QLQMGLLMYLGRPG 254	
Sapovaccarin-S2	QLQMGLLMYLGRPG 254	

Abbildung 12. Vollständige Aminosäuresequenz von Sapovaccarin-S1 und -S2. Alignment der Sapovaccarin-S1 und -S2 Sequenzen mit dem *N*-Terminus von *Vaccaria pyramidata* Medik. bestimmt durch Bolognesi *et al.* (Bolognesi *et al.*, 1995). Durch Kombination der PCR-Analyse und der massenspektrometrischen Peptidanalyse wurde die komplette Aminosäuresequenz von Sapovaccarin-S1 und -S2 aufgeklärt. Aminosäuren, die schwarz dargestellt sind, wurden mittels PCR-Analyse identifiziert. Die *N*-terminalen und C-terminalen Aminosäuren, die grün markiert sind, konnten nicht mittels PCR sequenziert werden. Die Peptidsequenzen, die mittels MALDI-Analyse bestimmt wurden, sind durch rote Käste hervorgehoben. Die blaue Linie hebt Sequenzabschnitte hervor, die mittels ISD-Daten sequenziert wurden. Das orangene Dreieck gibt die Position 110 an, wo sich Sapovaccarin-S1 und -S2 um Alanin und Threonin unterscheiden. *Abb. modifiziert nach Schlaak et al.*

Folgende Sequenzabdeckungen wurden mit den Peptiden des jeweiligen In-Gel-Verdau erhalten: Trypsin 93 %, AspN 50 %, LysC 31 % und Chymotrypsin 29 %. Durch Fusion aller Datensets konnte eine Sequenzabdeckung von 100 % erreicht werden. Die Mascot-Suchparameter waren wie folgt festgelegt: Peptidtoleranz 10 ppm, MS/MS-Toleranz 0,02 Da, $p < 0,052$. Die durch Kombination aus massenspektrometrischer und molekularbiologischer Methode identifizierte Aminosäuresequenz konnte somit auch vollständig auf dem Peptidlevel bestätigt werden. Die Sequenzen wurden unter den folgenden Akzessionsnummern Q7M1L6 (Sapovaccarin-S1) und C0HM39 (Sapovaccarin-S2) in der UniProt-Datenbank hinterlegt.

3.1.6 Homologiemodell von Sapovaccarin-S1

Wie in Abbildung 13 dargestellt, war die Sequenz von Sapovaccarin-S1 zu 83 % identisch mit der Sequenz von Gypsophilin-S und zu 79 % mit den Sequenzen von Saporin-S6 und Dianthin-30 (Kokorin *et al.*, 2019; Legname *et al.*, 1991; Maras *et al.*, 1990). Die neu identifizierten Aminosäuresequenzen von Sapovaccarin-S1 und -S2 wiesen somit eine für Typ I RIPs klassische Aminosäuresequenz auf. Auch die für Typ I RIPs bekannten hoch konservierten Aminosäuren des aktiven Zentrums Tyr73, Tyr121, Glu177 und Arg180 waren an den gleichen Positionen in der Sequenz von Sapovaccarin-S1 wiederzufinden (Fermani *et al.*, 2005). Der Sequenzvergleich macht deutlich, dass das Alanin (Ala110), das im Sapovaccarin-S2 durch Threonin substituiert ist, weit entfernt vom aktiven Zentrum lokalisiert ist.

A Sapov-S1	VVTITLNLANPSKGQYSSFVDRIRNNVRDPKLYGGTDIAVIGAPPTREKYLRINLQGPR	60
Saporin-S6	VTSITLDELVNPTAGQYSSFVDKIRNNVKDPNLKYGGTDIAVIG-PPSKEKFLRINFQSSR	59
Dianthin-30	ATAYTLNLANPSASQYSSFQIRNNVRDTSIYGGTDVAVIGAPSTTDKFLRINFQGPR	60
Gyp-S	-TTITLNLATPTAGQYSSFQIRNNVRDTKLYGGTDIAVIG-PPSRDKFLRINFQGPR	58
	.: **:*..*: .*****:*:*****:* .* *****:**** * : :*:**:*:* . *	
Sapov-S1	GTVSLGLRRENLYVVAYLAMDNNTNKAYYFRNQITSAELRTVFPEATAANQIVIQYGED	120
Saporin-S6	GTVSLGLKRDNLYVVAYLAMDNNTNVRAYYFKSEITSAELTALFPEATTANQKALEYTED	119
Dianthin-30	GTVSLGLRRENLYVVAYLAMDNANVRAYYFKNQITSAELTALFPEVVANQKQLEYGED	120
Gyp-S	GTVSLGLRRENLYVVSYLAMDNTGVNKAYYFKNQITTVELTTLFPEATVANHKLEAYED	118
	*****:*:*****:*****:..*:*:*:*:..*:*:*:*:..*:*:*:*:..*:*:*:*:..*:*	
Sapov-S1	YQSIERNAQITQGSQSRKELGLGIDLLVTSIDGVNRKARVVRNEARFLLIAIQMTAEAAAR	180
Saporin-S6	YQSI EKNAQITQGDKSRKELGLGIDLLTFMEAVNKKARVVKNEARFLLIAIQMTAEVAR	179
Dianthin-30	YQAI EKNAKITTGQDQSRKELGLGINLLITMIDGVNKKVRVVKDEARFLLIAIQMTAEAAAR	180
Gyp-S	YQSI EKNAKITQGDKSRKELGLGIDLLVTSIDGVNRKVRVVRDEARFLLIGIQMTAEAAAR	178
	:*:*:*:*:* *.:***:*****:*** * :.:**:*:*:*:*:*****.*****.*	
Sapov-S1	FRYIQNLVTFNFPKFKFSDNKVIQFEVSWGKISRAIYGDCKNGVFNKDYDFGFGKVRQAK	240
Saporin-S6	FRYIQNLVTKNFPNKFSDNKVIQFEVSWRKISTAIYGDCKNGVFNKDYDFGFGKVRQVK	239
Dianthin-30	FRYIQNLVTKNFPNKFSDENKVIQFQVSWSKISTAIYGDCKNGVFNKDYDFGFGKVRQAK	240
Gyp-S	FRYIQNLVTKNFPKFKFSENKVIQFQISWSKISKAIYGDCKNGVFNKDYDFGFGKVRQAK	238
	***** *:*:*:*:*:*****:..* *	
Sapov-S1	QLQMGLLMYLGRPG	254
Saporin-S6	DLQMGLLMYLGKPK	253
Dianthin-30	DLQMGLLKYLGRPK	254
Gyp-S	QLQMGLLMYLGRPK	252
	:***** **:***	

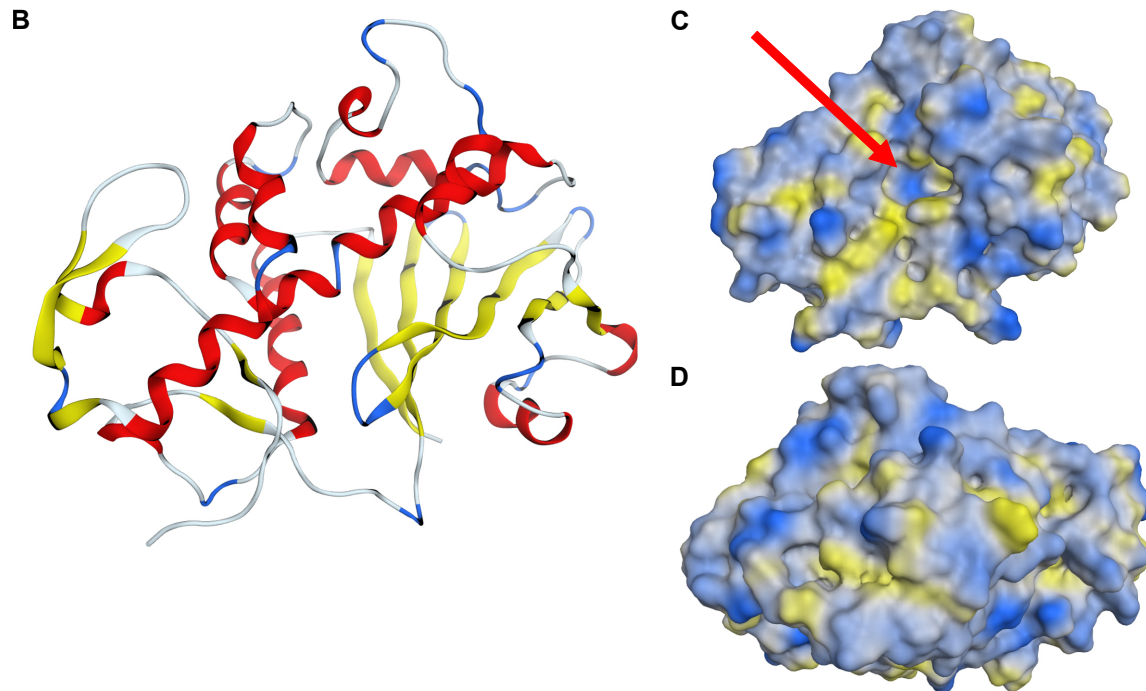


Abbildung 13. Sequenzanalyse und Homologiemodell von Sapovaccarin-S1. (A) Sequenzvergleich von Sapovaccarin-S1 (Sapov-S1), Saporin-S6, Dianthin-30 und Gypsophilin-S (Gyp-S), erstellt mit dem Online-Tool Clustal Omega (Kokorin *et al.*, 2019; Legname *et al.*, 1991; Maras *et al.*, 1990; Sievers *et al.*, 2011). Alanin an Position 110, die im Sapovaccarin-S2 substituiert ist, ist rot markiert. Die hoch konservierten Aminosäuren des aktiven Zentrums sind gelb markiert (Fermani *et al.*, 2005). Bedeutung der Symbole: (*) entspricht hoch konservierten Aminosäuren, (:) entspricht hoher Identität und (.) moderater Identität der Aminosäuren. (B) Tertiärstruktur des Homologiemodells von Sapovaccarin-S1. (C) Frontansicht der Proteinoberfläche. Blaue Bereiche entsprechen der hydrophilen und gelbe Bereiche der hydrophoben Oberfläche. Der rote Pfeil zeigt auf die Substratbindetasche. (D) Rückansicht der Proteinoberfläche. Die Darstellungen (B–D) wurden mit der Software MOE erstellt. *Abb. modifiziert nach Schlaak et al.*

Ein Homologiemodell der Proteinstruktur von Sapovaccarin-S1 wurde mit der Software MOE erstellt. Als Template für das Modell diente die hochaufgelöste Kristallstruktur von Dianthin-30 (1,4 Å, PDB Identifikationscode 1RL0) (Fermani *et al.*, 2005). Die Kristallstruktur von Dianthin-30, dessen Sequenz zu 79 % identisch und zu 95 % ähnlich zu Sapovaccarin-S1 war, war optimal als Template geeignet. Das Homologiemodell wies eine *root-mean-square deviation* (RMSD, Wurzel der mittleren Abweichungsquadrate) von 0,52 Å auf. Von der niedrigen RMSD wurde die richtige Faltung des finalen Modells abgeleitet. Das Modell wies weder Phi-Psi Ausreißer noch Atomüberschneidungen auf. Die dreidimensionale Struktur von Sapovaccarin-S1 wies die gleichen Strukturelemente, die für Typ I RIPs bekannt sind, auf. Die *N*-terminale Domäne war reich an β -Faltblättern und die *C*-terminale Domäne reich an α -Helices (Abbildung 13B). Das aktive Zentrum lag zwischen den beiden Domänen (Abbildung 13C). Die Proteinoberfläche von Sapovaccarin-S1 mit seiner hydrophilen Bindetasche ist in Abbildung 13C und D dargestellt (Fermani *et al.*, 2005).

3.1.7 Enzymatische Charakterisierung von Sapovaccarin-S1 und -S2

Wie unter 1.1 beschrieben, beruht die zytotoxische Aktivität der RIPs auf deren Adeninfreisetzung aus der 28S rRNA, die eine Hemmung der Proteinbiosynthese zur Folge hat (Endo & Tsurugi, 1987). Dabei setzen RIPs Adenin nicht nur aus der rRNA frei, sondern verschiedenste Polynukleotide gehören zu ihren Substraten (Barbieri *et al.*, 1994). Die *N*-Glykosidaseaktivität des isolierten Isoformengemisches aus Sapovaccarin-S1 und -S2 wurde in dieser Arbeit durch Adeninfreisetzung aus dem künstlichen A30-Oligonukleotid charakterisiert (2.7.4.2). Als Referenzproteine wurden das rekombinant hergestellte ^{His}Dianthin und das aus den Samen der *Gypsophila paniculata* L. isolierte Gypsophilin-S mitgeführt (Kokorin *et al.*, 2019). Wie in Abbildung 14 dargestellt, konnte für Sapovaccarin-S1 und -S2 (in der Abbildung als Sapovaccarin bezeichnet) *N*-Glykosidaseaktivität nachgewiesen werden. Die Adeninfreisetzung von Sapovaccarin-S1 und -S2 war größer als von Gypsophilin-S und ^{His}Dianthin. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nur für Sapovaccarin und das rekombinant hergestellte ^{His}Dianthin ermittelt werden.

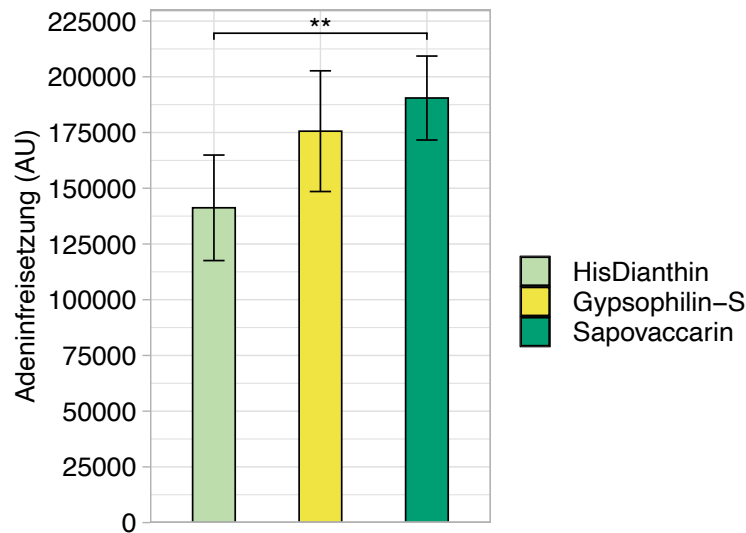


Abbildung 14. *N*-Glykosidaseaktivität von Sapovaccarin-S1 und -S2. 169 nM isoliertes Sapovaccarin-S1 und -S2 (Sapovaccarin) und als Referenzen 169 nM ^{His}Dianthin und 169 nM Gypsophilin-S (isoliert aus den Samen der *Gypsophila paniculata* L.) wurden je mit 21,4 μ M A30-Substrat bei 37 °C über Nacht inkubiert (2.7.4.2). Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford-Assay bestimmt (2.7.3.2). Die Enzymaktivität des isolierten Sapovaccarin-S1 und -S2 ist signifikant erhöht im Vergleich zu dem rekombinanten ^{His}Dianthin. Zwischen den Aktivitäten von Gypsophilin-S und Sapovaccarin-S1 und -S2 ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen, $n = 3$ (Signifikanz: **, $p \leq 0,01$; U-Test).

3.1.8 Thermostabilität von Sapovaccarin-S1 und -S2

Die Thermostabilität von Sapovaccarin-S1 und -S2 wurde mittels Nano DSC analysiert (2.7.4.3). Wie auch bereits bei der Bestimmung der *N*-Glykosidaseaktivität (Abbildung 14) wurden ^{His}Dianthin und Gypsophilin-S als Referenzproteine bearbeitet. Die entsprechenden DSC-Thermogramme sind in Abbildung 15 dargestellt. Der Schmelzpunkt (T_m), die Temperatur, bei der 50 % des Proteins in nativer und 50 % in denaturierter Konformation vorliegen, wurde für Sapovaccarin-S1 und -S2 bei 68,9 °C gemessen. Die T_m der Referenzproteine lagen mit 64,7 °C für Gypsophilin-S und mit 65,6 °C für ^{His}Dianthin bei niedrigeren Temperaturen. Für Proteine variieren die T_m -Werte zwischen 40–80 °C (Bischof & He, 2005). Somit waren Sapovaccarin-S1 und -S2 mit einer T_m von 68,9 °C mittelmäßig thermostabil.

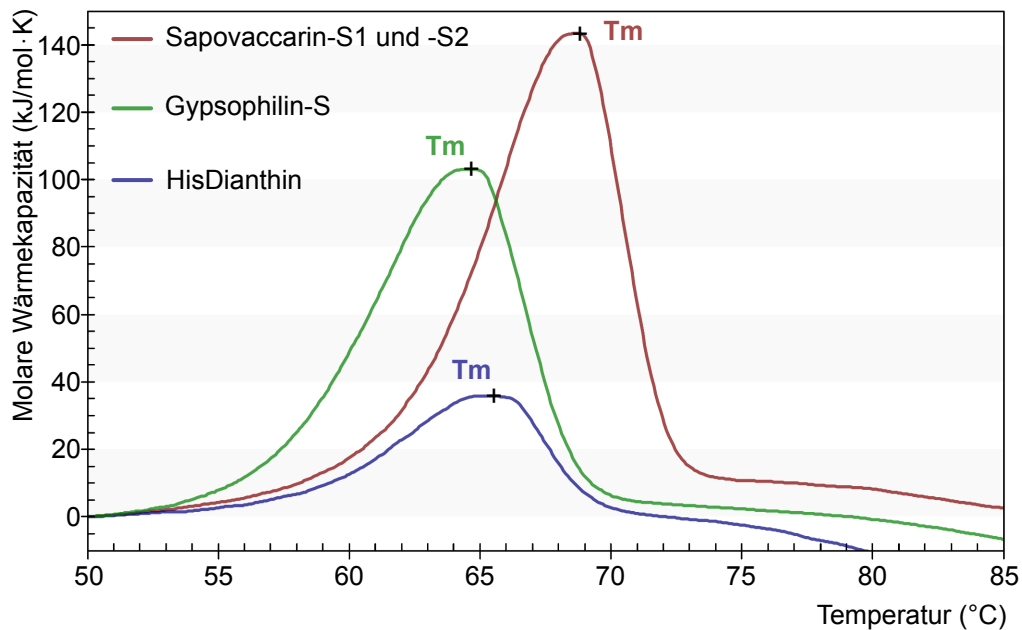


Abbildung 15. Thermostabilität von Sapovaccarin-S1 und -S2 im Vergleich zu Gypsophilin-S und ^{His}Dianthin. Die DSC-Thermogramme wurden in PBS pH 7,4 mit einer Konzentration von 400 µg/ml und mit einer Abtastrate von 1 °C/min aufgenommen (2.7.4.3). Die Konzentrationen der Proben wurden mit dem Bradford-Assay bestimmt (2.7.3.2). Der Schmelzpunkt (T_m) wurde für Sapovaccarin-S1 und -S2 bei 68,9 °C, für Gypsophilin-S bei 64,7 °C und für ^{His}Dianthin bei 65,6 °C gemessen. Sapovaccarin-S1 und -S2 ist thermisch stabiler als die Referenzproteine. Dargestellt ist die molare Wärmekapazität (kJ/mol·K), die mit der Software NanoAnalyze aus der Heizrate errechnet wurde. *Abb. modifiziert nach Schlaak et al.*

3.1.9 Proteinexpression und Aufreinigung von ^{His}Sapovaccarin-S1

Um die Untersuchungen an den basischen Aminosäuren, die unter 3.4 beschrieben werden, durchführen zu können, wurde ein pET11d-Vektor, der die cDNA-Sequenz für Sapovaccarin-S1 enthielt, benötigt. Die Synthese des Vektors erfolgte durch den Hersteller BioCat (Heidelberg). Im Folgenden wird die Vorbereitung der cDNA, die durch BioCat in einen pET11d-Vektor eingefügt wurde, erläutert. Die unter 3.1.5 erhaltene Aminosäuresequenz von Sapovaccarin-S1 wurde vollständig mit dem Online-Tool EMBOSS Backtranseq in DNA umgeschrieben (Rice *et al.*, 2000). Wie in Abbildung 16 dargestellt, wurde die Sequenz *N*-terminal über einen Linker (grün markierte Basen) um einen 6-fach His-Tag (violett markierte Basen) erweitert. Außerdem wurden sowohl der Start- als auch der Stoppcodon hinzugefügt. Die hellblau markierten Basen wurden zu Optimierungszwecken durch BioCat ergänzt. Der vollständige pET11d-^{His}Sapovaccarin-S1-Vektor hatte eine Größe von 6435 bp. Eine erfolgreiche Expression von ^{His}Sapovaccarin-S1 konnte in BL21(DE3)pLysS *E. coli* erreicht werden (Abbildung 17, Spur II). Die Expression wurde, wie unter 2.7.2.7 beschrieben, mit autoinduzierendem Medium durchgeführt. Die Expressionsansätze von ^{His}Sapovaccarin-S1 waren nach der Inkubation über Nacht weniger trüb als parallel bearbeitete Ansätze anderer Proteine (visuelle Auswertung). Nach verschiedensten Optimierungsversuchen konnte keine reine Elutionsfraktion mit der Aufreinigung mittels Amicon® Pro Affinitätskonzentrationskit Ni-NTA erzielt werden (Abbildung 17, Spur IV). Die Verunreinigungen V1–V3 ließen sich nicht vom Zielprotein abtrennen.

```

1      CCATGGGACA TCATCATCAT CATCATGCCG CGGTGGTGAC CATCACCTG AACCTGGCCA ACCCCAGCAA
71     GGGCCAGTAC AGCAGCTTCG TGGACAGGAT CAGGAACAAC GTGAGGGACC CCAAGCTGAA GTACGGCGGC
141    ACCGACATCG CCGTGATCGG CGCCCCCCC ACCAGGGAGA AGTACCTGAG GATCAACCTG CAGGGCCCCA
211    GGGGCACCGT GAGCCTGGGC CTGAGGAGGG AGAACCTGTA CGTGGTGGCC TACCTGGCCA TGGACAACAC
281    CAACACCAAC AAGGCCTACT ACTTCAGGAA CCAGATCACC AGCGCCGAGC TGAGGACCGT GTTCCCCGAG
351    GCCACCGCCG CCAACCAGAT CGTGATCCAG TACGGCGAGG ACTACCAGAG CATCGAGAGG AACGCCCAGA
421    TCACCAGGG CAGCCAGAGC AGGAAGGAGC TGGGCCTGGG CATCGACCTG CTGGTGACCA GCATCGACGG
491    CGTGAACAGG AAGGCCAGGG TGGTGAGGAA CGAGGCCAGG TTCCTGCTGA TCGCCATCCA GATGACCGCC
561    GAGGCCGCCA GGTTCAGGTA CATCCAGAAC CTGGTGACCT TCAACTCCC CAAGAAGTTC GACAGCGACA
631    ACAAGGTGAT CCAGTTCGAG GTGAGCTGGG GCAAGATCAG CAGGGCCATC TACGGCGACT GCAAGAACGG
701    CGTGTTC AAC AAGGACTACG ACTTCGGCTT CGGCAAGGTG AGGCAGGCCA AGCAGCTGCA GATGGGCCTG
771    CTGATGTACC TGGGCAGGCC CGGCTAAGGA TCC

```

Abbildung 16. Vektordesign von ^{His}Sapovaccarin-S1. Dargestellt ist die DNA-Sequenz von ^{His}Sapovaccarin-S1, die für die Synthese durch den Hersteller BioCat vorbereitet wurde. Die graue DNA-Sequenz wurde mit dem Online-Tool EMBOSS Backtranseq aus der in Abbildung 12 erhaltenen Proteinsequenz in eine Nukleinsäuresequenz umgeschrieben (Rice *et al.*, 2000). Zu dieser Sequenz wurden das Startcodon (rot), das Stoppcodon (orange), zwei Linker (hellgrün) und ein 6-fach His-Tag (violett) hinzugefügt. Die hellblau markierten Basen stellen eine Optimierung durch BioCat dar.

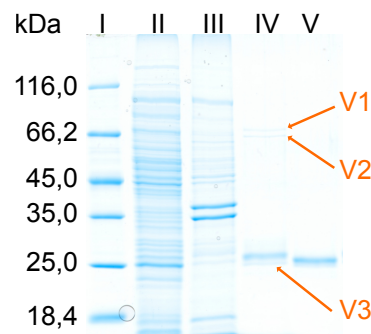


Abbildung 17. Expression von ^{His}Sapovaccarin-S1 in BL21(DE3)pLysS und Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA. Für die Expression wurde autoinduzierendes Medium verwendet. Die Proteinaufreinigung erfolgte mit dem Amicon® Pro Affinitätskonzentrationskit Ni-NTA. Das 12,5%ige SDS-Polyacrylamidgel wurde mit Coomassie angefärbt. I: Proteinmarker. II: Unaufgereinigter Proteinextrakt nach Lyse (48,6 µg). III: Zellpellet nach Lyse (33,5 µg). IV: Elutionsfraktion (300 mM Imidazol, 0,82 µg), Verunreinigungen (V1–V3) wurden durch orangene Pfeile markiert. V: Isoliertes Sapovaccarin-S1 und -S2 (0,83 µg) als Referenzprotein.

Sowohl die Bande von ^{His}Sapovaccarin-S1, die Banden der Verunreinigungen aus der Spur IV als auch die Referenzbande der Spur V wurden ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und mit der MALDI-TOF-MS vermessen (2.7.5.1 & 2.7.5.2). Die Swiss-Prot-Datenbanksuche der aufgenommenen Peptidmassenfingerprints mit der Software Mascot Server konnte die Identität von ^{His}Sapovaccarin-S1 mit einem Score von 106 für Sapovaccarin-S1 (bei Swiss-Prot hinterlegt als RIP1_GYPVA) bestätigen. Ab einem Protein Score von 70 lag für die hier untersuchten Proben eine signifikante ($p < 0,05$) Identifizierung vor. Ein Vergleich der Massenspektren von ^{His}Sapovaccarin-S1 und isoliertem Sapovaccarin-S1 und -S2 konnte dessen Identität zusätzlich bestätigen (s. Abbildung A4). Die Verunreinigungen V1–V3 wurden als ARNA_ECOLI (V1, Score 165, bifunktionelles Polymyxin-resistenzprotein ArnA), GLMS_ECOLI (V2, Score 92, Glutamin-Fructose-6-Phosphatamino-

transferase GlmS) und V3 als Mischung aus CRP_ECOLI (Score 92, *DNA-binding transcriptional dual regulator protein Crp*) und RIP1_GYPVA (Score 88, Sapovaccarin S1) identifiziert.

3.1.10 Enzymatische und zytotoxische Charakterisierung von ^{His}Sapovaccarin-S1

Die *N*-Glykosidaseaktivität von ^{His}Sapovaccarin-S1 wurde wie auch für das isolierte Sapovaccarin-S1 und -S2 mit dem *adenine-releasing assay* bestimmt (2.7.4.2). Als Referenzproteine wurden das isolierte Sapovaccarin-S1 und -S2 und das rekombinant hergestellte ^{His}Dianthin bearbeitet. Die rekombinante Expression von ^{His}Sapovaccarin-S1 hatte einen Aktivitätsverlust im Vergleich zu dem isolierten Sapovaccarin-S1 und -S2 von ungefähr 50 % zur Folge (Abbildung 18). Die Adeninfreisetzung durch ^{His}Sapovaccarin-S1 war im Vergleich zu isoliertem Sapovaccarin-S1 und -S2 signifikant reduziert. Die Aktivitäten der rekombinant hergestellten RIPs verhielten sich dahingegen ähnlich. Der Unterschied zwischen isoliertem und rekombinant exprimiertem Sapovaccarin-S1, der für die *N*-Glykosidaseaktivität festgestellt werden konnte, war auch in den Zytotoxizitätsuntersuchungen aufzufinden. Wie in Abbildung 19 dargestellt, war das rekombinante ^{His}Sapovaccarin-S1 unter Zugabe von SO1861 bei den untersuchten Konzentrationen signifikant weniger zytotoxisch.

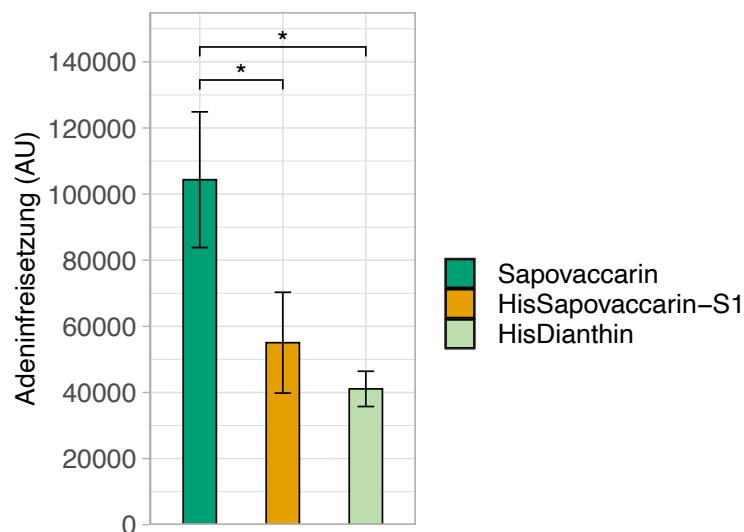


Abbildung 18. *N*-Glykosidaseaktivität von rekombinant exprimiertem ^{His}Sapovaccarin-S1. 169 nM ^{His}Sapovaccarin-S1 und isoliertes Sapovaccarin-S1 und -S2 (Sapovaccarin) und ^{His}Dianthin als Referenzproteine wurden je mit 21,4 μ M A30-Substrat bei 37 °C über Nacht inkubiert (2.7.4.2). Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem BCA-Assay bestimmt (2.7.3.1). Die Enzymaktivitäten der rekombinant exprimierten Proteine ^{His}Sapovaccarin-S1 und ^{His}Dianthin sind signifikant reduziert im Vergleich zu dem isolierten Sapovaccarin. Zwischen den Aktivitäten von ^{His}Sapovaccarin-S1 und ^{His}Dianthin ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen, $n = 3$ (Signifikanz: *, $p \leq 0,05$; *t*-Test).

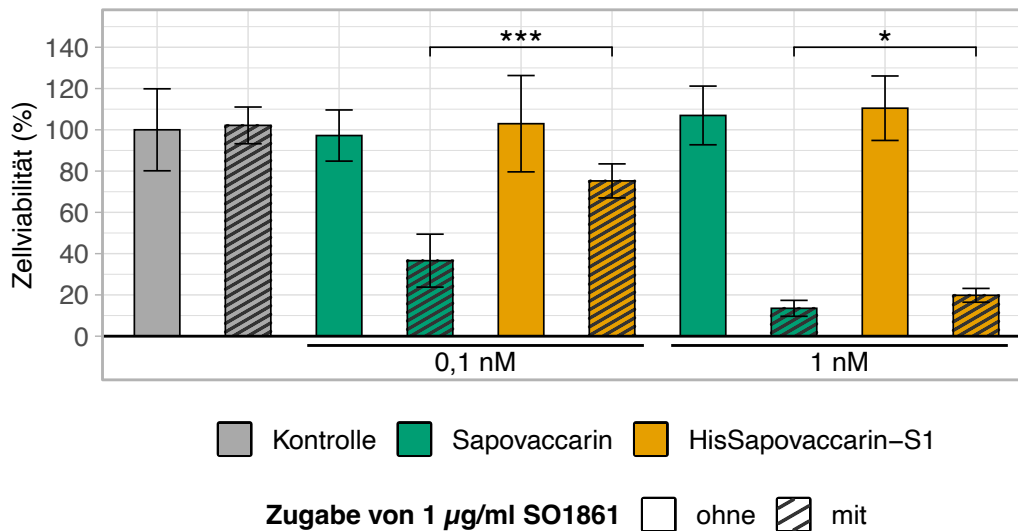


Abbildung 19. Zytotoxizität von rekombinant exprimiertem ^{His}Sapovaccarin-S1. Neuro-2A-Zellen wurden mit 0,1 und 1 nM ^{His}Sapovaccarin-S1 bzw. isoliertem Sapovaccarin-S1 und -S2 (Sapovaccarin) ± 1 µg/ml SO1861 für 48 h inkubiert. Kontrollzellen wurden äquivalent mit PBS ± 1 µg/ml SO1861 behandelt. Rekombinant exprimiertes ^{His}Sapovaccarin-S1 + SO1861 zeigte eine signifikant geringere Zytotoxizität als isoliertes Sapovaccarin-S1 und -S2 + SO1861. Der Unterschied war bei geringer Konzentration (0,1 nM) stärker ausgeprägt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen je als Duplikat, n = 3 (Signifikanz: *, p ≤ 0,05; ***, p ≤ 0,001; t-Test).

3.2 Untersuchung der Beteiligung basischer Aminosäuren an der Interaktion zwischen ^{His}Dianthin und SO1861

3.2.1 Proteinexpression und Aufreinigung von ^{His}Dianthin

Die Nukleotidsequenz des mit einem 6-fach His-Tag versehenen Dianthin-30 (^{His}Dianthin) lag in einem pET11d-Vektor vor, der von Gilbert-Oriol *et al.* durch molekulare Klonierung erzeugt wurde (Gilbert-Oriol *et al.*, 2015; Legname *et al.*, 1991). Um die Identität des Vektors zu bestätigen und größere DNA-Verunreinigungen auszuschließen, wurden zunächst eine Plasmidpräparation und ein Restriktionsverdau durchgeführt. Beim linearen Verdau war eine Bande bei 6114 bp, entsprechend der Größe des pET11d-^{His}Dianthin-Vektors, zu erwarten. Der doppelte Verdau sollte sowohl eine Bande bei 5278 bp als auch eine bei 836 bp, welche jeweils der Größe des Vektors ohne ^{His}Dianthin-Sequenz und dem ^{His}Dianthin-Insert entsprachen, ergeben. Als Negativkontrolle wurde das ungeschnittene, zirkularisierte Plasmid, welches weiter als das lineare Plasmid wandert, mitgeführt. Das Agarosegel der Restriktionsverdauansätze konnte das Vorhandensein der erwarteten Banden und somit die Identität des pET11d-^{His}Dianthin-Vektors bestätigen (Abbildung 20A). Neben den erwarteten Banden traten leichte Verunreinigungen, welche im Vergleich zu den Zielbanden geringer ausgeprägt waren, auf. Die Proteinexpression von ^{His}Dianthin erfolgte, wie in der Literatur beschrieben, in NiCo21(DE3) (Bhargava *et al.*, 2017). Neben dem rekombinanten Zielprotein werden von *E. coli* Bakterien auch bakterielle Proteine gebildet, von denen das Zielprotein abgetrennt werden muss.

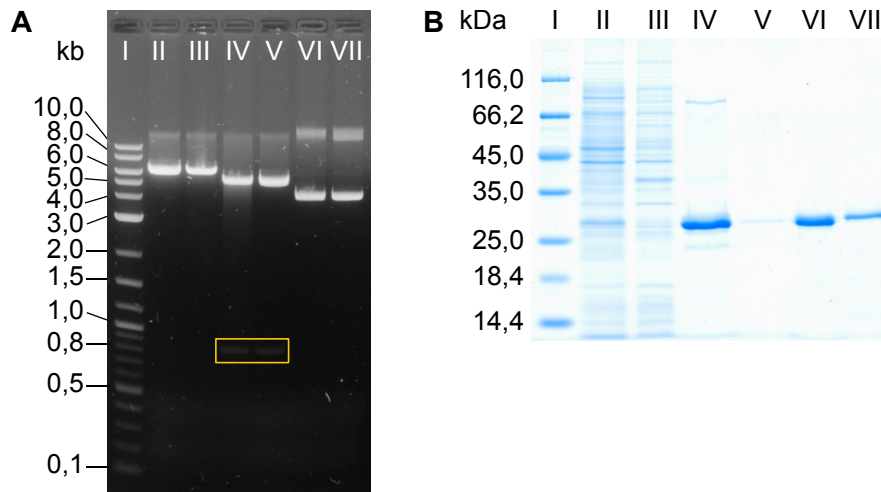


Abbildung 20. Restriktionsverdau von pET11d-^{His}Dianthin und Proteinaufreinigung von ^{His}Dianthin. (A) Agarose-Gelelektrophorese (1 %) zur Überprüfung der Plasmidpräparation von pET11d-^{His}Dianthin. Der Restriktionsverdau wurde mit zwei Plasmidpräparations-Ansätzen parallel durchgeführt. Der lineare Verdau von pET11d-^{His}Dianthin weist eine Bande bei ca. 6114 bp auf (Spur II + III). Durch den doppelten Verdau entstehen zwei Spaltprodukte: das kleinere bei ca. 800 bp (orange hervorgehoben) entspricht dem Insert und das zweite bei ca. 5200 bp dem Plasmid ohne Insert (Spur IV + V). Plasmid-DNA in ungeschnittener, zirkularisierter Form wandert weiter als die lineare Form (Negativkontrolle, Spur IV + V). Die Lage der vorhandenen Banden entsprach den erwarteten Banden und bestätigte die erfolgreiche Plasmidpräparation von pET11d-^{His}Dianthin. DNA-Leiter (Spur I): 1 kb Plus DNA-Leiter. (B) SDS-PAGE (12,5 %) der Expression in NiCo21(DE3) und Aufreinigung mittels manueller Ni-NTA und Kationenaustauschchromatographie, Coomassie Färbung. I: Proteinmarker. II: Unaufgereinigter Proteinextrakt nach Lyse (48,6 µg). III: Zellpellet nach Lyse (33,3 µg). IV: Ni-NTA Elutionsfraktion E125-1 (125 mM Imidazol, 5,2 µg). V: Ni-NTA Elutionsfraktion E125-2 (0,25 µg). VI: Vereinte bei 200 mM und 300 mM NaCl eluierte Fraktionen der Kationenaustauschchromatographie, reines ^{His}Dianthin (0,9 µg). VII: ^{His}Dianthin (0,9 µg) als Referenzprotein.

In Abbildung 20B sind die einzelnen Schritte der Aufreinigung, vom unaufgereinigten Proteinextrakt bis zu dem reinen Protein, dargestellt. Der an die Dianthin-Sequenz angefügte His-Tag ermöglicht durch seine Affinität zu Nickel-Ionen eine Aufreinigung mittels Ni-NTA. Der erste Aufreinigungsschritt konnte einen Großteil der bakteriellen Proteine entfernen. Einige bakterielle Proteine weisen His-Tag-ähnliche Strukturen auf, die ebenfalls an die Ni-NTA-Agarose binden (Bolanos-Garcia & Davies, 2006). Die Expression von ^{His}Dianthin wurde in einem Stamm durchgeführt, der für die Aufreinigung mit der Ni-NTA optimiert wurde (Robichon *et al.*, 2011). Dennoch war eine vollständige Aufreinigung mittels Ni-NTA nicht möglich (Abbildung 20B, Spur IV). ^{His}Dianthin eluierte gemeinsam mit bakteriellen Proteinen bei 125 mM Imidazol. Die im Anschluss durchgeführte Kationenaustauschchromatographie führte bei 200 mM und 300 mM NaCl zur Elution des reinen ^{His}Dianthins (Abbildung 20B, Spur VII).

3.2.2 Massenspektrometrische Analyse von ^{His}Dianthin

Zur Identifizierung und Überprüfung der finalen Proteinsequenz wurde das exprimierte ^{His}Dianthin einer intensiven massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Hierfür wurde ^{His}Dianthin mit drei verschiedenen Proteasen (Trypsin, Chymotrypsin und Elastase) verdaut, die Gesamtmasse des intakten Proteins bestimmt und die Termini durch MALDI-MSD-Messungen untersucht (2.7.5.1 & 2.7.5.2).

A MGHHHHHHAAATAYTLNLANPSASQYSSFLDQIRNNVRDTS LIYGGTDVAVIGAPSTTDKFLRLNFQGPRGTVSLGLRR
ENLYVVAYLAMDNANVNRAYYFKNQITSAELTALFPEVVVANQKQLEYGEDYQAI EKNAKITTG DQSRKELGLGINLLI
TMDIGVNNKVRVVKDEARFLLI AIQMTAEAARFRYIQNLVTKNFPNKF DSENKVIQFQVSWSKISTAI FGDCKNGVFNK
DYDFGFGKVRQAKDLQMGLLKYLRPK (264)

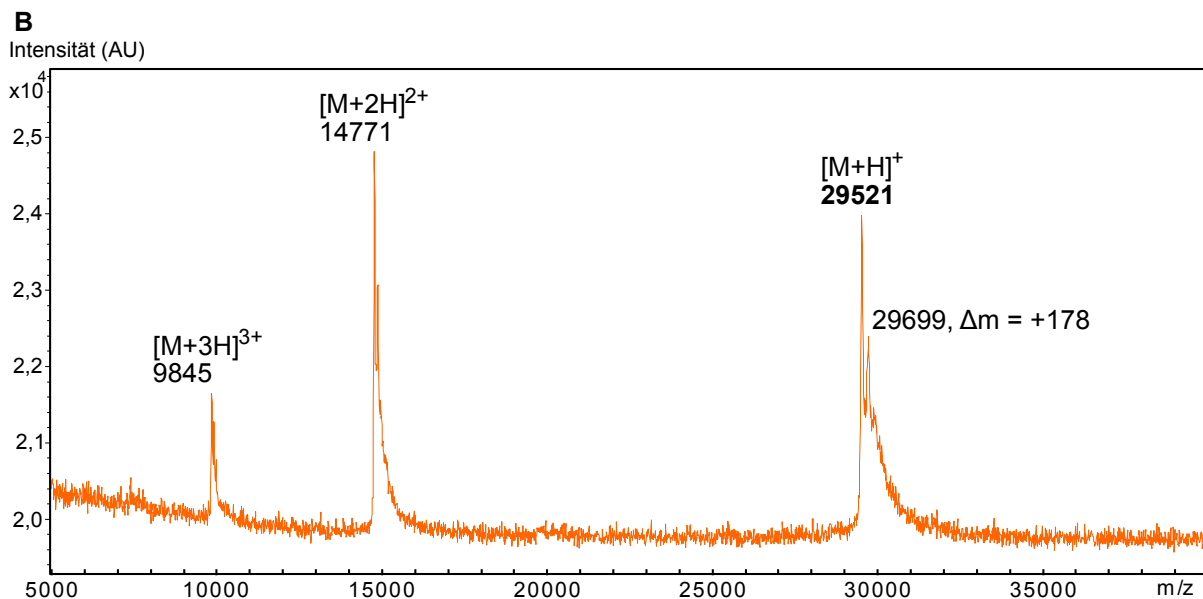


Abbildung 21. Massenspektrometrische Analyse des rekombinant exprimierten ^{His}Dianthins. (A) Proteinsequenz, die durch die cDNA des pET11d-^{His}Dianthin-Vektors kodiert wird. Der His-Tag, der an die Sequenz von Dianthin-30 (schwarze Aminosäuren) hinzugefügt wurde, ist violett markiert. (B) Massenspektrum des ^{His}Dianthins. Neben dem Hauptpeak $[M+H]^+$ bei 29521 Da wurde eine weitere Masse von 29699 Da, die einer Massendifferenz (Δm) von +178 Da entspricht, mittels MALDI-TOF-MS-Messung (UltrafleXtreme) ermittelt. Die Masse des zweifach geladenen Proteins lag bei 14771 m/z und die des dreifach geladenen Proteins bei 9845 m/z.

Der In-Gel-Verdau mit Trypsin und die Aufnahme des Peptidmassenfingerprints bestätigte zunächst die Identität von ^{His}Dianthin. Mithilfe der Software Mascot Server wurde der resultierende Peptidmassenfingerprint mit der Sequenz-Datenbank Swiss-Prot verglichen und ein Protein Score von 100 wurde für das Protein RIP0_DIACA, das Dianthin-30 entspricht, erzielt. Auch hier gilt, ab einem Protein Score von 70 ist die Identifizierung signifikant ($p < 0,05$). Die cDNA des pET11d-^{His}Dianthin-Vektors kodiert für die in Abbildung 21A dargestellte Aminosäuresequenz (Gilbert-Oriol *et al.*, 2015). Mit dem Online-Tool ExPASy PeptideMass wurde für die in Abbildung 21A dargestellte Proteinsequenz eine theoretische mittlere Masse $[M+H]^+$ von 29666 Da berechnet (Gasteiger *et al.*, 2003). Wie in Abbildung 21B dargestellt, wurde für ^{His}Dianthin mit der MALDI-TOF-MS eine mittlere Masse $[M+H]^+$ von 29521 Da und eine weitere Masse $[M+H]^+$ von 29699 Da, welche einer Massenzunahme von 178 Da entsprach, gemessen. Die große Abweichung ($\Delta m = 145$ Da) zur theoretischen Masse des ^{His}Dianthins konnte durch die Aufnahme der *N*-terminalen *c*-Ionenreihe aufgeklärt werden (Abbildung A5). Der *N*-Terminus wies kein endständiges Methionin auf. Die theoretische mittlere Masse $[M+H]^+$ von ^{His}Dianthin ohne Methionin lag bei 29535 Da. Durch Analyse der *N*-terminalen ISD-Messung und des Peptides 001–013 (MGHHHHHHAAATAY), welches durch den Verdau mit Chymotrypsin erhalten wurde, konnte die Modifikation von +178 Da dem

N-Terminus zugeordnet werden (Abbildung A6). Das gleiche *N*-terminale Peptid wies eine weitere Modifikation, die +42 Da groß war, auf (Abbildung A6).

Die mit den verschiedenen Proteasen erzeugten Peptide wurden zusätzlich mit der Orbitrap Q ExactiveTM HF vermessen und mit der Software Mascot Daemon auf Sequenzabdeckung überprüft. Die Peptide, die mit dem Trypsin- und dem Chymotrypsin-Verdau erhalten wurden, deckten kombiniert 100 % der ^{His}Dianthin-Sequenz ab. Die Peptide des Elastase-Verdau, konnten ebenfalls 100 % der ^{His}Dianthin-Sequenz abdecken (s. Abbildung A7). Somit wurde die gesamte ^{His}Dianthin-Sequenz auf Peptidlevel nachgewiesen.

3.2.3 Bestätigung der Bindung von SO1861 an ^{His}Dianthin mittels nativer MS

Wie unter 1.2 beschrieben, konnte für ^{His}Saporin-3 und den Saponinen SA1641 und SO1861 eine pH-abhängige Bindung mittels SPR gezeigt werden (Weng, Thakur, Beceren-Braun, *et al.*, 2012; Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Um die Beteiligung der basischen Aminosäuren an der Interaktion zwischen SO1861 und ^{His}Dianthin untersuchen zu können, sollte zunächst die Bindung von SO1861 an ^{His}Dianthin bestätigt werden. Hierfür wurden MS-Messungen unter nativen Bedingungen durchgeführt (Abbildung 22). Die massenspektrometrischen Aufnahmen von ^{His}Dianthin und SO1861 erfolgten bei einem leicht sauren pH-Wert von 6,24 in 50 mM Ammoniumacetat-Puffer als erstes separat (Kontrollspektren) und anschließend in Kombination (2.7.5.4). Das Kontrollspektrum von ^{His}Dianthin wurde sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen aufgenommen. Neben den ^{His}Dianthin-Peaks (29533,96 Da – unmodifiziert und 29711,89 Da – modifiziert), die unter 3.2.2 bestätigt werden konnten, wies das Kontrollspektrum unter denaturierenden Bedingungen einen Hauptpeak mit der Masse 29594,85 Da auf, der keiner der bekannten ^{His}Dianthin-Massen zugeordnet werden konnte (Abbildung A8). Der Hauptpeak mit der Masse von 29594,85 Da wurde auch unter nativen Bedingungen gemessen. Das Kontrollspektrum von ^{His}Dianthin unter nativen Bedingungen zeigte einen niedrigen Ladungszustand und eine enge Ladungszustandsverteilung (10⁺ bis 12⁺), was typisch für Massenspektren nativ gefalteter Proteine ist, auf (Abbildung A9). Im Massenspektrum der kombinierten Messung von ^{His}Dianthin und SO1861 trat ein kleines zusätzliches Signal bei ca. 31459,5 Da auf (Abbildung 22). Mit Zunahme der SO1861-Konzentration nahm die Intensität des Signals zu. Das Signal bei 31459,5 Da entsprach einer Massenzunahme von 1864 Da, ausgehend vom Hauptpeak bei ca. 29595 Da. Das zusätzliche Signal mit der Massenzunahme von 1864 Da deutete auf eine Bindung von SO1861 (theoretischen Masse von 1862,88 Da) an ^{His}Dianthin hin. Wie in Abbildung 22 dargestellt, wurde nur ein zusätzlicher Peak mit der Massenzunahme von 1864 Da detektiert. Dies würde einem Bindungsverhältnis von 1:1 zwischen ^{His}Dianthin und SO1861 entsprechen.

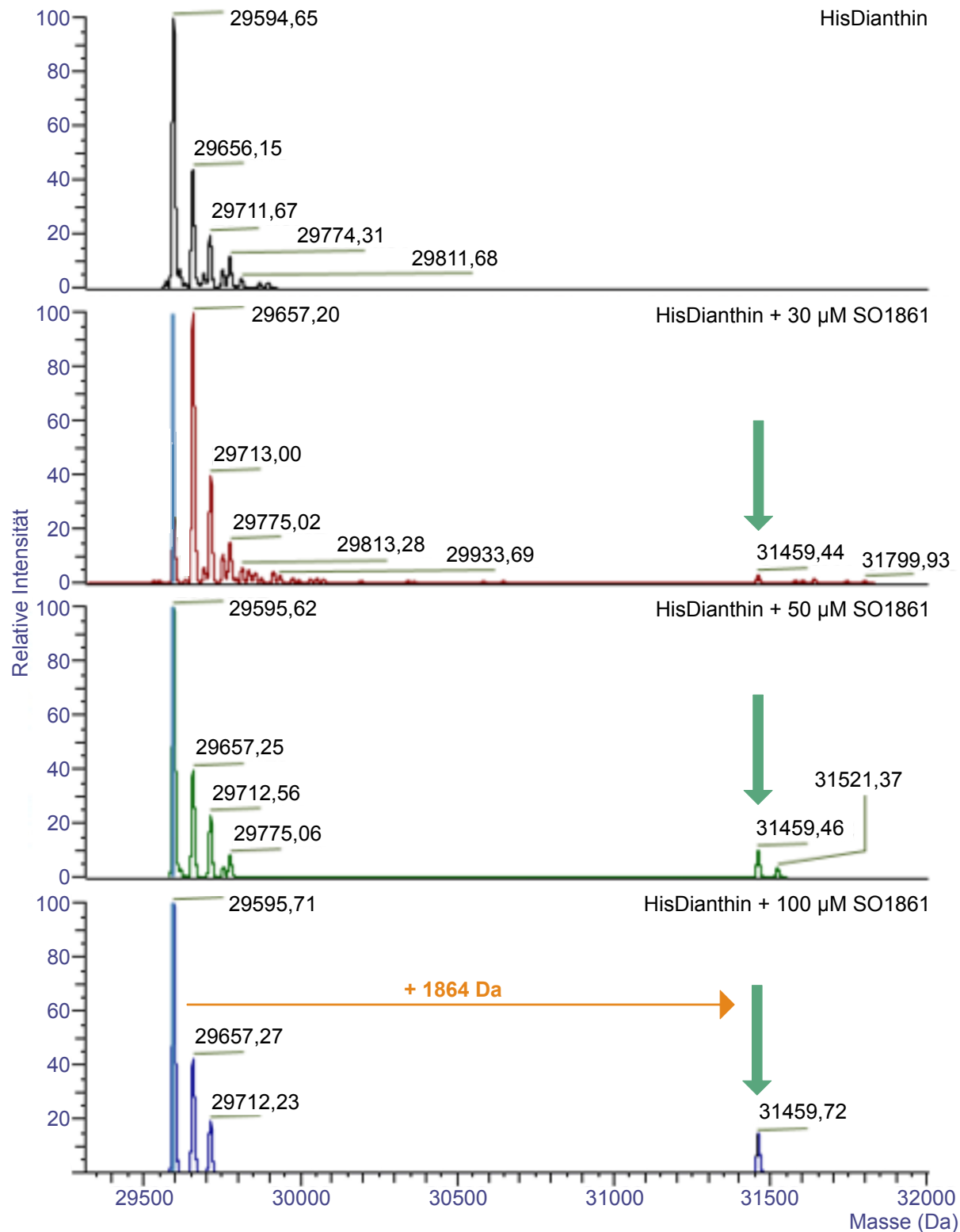


Abbildung 22. Analyse der Bindung von SO1861 an ^{His}Dianthin mittels nativer MS. Massenspektren wurden von ^{His}Dianthin allein und unter Zugabe von 30 µM, 50 µM und 100 µM SO1861 aufgenommen (2.7.5.4). Mit zunehmender SO1861-Konzentration wurde bei 31459 Da ein zusätzliches Signal, welches auf eine Bindung von SO1861 an ^{His}Dianthin deutete, detektiert. Die Bindung von SO1861 an ^{His}Dianthin ließ sich als Massenzunahme von 1864 Da, welche relativ nahe an der theoretischen Masse (1862,88 Da) des SO1861 lag, messen. Das Signal der Bindung von SO1861 an ^{His}Dianthin ist durch einen grünen Pfeil hervorgehoben. Auf der y-Achse ist die relative Intensität und auf der x-Achse die dekonvolvierte Masse in Da dargestellt.

3.2.4 Auswahl der basischen Aminosäuren

Der Interaktionsmechanismus zwischen ^{His}Dianthin und SO1861 sollte mit Fokus auf die basischen Aminosäuren, vor allem auf Lysin-Reste untersucht werden. Zwei Bedingungen waren an die Auswahl der Lysin-Reste geknüpft: Vorkommen in anderen Typ I RIPs, für die eine Interaktion mit Triterpensaponinen aufgezeigt werden konnte und Lokalisation außerhalb der Substratbindetasche. Wie in Abbildung 23 dargestellt, wurde hierfür die Sequenz von Dianthin-30 mit den Sequenzen von Saporin-S6, Gypsophilin-S und Agrostin mit dem Online-Tool Clustal Omega verglichen (Sievers *et al.*, 2011). Der Sequenzvergleich zeigte, dass Dianthin-30 über 19 Lysine verfügt, wovon alle in mindestens einem weiteren Typ I RIP konserviert sind (s. Abbildung 23). Die Lysine an den Positionen 138, 211 und 248 sind an der Substratbindung beteiligt und wurden daher als mögliche ^{His}Dianthin-Mutanten ausgeschlossen (Kurinov *et al.*, 2004). Zusätzlich zu den Lysin-Resten wurde der Arginin-Rest Arg24 ausgewählt.

		24		50			
Dianthin-30	ATAYTLNLANPSASQYSSFLDQIRNNVRDTS LIYGGTDVAVIGAPST--TDKFLRL-NFQ				57		
Saporin-S6	VTSITLDLVNPTAGQYSSFVDKIRNNVKDPNLKYGGTDIAVIGPPS---KEKFLRI-NFQ				56		
Gypsophilin-S	-TTITLNLATPTAGQYSSFLDRIRNNVRDTKLYGGTDIAVIGPPS---RDKFLRI-NFQ				55		
Agrostin	-QFTTLTWDFSKVQQYQGLVASLRKE-----LGATTVCTIPATSETPNPTFILVKIIN				52		
	** .. **...: :*: : *.* :..* * .*: : ::						
		92		113			
Dianthin-30	GPRGTVSLGLRRENLYVVAYLAMDNANVNRAYYFKNQITS AELTALFPEVVANQKQLEY				117		
Saporin-S6	SSRGTVSLGLKRDNLVYVAYLAMDNNTNVNRAYYFKSEITS AELTALFPEATTANQKALEY				116		
Gypsophilin-S	GPRGTVSLGLRRENLYVVSYLAMDNTGVNKAYYFKNQITTVELTTLFPEATVANHKLLEY				115		
Agrostin	KKKVAITVAFRKSNNVYVGYQDVTG-GKIRANFVANELTAQERAQLFPTATIRA-PDLPY				110		
	: : : : : : : : : * * * * . . : * : . : : * : * : * * * . . * *						
		126 129	138	156 157	162		
Dianthin-30	GEDYQAIEKNAKITTGDQSRKELGLGINLLITMIDGVNKK--VRVVKDEARFLLIAIQMT				175		
Saporin-S6	TEDYQSIEKNAQITQGDKSRKELGLGIDLLTFMEAVNKK--ARVVKNEARFLLIAIQMT				174		
Gypsophilin-S	AEDYQSIEKNAKITTQGDKSRKELGLGIDLLVTSIDGVNRK--VRVVRDEARFLLIGIQMT				173		
Agrostin	GVSYVDLERVAGVD-----RANFRLGVENLSPMLDIVNGADYGKSRQDLAKFALMVIQMV				165		
	. * : * : * : * * : * * : * : * * : : * : * * : * * .						
		190	195	201	211	221	227
Dianthin-30	AEAARFRYIQNLVTKNFP---NKFDSENKVIQFQVSWKISTAIYGDCKNGVFNKDYDFG						232
Saporin-S6	AEVARFRYIQNLVTKNFP---NKFSDNKVIQFEVSWRKISTAIYGDCKNGVFNKDYDFG						231
Gypsophilin-S	AEAARFRYIQNLVTKNFP---KKFESENKVIQFQISWSKISKAIYGDCKKGVFNKDYDFG						230
Agrostin	AEGTRFKYISDIVLKQGTQEGKTFLEPDATFIKLETNWGSFSDLIHNSPSCPPVKSPNFP						225
	** : * : * : * : * * : * * : * : * * : * : * * : * * . . * . : *						
		235 240	248	254			
Dianthin-30	FGKVRQAKDLQMGLLKYLGRPK				254		
Saporin-S6	FGKVRQVKDLQMGLLMYLGRPK				253		
Gypsophilin-S	FGKVRQAKQLQMGLLMYLGRPK				252		
Agrostin	A---WSDIKPQVGLLKFKTTR-				243		
	. . * : * * * :						

Abbildung 23. Auswahl der basischen Aminosäuren für die Mutationsstudie am ^{His}Dianthin. Die Aminosäuresequenzen von Dianthin-30, Saporin-S6, Gypsophilin-S und Agrostin wurden mit dem Online-Tool Clustal Omega verglichen (Kokorin *et al.*, 2019; Legname *et al.*, 1991; Maras *et al.*, 1990; Sievers *et al.*, 2011; Weise *et al.*, 2020). Lysin-Reste sind gelb und der Arg24-Rest ist türkis markiert. Aminosäuren, die Teil des aktiven Zentrums sind, sind dick hervorgehoben (Arg68, Tyr73, Val74, Glu119, Tyr121, Arg137, Lys138, Glu177, Arg180, Trp209, Lys211 und Lys248). Orange hervorgehoben sind Lysin-Reste, die sich im aktiven Zentrum befinden. (Kurinov *et al.*, 2004). Bedeutung der Symbole: (*) entspricht hoch konservierten Aminosäuren, (:) entspricht hoher Identität und (.) moderater Identität der Aminosäuren.

Arg24 ist hoch konserviert sowohl in den in Abbildung 23 aufgelisteten Typ I RIPs als auch in weiteren Typ I und II RIPs, wie ein Sequenzvergleich von Di Maro *et al.* zeigte (Di Maro *et al.*, 2014). Somit wurden insgesamt 17 Aminosäure-Reste (Arg24, Lys50, Lys92, Lys113, Lys126, Lys129, Lys156, Lys157, Lys162, Lys190, Lys195, Lys201, Lys221, Lys227, Lys235, Lys240 und Lys254) ausgewählt, die auf ihre Beteiligung an der Interaktion zwischen ^{His}Dianthin und SO1861 untersucht werden sollten.

3.2.5 Einfügen der Mutationen im ^{His}Dianthin-Vektor

Die Beteiligung der unter 3.2.4 beschriebenen 17 Aminosäure-Reste des ^{His}Dianthins an der Interaktion mit SO1861 wurde untersucht, indem die entsprechende basische Aminosäure durch Alanin ersetzt wurde. Neben den Einzelmutationen am ^{His}Dianthin wurden auch ^{His}Dianthin-Mutanten erstellt, bei denen gleichzeitig zwei bzw. drei Lysin-Reste durch Alanin ersetzt wurden. Insgesamt wurden so 19 ^{His}Dianthin-Mutanten generiert: Lys50Ala, Lys92Ala, Lys113Ala, Lys126Ala, Lys129Ala, Lys156Ala, Lys157Ala, Lys162Ala, Lys190Ala, Lys195Ala, Lys201Ala, Lys221Ala, Lys227Ala, Lys235Ala, Lys240Ala, Lys254Ala, Lys50/92Ala, Lys50/92/126Ala und Arg24Ala. Um die Alanin-Mutanten exprimieren zu können, wurde daher die Alanin-Substitution zunächst auf Ebene der DNA durchgeführt (2.7.2.6). Durch Austausch des entsprechenden Codons der cDNA des pET11d-^{His}Dianthin-Vektors wurden die Vektoren für die Mutanten Lys195Ala, Lys227Ala und Arg24Ala mittels zielgerichteter Mutagenese hergestellt (Abbildung 24). Das Herstellen der ^{His}Dianthin-Mutanten-Vektoren war in zwei Schritten möglich: Der erste Schritt bestand aus einer PCR, die für jede Mutante mit individuellen Primern durchgeführt wurde.

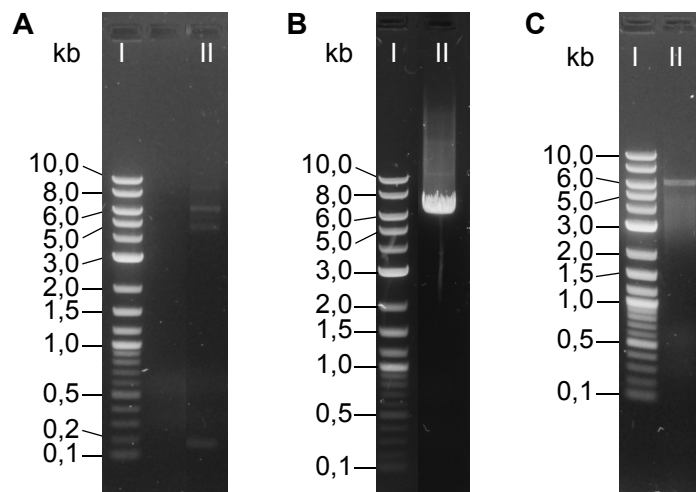


Abbildung 24. PCR-Produkte der zielgerichteten Mutagenese des pET11d-^{His}Dianthin-Vektors. Die 1 kb Plus DNA-Leiter wurde für die 1%igen Agarosegele als Marker (Spur I) verwendet. Aus jedem PCR-Ansatz wurden 5 µl Probe entnommen, mit DNA-Gel-Ladefarbstoff versetzt und auf das Gel aufgetragen (2.7.2.5). (A) Spur II: pET11d-^{His}Dianthin Lys195Ala. (B) Spur II: pET11d-^{His}Dianthin Lys227Ala. (C) Spur II: pET11d-^{His}Dianthin Arg24Ala. Die drei Zielvektoren wiesen eine Bande im Bereich der erwarteten Größe von 6114 bp auf. Die Intensität der Zielbande der verschiedenen Proben variierte.

Die PCR führte bei den drei Mutanten zu dem erwarteten Produkt bei 6114 bp (Abbildung 24). Im zweiten Schritt erfolgte eine Zirkularisierung der PCR-Produkte, die direkt im Anschluss in NEB[®] 5-alpha *E. coli* transformiert werden konnten. Plasmidpräparationen und anschließende Sequenzierungen (mit den Primern der Tabelle 3) durch LGC Genomics (Berlin) bestätigten das korrekte Einfügen der Alanin-Substitution und die Intaktheit des pET11d-Vektors (s. im Anhang Abbildung A10). Aus zeitlichen Gründen wurden die restlichen 16 Vektoren zur Synthese bei BioCat (Heidelberg) in Auftrag gegeben.

3.2.6 Proteinexpression und Aufreinigung der ^{His}Dianthin-Mutanten

Insgesamt wurden 19 ^{His}Dianthin-Mutanten in zwei verschiedenen *E. coli* Stämmen exprimiert (2.7.2.7). Da die Proteinexpression einiger ^{His}Dianthin-Mutanten in NiCo21(DE3) nicht erfolgreich war, wurde die Expression von ^{His}Dianthin Lys156Ala, Lys157Ala, Lys235Ala, Lys240Ala und Lys50/92/126Ala im BL21(DE3)pLysS Stamm durchgeführt. Für die Aufreinigung wurde das Amicon[®] Pro Affinitätskonzentrationskit Ni-NTA verwendet. Im Anschluss wurden die Proteinkonzentrationen der Elutionsfraktionen mit dem BCA-Assay am NanoDrop[™] One bestimmt (2.7.3.1). Das Amicon[®] Pro Affinitätskonzentrationskit Ni-NTA erlaubte eine schnelle Aufreinigung mit kleinen Ausbeuten. Die Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE zeigte, dass alle ^{His}Dianthin-Mutanten eine deutliche Bande in etwa auf der Höhe von ^{His}Dianthin aufwiesen (Abbildung 25). Die Elutionsfraktionen der ^{His}Dianthin-Mutanten Lys129Ala, Lys157Ala, Lys227Ala, Lys235Ala und Lys240Ala enthielten neben der Zielproteinbande noch schwache Verunreinigungen. Aufgrund der hohen Anzahl an zu exprimierenden Proteinen, wurde an dieser Stelle auf ganz reine Elutionsfraktionen verzichtet. ^{His}Dianthin-Mutanten, die im Screening auf zytotoxische Aktivität einen Unterschied zu dem nativen ^{His}Dianthin zeigen würden, sollten erneut exprimiert und ganz rein aufgereinigt werden. Dies traf am Ende nur für ^{His}Dianthin Arg24Ala zu. ^{His}Dianthin Arg24Ala wurde zusätzlich als großer Ansatz exprimiert und wie das native ^{His}Dianthin (Abbildung 20) durch Kombination von manueller Ni-NTA und Kationenaustauschchromatographie aufgereinigt (Abbildung 26). Arg24Ala wurde erfolgreich aus den Bakterien extrahiert (Abbildung 26A, Spur II). Im Zellpellet war kaum noch Zielprotein aufzufinden (Abbildung 26A, Spur III). Das Zielprotein eluierte bei 125 mM Imidazol über drei Fraktionen (E125-1, E125-2 und E125-3), welche vereint und gegen den Startpuffer der Kationenaustauschchromatographie dialysiert wurden (Abbildung 26B, Spur II). Arg24Ala eluierte von der HiTrap[™] SP XL Säule bei 200 und 300 mM NaCl (Abbildung 26B, Spur III–VI). Je NaCl-Konzentration wurden zwei Fraktionen, die reines ^{His}Dianthin Arg24Ala enthielten, aufgefangen.

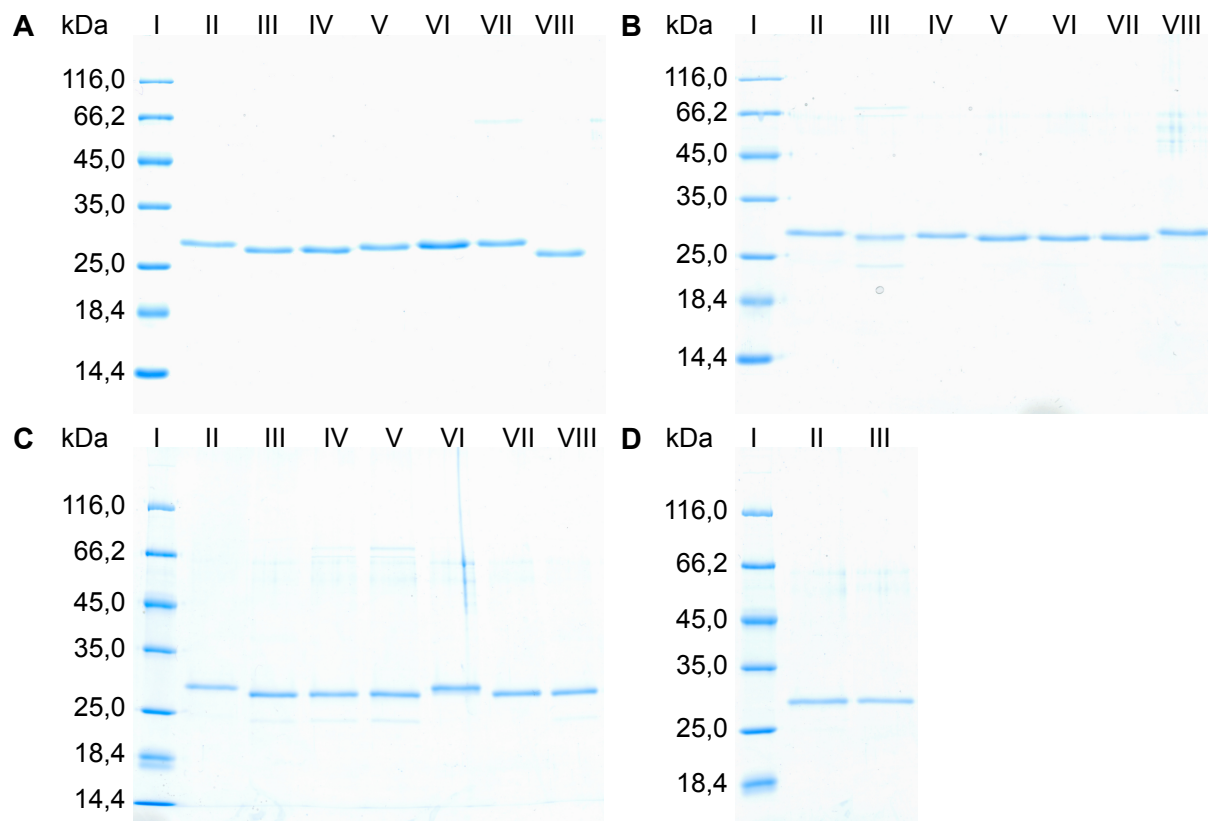


Abbildung 25. SDS-PAGE (12,5 %, Coomassie-Färbung) der aufgereinigten ^{His}Dianthin-Mutanten. Dargestellt sind die Elutionsfraktionen, die mit dem Amicon® Pro Affinitätskonzentrationskit Ni-NTA erhalten wurden. 0,6 µg Protein wurden in jeder Tasche aufgetragen. Der Proteinmarker (Spur I) und das Referenzprotein ^{His}Dianthin (Spur II) befinden sich bei jedem Gel an gleicher Position. (A) ^{His}Dianthin-Mutanten Lys50Ala bis Lys156Ala. III: Lys50Ala; IV: Lys92Ala; V: Lys113Ala; VI: Lys126Ala; VII: Lys129Ala; VIII: Lys156Ala. (B) ^{His}Dianthin-Mutanten Lys157Ala bis Lys221Ala. III: Lys157Ala; IV: Lys162Ala; V: Lys190Ala; VI: Lys195Ala; VII: Lys201Ala; VIII: Lys221Ala. (C) ^{His}Dianthin-Mutanten Lys227Ala bis Arg24Ala. III: Lys227Ala; IV: Lys235Ala; V: Lys240Ala; VI: Lys254Ala; VII: Lys50/92Ala; VIII: Arg24Ala. (D) ^{His}Dianthin-Mutante Lys50/90/126Ala (Spur III).

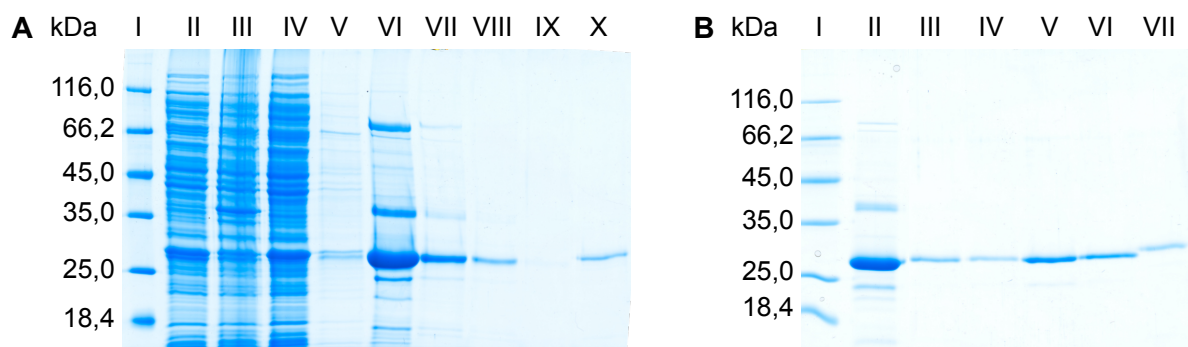


Abbildung 26. Expression in NiCo21(DE3) und Proteinaufreinigung von ^{His}Dianthin Arg24Ala. Die 12,5%igen Polyacrylamidgele mit Proteinmarker (I) wurden mit Coomassie angefärbt. (A) Aufreinigung mittels manueller Ni-NTA. II: Unaufgereinigter Proteinextrakt nach Lyse (~ 85 µg). III: Zellpellet nach Lyse (~ 66 µg). IV: Ni-NTA Durchfluss. V: Waschfraktion. VI: Ni-NTA E125-1 (125 mM Imidazol). VII: Ni-NTA E125-2. VIII: Ni-NTA E125-3. IX: Ni-NTA E250. X: Referenzprotein ^{His}Dianthin (0,6 µg). (B) Aufreinigung mittels Kationenaustauschchromatographie Die aufgefangenen Peaks wurden im Anschluss vereint und dialysiert. II: E125-1, E125-2, E125-3 vereint und dialysiert (auf Kationenaustauscher aufgetragene Probe). III: Peak 2.1 (200 mM NaCl, ~ 0,8 µg). IV: Peak 2.2 (200 mM NaCl, ~ 0,6 µg). V: Peak 3.1 (300 mM NaCl, ~ 1,8 µg). VI: Peak 3.2 (300 mM NaCl, ~ 1,3 µg). VII: Referenzprotein ^{His}Dianthin (0,6 µg).

Um die Identität des mittels Kationenaustauschchromatographie isolierten ^{His}Dianthin Arg24Ala zu bestimmen, wurden die Gelbanden mit Trypsin und AspN verdaut und deren Peptidmassenfingerprints mit der MALDI-TOF-MS aufgenommen (2.7.5.1 & 2.7.5.2). Während die Spaltstelle von Trypsin am C-Terminus von Lysin und Arginin liegt, spaltet AspN *N*-terminal an Asparaginsäure. Das Einführen der Alanin-Substitution hatte somit zur Folge, dass eine Trypsin-Spaltstelle verschwand. Die Peptidmassenfingerprints der tryptischen Peptide waren für die Bestätigung des Zielproteins als ^{His}Dianthin-Variante geeignet. Es konnten alle erwarteten, übereinstimmenden Peptide nachgewiesen werden (Abbildung 27A–B).

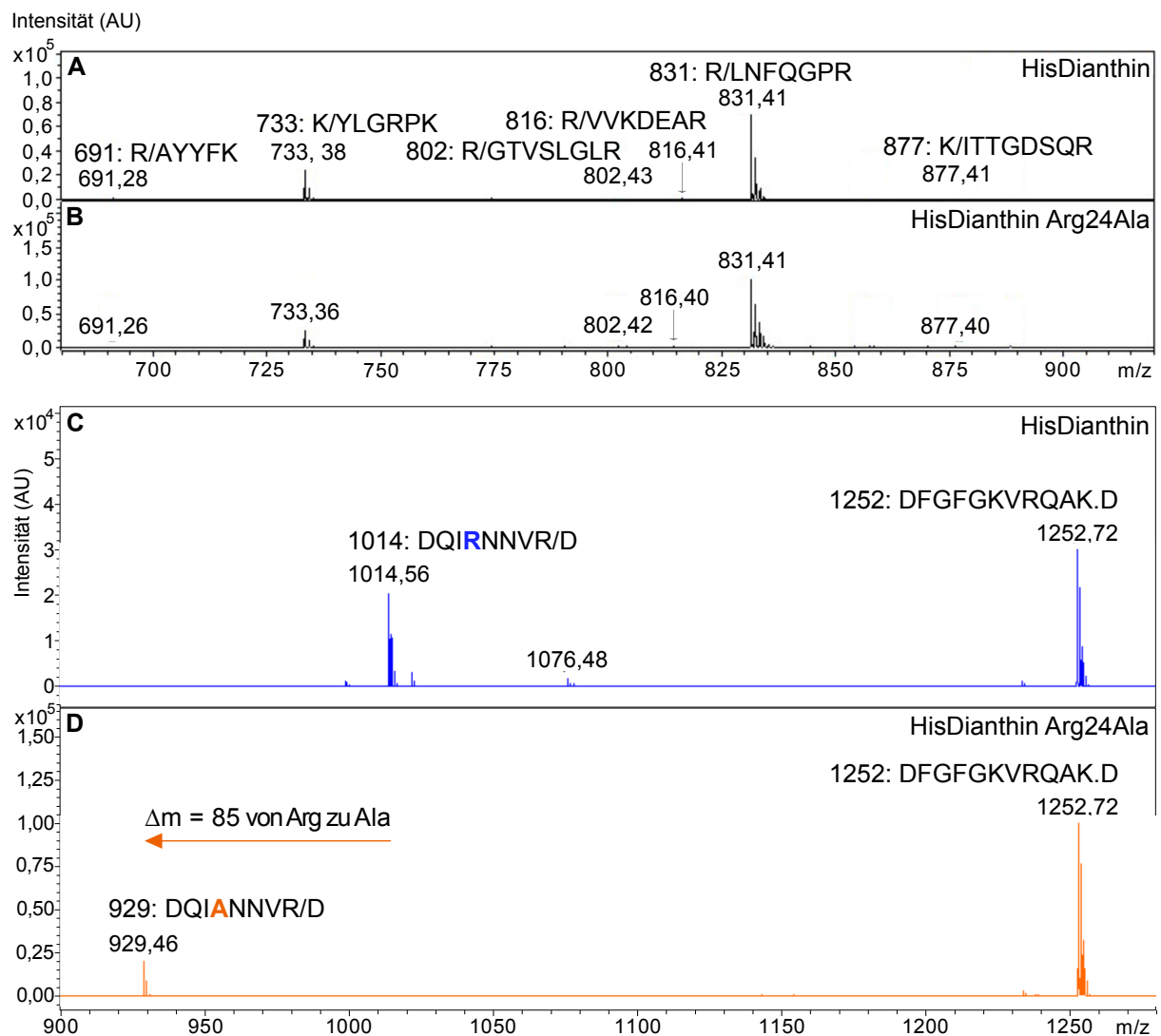


Abbildung 27. MALDI-TOF-Massenspektren des In-Gel-Verdau von ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Gerät Ultraflex II. (A) & (B) Tryptische Peptidmassenfingerprints von ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala im Massenbereich 680–920 Da. Alle abgebildeten Peptide von ^{His}Dianthin stimmten mit denen von ^{His}Dianthin Arg24Ala überein. Somit konnte die Identität von ^{His}Dianthin Arg24Ala als ^{His}Dianthin-Variante bestätigt werden. (C) & (D) Peptidmassenfingerprints des In-Gel-Verdau mit AspN im Massenbereich von 900–1280 m/z. Während das zur Identifizierung notwendige Peptid des ^{His}Dianthins bei 1014,56 Da lag, verschob sich der Peak des Peptides von ^{His}Dianthin Arg24Ala um 85 Da auf 929,46 Da. 85 Da entsprach der Massendifferenz, die durch die Alanin-Substitution zu erwarten war.

Da das tryptische Peptid des nativen ^{His}Dianthins, das zur Differenzierung zwischen ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala hätte herangezogen werden können, mit einer Masse von 502 Da im Bereich der MALDI-Matrix Massenpeaks lag, wurde zusätzlich der In-Gel-Verdau mit AspN durchgeführt. Die *N*-terminale Spaltung an Asparginsäure führte zu einem Peptid (Position 21–28), das eine Differenzierung zwischen ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala erlaubte. Die Masse des ^{His}Dianthin-Peptides (DQIRNNVR/D) entsprach 1014 Da und die des ^{His}Dianthin Arg24Ala-Peptides (DQIANNVR/D) 929 Da. Die Massendifferenz von 85 Da entsprach dem Austausch von Arginin (156 Da) gegen Alanin (71 Da). Die zugehörige Peptidmasse konnte in dem jeweiligen Massenspektrum wiedergefunden werden. Somit wurde das korrekte Einfügen der Arg24Ala-Mutation im ^{His}Dianthin Arg24Ala auf Proteinlevel bestätigt (Abbildung 27C–D).

3.2.7 Bestimmung der Auswirkung der Mutationen auf die *N*-Glykosidaseaktivität

Die Auswirkung der Alanin-Substitution verschiedenster Lysin-Reste und einem Arginin-Rest auf die *N*-Glykosidaseaktivität von ^{His}Dianthin wurde durch Quantifizierung des freigesetzten Adenins von dem künstlichen Substrat A30 ausgewertet (2.7.4.2). Die Adeninfreisetzung des nativen ^{His}Dianthins wurde als Referenzwert festgelegt und die Adeninfreisetzungen der ^{His}Dianthin-Mutanten wurden prozentual auf den Referenzwert bezogen (Abbildung 28). Wie in Abbildung 28 dargestellt, konnte eine Adeninfreisetzung für alle ^{His}Dianthin-Mutanten nachgewiesen werden. Das Einfügen der Alanin-Substitution bewirkte bei einigen ^{His}Dianthin-Mutanten eine Reduktion der Aktivität. So hatte die Alanin-Substitution an den Positionen 50, 113, 157, 221 und 227 einen signifikanten Einfluss auf die Adeninfreisetzung (Abbildung 28). Durch Einführen mehrerer Alanin-Substitutionen im gleichen Protein, konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion der *N*-Glykosidaseaktivität beobachtet werden. Dabei wies Lys50/92/126Ala mit drei gleichzeitigen Alanin-Substitutionen die geringste Aktivität auf.

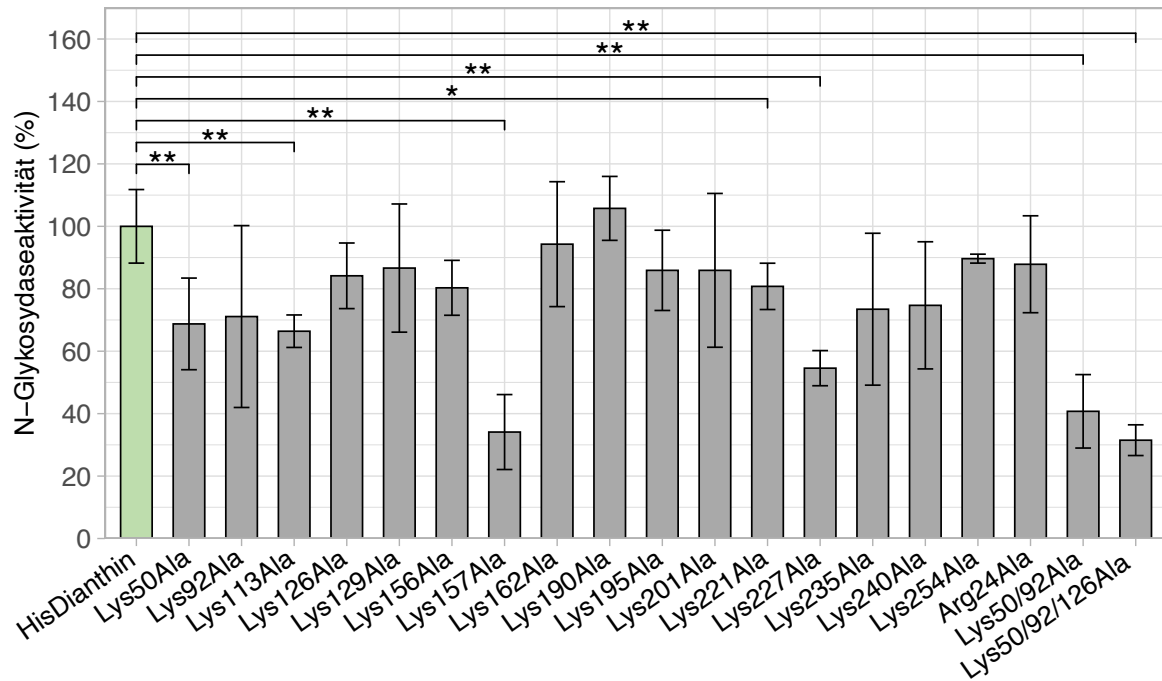


Abbildung 28. N-Glykosylaseaktivität der ^{His}Dianthin-Mutanten im Vergleich zu dem nativen ^{His}Dianthin. Der *adenine-releasing assay* wurde mit einer Proteinkonzentration von 169 nM und 21,4 μ M A30-Substrat über Nacht bei 37 °C durchgeführt (2.7.4.2). Die Aktivitäten der ^{His}Dianthin-Mutanten wurden prozentual auf die Aktivität von ^{His}Dianthin bezogen. Die Lysin-Substitution an den Positionen 50, 113, 157, 221, 227 sowie die kombinierten Alanin-Substitutionen an den Positionen 50/92 und 50/92/126 übten sich signifikant auf die Enzymaktivität aus. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen, $n = 3$ (Signifikanz: *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; U-Test).

3.2.8 Screening der ^{His}Dianthin-Mutanten auf zytotoxische Aktivität in Neuro-2A-Zellen

Wie unter 1.2 erwähnt, verstärken Triterpensaponine 1100- bis zu 100000-fach die Zytotoxizität von Typ I RIPs (C. Bachran *et al.*, 2006; Hebestreit & Melzig, 2003; Hebestreit *et al.*, 2006; Holmes *et al.*, 2015). Das bedeutet, dass ^{His}Dianthin kombiniert mit SO1861 (^{His}Dianthin + SO1861) bei Konzentrationen zytotoxisch ist, bei denen ^{His}Dianthin allein keine Zytotoxizität aufweist (^{His}Dianthin – SO1861). Der Einfluss der ^{His}Dianthin-Mutationen auf die Interaktion mit SO1861 wurde daher durch Messung der synergistischen Zytotoxizität (^{His}Dianthin + SO1861) untersucht (Abbildung 29). Um Änderungen in der Zytotoxizität messen zu können, wurde das Screening auf zytotoxische Aktivität mit der niedrigsten ^{His}Dianthin-Konzentration durchgeführt, die in Kombination mit SO1861 noch volle Zytotoxizität aufwies. Alanin-Substitutionen, die die molekulare Interaktion zwischen ^{His}Dianthin und SO1861 beeinträchtigen, würden sich in Form einer reduzierten endosomalen Freisetzung und dementsprechend einer reduzierten Zytotoxizität im Vergleich zu dem nativen ^{His}Dianthin + SO1861 zeigen. Das Screening der ^{His}Dianthin-Mutanten auf zytotoxische Aktivität wurde sowohl mit Zugabe von SO1861 als auch ohne Zugabe von SO1861 durchgeführt.

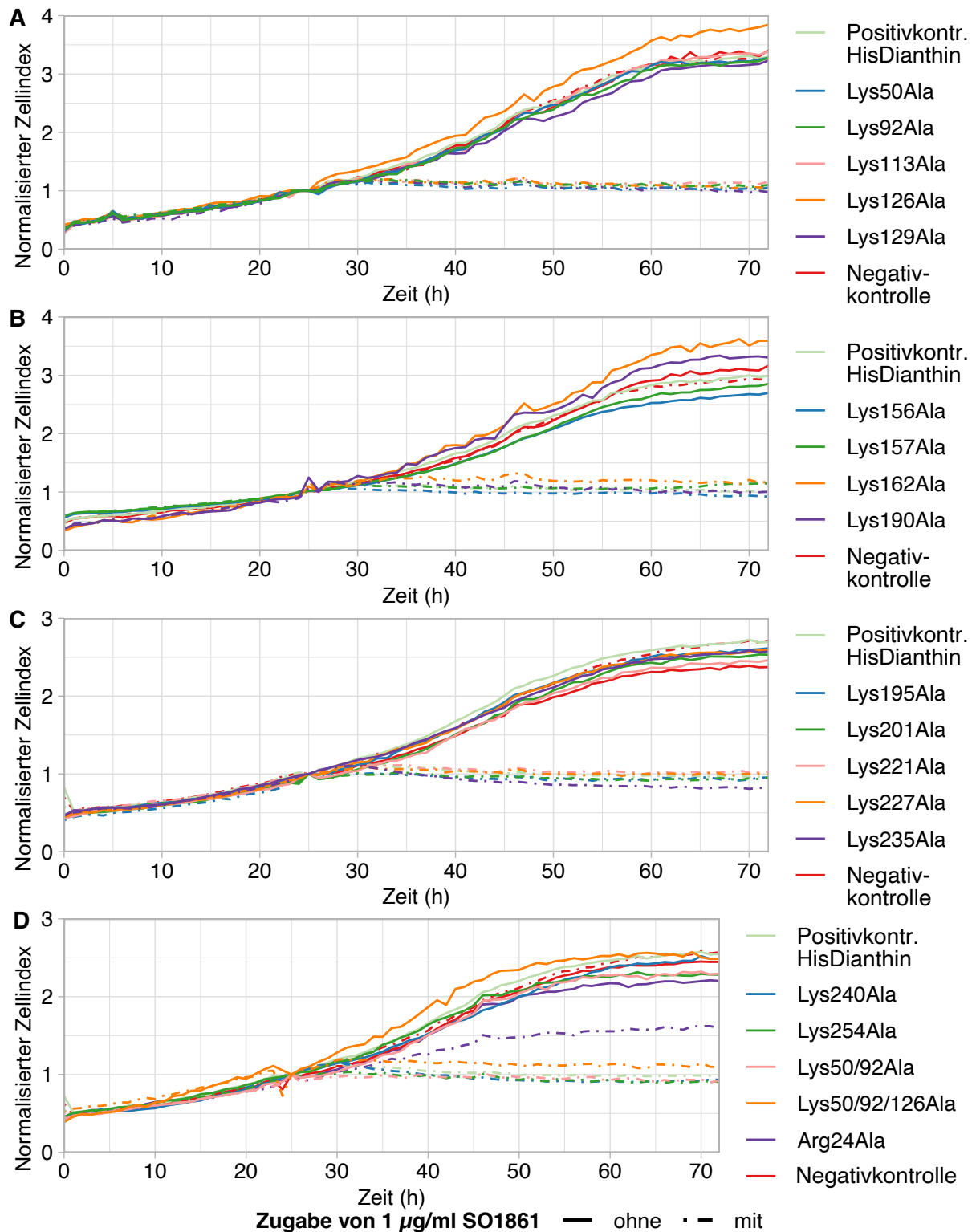


Abbildung 29. Screening der ^{His}Dianthin-Mutanten auf zytotoxische Aktivität in Neuro-2A-Zellen. (A) Lys50Ala bis Lys129Ala. (B) Lys156Ala bis Lys190Ala. (C) Lys195Ala bis Lys235Ala. (D) Lys240Ala bis Arg24Ala. Die Zellkonfluenz wurde über 72 h mit dem CytoSMART™ Omni System aufgenommen. 24 h nach der Aussaat wurde 1 nM ^{His}Dianthin-Mutante ± 1 µg/ml SO1861 hinzugeben und für 48 h inkubiert. Kontrollzellen wurden mit 1 nM ^{His}Dianthin ± 1 µg/ml SO1861 (Positivkontrolle) und PBS ± 1 µg/ml SO1861 (Negativkontrolle) behandelt. Die synergistische Zytotoxizität der Lysin-Mutanten wich nicht von der des nativen ^{His}Dianthins ab. Nur ^{His}Dianthin Arg24Ala + SO1861 übte eine geringere Zytotoxizität als die native Form aus. Dargestellt ist der normalisierte Zellindex, der durch Normalisierung der Konfluenzdaten auf den Zeitpunkt nach der Zugabe (25 h) berechnet wurde. Die Daten sind als Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen je als Triplikat (n = 3) gezeigt.

Abbildung 29 zeigt, dass die Zytotoxizitäten der Lysin-substituierten ^{His}Dianthin-Mutanten ± SO1861 sich nicht von der des nativen ^{His}Dianthins unterschieden. Dahingegen war der zytotoxische Effekt von ^{His}Dianthin Arg24Ala + SO1861 im Vergleich zu dem nativen ^{His}Dianthin geringer ausgeprägt (Abbildung 29D). Alle weiteren Untersuchungen wurden nur mit der Arg24Ala-Mutante durchgeführt.

3.2.9 Vergleichende Toxizitätsuntersuchung von ^{His}Dianthin Arg24Ala in drei Zelllinien

Wie unter 3.2.8 beschrieben, war die synergistische Zytotoxizität von ^{His}Dianthin Arg24Ala + SO1861 im Vergleich zu dem nativen ^{His}Dianthin reduziert. Um die Signifikanz der Reduktion und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Zelllinien zu bestimmen, wurden zytotoxische Untersuchungen mit 0,1 und 1 nM ^{His}Dianthin Arg24Ala in A2058-, HCT116- und Neuro-2A-Zellen durchgeführt. Wie in Abbildung 30 dargestellt, wurde durch das Einführen der Arg24Ala-Mutation im ^{His}Dianthin im Vergleich zu dem nativen ^{His}Dianthin eine signifikante Zunahme der Zellviabilität, entsprechend einer Reduktion der synergistischen Zytotoxizität, in den drei untersuchten Zelllinien gemessen.

Das Ausmaß der Zunahme der Zellviabilität bzw. der Zytotoxizitätsreduktion war in den Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt. Während die Zellviabilität aufgrund der Mutation (Vergleich ^{His}Dianthin + SO1861 mit ^{His}Dianthin Arg24Ala + SO1861) in den A2058-Zellen bei 0,1 nM um 106,8 % und bei 1 nM um 748,9 % zunahm, lagen die Viabilitätszunahmen in den HCT116-Zellen bei 117,8 % (0,1 nM) und bei 146,5 % (1 nM). In den Neuro-2A-Zellen stieg die Zellviabilität etwas weniger, bei 0,1 nM um 69,7 % und bei einer Konzentration von 1 nM lag die Zunahme bei 346,9 %. Somit konnte für ^{His}Dianthin Arg24Ala sowohl nachgewiesen werden, dass die Abnahme der synergistischen Zytotoxizität signifikant war, als auch, dass die Abnahme der Zytotoxizität nicht von der Neuro-2A-Zelllinie abhängig war.

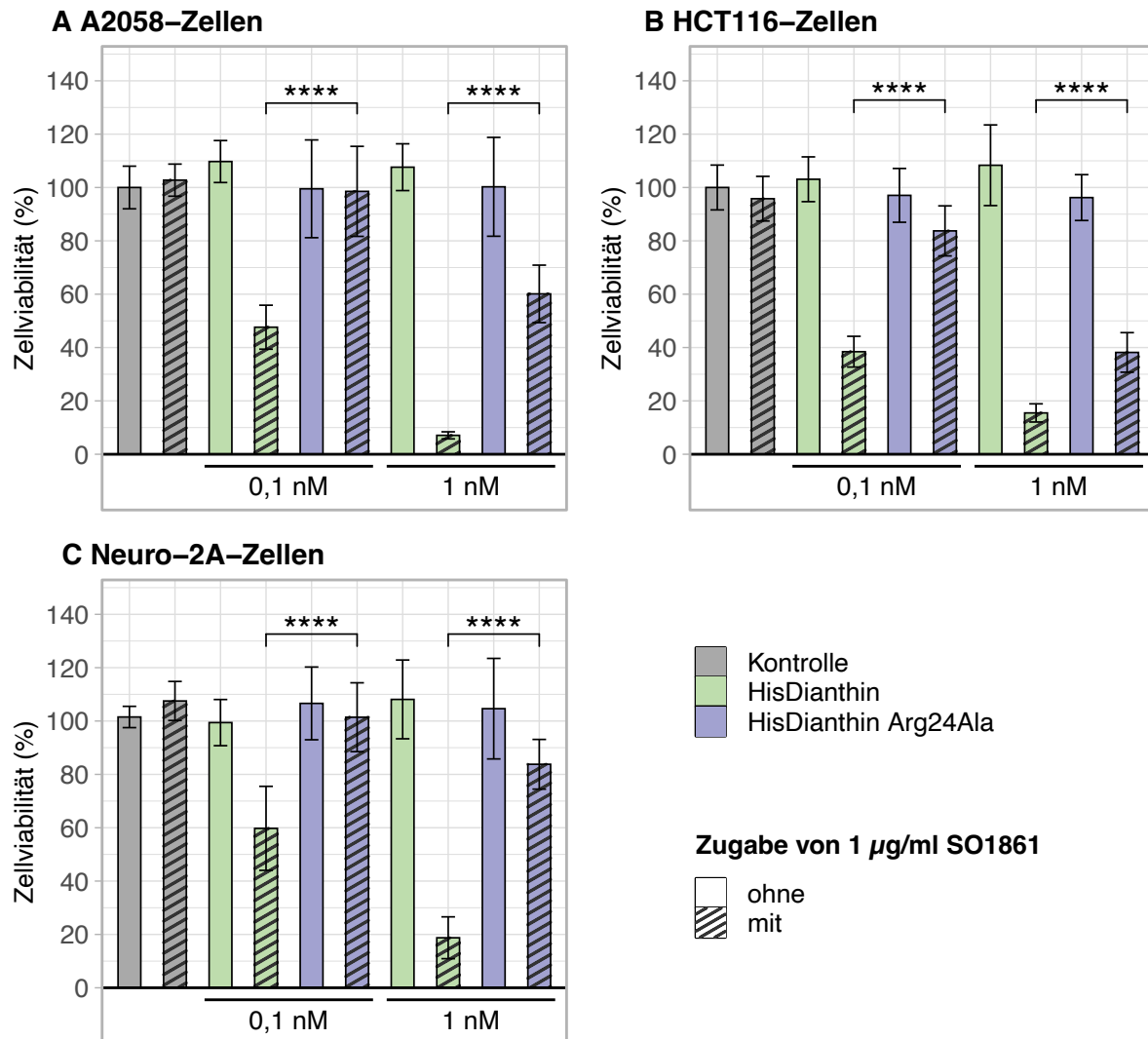


Abbildung 30. Zytotoxizität von HisDianthin Arg24Ala in drei Zelllinien. A2058-Zellen (A), HCT116-Zellen (B) und Neuro-2A-Zellen (C) wurden mit 0,1 und 1 nM HisDianthin ± 1 µg/ml SO1861 und HisDianthin Arg24Ala ± 1 µg/ml SO1861 für 48 h inkubiert (2.7.6.3). Am Ende der Inkubation wurde zur Bestimmung der Zellviabilität ein MTT-Assay durchgeführt (2.7.6.4). Kontrollzellen wurden äquivalent mit PBS ± 1 µg/ml SO1861 behandelt. Die Arg24Ala-Mutation (+ SO1861) bewirkte in allen Zelllinien eine signifikant reduzierte synergistische Zytotoxizität im Vergleich zu dem nativen HisDianthin. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen je als Triplikat, n = 3 (Signifikanz: ****, p ≤ 0,0001, t-Test).

3.2.10 Zytotoxizität von Arg24Ala im höheren Konzentrationsbereich

Nach dem in 3.2.9 nachgewiesen werden konnte, dass sich die Zytotoxizität von HisDianthin Arg24Ala + SO1861 signifikant von der von HisDianthin + SO1861 unterschied, wurde untersucht, ob der Zytotoxizitätsunterschied auf die reduzierte Interaktion mit SO1861 zurückzuführen war. Zu diesem Zweck wurde die Bestimmung der Zytotoxizität von HisDianthin Arg24Ala im hohen Konzentrationsbereich ohne und mit Zugabe von SO1861 durchgeführt (Abbildung 31). Typ I RIPs schaffen es in sehr kleinen Mengen auf nicht aufgeklärtem Mechanismus dem lysosomalen Abbau zu entkommen. Bei sehr niedrigen Toxinkonzentrationen ist dieser Teil nicht ausreichend, um einen

zytotoxischen Effekt auszuüben. Hohe Toxinkonzentrationen ermöglichen auch ohne Zugabe von Triterpensaponinen das Messen des zytotoxischen Effekts von Typ I RIPs. Je höher die eingesetzte RIP-Konzentration, desto höher der Anteil der RIPs, der das Zytoplasma erreicht und zytotoxisch wirken kann (Bolognesi *et al.*, 2012; Fuchs, 2019; Sandvig & van Deurs, 2005). Die untersuchten ^{His}Dianthin Arg24Ala-Konzentrationen (10, 100 und 1000 nM) waren ohne Zugabe von SO1861 nicht zytotoxisch (Abbildung 31A). ^{His}Dianthin hingegen zeigte ab einer Konzentration von 100 nM auch ohne Zugabe von SO1861 einen zytotoxischen Effekt (Abbildung 31A). Wie Abbildung 31A zeigt, unterschieden sich ^{His}Dianthin Arg24Ala und ^{His}Dianthin ab einer Konzentration von 100 nM signifikant in ihrer Zytotoxizität. In Abbildung 31B ist die Zytotoxizität unter Zugabe von 1 µg/ml SO1861 dargestellt. Auch bei hohen Konzentrationen mit Zugabe von SO1861 blieb die Zytotoxizität von ^{His}Dianthin Arg24Ala im Vergleich zu ^{His}Dianthin leicht reduziert. Bei 100 und 1000 nM waren die Zytotoxizitäten von ^{His}Dianthin Arg24Ala und ^{His}Dianthin sehr ähnlich, wobei nur der Unterschied bei 1000 nM signifikant war.

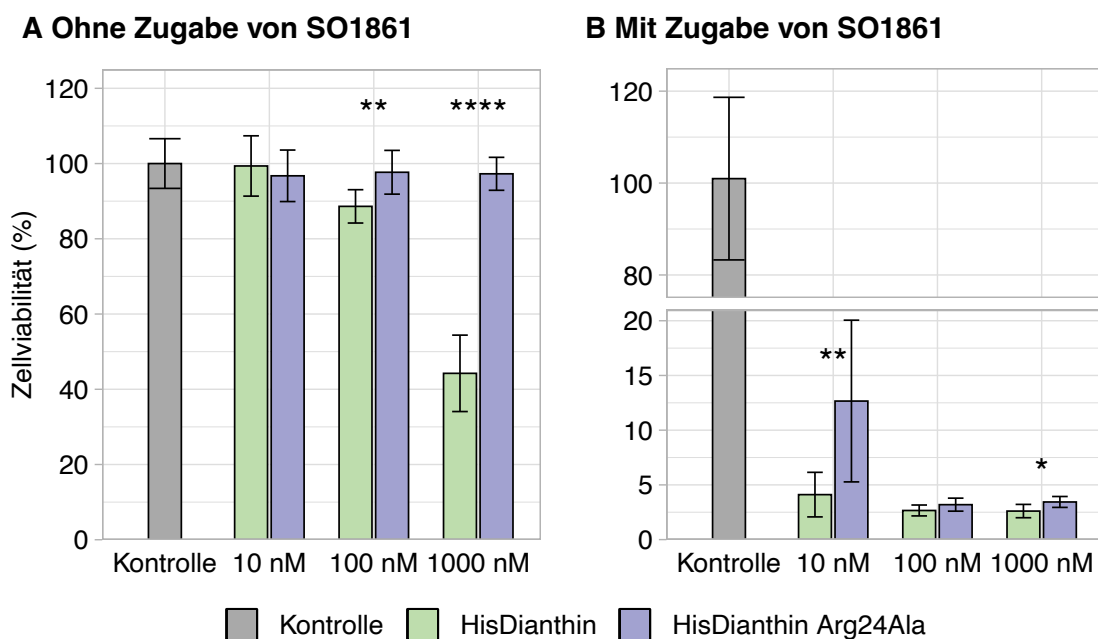


Abbildung 31. Zytotoxizität hoher ^{His}Dianthin Arg24Ala Konzentrationen. Neuro-2A-Zellen wurden mit 10, 100 und 1000 nM ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala ohne Zugabe von SO1861 (A) und mit Zugabe von 1 µg/ml SO1861 (B) für 48 h inkubiert (2.7.6.3). Kontrollzellen wurden äquivalent mit PBS ± 1 µg/ml SO1861 behandelt. Nach der Inkubation wurde zur Bestimmung der Zellviabilität ein MTT-Assay durchgeführt (2.7.6.4). (A) Ohne Zugabe von SO1861 war ^{His}Dianthin Arg24Ala auch im hohen Konzentrationsbereich nicht zytotoxisch. Wohingegen das native ^{His}Dianthin ab einer Konzentration von 100 nM Zytotoxizität zeigte. Die Zytotoxizität der nativen und der mutierten Form unterschieden sich ab einer Konzentration von 100 nM signifikant. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen je als Triplikat, n = 3 (Signifikanz: **, p ≤ 0,01; ****, p ≤ 0,0001; t-Test). (B) Die Zugabe von SO1861 bewirkte bei beiden Formen eine Zunahme der Zytotoxizität. Die Zytotoxizitätsunterschiede beider Formen waren bei 10 nM und bei 1000 nM signifikant. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen je als Triplikat, n = 3 (Signifikanz: *, p ≤ 0,05; **, p ≤ 0,01; U-Test).

Durch das Einführen der Arg24Ala-Mutation im ^{His}Dianthin kam es auch im höheren Konzentrationsbereich ohne Zugabe von SO1861 zu einem Verlust der Zytotoxizität. Bei niedrigeren Konzentrationen (0,1, 1 und 10 nM) in Kombination mit SO1861, als auch im höheren Konzentrationsbereich (100 und 1000 nM) ohne Zugabe von SO1861 war die Zytotoxizität von ^{His}Dianthin Arg24Ala im Vergleich zum nativen ^{His}Dianthin reduziert bzw. nicht mehr vorhanden (Abbildung 30 & Abbildung 31). Dies zeigte, dass die Reduktion der Zytotoxizität nicht auf einer verminderten Interaktion mit SO1861 beruhen kann. Eine verringerte Zytotoxizität aufgrund einer Abnahme der *N*-Glykosidaseaktivität durch Einführen der Arg24Ala-Mutation konnte, wie in 3.2.7 gezeigt, ebenfalls ausgeschlossen werden. ^{His}Dianthin Arg24Ala und ^{His}Dianthin unterschieden sich nicht signifikant in ihrer Enzymaktivität. Die reduzierte Zytotoxizität von ^{His}Dianthin Arg24Ala konnte somit weder auf eine verminderte Interaktion mit SO1861 noch auf einen Aktivitätsverlust zurückgeführt werden. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Zytotoxizitätsabnahme durch eine geringere Endozytose von ^{His}Dianthin Arg24Ala verursacht wurde.

3.2.11 Auswirkung der Arg24Ala-Mutation auf die Proteinstabilität

Neben der Charakterisierung des Einflusses der Arg24Ala-Mutation auf die *N*-Glykosidaseaktivität (3.2.7) und die Zytotoxizität (3.2.9) wurde auch die Thermostabilität von ^{His}Dianthin Arg24Ala im Vergleich zu ^{His}Dianthin untersucht (2.7.4.3). In Abbildung 32 sind die Thermogramme von ^{His}Dianthin (A) und ^{His}Dianthin Arg24Ala (B) dargestellt. Sowohl ^{His}Dianthin als auch ^{His}Dianthin Arg24Ala zeigten eine konzentrationsabhängige Zunahme der Heizrate ($\mu\text{J/s}$). Abbildung 32C zeigt, dass sich der Kurvenverlauf der molaren Wärmekapazität von ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala gleich verhielt. Die Substitution von Arginin durch Alanin hatte jedoch zur Folge, dass die Schmelztemperatur (T_m , der Mittelpunkt des thermischen Phasenübergangs) um $7,2\text{ }^\circ\text{C}$ abnahm. Während für ^{His}Dianthin eine T_m von $65,8\text{ }^\circ\text{C}$ gemessen werden konnte, lag die von ^{His}Dianthin Arg24Ala nur noch bei $58,6\text{ }^\circ\text{C}$.

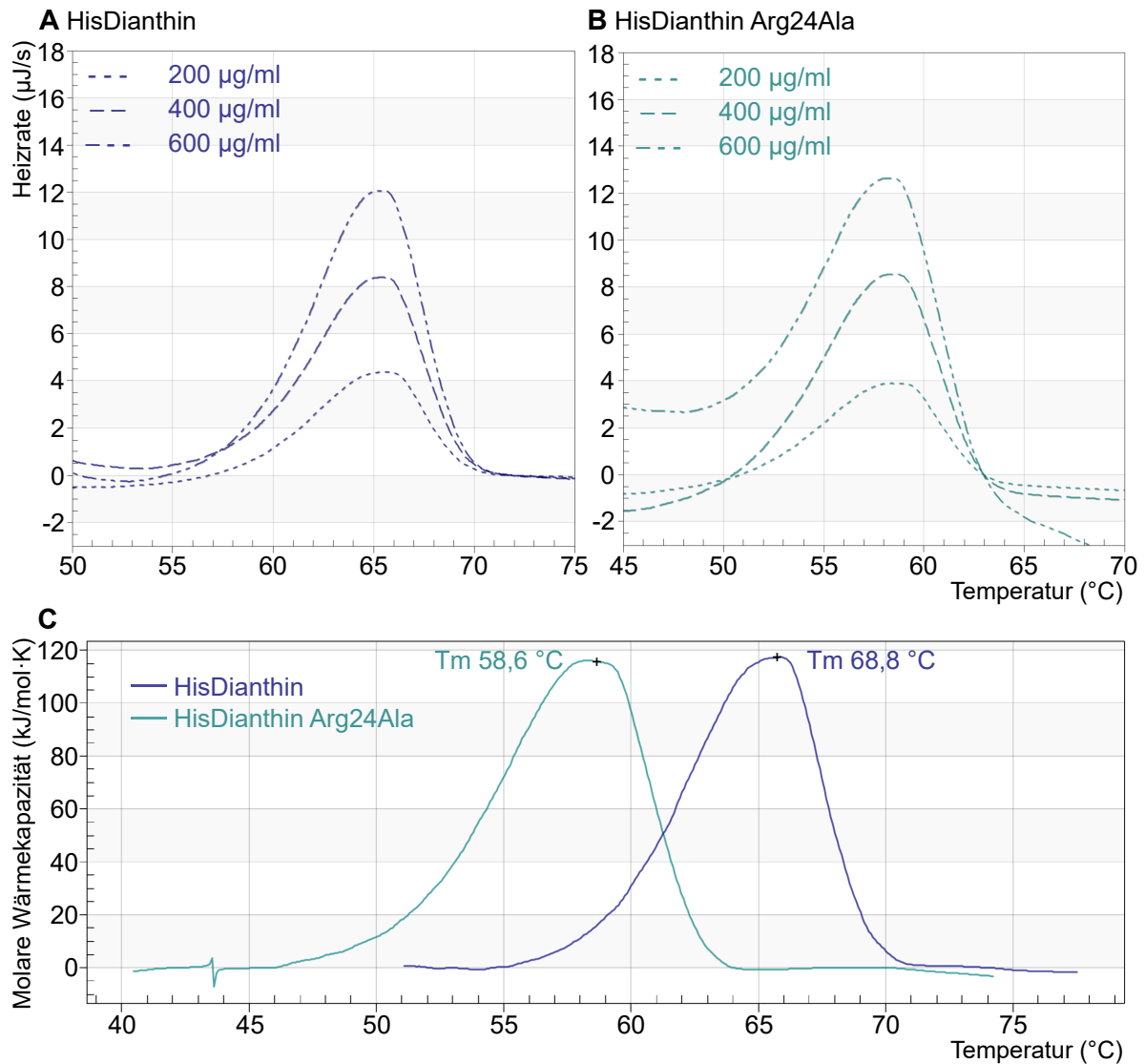


Abbildung 32. Thermostabilität von ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala. Je 200, 400 und 600 µg/ml ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala in PBS pH 7,4 wurden mit einer Abtastrate von 1 °C/min mit dem Nano DSC vermessen (2.7.4.3). Die Konzentrationen der Proben wurden mit dem BCA-Assay bestimmt (2.7.3.1). (A) Thermogramme von ^{His}Dianthin dargestellt als Heizrate (µJ/s). (B) Thermogramme von ^{His}Dianthin Arg24Ala dargestellt als Heizrate (µJ/s). (C) Molare Wärmekapazität von ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala, die aus den zuvor bestimmten Heizraten mittels der Software NanoAnalyze errechnet wurde. Die Mittelpunkte des thermischen Phasenübergangs (T_m) betragen für ^{His}Dianthin 65,8 °C und für ^{His}Dianthin Arg24Ala 58,6 °C.

3.3 Untersuchung der Endozytose von ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala

3.3.1 Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff CF@568

Die in 3.2.10 aufgestellte Hypothese sollte in einem Endozytose-Assay überprüft werden. Hierfür wurden ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala zunächst mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, um im Anschluss die Endozytose mittels Durchflusszytometrie quantifizieren zu können. Die Markierungsreaktionen von ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala mit dem Fluoreszenzfarbstoff CF@568 wurden, wie unter 2.7.3.4 beschrieben, durchgeführt. Die Analyse der Reinheit der Protein-CF568-Konjugate erfolgte sowohl mittels SDS-PAGE als auch durch

MALDI-TOF-MS-Analyse (Abbildung 33 & Abbildung A11). ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala wurden komplett zu ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 umgesetzt. Wie in Abbildung 33 dargestellt, zeigte jedes Protein-CF568-Konjugat nur eine Bande, die leicht diffus war und etwas höher als die der Edukte lag. Der Größenbereich der Protein-CF568-Konjugat-Banden (ca. 30–33 kDa) entsprach dem Massenbereich, der auch mit der MALDI-TOF-MS ermittelt wurde (Abbildung A11). Die Diffusität der Protein-CF568-Konjugat-Banden resultierte aus den unterschiedlichen Markierungsgraden, die in Abbildung A11 dargestellt sind, und dem damit einhergehenden breiteren Massenbereich der Protein-CF568-Konjugate. Die Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Messungen stimmten mit den Ergebnissen der SDS-PAGE überein. Die Massenspektren der Protein-CF568-Konjugate wiesen keinen dem unmarkierten Protein entsprechenden Massenpeak auf. Die Massenpeaks von ^{His}Dianthin-CF568 deckten einen Massenbereich von 30985 Da bis 33865 Da ab. Dies entsprach einem Markierungsgrad (Anzahl Farbstoffmoleküle je Proteinmolekül) von 2–6. Die Massenpeaks von ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 erstreckten sich über einen Massenbereich von 30204 Da bis 33715 Da, einem Markierungsgrad von 1–6 entsprechend (Abbildung A11). Der Markierungsgrad von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 wurde mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt. Einerseits, wie oben beschrieben, mittels MALDI-TOF-MS-Analyse und andererseits aus den Absorptionen bei 280 nm und 562 nm. Hierfür wurden zunächst die Konzentrationen von ^{His}Dianthin-CF568 (2,36 mg/ml) und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 (2,30 mg/ml) nach Herstellerangaben des Fluoreszenzfarbstoffes aus den gemessenen Absorptionen bei 280 nm und 562 nm berechnet. Daraus abgeleitet wurden: der Markierungsgrad 2,07 für ^{His}Dianthin-CF568 und 2,38 für ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568. Die durch Absorptionsmessung bestimmten Markierungsgrade stellten Durchschnittswerte dar. Der aus den Absorptionen berechnete Markierungsgrad für ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 war leicht höher als für ^{His}Dianthin-CF568. Dies spiegelte sich auch in den Intensitäten der mittels MALDI-TOF-MS gemessenen Peaks wider.

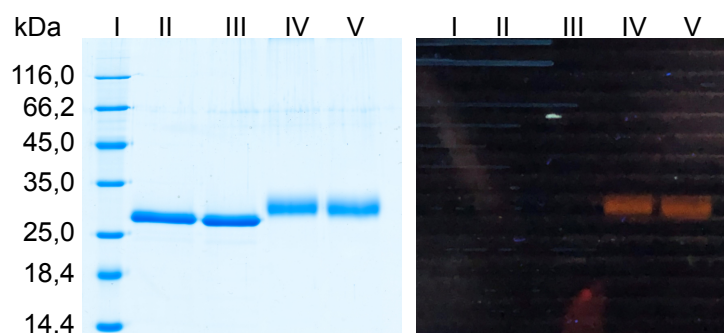


Abbildung 33. SDS-PAGE der Markierungsreaktion von ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala mit CF568 (12,5 %, Coomassie Färbung). Äquivalenter Ausschnitt: linke Seite unter Tageslicht und rechte Seite bei 366 nm dargestellt. I: Proteinmarker. II: ^{His}Dianthin (2,0 µg). III: ^{His}Dianthin Arg24Ala (2,0 µg). IV: ^{His}Dianthin-CF568 (2,3 µg). V: ^{His}Dianthin Arg24Ala (2,3 µg).

Wie Abbildung 33 zeigt, war die Fluoreszenz der Banden von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 visuell ausgewertet gleich intensiv. Um dennoch auszuschließen, dass der Unterschied des Markierungsgrades von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 keinen Einfluss auf die Fluoreszenz hatte, wurden die Fluoreszenzintensitäten mit dem Mikroplatten-Reader Infinite® 200 bestimmt. Sowohl bei 100 nM als auch bei 1000 nM konnte kein signifikanter Unterschied in den Fluoreszenzintensitäten gemessen werden. Der unterschiedliche Markierungsgrad hatte somit keine Auswirkung auf die Fluoreszenzintensität. Dementsprechend konnten ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 gleichwertig im Endozytose-Assay eingesetzt werden.

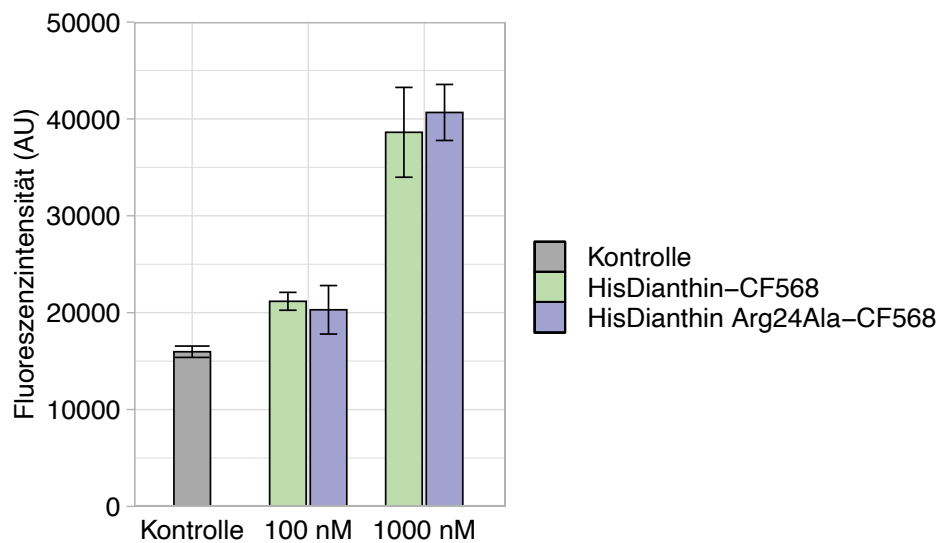


Abbildung 34. Fluoreszenzintensität von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568. Die Messungen wurden mit dem Mikroplatten-Reader Infinite® 200 und einem Filter mit Exzitationswellenlänge bei 560/10 nm und Emissionswellenlänge bei 595/35 nm durchgeführt. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Fluoreszenzintensitäten von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 sowohl bei einer Konzentration 100 nM als auch bei 1000 nM festgestellt werden. Als Kontrolle wurde PBS vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen je als Triplikat, $n = 3$ (Signifikanz: U-Test).

3.3.2 Charakterisierung von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568

Um den Einfluss der Markierungsreaktion auf die *N*-Glykosidaseaktivität und die Zytotoxizität von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 zu bestimmen, wurden der *adenine-releasing assay*, wie unter 2.7.4.2 beschrieben, und die Untersuchung auf Zytotoxizität, wie unter 2.7.6.3 beschrieben, durchgeführt. Die Markierungsreaktion mit CF®568 hatte zur Folge, dass weder ^{His}Dianthin-CF568 noch ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 Adenin vom künstlichen Substrat A30 freisetzen (Abbildung 35). Der Unterschied der Adeninfreisetzung zwischen unmarkiertem und markiertem Protein war signifikant.

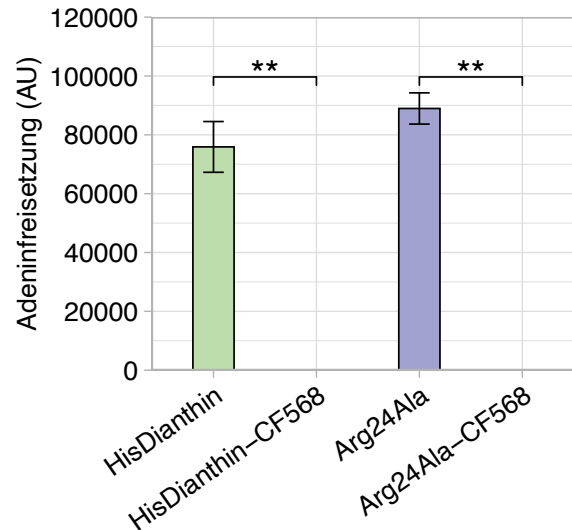


Abbildung 35. *N*-Glykosidaseaktivität des mit CF@568 markierten ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala. Der *adenine-releasing assay* wurde mit einer Proteinkonzentration von 169 nM und 21,4 μM A30-Substrat über Nacht bei 37 °C durchgeführt (2.7.4.2). Die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff CF@568 hatte den kompletten Aktivitätsverlust von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 zur Folge. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen, n = 3 (Signifikanz: **, p ≤ 0,01; *t*-Test).

Ähnliches war für die Zytotoxizität von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 festzustellen. Die Zytotoxizität wurde im Konzentrationsbereich 0,1–100 nM ohne und mit Zugabe von SO1861 getestet (Abbildung 36). ^{His}Dianthin-CF568 + SO1861 war nur noch bei einer Konzentration von 100 nM signifikant zytotoxisch (Abbildung 36A). Vor der Markierungsreaktion war ^{His}Dianthin + SO1861 über einen Konzentrationsbereich von 0,1–100 nM zytotoxisch (Abbildung 30 & Abbildung 31). Der zytotoxische Effekt unter Zugabe von SO1861, der unter 3.2.9 und 3.2.10 für ^{His}Dianthin Arg24Ala beschrieben wurde, war bei ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 (0,1–100 nM) nicht mehr vorhanden (Abbildung 36B).

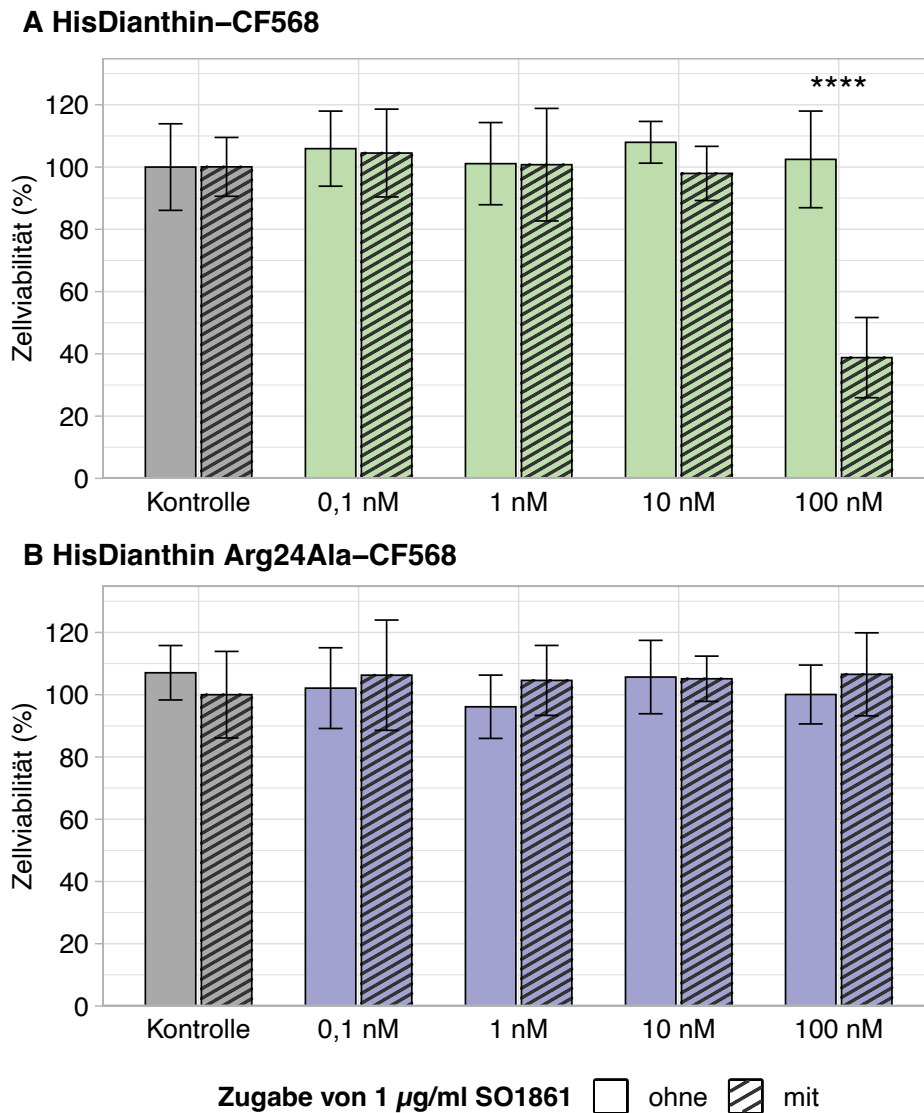


Abbildung 36. Zytotoxizität von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568. Neuro-2A-Zellen wurden mit 0,1, 1, 10 und 100 nM ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 ± 1 µg/ml SO1861 für 48 h inkubiert (2.7.6.3). Kontrollzellen wurden äquivalent mit PBS ± 1 µg/ml SO1861 behandelt. Am Ende der Inkubation wurde zur Bestimmung der Zellviabilität ein MTT-Assay durchgeführt (2.7.6.4). (A) ^{His}Dianthin-CF568 + SO1861 zeigte nur noch bei einer Konzentration von 100 nM signifikante Zytotoxizität. (B) Die Markierung mit dem Fluoreszenzlabel hatte bei ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 im Konzentrationsbereich von 0,1–100 nM den Verlust der Zytotoxizität zur Folge. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen je als Duplikat, n = 3 (Signifikanz: ****, p ≤ 0,0001; t-Test).

3.3.3 Fluoreszenzaufnahmen von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568

Die Aufnahme von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 in Neuro-2A-Zellen wurde zunächst mit dem Fluoreszenzmikroskop Lux3 FL aufgenommen (2.7.6.5). Für die in Abbildung 37 dargestellten Fluoreszenzaufnahmen wurden Neuro-2A-Zellen 24 h mit 100 nM ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 unter Zugabe von 1 µg/ml SO1861 inkubiert. Anschließend erfolgten die Aufnahmen mit dem Lux3 FL. Aufgrund der geringen Sensitivität des Mikroskops waren die Aufnahmen nur von Proben, die mit SO1861 inkubiert wurden, möglich.

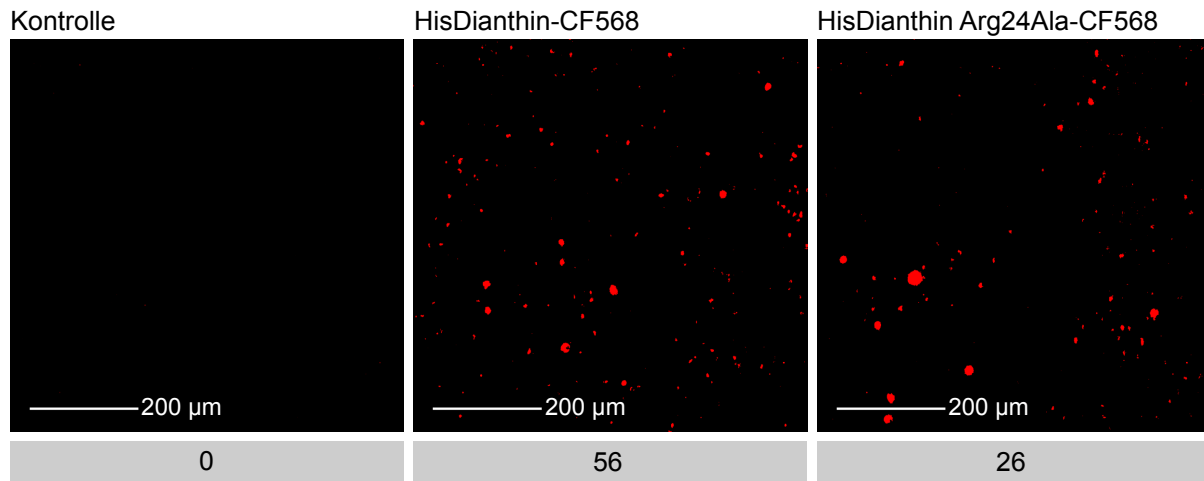


Abbildung 37. Aufnahmen von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 mit dem Fluoreszenzmikroskop. Neuro-2A-Zellen wurden 24 h mit 100 nM ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 unter Zugabe von 1 µg/ml SO1861 inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit PBS bearbeitet. 24 h nach Zugabe der Proben erfolgten die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit dem roten Fluoreszenzfilter des Lux3 FL (Anregung: 561/14 nm, Emission: 630/90 nm). Die in den grauen Feldern angegebenen Zahlen, entsprechen der Anzahl der Fluoreszenzobjekte, die auf Grundlage der Aufnahme mittels Algorithmus berechnet wurden.

Die Anzahl der Fluoreszenzobjekte wurde mittels Algorithmus aus den Fluoreszenzaufnahmen berechnet. Für ^{His}Dianthin-CF568 konnten aus den Fluoreszenzaufnahmen 56 Fluoreszenzobjekte und für ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 26 Fluoreszenzobjekte ($\Delta = 30$) berechnet werden (Abbildung 37). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen deuteten darauf hin, dass ^{His}Dianthin-CF568 stärker als ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 endozytiert wurde.

3.3.4 Endozytose von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568

Wie unter 3.3.3 beschrieben, unterschieden sich ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 nach 24-stündiger Inkubation visuell im Ausmaß ihrer Endozytose. Zur Quantifizierung der Endozytose von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 in Neuro-2A-Zellen wurde die Fluoreszenzintensität mit dem Durchflusszytometer (CytoFLEX) gemessen (2.7.6.6). Hierfür wurden Neuro-2A-Zellen 0, 2, 6, 16 und 24 h mit 100 nM ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 inkubiert. Nach Entfernen des Mediums und Ablösen der Zellen mit Trypsin wurden min. 10^3 Zellen im Anschluss mit dem CytoFLEX vermessen. Die Auswertung der Einzelzellen erfolgte über den Median der Peakhöhe im PE-Kanal. Das Ausmaß des endozytierten ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 verhielt sich proportional zur Peakhöhe des Fluoreszenzsignals. Zu dem Zeitpunkt 0 h hat keine Endozytose stattgefunden. Die Fluoreszenzintensität zu diesem Zeitpunkt entsprach der Eigenfluoreszenz der Zellen. Wie in Abbildung 38 dargestellt, erfolgte die Endozytose von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 über die ersten zwei Stunden im gleichen Ausmaß. Nach sechs Stunden war die Fluoreszenzintensität von ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 signifikant höher als die von ^{His}Dianthin-CF568.

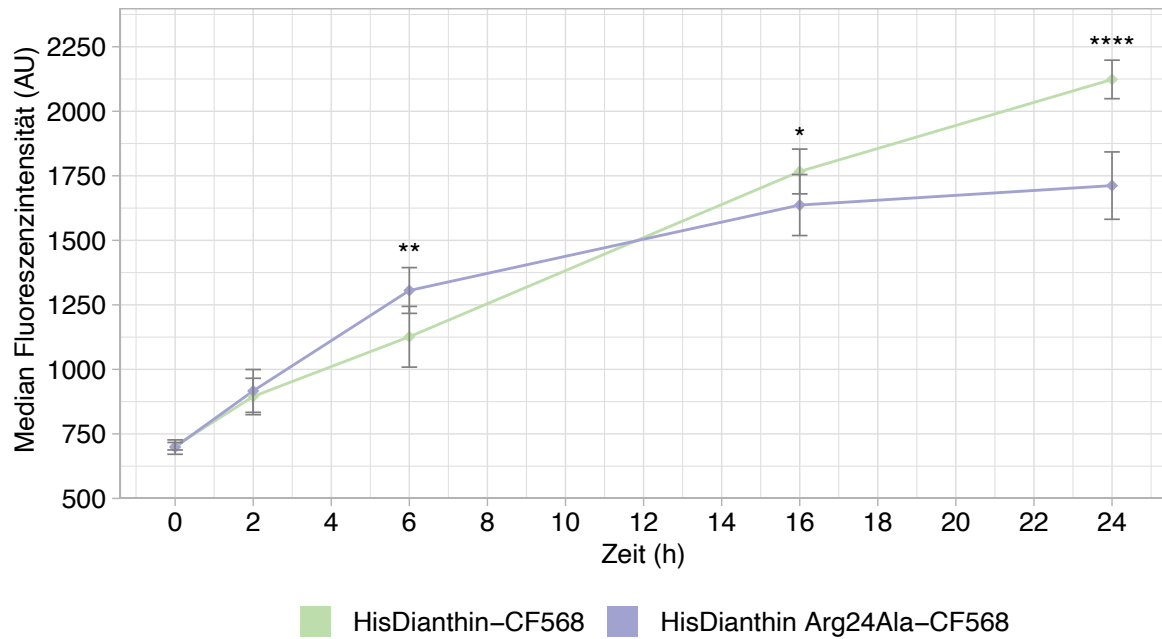


Abbildung 38. Endozytose von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568. Neuro-2A-Zellen wurden 0, 2, 6, 16 und 24 h mit 100 nM ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 inkubiert. Nach Entfernen des Mediums, in dem sich der nicht endozytierte Proteinanteil befand, wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (2.7.6.6). Die Auswertung erfolgte über die Peakhöhe im PE-Kanal. Nach 6 h unterschieden sich ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 signifikant in ihrer Endozytose, wobei zunächst ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 (6 h) und ab 16 h ^{His}Dianthin-CF568 stärker endozytiert wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Einzelzellen (Doubletten und Zelltrümmer wurden aus der Analyse ausgeschlossen) von drei unabhängigen Messungen je als Triplikat, n = 3 (Signifikanz: *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ****, $p \leq 0,0001$; *t*-Test).

^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 wurde dementsprechend mehr als ^{His}Dianthin-CF568 in die Zelle aufgenommen. Dahingegen konnte nach 16-stündiger Inkubation eine signifikant höhere Endozytose von ^{His}Dianthin-CF568 gemessen werden. Auch nach 24-stündiger Inkubation war die Aufnahme von ^{His}Dianthin-CF568 in die Zelle weiterhin signifikant stärker als die von ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568. Die Differenz der Fluoreszenzintensität lag nach 24-stündiger Inkubation bei 411 AU. Somit entsprachen die Daten der Durchflusszytometrie den semi-quantitativen Daten der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 37). Gleichzeitig konnte mit dem Experiment die aufgestellte Hypothese bestätigt werden. Die reduzierte synergistische Zytotoxizität durch Einführen der Arg24Ala-Mutation im ^{His}Dianthin resultierte aus dessen geringerer Endozytose.

Die Alanin-Substitution erfolgte, wie auch für ^{His}Dianthin Arg24Ala durchgeführt, mittels zielgerichteter Mutagenese auf Ebene der DNA (2.7.2.6). Die Nukleotidsequenz des mit einem 6-fach His-Tag versehenen Sapovaccarin-S1 (^{His}Sapovaccarin-S1) wurde, wie unter 3.1.9 beschrieben, in einem pET11d-Vektor hergestellt. Der pET11d-^{His}Agrostin-Vektor, der die Nukleotidsequenz von Agrostin mit *N*-terminalem 8-fach His-Tag aufwies, lag im Labor bereits vor (Weise *et al.*, 2020). Die zielgerichtete Mutagenese wurde in zwei Schritten durchgeführt. Wie in Abbildung 40 dargestellt, wurde die PCR parallel mit verschiedenen Reaktionsparametern durchgeführt (2.7.2.6). Für ^{His}Agrostin Arg23Ala war die Zielbande bei einer Größe von 6403 bp zu erwarten. Alle PCR-Ansätze wiesen eine Bande bei der erwarteten Größe auf (Abbildung 40A). Die Zielbande von ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala sollte bei 6435 bp liegen. Der PCR-Ansatz mit 10 ng Plasmid-DNA, einer Annealing-Zeit von 15 s und einer Elongationszeit von 129 s lieferte kein Produkt. Die restlichen Ansätze lieferten die erwartete Bande bei ca. 6435 bp (Abbildung 40B). Im zweiten Schritt wurden die PCR-Produkte durch enzymatische Behandlung zirkularisiert und in NEB[®] 5-alpha *E. coli* transformiert. Anschließend wurden Plasmidpräparationen durchgeführt (2.7.2.3). Die Sequenzierung der Proben erfolgte durch LGC Genomics (Berlin). Nicht alle Reaktionsparameter lieferten ein korrektes Plasmid. Für ^{His}Agrostin Arg23Ala konnte für das in Spur IV (Abbildung 40A) erhaltene PCR-Produkt das korrekte Einfügen der Alanin-Substitution bestätigt werden (auf die Darstellung der Sequenzierungsdaten wurde verzichtet, da das korrekte Einfügen der Mutationen auf Proteinebene in 3.4.3 nachgewiesen werden konnte). Bei ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala war das Plasmid mit der korrekten Alanin-Substitution das PCR-Produkt der Spur VI (Abbildung 40B). Die Plasmide, für die das korrekte Einfügen der Alanin-Mutation bestätigt werden konnte, wurden für die weiteren Experimente verwendet.

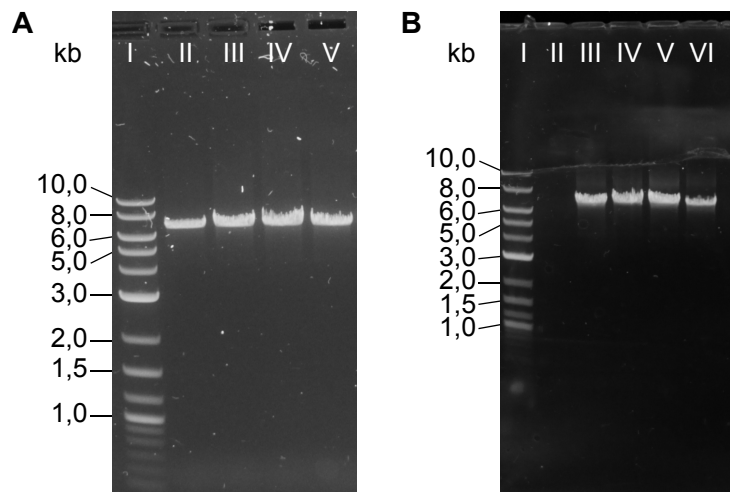


Abbildung 40. PCR-Produkte der zielgerichteten Mutagenese von pET11d-^{His}Agrostin und pET11d-^{His}Sapovaccarin-S1. 1%ige Agarosegele mit 1 kb Plus DNA-Leiter als Marker (Spur I). Die PCR wurde mit verschiedenen Reaktionsparametern durchgeführt (Variationen in der Annealing-Zeit T_1 , der Elongationszeit T_2 und der Plasmid-DNA-Menge) Die zu erwartenden Banden sollten bei ca. 6400 bp liegen. (A) pET11d-^{His}Agrostin Arg23Ala. II: T_1 15 s, T_2 129 s (10 ng). III: T_1 15 s, T_2 129 s (20 ng). IV: T_1 30 s, T_2 129 s (10 ng). V: T_1 30 s, T_2 129 s (20 ng). (B) ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala. II: T_1 15 s, T_2 129 s (10 ng). III: T_1 15 s, T_2 129 s (20 ng). IV: T_1 30 s, T_2 129 s (10 ng). V: T_1 30 s, T_2 129 s (20 ng). VI: T_1 30 s, T_2 193 s (10 ng).

3.4.2 Proteinexpression in *E. coli* und Aufreinigung der mutierten Typ I RIPs

Die Proteinexpression von ^{His}Agrostin Arg23Ala in BL21(DE3)pLysS und ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala in RosettaTM2(DE3) wurde mit autoinduzierendem Medium durchgeführt (2.7.2.7). Die Expression und die Proteinaufreinigung von ^{His}Agrostin Arg23Ala erwiesen sich als sehr schwierig. Es wurden verschiedenste Expressionsbedingungen und Lyseverfahren ausprobiert. Wie in Abbildung 41A dargestellt, verblieb der Großteil des exprimierten ^{His}Agrostin Arg23Ala nach Lyse und anschließender Zentrifugation in Form von Einschlusskörperchen im Zellpellet (Spur III, A). Nur ein sehr kleiner Anteil konnte extrahiert werden (Spur II, A). Die manuelle Ni-NTA lieferte eine Elutionsfraktion mit sehr vielen bakteriellen Verunreinigungen (Spur IV, A). Mittels Kationenaustauschchromatographie konnte ^{His}Agrostin Arg23Ala bis auf eine Verunreinigung von den restlichen Verunreinigungen abgetrennt werden (Spur V, A). Abbildung 41B zeigt die Expression und Aufreinigung von ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala. Auch hier verblieb ein großer Anteil des exprimierten Proteins im Zellpellet (Spur III, B). Jedoch konnte genug Protein extrahiert werden, um mit dem Amicon® Pro Affinitätskonzentrationskit ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala zu isolieren (Spur IV, B).

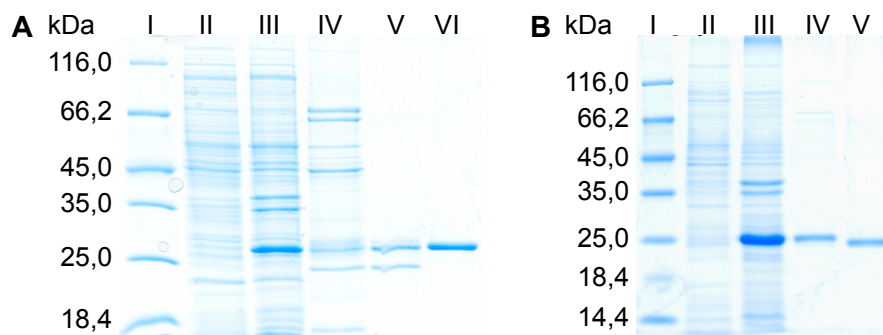


Abbildung 41. SDS-PAGE (12,5 %) der Expression und Proteinaufreinigung von ^{His}Agrostin Arg23Ala und ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala. Die Färbung erfolgte mit Coomassie. (A) ^{His}Agrostin Arg23Ala wurde in BL21(DE3)pLysS mit autoinduzierendem Medium exprimiert und mittels manueller Ni-NTA und Kationenaustauschchromatographie isoliert. I: Proteinmarker. II: Unaufgereinigter Proteinextrakt nach Lyse (48,5 µg). III: Zellpellet nach Lyse (33,5 µg). IV: Ni-NTA Elutionsfraktion (E125-1, 125 mM Imidazol, 7,3 µg). V: Fraktion Kationenaustauschchromatographie (0,89 µg). VI: Referenzprotein ^{His}Agrostin (0,86 µg). (B) ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala, Expression in RosettaTM2(DE3) mit autoinduzierendem Medium und Aufreinigung mit dem Amicon® Pro Affinitätskonzentrationskit. I: Proteinmarker. II: Unaufgereinigter Proteinextrakt nach Lyse (48,6 µg). III: Zellpellet nach Lyse (33,5 µg). IV: Elutionsfraktion (300 mM Imidazol, 0,9 µg). V: Isoliertes Sapovaccarin-S1 und -S2 (0,92 µg) als Referenzprotein.

3.4.3 Identitätsbestimmung von ^{His}Agrostin Arg23Ala und ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala

Um die Identität der in 3.4.2 exprimierten Proteine zu bestätigen, wurde ein In-Gel-Verdau mit Trypsin und anschließender MALDI-TOF-MS-Messung durchgeführt (2.7.5.1 & 2.7.5.2). Hierfür wurden für ^{His}Agrostin Arg23Ala die obere Bande in Spur V, die Bande der Verunreinigung (Spur V, untere Bande) und die ^{His}Agrostin-Referenzbande (Spur VI) ausgeschnitten (Abbildung 41A). Der Abgleich des Peptidmassenfingerprints der Verunreinigung, die mit ^{His}Agrostin Arg23Ala in der Fraktion eluiert ist, mit der Datenbank Swiss-Prot identifizierte diese als CRP_ECOLI (Protein Score von 96). Da es für

^{His}Agrostin keinen Swiss-Prot-Eintrag gab, wurde eine eigene Datenbank mit den Sequenzen von ^{His}Agrostin und ^{His}Agrostin Arg23Ala erstellt. Die Mascot-Suche wurde gegen die selbst erstellte Datenbank und gegen die Swiss-Prot-Datenbank ausgeführt. Der Peptidmassenfingerprint der ^{His}Agrostin Arg23Ala-Bande erzielte einen Protein Score von 118 für ^{His}Agrostin Arg23Ala (13 Treffer) und von 105 für ^{His}Agrostin (12 Treffer). Zusätzlich wurde das erfolgreiche Einfügen der Arg23Ala-Mutation im ^{His}Agrostin bestätigt, indem die Massenspektren der Peptidmassenfingerprints von ^{His}Agrostin mit ^{His}Agrostin Arg23Ala verglichen wurden (Abbildung 42). Um die Identität von ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala zu bestätigen, wurde sowohl die Bande der Spur IV als auch die Referenzproteinbande der Spur V ausgeschnitten (Abbildung 41B). Die Software Mascot Server konnte durch Vergleich mit der Datenbank Swiss-Prot für ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala Übereinstimmungen (Protein Score von 179) mit den für Sapovaccarin-S1 hinterlegten Daten finden (s. 3.1.5). Durch Vergleich der Peptidmassenfingerprints von ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala mit dem Referenzprotein konnte das erfolgreiche Einfügen der Arg24Ala-Mutation im ^{His}Sapovaccarin-S1 bestätigt werden (Abbildung 43).

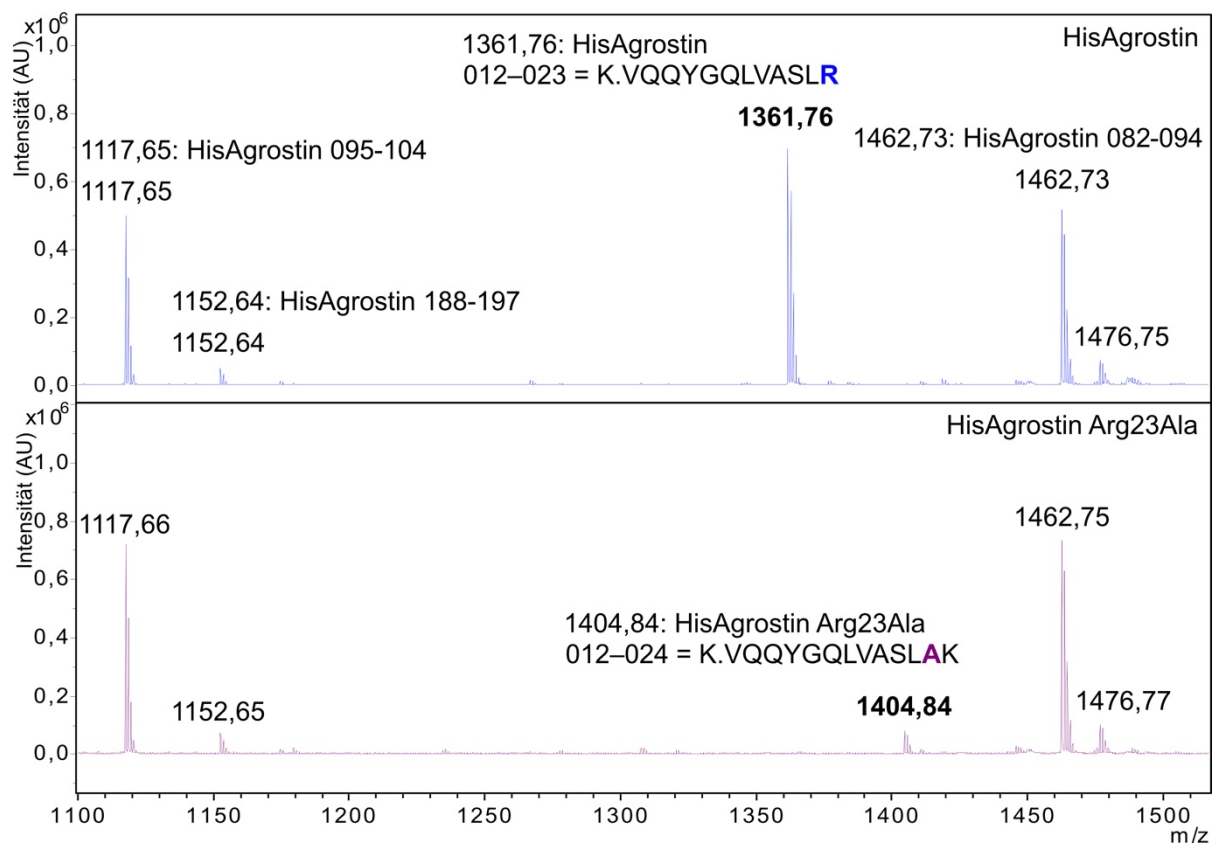


Abbildung 42. MALDI-TOF-Massenspektren des Trypsin-In-Gel-Verdau von ^{His}Agrostin und ^{His}Agrostin Arg23Ala. Zoom in den Massenbereich 1100–1520 m/z. Die Bestätigung der korrekt eingefügten Mutation war über das Peptid 012–024 des ^{His}Agrostin Arg23Ala und über das Peptid 012–023 des ^{His}Agrostins möglich. Durch die Alanin-Substitution fiel eine Arginin-Spaltstelle des Trypsins weg. Dementsprechend war das entsprechende Peptid des ^{His}Agrostin Arg23Ala um eine Aminosäure größer als das Peptid des ^{His}Agrostins. Die Spaltung des ^{His}Agrostin Arg23Ala erfolgte erst nach dem Lysin. Die restlichen Peptide von ^{His}Agrostin und ^{His}Agrostin Arg23Ala stimmten, wie zu erwarten war, überein.

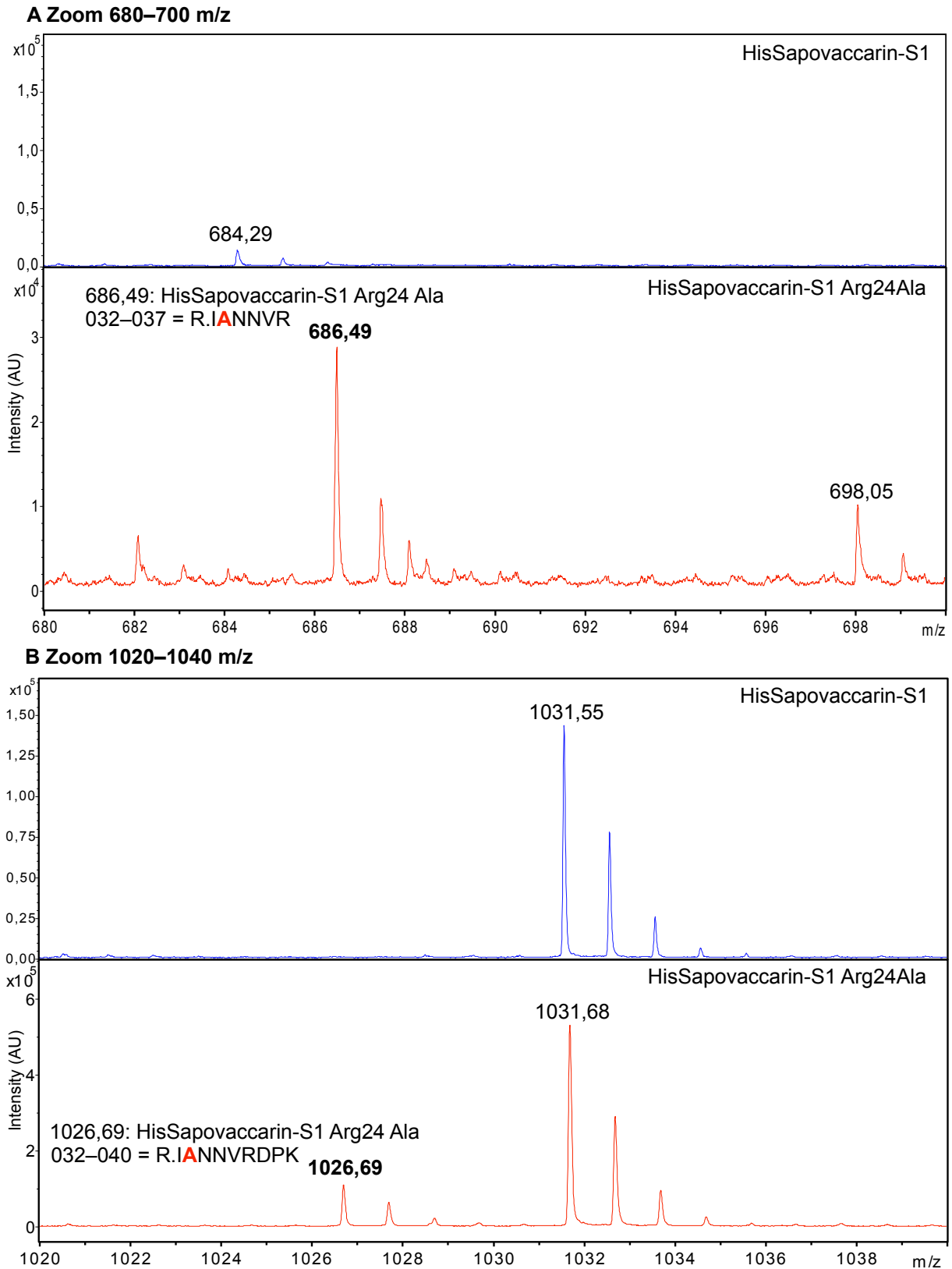


Abbildung 43. MALDI-Massenspektren des Trypsin-In-Gel-Verdau von HisSapovaccarin-S1 und HisSapovaccarin-S1 Arg24Ala. (A) Zoom in den Massenbereich 680–700 m/z und (B) Zoom in den Massenbereich 1020–1040 m/z. Auch hier fiel durch die Alanin-Substitution eine Spaltstelle des Trypsins weg. Die tryptischen Peptide bei 686 und 1026 m/z konnten daher nur bei HisSapovaccarin-S1 Arg24Ala detektiert werden und bestätigten das erfolgreiche Einfügen der Alanin-Substitution.

3.4.4 *N*-Glykosidaseaktivität von ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala und ^{His}Agrostin Arg23Ala

Der Einfluss auf die *N*-Glykosidaseaktivität durch die in ^{His}Agrostin und ^{His}Sapovaccarin-S1 eingeführte Arginin-Mutation wurde mit dem *adenine-releasing assay* bestimmt (2.7.4.2). Wie in Abbildung 44A gezeigt, führte das Einfügen der Arginin-Substitution im ^{His}Agrostin zu keiner signifikanten Aktivitätsänderung. Im Vergleich zu dem ^{His}Dianthin wiesen sowohl ^{His}Agrostin als auch ^{His}Agrostin Arg23Ala eine signifikant geringere *N*-Glykosidasaktivität auf. Auch beim ^{His}Sapovaccarin-S1 führte das Einführen der Arginin-Substitution zu keinem signifikanten Aktivitätsunterschied (Abbildung 44B). Die *N*-Glykosidaseaktivitäten von ^{His}Sapovaccarin-S1 und ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala waren im Vergleich zu dem ^{His}Dianthin höher. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nur für ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala und ^{His}Dianthin bestimmt werden (Abbildung 44B).

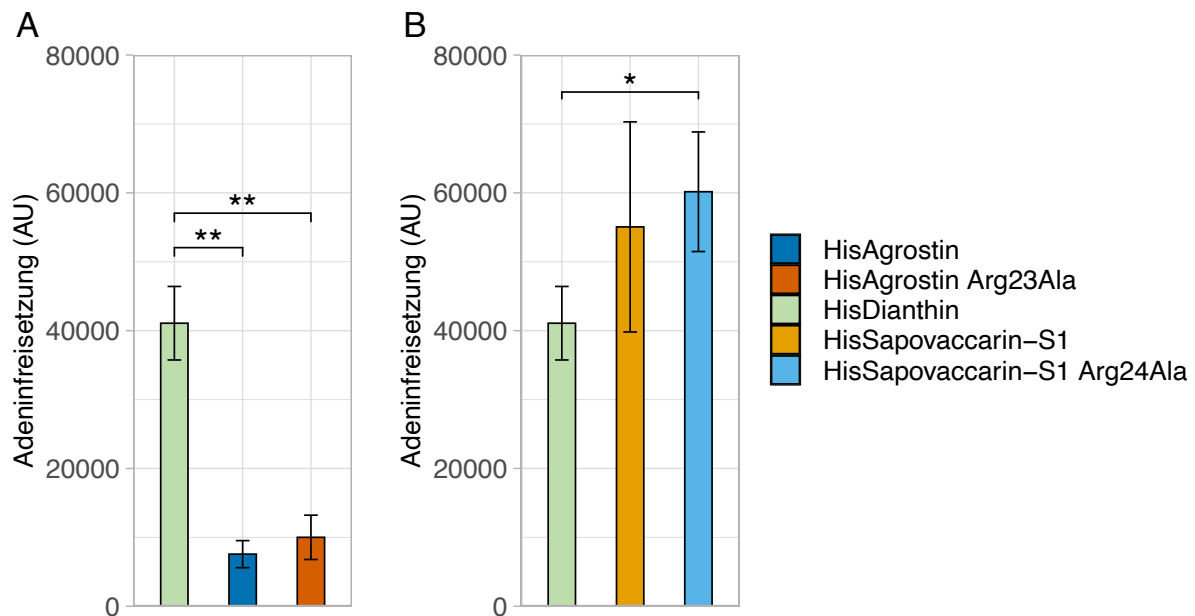


Abbildung 44. *N*-Glykosidaseaktivität von ^{His}Agrostin Arg23Ala und ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala. Je 169 nM RIP wurden mit 21,4 μ M A30-Substrat bei 37 °C über Nacht inkubiert (2.7.4.2). (A) Das Einführen der Arginin-Substitution im ^{His}Agrostin führte zu keinem signifikanten Aktivitätsverlust im Vergleich zu der nativen Form. Die Enzymaktivitäten von ^{His}Agrostin und ^{His}Agrostin Arg23Ala waren jedoch signifikant geringer als die des ^{His}Dianthins. (B) Das Einführen der Arginin-Substitution im ^{His}Sapovaccarin-S1 führte ebenfalls zu keinem signifikanten Aktivitätsverlust. Die Aktivität von ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala war signifikant höher als die von ^{His}Dianthin. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen, $n = 3$ (Signifikanz: *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; t -Test).

3.4.5 Zytotoxizität von ^{His}Agrostin Arg23Ala und ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala

Die Zytotoxizitätsuntersuchungen von ^{His}Agrostin Arg23Ala und ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala wurden, wie in 2.7.6.3 beschrieben, mit Proteinkonzentrationen von 0,1 und 1 nM, je ohne und mit Zugabe von 1 µg/ml SO1861 in Neuro-2A-Zellen durchgeführt. Wie in Abbildung 45 dargestellt, führte die Arginin-Substitution an Position 23 zu dem kompletten Verlust des zytotoxischen Effektes von ^{His}Agrostin. Der Zytotoxizitätsunterschied von ^{His}Agrostin Arg23Ala und ^{His}Agrostin unter Zugabe von SO1861 war bei beiden Konzentrationen signifikant. Abbildung 46 zeigt, dass auch bei ^{His}Sapovaccarin-S1 das Ersetzen von Arginin durch Alanin an Position 24 einen signifikanten Unterschied in der Zytotoxizität, sowohl bei einer Konzentration von 0,1 als auch bei 1 nM, zur Folge hatte. Der zytotoxische Effekt von 0,1 nM ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala unter Zugabe von SO1861 war nicht mehr vorhanden. 1 nM ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala unter Zugabe von SO1861 war weiterhin zytotoxisch, jedoch signifikant weniger als 1 nM ^{His}Sapovaccarin-S1.

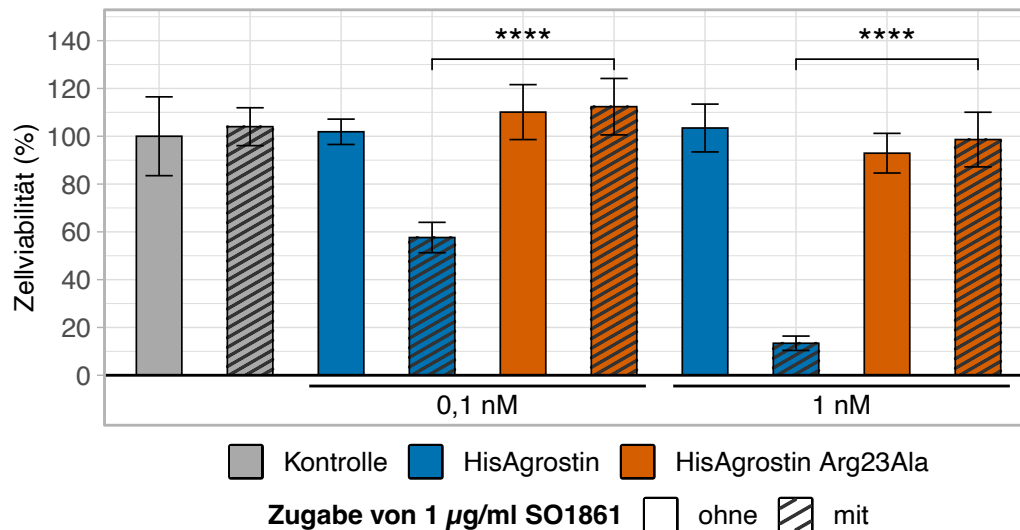


Abbildung 45. Zytotoxizität von ^{His}Agrostin Arg23Ala. Neuro-2A-Zellen wurden mit 0,1 und 1 nM ^{His}Agrostin und ^{His}Agrostin Arg23Ala ± 1 µg/ml SO1861 für 48 h inkubiert (2.7.6.3.). Kontrollzellen wurden äquivalent mit PBS ± 1 µg/ml SO1861 behandelt. Die Zellviabilität wurde nach 48-stündiger Inkubation mit dem MTT-Assay bestimmt (2.7.6.4). Durch Einführen der Arg23Ala-Mutation wurde der zytotoxische Effekt von ^{His}Agrostin aufgehoben. ^{His}Agrostin und ^{His}Agrostin Arg23Ala unterschieden sich somit signifikant in ihrer Zytotoxizität. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen je als Duplikat, n = 3 (Signifikanz: ****, p ≤ 0,0001; t-Test).

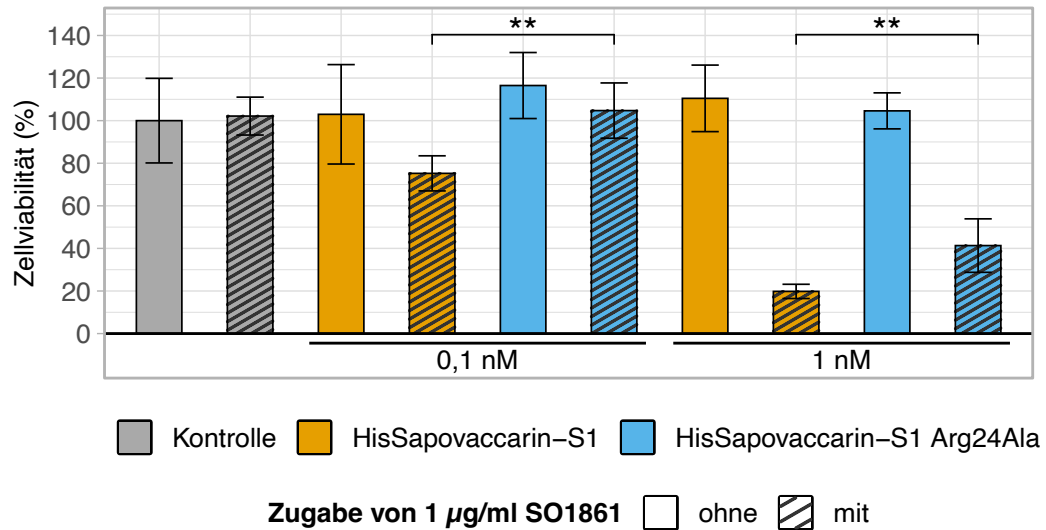


Abbildung 46. Zytotoxizität von ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala. Neuro-2A-Zellen wurden mit 0,1 und 1 nM ^{His}Sapovaccarin-S1 und ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala ± 1 µg/ml SO1861 für 48 h inkubiert (2.7.6.3.). Kontrollzellen wurden äquivalent mit PBS ± 1 µg/ml SO1861 behandelt. Für die Bestimmung der Zellviabilität wurde ein MTT-Assay am Ende der Inkubation durchgeführt (2.7.6.4). Das Einführen der Arg24Ala-Mutation bewirkte bei ^{His}Sapovaccarin-S1 (0,1 und 1 nM) eine signifikante Reduktion der Zytotoxizität. 0,1 nM ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala übte keine Zytotoxizität mehr aus. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen je als Duplikat, n = 3 (Signifikanz: **, p ≤ 0,01; t-Test).

4 Diskussion

Dass Triterpensaponine die Zytotoxizität von Typ I RIPs steigern, wurde das erste Mal für Saponine aus *Agrostemma githago* L. und dem Typ I RIP Agrostin durch Hebestreit & Melzig 2003 beschrieben (Hebestreit & Melzig, 2003). Seitdem konnte gezeigt werden, dass der zytotoxizitätssteigernde Effekt durch spezifische Triterpensaponine auch bei weiteren Typ I RIPs und deren Immunotoxinen vorhanden ist (Gilabert-Oriol *et al.*, 2015; Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Über die letzten Jahre wurden einige strukturelle Merkmale beschrieben, die Triterpensaponine aufweisen müssen, um einen zytotoxizitätssteigernden Effekt auf Typ I RIPs ausüben zu können (C. Bachran *et al.*, 2006; Böttger *et al.*, 2013; Melzig *et al.*, 2005). Der Hauptmechanismus, der hinter der Zytotoxizitätssteigerung steckt, ist eine Saponin-vermittelte endosomale Freisetzung der Typ I RIPs (Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Allerdings ist bisher wenig bekannt über den molekularen Mechanismus. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die endosomale Freisetzung durch die Bindung der Saponine an die Typ I RIPs induziert wird. Mittels SPR konnte gezeigt werden, dass spezifische Triterpensaponine an Typ I RIPs pH-abhängig binden. Die stärkste Bindung wurde bei pH 5 gemessen (Weng, Thakur, Beceren-Braun, *et al.*, 2012; Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Aufgrund der pH-Abhängigkeit der Bindung könnten basische Aminosäuren der Typ I RIPs an der Interaktion mit Triterpensaponinen beteiligt sein. In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel von ^{His}Dianthin die Beteiligung basischer Aminosäuren, hauptsächlich der von Lysin-Resten und einem Arginin-Rest, an der Interaktion mit SO1861 untersucht. Hierfür wurden die basischen Aminosäure-Reste gegen Alanin ausgetauscht und hinsichtlich ihres verminderten Effektes auf die Zytotoxizitätssteigerung durch SO1861 getestet. Des Weiteren erfolgte eine Charakterisierung der verringerten Zytotoxizitätssteigerung durch Einführen der Arg24Ala-Mutation im ^{His}Dianthin. Die Übertragbarkeit der Arg24Ala-Mutation wurde am Beispiel von ^{His}Sapovaccarin-S1, ein Typ I RIP mit klassischer Aminosäuresequenz, welches im Rahmen dieser Arbeit vollständig sequenziert wurde und von ^{His}Agrostin, ein Typ I RIP mit unüblicher Aminosäuresequenz, überprüft.

4.1 Isolierung, Sequenzierung und Proteinexpression von Typ I RIPs aus der *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm.

4.1.1 Proteincharakterisierung des isolierten Sapovaccarin-S1 und -S2

Aus den Samen der *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm. wurde mittels wässriger Extraktion, gefolgt von einer Ammoniumsulfatfällung und einer Kationenaustauschchromatographie, ein Gemisch aus zwei RIP-Isoformen, die sich an einer einzigen Position in ihrer Proteinsequenz unterschieden, isoliert. Die Massen, die mit hochauflösender MS ermittelt wurden, lagen in dem für Typ I RIPs charakteristischen Massenbereich (Shi *et al.*, 2016). Die Aminosäuresequenzen wurden durch Kombination aus PCR und MS-Analyse vollständig aufgeklärt. Mit Hilfe eines proteolytischen Verdaus wurde die komplette

Sequenz auch auf Peptidlevel bestätigt. Die Isoformen (Ala110Thr) konnten auf Proteinlevel, sowohl für das intakte Protein als auch auf Ebene der Peptide, und auf DNA-Level nachvollzogen werden. Da Typ I RIPs meist von Genen kodiert werden, die keine Introns aufweisen, wurde in dieser Arbeit zur Sequenzierung DNA und nicht mRNA verwendet (Bolognesi *et al.*, 2016). Die PCR-Daten, die bis auf die *N*-terminale und *C*-terminale Region die Sequenz fast vollständig abdeckten, bestätigten auch für Sapovaccarin-S1 und -S2 die Abwesenheit von Introns in der genomischen DNA. Da die Isoform auch in der DNA aufzufinden war, konnte diese nicht durch alternatives Spleißen entstanden sein. Die zwei Isoformen müssen daher durch unterschiedliche Gene kodiert worden sein. Wie unter 1.1 beschrieben, ist das Auftreten mehrerer Isoformen für Typ I RIPs üblich (Bolognesi *et al.*, 2016). Auch in der Familie der Caryophyllaceae wurden einige Isoformen, z. B. für *Dianthus caryophyllus* L., *Saponaria officinalis* L. und *Agrostemma githago* L., beschrieben (Ferrerias *et al.*, 1993; Stirpe *et al.*, 1983; Stirpe *et al.*, 1981). Dabei ist bekannt, dass Isoformen der Typ I RIPs durch verschiedene Gene kodiert werden können (Hartley & Lord, 2004).

Das unpolare Alanin des Sapovaccarin-S1 wird durch ein polares Threonin im Sapovaccarin-S2 ersetzt. Der Unterschied in nur einer Aminosäure bewirkt eine minimale Massenzunahme von 30 Da. Der theoretische IEP (bestimmt mit dem Online-Tool ExPASy ProtParam) beider Isoformen ist gleich und liegt bei 9,87 (Wilkins *et al.*, 1999). Demzufolge konnte eine Separation der beiden Isoformen mittels Kationenaustauschchromatographie nicht erzielt werden. Auch eine Auftrennung mittels SDS-PAGE ist bei solch einer kleinen Massendifferenz nicht möglich. Die Elutionsfraktion erschien somit als eine Bande (Abbildung 6, Spur VII). Die sehr geringe Massendifferenz und der nicht vorhandene Unterschied im IEP machen eine Auftrennung über andere Proteinaufreinigungsmethoden sehr schwierig. Eine Aufreinigung über Gelfiltration oder hydrophobe Interaktionschromatographie hätte vermutlich ebenfalls nicht zu separat isolierten Isoformen geführt. Daher wurde von einer anderen Aufreinigungsmethode abgesehen und mit dem Isoformengemisch weitergearbeitet. Diese Entscheidung wurde von der Tatsache unterstützt, dass die Position 110 weder im aktiven Zentrum noch in dessen näherer Umgebung lokalisiert ist (Abbildung 13A). Es scheint sehr unwahrscheinlich, dass eine Punktmutation an dieser Position einen großen Einfluss auf die Enzymaktivität hat.

Sowohl die Intensitätsverhältnisse der Massenspektren der intakten Proteinmassen (Abbildung 8), als auch der MS/MS-Spektren des tryptischen Peptides (Positionen 102–126, Abbildung 10) und des DNA-Chromatogramms (Abbildung 11) deuteten darauf hin, dass die Isoformengemisch zu einem größeren Anteil aus Sapovaccarin-S1 zusammengesetzt war.

Die Gruppe um Bolognesi *et al.* war die erste, die ein RIP aus der *Gypsophila vaccaria* L. isolierte und den *N*-Terminus sequenzierte. Sie isolierte das RIP, wie auch hier ähnlich durchgeführt, durch wässrige Extraktion und Kationenaustauschchromatographie. Die molekulare Masse von 28 kDa wurde mittels SDS-PAGE und Gelfiltration bestimmt. Die *N*-Glykosidaseaktivität wurde durch Adeninfreisetzung aus Kaninchen-Retikulozytenlysat und aus aufgereinigten Rattenleberribosomen nachgewiesen (Bolognesi *et al.*, 1995). Die molekulare Masse, der sequenzierte *N*-Terminus und die *N*-Glykosidaseaktivität, die

von Bolognesi *et al.* bestimmt wurden, stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Da die durchgeführten Methoden zur Massenbestimmung weniger empfindlich als die heutigen waren, konnte die Masse damals nicht exakt bestimmt werden. Damit einhergehend war keine Differenzierung der Isoformen möglich. Bolognesi *et al.* ging von einem isolierten Protein aus.

Die Thermostabilität von Sapovaccarin-S1 und -S2 wurde mittels DSC analysiert. Zu dem Vergleich wurden Gypsophilin-S, ebenfalls ein aus dem Samen isoliertes RIP, und ^{His}Dianthin, rekombinant hergestellt, untersucht. Die T_m von Sapovaccarin-S1 und -S2, Gypsophilin-S und ^{His}Dianthin lagen bei je 69 °C, 65 °C und 66 °C. Sapovaccarin-S1 und -S2 zeigten die höchste Thermostabilität. Es sind bisher wenige Publikationen zur Thermostabilität von Typ I RIPs erschienen. Für Saporin-S6 und Gelonin wurden die T_m bei jeweils 58 °C und bei 66 °C gemessen. Diese entsprachen einer mittel-hohen Thermostabilität (Sanchez *et al.*, 2015; Scire *et al.*, 2019). Die für Sapovaccarin-S1 und -S2 ermittelte T_m lag somit in einem Bereich, der für isolierte Typ I RIPs üblich ist.

4.1.2 Proteincharakterisierung des rekombinant hergestellten ^{His}Sapovaccarin-S1

Die Sapovaccarin-S1-Sequenz wurde aufgrund des höheren Anteils am Isoformengemisch für die rekombinante Expression ausgewählt. Als Template für die Erstellung des pET11d-^{His}Sapovaccarin-S1-Vektors diente der pET11d-^{His}Diathin-Vektor (Gilabert-Oriol *et al.*, 2015). Hierfür wurde die cDNA von Sapovaccarin-S1 um 27 Basen, die für zwei Linker und einen 6-fach His-Tag kodieren, ergänzt. Die Aminosäuresequenz von Sapovaccarin-S1 wurde somit N-terminal um die Aminosäuren GHHHHHAA- erweitert. Diese Ergänzung ermöglichte die Aufreinigung von ^{His}Sapovaccarin-S1 mittels Ni-NTA. Die Proteinexpression von ^{His}Sapovaccarin-S1 ging mit sehr geringen Ausbeuten einher. Es wurden verschiedene Expressionsbedingungen, unter anderem zwei verschiedene *E. coli* Stämme, verschiedene Temperaturen und Inkubationszeiten getestet. Mit autoinduzierendem Medium und einer 9-stündigen Inkubation bei 37 °C, gefolgt von einer Inkubation bei 25 °C über Nacht, wurde die größte Ausbeute erzielt (s. 2.7.2.7). Wie der Spur III der SDS-PAGE (Abbildung 17) zu entnehmen ist, war die geringe Ausbeute nicht durch eine Expression in Form von Einschlusskörperchen bedingt. Diese wäre als intensive Bande auf Höhe des Zielproteins im Zellpellet zu sehen. Der Kulturansatz von ^{His}Sapovaccarin-S1 wies am Ende der Expression visuell betrachtet eine geringere Dichte auf als parallel bearbeitete Expressionsansätze anderer Proteine mit dem gleichen *E. coli* Stamm. Die geringe Ausbeute wurde vermutlich durch die starke Toxizität gegenüber den *E. coli* Bakterien, die für Typ I RIPs bekannt ist, verursacht (Zhu *et al.*, 2018). Optimierungsmöglichkeiten der Expression von stark toxischen Proteinen lägen zum Beispiel in der Auswahl eines *E. coli* Stammes, der für die Expression von toxischen Proteinen geeignet ist und der Senkung der Expressionstemperatur bis auf 15 °C. Die Expression von ^{His}Sapovaccarin-S1 wurde bereits in einem *E. coli* Stamm (BL21(DE3)pLysS), der für toxische Proteine optimiert wurde, durchgeführt. Hier gäbe es noch weitere Stämme die ausprobiert werden könnten. Dazu gehört der Lemo21(DE3) Stamm, der für die Expression

von anspruchsvollen Proteinen optimiert wurde (Schlegel *et al.*, 2012). Eine Durchführung bei noch niedrigeren Temperaturen war aufgrund der Laborausstattung nicht möglich.

Eine Folge der geringen Proteinexpression war, dass nur ein kleiner Anteil der Ni-NTA-Säule mit HisSapovaccarin-S1 und die restlichen, freien Ni-Ionen mit unerwünschten *E. coli* Proteinen beladen waren. Dies ist umso ausgeprägter, je weniger Zielprotein exprimiert wird. Die Elutionsfraktion von HisSapovaccarin-S1 wies drei Verunreinigungen auf (Abbildung 17, Spur V). Massenspektrometrisch wurden diese als ArnA, Crp und GlmS identifiziert. Die Bindung dieser drei *E. coli* Proteine an Ni-NTA ist auch in der Literatur beschrieben (Andersen *et al.*, 2013; Bolanos-Garcia & Davies, 2006).

Da die bakteriellen Verunreinigungen 14,8 % (bestimmt aus der SDS-PAGE Abbildung 17 mit der Software GelAnalyzer) der Elutionsfraktion von HisSapovaccarin-S1 ausmachen, sollten diese mit in die *N*-Glykosidaseaktivitätsdaten (Abbildung 18) einberechnet werden. Unter Berücksichtigung der Verunreinigungen ergibt sich somit für HisSapovaccarin-S1 eine Adeninfreisetzung von 64618,94 AU (Mittelwert). Dieser Wert entspricht 62 % der Aktivität des isolierten Sapovaccarin-S1 und -S2. Ein signifikanter Unterschied kann nicht mehr festgestellt werden (*t*-Test). Der Vergleich der beiden Aktivitäten ist zusätzlich dadurch erschwert, dass es sich bei dem isolierten Protein um ein Isoformengemisch handelt und bei der rekombinanten Form um nur eine Isoform. Die rekombinante Herstellung von HisSapovaccarin-S2 hätte sowohl ermöglicht die Aktivitäten der einzelnen Isoformen als auch die Aktivitäten des rekombinanten Isoformengemisches mit der aus den Samen isolierten Isoformen zu vergleichen. Insgesamt deuten die Daten darauf hin, dass das Einfügen des His-Tags eine Reduktion der Enzymaktivität von HisSapovaccarin-S1 zur Folge hat (Araujo *et al.*, 2000; Majorek *et al.*, 2014). Die Zytotoxizitätsuntersuchungen wurden bei sehr niedrigen Toxinkonzentrationen (0,1 und 1 nM) durchgeführt. Aufgrund der sehr niedrigen Konzentrationen dürften die Verunreinigungen hier keine Auswirkung auf die Toxizität (+ SO1861) haben. Äquivalent zu den Daten der *N*-Glykosidaseaktivität scheint das Einfügen des His-Tags eine Auswirkung auf die Zytotoxizität von HisSapovaccarin-S1 zu haben (Araujo *et al.*, 2000; Majorek *et al.*, 2014).

4.2 Beteiligung basischer Aminosäuren an der zytotoxizitätssteigernden Interaktion zwischen Typ I RIPs und Triterpensaponinen

4.2.1 Untersuchungen am Beispiel von HisDianthin und SO1861

Die synergistische Zytotoxizitätssteigerung von Typ I RIPs durch Triterpensaponine ist ein Phänomen, das für verschiedene Typ I RIPs wie Agrostin, Gypsophilin-S, Dianthin-30 und Saporin-S6 sowie für deren rekombinante Proteine und Immunotoxine bekannt ist (Gilabert-Oriol *et al.*, 2015; Kokorin *et al.*, 2019; Weise *et al.*, 2020; Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Dabei wurde die Zytotoxizitätssteigerung sowohl durch Saponingemische als auch durch isolierte Saponine wie SA1657, SA1641 und SO1861 nachgewiesen (Thakur *et al.*, 2013; Weng *et al.*, 2009; Weng, Thakur, von

Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Um den Interaktionsmechanismus, der der synergistischen Zytotoxizität zugrunde liegt, auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden exemplarisch ^{His}Dianthin und SO1861 für diese Arbeit ausgewählt. Neben Saporin-S6 ist Dianthin-30 das bisher am besten charakterisierte Typ I RIP (Fuchs, 2019; Polito *et al.*, 2013). Im Vergleich zu ^{His}Sapovaccarin-S1 ist die Proteinexpression von ^{His}Dianthin verhältnismäßig einfach. ^{His}Dianthin verhält sich den Bakterien gegenüber wesentlich untoxischer als ^{His}Sapovaccarin-S1. Expressionsmethoden waren bereits etabliert und gehen mit einer großen Ausbeute einher (Bhargava *et al.*, 2017; Legname *et al.*, 1995). Zudem lässt sich ^{His}Dianthin in zwei Schritten mit einer sehr hohen Reinheit aufreinigen (Abbildung 20B). ^{His}Dianthin ist außerdem durch eine hohe thermische Stabilität und Lagerfähigkeit bei -20 °C gekennzeichnet (Gilabert-Oriol *et al.*, 2015). Die thermische Stabilität konnte sowohl durch Cirkulardichroismus-Spektroskopie (CD) als auch durch Nano DSC aufgezeigt werden. Die Temperatur T_m , bei der 50 % des ^{His}Dianthins denaturiert waren, lag mittels CD bei ca. 66 °C und mittels Nano DSC bei 65,6 °C (Gilabert-Oriol *et al.*, 2015; Schlaak *et al.*, 2022).

SO1861 erwies sich in Kombination mit Typ I RIPs als ein sehr effizientes zytotoxizitätssteigerndes Triterpensaponin (Thakur *et al.*, 2013). Die synergistische Zytotoxizitätssteigerung wurde auch für ^{His}Dianthin und SO1861 bestätigt. Dabei waren sehr geringe SO1861-Konzentrationen von 2 µg/ml notwendig (Gilabert-Oriol *et al.*, 2015). Die Toxizitätsdaten bei alleiniger Applikation von SO1861 an Ramos-Zellen zeigten, dass SO1861 erst bei sehr hohen Konzentrationen von über 5 µg/ml zytotoxisch war. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml lag die Zellviabilität noch bei 81 % (Gilabert-Oriol *et al.*, 2016). Die Struktur von SO1861 konnte zudem vollständig aufgeklärt werden (Sama *et al.*, 2017). Die Isolation von reinem SO1861 aus den Wurzeln der *Saponaria officinalis* L. ist ein sehr zeitaufwändiger Prozess (Fuchs *et al.*, 2017; Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Für die Durchführung dieser Arbeit war dank früherer Isolationen durch Dr. Alexander Weng und Dr. Simko Sama reines SO1861 in ausreichenden Mengen im Labor vorrätig.

4.2.2 Massenspektrometrische Analyse von ^{His}Dianthin

Wie unter 3.2.1 beschrieben, wurde der in dieser Arbeit verwendete pET11d-^{His}Dianthin-Vektor, dessen cDNA für die in Abbildung 21A dargestellte ^{His}Dianthin-Sequenz kodiert, von Gilabert-Oriol *et al.* hergestellt. Die Autoren bestimmten für das exprimierte ^{His}Dianthin mittels MS eine Masse von 29531 Da. Die theoretisch berechnete Masse von 29665 Da wich davon ab ($\Delta m = 134$ Da). Die Massendiskrepanz konnte durch das tryptische Peptid bei 1774 m/z, das dem N-Terminus entsprach, aufgeklärt werden. Das MS/MS-Spektrum zeigte, dass die Sequenz N-terminal kein Methionin aufwies. Insgesamt wurden durch die MS-Analyse 78 % der Aminosäuren des ^{His}Dianthins identifiziert (Gilabert-Oriol *et al.*, 2015). Die in dieser Arbeit durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen bestätigten bzw. ergänzten die Daten der genannten Publikation. Die ^{His}Dianthin-Sequenz konnte zu

100 % mit den Peptiden verschiedener Proteasen abgedeckt werden (Abbildung A7). Für das einfach geladene Protein wurden zwei Massen $[M+H]^+$ von 29521 Da und 29699 Da ($\Delta m = 178$ Da) gemessen. Die ISD-Aufnahmen des *N*-Terminus bestätigten, dass ^{His}Dianthin *N*-terminal kein Methionin aufwies (Abbildung A5). Methionin kann in *E. coli* Bakterien posttranslational abgespalten werden (Hirel *et al.*, 1989). Zusätzlich erlaubte die ISD-Aufnahme des *N*-Terminus die Modifikation von +178 Da dem *N*-Terminus zuzuordnen (Abbildung A5). Die Auswertung des Massenspektrums des *N*-terminalen Chymotrypsin-Peptides 001–013 zeigte, dass ^{His}Dianthin in zwei Modifikationen (+178 Da und +42 Da) auftrat. Die Modifikation +178 Da konnte einer *N*-Glukonylierung und die +42 Da einer *N*-Acetylierung zugeordnet werden. Beides sind Modifikationen, die durch *E. coli* Bakterien gebildet werden. Sowohl die Glukonylierung als auch die Acetylierung finden dabei an der endständigen Aminogruppe des His-Tags statt (Geoghegan *et al.*, 1999; Ree *et al.*, 2018). Die gemessene Masse des intakten Proteins (29520 Da) stimmte nicht mit der theoretischen Masse (29534 Da) überein. Die Abweichung von 15 Da kann durch eine Massenungenauigkeit des Gerätes erklärt werden. Die UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF ist neu im Bestand des Institutes für Chemie und Biochemie (FU Berlin). Die Kalibrierung des Gerätes war zu dem Zeitpunkt der Messung noch nicht optimal. Dies zeigt sich auch in der Berechnung aus den Massen des zwei- und dreifach geladenen Proteins, welche verschiedene Gesamtproteinmassen ergeben.

4.2.3 Die Bindung von SO1861 an ^{His}Dianthin

Die Bindung von SO1861 an Typ I RIPs wurde bisher am Beispiel von ^{His}Saporin-3 bei pH 5, pH 6 und pH 7,4 mittels SPR untersucht. Mit abnehmendem pH-Wert wurde eine Zunahme der Bindung, die bei pH 5 am ausgeprägtesten war, gemessen (Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Die Schwächen der SPR liegen vor allem in der unspezifischen Bindung des Liganden an die Sensoroberfläche, die für oberflächenaktive Moleküle wie SO1861 sehr stark ausgeprägt sein kann, sowie in der Änderung der nativen Proteinkonformation nach Immobilisierung auf der Sensoroberfläche (Helmerhorst *et al.*, 2012). Für die Untersuchung der Bindung von SO1861 an ^{His}Dianthin wurde daher eine sensorfreie Methode gewählt. Die nativen MS-Aufnahmen wurden bei einem pH-Wert von 6,24, dem pH-Wert der frühen Endosomen, durchgeführt (Scott & Gruenberg, 2011).

Die Kontrollspektren von ^{His}Dianthin, sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen, wiesen neben den für unter 3.2.2 bestimmten Massenpeaks einen Hauptpeak (20595 Da) auf, der von der Masse des unmodifizierten ^{His}Dianthins (29534 Da) um 61 Da abwich (Abbildung A8 & Abbildung 22). Da die Massenabweichung unter nativen und denaturierenden Bedingungen auftrat, müsste diese durch eine kovalente Bindung verursacht worden sein. Eine Möglichkeit wäre die Bindung von Metallionen. In dem entsprechenden Massenbereich befinden sich die Metalle Kupfer (63,6 Da) und Nickel (58,7 Da), welches bei der Aufreinigung von ^{His}Dianthin zum Einsatz kam. In der Literatur konnten keine Daten zur Bindung von Metallionen an ^{His}Dianthin gefunden werden. Der Peak mit der

Massenabweichung von 61 Da trat nur bei Messungen mit der LC-ESI-MS/MS (Orbitrap Q Exactive™ HF) auf. Die MS-Aufnahme der intakten Proteinmasse mit der MALDI-TOF-MS wies keinen entsprechenden Peak auf (Abbildung 21). Durch die Anwesenheit der Peaks bei 29534 Da (unmodifiziertes ^{His}Dianthin) und bei 29712 Da (modifiziertes ^{His}Dianthin) in den Kontrollspektren konnte die Identität von ^{His}Dianthin bestätigt werden (Abbildung A8 & Abbildung 22).

Dem MALDI-TOF-Massenspektrum der Abbildung 21 ist zu entnehmen, dass ^{His}Dianthin stärker unmodifiziert als modifiziert (*N*-Glukonoylierung) vorliegt. Dies ist in den mit der Orbitrap Q Exactive™ HF aufgenommenen Kontrollspektren nicht der Fall. Der Peak des modifizierten ^{His}Dianthins ist intensiver als der Peak der unmodifizierten Form (Abbildung A8). Es scheint, dass ein großer Teil des unmodifizierten ^{His}Dianthins durch Bindung der 61 Da in den Hauptpeak mit der Masse 29595 Da übergegangen ist.

Die MS-Aufnahmen von ^{His}Dianthin unter Zugabe von SO1861 wiesen einen Massenpeak auf, der in den Kontrollspektren von ^{His}Dianthin nicht vorhanden war und der mit zunehmender SO1861-Konzentration an Intensität gewann (Abbildung 22). Die Masse des neuen Peaks setzte sich zusammen aus den Massen des ^{His}Dianthin-Hauptpeaks (29595 Da) und 1864 Da. Die Massenzunahme von 1864 Da war sehr nah an der theoretischen Masse von SO1861 (1862,88 Da). Aus dem nativen Massenspektrum ließ sich ein Bindungsverhältnis von 1:1 ableiten. Der ^{His}Dianthin-SO1861-Massenpeak erschien ab einer SO1861-Konzentration von 30 µM und wies eine sehr geringe Intensität auf. Mit Zunahme der SO1861-Konzentration nahm die Intensität des Peaks zu, jedoch spricht die Intensität bei der höchsten Konzentration für eine eher schwache Bindung. Die Durchführung der nativen MS bei niedrigerem pH-Wert, wie von Weng *et al.* mit der SPR aufgezeigt, könnte auch in der nativen MS zu einer stärkeren Bindung führen (Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012).

Die native MS ermöglicht das Messen einer nahezu nativen Proteinkonformation. Aufgrund der Energien während der Ionisierung in der Gasphase kann jedoch nicht der komplette native Zustand erhalten bleiben. Hinzukommt, dass die Auswahl des Messpuffers und damit einhergehend die Auswahl des pH-Wertes (hier pH 6,24) stark eingeschränkt sind. Ammoniumacetat ist als Puffer besonders geeignet, da Ammoniumacetat eine möglichst native Umgebung für Biomoleküle schafft, flüchtig ist und ein Entfernen des Lösungsmittels bei niedrigen Aktivierungsenergien ermöglicht (Kebarle & Verkerk, 2009). Die Bindung von SO1861 an ^{His}Saporin-3 (Weng, Thakur, Beceren-Braun, *et al.*, 2012; Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012) bzw. ^{His}Dianthin konnte mit zwei sich stark unterscheidenden Methoden (SPR und native MS), die teils in unterschiedlichen Bereichen ihre Schwächen aufweisen, gemessen werden. Somit deutet alles auf eine Bindung zwischen SO1861 und ^{His}Dianthin hin.

4.2.4 Auswahl geeigneter, basischer Aminosäuren

Nach der Bestätigung der Bindung von SO1861 an ^{His}Dianthin erfolgte die Auswahl der Aminosäuren, die auf ihre Beteiligung an der Interaktion untersucht werden sollten. Wie unter 1.2 beschrieben, wurden über die letzten Jahre einige Faktoren aufgeklärt, die für eine endosomale Freisetzung der RIPs durch Triterpensaponine erfüllt sein müssen. Vor allem wurde durch mehrere Publikationen die Bedeutung des sauren pH-Wertes hervorgehoben (D. Bachran *et al.*, 2011; Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Eine unverzichtbare Strukturvoraussetzung der Triterpensaponine ist die Glucuronsäure an C-3 (Böttger *et al.*, 2013). Diese liegt bei dem pH-Wert der späten Endosomen und Lysosomen, aus denen die Freisetzung erfolgt, negativ geladen vor (Thakur *et al.*, 2013; Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). ^{His}Dianthin mit einem theoretischen IEP von 9,48 (bestimmt mit dem Online-Tool ExPasy ProtParam) liegt in den späten Endosomen und den Lysosomen positiv geladen vor (Wilkins *et al.*, 1999). Die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin, die im Sauren eine positive Ladung tragen, machen insgesamt 33 der 263 Aminosäuren aus. Aufgrund der Notwendigkeit des sauren pH-Wertes wurde die Hypothese aufgestellt, dass die basischen Aminosäuren und die Glucuronsäure an der Interaktion bzw. der Bindung zwischen ^{His}Dianthin und SO1861 beteiligt sind. Um die Anzahl der basischen Aminosäuren im ^{His}Dianthin einzuschränken, wurde der Fokus der Untersuchungen auf die Lysin-Reste gelegt. Es sollten alle Lysin-Reste, die von der Oberfläche zugänglich sind und sich nicht im aktiven Zentrum befinden, auf eine Beteiligung an der Interaktion mit SO1861 hin untersucht werden. Die Lysin-Reste, die im aktiven Zentrum lokalisiert sind, wurden von der Analyse ausgeschlossen, da, wie unter 1.2 beschrieben, für ^{His}Saporin-3 kein Aktivitätsunterschied in Anwesenheit von SA1641 festgestellt werden konnte (Gilabert-Oriol *et al.*, 2016).

16 Lysin-Reste wurden in die Auswahl eingeschlossen (Abbildung 23). Die ausgewählten Lysin-Reste waren ebenfalls an entsprechender Position in den Sequenzen von Saporin-S6 und bzw. oder von Gypsophilin-S, für die die synergistische Toxizität mit Triterpensaponinen ebenfalls bekannt ist, aufzufinden. Agrostin als Typ I RIP mit unüblicher Aminosäuresequenz, welches dennoch mit Triterpensaponinen interagiert, wies dennoch nur zwei der ausgewählten Lysin-Reste (Lys190 und Lys227) in seiner Sequenz auf. Zusätzlich zu den 16 Lysin-Resten wurde für die Untersuchungen das Arginin an Position 24 ausgewählt. Wie in Abbildung 47A dargestellt, verglichen Di Maro *et al.* die Sequenzen von 165 aus Angiospermen isolierten Typ I und Typ II RIPs (Di Maro *et al.*, 2014). Nur Arginin (an den Positionen 54 und 283 des Sequenzvergleichs) kam als basische Aminosäure hoch konserviert vor. Arg54 und Arg283 wurden von Di Maro *et al.* den Positionen Arg26 und Arg166 der Ebulin A-Kette, ein Typ II RIP aus *Sambucus ebulus* L., zugeordnet. Abbildung 47B zeigt den Sequenzvergleich von Ebulin und Dianthin-30 mit dem Online-Tool Clustal Omega, der das Ableiten der entsprechenden Positionen (Arg24 und Arg180) im Dianthin-30 ermöglichte (Sievers *et al.*, 2011). Arg180 wurde von der Auswahl ausgeschlossen, da es Teil des aktiven Zentrums und an der Bindung

des Adenins beteiligt ist (Di Maro *et al.*, 2014). Arg24 war außerdem in allen in Abbildung 23 verglichenen Typ I RIPs präsent und wurde daher in die Analyse eingeschlossen.

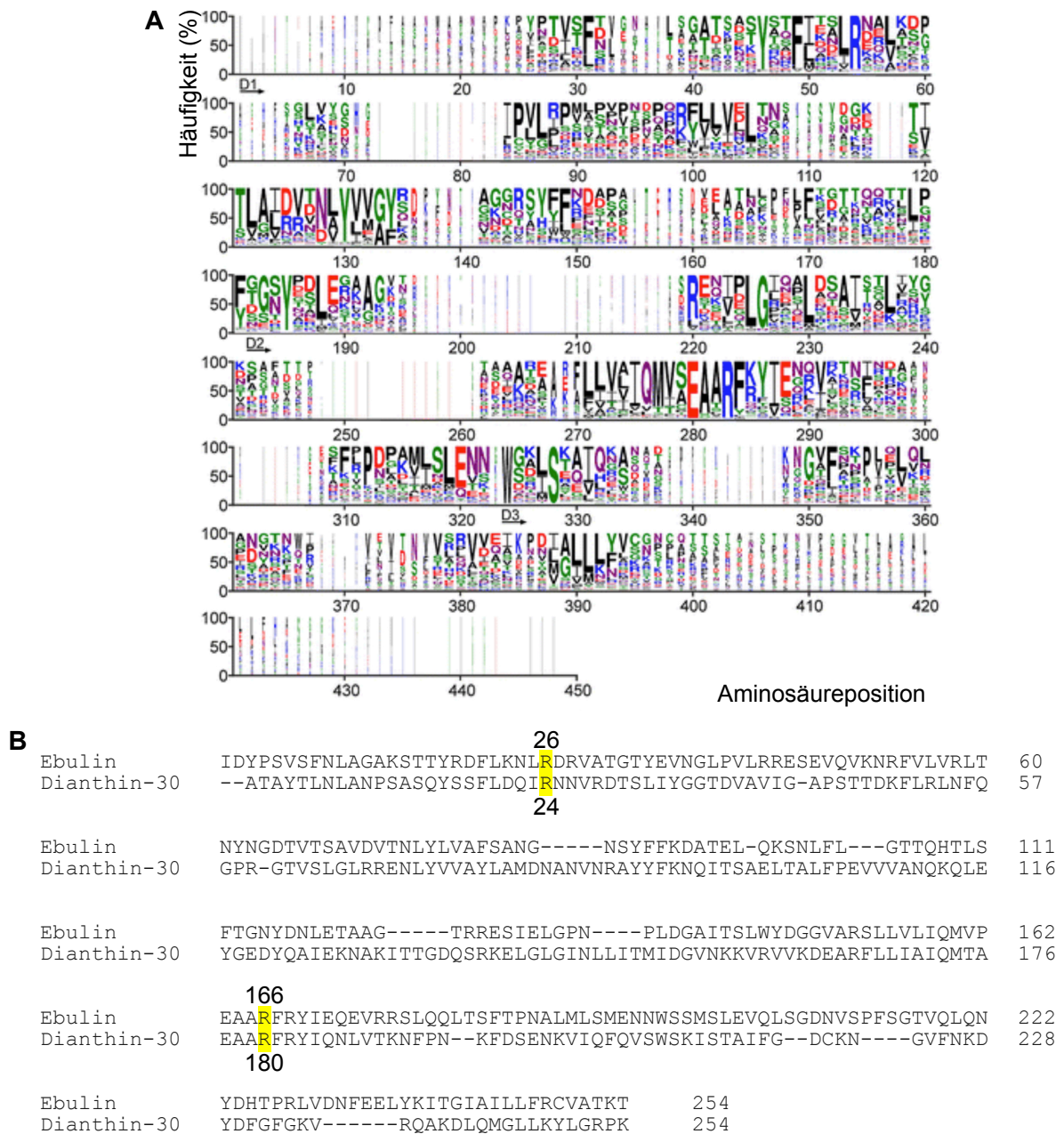


Abbildung 47. Herleitung der Aminosäureposition Arg24 des ^{His}Dianthins. (A) Sequenzvergleich von 165 RIPs der Angiospermen. Die Höhe der Buchstaben ist proportional zur Häufigkeit der Aminosäure an dieser Position in Bezug zu allen Aminosäuren. Die Breite der Buchstaben ist proportional zur Häufigkeit der Aminosäure an der Position, einschließlich Lücken. *Abb. Modifiziert nach DiMaro et al.* (Di Maro *et al.*, 2014). (B) Sequenzvergleich der Ebulin A-Kette (Typ II RIP aus *Sambucus ebulus* L.) mit Dianthin-30. Der Vergleich wurde mit dem Online-Tool Clustal Omega erstellt (Legname *et al.*, 1991; Pascal *et al.*, 2001; Sievers *et al.*, 2011). Die in (A) dargestellten hoch konservierten basischen Aminosäuren Arg54 und Arg283 wurden in der Publikation von DiMaro *et al.* den Aminosäurepositionen Arg26 und Arg166 (gelb markiert) der Ebulin A-Kette zugeordnet. Durch den Sequenzvergleich der beiden RIPs konnten dementsprechend Arg24 und Arg180 (gelb markiert) dem Dianthin-30 zugeordnet werden.

4.2.5 Herstellung der ^{His}Dianthin-Mutanten

Um die Beteiligung der 17 ausgewählten, basischen Aminosäuren an der Interaktion zwischen ^{His}Dianthin und SO1861 zu untersuchen, musste die Aminosäure mit basischer Funktion durch eine Aminosäure mit neutraler Funktion ersetzt werden. Eine etablierte Methodik der Molekularbiologie ist für diesen Zweck die Alanin-Substitution, auch Alaninscan genannt. Durch schrittweisen Austausch der entsprechenden Aminosäure durch Alanin wird die Beteiligung des Aminosäure-Restes an der Protein-Protein- bzw. Protein-Ligand-Interaktion untersucht. Dabei wird jede Seitenkette einzeln getestet (Clackson & Wells, 1995; Wells, 1991). Die Substitution mit Alanin hat den Vorteil, dass keine neuen Wasserstoffbrücken gebildet werden, Alanin nicht besonders hydrophob ist und keine sterische Hinderung erfolgt. Alanin ermöglicht es daher, die zu untersuchende Seitenkette zu ersetzen, ohne die Konformation der Hauptkette zu beeinflussen (Cunningham & Wells, 1989). Durch die Substitution mit Alanin werden alle Atome der entsprechenden Seitenkette (hier Lysin bzw. Arginin) hinter dem β -C-Atom entfernt (Clackson & Wells, 1995). Der Alaninscan wurde mit den 17 ausgewählten Aminosäuren durchgeführt. Die Alanin-Substitution eines Lysine-Restes führte zur Abnahme des theoretischen IEP von 9,48 auf 9,42 (Wilkins *et al.*, 1999). Zusätzlich wurde von der gängigen Methodik abgewichen und es wurden zwei bzw. drei Lysin-Reste gleichzeitig durch Alanin ersetzt, wodurch der theoretische IEP auf 9,35 bzw. 9,26 fiel (Wilkins *et al.*, 1999). Die Alanin-Substitution wurde nicht auf Proteinebene, sondern auf DNA-Ebene durchgeführt. Im pET11d-^{His}Dianthin-Vektor wurden mittels SDM die Alanin-Substitutionen für Lys195Ala, Lys227Ala und Arg24Ala erzeugt. Die SDM wurde in zwei an sich einfachen Schritten durchgeführt. Allerdings kam es bei der PCR mit den spezifischen Mutations-tragenden Primern zu fehlerhaften PCR-Produkten, wie die anschließenden Plasmid-Präparationen offenbarten und musste teilweise wiederholt werden. Infolgedessen wurden aus zeitlichen Gründen die restlichen ^{His}Dianthin-Mutanten ebenfalls im pET11d-Vektor kommerziell (BioCat, Heidelberg) erworben.

Die Proteinexpression der ^{His}Dianthin-Mutanten erwies sich als schwieriger als die des nativen ^{His}Dianthins. 14 der 19 Mutanten ließen sich in NiCo21(DE3) exprimieren und anschließend extrahieren. Für ^{His}Dianthin Lys156Ala, Lys157Ala, Lys235Ala, Lys240Ala, Lys50/92/126Ala blieb die Expression und Isolierung aus den NiCo21(DE3) auch nach mehrmaliger Wiederholung erfolglos. Die Analyse der entsprechenden Zellpellets mittels SDS-PAGE zeigte, dass sich die Zielproteine im Zellpellet befanden. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass die Zielproteine in Einschlusskörperchen exprimiert wurden, wie es auch für ^{His}Saporin-S6 und seine Mutanten bekannt ist (Bagga *et al.*, 2003; Pittaluga *et al.*, 2005). Der Wechsel auf einen anderen Expressionsstamm (BL21(DE3)pLysS) ermöglichte die erfolgreiche Expression und Extraktion der Zielproteine. Anders als erwartet, ließen sich die ^{His}Dianthin-Mutanten Lys50/92 und Lys50/92/126, trotz gleichzeitiger Substitution von zwei bzw. drei Aminosäuren, exprimieren und extrahieren. Mit dem Amicon[®] Pro Affinitätskonzentrationskit Ni-NTA wurden, bis auf für die ^{His}Dianthin-Mutanten Lys129Ala, Lys157Ala, Lys227Ala, Lys235Ala und Lys240Ala, reine Elutionsfraktionen erhalten (Abbildung 25).

4.2.6 Enzymatische Charakterisierung der ^{His}Dianthin-Mutanten

Das Einführen der Alanin-Substitutionen im ^{His}Dianthin hatte nur partiell Auswirkung auf deren *N*-Glykosidaseaktivität. Die ^{His}Dianthin-Mutanten Lys50Ala, Lys113Ala, Lys157Ala, Lys221Ala, Lys227Ala, Lys50/92Ala und Lys50/92/126Ala unterschieden sich signifikant in ihrer Enzymaktivität im Vergleich zu der nativen Form (Abbildung 28). Bei den ^{His}Dianthin-Mutanten Lys157Ala, Lys50/92Ala und Lys50/92/126Ala war der Aktivitätsunterschied besonders ausgeprägt. Der Mittelwert der drei Mutanten lag jeweils unter 50 % der *N*-Glykosidaseaktivität von ^{His}Dianthin. Wie zu erwarten war die Enzymaktivität bei der Variante mit drei substituierten Lysin-Resten, die am meisten von der nativen Form abwich, am stärksten reduziert.

Bei Lys157Ala und Lys227Ala könnte die reduzierte Enzymaktivität auf die Verunreinigungen zurückzuführen sein. Da die bestimmten Proteinkonzentrationen sich aus der Menge Mutanten- und Verunreinigungsprotein repräsentierten, war die im *adenine-releasing assay* eingesetzte RIP-Menge reduziert. Eine *N*-Glykosidaseaktivität, verursacht durch *E. coli* Verunreinigungen, konnte ausgeschlossen werden, indem eine Expressionsfraktion, die kein Zielprotein enthielt, auf *N*-Glykosidaseaktivität überprüft wurde. Durch Analyse der SDS-Gele der Abbildung 28 mit der Software GelAnalyzer konnte ein Gehalt an Lys157Ala von 79,4 % (Verunreinigungen 20,6 %) und an Lys227Ala von 96,4 % (Verunreinigung 3,6 %) bestimmt werden. Die prozentuale *N*-Glykosidaseaktivität im Vergleich zu ^{His}Dianthin lag für Lys157 bei 34,1 % und für Lys227 bei 54,6 %. Da die Reduktion der Aktivität nicht dem Gehalt der Mutante entsprach, war davon auszugehen, dass der Aktivitätsverlust vom Einführen der Mutation verursacht wurde. Bei den ^{His}Dianthin-Mutanten Lys129Ala, Lys227Ala, Lys235Ala und Lys240Ala war trotz Verunreinigung kein signifikanter Aktivitätsunterschied festzustellen, wodurch die Hypothese unterstützt werden konnte, dass die Verunreinigungen keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hatten. Wie unter 4.2.4 beschrieben, wurde beim Einführen der Alanin-Substitution darauf geachtet, dass Lysin-Reste, die Teil des aktiven Zentrums sind, von der Auswahl ausgeschlossen wurden. Dennoch ließ sich für einige Mutanten eine Reduktion der Enzymaktivität verzeichnen. Die Abnahmen der *N*-Glykosidaseaktivität könnten auf einen destabilisierenden Effekt, den das Einführen der Alanin-Substitution auf die Tertiärstruktur haben kann, zurückzuführen sein (Laimer *et al.*, 2016; Laimer *et al.*, 2015).

In der Literatur wurden bisher noch keine Mutationsstudien an Lysin-Resten bzw. Arginin-Resten des ^{His}Dianthins beschrieben. Für ^{His}Saporin-S6 wurden mehrere Mutationsstudien, deren Hauptfokus auf die Funktionen der Aminosäuren im aktiven Zentrum gelegt war, veröffentlicht (Bagga *et al.*, 2003; Ghosh & Batra, 2006; Pittaluga *et al.*, 2005). Bagga *et al.* charakterisierten jedoch die Arg24Ala-Mutation am Beispiel von ^{His}Saporin-S6 (Bagga *et al.*, 2003). Die Sequenzen von ^{His}Saporin-S6 und ^{His}Dianthin sind sich sehr ähnlich (79,8 % identische Aminosäuren) und eignen sich somit sehr gut zum Vergleichen. Die *N*-Glykosidaseaktivität von ^{His}Saporin-S6 Arg24Ala wurde anhand der Freisetzung des Endo-Fragments aus der 28S rRNA aus einem Kaninchen-Retikulozytenlysate

bestimmt. Die Autoren konnten, wie auch in dieser Arbeit für ^{His}Dianthin Arg24Ala beschrieben, keinen signifikanten Unterschied in der *N*-Glykosidaseaktivität im Vergleich zu dem nativen ^{His}Saporin-S6 feststellen. Ein zusätzlich durchgeführter *in vitro* Translationsassay konnte auch keinen signifikanten Unterschied zwischen ^{His}Saporin-S6 und ^{His}Saporin-S6 Arg24Ala bei der Hemmung der Proteinsynthese feststellen (Bagga *et al.*, 2003).

4.2.7 Zytotoxische Charakterisierung der ^{His}Dianthin-Mutanten

Die Beteiligung der basischen Aminosäuren an der Interaktion zwischen ^{His}Dianthin und SO1861 wurde anhand der synergistischen Zytotoxizität untersucht. Sowohl die eingesetzte Proteinkonzentration (1 nM) als auch die SO1861-Konzentration (1 µg/ml) lagen in dem Konzentrationsbereich, der in verschiedenen Zelllinien bei synergistischen Zytotoxizitätsuntersuchungen eingesetzt wurde (Bhargava *et al.*, 2017; Gilabert-Oriol *et al.*, 2016; Gilabert-Oriol *et al.*, 2014; Gilabert-Oriol *et al.*, 2013; Gilabert-Oriol *et al.*, 2015). Beim Screening der ^{His}Dianthin-Mutanten auf zytotoxische Aktivität wurde jede Mutante parallel ohne und mit Zugabe von 1 µg/ml SO1861 getestet. Ohne Zugabe von SO1861 sollte bei der geringen Proteinkonzentration kein zytotoxischer Effekt vorhanden sein. Dies traf für alle Mutanten zu (Abbildung 29). Durch die Zugabe von SO1861, welche die endosomale Freisetzung von ^{His}Dianthin und den Mutanten verstärkt, war eine Zytotoxizitätssteigerung zu erwarten (Gilabert-Oriol *et al.*, 2015). ^{His}Dianthin-Mutanten, deren mutierte Aminosäure mit SO1861 interagiert, sollten eine geringere Zytotoxizitätssteigerung als die des nativen ^{His}Dianthins aufweisen. Eine reduzierte Zytotoxizitätssteigerung war nur bei ^{His}Dianthin Arg24Ala zu verzeichnen (Abbildung 29D). Die restlichen ^{His}Dianthin-Mutanten unterschieden sich in ihrer Zytotoxizität nicht vom nativen ^{His}Dianthin (Abbildung 29).

Ausgehend von den *N*-Glykosidaseaktivitätsdaten wäre zu erwarten, dass ^{His}Dianthin-Mutanten mit signifikant geringerer Enzymaktivität auch geringer zytotoxisch sein müssten. Die Konfluenzdaten in Neuro-2A-Zellen konnten für die entsprechenden ^{His}Dianthin-Mutanten eine geringere Zytotoxizität nicht bestätigen (Abbildung 29). Der *adenine-releasing assay* beruht auf der Abspaltung eines Adenins von dem künstlichen Oligonukleotid A30 (Weng, 2018). Der Assay fungiert als stark vereinfachtes Modell. Die Mechanismen, die der Zytotoxizität der RIPs zu Grunde liegen, sind jedoch viel komplexer (s. 1.1). Demzufolge weichen die ermittelten *N*-Glykosidaseaktivitätsdaten von den Zytotoxizitätsdaten ab. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten bestätigen nochmals, dass die Zytotoxizität der RIPs durch die ganz spezifische rRNA *N*-Glykosidaseaktivität bestimmt wird.

Das Durchführen eines zweiten Assays, dessen Enzymaktivität repräsentativ für die Zytotoxizität der RIPs ist, wäre an dieser Stelle für die Charakterisierung der biologischen Aktivität der ^{His}Dianthin-Mutanten sinnvoll gewesen. Zum Beispiel lässt sich die Hemmung der Proteinsynthese durch RIPs relativ einfach mit einem Luciferase-RNA-Assay bestimmen.

Kaninchen-Retikulozytenlysat wird dabei mit Luciferase-RNA und dem RIP inkubiert. Die Quantifizierung der Proteinsynthesehemmung erfolgt durch Messung der Biolumineszenz, die durch Zugabe des Luciferasesubstrates Luciferin induziert wird (Bai *et al.*, 2009; Hale, 2001). Die Hemmung der Proteinsynthese kann als reduzierte Biolumineszenz, da weniger bzw. keine Luciferase gebildet wird, gemessen werden. Der Assay kann besser die natürlichen Prozesse der Zelle als der sehr Substrat-spezifische *adenine-releasing assay* repräsentieren.

Keine der Lysin-Mutanten, sowohl die einfach als auch die mehrfach substituierten Varianten, zeigten in Kombination mit SO1861 eine veränderte Zytotoxizität. Die Substitution der Lysin-Seitenketten hatte keine Auswirkung auf die Interaktion mit SO1861. Dementsprechend sind die in dieser Arbeit untersuchten Lysin-Reste nicht an der Interaktion mit SO1861 beteiligt. Die Daten dieser Arbeit widerlegen somit den von Hebestreit *et al.* postulierten Mechanismus der temporären Schiffischen Basenbildung zwischen der Aldehyd-Gruppe der Saponine und der ϵ -Aminogruppe der Lysine (Hebestreit & Melzig, 2003).

Ein weiterer Ansatz zur Charakterisierung der Interaktion zwischen ^{His}Dianthin und SO1861 wäre die Untersuchung des Einflusses des IEP von ^{His}Dianthin. Die schrittweise, gleichzeitige Substitution der Lysin-Reste wie bei Lys50/92/126Ala bis zu einer ^{His}Dianthin-Mutante, in der alle Lysin-Reste durch Alanin substituiert sind, hätte eine Reduktion des theoretischen IEP auf 5,29 zur Folge (Wilkins *et al.*, 1999). Die Expression einer ^{His}Dianthin-Mutante, in der alle Lysin-Reste substituiert sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit ausprobiert. Hierfür wurden verschiedenste Expressionsbedingungen getestet. Die MS-Analyse des In-Gel-Verdaus mit Trypsin ergab, dass das Zielprotein unlöslich im Zellpellet verblieb (s. Abbildung A12). Auch eine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen war erfolglos. Da die hohe Anzahl der Substitutionen stark von der natürlichen Sequenz abweicht, ist es naheliegend, dass die Ausbildung der Tertiärstruktur durch die Substitutionen gestört wird. Gleiches könnte auch bei ^{His}Dianthin-Mutanten mit mehr als drei parallelen Alanin-Substitutionen vorkommen.

4.3 Erweiterte Untersuchungen zur Zytotoxizität und Stabilität von ^{His}Dianthin Arg24Ala

Wie die Konfluenzdaten von ^{His}Dianthin Arg24Ala in Neuro-2A-Zellen zeigten, wurde durch das Einführen der Alanin-Substitution an Position 24 die synergistische Zytotoxizität reduziert (Abbildung 29D). Um die Signifikanz zu bestimmen und auszuschließen, dass der Effekt abhängig von der Zelllinie war, wurde das Experiment mit zwei Proteinkonzentrationen (0,1 und 1 nM) in drei verschiedenen Zelllinien wiederholt. Die Reduktion der synergistischen Zytotoxizität war bei 0,1 und 1 nM in Neuro-2A-, A2058- sowie HCT116-Zellen signifikant (Abbildung 30). Die verminderte synergistische Zytotoxizität war somit nicht von der Zelllinie abhängig. ^{His}Dianthin Arg24Ala zeigte auch keine signifikant reduzierte N-Glykosidaseaktivität (Abbildung 28). Daher wurde die Vermutung aufgestellt, dass Arg24 an der Interaktion mit SO1861 beteiligt sein könnte. Unterstützt wurde die

Hypothese durch die Betrachtung der Proteinoberfläche. Wie in Abbildung 48 dargestellt, ist die basische Guanidin-Gruppe von Arg24 von der Proteinoberfläche her zugänglich und könnte mit SO1861 interagieren. Die Oberflächenzugänglichkeit von Arg24 konnte außerdem mit dem Online-Tool NetSurfP-3.0 bestätigt werden (Hoie *et al.*, 2022). Des Weiteren befinden sich in der Umgebung von Arg24 sowohl hydrophile als auch hydrophobe Bereiche, passend zur amphiphilen Struktur von SO1861 (Abbildung 48A). Mit der Software MOE konnte außerdem eine potenzielle, eher flache Bindetasche in der Umgebung von Arg24 identifiziert werden (Abbildung 48C). Molekulares Docking wurde an dieser Stelle nicht durchgeführt. Die Hypothese sollte zunächst durch das Zellkulturexperiment im hohen Konzentrationsbereich überprüft werden.

Wie unter 3.2.10 erwähnt, lässt sich der zytotoxische Effekt von ^{His}Dianthin auch bei sehr hohen RIP-Konzentrationen ohne Zugabe von SO1861 bestimmen, da ein kleiner Anteil dem lysosomalen Abbau entkommt (Bhargava *et al.*, 2017; Fuchs, 2019). Sollte die reduzierte synergistische Zytotoxizität von ^{His}Dianthin Arg24Ala auf der verminderten Interaktion mit SO1861 beruhen, dürften sich die Zytotoxizitäten von ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala ohne Zugabe von SO1861 nicht unterscheiden. Ab 100 nM war ein signifikanter Zytotoxizitätsunterschied zu messen. Die Zellviabilität bei 100 nM ^{His}Dianthin lag bei 88,6 % und ^{His}Dianthin Arg24Ala bei 97,7 %. Bei 1000 nM war der Zytotoxizitätsunterschied wesentlich größer. 1000 nM ^{His}Dianthin war zytotoxisch (Zellviabilität von 44,2 %) und 1000 nM ^{His}Dianthin Arg24Ala (Zellviabilität von 97,3 %) zeigte keine Zytotoxizität (Abbildung 31A). Da die Zytotoxizitäten von ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala auch ohne SO1861-Zugabe variierten, konnte die verringerte synergistische Zytotoxizität nicht durch eine reduzierte Interaktion mit SO1861 bedingt sein.

Wie unter 4.2.6 beschrieben, war die *N*-Glykosidaseaktivität von ^{His}Dianthin Arg24Ala nicht signifikant reduziert. Auch für ^{His}Saporin-S6 Arg24Ala konnte durch das Einführen der Alanin-Substitution an Position 24 weder eine Reduktion der *N*-Glykosidaseaktivität noch der Proteinsynthesehemmung gemessen werden (Bagga *et al.*, 2003). Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die verringerte Zytotoxizität von ^{His}Dianthin Arg24Ala sowohl ohne Zugabe als auch mit Zugabe von SO1861 nicht durch Beeinträchtigung der enzymatischen Aktivitäten verursacht wurde. Wenn die Zytotoxizität bei gleichzeitig intakter Enzymaktivität geringer ist, kann das auf eine verminderte Toxinkonzentration innerhalb der Zelle zurückzuführen sein. Jedoch wäre diese nicht bedingt durch eine reduzierte Interaktion mit SO1861, die ausgeschlossen werden konnte, sondern durch eine geringere Aufnahme in die Zelle mittels Endozytose.

Neben dem Einfluss der Arg24Ala-Mutation auf die *N*-Glykosidaseaktivität wurde auch die Thermostabilität charakterisiert (Abbildung 32). Das Einführen der Alanin-Mutation in Position 24 bewirkte bei pH 7,4 eine Destabilisierung des ^{His}Dianthins, gekennzeichnet durch eine *T_m*-Abnahme um 7,2 °C auf 58,6 °C. Die *T_m* des nativen ^{His}Dianthins lag bei 65,8 °C. Verglichen mit der *T_m* von ^{His}Saporin-S6, die 58 °C bei pH 7,4 beträgt, wird ersichtlich, dass ^{His}Dianthin Arg24Ala trotz der

Destabilisierung eine für rekombinante Typ I RIPs charakteristische T_m aufweist (Sanchez *et al.*, 2015). Mit dem Online-Tool MAESTROweb, welches Stabilitätsänderungen durch Einführen von Mutationen vorhersagt, wurde bei pH 7,4 eine Destabilisierung durch die Arg24Ala-Mutation berechnet (Laimer *et al.*, 2016; Laimer *et al.*, 2015). Die unter 3.2.11 bestimmten Nano DSC-Daten bestätigten die die mittels MAESTROweb berechnete Stabilitätsänderung.

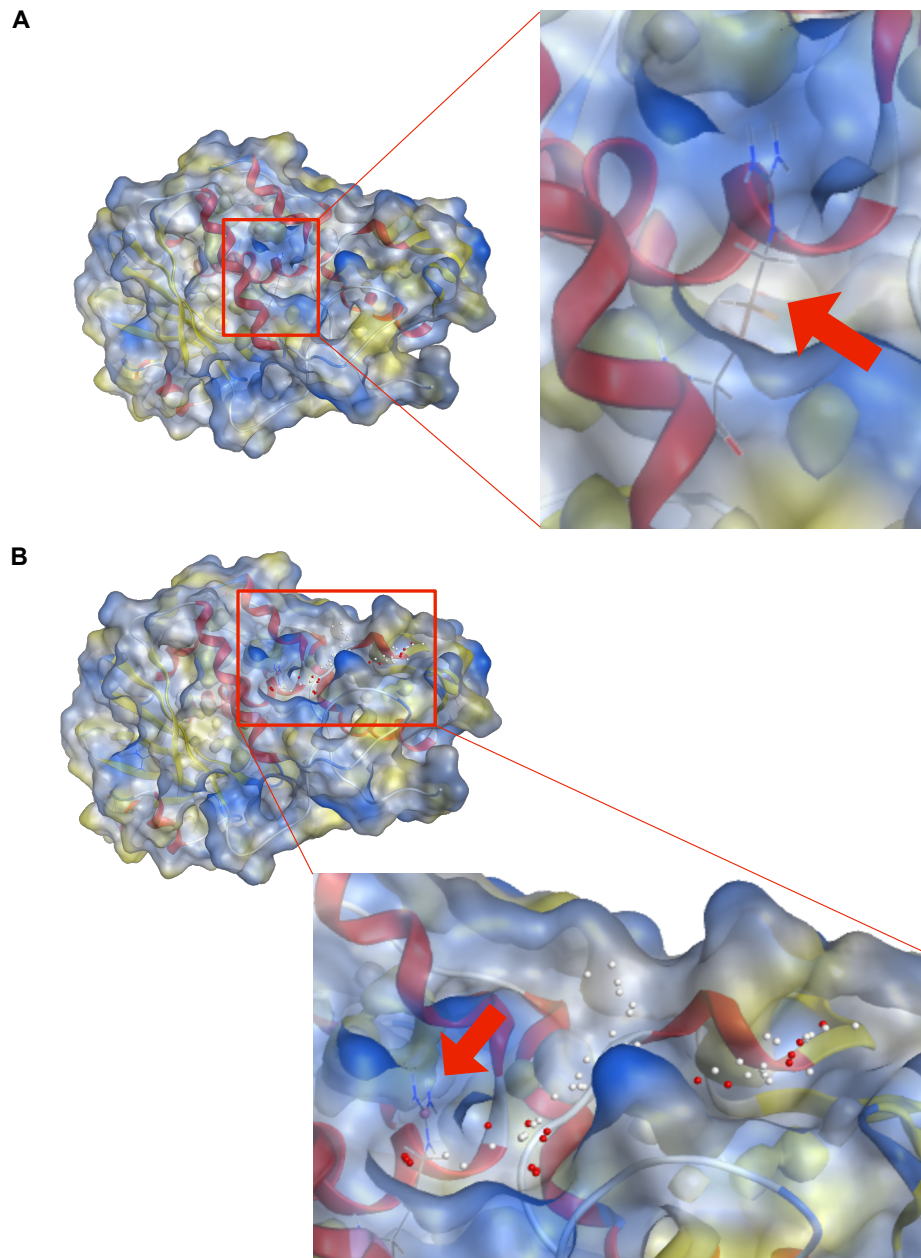


Abbildung 48. 3D-Struktur von ^{His}Dianthin (PDB ID 1R10) und die Position von Arg24 im Protein. (A) Proteinstuktur von ^{His}Dianthin unterhalb der Proteinoberfläche. Hydrophile Regionen sind blau markiert, hydrophobe Regionen gelb. Arg24 ist Teil einer α -Helix und ragt davon zur Proteinoberfläche. (B) Potenzielle Bindetasche in der Nähe von Arg24. Die Lage der potenziellen Bindetasche ist durch rote und weiße Punkte markiert. Der rote Pfeil (A-B) markiert die Arginin-Seitenkette an Position 24. Abbildungen A-B und die Berechnung der Bindetasche wurden mit MOE erstellt.

4.4 Einfluss der Arg24Ala-Mutation auf die Endozytose von ^{His}Dianthin

4.4.1 ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568

Wie in 2.7.3.4 ausgeführt, wurde die Markierungsreaktion mit CF®568 ohne vorheriges Testen eines optimalen stöchiometrischen Verhältnisses durchgeführt. Laut Fluoreszenzfarbstoffhersteller soll der Markierungsgrad von IgG-Antikörpern, deren Proteingröße 150 kDa beträgt, 5–6 betragen. Leichte Abweichungen sollen dennoch zu akzeptablen Ergebnissen führen. Für ein Protein von ca. 29,5 kDa lässt sich davon ein optimaler Markierungsgrad von 1–1,2 ableiten. Die aus den Absorptionswerten bei 280 und 562 nm errechneten Markierungsgrade von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 waren mit 2,07 und 2,38 doppelt so hoch. Diese Werte stellen Durchschnittswerte dar. Mittels MALDI-TOF-MS konnte die Markierungsgradspanne, deren maximaler Wert sowohl für ^{His}Dianthin-CF568 als auch für ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 ein Markierungsgrad von sechs war, bestimmt werden (Abbildung A11). Das heißt, dass bis zu sechs Lysin-Reste mit einem CF®568-Molekül reagiert und die funktionelle Gruppe des Lysins, ein primäres Amin, durch Bildung einer stabilen Amidbindung mit CF®568 blockiert haben (s. 2.7.3.4). Für ^{His}Dianthin kam es durch die Markierung zu einer Massenzunahme von 1403–4283 Da. Bei ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 lag diese bei 711–4222 Da. Sowohl die SDS-PAGE als auch die MS-Analyse konnten die Reinheit der Protein-CF568-Konjugate bestätigen (3.3.1). Für die Fluoreszenzintensität von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 (100 und 1000 nM) konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden (Abbildung 34). Alles in allem führte die Markierungsreaktion zu zwei relativ ähnlich markierten Produkten. Ob bei beiden Proteinen die gleichen Lysin-Reste konjugiert wurden, lässt sich anhand der Daten nicht auswerten. Da sie beide unter gleichen Reaktionsbedingungen markiert wurden, ist wahrscheinlich davon auszugehen.

Die Markierung von Typ I RIPs mit Fluoreszenzfarbstoff wurde mit Alexa Fluor™ 488 sowohl an ^{His}Dianthin, ^{His}Saporin-Antikörper-Konjugat und ^{His}Saporin-3 durchgeführt (Gilabert-Oriol *et al.*, 2017; Gilabert-Oriol *et al.*, 2014; Weng *et al.*, 2008; Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012; Wensley *et al.*, 2019; Wensley *et al.*, 2021). Jedoch wurde weder der Markierungsgrad, errechnet aus den Absorptionswerten oder der MS-Analyse, noch der Einfluss auf die *N*-Glykosidaseaktivität bestimmt. Nur für ^{His}Saporin-3 markiert mit Alexa Fluor™ 488 wurde die Zytotoxizität mittels XTT-Assay ermittelt. Die Autoren konnten keine Abnahme der Zytotoxizität feststellen (Weng *et al.*, 2008). Dass die Markierungsreaktion an Lysin-Resten Folgen für die *N*-Glykosidaseaktivität der RIPs haben kann, konnte anhand der nicht mehr vorhandenen Adeninfreisetzung aus dem A30-Substrat sowohl für ^{His}Dianthin-CF568 als auch für ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 gezeigt werden (Abbildung 35). Gleiches ist für die Zytotoxizität ohne und mit Zugabe von SO1861 zu beobachten (Abbildung 36). Vor der Reaktion mit CF®568 war ^{His}Dianthin in Kombination mit SO1861 im Konzentrationsbereich von 0,1–100 nM zytotoxisch (Abbildung 30, Abbildung 31). Die synergistische Zytotoxizität von

^{His}Dianthin-CF568 war nur noch bei 100 nM vorhanden (Abbildung 36A). Für ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 war sie gänzlich aufgehoben (Abbildung 36B).

Die in Abbildung 23 dargestellte ^{His}Dianthin-Sequenz weist 19 Lysine auf, wovon Lys138, Lys211 und Lys248 im aktiven Zentrum lokalisiert sind (Kurinov *et al.*, 2004). Der NHS-Ester von CF®568 reagiert unspezifisch mit Lysin-Resten und kann somit auch sehr stabile Amidbindungen mit den Lysin-Resten, die in die enzymatische Aktivität des ^{His}Dianthins involviert sind, eingehen. Eine Optimierung des Farbstoff-Protein-Verhältnisses könnte dazu führen, dass der Markierungsgrad in Richtung des empfohlenen Wertes von 1–1,2 reduziert wird. Es bestünde dennoch weiterhin die Möglichkeit, dass der Fluoreszenzfarbstoff an die Lysine des aktiven Zentrums bindet. Daher wurde auf eine Optimierung des Farbstoff-Protein-Verhältnisses verzichtet. Eine selektive Markierungsreaktion unter Umgehung des aktiven Zentrums wäre hier von Vorteil. Neben den Amin-reaktiven Farbstoffen stehen Thiol-reaktive Farbstoffe zur Verfügung. Die Kopplung über die Thiol-Gruppe des Cysteins und z. B. Maleimid ist wesentlich selektiver (Edelmann & Hauri, 2021). Das einzige im ^{His}Dianthin vorkommende Cystein ist nicht der Proteinoberfläche ausgesetzt (berechnet mit dem Online-Tool NetSurfP-3.0) und lässt sich somit nicht über Maleimid mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugieren (Hoie *et al.*, 2022).

4.4.2 Endozytose von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568

Während die Endozytose von Typ II RIPs sehr gut charakterisiert ist, sind die Endozytosemechanismen der Typ I RIPs bisher weniger gut untersucht (D. Bachran *et al.*, 2011; Bolognesi *et al.*, 2016; Ritchie *et al.*, 2013). Wie unter 1.1 beschrieben, wurden die Aufnahmemechanismen einiger Typ I RIPs aufgeklärt (Fuchs, 2019). Dass ^{His}Dianthin via Endozytose in die Zelle gelangt, wurde mit einer Kolokalisationsstudie aufgezeigt. Die Kolokalisation von ^{His}Dianthin-Alexa Fluor™ 488 und pHrodo™ Rot Dextran, einem pH-sensitivem Marker für späte Endosomen und Lysosomen, deutete darauf hin, dass ^{His}Dianthin nach Aufnahme in die Zelle in den späten Endosomen bzw. Lysosomen akkumuliert (Gilbert-Oriol *et al.*, 2015; Weng, Thakur, von Mallinckrodt, *et al.*, 2012). Der Endozytosemechanismus, der der Aufnahme von ^{His}Dianthin bzw. Dianthin-30 zu Grunde liegt, wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Bekannt ist nur, dass ^{His}Dianthin-Antikörper-Konjugate bedingt durch den Antikörper-Anteil über die Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen werden (Fuchs, 2019). Für ^{His}Saporin-3, das zu 60,6 % identisch mit ^{His}Dianthin ist, und für Saporin-S6, das zu 71,5 % identisch mit ^{His}Dianthin ist, wurde eine Clathrin-vermittelte Endozytose als Mechanismus vorgeschlagen (Cavallaro *et al.*, 1995; Weng *et al.*, 2008). Die Clathrin-vermittelte Endozytose ist der am häufigsten untergangene und auch der am besten charakterisierte Endozytoseweg (McMahon & Boucrot, 2011; Rennick *et al.*, 2021). Da ^{His}Saporin-3 bzw. Saporin-S6 und ^{His}Dianthin ähnliche Sequenzen aufweisen, ist zu vermuten, dass die Aufnahme von ^{His}Dianthin ebenfalls über die Clathrin-vermittelte Endozytose erfolgt. Zur Bestätigung des Endozytoseweges könnten Experimente

mit Hemmstoffen der Clathrin-vermittelten oder der Caveolae-vermittelten Endozytose, wie z. B. Chlorpromazin, Imipramin, Okadasäure und Filipin III durchgeführt werden (D. Bachran *et al.*, 2011; Weng *et al.*, 2008).

Wie in 4.4.1 aufgeführt, konnten bei der Markierungsreaktion mit CF®568 ähnlich markierte Produkte erzielt werden: Die Fluoreszenzintensitäten und der Markierungsgrad unterschieden sich nicht bzw. nur geringfügig und die Protein-CF568-Konjugate wiesen kein unkonjugiertes Protein auf. Hinzukommt, dass sich in der näheren Umgebung von Arg24 kein Lysin-Rest befindet, der durch Bindung von CF®568 die Zugänglichkeit von Arginin sterisch hindern würde. Wenn zusätzlich davon ausgegangen wird, dass beide Proteine an den gleichen Lysin-Resten mit CF®568 markiert sind, waren alle Kriterien erfüllt, um die Endozytose von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 vergleichen zu können. Dennoch ist zu beachten, dass ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 stark von ihrer nativen Beschaffenheit abweichen, was sich in ihrer stark reduzierten bzw. nicht mehr vorhandenen Zytotoxizität und *N*-Glykosidaseaktivität widerspiegelt (3.3.3). Die Abweichung von der nativen Beschaffenheit kann auch eine Auswirkung auf deren Endozytose haben. Da beide Proteine im Vergleich betrachtet werden, dürfte dies jedoch keinen Einfluss auf die nachfolgende Auswertung haben.

Der Unterschied in der Endozytose von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568, der fluoreszenzmikroskopisch nach 24 h Inkubation gemessen werden konnte, wurde mittels Durchflusszytometrie bestätigt (Abbildung 37 & Abbildung 38). Innerhalb der ersten zwei Stunden wurden ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 im gleichen Ausmaß endozytiert. Während nach 6 h ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568 zunächst mehr endozytiert wurde als ^{His}Dianthin-CF568, wurde es nach 16 h signifikant weniger als ^{His}Dianthin-CF568 endozytiert. Unter den oben gemachten Annahmen der Vergleichbarkeit von ^{His}Dianthin-CF568 und ^{His}Dianthin Arg24Ala-CF568, lässt sich aus den Ergebnissen schlussfolgern, dass Arginin an Position 24 einen funktionellen Beitrag bei der Endozytose von ^{His}Dianthin zu leisten scheint.

Da dies die erste Arbeit ist, die sich mit einzelnen Aminosäuren des ^{His}Dianthins bzw. generell der Typ I RIPs und ihrer Funktion bei der Endozytose beschäftigt hat, gibt es in der Literatur keine Angaben über weitere Aminosäuren, die in die Endozytose von Typ I RIPs involviert sein könnten.

4.5 Validierung der Funktion von Arg24 an anderen Typ I RIPs

Wie die Auswertung unter 4.4.2 aufzeigen konnte, ist die verminderte synergistische Zytotoxizität durch Substitution des Arginins an Position 24 im ^{His}Dianthin auf eine Abnahme der Endozytose zurückzuführen. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass der aufgetretene Effekt von der Zelllinie anhängig war (Abbildung 30). Um zu untersuchen, ob Arg24 ausschließlich im ^{His}Dianthin eine Funktion bei der Endozytose ausübt, wurden zwei weitere Typ I RIPs für die Charakterisierung von

Arg24 ausgewählt: Agrostin, dessen Sequenz nur zu 26 % mit Dianthin-30 identisch ist, und Sapovaccarin-S1, das 79 % Sequenzidentität mit Dianthin-30 aufweist (Legname *et al.*, 1991; Weise *et al.*, 2020). Dianthin-30 und Sapovaccarin-S1 unterscheiden sich weder in der Anzahl der Aminosäuren noch in der Position des zu untersuchenden Arginins. Die Arginin-Position 23 im Agrostin, das aus zwölf Aminosäuren weniger als Dianthin-30 aufgebaut ist, ließ sich erst nach Ausrichten der Sequenzen bestimmen (Abbildung 39).

Die Proteinexpression von ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala und ^{His}Agrostin Arg23Ala erwies sich als herausfordernd. Beide Proteine ließen sich sehr schwer aus dem Pellet extrahieren. Nach Zentrifugation des Bakterienlysats verblieb ein Großteil des Proteins in Einschlusskörperchen im Zellpellet (Abbildung 41). Wie unter 4.2.5 erwähnt, ist die Proteinexpression in Form von Einschlusskörperchen für rekombinante Typ I RIPs kein unbekanntes Phänomen. Für ^{His}Saporin-S6 wurde ebenfalls beschrieben, dass es sich unter verschiedensten Expressionsbedingungen nur in Einschlusskörperchen exprimieren lässt (Pittaluga *et al.*, 2005). Die Autoren umgingen das Problem, indem sie die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen durchführten. Eine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen besteht aus harschen Reaktionsbedingungen und vielen Schritten, in denen es zu Verlusten des Zielproteins kommen kann, so dass sehr geringe Ausbeuten von 5–20 % erzielt werden (Wingfield, 2015). Nach der Denaturierung müssen die Proteine renaturiert werden. Dies kann abhängig von der Proteingröße nicht immer erfolgreich sein (Wingfield, 2015). Daher wurde auf eine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen verzichtet. Hinzu kam, dass immerhin ein kleiner Teil der Zielproteine in Lösung gegangen ist und Proteinfractionen mit leichten bis mittleren Verunreinigungen erzielt werden konnten. Für die weiteren Betrachtungen muss beachtet werden, dass der Gehalt von ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala 90,5 % (9,5 % *E. coli* Verunreinigungen) und von ^{His}Agrostin Arg23Ala 72,3 % (28,3 % *E. coli* Verunreinigungen) betrug (bestimmt durch Auswertung der SDS-PAGE der Abbildung 41 mit der Software GelAnalyzer) und die bestimmten Proteinkonzentrationen somit die gesamten Proteine (inkl. Verunreinigungen) repräsentieren.

Durch Einführen der Arg23Ala-Substitution im ^{His}Agrostin konnte kein signifikanter Unterschied in der *N*-Glykosidaseaktivität zwischen mutierter und nativer Form festgestellt werden (Abbildung 44A). Auch für das Einführen der Arg24Ala-Substitution im ^{His}Sapovaccarin-S1 ließ sich kein signifikanter Einfluss auf die *N*-Glykosidaseaktivität feststellen (Abbildung 44B). Durch den Anteil der Verunreinigungen sind die Aktivitäten der Abbildung 44 geringer, als sie ohne Verunreinigungen wären. Wie unter 4.2.6 erläutert, wurde eine *N*-Glykosidaseaktivität seitens der *E. coli* Verunreinigungen ausgeschlossen. Daher konnten die Aktivitätsdaten unter Einberechnung des Anteils der Verunreinigungen korrigiert werden. In Abbildung 49A sind die bereinigten *N*-Glykosidaseaktivitäten dargestellt. Die Korrektur hat keinen Einfluss auf die unter 3.4.4 präsentierten Ergebnisse. Die Arg23Ala-Substitution führte weiterhin zu einer leichten, nicht signifikanten Zunahme

der Aktivität von ^{His}Agrostin. Und auch bei ^{His}Sapovaccarin-S1 war kein signifikanter Aktivitätsunterschied zwischen nativer und mutierter Variante festzustellen.

Neben dem Vergleich der *N*-Glykosidaseaktivitäten ist in Abbildung 49 auch ein Vergleich der synergistischen Zytotoxizitäten der untersuchten Typ I RIPs und ihrer Mutanten dargestellt. Die Betrachtung der *N*-Glykosidaseaktivitäten gemeinsam mit den Zytotoxizitätsdaten macht deutlich, dass die *N*-Glykosidaseaktivität am A30-Substrat nicht repräsentativ für das Ausmaß der Zytotoxizität ist (Abbildung 49). Wie unter 1.1 beschrieben, sind RIPs Enzyme mit vielfachen Enzymaktivitäten. Alle Typ I und Typ II RIPs besitzen ihre spezifische rRNA *N*-Glykosidaseaktivität, die eine Hemmung der Proteinsynthese und den Zelltod zur Folge hat (Endo & Tsurugi, 1987). Die *N*-Glykosidaseaktivität ist erweiterbar auf eine Vielzahl anderer Substrate, wie z. B. poly(A), DNA und mRNA, auch als Polynukleotid:Adenosin Glykosidaseaktivität bezeichnet (Barbieri *et al.*, 1997). RIPs variieren dabei stark bezüglich ihrer Polynukleotid:Adenosin Glykosidaseaktivität und ihrer Substratspezifität (Peumans *et al.*, 2001). Der *adenine-releasing assay*, der in dieser Arbeit zum Quantifizieren der *N*-Glykosidaseaktivität eingesetzt wurde, macht sich die Polynukleotid:Adenosin Glykosidaseaktivität am poly(A)-Substrat zu Nutze (Weng, 2018). Vor allem ^{His}Agrostin schien keine hohe Substratspezifität gegenüber dem A30-Substrat zu haben. Während die *N*-Glykosidasaktivität von ^{His}Agrostin ungefähr ein sechstel der Aktivität von ^{His}Dianthin ausmachte (signifikanter Unterschied), war dieser Unterschied zwischen ^{His}Agrostin und ^{His}Dianthin in den Zytotoxizitätsdaten nicht mehr vorhanden (Abbildung 49). ^{His}Sapovaccarin-S1 dahingegen schien eine sehr hohe Affinität gegenüber dem A30-Substrat zu haben. Die *N*-Glykosidasaktivität war ungefähr ein fünftel größer als die von ^{His}Dianthin und ungefähr 7,3-mal größer als die von ^{His}Agrostin. Die synergistische Zytotoxizität war trotz höherer *N*-Glykosidasaktivität bei einer Konzentration von 0,1 nM signifikant geringer als die von ^{His}Dianthin (gekennzeichnet durch eine größere Zellviabilität in Abbildung 49B). Im Vergleich zu dem ^{His}Agrostin war die synergistische Zytotoxizität von ^{His}Sapovaccarin-S1 sowohl bei 0,1 nM als auch bei 1 nM signifikant geringer.

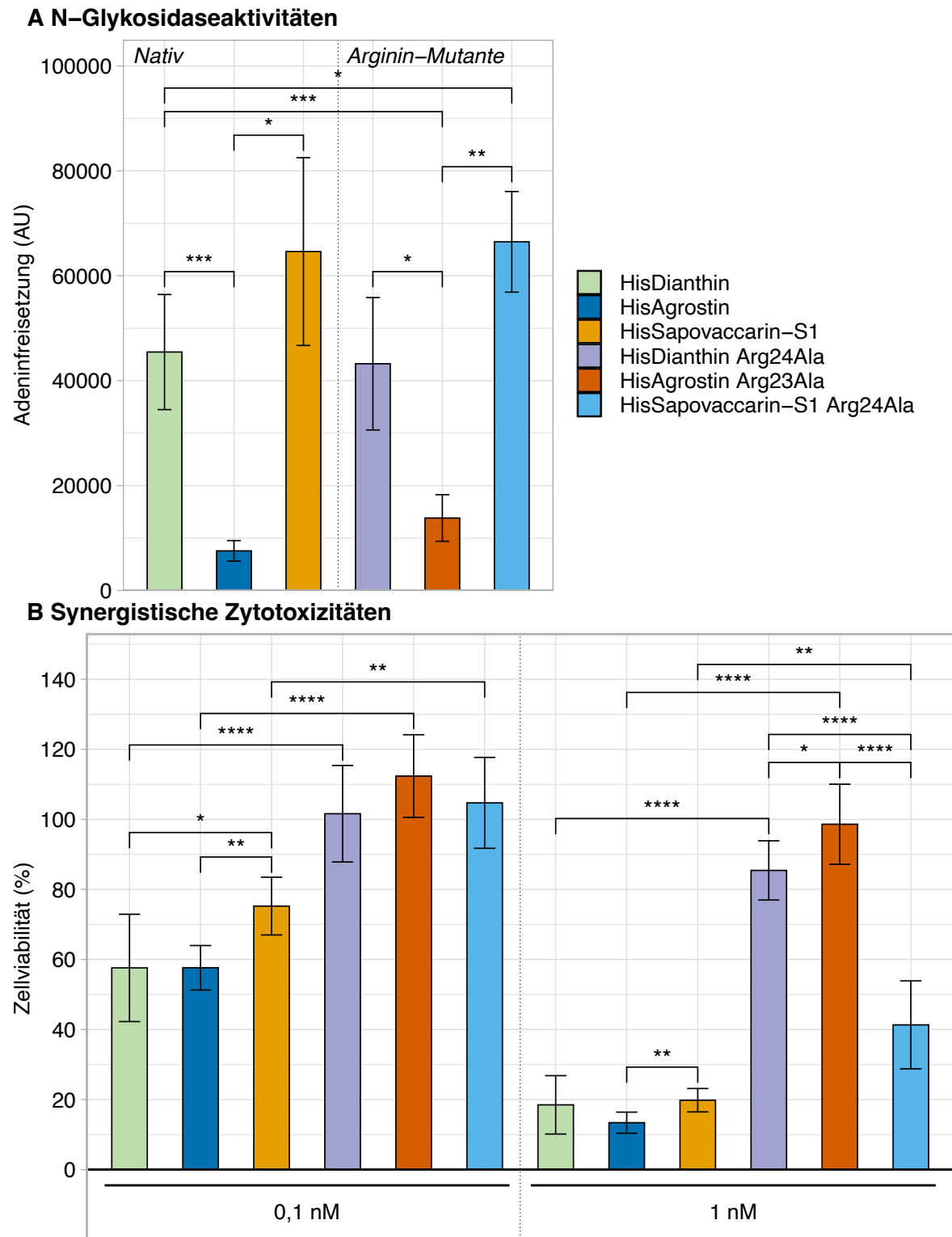


Abbildung 49. Vergleich der korrigierten *N*-Glykosidaseaktivitäten und der synergistischen Zytotoxizitäten der untersuchten RIPs und ihrer Arginin-Mutante. (A) Der Vergleich der *N*-Glykosidaseaktivitäten repräsentiert die Daten der Abbildung 28 und der Abbildung 44. Die dargestellten Daten entsprechen den Aktivitäten ohne Proteinverunreinigungen. Die Aktivität der Proben mit Verunreinigungen wurden um den Anteil der Verunreinigungen korrigiert. (B) Der Vergleich der synergistischen Zytotoxizitäten repräsentiert die Daten der Abbildung 30, Abbildung 45 und Abbildung 46, welche in Neuro-2A-Zellen unter Zugabe von 1 µg/ml SO1861 generiert wurden. Dargestellt (A + B) sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen, n = 3 (Signifikanz: *, p ≤ 0,05; **, p ≤ 0,01; ***, p ≤ 0,001; ****, p ≤ 0,0001; t-Test).

Ziel des Einführens der Arginin-Mutation im ^{His}Agrostin und ^{His}Sapovaccarin-S1 war die Untersuchung der Übertragbarkeit der Funktion des Arginin-Restes bei der Endozytose von ^{His}Dianthin, ^{His}Agrostin und ^{His}Sapovaccarin-S1. Die in Abbildung 49 dargestellten Zytotoxizitätsdaten machen deutlich, dass sowohl ^{His}Agrostin Arg23Ala als auch ^{His}Sapovaccarin-S1 Arg24Ala signifikant weniger zytotoxisch als ihre native Form sind. Auch wenn aufgrund der Verunreinigungen die hier präsentierten Daten mit Vorsicht zu betrachten sind, lässt sich dennoch ein Trend erkennen. Das Arginin an Position 24 des ^{His}Sapovaccarin-S1 und auch das Arginin an Position 23 des ^{His}Agrostins, wessen Aminosäuresequenz sehr stark von den anderen beiden Typ I RIPs abweicht (26 % Sequenzidentität mit ^{His}Dianthin), scheint die gleiche Funktion beim Prozess der Endozytose einzunehmen wie im ^{His}Dianthin.

Am Beispiel von drei Typ I RIPs konnte gezeigt werden, dass die untersuchte Arginin-Mutation eine verminderte synergistische Zytotoxizität zur Folge hatte. Da Arg24 (exakte Position variiert je nach RIP) eine hoch konservierte Aminosäure in den Sequenzen von Typ I RIPs ist, ließe sich die Funktion von Arg24 vermutlich auch auf weitere Typ I RIPs übertragen (Di Maro *et al.*, 2014).

5 Zusammenfassung

Die synergistische Zytotoxizität zwischen Ribosomen-inaktivierenden Proteinen und Triterpensaponinen beruht auf dem Triterpensaponin-vermittelten *endosomal escape* von Typ I RIPs. Typ I RIPs wirken zytotoxisch, indem sie einen spezifischen Adeninrest von der rRNA abspalten. Die Abspaltung hat das Erliegen der Proteinsynthese und den Zelltod zur Folge. Damit Typ I RIPs ihre Toxizität ausüben können, müssen sie aus den Endo- und Lysosomen freigesetzt werden, andernfalls werden sie proteolytisch abgebaut. Spezifische Triterpensaponine bewirken dabei, dass Typ I RIPs dem endolysosomalen Abbau entkommen, indem sie in das Zytosol freigesetzt werden. Bisherige Untersuchungen deuteten darauf hin, dass Triterpensaponine pH-abhängig an Typ I RIPs binden und dadurch die endolysosomale Freisetzung induzieren. Die essenzielle Glucuronsäure an C-3 der Triterpensaponine, negativ geladen in Endo- und Lysosomen, könnte dabei mit basischen Aminosäuren der Typ I RIPs, positiv geladen in Endo- und Lysosomen, interagieren.

Voraussetzung für die weiteren Untersuchungen dieser Arbeit war das Erbringen des Nachweises der Bindung von SO1861 und ^{His}Dianthin, der bisher nur am Beispiel von ^{His}Saporin-3 erbracht wurde. Massenspektrometrische Aufnahmen unter nativen Bedingungen zeigten bei pH 6,24 für SO1861 und ^{His}Dianthin eine Assoziation im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1.

Der Einfluss basischer Aminosäuren auf die bestätigte Interaktion zwischen SO1861 und ^{His}Dianthin wurde an 19 ^{His}Dianthin-Mutanten, bei denen Lysin- und Arginin-Reste durch Alanin ersetzt wurden, anhand ihrer synergistischen Zytotoxizität untersucht. Für die ausgewählten Lysin-Reste konnte keine Beteiligung an der synergistischen Zytotoxizität nachgewiesen werden.

Einzig die synergistische Zytotoxizität von ^{His}Dianthin Arg24Ala war im Vergleich zu dem nativen ^{His}Dianthin reduziert. Die aufgetretene Reduktion der Zytotoxizität war nicht zelllinienabhängig. Allerdings war sie auch ohne Anwesenheit von SO1861 reduziert, bei gleichzeitig unbeeinträchtigter *N*-Glykosidaseaktivität. Die Markierung von ^{His}Dianthin Arg24Ala und ^{His}Dianthin mit Fluoreszenzfarbstoff erlaubte via Durchflusszytometrie, die verminderte Zytotoxizität auf eine verringerte Endozytose zurückzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die untersuchten Arginin- und Lysin-Reste der Typ I RIPs nicht hauptverantwortlich für die Interaktion mit SO1861 zu sein scheinen. Um aufzuklären, auf welcher Interaktion die Bindung zwischen Typ I RIPs und Triterpensaponinen, die vermutlich dem *endosomal escape* zu Grunde liegt, beruht, müssen weitere Experimente durchgeführt werden.

Um die Funktion von Arg24 an weiteren Typ I RIPs validieren zu können, wurden aus den Samen der *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm. die RIP-Isoformen Sapovaccarin-S1 und -S2 isoliert und sequenziert. Das Isoformengemisch wies eine für Typ I RIPs typische Proteinsequenz auf. Die *N*-Glykosidaseaktivität

und die Thermostabilität waren mit denen von isolierten Typ I RIPs vergleichbar. Die Untersuchung der Funktion der Aminosäure Arg24 an den Typ I RIPs ^{His}Sapovaccarin-S1 und ^{His}Agrostin bestätigte, dass auch hier eine Reduktion der Zytotoxizität zu verzeichnen war. Die durchgeführten Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Funktion von Arginin an Position 24, die am ^{His}Dianthin aufgezeigt werden konnte, sich auch auf die Endozytose von ^{His}Agrostin und ^{His}Sapovaccarin-S1, wenn nicht sogar auf Typ I RIPs im Allgemeinen übertragen lässt.

6 Summary

The synergistic cytotoxicity between ribosome-inactivating proteins and triterpene saponins is due to the endosomal escape of type I RIPs induced by triterpene saponins. Type I RIPs are toxins that cleave off a specific adenine residue from rRNA. As a result, protein synthesis is inhibited, which is followed by cell death. To avoid degrading and to exert their cytotoxicity, type I RIPs must be released from endosomes/lysosomes. Specific triterpene saponins act as endosomal escape enhancers by releasing the toxin into the cytosol. Previous studies have suggested that endolysosomal release is triggered by pH-dependent binding of triterpene saponins to type I RIPs. The negatively charged essential glucuronic acid at position C-3 of triterpene saponins could interact in endo-/lysosomes with positively charged basic amino acid residues of type I RIPs.

A prerequisite for further investigations of this research was the demonstration of the binding of SO1861 and ^{His}dianthin, which has so far only been demonstrated using the type I RIP ^{His}saporin-3. Mass spectrometry under native conditions revealed a binding of SO1861 and ^{His}dianthin at pH 6.24 with a stoichiometric ratio of 1:1.

The effect of basic amino acid residues on the interaction confirmed above between SO1861 and ^{His}dianthin were examined for the synergistic cytotoxicity of 19 ^{His}dianthin mutants. Lysine and arginine residues were substituted by alanine. The selected lysine residues did not contribute to synergistic cytotoxicity. Only ^{His}dianthin Arg24Ala reduced the synergistic cytotoxicity when compared to native ^{His}dianthin. The reduction in cytotoxicity was not cell line specific. However, cytotoxicity was reduced even without the presence of SO1861, whereas *N*-glycosidase activity was not affected. ^{His}dianthin Arg24Ala and ^{His}dianthin labelling allowed flow cytometry to attribute the reduction in cytotoxicity to decreased endocytosis. In this research, it has been shown that the studied arginine and lysine residues of type I RIPs do not seem to be primarily responsible for the interaction with SO1861. The interaction between type I RIPs and triterpene saponins, which presumably underlies the endosomal escape, could not be clarified further.

To validate the effect of Arg24 on other type I RIPs, the RIP isoforms sapovaccarin-S1 and -S2 were isolated from the seeds of *Gypsophila vaccaria* (L.) Sm. and their protein sequence determined. The isoform mixture exhibited a typical type I RIP protein sequence, *N*-glycosidase activity and thermal stability comparable to other isolated type I RIPs. Examination of the effect of Arg24Ala in the type I RIPs ^{His}sapovaccarin-S1 and ^{His}agrostin confirmed that the same mutation caused reduced cytotoxicity. This research suggests that the function of arginine at position 24, first shown in the example of ^{His}dianthin, can be transferred to the endocytosis of ^{His}sapovaccarin-S1 and ^{His}agrostin, and possibly to the endocytosis of type I RIPs in general.

7 Literaturverzeichnis

- Andersen, K. R., Leksa, N. C., & Schwartz, T. U. (2013), Optimized E. coli expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification, *Proteins* 81: 1857-1861.
- Araujo, A. P., Oliva, G., Henrique-Silva, F., Garratt, R. C., Caceres, O., & Beltramini, L. M. (2000), Influence of the histidine tail on the structure and activity of recombinant chlorocatechol 1,2-dioxygenase, *Biochem Biophys Res Commun* 272: 480-484.
- Armstrong, J. A. S., J.R. (2015), Agarose gel electrophoresis, *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 10: 1.1.1-9.2.23.
- Bachran, C., Sutherland, M., Heisler, I., Hebestreit, P., Melzig, M. F., & Fuchs, H. (2006), The saponin-mediated enhanced uptake of targeted saporin-based drugs is strongly dependent on the saponin structure, *Exp Biol Med (Maywood)* 231: 412-420.
- Bachran, D., Schneider, S., Bachran, C., Weng, A., Melzig, M. F., & Fuchs, H. (2011), The endocytic uptake pathways of targeted toxins are influenced by synergistically acting Gypsophila saponins, *Mol Pharm* 8: 2262-2272.
- Bagga, S., Seth, D., & Batra, J. K. (2003), The cytotoxic activity of ribosome-inactivating protein saporin-6 is attributed to its rRNA N-glycosidase and internucleosomal DNA fragmentation activities, *J Biol Chem* 278: 4813-4820.
- Bai, Y., Monzingo, A. F., & Robertus, J. D. (2009), The X-ray structure of ricin A chain with a novel inhibitor, *Arch Biochem Biophys* 483: 23-28.
- Baluna, R., & Vitetta, E. S. (1997), Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy, *Immunopharmacology* 37: 117-132.
- Barbieri, L., Battelli, M. G., & Stirpe, F. (1993), Ribosome-inactivating proteins from plants, *Biochim Biophys Acta* 1154: 237-282.
- Barbieri, L., Gorini, P., Valbonesi, P., Castiglioni, P., & Stirpe, F. (1994), Unexpected activity of saporins, *Nature* 372: 624.
- Barbieri, L., Valbonesi, P., Bonora, E., Gorini, P., Bolognesi, A., & Stirpe, F. (1997), Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A), *Nucleic Acids Res* 25: 518-522.
- Baumann, E., Stoya, G., Volkner, A., Richter, W., Lemke, C., & Linss, W. (2000), Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure, *Acta Histochem* 102: 21-35.
- Bhargava, C., Durkop, H., Zhao, X., Weng, A., Melzig, M. F., & Fuchs, H. (2017), Targeted dianthin is a powerful toxin to treat pancreatic carcinoma when applied in combination with the glycosylated triterpene SO1861, *Mol Oncol* 11: 1527-1543.
- Bischof, J. C., & He, X. (2005), Thermal stability of proteins, *Ann N Y Acad Sci* 1066: 12-33.

- Bolanos-Garcia, V. M., & Davies, O. R. (2006), Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography, *Biochim Biophys Acta* 1760: 1304-1313.
- Bolognesi, A., Bortolotti, M., Maiello, S., Battelli, M. G., & Polito, L. (2016), Ribosome-Inactivating Proteins from Plants: A Historical Overview, *Molecules* 21:
- Bolognesi, A., Olivieri, F., Battelli, M. G., Barbieri, L., Falasca, A. I., Parente, A., . . . Stirpe, F. (1995), Ribosome-inactivating proteins (RNA N-glycosidases) from the seeds of *Saponaria ocyroides* and *Vaccaria pyramidata*, *Eur J Biochem* 228: 935-940.
- Bolognesi, A., Polito, L., Scicchitano, V., Orrico, C., Pasquinelli, G., Musiani, S., . . . Battelli, M. G. (2012), Endocytosis and intracellular localisation of type 1 ribosome-inactivating protein saporin-s6, *J Biol Regul Homeost Agents* 26: 97-109.
- Böttger, S., Westhof, E., Siems, K., & Melzig, M. F. (2013), Structure-activity relationships of saponins enhancing the cytotoxicity of ribosome-inactivating proteins type I (RIP-I), *Toxicon* 73: 144-150.
- Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Cavallaro, U., Nykjaer, A., Nielsen, M., & Soria, M. R. (1995), Alpha 2-macroglobulin receptor mediates binding and cytotoxicity of plant ribosome-inactivating proteins, *Eur J Biochem* 232: 165-171.
- Clackson, T., & Wells, J. A. (1995), A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface, *Science* 267: 383-386.
- Clochard, J., Jerz, G., Schmieder, P., Mitdank, H., Troger, M., Sama, S., & Weng, A. (2020), A new acetylated triterpene saponin from *Agrostemma githago* L. modulates gene delivery efficiently and shows a high cellular tolerance, *Int J Pharm* 589: 119822.
- Cunningham, B. C., & Wells, J. A. (1989), High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis, *Science* 244: 1081-1085.
- Di Maro, A., Citores, L., Russo, R., Iglesias, R., & Ferreras, J. M. (2014), Sequence comparison and phylogenetic analysis by the Maximum Likelihood method of ribosome-inactivating proteins from angiosperms, *Plant Mol Biol* 85: 575-588.
- Edelmann, M. R., & Hauri, S. (2021), Functional in vitro assessment of modified antibodies: Impact of label on protein properties, *PLoS One* 16: e0257342.
- Efthimiadou, A. K. A. B., D.; Katsenios, N. (2012), Cultivation of cow cockle (*Vaccaria hispanica* (Mill.) Rauschert): An industrial–medicinal weed, *Industrial Crops and Products* 40: 307–311.
- Endo, Y., & Tsurugi, K. (1987), RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes, *J Biol Chem* 262: 8128-8130.
- Ensinger, F. (2023), Foto der *Saponaria vaccaria* L., unter: <https://pflanzenbestimmung.info/vaccaria-hispanica/>, (abgerufen am 10.07.2023).

- Favel, A., Steinmetz, M. D., Regli, P., Vidal-Ollivier, E., Elias, R., & Balansard, G. (1994), In vitro antifungal activity of triterpenoid saponins, *Planta Med* 60: 50-53.
- Fermani, S., Falini, G., Ripamonti, A., Polito, L., Stirpe, F., & Bolognesi, A. (2005), The 1.4 anstroms structure of dianthin 30 indicates a role of surface potential at the active site of type 1 ribosome inactivating proteins, *J Struct Biol* 149: 204-212.
- Ferreras, J. M., Barbieri, L., Girbes, T., Battelli, M. G., Rojo, M. A., Arias, F. J., . . . Stirpe, F. (1993), Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis* L. (Caryophyllaceae), *Biochim Biophys Acta* 1216: 31-42.
- Flavell, D. J., & Flavell, S. U. (2022), Plant-Derived Type I Ribosome Inactivating Protein-Based Targeted Toxins: A Review of the Clinical Experience, *Toxins (Basel)* 14:
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P., & Becker, K. (2002), The biological action of saponins in animal systems: a review, *Br J Nutr* 88: 587-605.
- Fuchs, H. (2019), Dianthin and Its Potential in Targeted Tumor Therapies, *Toxins (Basel)* 11:
- Fuchs, H., Niesler, N., Trautner, A., Sama, S., Jerz, G., Panjideh, H., & Weng, A. (2017), Glycosylated Triterpenoids as Endosomal Escape Enhancers in Targeted Tumor Therapies, *Biomedicines* 5:
- Fuchs, H., Weng, A., & Gilabert-Oriol, R. (2016), Augmenting the Efficacy of Immunotoxins and Other Targeted Protein Toxins by Endosomal Escape Enhancers, *Toxins (Basel)* 8: 200.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003), ExpPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res* 31: 3784-3788.
- Geoghegan, K. F., Dixon, H. B., Rosner, P. J., Hoth, L. R., Lanzetti, A. J., Borzilleri, K. A., . . . Stroth, J. G. (1999), Spontaneous alpha-N-6-phosphogluconoylation of a "His tag" in *Escherichia coli*: the cause of extra mass of 258 or 178 Da in fusion proteins, *Anal Biochem* 267: 169-184.
- Ghosh, P., & Batra, J. K. (2006), The differential catalytic activity of ribosome-inactivating proteins saporin 5 and 6 is due to a single substitution at position 162, *Biochem J* 400: 99-104.
- Gilabert-Oriol, R., Furness, S. G. B., Stringer, B. W., Weng, A., Fuchs, H., Day, B. W., . . . Wookey, P. J. (2017), Dianthin-30 or gelonin versus monomethyl auristatin E, each configured with an anti-calcitonin receptor antibody, are differentially potent in vitro in high-grade glioma cell lines derived from glioblastoma, *Cancer Immunol Immunother* 66: 1217-1228.
- Gilabert-Oriol, R., Thakur, M., Haussmann, K., Niesler, N., Bhargava, C., Gorick, C., . . . Weng, A. (2016), Saponins from *Saponaria officinalis* L. Augment the Efficacy of a Rituximab-Immunotoxin, *Planta Med* 82: 1525-1531.
- Gilabert-Oriol, R., Thakur, M., von Mallinckrodt, B., Bhargava, C., Wiesner, B., Eichhorst, J., . . . Weng, A. (2014), Reporter assay for endo/lysosomal escape of toxin-based therapeutics, *Toxins (Basel)* 6: 1644-1666.

- Gilabert-Oriol, R., Thakur, M., von Mallinckrodt, B., Hug, T., Wiesner, B., Eichhorst, J., . . . Weng, A. (2013), Modified trastuzumab and cetuximab mediate efficient toxin delivery while retaining antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in target cells, *Mol Pharm* 10: 4347-4357.
- Gilabert-Oriol, R., Weng, A., Trautner, A., Weise, C., Schmid, D., Bhargava, C., . . . Thakur, M. (2015), Combinatorial approach to increase efficacy of Cetuximab, Panitumumab and Trastuzumab by dianthin conjugation and co-application of SO1861, *Biochem Pharmacol* 97: 247-255.
- Girbes, T., Ferreras, J. M., Arias, F. J., & Stirpe, F. (2004), Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria, *Mini Rev Med Chem* 4: 461-476.
- Goldmacher, V. S., Tinnel, N. L., & Nelson, B. C. (1986), Evidence that pinocytosis in lymphoid cells has a low capacity, *J Cell Biol* 102: 1312-1319.
- Hale, M. L. (2001), Microtiter-based assay for evaluating the biological activity of ribosome-inactivating proteins, *Pharmacol Toxicol* 88: 255-260.
- Halling, K. C., Halling, A. C., Murray, E. E., Ladin, B. F., Houston, L. L., & Weaver, R. F. (1985), Genomic cloning and characterization of a ricin gene from *Ricinus communis*, *Nucleic Acids Res* 13: 8019-8033.
- Hartley, M. R., & Lord, J. M. (2004), Genetics of ribosome-inactivating proteins, *Mini Rev Med Chem* 4: 487-492.
- Hebestreit, P., & Melzig, M. F. (2003), Cytotoxic activity of the seeds from *Agrostemma githago* var. *githago*, *Planta Med* 69: 921-925.
- Hebestreit, P., Weng, A., Bachran, C., Fuchs, H., & Melzig, M. F. (2006), Enhancement of cytotoxicity of lectins by Saponinum album, *Toxicon* 47: 330-335.
- Helmerhorst, E., Chandler, D. J., Nussio, M., & Mamotte, C. D. (2012), Real-time and Label-free Biosensing of Molecular Interactions by Surface Plasmon Resonance: A Laboratory Medicine Perspective, *Clin Biochem Rev* 33: 161-173.
- Hirel, P. H., Schmitter, M. J., Dessen, P., Fayat, G., & Blanquet, S. (1989), Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8247-8251.
- Hoie, M. H., Kiehl, E. N., Petersen, B., Nielsen, M., Winther, O., Nielsen, H., . . . Marcatili, P. (2022), NetSurfP-3.0: accurate and fast prediction of protein structural features by protein language models and deep learning, *Nucleic Acids Res* 50: W510-W515.
- Holmes, S. E., Bachran, C., Fuchs, H., Weng, A., Melzig, M. F., Flavell, S. U., & Flavell, D. J. (2015), Triterpenoid saponin augmentation of saporin-based immunotoxin cytotoxicity for human leukaemia and lymphoma cells is partially immunospecific and target molecule dependent, *Immunopharmacol Immunotoxicol* 37: 42-55.
- Jansohn, M., & Rothhämel, S. (2012), *Gentechnische Methoden*, Spektrum Akademischer Verlag.

- Kebarle, P., & Verkerk, U. H. (2009), Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now, *Mass Spectrom Rev* 28: 898-917.
- Kokorin, A., Weise, C., Sama, S., & Weng, A. (2019), A new type 1 ribosome-inactivating protein from the seeds of *Gypsophila elegans* M.Bieb, *Phytochemistry* 157: 121-127.
- Kurinov, I. V., Rajamohan, F., & Uckun, F. M. (2004), High resolution X-ray structure and potent anti-HIV activity of recombinant dianthin antiviral protein, *Arzneimittelforschung* 54: 692-702.
- Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227: 680-685.
- Laimer, J., Hiebl-Flach, J., Lengauer, D., & Lackner, P. (2016), MAESTROweb: a web server for structure-based protein stability prediction, *Bioinformatics* 32: 1414-1416.
- Laimer, J., Hofer, H., Fritz, M., Wegenkittl, S., & Lackner, P. (2015), MAESTRO--multi agent stability prediction upon point mutations, *BMC Bioinformatics* 16: 116.
- Legname, G., Bellosta, P., Gromo, G., Modena, D., Keen, J. N., Roberts, L. M., & Lord, J. M. (1991), Nucleotide sequence of cDNA coding for dianthin 30, a ribosome inactivating protein from *Dianthus caryophyllus*, *Biochim Biophys Acta* 1090: 119-122.
- Legname, G., Fossati, G., Monzini, N., Gromo, G., Marcucci, F., Mascagni, P., & Modena, D. (1995), Heterologous expression, purification, activity and conformational studies of different forms of dianthin 30, *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids* 1: 61-68.
- Majorek, K. A., Kuhn, M. L., Chruszcz, M., Anderson, W. F., & Minor, W. (2014), Double trouble- Buffer selection and His-tag presence may be responsible for nonreproducibility of biomedical experiments, *Protein Sci* 23: 1359-1368.
- Maras, B., Ippoliti, R., De Luca, E., Lendaro, E., Bellelli, A., Barra, D., . . . Brunori, M. (1990), The amino acid sequence of a ribosome-inactivating protein from *Saponaria officinalis* seeds, *Biochem Int* 21: 831-838.
- McMahon, H. T., & Boucrot, E. (2011), Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis, *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 517-533.
- Melzig, M. F., Bader, G., & Loose, R. (2001), Investigations of the mechanism of membrane activity of selected triterpenoid saponins, *Planta Med* 67: 43-48.
- Melzig, M. F., Hebestreit, P., Gaidi, G., & Lacaille-Dubois, M. A. (2005), Structure-activity-relationship of saponins to enhance toxic effects of agrostin, *Planta Med* 71: 1088-1090.
- Mock, J. W., Ng, T. B., Wong, R. N., Yao, Q. Z., Yeung, H. W., & Fong, W. P. (1996), Demonstration of ribonuclease activity in the plant ribosome-inactivating proteins alpha- and beta-momorcharins, *Life Sci* 59: 1853-1859.
- Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* 65: 55-63.

- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., & Erhardt, W. (1988), Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250, *Electrophoresis* 9: 255-262.
- Nicolas, E., Beggs, J. M., Haltiwanger, B. M., & Taraschi, T. F. (1997), Direct evidence for the deoxyribonuclease activity of the plant ribosome inactivating protein gelonin, *FEBS Lett* 406: 162-164.
- Nielsen, K., & Boston, R. S. (2001), RIBOSOME-INACTIVATING PROTEINS: A Plant Perspective, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 785-816.
- Olsnes, S., & Pihl, A. (1973), Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis, *Biochemistry* 12: 3121-3126.
- Olsnes, S., Sandvig, K., Petersen, O. W., & van Deurs, B. (1989), Immunotoxins--entry into cells and mechanisms of action, *Immunol Today* 10: 291-295.
- Pascal, J. M., Day, P. J., Monzingo, A. F., Ernst, S. R., Robertus, J. D., Iglesias, R., . . . Girbes, T. (2001), 2.8-Å crystal structure of a nontoxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin 1, *Proteins* 43: 319-326.
- Peumans, W. J., Hao, Q., & Van Damme, E. J. (2001), Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases?, *FASEB J* 15: 1493-1506.
- Pittaluga, E., Poma, A., Tucci, A., & Spano, L. (2005), Expression and characterisation in *E. coli* of mutant forms of saporin, *J Biotechnol* 117: 263-266.
- Polito, L., Bortolotti, M., Mercatelli, D., Battelli, M. G., & Bolognesi, A. (2013), Saporin-S6: a useful tool in cancer therapy, *Toxins (Basel)* 5: 1698-1722.
- Rapak, A., Falnes, P. O., & Olsnes, S. (1997), Retrograde transport of mutant ricin to the endoplasmic reticulum with subsequent translocation to cytosol, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3783-3788.
- Ravel, S., Colombatti, M., & Casellas, P. (1992), Internalization and intracellular fate of anti-CD5 monoclonal antibody and anti-CD5 ricin A-chain immunotoxin in human leukemic T cells, *Blood* 79: 1511-1517.
- Ree, R., Varland, S., & Arnesen, T. (2018), Spotlight on protein N-terminal acetylation, *Exp Mol Med* 50: 1-13.
- Rennick, J. J., Johnston, A. P. R., & Parton, R. G. (2021), Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics, *Nat Nanotechnol* 16: 266-276.
- Rice, P., Longden, I., & Bleasby, A. (2000), EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite, *Trends Genet* 16: 276-277.
- Ritchie, M., Tchistiakova, L., & Scott, N. (2013), Implications of receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking dynamics in the development of antibody drug conjugates, *MAbs* 5: 13-21.
- Robichon, C., Luo, J., Causey, T. B., Benner, J. S., & Samuelson, J. C. (2011), Engineering *Escherichia coli* BL21(DE3) derivative strains to minimize *E. coli* protein contamination after

- purification by immobilized metal affinity chromatography, *Appl Environ Microbiol* 77: 4634-4646.
- Roncuzzi, L., & Gasperi-Campani, A. (1996), DNA-nuclease activity of the single-chain ribosome-inactivating proteins dianthin 30, saporin 6 and gelonin, *FEBS Lett* 392: 16-20.
- Sama, S., Jerz, G., Schmieder, P., Woith, E., Melzig, M. F., & Weng, A. (2017), Sapofectosid - Ensuring non-toxic and effective DNA and RNA delivery, *Int J Pharm* 534: 195-205.
- Sama, S., Jerz, G., Thakur, M., Melzig, M. F., & Weng, A. (2019), Structure-Activity Relationship of Transfection-Modulating Saponins - A Pursuit for the Optimal Gene Trafficker, *Planta Med* 85: 513-518.
- Sanchez, M., Scire, A., Tanfani, F., & Ausili, A. (2015), The thermal unfolding of the ribosome-inactivating protein saporin-S6 characterized by infrared spectroscopy, *Biochim Biophys Acta* 1854: 1357-1364.
- Sandvig, K., Grimmer, S., Lauvrak, S. U., Torgersen, M. L., Skretting, G., van Deurs, B., & Iversen, T. G. (2002), Pathways followed by ricin and Shiga toxin into cells, *Histochem Cell Biol* 117: 131-141.
- Sandvig, K., & van Deurs, B. (1996), Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin, *Physiol Rev* 76: 949-966.
- Sandvig, K., & van Deurs, B. (2005), Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins, *Gene Ther* 12: 865-872.
- Schlaak, L., Weise, C., Kuropka, B., & Weng, A. (2022), Sapovaccarin-S1 and -S2, Two Type I RIP Isoforms from the Seeds of *Saponaria vaccaria* L, *Toxins (Basel)* 14:
- Schlegel, S., Lofblom, J., Lee, C., Hjelm, A., Klepsch, M., Strous, M., . . . de Gier, J. W. (2012), Optimizing membrane protein overexpression in the *Escherichia coli* strain Lemo21(DE3), *J Mol Biol* 423: 648-659.
- Schrot, J., Weng, A., & Melzig, M. F. (2015), Ribosome-inactivating and related proteins, *Toxins (Basel)* 7: 1556-1615.
- Scire, A., Tanfani, F., & Ausili, A. (2019), A Spectroscopic Study on Secondary Structure and Thermal Unfolding of the Plant Toxin Gelonin Confirms Some Typical Structural Characteristics and Unravels the Sequence of Thermal Unfolding Events, *Toxins (Basel)* 11:
- Scott, C. C., & Gruenberg, J. (2011), Ion flux and the function of endosomes and lysosomes: pH is just the start: the flux of ions across endosomal membranes influences endosome function not only through regulation of the luminal pH, *Bioessays* 33: 103-110.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996), Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels, *Anal Chem* 68: 850-858.
- Shi, W. W., Mak, A. N., Wong, K. B., & Shaw, P. C. (2016), Structures and Ribosomal Interaction of Ribosome-Inactivating Proteins, *Molecules* 21:

- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., . . . Higgins, D. G. (2011), Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol Syst Biol* 7: 539.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., . . . Klenk, D. C. (1985), Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem* 150: 76-85.
- Sparg, S. G., Light, M. E., & van Staden, J. (2004), Biological activities and distribution of plant saponins, *J Ethnopharmacol* 94: 219-243.
- SpectraViewer (2023), Exzitations- und Emissionsspektrum von CF568, unter: <https://www.merckmillipore.com/DE/de/support/lab-tools/spectra-viewer-tool/uvWb.qB.QqUAAAFnIQhZa3Md.nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F&bd=1>, (abgerufen am 11.03.2023).
- Stertman, L., Palm, A. E., Zarnegar, B., Carow, B., Lunderius Andersson, C., Magnusson, S. E., . . . Lovgren Bengtsson, K. (2023), The Matrix-M adjuvant: A critical component of vaccines for the 21(st) century, *Hum Vaccin Immunother* 19: 2189885.
- Stirpe, F. (2013), Ribosome-inactivating proteins: from toxins to useful proteins, *Toxicon* 67: 12-16.
- Stirpe, F., Barbieri, L., Gorini, P., Valbonesi, P., Bolognesi, A., & Polito, L. (1996), Activities associated with the presence of ribosome-inactivating proteins increase in senescent and stressed leaves, *FEBS Lett* 382: 309-312.
- Stirpe, F., Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Falasca, A., Abbondanza, A., & Stevens, W. A. (1983), Ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort), of *Agrostemma githago* L. (corn cockle) and of *Asparagus officinalis* L. (asparagus), and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree), *Biochem J* 216: 617-625.
- Stirpe, F., Williams, D. G., Onyon, L. J., Legg, R. F., & Stevens, W. A. (1981), Dianthins, ribosome-damaging proteins with anti-viral properties from *Dianthus caryophyllus* L. (carnation), *Biochem J* 195: 399-405.
- Thakur, M., Weng, A., Pieper, A., Mergel, K., von Mallinckrodt, B., Gilabert-Oriol, R., . . . Fuchs, H. (2013), Macromolecular interactions of triterpenoids and targeted toxins: role of saponins charge, *Int J Biol Macromol* 61: 285-294.
- ThermoFisher (2017), Protocol BCA Protein Assay, unter: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Methods-Protocols/T138-NanoDrop-One-OneC-BCA_Protocol.pdf, (abgerufen am 22.03.2022).
- Valbonesi, P., Barbieri, L., Bolognesi, A., Bonora, E., Polito, L., & Stirpe, F. (1999), Preparation of highly purified momordin II without ribonuclease activity, *Life Sci* 65: 1485-1491.
- Vincken, J. P., Heng, L., de Groot, A., & Gruppen, H. (2007), Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom, *Phytochemistry* 68: 275-297.
- Vo, N. N. Q., Fukushima, E. O., & Muranaka, T. (2017), Structure and hemolytic activity relationships of triterpenoid saponins and sapogenins, *J Nat Med* 71: 50-58.

- Wang, W., & Malcolm, B. A. (1999), Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis, *Biotechniques* 26: 680-682.
- Weise, C., Schrot, A., Wuerger, L. T. D., Adolf, J., Gilabert-Oriol, R., Sama, S., . . . Weng, A. (2020), An unusual type I ribosome-inactivating protein from *Agrostemma githago* L, *Sci Rep* 10: 15377.
- Wells, J. A. (1991), Systematic mutational analyses of protein-protein interfaces, *Methods Enzymol* 202: 390-411.
- Weng, A. (2018), A novel adenine-releasing assay for ribosome-inactivating proteins, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1072: 300-304.
- Weng, A., Bachran, C., Fuchs, H., Krause, E., Stephanowitz, H., & Melzig, M. F. (2009), Enhancement of saporin cytotoxicity by *Gypsophila* saponins--more than stimulation of endocytosis, *Chem Biol Interact* 181: 424-429.
- Weng, A., Bachran, C., Fuchs, H., & Melzig, M. F. (2008), Soapwort saponins trigger clathrin-mediated endocytosis of saporin, a type I ribosome-inactivating protein, *Chem Biol Interact* 176: 204-211.
- Weng, A., Manunta, M. D., Thakur, M., Gilabert-Oriol, R., Tagalakis, A. D., Eddaoudi, A., . . . Hart, S. L. (2015), Improved intracellular delivery of peptide- and lipid-nanoplexes by natural glycosides, *J Control Release* 206: 75-90.
- Weng, A., Thakur, M., Beceren-Braun, F., Bachran, D., Bachran, C., Riese, S. B., . . . Fuchs, H. (2012), The toxin component of targeted anti-tumor toxins determines their efficacy increase by saponins, *Mol Oncol* 6: 323-332.
- Weng, A., Thakur, M., von Mallinckrodt, B., Beceren-Braun, F., Gilabert-Oriol, R., Wiesner, B., . . . Fuchs, H. (2012), Saponins modulate the intracellular trafficking of protein toxins, *J Control Release* 164: 74-86.
- Wensley, H. J., Johnston, D. A., Smith, W. S., Holmes, S. E., Flavell, S. U., & Flavell, D. J. (2019), A Flow Cytometric Method to Quantify the Endosomal Escape of a Protein Toxin to the Cytosol of Target Cells, *Pharm Res* 37: 16.
- Wensley, H. J., Smith, W. S., Holmes, S. E., Flavell, S. U., & Flavell, D. J. (2021), The Effect of Small Molecule Pharmacological Agents on the Triterpenoid Saponin Induced Endolysosomal Escape of Saporin and a Saporin-Based Immunotoxin in Target Human Lymphoma Cells, *Biomedicines* 9:
- 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.
- Wingfield, P. T. (2015), Overview of the purification of recombinant proteins, *Curr Protoc Protein Sci* 80: 6 1 1-6 1 35.

- Zhou G., T. L., Wang T., Zhou X., Kou Z., Wang Z., Wu J. (2016), Phytochemistry and pharmacological activities of *Vaccaria hispanica* (Miller) Rauschert: a review, *Phytochemistry Reviews* 15: 813-827.
- Zhu, F., Zhou, Y. K., Ji, Z. L., & Chen, X. R. (2018), The Plant Ribosome-Inactivating Proteins Play Important Roles in Defense against Pathogens and Insect Pest Attacks, *Front Plant Sci* 9: 146.

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Essenzielle Strukturmerkmale, die Triterpensaponine für einen erfolgreichen <i>endosomal escape</i> von Typ I RIPs erfüllen müssen, am Beispiel von SO1861.	6
Abb. 2	<i>Gypsophila vaccaria</i> (L.) Sm. (A) Blüte (Ensinger, 2023) und (B) Samen im dargestellten Maßstab.	18
Abb. 3	Schematische Darstellung der zielgerichteten Mutagenese.	23
Abb. 4	Markierung von ^{His} Dianthin und ^{His} Dianthin Arg24Ala mit dem Fluoreszenzfarbstoff CF®568.	28
Abb. 5	Bildung des Formazan-Produktes aus MTT.	36
Abb. 6	12,5 %iges Polyacrylamidgel der Isolierungsschritte von Sapovaccarin-S1 und -S2 aus den Samen der <i>Gypsophila vaccaria</i> (L.) Sm. (angefärbt mit Coomassie).	38
Abb. 7	Chromatogramm der Kationenaustauschchromatographie der Isolierung von Sapovaccarin-S1 und -S2 (2.7.1.2).	39
Abb. 8	Dekonvuliertes Massenspektrum der isolierten Proteinfraction (entspricht Spur VII der SDS-PAGE).	40
Abb. 9	Sequenzierung von Sapovaccarin-S1 mittels PCR.	42
Abb. 10	Differenzierung der Sapovaccarin-S1 und -S2 Isoformen auf Proteinebene.	43
Abb. 11	Chromatogramm der DNA-Sequenzierung des für die Aminosäuren 107–113 kodierenden DNA-Abschnittes.	44
Abb. 12	Vollständige Aminosäuresequenz von Sapovaccarin-S1 und -S2.	45
Abb. 13	Sequenzanalyse und Homologiemodell von Sapovaccarin-S1.	46
Abb. 14	<i>N</i> -Glykosidaseaktivität von Sapovaccarin-S1 und -S2.	48
Abb. 15	Thermostabilität von Sapovaccarin-S1 und -S2 im Vergleich zu Gypsophilin-S und ^{His} Dianthin.	49
Abb. 16	Vektordesign von ^{His} Sapovaccarin-S1.	50
Abb. 17	Expression von ^{His} Sapovaccarin-S1 in BL21(DE3)pLysS und Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA.	50
Abb. 18	<i>N</i> -Glykosidaseaktivität von rekombinant exprimiertem ^{His} Sapovaccarin-S1.	51
Abb. 19	Zytotoxizität von rekombinant exprimiertem ^{His} Sapovaccarin-S1.	52
Abb. 20	Restriktionsverdau von pET11d- ^{His} Dianthin und Proteinaufreinigung von ^{His} Dianthin.	53
Abb. 21	Massenspektrometrische Analyse des rekombinant exprimierten ^{His} Dianthins.	54
Abb. 22	Analyse der Bindung von SO1861 an ^{His} Dianthin mittels nativer MS.	56
Abb. 23	Auswahl der basischen Aminosäuren für die Mutationsstudie am ^{His} Dianthin.	57

Abb. 24	PCR-Produkte der zielgerichteten Mutagenese des pET11d- ^{His} Dianthin-Vektors.	58
Abb. 25	SDS-PAGE (12,5 %, Coomassie-Färbung) der aufgereinigten ^{His} Dianthin-Mutanten.	60
Abb. 26	Expression in NiCo21(DE3) und Proteinaufreinigung von ^{His} Dianthin Arg24Ala.	60
Abb. 27	MALDI-TOF-Massenspektren des In-Gel-Verdaus von ^{His} Dianthin und ^{His} Dianthin Arg24Ala.	61
Abb. 28	<i>N</i> -Glykosydaseaktivität der ^{His} Dianthin-Mutanten im Vergleich zu dem nativen ^{His} Dianthin.	63
Abb. 29	Screening der ^{His} Dianthin-Mutanten auf zytotoxische Aktivität in Neuro-2A-Zellen.	64
Abb. 30	Zytotoxizität von ^{His} Dianthin Arg24Ala in drei Zelllinien.	66
Abb. 31	Zytotoxizität hoher ^{His} Dianthin Arg24Ala Konzentrationen.	67
Abb. 32	Thermostabilität von ^{His} Dianthin und ^{His} Dianthin Arg24Ala.	69
Abb. 33	SDS-PAGE der Markierungsreaktion von ^{His} Dianthin und ^{His} Dianthin Arg24Ala mit CF®568 (12,5 %, Coomassie Färbung).	70
Abb. 34	Fluoreszenzintensität von ^{His} Dianthin-CF568 und ^{His} Dianthin Arg24Ala-CF568.	71
Abb. 35	<i>N</i> -Glykosidaseaktivität des mit CF®568 markierten ^{His} Dianthin und ^{His} Dianthin Arg24Ala.	72
Abb. 36	Zytotoxizität von ^{His} Dianthin-CF568 und ^{His} Dianthin Arg24Ala-CF568.	73
Abb. 37	Aufnahmen von ^{His} Dianthin-CF568 und ^{His} Dianthin Arg24Ala-CF568 mit dem Fluoreszenzmikroskop.	74
Abb. 38	Endozytose von ^{His} Dianthin-CF568 und ^{His} Dianthin Arg24Ala-CF568.	75
Abb. 39	Bestimmung der Arginin-Position, die Arg24 im Dianthin-30 entspricht.	76
Abb. 40	PCR-Produkte der zielgerichteten Mutagenese von pET11d- ^{His} Agrostin und pET11d- ^{His} Sapovaccarin-S1.	77
Abb. 41	SDS-PAGE (12,5 %) der Expression und Proteinaufreinigung von ^{His} Agrostin Arg23Ala und ^{His} Sapovaccarin-S1 Arg24Ala.	78
Abb. 42	MALDI-TOF-Massenspektren des Trypsin-In-Gel-Verdaus von ^{His} Agrostin und ^{His} Agrostin Arg23Ala.	79
Abb. 43	MALDI-Massenspektren des Trypsin-In-Gel-Verdaus von ^{His} Sapovaccarin-S1 und ^{His} Sapovaccarin-S1 Arg24Ala.	80
Abb. 44	<i>N</i> -Glykosidaseaktivität von ^{His} Agrostin Arg23Ala und ^{His} Sapovaccarin-S1 Arg24Ala.	81
Abb. 45	Zytotoxizität von ^{His} Agrostin Arg23Ala.	82
Abb. 46	Zytotoxizität von ^{His} Sapovaccarin-S1 Arg24Ala.	83
Abb. 47	Herleitung der Aminosäureposition Arg24 des ^{His} Dianthins.	92

Abb. 48	3D-Struktur von ^{His} Dianthin (PDB ID 1RI0) und die Position von Arg24 im Protein.	98
Abb. 49	Vergleich der korrigierten <i>N</i> -Glykosidaseaktivitäten und der synergistischen Zytotoxizitäten der untersuchten RIPs und ihrer Arginin-Mutante.	104
Abb. A1	MS/MS-Spektren des tryptischen Peptides Position 102–126 von Sapovaccarin-S1 (A) und -S2 (B).	123
Abb. A2	Theoretische b- und y-Ionenserie des tryptischen Peptides Position 102–106 von Sapovaccarin-S1 (linke Seite) und Sapovaccarin-S2 (rechte Seite).	124
Abb. A3	ISD-Analyse von Sapovaccarin-S1 und -S2.	125
Abb. A4	Massenspektren der tryptischen Peptide des isolierten Sapovaccarin-S1 und -S2 (A) und von ^{His} Sapovaccarin-S1 (B) im Massenbereich 2800–3000 m/z.	126
Abb. A5	ISD-Analyse des <i>N</i> -Terminus von ^{His} Dianthin.	127
Abb. A6	MALDI-TOF-Massenspektrum des <i>N</i> -terminalen ^{His} Dianthin-Peptides 001–013 (GHHHHHHAAATAY).	128
Abb. A7	Sequenzabdeckung der Peptide mit der ^{His} Dianthin-Sequenz.	129
Abb. A8	Kontrollspektrum der Untersuchung der Bindung von SO1861 und ^{His} Dianthin mittels nativer MS.	130
Abb. A9	Rohdaten der nativen MS der Bindung von SO1861 an ^{His} Dianthin.	131
Abb. A10	Sequenzierung der Plasmid-Inserts der ^{His} Dianthin-Mutanten Lys195Ala, Lys227Ala und Arg24Ala.	132
Abb. A11	MALDI-TOF-Massenspektren der Markierungsreaktion von ^{His} Dianthin und ^{His} Dianthin Arg24Ala mit dem Fluoreszenzfarbstoff CF®568.	134
Abb. A12	Untersuchung der ^{His} Dianthin-Mutante (^{His} Dianthin-ohne-Lysine).	135

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Typ I und Typ II RIPs, deren Proteinsequenzen im Rahmen dieser Arbeit Verwendung finden.	2
Tab. 2	Primerpaare für die DNA-Sequenzierung der DNA, isoliert aus den Samen der <i>Gypsophila vaccaria</i> (L.) Sm.	20
Tab. 3	Sequenzierungsprimer.	21
Tab. 4	Primer für die zielgerichtete Mutagenese von ^{His} Dianthin, ^{His} Sapovaccarin-S1 und ^{His} Agrostin.	23
Tab. 5	<i>E. coli</i> Stämme für die Proteinexpression.	24
Tab. 6	Reaktionsansätze der Markierungsreaktion mit CF®568.	28
Tab. 7	Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele.	29
Tab. 8	MALDI-Messungen der In-Gel-verdauten Proteinproben und deren Parameter.	32
Tab. 9	MALDI-Messungen intakter Proteinproben und deren Parameter.	32
Tab. 10	Für die Zytotoxizitätsuntersuchungen verwendete Zelllinien.	34
Tab. 11	Durchgeführte Zytotoxizitätsuntersuchungen.	35
Tab. 12	Sequenzierung der Peptidmassenfingerprints von Sapovaccarin-S1 und -S2.	41

9 Anhang

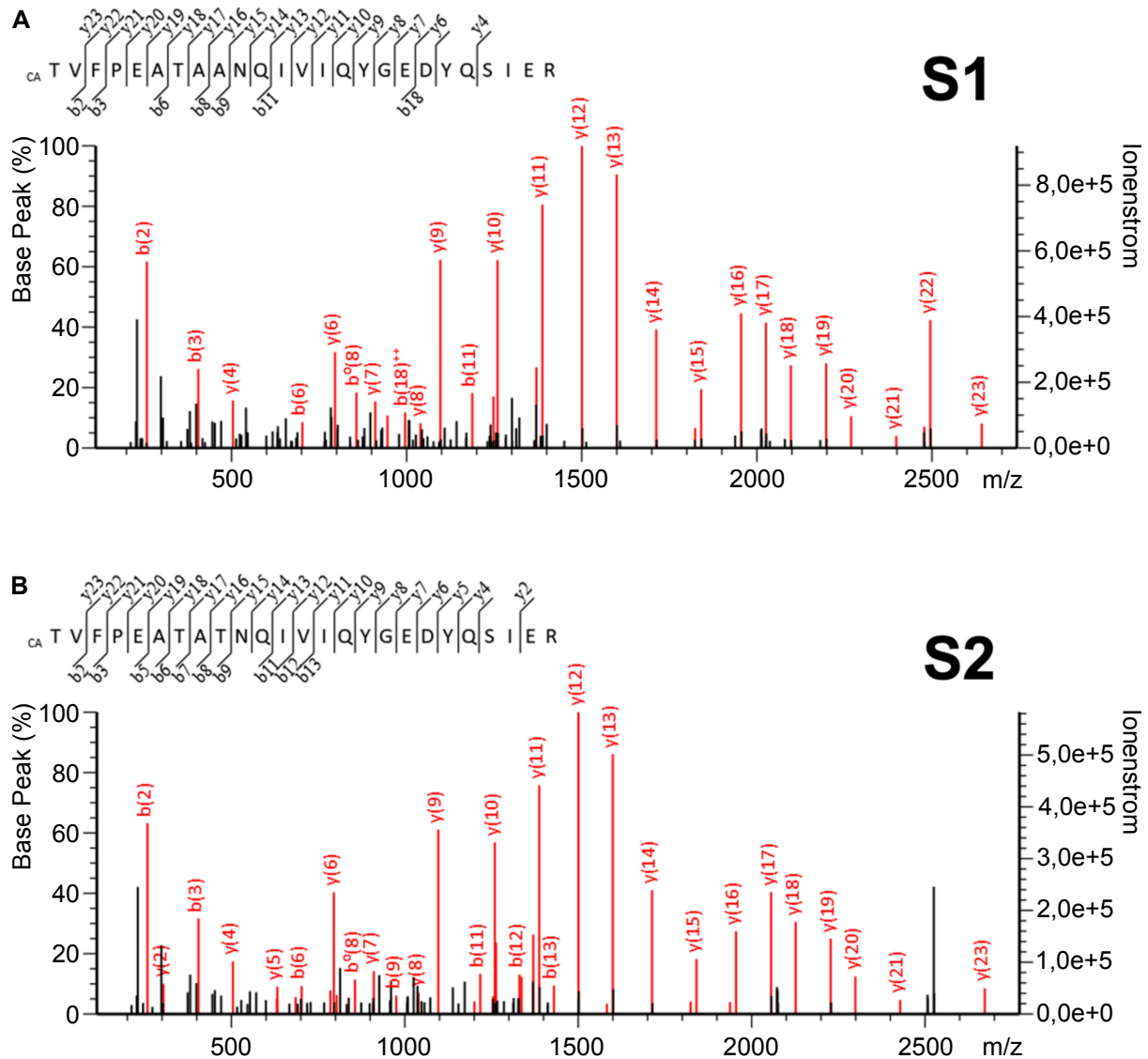


Abbildung A1. MS/MS-Spektren des tryptischen Peptides Position 102–126 von Sapovaccarin-S1 (A) und -S2 (B). Die Massenspektren wurden mit der Software Mascot analysiert. Die entsprechende Peptidsequenz wurde mit den dazugehörigen b- und y-Ionen beschriftet. *Abb. modifiziert nach Schlaak et al.*

S1 (110A)				S2 (110T)					
M+H(mono) = 2842,39				M+H(mono) = 2872,40					
b		y		b		y			
---	1	T	25	---	1	T	25		
201.1234	2	V	24	2741.3417	201.1234	2	V	24	2771.3523
348.1918	3	F	23	2642.2733	348.1918	3	F	23	2672.2839
445.2445	4	P	22	2495.2049	445.2445	4	P	22	2525.2154
574.2871	5	E	21	2398.1521	574.2871	5	E	21	2428.1627
645.3243	6	A	20	2269.1095	645.3243	6	A	20	2299.1201
746.3719	7	T	19	2198.0724	746.3719	7	T	19	2228.0830
817.4090	8	A	18	2097.0247	817.4090	8	A	18	2127.0353
888.4462	9	A	17	2025.9876	918.4567	9	T	17	2055.9982
1002.4891	10	N	16	1954.9505	1032.4997	10	N	16	1954.9505
1130.5477	11	Q	15	1840.9076	1160.5582	11	Q	15	1840.9076
1243.6317	12	I	14	1712.8490	1273.6423	12	I	14	1712.8490
1342.7001	13	V	13	1599.7649	1372.7107	13	V	13	1599.7649
1455.7842	14	I	12	1500.6965	1485.7948	14	I	12	1500.6965
1583.8428	15	Q	11	1387.6124	1613.8533	15	Q	11	1387.6124
1746.9061	16	Y	10	1259.5539	1776.9167	16	Y	10	1259.5539
1803.9276	17	G	9	1096.4905	1833.9381	17	G	9	1096.4905
1932.9702	18	E	8	1039.4691	1962.9807	18	E	8	1039.4691
2047.9971	19	D	7	910.4265	2078.0077	19	D	7	910.4265
2211.0604	20	Y	6	795.3995	2241.0710	20	Y	6	795.3995
2339.1190	21	Q	5	632.3362	2369.1296	21	Q	5	632.3362
2426.1510	22	S	4	504.2776	2456.1616	22	S	4	504.2776
2539.2351	23	I	3	417.2456	2569.2457	23	I	3	417.2456
2668.2777	24	E	2	304.1615	2698.2883	24	E	2	304.1615
---	25	R	1	175.1190	---	25	R	1	175.1190

Abbildung A2. Theoretische b- und y-Ionenserie des tryptischen Peptides Position 102–106 von Sapovaccarin-S1 (linke Seite) und Sapovaccarin-S2 (rechte Seite). B-Ionen unterscheiden sich um 30 Da beginnend bei b9 und y-Ionen ab y17. *Abb. modifiziert nach Schlaak et al.*

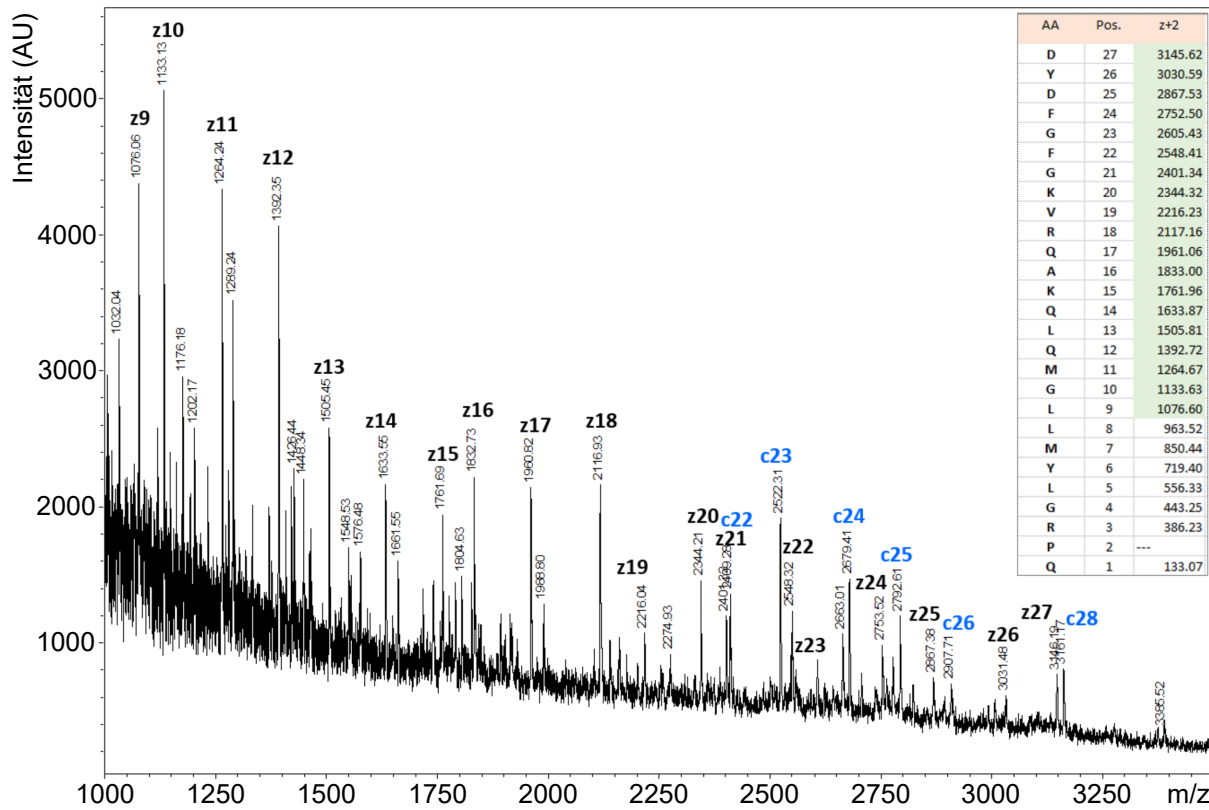


Abbildung A3. ISD-Analyse von Sapovaccarin-S1 und -S2. Durch Aufnahme der C-terminalen Ionenreihe (z + 2) z9 bis z27 konnte der C-Terminus von Sapovaccarin-S1 und -S2 ermittelt werden. Zusätzlich konnte mit der ISD-Messung die N-terminale Sequenz (c22 bis c28), die von Bolognesi *et al.* bestimmt wurde, bestätigt werden (Bolognesi *et al.*, 1995). *Abb. modifiziert nach Schlaak et al.*

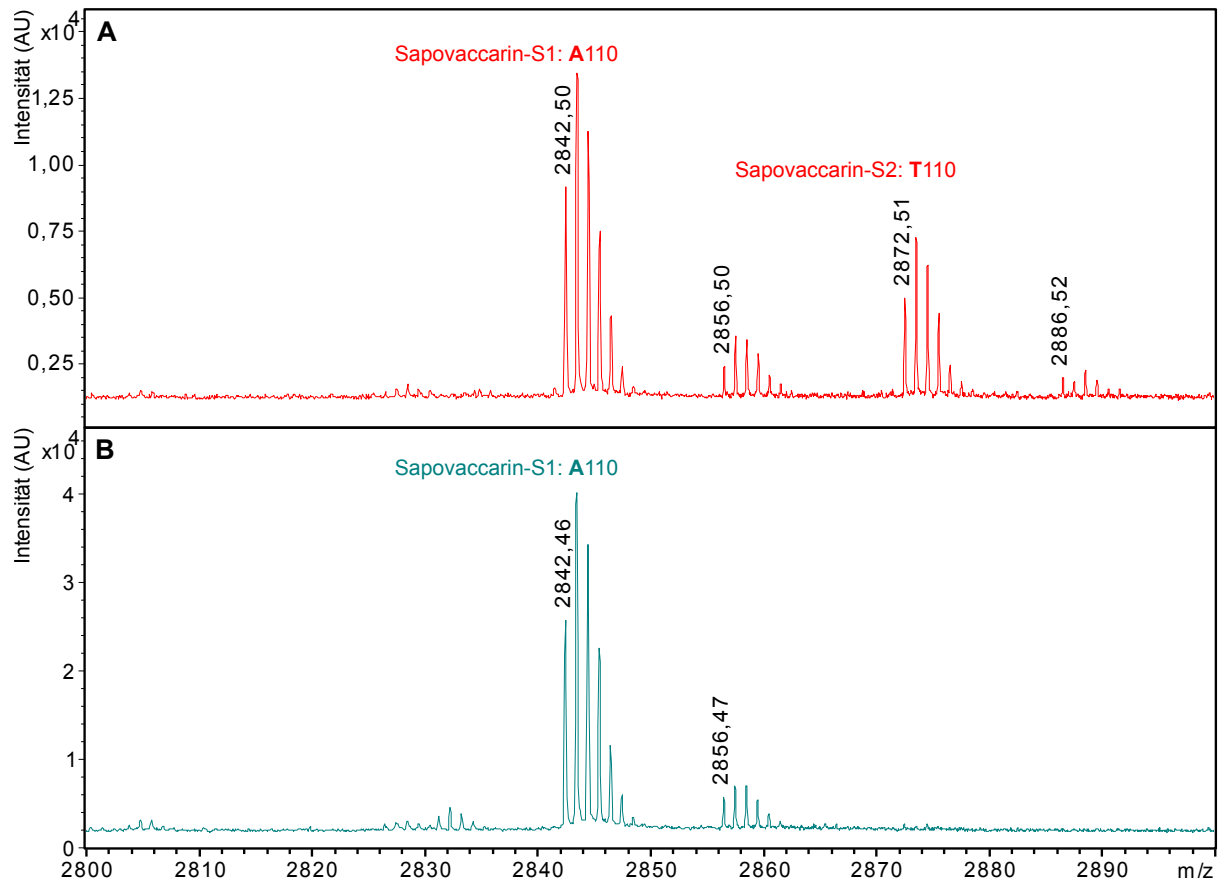


Abbildung A4. Massenspektren der tryptischen Peptide des isolierten Sapovaccarin-S1 und -S2 (**A**) und von ^{His}Sapovaccarin-S1 (**B**) im Massenbereich 2800–3000 m/z. Im unteren Spektrum fehlt das Peptid bei 2872,51 Da, welches einem tryptischen Peptid von Sapovaccarin-S2 entspricht. Somit besteht das rekombinant exprimierte ^{His}Sapovaccarin-S1 nur aus der Isoform S1.

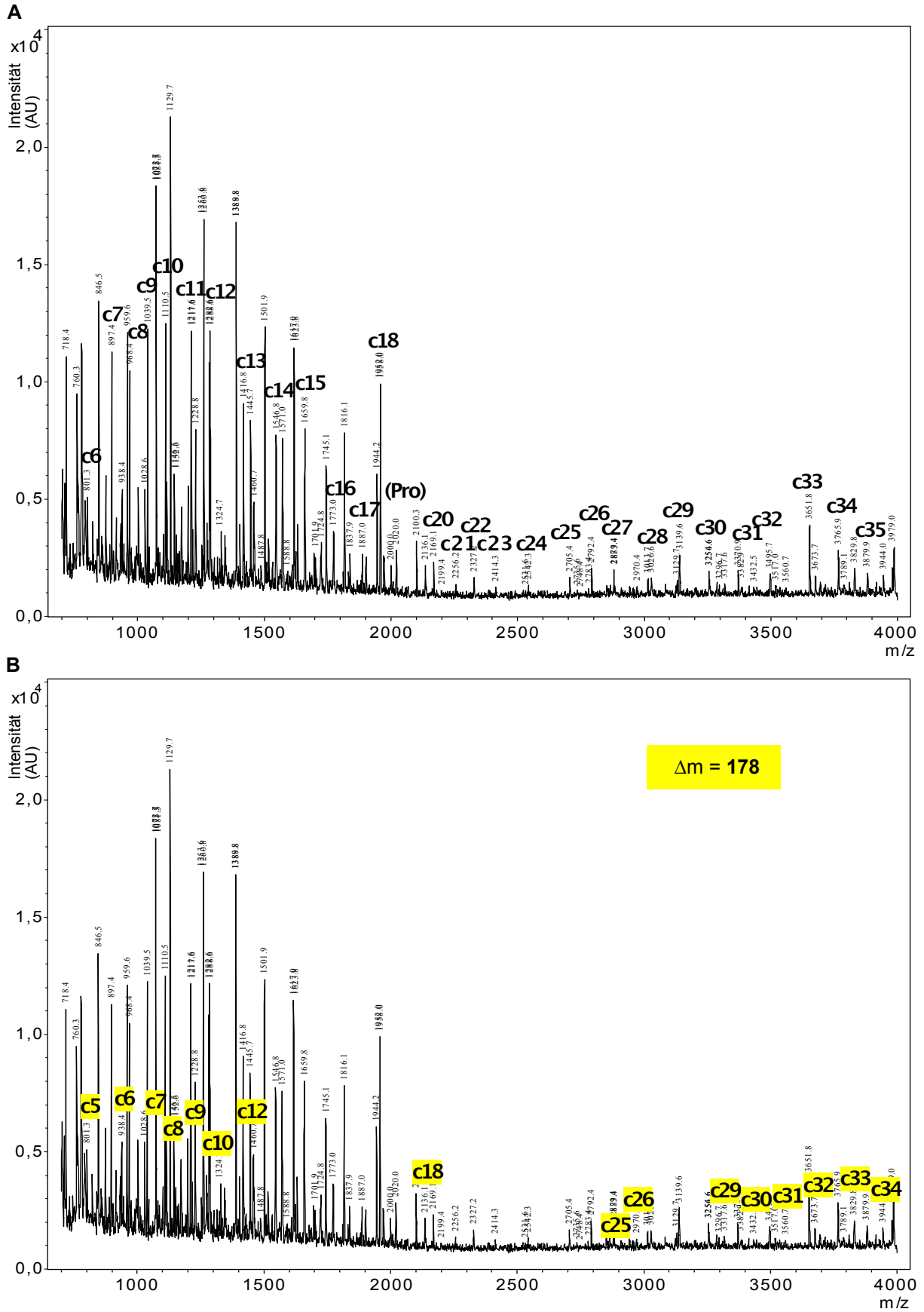


Abbildung A5. ISD-Analyse des *N*-Terminus von His¹Dianthin. Annotiert sind nur die *N*-terminalen *c*-Ionen. (A) Unmodifizierter *N*-Terminus mit c6 bis c35. Es konnte *N*-terminal kein Methionin identifiziert werden. (B) Modifizierter *N*-Terminus (um +178 Da verschoben) mit c5 bis c34.

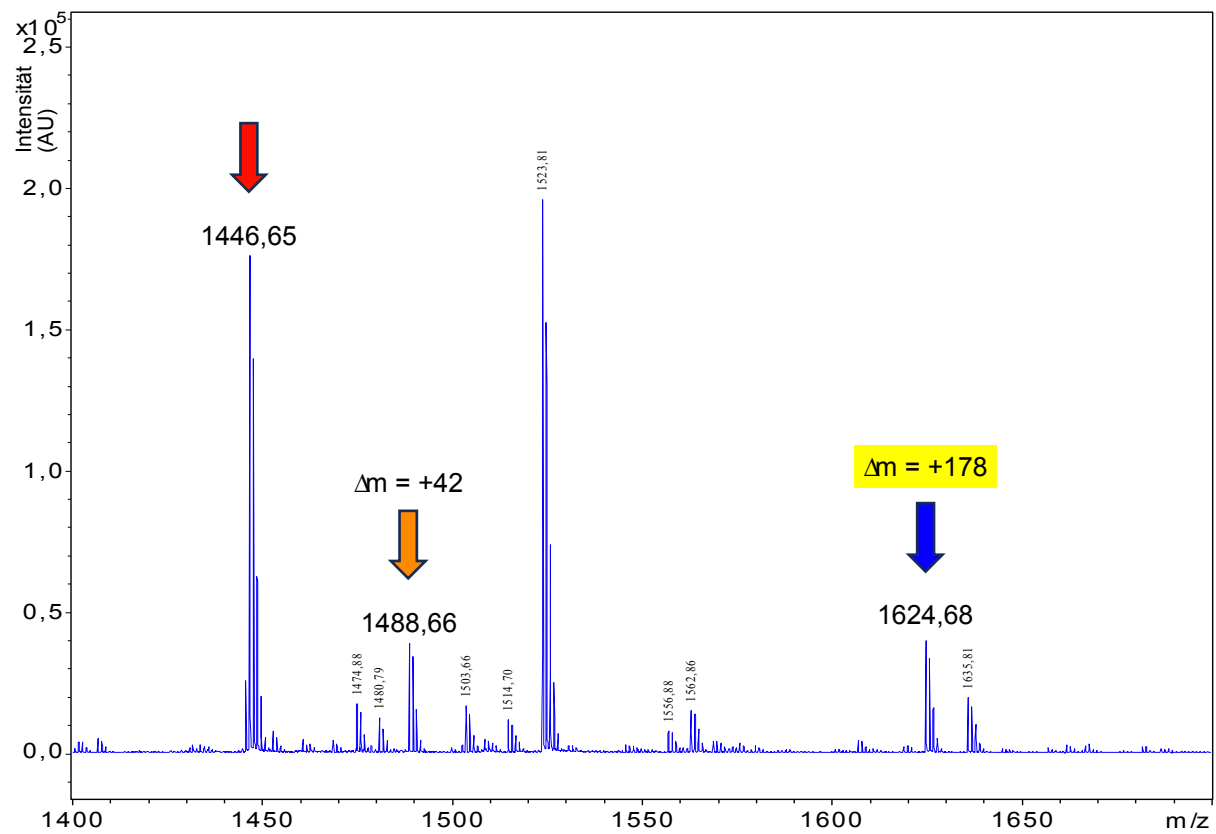


Abbildung A6. MALDI-TOF-Massenspektrum des *N*-terminalen HisDianthin-Peptides 001–013 (GHHHHHHAATAY). Das Peptid wurde durch den Verdau mit Chymotrypsin erzeugt. Dargestellt ist der Massenbereich 1400–1700 m/z. Die Masse bei 1446,65 Da entspricht dem unmodifizierten Peptid. Die Masse bei 1488,66 Da, die einer Zunahme von 42 Da entspricht, ist das *N*-acetylierte Peptid. Die Massenzunahme von 178 Da (Peak bei 1624,68 Da) entspricht der *N*-Glukonylierung.

Trypsin

Sequenzabdeckung: 95 %

1 GHHHHHAAA TAYTLNLANP SASQYSSFLD QIRNNVRDTS LIYGGTDVAV
 51 IGAPSTTDKF LRLNFQGPRG TVSLGLRREN LYVVAYLAMD NANVNRAYYF
 101 KNQITSAELT ALFPEVVVAN QKQLEYGEDY QAIEKNAKIT TGDQSRKELG
 151 LGINLLITMI DGVNKKVRVV KDEARFLLIA IQMTAEAARE RYIQNLVTKN
 201 FPNKFDSENK VIQFQVSWK ISTAIFGDCK NGVFNKDYDF GFGKVRQAKD
 251 LQMGLLKYLG RPK

Chymotrypsin

Sequenzabdeckung: 97 %

1 GHHHHHAAA TAYTLNLANP SASQYSSFLD QIRNNVRDTS LIYGGTDVAV
 51 IGAPSTTDKF LRLNFQGPRG TVSLGLRREN LYVVAYLAMD NANVNRAYYF
 101 KNQITSAELT ALFPEVVVAN QKQLEYGEDY QAIEKNAKIT TGDQSRKELG
 151 LGINLLITMI DGVNKKVRVV KDEARFLLIA IQMTAEAARE RYIQNLVTKN
 201 FPNKFDSENK VIQFQVSWK ISTAIFGDCK NGVFNKDYDF GFGKVRQAKD
 251 LQMGLLKYLG RPK

Elastase

Sequenzabdeckung: 100 %

1 GHHHHHAAA TAYTLNLANP SASQYSSFLD QIRNNVRDTS LIYGGTDVAV
 51 IGAPSTTDKF LRLNFQGPRG TVSLGLRREN LYVVAYLAMD NANVNRAYYF
 101 KNQITSAELT ALFPEVVVAN QKQLEYGEDY QAIEKNAKIT TGDQSRKELG
 151 LGINLLITMI DGVNKKVRVV KDEARFLLIA IQMTAEAARE RYIQNLVTKN
 201 FPNKFDSENK VIQFQVSWK ISTAIFGDCK NGVFNKDYDF GFGKVRQAKD
 251 LQMGLLKYLG RPK

Abbildung A7. Sequenzabdeckung der Peptide mit der ^{His}Dianthin-Sequenz. Die durch In-Gel-Verdau mit Trypsin, Chymotrypsin und Elastase erzeugten Peptide, wurden mit der Orbitrap Q Exactive™ HF vermessen und mit der Software Mascot Daemon auf Sequenzabdeckung überprüft. Die Suchparameter waren wie folgt festgelegt: Taxonomie *E. coli*, Datenbanken Swiss-Prot und ^{His}Dianthin (selbst angelegt), fixe Modifikation Carbamidomethyl (C), max. entgangene Spaltstellen 2 bzw. 4 bei Chymotrypsin. Peptide, die mit der ^{His}Dianthin-Sequenz übereinstimmten, sind rot hervorgehoben. Sowohl für die Kombination aus Trypsin und Chymotrypsin als auch für die Elastase allein konnte eine Sequenzabdeckung von 100 % erzielt werden.

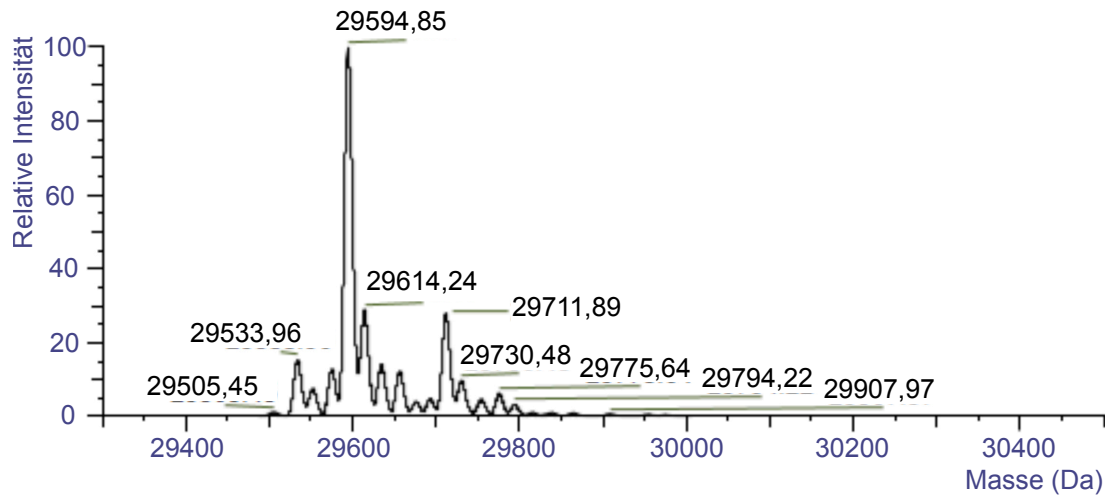


Abbildung A8. Kontrollspektrum der Untersuchung der Bindung von SO1861 und ^{His}Dianthin mittels nativer MS. Abgebildet ist ^{His}Dianthin unter denaturierenden Bedingungen. Das dekonvolvierte Spektrum wies neben dem großen Peak bei 29594,85 Da kleine Peaks mit u. a. 29533,96 Da (Masse von ^{His}Dianthin ohne endständiges Methionin) und 29711,89 Da (Masse von ^{His}Dianthin ohne endständiges Methionin, mit *N*-Glukonylierung) auf. Die Massen der beiden genannten kleinen Peaks wurden unter 3.2.2 für ^{His}Dianthin bestätigt. Die Massendifferenz des Hauptpeaks (29594,85 Da) und des ^{His}Dianthin-Peaks (ohne endständiges Methionin, 29533,96 Da) betrug 61 Da. Diese Massendifferenz könnte auf die Bindung eines Metallions zurückzuführen sein. In Frage kämen Nickel oder Kupfer. Die Abweichung um 61 Da wurde sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen gemessen, was auf eine kovalente Bindung des Metallions deutet.

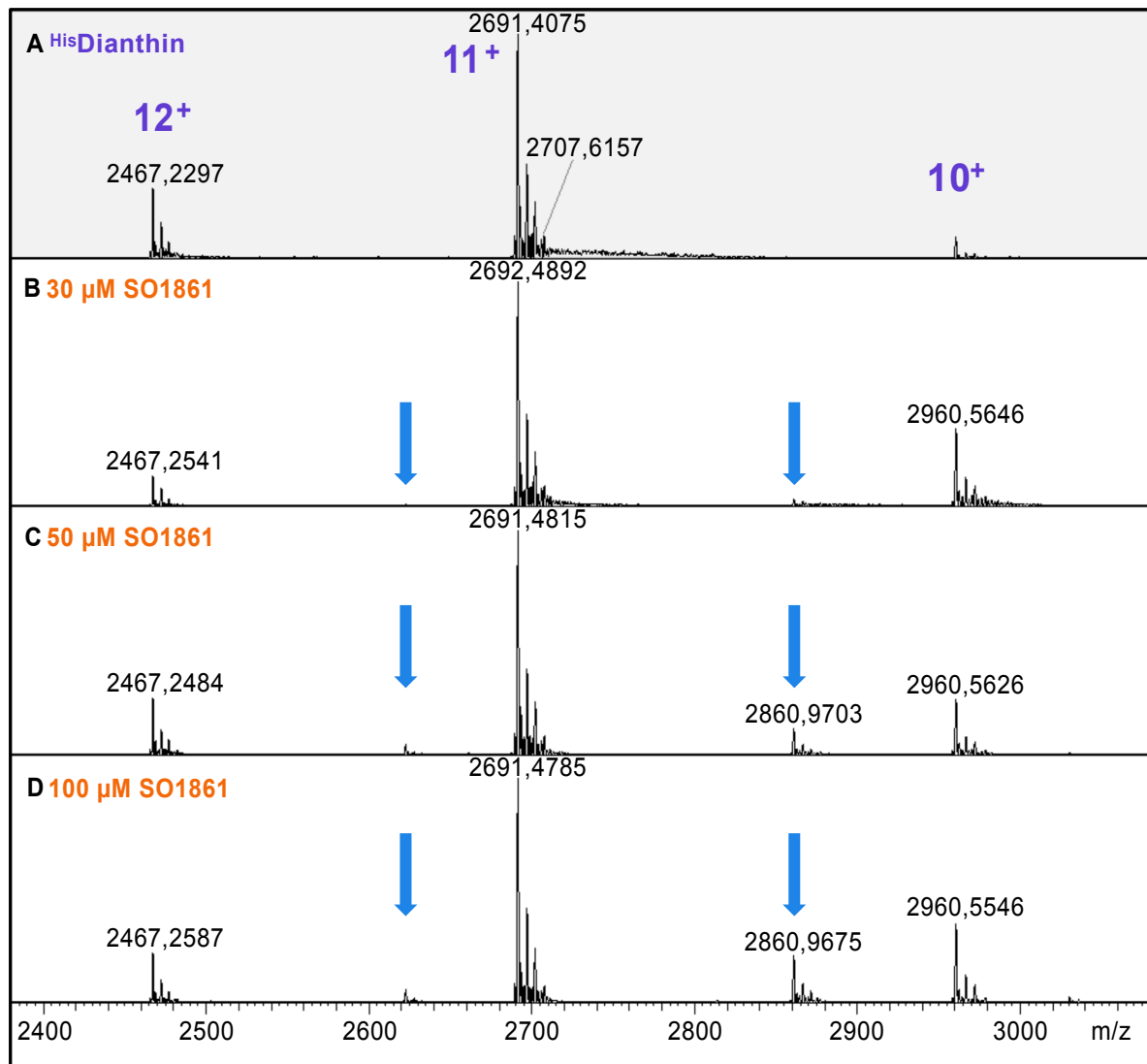


Abbildung A9. Rohdaten der nativen MS der Bindung von SO1861 an HisDianthin. (A) Kontrollspektrum von HisDianthin. HisDianthin wies ein für nativ gefaltete Proteine typisches Spektrum, welches durch einen niedrigen Ladungszustand und eine enge Ladungszustandsverteilung gekennzeichnet war (10⁺ bis 12⁺), auf. (B–D) Massenspektren von HisDianthin mit zunehmender SO1861-Konzentration (finale Konzentrationen: 30, 50, 100 μM). Durch Zugabe von SO1861 traten zusätzliche Peaks, welche in der Abbildung durch blaue Pfeile hervorgehoben sind, im Massenspektrum auf. Mit zunehmender SO1861-Konzentration nahm die Intensität der zusätzlichen Peaks zu.

```

HisDianthin      -----ATGGGACATCATCATCATCATCATGCCGCGGCCACAGCATAACACATTAAAT
Lys195Ala        AGATATACCATGGGACATCATCATCATCATCATGCCGCGGCCACAGCATAACACATTAAAT
Lys227Ala        AGATATACCATGGGACATCATCATCATCATCATGCCGCGGCCACAGCATAACACATTAAAT
Arg24Ala         AGATATACCATGGGACATCATCATCATCATCATGCCGCGGCCACAGCATAACACATTAAAT
                  *****

HisDianthin      CTCGCAAATCCATCCGCGAGTCAATACTCATCTTTTCTGGATCAAATCCGAAACAATGTG
Lys195Ala        CTCGCAAATCCATCCGCGAGTCAATACTCATCTTTTCTGGATCAAATCCGAAACAATGTG
Lys227Ala        CTCGCAAATCCATCCGCGAGTCAATACTCATCTTTTCTGGATCAAATCCGAAACAATGTG
Arg24Ala         CTCGCAAATCCATCCGCGAGTCAATACTCATCTTTTCTGGATCAAATCCGAAACAATGTG
                  *****

HisDianthin      AGGATACCAGCCTCATATACGGTGGGACAGACGTAGCCGTGATTGGTGCGCCTTCTACT
Lys195Ala        AGGATACCAGCCTCATATACGGTGGGACAGACGTAGCCGTGATTGGTGCGCCTTCTACT
Lys227Ala        AGGATACCAGCCTCATATACGGTGGGACAGACGTAGCCGTGATTGGTGCGCCTTCTACT
Arg24Ala         AGGATACCAGCCTCATATACGGTGGGACAGACGTAGCCGTGATTGGTGCGCCTTCTACT
                  *****

HisDianthin      ACTGATAAATTCCTTAGACTTAAATTTCCAAGGTCTCGAGGAACGGTCTCTCTTGGCCTT
Lys195Ala        ACTGATAAATTCCTTAGACTTAAATTTCCAAGGTCTCGAGGAACGGTCTCTCTTGGCCTT
Lys227Ala        ACTGATAAATTCCTTAGACTTAAATTTCCAAGGTCTCGAGGAACGGTCTCTCTTGGCCTT
Arg24Ala         ACTGATAAATTCCTTAGACTTAAATTTCCAAGGTCTCGAGGAACGGTCTCTCTTGGCCTT
                  *****

HisDianthin      AGGCGCGAGAACTTATACGTGGTTCGCGTATCTTGCAATGGATAACGCAAATGTTAACCGT
Lys195Ala        AGGCGCGAGAACTTATACGTGGTTCGCGTATCTTGCAATGGATAACGCAAATGTTAACCGT
Lys227Ala        AGGCGCGAGAACTTATACGTGGTTCGCGTATCTTGCAATGGATAACGCAAATGTTAACCGT
Arg24Ala         AGGCGCGAGAACTTATACGTGGTTCGCGTATCTTGCAATGGATAACGCAAATGTTAACCGT
                  *****

HisDianthin      GCATATTACTTCAAAAACCAAATCACTTCTGCTGAGTTAACCGCCCTTTTCCCGGAGGTT
Lys195Ala        GCATATTACTTCAAAAACCAAATCACTTCTGCTGAGTTAACCGCCCTTTTCCCGGAGGTT
Lys227Ala        GCATATTACTTCAAAAACCAAATCACTTCTGCTGAGTTAACCGCCCTTTTCCCGGAGGTT
Arg24Ala         GCATATTACTTCAAAAACCAAATCACTTCTGCTGAGTTAACCGCCCTTTTCCCGGAGGTT
                  *****

HisDianthin      GTGGTTGCAAATCAAAAACAATTAGAGTACGGGGAAGATTACCAGCGGATAGAAAAGAAC
Lys195Ala        GTGGTTGCAAATCAAAAACAATTAGAGTACGGGGAAGATTACCAGCGGATAGAAAAGAAC
Lys227Ala        GTGGTTGCAAATCAAAAACAATTAGAGTACGGGGAAGATTACCAGCGGATAGAAAAGAAC
Arg24Ala         GTGGTTGCAAATCAAAAACAATTAGAGTACGGGGAAGATTACCAGCGGATAGAAAAGAAC
                  *****

HisDianthin      GCCAAGATAACAACAGGCGATCAAAGTAGAAAGGAACTCGGTTTGGGGATCAATCTACTT
Lys195Ala        GCCAAGATAACAACAGGCGATCAAAGTAGAAAGGAACTCGGTTTGGGGATCAATCTACTT
Lys227Ala        GCCAAGATAACAACAGGCGATCAAAGTAGAAAGGAACTCGGTTTGGGGATCAATCTACTT
Arg24Ala         GCCAAGATAACAACAGGCGATCAAAGTAGAAAGGAACTCGGTTTGGGGATCAATCTACTT
                  *****

HisDianthin      ATAACGATGATTGATGGAGTGAATAAGAAGGTACGTGTAGTCAAAGACGAGGCAAGGTTT
Lys195Ala        ATAACGATGATTGATGGAGTGAATAAGAAGGTACGTGTAGTCAAAGACGAGGCAAGGTTT
Lys227Ala        ATAACGATGATTGATGGAGTGAATAAGAAGGTACGTGTAGTCAAAGACGAGGCAAGGTTT
Arg24Ala         ATAACGATGATTGATGGAGTGAATAAGAAGGTACGTGTAGTCAAAGACGAGGCAAGGTTT
                  *****

HisDianthin      TTGTTAATCGCAATTCAAATGACGGCTGAGGCCGCGGATTTAGGTACATACAGAACTTG
Lys195Ala        TTGTTAATCGCAATTCAAATGACGGCTGAGGCCGCGGATTTAGGTACATACAGAACTTG
Lys227Ala        TTGTTAATCGCAATTCAAATGACGGCTGAGGCCGCGGATTTAGGTACATACAGAACTTG
Arg24Ala         TTGTTAATCGCAATTCAAATGACGGCTGAGGCCGCGGATTTAGGTACATACAGAACTTG
                  *****

HisDianthin      GTTACCAAGAACTTCCCAAACAAGTTCGACTCAGAAAATAAGGTTATTCAATTTCAAGTT
Lys195Ala        GTTACCAAGAACTTCCCAAACAAGTTCGACTCAGAAAATAAGGTTATTCAATTTCAAGTT
Lys227Ala        GTTACCAAGAACTTCCCAAACAAGTTCGACTCAGAAAATAAGGTTATTCAATTTCAAGTT
Arg24Ala         GTTACCAAGAACTTCCCAAACAAGTTCGACTCAGAAAATAAGGTTATTCAATTTCAAGTT
                  *****

```

```

HisDianthin      AGTTGGAGTAAGATTTCTACGGCAATATTTGGGGATTGCAAAAACGGCGTGTTTAATAAA
Lys195Ala       AGTTGGAGTAAGATTTCTACGGCAATATTTGGGGATTGCAAAAACGGCGTGTTTAATAAA
Lys227Ala       AGTTGGAGTAAGATTTCTACGGCAATATTTGGGGATTGCAAAAACGGCGTGTTTAATGCA
Arg24Ala        AGTTGGAGTAAGATTTCTACGGCAATATTTGGGGATTGCAAAAACGGCGTGTTTAATAAA
*****

HisDianthin      GATTATGATTTCTGGGTTTGGGAAAGTGAGGCAGGCAAAAAGACCTTCAAATGGGGCTCCTT
Lys195Ala       GATTATGATTTCTGGGTTTGGGAAAGTGAGGCAGGCAAAAAGACCTTCAAATGGGGCTCCTT
Lys227Ala       GATTATGATTTCTGGGTTTGGGAAAGTGAGGCAGGCAAAAAGACCTTCAAATGGGGCTCCTT
Arg24Ala        GATTATGATTTCTGGGTTTGGGAAAGTGAGGCAGGCAAAAAGACCTTCAAATGGGGCTCCTT
*****

HisDianthin      AAGTATTTAGGTAGACCGAAGTAA-----
Lys195Ala       AAGTATTTAGGTAGACCGAAGTAAGAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCT
Lys227Ala       AAGTATTTAGGTAGACCGAAGTAAGAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCT
Arg24Ala        AAGTATTTAGGTAGACCGAAGTAAGAATTCTTGAAGACGAAAAG-CCTCGTGATACGCCT
*****

```

Abbildung A10. Sequenzierung der Plasmid-Inserts der ^{His}Dianthin-Mutanten Lys195Ala, Lys227Ala und Arg24Ala. Die Mutationen wurden durch Austausch zweier Basen mittels zielgerichteter Mutagenese in die Sequenz des Plasmides eingebaut (2.7.2.6). Der erfolgreiche Basenaustausch ist durch eine gelbe Markierung hervorgehoben.

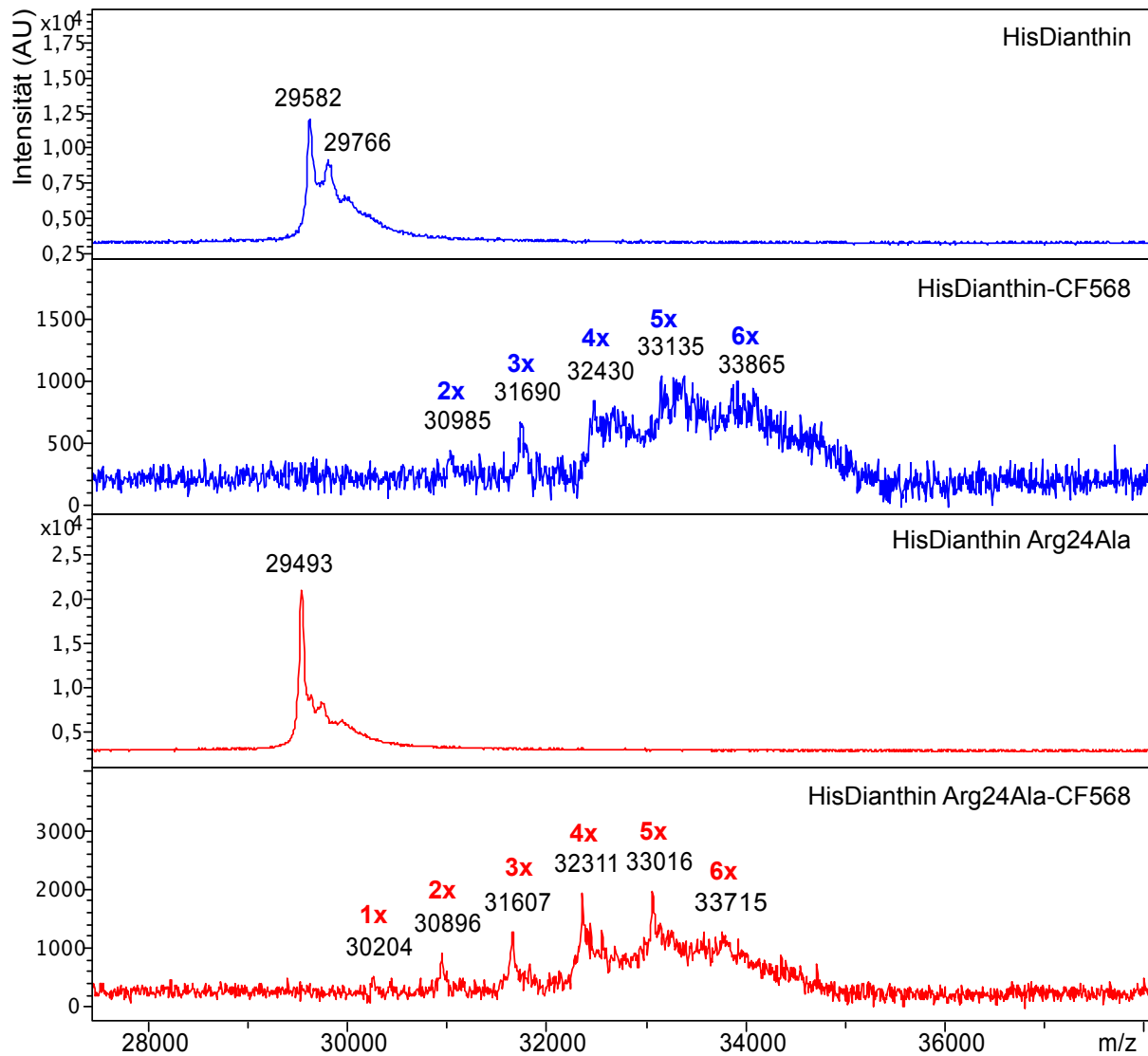


Abbildung A11. MALDI-TOF-Massenspektren der Markierungsreaktion von ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala mit dem Fluoreszenzfarbstoff CF®568. Massenspektren wurden sowohl von den Edukten als auch den Produkten der Markierungsreaktion mit dem Gerät UltrafleXtreme aufgenommen. ^{His}Dianthin (29582 Da) bzw. modifiziertes ^{His}Dianthin (29766 Da, s. 3.2.2) und ^{His}Dianthin Arg24Ala (29493 Da) wurden in der Markierungsreaktion vollständig zu dem markierten Produkt umgesetzt (Abwesenheit des Massenpeaks des Eduktes im Massenspektrum des Produktes). Die Abweichungen von 54 Da zu den theoretischen ^{His}Dianthin-Massen ist auf eine schlechte Kalibrierung des Gerätes zurückzuführen. Die Aufnahmen erfolgten kurz nach der Installation des neuen UltrafleXtreme Gerätes. CF®568 reagierte mit ^{His}Dianthin und ^{His}Dianthin Arg24Ala in mehreren stöchiometrischen Verhältnissen. ^{His}Dianthin wurde mit 2–6 Farbstoffmolekülen je Proteinmolekül und ^{His}Dianthin Arg24Ala wurde mit 1–6 Farbstoffmolekülen je Proteinmolekül markiert. Über die ersten fünf Addukte gerechnet, kam es im Durchschnitt zu einer Massenzunahme von 698 Da, welche der Masse des Fluoreszenzfarbstoffes nach Abspaltung von Sauerstoff entspricht.

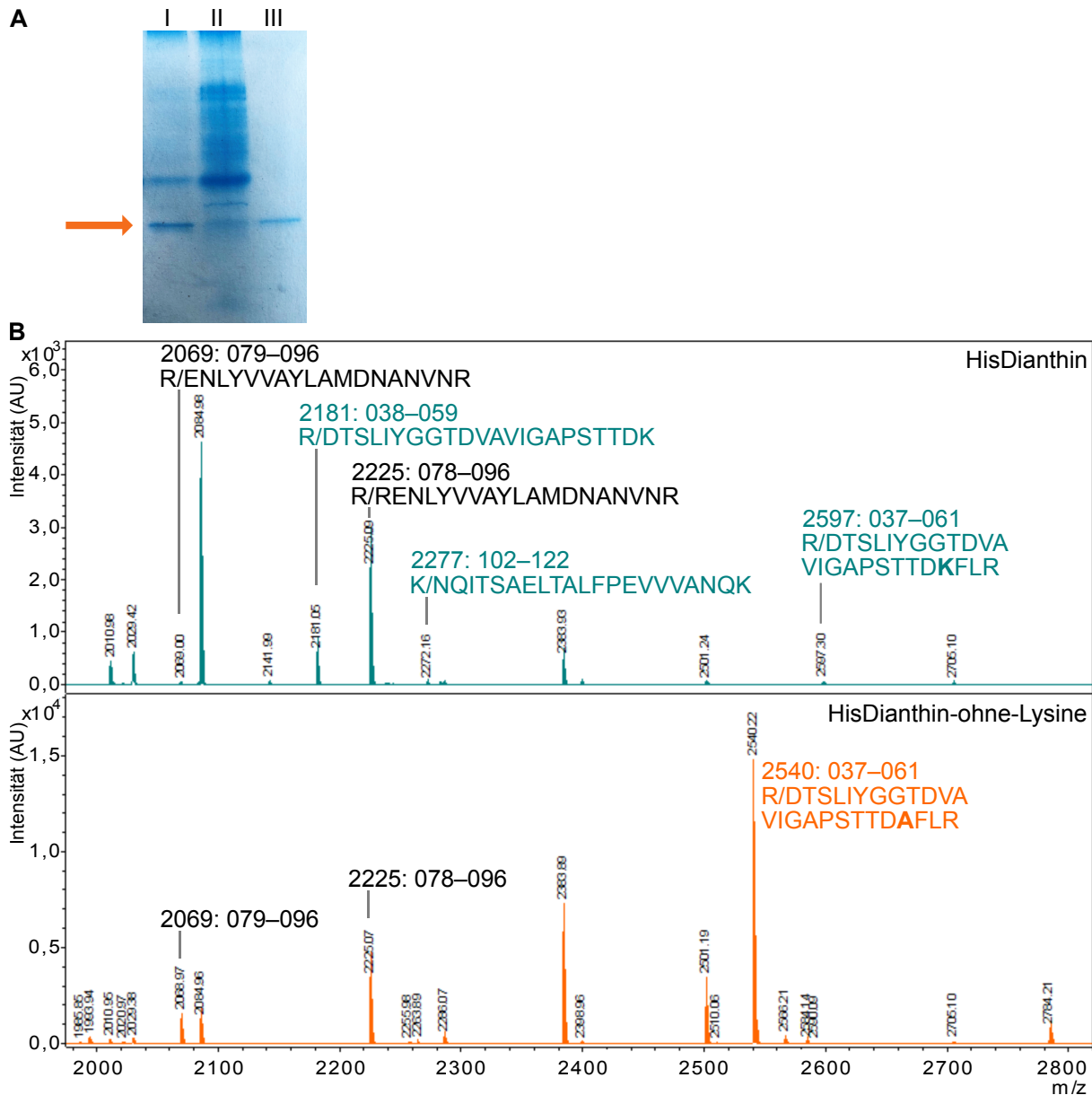


Abbildung A12. Untersuchung der ^{His}Dianthin-Mutante (^{His}Dianthin-ohne-Lysine). Alle Lysin-Reste mit Ausnahme des aktiven Zentrums (Lys138, Lys211 und Lys248) wurden mit Alanin substituiert. Der pET11d-Vektor wurde von BioCat synthetisiert. Nach der Transformation (2.7.2.2) wurde die Proteinexpression (2.7.2.7) in NiCo21(DE3) durchgeführt. ^{His}Dianthin-ohne-Lysine wurde, wie unter 2.7.2.9 beschrieben, aufgereinigt. Die SDS-PAGE (2.7.4.1) der Elutionsfraktion wies keine Zielbande auf. Daher wurde die SDS-PAGE mit dem Bakterienpellet, erhalten durch Zentrifugation der lysierten Bakteriensuspension (2.7.2.8), wiederholt. (A) SDS-PAGE des Bakterienpellets. Spur I: Resuspendiertes Bakterienpellet (in PBS), ^{His}Dianthin-ohne-Lysine. Spur II: Irrelevante Probe. Spur III: Referenzprotein, natives ^{His}Dianthin. Die Banden der Spur I und III auf Höhe des Pfeils wurden mit Trypsin verdaut (2.7.5.1). (B) MS-Analyse der Gelbanden. Der Peptidmassenfingerprint der Referenzbande wurde mit Mascot Server mit einem Protein Score von 240 als Dianthin-30 identifiziert. ^{His}Dianthin-ohne-Lysine wurde nicht als Dianthin-30 identifiziert. Die Alanin-Substitution der Lysin-Reste bewirkte den Verlust von Trypsin-Spaltstellen, wodurch sich der Peptidmassenfingerprint stark veränderte und nicht mehr Dianthin-30 zugeordnet werden konnte. Die Betrachtung der Peptidmassenfingerprints, hier am Beispiel des Massenbereichs 1975–2820, lässt eine Identifizierung der ausgeschnittenen Bande als ^{His}Dianthin-ohne-Lysine zu. Signale der Peptide (grün), die nach Lysin gespalten sind, fehlen der Mutante. Signale für Peptide (schwarz), die kein Lysin an den Spaltstellen aufweisen (Arg an beiden Spaltstellen), sind meist in beiden Proben zu detektieren, z. B. $[M + H]^+ = 2069$ m/z (079–096). Einzelne Peptide (orange), die sich durch die Alanin-Substitution erklären lassen, sind nur in der Mutante zu sehen. Charakteristisch ist auch der Shift von 2597 zu 2540 (Peptid 037–061), Sequenz R/DTSLIYGGTDVA VIGAPSTTD(K/A)FLR mit $\Delta m = 57$, entsprechend der Massendifferenz von Lysin (128 Da) zu Alanin (71 Da).

10 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten in Fachzeitschriften

L. Schlaak, C. Weise, B. Kuroпка, A. Weng (2022), Sapovaccarin-S1 and -S2, two type I RIP isoforms from the seeds of *Saponaria vaccaria* L., *Toxins* 14(7): 449.

Posterbeiträge zu Konferenzen

L. Schlaak, C. Weise, B. Kuroпка, A. Weng, Sapovaccarin-S1 and -S2, two type I RIP isoforms from the seeds of *Saponaria vaccaria* L. “Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor/Young scientists present.“ Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft (DPhG), Landesgruppe Berlin-Brandenburg, Berlin, Deutschland, 8. Juli 2022.

L. Schlaak, V. Ehrentraut, A. Weng, How the choice of *E. coli* affects the protein expression of dianthin mutants, ENDOSCAPE-Symposium, Berlin, Deutschland, 7.-8. September 2022.

11 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Dr. Alexander Weng bedanken, der mir sowohl die Möglichkeit gegeben als auch mich dazu ermutigt hat zu promovieren. Vielen Dank für das Einbringen zahlreicher Ideen, der mir eingeräumten Freiheiten und der Möglichkeit jederzeit Problematiken sowie Gedankengänge ansprechen zu können.

Prof. Dr. Timo Niedermeyer danke ich für das Erstellen des Zweitgutachtens.

Ein großer Dank geht an Dr. Christoph Weise, der die massenspektrometrische Analytik (fast) aller Proteinproben dieser Arbeit übernommen hat und solange gemessen hat, bis alle Unstimmigkeiten aufgeklärt werden konnten. Auch vielen Dank an Dr. Benno Kuropka (Institut für Biochemie, FU Berlin), der sich der MS-Analytik der restlichen Proteinproben angenommen hat.

Vielen Dank auch an meine Kollegen der Arbeitsgruppe, ihre Hilfsbereitschaft und die zahlreichen produktiven Gespräche in der Mittagspause. Besonderer Dank geht an Prof. Dr. Matthias F. Melzig, der allzeit ein offenes Ohr hatte, an Conny Görick, die jederzeit mit ihrem technischen Rat zur Verfügung stand, an Alexander Sonntag für das intensive Korrekturlesen dieser Arbeit und an Meike Tröger & Hardy Mittdank, die für jede Problematik eine Idee parat hatten.

Der ehemaligen Diplomandin Vanessa Ehentraut danke ich für ihre Unterstützung und ihren Fleiß, den sie den vielen Proteinexpressionen und Proteinaufreinigungen gewidmet hat. Vielen Dank auch den Wahlpflichtstudenten, die diverse Aufgaben übernommen haben, die unabdinglich für den Erfolg dieser Arbeit waren.

Ein ganz besonderer Dank auch an Felix Bredendiek und Martina Jaruschewski, die sich für das Korrekturlesen dieser Arbeit Zeit genommen haben.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Familie, die mir mein ganzes Leben alles ermöglicht und mich geprägt hat, indem wie ich heute bin.

Am Ende möchte ich mich besonders bei Adrian bedanken. Ohne ihn hätte ich niemals den Mut aufgebracht zu promovieren. Vielen Dank für das Vertrauen in mich, das Bestärken es zu schaffen und vor allem die Unterstützung in den letzten Monaten.