

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom- Biologin Annabell Marr

aus Hildburghausen

Tag der mündlichen Prüfung: .....

## **T H E M A**

Charakterisierung und Optimierung von CD276 spezifischen Peptiden  
mittels Display Techniken

Gutachter: PD Dr. Walter Mier

Prof. Dr. med. Uwe Haberkorn

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und ich mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Weiterhin erkläre ich, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

.....

# Inhalt

1 Zusammenfassung.....	8
2 Einleitung .....	10
2.1 Bildgebung und Krebs.....	10
2.1.1 Tumor-Therapie und Diagnosemethoden .....	10
2.1.2 Gezielte Radionuklidtherapie .....	11
2.1.3 Peptid-basierte Therapien.....	13
2.2 Peptidbibliotheken.....	13
2.3 Display Techniken.....	15
2.3.1 Phage Display.....	16
2.3.2 Ribosome Display .....	19
2.4 CD276.....	23
2.5 PDGFR $\beta$ .....	24
2.6 Aufgabenstellung .....	25
3 Material .....	26
3.1 Geräte .....	26
3.2 Glaswaren.....	28
3.3 Chemikalien und Enzyme .....	28
3.4 Verbrauchsmaterialien .....	31
3.5 Bakterienstämme und Phagen.....	33
3.6 Zellen .....	33
3.7 Medien und Zusätze .....	34
3.8 Puffer .....	34
3.9 Restriktionsenzyme.....	34
3.10 Vektoren.....	34
3.11 Primer .....	35
3.12 Antikörper und Proteine .....	36
3.13 Größenmarker und Ladepuffer.....	36
3.14 Radioisotope .....	36
3.15 Kits.....	36
3.16 Computerprogramme und Internetanwendungen .....	37
3.17 Externe Serviceeinheiten .....	37
4 Methoden .....	38
4.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden .....	38
4.1.1 PCR-Polymerase-Kettenreaktion .....	38
4.1.2 Real-Time-PCR.....	39

4.1.3 Restriktionsverdau von DNA .....	40
4.1.4 DNA-Gelelektrophorese.....	40
4.1.5 RNA-Gelelektrophorese .....	41
4.1.6 RNA-Extraktion aus Zellen.....	41
4.1.7 Proteinextraktion aus Zellen .....	42
4.1.7.1 Gesamtproteinextraktion .....	42
4.1.7.2 Isolation von Membran- und Zytoplasmaproteinen.....	42
4.1.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Bradfordmethode ...	43
4.1.8 SDS-Page.....	43
4.1.9 Coomassie-Färbung .....	44
4.1.9 Western-Blot.....	45
4.2 Zellkultur .....	45
4.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen .....	45
4.2.2 Passagieren von adhärennten Zellen .....	46
4.2.3 Einfrieren von Zelllinien.....	46
4.2.4 Auftauen von Zelllinien.....	47
4.2.5 Zellaussaat für <i>in vitro</i> Experimente.....	47
4.3 Herstellung rekombinanter Zelllinien.....	47
4.3.1 Klonierung der extrazellulären Domäne von CD276.....	47
4.3.2 Transfektion in Hek Flp-In™-293-Zellen .....	48
4.3.3 Kultur, Ernte und Aufreinigung der extrazellulären Domäne von CD276 .....	49
4.3.4 Biotinylierung der extrazellulären Domäne von CD276.....	50
4.4 Herstellung von Peptidbibliotheken.....	51
4.4.1 Herstellung der Min10 Bibliothek für Phage Display .....	52
4.4.1 Erste PCR .....	52
4.4.1.2 Zweite PCR .....	52
4.4.1.3 Klonierung in pSEX81 .....	53
4.4.2 Herstellung der Min-Bibliothek für Ribosome Display .....	55
4.4.2.1 Erste und zweite PCR .....	55
4.4.2.3 Klonierung in PRDV.....	55
4.5 Phage Display.....	56
4.5.1 Phage Display mit der Ph.D.12 Bibliothek .....	56
4.5.1.1 Panning Ph.D.12 .....	56
4.5.1.2 Aufreinigung der Phagenpartikel Ph.D.12 .....	57
4.5.1.3 Phagentiter Ph.D.12 .....	57
4.5.2 Panning mit dem M13-Phagensystem .....	58
4.5.2.1 Panning und Aufreinigung des M13-Phagensystems.....	58

4.5.2.2 Phagentiter des M13-Phagensystems .....	58
4.6 Ribosome Display .....	59
4.6.1 <i>In vitro</i> Transkription .....	59
4.6.2 <i>In vitro</i> Translation .....	60
4.6.3 Panning des Ribosome Displays .....	60
4.6.4 reverse Transkription der mRNA.....	61
4.6.5 Vierte und fünfte PCR.....	61
4.7 Peptidsynthese .....	63
4.7.1 Festphasensynthese linearer Peptide.....	63
4.7.2 Faltung von Miniprotein-Scaffolds.....	64
4.7.3 Radiomarkierungen mit I-125 und I-131.....	64
4.8 <i>In vitro</i> Peptid-Charakterisierung.....	65
4.8.1 Bindungskinetiken an immobilisiertem Protein.....	65
4.8.2 Peptid-Arrays .....	65
4.8.3 Bindungskinetiken an Zellen .....	66
4.8.4 Spezifische Bindung .....	67
4.8.5 Bestimmung von internalisierter und extrazellulär gebundener Aktivität.....	67
4.8.6 Stabilität in humanem Serum.....	68
4.8.7 Stabilität <i>in vitro</i> .....	68
4.9 <i>In vivo</i> Peptid-Charakterisierung .....	68
4.9.1 Tumorinokulation .....	69
4.9.2 Intravenöse Peptidapplikation.....	69
4.9.3 $\gamma$ -Szintigrafie .....	69
4.9.4 Organverteilungsstudien .....	70
5 Ergebnisse .....	71
5.1 Herstellung der extrazellulären Domäne von CD276 .....	71
5.2 Screening nach einem geeigneten Zellsystem für die <i>in vitro</i> Experimente	73
5.2.1 CD276 .....	73
5.2.2 PDGFR $\beta$ .....	74
5.3 Übersicht von identifizierten Peptiden mittels Biopanning.....	74
5.4 Charakterisierung CD276.11.....	76
5.4.1 <i>In vitro</i> Charakterisierung CD276.11 .....	76
5.4.2 <i>In vitro</i> Stabilität CD276.11 .....	78
5.4.3 <i>In vivo</i> Charakterisierung CD276.11 .....	79
5.4.6.1 Organverteilungsstudien CD276.11.....	79
5.4.4 Optimierung der Bindungseigenschaften und Identifikation der minimalen Bindesequenz von CD276.11 .....	81

5.4.4.1	Fragment und Alanin-Scan .....	81
5.4.4.2	Peptid-Arrays CD276.11 .....	83
5.4.5	Stabilisierungsstrategien CD276.11 .....	84
5.4.6	Identifizierung des Metaboliten von CD276.11 .....	87
5.5	Charakterisierung PDGFR-P1 .....	94
5.5.1	Peptid Arrays PDGFR-P1 .....	94
5.5.2	Vergleich der Proteinsequenz von CD276 und PDGFR $\beta$ .....	97
5.5.3	Analyse der Derivate von PDGFR-P1 .....	98
5.5.3.1	Kinetiken der PDGFR-P1 Derivate .....	98
5.5.3.2	<i>In vitro</i> Kompetitionsstudien des Derivates G2 und des Fragments RRPFF .....	100
5.5.3.3	<i>In vitro</i> Internalisierung von $\gamma$ G2 und $\gamma$ RRPFF .....	102
5.5.4	Serumstabilitäten von $^{125}$ I- $\gamma$ G2 und $^{125}$ I- $\gamma$ RRPFF .....	102
5.5.5	<i>In vivo</i> Charakterisierung $\gamma$ G2 .....	103
5.5.6	Stabilisierungsstrategien für das Fragment RRPFF .....	105
5.5.6.1	Kinetikexperimente der Derivate von AV2 .....	105
5.5.6.2	$\gamma$ -Kamerabilder des Peptids $\gamma$ rrpff .....	107
6	Diskussion .....	107
6.1	CD276.11 .....	108
6.2	PDGFR-P1 .....	113
7	Ausblick .....	120
8	Tabellenverzeichnis .....	122
9	Abbildungsverzeichnis .....	123
10	Abkürzungsverzeichnis .....	127
11	Literaturverzeichnis .....	130
12	Anhang .....	I

## 1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollten spezifisch bindende Peptide gegen die extrazelluläre Domäne der Zielstruktur CD276, ein in verschiedenen Tumorarten überexprimiertes Membranprotein, identifiziert werden. Tumor spezifische Peptide finden in der Bildgebung sowie zielgerichteten Therapien Anwendung. Die hier identifizierten Peptide sollen als Leitstrukturen für neue Tracer zum Einsatz in der Bildgebung dienen.

Die Selektion der Peptide erfolgte mit Hilfe der Phagenbibliothek Ph.D12 sowie selbst hergestellten Peptidbibliotheken basierend auf Miniprotein-Scaffolds und zwei verschiedenen Display Systemen, dem Phage- und Ribosome Display. Peptide wurden anschließend durch Fmoc-Festphasensynthese hergestellt, wenn nötig entsprechend gefaltet sowie mit  $^{125}\text{I}$  radiomarkiert und in Kinetik-, Wettbewerbs- sowie Internalisierungsstudien charakterisiert. Vor dem Einsatz *in vivo* an Tumor tragenden Nacktmäusen wurden zudem Stabilitätsstudien in Serum vorgenommen.

Das Peptid CD276.11, welches der Ph.D.12 Bibliothek entstammt und mit Phage Display nach vier Panningrunden isoliert wurde, zeigte eine mit der CD276 Expression korrelierende Bindungsstärke an fünf verschiedenen Tumorzelllinien. Wettbewerbsexperimente mit radiomarkiertem Peptid und unmarkiertem Peptid wiesen auf eine spezifische Bindung an CD276 hin. Ein  $\text{IC}_{50}$  Wert von 750 nM konnte ermittelt werden. Stabilitätsexperimente in humanem Serum ergaben eine  $t_{1/2}$  von fünf Minuten. Der Versuch der Stabilisierung sowie Fragmentanalysen führten zu dem Schluss, dass es sich bei dem in der Serumanalyse entstehenden Metaboliten um einen  $^{125}\text{I}$  Tyrosinrest handelte. Diese Vermutung konnte durch Bindungsstudien von markiertem Tyrosin auf Zellen sowie Wettbewerbsversuche mit  $^{125}\text{I}$ -CD276 und unmarkiertem Tyrosin bestätigt werden.

Ein weiteres nach vier Panningrunden mit der Ph.D.12 Bibliothek und dem Phage Display System identifiziertes Peptid, das PDGFR-P1, wurde bereits zuvor in zwei unabhängigen Pannings gegen das Membranprotein PDGFR $\beta$  isoliert. Ziel war es hier, die Bindung an beide Zielproteine zu bestätigen und die Affinität des Peptids zu steigern. Mittels Peptid-Arrays konnte gezeigt werden, dass das Peptid sowohl an CD276 als auch an PDGFR $\beta$ , nicht aber an das Kontrollprotein FGFR band. Durch gezielten Austausch einzelner Aminosäuren sowie einer Fragmentanalyse auf dem Peptid-Array konnte ein Peptid G2 mit erhöhter Affinität identifiziert werden, welches anschließend *in vitro* sowie *in vivo* charakterisiert wurde.



## Abstract

Endoradiotherapy is a promising method to treat non-operable and metastasized tumors. A prerequisite of therapy success is tumor specific accumulation of the radioconjugates. Often tumor cells show a different proteome compared to normal cells and expression levels of proteins change. Due to the upregulation in cancer cells and the low expression or even absence in healthy tissue these molecules might be suitable targets for therapies and imaging. Aim of this study is to identify peptides specifically binding the extracellular domain of the membrane protein CD276 which is overexpressed in many different cancer types.

Peptide screening was carried out with the purchased peptide library Ph.D.12 as well as self constructed libraries based on miniprotein scaffolds using two different display systems: Phage- and Ribosome Display. Biopanning was carried out using a 12-mer peptide library from NEB™ against the purified extracellular domain of CD276. After four selection rounds the phage vectors were sequenced and amino acids were chemically synthesized by fmoc-synthesis. *In vitro* characterization was carried out using different cell lines expressing CD276. Binding and metabolic stability was analyzed in cell assays after labelling the peptide with <sup>125</sup>I. Stability tests were carried out with <sup>125</sup>I labelled peptide in human serum followed by HPLC analysis. *In vivo* analysis was carried out with nude mice carrying xenografts.

The peptide CD276.11 isolated with Ph.D.12 in Phage Display showed a correlation in binding affinity and expression level of CD276 on five different tumor cell lines. Competition experiments with <sup>125</sup>I-CD276 and unlabeled peptide revealed a specific binding with a calculated IC<sub>50</sub> of 750 nM. Stability experiments in human serum resulted in a stable metabolite. Due to metabolite formation after 1 minute in serum, CD276.11 needed to be stabilized for further application *in vivo*. All stabilization strategies failed and identification of the metabolite led to the conclusion that the degraded product is a radiolabeled tyrosine residue.

Second peptide identified through Phage Display with the Ph.D.12 library was PDGFR-P1. Due to identification in previous, independent pannings against PDGFRβ, aim was the validation of binding to both targets: CD276 and PDGFRβ. Peptide arrays confirmed binding to both proteins but not to the control protein FGFR. Furthermore single amino acid exchange and fragment scan led to a modified peptide G2 with higher affinity than the original peptide. G2 as well as a fragment of G2, the peptide AV2, were characterized *in vitro* as well as *in vivo*.

## **2 Einleitung**

Krebs ist nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems mit 7,6 Millionen Todesfällen die zweithäufigste Todesursache [WHO, 2012]. Am weitesten verbreitet sind dabei Krebsarten wie Lungen-, Magen-, Leber-, Enddarm- und Brustkrebs. Ursachen für die Entstehung von Tumoren sind dabei laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO): hoher Body-Mass-Index, ballaststoffarme Ernährung, zu wenig körperliche Betätigung, Alkohol- und Tabakmissbrauch sowie virale Infektionen z.B. mit dem Hepatitis B-/Hepatitis C- oder dem Humanen Papillom-Virus (HPV). Für 2030 werden steigende Zahlen von bis zu 13,1 Millionen Todesfällen pro Jahr erwartet [WHO, 2012]. Aber auch das Altern der Gesellschaft in westlichen Ländern mit hohen hygienischen Standards sowie immer bessere Diagnosesysteme und Behandlungsmöglichkeiten führen zu steigenden Diagnosezahlen von Krebsfällen, gleichzeitig aber sinkenden Mortalitätsraten für einige Tumorarten [1, 2].

### **2.1 Bildgebung und Krebs**

Für eine erfolgreiche Behandlung von Krebs sind eine genaue Diagnose der Tumorart und eine Lokalisation des Tumors unabdingbar. Derzeit stehen verschiedene Möglichkeiten der Diagnose zur Verfügung: Positronen Emissions Tomographie (PET), Single Photon Emissions Tomographie (SPECT), Computertomographie (CT) und Magnet Resonanz Tomographie (MRT).

#### **2.1.1 Tumor-Therapie und Diagnosemethoden**

Die Behandlung wird je nach Krebsart, Tumorgöße und -lokalisierung, Stadium der Krankheit sowie dem Allgemeinzustand des Patienten individuell angepasst. Für erfolgreiche Behandlungen ist deshalb eine Entwicklung von effektiven, Patienten orientierten Behandlungsmöglichkeiten wichtig, um unnötige, teure und nebenwirkungsreiche Therapien zu vermeiden. Bestehende Diagnose- und Therapiemethoden haben sich in den letzten Jahren stetig verbessert. Für verschiedene Zwecke der Darstellung des menschlichen Körpers bzw. von Geweben und Organen gibt es unterschiedliche Methoden. Zum einen gibt es die Möglichkeit hoch auflösende Bilder z.B. mit MRT oder CT zu erhalten. Nachteil ist hier, dass lediglich Tumoren ab einer Masse von ca. 1 g dargestellt werden können und sich

diese auch nicht eindeutig von gesundem oder entzündetem Gewebe abgrenzen lassen. Um dies zu kompensieren, wird oftmals eine Methode mit hohem Kontrast wie z.B. PET angeschlossen. PET wurde in den 1970er Jahren erstmals beschrieben [3] und ist eine nicht invasive diagnostische Methode zur dreidimensionalen Darstellung des Körpers. Es basiert auf der Gabe von Kontrastmitteln, welche z.B. Stoffwechselforgänge mit hohem metabolischem Umsatz oder Hypoxie anzeigen. Ein weit verbreiteter Tracer ist beispielsweise das Glukose-Analog Fluorodeoxyglukose (FDG), welche mit  $^{18}\text{F}$  markiert und zur Darstellung von

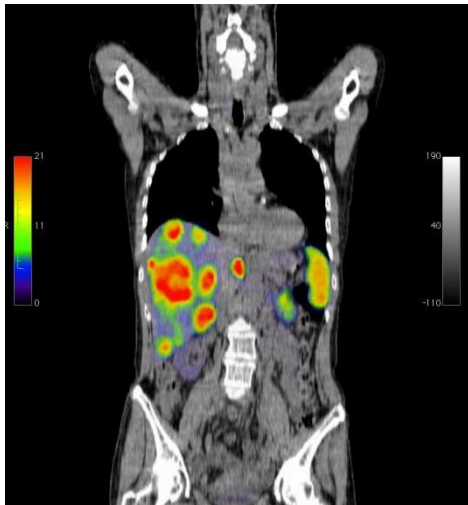


Abbildung 1: PET/CT 60 min nach i.v. Gabe von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC in einen Patienten mit metastasierenden neuroendokrinen Tumor. Die koronale Sektion zeigt multiple Metastasen in der Leber.

Weichteilen wie Gehirn, dem Herz- sowie Tumoren genutzt wird [4]. Das Glukose-Analogon wird von den Zellen wie Glukose aufgenommen. Vor allem Zellen mit hoher metabolischer Aktivität wie Krebs- und Hirnzellen haben einen hohen Umsatz und können so von Normalgewebe abgegrenzt werden. Eine Kombination von PET und CT ergibt durch Überlagerung der Bilder eine präzise Darstellung von Tumoren und Metastasen (PET) sowie umliegendem Gewebe (CT) (Abbildung 1). Im Falle der Therapie von

Krebs richtet sich der Fokus der Forschung in den letzten Jahren vermehrt auf kombinierte Therapien, da altbewährte Methoden wie Bestrahlung, Operation und Chemotherapie oft starke Nebenwirkungen und schlechte Resultate zeigen.

### 2.1.2 Gezielte Radionuklidtherapie

Die zielgerichtete Therapie von Tumoren ist eine alternative Methode zu gebräuchlichen Therapiemethoden. Neue Therapieansätze sollen vor allem Tumoren, die durch Operationen nicht erreicht werden können, sowie Metastasen darstellen und behandeln. Ein weiterer positiver Nebeneffekt ist die Reduzierung von Nebenwirkungen für umliegendes gesundes Gewebe. Vorteil dieser Methode ist außerdem, dass Liganden, welche bei der Diagnose eingesetzt wurden, auch für die spätere Therapie herangezogen werden können. Liganden, die sowohl für die Diagnose als auch zur Therapie eingesetzt werden können, werden „theranostics“ genannt. Durch Austausch der Radionuklide von diagnostischen zu therapeutischen Radionukliden können Tumore, die in der Diagnose sichtbar gemacht wurden, gezielt

behandelt werden. Zur Diagnose werden häufig Radionuklide wie  $^{68}\text{Ga}$  oder  $^{18}\text{F}$  eingesetzt. Zur Therapie verwendet man fast ausschließlich  $\beta$ -Strahler wie  $^{32}\text{P}$ ,  $^{131}\text{I}$  oder  $^{90}\text{Y}$  [5-7] selten auch  $\alpha$ -Strahler wie  $^{213}\text{Bi}$  oder  $^{225}\text{Ac}$ .

Endoradiotherapie ist eine Möglichkeit der gezielten Behandlung von Tumoren. Sie basiert auf Peptiden, Proteinen oder Antikörpern, die sich markiert mit Radionukliden, spezifisch im Tumorgewebe anreichern. Durch die hohe Selektivität der Moleküle werden Nebenwirkungen und toxische Effekte für angrenzendes Gewebe bzw. Organe auf ein Minimum reduziert. Voraussetzung für neue Endoradiotherapie ist die Entwicklung spezifischer Liganden für Tumor-Antigene oder im Tumorgewebe überexprimierte Rezeptoren zu entwickeln. Studien zeigen immer neue Zielstrukturen, welche mit Tumoren oder Tumor assoziierten Zellen einhergehen [8]. Da diese oft ausschließlich in Tumoren hoch reguliert sind und nur schwach bis gar nicht in Normalgewebe vorkommen, eignen sie sich für die diagnostische Bildgebung bzw. gezielte Radiotherapie. Liganden für Tumor-Antigene und -rezeptoren sind deshalb ideale Kandidaten für neue Tracer zur Darstellung von Tumoren oder für die Radionuklidtherapie.

Bisher gibt es einige Systeme für die Radiotherapie, die sowohl in klinischen Studien als auch zur Behandlung von Patienten eingesetzt werden (Tabelle 1).

**Tabelle 1: In der Nuklearmedizin eingesetzte Systeme zur Diagnose und Therapie.**

Vektor	Name	Anwendung	Referenz
Peptide	Exendin-4	Analog zu glucagon-like Peptid-1 (GLP-1)	[9, 10]
	Minigastrin	Gastrin/Cholecystokinin-2 (CCK-2) Rezeptor	[11]
	Bombesin	Gastrin-releasing Peptid Rezeptor (GRP-R) positive Tumoren	[12]
	$^{90}\text{Y}$ -DOTATOC $^{111}\text{In}$ -DTPATOC $^{177}\text{Lu}$ - DOTATATE	Gastroentero- und Pankreas-Tumoren	[13, 14]
Antikörper	Cetuximab	Plattenepithelkarzinom von Kopf- und Halstumoren, Kolorektalkarzinom	[15-17]
	Ibrimutomab	CD20-Antigen auf B-Zell Non-Hodgkin's Lymphomen	[18]
	Tiuxetan Rituximab	CD20-Antigen auf B-Zell Non-Hodgkin's Lymphomen	[19]

### **2.1.3 Peptid-basierte Therapien**

Peptid-basierte Therapien wie die Peptid Rezeptor Radionuklid Therapie (PRRT) werden durch Kopplung von Radionukliden mit Peptid-Liganden für Tumor assoziierte Oberflächenstrukturen, meist Tumor spezifisch überexprimierte Rezeptoren, erreicht. Peptidanaloga sind aufgrund ihrer ursprünglichen Funktion bestens für die Nachahmung von natürlichen regulatorischen Peptiden geeignet. Sie sind deshalb gute Alternativen für die Antikörper basierte Endoradiotherapie und zur Darstellung. Neben ihrer hoch affinen Bindung an Rezeptoren haben sie weitere Vorteile gegenüber Proteinen und Antikörpern: (1) Sie haben eine geringere Immunogenität, (2) sie sind kleiner und deshalb leichter herzustellen, eine Herstellung *in vivo* ist nicht mehr nötig, (3) sie haben eine geringere Toxizität und zeigen weniger partielle Remission [20, 21] und (4) sie zeigen eine schnellere renale Ausscheidung. Peptide werden deshalb immer öfter als Radiopharmaka eingesetzt. Ein Beispiel ist DOTATOC, welches zur Therapie von neuroendokrinen Tumoren des Pankreas, Neuroblastomen und von Meningiomen verwendet wird. DOTATOC ist ein Peptid, welches an den Somatostatin Rezeptor-2 bindet. Die Somatostatin Rezeptor-Bildgebung stellt ein Paradigma des Rezeptor-Targetings dar. Hier wurde erstmals ein in Tumoren überexprimierter Rezeptor als Zielstruktur genutzt. Vorteil ist hier die Tatsache, dass der Rezeptor bei Ligandenbindung internalisiert und somit in der Zelle zurückgehalten wird. An den Liganden gebundene Radionuklide verbleiben somit direkt am Zielort und können Tumorgewebe direkt bestrahlen.

### **2.2 Peptidbibliotheken**

Die ersten Bibliotheken wurden in den 1980er Jahren von Smith *et al.* zum Klonieren generiert [22]. Durch Insertion von Fremd-DNA am N-Terminus des pIII minor coat Proteins des filamentösen Phagen M13 konnte ein Fusionsprotein kreiert werden, welches aus dem Oberflächenprotein pIII und dem durch die inserierte DNA codierten Protein bestand. Durch Randomisierung von DNA wurden 1993 erstmals Bibliotheken zum Screening von Antikörperepitopen hergestellt [23-25]. Seither werden diese für viele verschiedene Anwendungen wie Protein-Protein Interaktionsanalysen und zur Charakterisierung von Antikörpern eingesetzt [26-31]. Smothers und Hartley zeigten wenig später, dass so identifizierte Zelloberflächenbindende Peptide oft Ähnlichkeiten mit Domänen von natürlich exprimierten Proteinen zeigen [31, 32]. Derzeit gibt es viele verschiedene Bibliotheken: lineare

und zyklische Peptidbibliotheken [26, 28], Antigen- oder Genfragment-Bibliotheken [27, 29] sowie die Kombinationen beider [30].

Durch kombinatorische Chemie ist es möglich, riesige Peptidbibliotheken herzustellen, die eine enorm große Population verschiedener Peptide hervorbringen. Diese werden zum Screening eingesetzt und auf wenige Kandidaten selektiert, die die gewünschten Eigenschaften, wie hohe Affinität zu Tumor assoziierten Rezeptoren aufweisen. Vorteil dieser Methode ist die enorme Anzahl an selektierten Kandidaten, die für die weitere Evaluation genutzt werden können.

Kombinatorische Peptidbibliotheken bestehen entweder aus komplett randomisierten Peptiden oder aber basieren auf Scaffoldstrukturen, die variable Sequenzen von wenigen Aminosäuren tragen [33, 34]. Die Konstruktion von Bibliotheken erfolgt durch die Methode der Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit speziellen Trinukleotidprimern, die für alle 20 natürlichen Aminosäuren codieren [35, 36]. Ausgeschlossen werden die Aminosäuren Cystein, um ungewollte Cysteinbrückenbildungen innerhalb der Peptide zu vermeiden, sowie Stopp-Codons [37]. Theoretisch möglich sind 64 Codons, eingesetzt werden aber nur 20 Trinukleotide, um alle 20 Aminosäuren abzudecken.

In dieser Arbeit wurde die käufliche Bibliothek PH.D.12<sup>TM</sup> von New England Biolabs verwendet. Grundlage ist hier die Klonierungsstrategie von Smith *et al.* [38]. Das pIII minor coat Protein ist N-terminal mit der komplett randomisierten, linearen Peptidbibliothek fusioniert. Die Peptidbibliothek besteht aus 12 variablen Aminosäuren, welche linear angeordnet sind. Jede Aminosäureposition kann von jeder der 20 natürlichen Aminosäuren belegt werden, sodass eine theoretische Diversität von  $20^{12}$  entsteht, was einer Anzahl von  $4,1 \times 10^{15}$  verschiedenen Peptiden entspricht. Das entstehende Oberflächenprotein, welches in fünf Kopien um das Phagenende von M13 angeordnet ist, moduliert ursprünglich die Infektiösität des Phagen durch Bindung an die F-Pili von Rezipienten-Bakterienzellen [33, 34]. Durch die Insertion der Bibliothek in frame mit dem Oberflächenprotein pIII in das Phagemid repräsentiert der Phagenpool nun die Bibliothek. Wichtig ist hierbei die Kopplung von Genotyp (auf dem Phagemid codierte Bibliothek) mit dem Phänotyp (präsentiertes Protein auf der Phagenoberfläche), die zur späteren Identifikation der Aminosäuresequenz der Peptid-Binder unabdingbar ist.

Da die Stabilität von linearen Peptiden im humanen Serum oft unzureichend ist, müssen für die *in vivo* Applikation verschiedene Optimierungsstrategien

herangezogen werden. Scaffold basierte Systeme gewinnen dabei immer mehr an Bedeutung. Grundlage sind kleine gefaltete Peptide oder Miniproteine, welche durch ihre dreidimensionale Struktur und Cysteinbrücken einen hohen Schutz vor proteolytischen Abbau *in vivo* bieten. Vorteile sind hier außerdem eine schnelle Clearance und Bindungsaffinitäten im nanomolaren Bereich [39, 40]. Durch die Modifikation und die Insertion von variablen Peptidsequenzen können Bibliotheken mit einer sehr hohen Variabilität entstehen. Eingesetzt werden meist Peptide oder Miniproteine, deren Grundstrukturen (=Scaffold) auf  $\alpha$ -Helices und Cysteinreichen Gerüststrukturen wie „Knottins“ basieren, um eine hohe Stabilität im humanen Serum zu gewährleisten. Viele Scaffold-Proteine eignen sich für den Einsatz in Display Systemen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Miniprotein-Scaffold-basierte Proteine für die Anwendung in Display Systemen. Modifiziert nach Haberkorn et al. [41].

Name	Scaffold	AS	Strukturelemente	Referenz
Affibody	Protein A	58	2 $\alpha$ -Helices	[42]
Flitrx	Thioredoxin	108	1 loop	[43]
Kunitz domain	BPTI/APPI	58	1-2 loops	[44]
Knottins	CBD/EETI-II	36/28	$\beta$ - Faltblätter /loops	[45]
	Min-23	23	$\beta$ -turn	[46]
	Tendamistat	74	2-3 loops, $\beta$ - Faltblätter	[47]
	Cellulose binding protein	36	Dreifache $\beta$ - Faltblätter	[48]
PDZ domain	Ras binding protein AF-6	100	3 $\alpha$ -Helices, 5 $\beta$ -Faltblätter	[49]
Repeat motif	Ankyrin repeat	33	2 $\alpha$ -Helices, -turn	[50]

### 2.3 Display Techniken

Um hoch affine Binder für Peptid-basierte Rezeptor Therapien zu identifizieren, bedarf es riesiger Peptid-Bibliotheken und einer geeigneten Selektionstechnik. Display Techniken stellen dabei eine einfach zu handhabende Methode zur Identifizierung spezifischer Miniproteine und Peptide dar, welche an Target-Strukturen binden. Allen Display Systemen liegt dabei das gleiche Prinzip zugrunde: die Kopplung von Geno- und Phänotyp des Proteins bzw. Peptids.

Derzeit gibt es verschiedene Display-Techniken: Phagen-/ Viren-Display [38], Bakterien-Display (CIS) [51, 52], Hefe-Display [53], Ribosome Display [54], mRNA-Display [55] und DNA-basierte *in vitro* Systeme [56]. Display Systeme können unterschieden werden in zellbasierte Systeme wie Phagen- und Hefe-Display und zellfreie Systeme wie Ribosome- und mRNA-Display.

In folgender Arbeit wurden das Phagen- und Ribosome Display verwendet. Phage Display ist eine einfache Methode, um hoch affine Binder in kurzer Zeit zu

selektieren. Alle Arten von Bibliotheken können präsentiert werden. Der Umgang mit Phagen und Bakterien erfordert keine besondere Vorsicht. Im Gegensatz dazu steht das Ribosome Display, welches ein hohes Maß an Achtsamkeit bei der Laborarbeit verlangt. Die Handhabung von RNA ist in jedem Fall schwierig, da Arbeiten bei 4°C ausgeführt werden müssen. Außerdem ist eine Kontamination mit RNasen praktisch überall möglich und erfordert besonderes Augenmerk und speziell vorbehandelte Materialien. Außerdem eignen sich nicht alle Peptid-Bibliotheken für die Anwendung im Ribosome-Display, da Peptide eine minimale Größe aufweisen müssen, um vom Ribosomen-Komplex richtig präsentiert zu werden. Dennoch stellt das Ribosome Display eine gute Methode zur Selektion hoch affiner Binder im niedermolaren Bereich dar.

### 2.3.1 Phage Display

Phage Display ist eine oft genutzte Methode zum Screening von Antikörper-, Protein- und Peptidbibliotheken. Oberflächenstrukturen von Phagen können leicht modifiziert werden, ohne die benötigte Infektiosität zu verlieren. Im Gegensatz zu lytischen Phagen wie dem T4-Phagen replizieren filamentöse Phagen wie M13, f1 und fd, die für das Phage Display genutzt werden, ohne ihren Wirt zu zerstören, weshalb sie

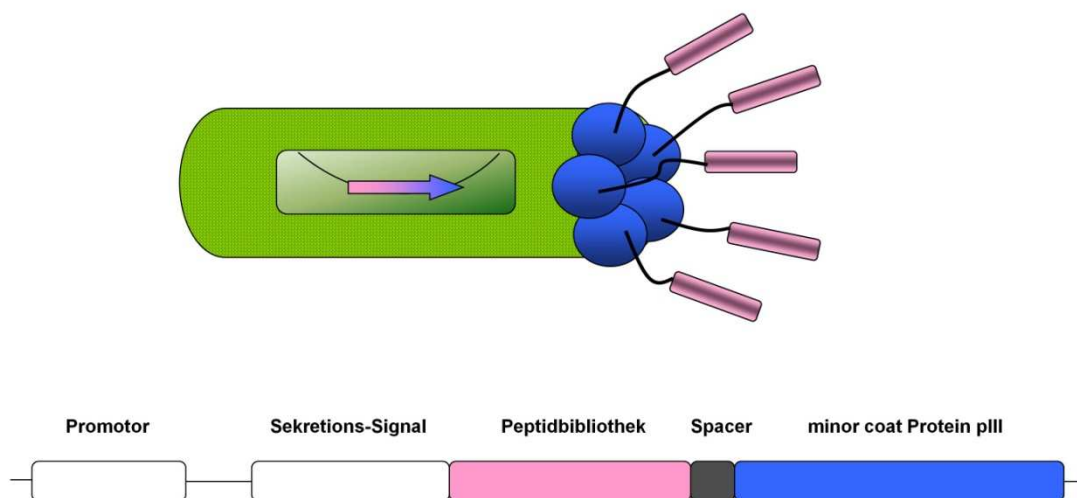


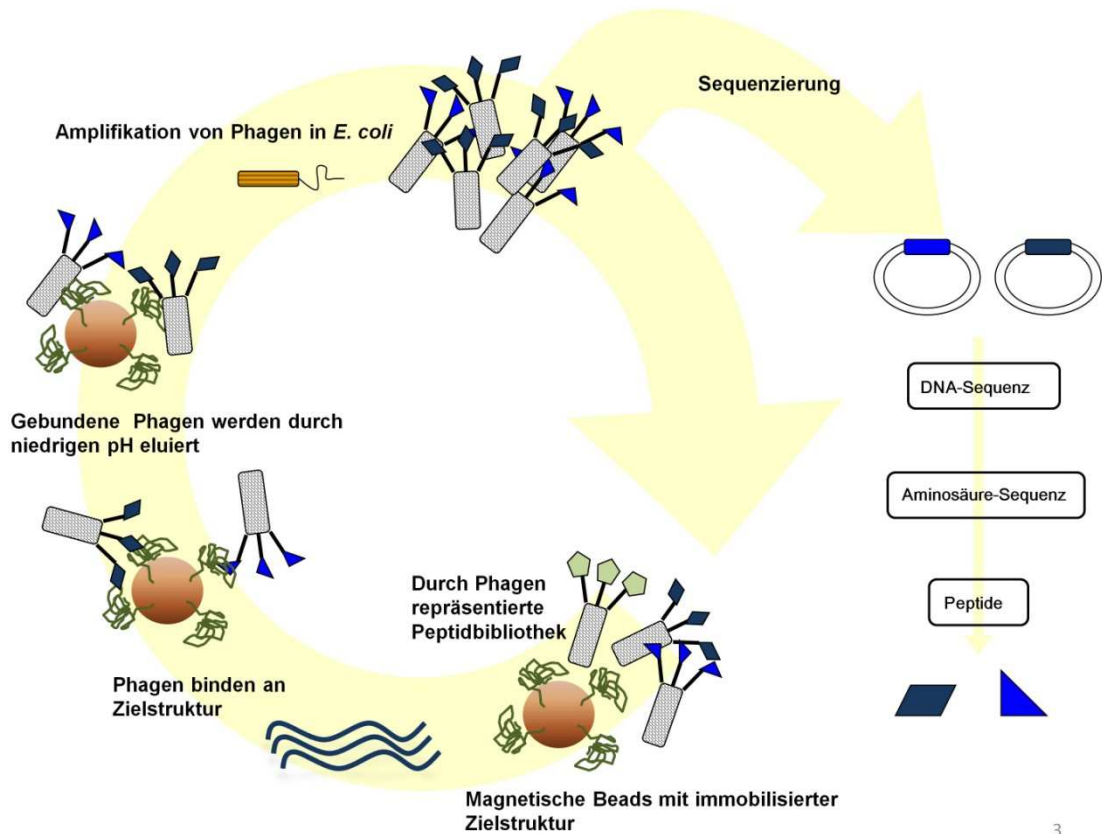
Abbildung 2: (Oben) Phage mit genetisch modifiziertem Phagemidvektor. (Unten) Die Peptidbibliothek ist „in frame“ durch einen Spacer mit dem Minor Coat Protein III fusioniert. Das N-terminale Sekretionssignal erlaubt die Präsentation des Fusionsproteins auf dem Phagen. So modifizierte Phagen werden für das Phage Display System eingesetzt.



sich gut für die Anwendung zum Biopanning eignen. Als Biopanning bezeichnet man den Prozess des Displays von Peptid- oder Protein-Bibliotheken zu Zielmolekülen zur Selektion hoch affiner Binder. Erstmals beschrieben Smith *et al.* die Präsentation von Polypeptiden auf einer Phagenoberfläche von M13 [38] und legten damit den Grundstein für alle Display Techniken. Normalerweise wird die Bibliothek mit dem N-Terminus des minor coat Proteins pIII fusioniert [38, 43]. Dieses Fusionsprotein wird vom Phagen präsentiert. Jedes Phagenende trägt fünf Kopien des pIII Proteins. Zusammen mit einem weiteren Oberflächenprotein, dem pVI, ist es an der Infektion von Bakterien und dem Aufbau der Phagenpartikel beteiligt. Um die richtige Faltung des präsentierten Proteins/Peptids zu gewährleisten, wird zusätzlich ein Abstandshalter, der sogenannte Spacer, von drei Glycinen zwischen dem pIII und der Bibliothek eingefügt (Abbildung 2). Grundsätzlich unterscheidet man zwei Varianten des Phage Display: polyvalent und monovalent [57]. Für kleine Moleküle wird das polyvalente Phage Display (z.B. PH.D.12<sup>TM</sup>) verwendet. Das Capsid-protein ist hier in der Lage das Peptid zu präsentieren, ohne dass die Funktionalität der Oberflächenproteine verloren geht. Die im monovalenten Phage Display präsentierten Peptide/Proteine dagegen sind so groß, dass eine normale Funktion der Oberflächenproteine des Phagen nicht mehr möglich ist. Deswegen wird hier eine Mosaikstruktur von rekombinanten und Wildtyp-Capsidproteinen aufgebaut. Dies geschieht mit Hilfe eines zugegebenen Helfer-Phagen, der für die ursprüngliche Variante des Capsidproteins codiert. Wildtyp- als auch modifizierte Phagen befallen die gleiche Bakterienzelle. Es kommt zur Translation von Wildtyp- als auch modifizierten Capsidproteinen. Der Aufbau der Phagenpartikel geschieht sowohl aus Capsidproteinen des Helfer-Phagen als auch aus Phagen des Biopannings, was zu einer Mosaikstruktur führt. Weiterhin codiert der Helferphage für Replikationsproteine und zusätzlich zur Verpackung der Phagemide benötigte Proteine.

Abbildung 3 zeigt einen kompletten Panningzyklus auf magnetischen Beads, die mit Targetprotein beladen sind. (1) Die Phagenbibliothek wird zunächst mit dem immobilisierten Target inkubiert. (2) Ungebundene Phagen werden durch stringentes Waschen entfernt. (3) Die Elution der Binder erfolgt mittels niedrigem pH mit Glycin-Puffer. Hoch affine Binder können durch einen weiteren Schritt mit 0,1-1 mM Lösung eines bekannten Liganden gelöst werden. (4) Die eluierten Phagen werden anschließend in *E. coli* amplifiziert und aufgereinigt. (5) Die so vorselektierte Bibliothek wird erneut in einen Panningzyklus eingesetzt, um hoch affine Binder zu

erhalten. (6) Nach drei bis sechs Panningzyklen können angereicherte Phagen titriert und die isolierten Phagemide sequenziert werden. Affinitätskonstanten der durch Phage Display selektierten Binder liegen etwa im Bereich mikro- bis nanomolar. Generell kann die Affinität durch weitere Biopannings mit einer Zweitbibliothek, generiert aus mutierten Varianten des Binders oder durch den Einsatz in Ribosome Display erhöht werden [58].



3

Abbildung 3: Phage Display Zyklus auf immobilisiertem Target-Protein gebunden an magnetische Beads.

### 2.3.2 Ribosome Display

Erstmals beschrieben wurde das Ribosome Display von Mattheakis *et al.* als zellfreie Methode des Biopannings zur Selektion von Peptidliganden für Antikörper [59]. Zellfreie Systeme haben viele Vorteile gegenüber zellbasierten Systemen wie dem Phage- oder Bakterien Display. Vor allem die Transformation der Bibliothek in Bakterien führt bei zellbasierten Systemen zu einem erheblichen Diversitätsverlust. Beispielsweise wird die theoretische Variabilität einer 12 Aminosäuren großen Bibliothek von theoretisch  $4,1 \times 10^{15}$  auf praktisch 0,001 % der Ursprungsdiversität reduziert [37]. In zellfreien Systemen ist es dagegen sogar möglich, die Variabilität der Bibliothek noch zu steigern. Dies geschieht durch selektiv eingefügte Error-Prone-PCR-Schritte oder Techniken wie DNA-Shuffling [60, 61].

Alle Display-Systeme basieren auf der Kopplung von Geno- und Phänotyp von Peptiden, Proteinen oder Antikörpern. Bei der Ribosome Display-Technologie ist der Phänotyp, das naszierende Peptid, mit seinem Genotyp der korrespondierenden mRNA, im Peptid-Ribosomen-mRNA-Komplex verbunden.

Der Aufbau der Bibliotheken muss dafür in mehreren Schritten erfolgen. Zunächst muss die Bibliothek mit Trinukleotidprimern durch PCR generiert werden. Die Tripletprimere enthalten dabei sowohl die Bibliothek als auch durch Überhangprimere angefügte flankierende Restriktionsschnittstellen, die das Inserieren der Bibliothek in den Ribosome Display Vector (pRDV) ermöglichen [62]. Der Vektor pRDV enthält eine multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site), die auf der 3' Seite von der Shine Dalgarno Sequenz (SDS) sowie dem T7-Promotor mit dem Startcodon flankiert ist. Der T7-Promotor stellt dabei den Startpunkt für die RNA-Polymerase bei der *in vitro* Transkription dar, die SDS fungiert als Ribosomenbindestelle (RBS) zur Initiation der *in vitro* Translation, welche durch Ablesen der mRNA Templates die Bibliothek in Peptid-Ribosomen-mRNA-Komplexe umschreibt. An der 5' Seite befindet sich ein Spacer, der abgeleitet ist vom *tolA*-Gen von *E.coli*, welches ursprünglich an der Resistenz gegenüber Colicinen beteiligt ist [63]. Der Spacer ist essentiell für die Faltung des durch die Bibliothek codierten Moleküls. Ohne den Spacer, der als Abstandshalter gegenüber dem Ribosomen fungiert, könnte sich eine native 3-D-Struktur nicht ausbilden. Das so präsentierte Molekül würde also nicht in seiner natürlichen Form dargestellt, was zur Selektion von Bindern führt, die nicht an das native Targetprotein binden. Wichtig ist auch das Fehlen eines Stopp-Codons am Ende der Bibliothek. Durch Klonierung der Bibliothek „in frame“ mit dem Spacer wird

ein Fusionsprotein generiert. *In vivo* kommt es bei der Translation durch Translations-Terminationsfaktoren (Translation release factors, RFs), welche an das Stopp-Codon binden und eine normale tRNA imitieren, zum Abbruch der tRNA-Kette und letztlich zur Dissoziation der Ribosomenuntereinheiten. Die *in vitro* Translation läuft nun so lange ab, bis die den Spacer codierende mRNA vollständig abgelesen ist. Durch das Fehlen des Stoppcodons kommt es nicht zu einer Dissoziation der Ribosomenkomplexe. Die mRNA, das Peptid sowie die zwei Ribosomenuntereinheiten bleiben miteinander verbunden (Abbildung 4B). Die Bibliothek wird so konstruiert, dass die codierende Template-DNA folgendermaßen aufgebaut ist: 3' T7-Promotor, SDS, Bibliothek ohne Stopp-Codon und Spacer 5' (Abbildung 4A). Die Template-DNA wird *in vitro* in eine mRNA-Bibliothek transkribiert und *in vitro* durch Translation in Peptid-Ribosomen-mRNA-Komplexe translatiert. *In vivo* werden anschließend posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel Disulfidbrücken, vorgenommen. Dies geschieht *in vivo* bei Eukaryoten im Endoplasmatischen Retikulum oder dem Periplasma von Bakterien. Beim Einsatz von Bibliotheken mit Disulfidbrücken, wie dem Min23 Scaffold, geschieht dies *in vitro* durch die Zugabe des Enzyms Disulfidisomerase [64]. Natürlicherweise hilft weiterhin die transfer-messenger RNA (tmRNA) das Polypeptid vom Ribosomenkomplex zu entlassen [65], *in vitro* wird dies durch die Zugabe von antisense RNA zum Translationsmix verhindert [66].

Abbildung 5 zeigt einen Panningzyklus des Ribosome Displays. (1) Die DNA-Bibliothek, welche einen T7-Promotor, die SDS, die Peptid-Sequenz sowie einen Spacer ohne Stopp-Codon enthält, wird *in vitro* in mRNA-Templates umgeschrieben. (2) mRNA-Templates werden anschließend *in vitro* durch Ribosomen translatiert. Nach der Anheftung der Ribosomenuntereinheiten an der SDS stromaufwärts des Start-Codons bewegen sich die Ribosomen bis zum Ende der mRNA. Durch das fehlende Stopp-Codon bleiben mRNA, Ribosomen und Peptid miteinander verbunden und das Peptid faltet sich mit Hilfe der Proteindisulfidisomerase in seine natürliche Form. (3) Das Zielprotein wird immobilisiert und mit den Ribosomen-Komplexen inkubiert. Nicht gebundene Komplexe werden durch stringente Waschschrte entfernt. (4) Um die mRNA der Binder zu isolieren, wird Elutionspuffer zugegeben, welcher EDTA enthält. EDTA komplexiert  $Mg^{2+}$  Ionen, die zur Stabilisierung der Ribosomenkomplexe benötigt werden. Die Ribosomenuntereinheiten dissoziieren auseinander und das Peptid und die zugehörige mRNA werden entlassen.

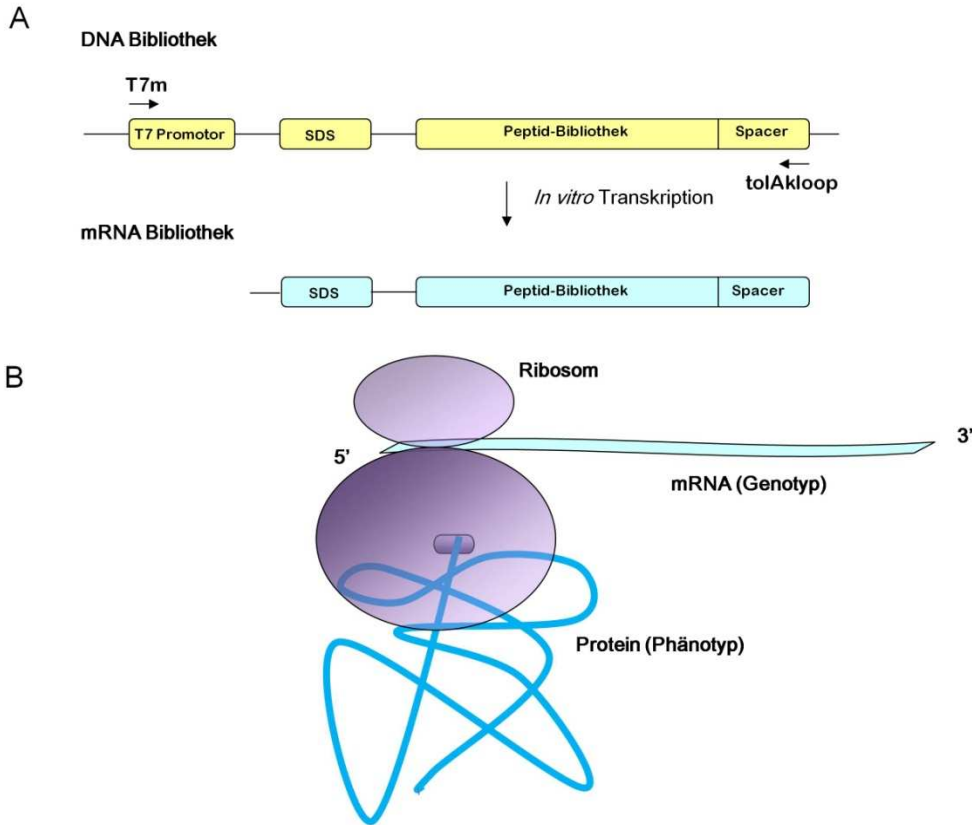


Abbildung 4: (A) Aufbau der Bibliothek für das Ribosome Display. Umwandlung der DNA Bibliothek in eine mRNA Bibliothek durch *in vitro* Transkription. (B) Der Peptid-Ribosomen-mRNA-Komplex zum Einsatz im Biopanning entsteht durch *in vitro* Translation der mRNA Bibliothek.

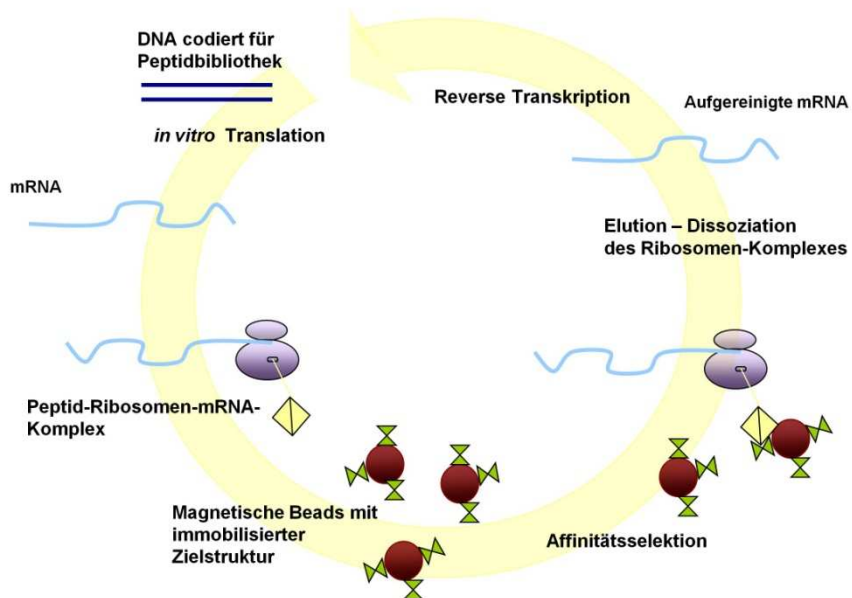


Abbildung 5: Panningzyklus Ribosome Display auf immobilisiertem Targetprotein an magnetischen Beads.

Die Elution mit hoch affinen Liganden ist ebenfalls möglich. (5) Für die anschließende reverse Translation wird die mRNA zunächst aufgereinigt. (6) Die resultierende cDNA enthält lediglich die Peptid-codierende Sequenz. Um T7-Promotor, SDS und Spacer anzuhängen sind PCR-Schritte nötig. Bei diesem Schritt ist außerdem das Einfügen einer Error-Prone PCR zur Erhöhung der Diversität möglich. Für Peptide mit einer Affinität im nanomolaren oder im subnanomolaren Bereich werden drei bis sechs Panningrunden durchgeführt. Durch Strategien wie off-rate Selektion können Peptide mit Affinitäten bis zu einem picomolaren Bereich erzielt werden [67].

## 2.4 CD276

CD276 wird der Klasse der Immunglobuline (Ig) zugeordnet. Bei CD276, auch als B7-H3 oder B7RP-2 bezeichnet, handelt es sich um ein 77 kDa großes glykosyliertes Transmembranprotein der Klasse I, welches an der Immunantwort beteiligt ist. Es gehört der Familie der B7 Moleküle an, da es aus einem N-terminalen Signalpeptid, extrazellulären V- und C-Ig-like- Domänen, einem Transmembranteil und einem 45 Aminosäuren langen C-Terminus zusammengesetzt ist. Die B7 Familie und deren Rezeptoren, die CD28 Familie, sind an der Bindung von Antigenen an T-Zellen beteiligt [68]. Dies geschieht durch positive Kostimulation und negative Koinhibition. Erstmals beschrieben wurde B7-H3 2001 von Chapoval *et al.* als Molekül, welches an der Kostimulation der T-Zell-Antwort und IFN- $\gamma$  Produktion beteiligt ist. B7-H3 fungiert hier als Inhibitor der CD4 T-Zell Aktivierung, welcher gleichermaßen die Produktion von Effektorzytokinen wie IL-4 und IFN- $\gamma$  anregt [69]. Zusätzlich ist es an der Stimulierung von primären CD8 zytotoxischen T-Zellen (CTLs) beteiligt, welche nachweislich das Wachstum des Tumors verlangsamen [70]. Die genaue Funktion sowie der Funktionsmechanismus sind noch unklar. Bekannt sind zwei hoch konservierte Isoformen: humane und murine Form [71]. Diese unterscheiden sich in der Anzahl der V- und C-Ig-like- Domänen. Das humane Protein (4Ig B7-H3) besteht aus vier tandemartig hintereinander angereihten Ig-like Domänen, das murine hingegen nur aus zwei Domänen (2Ig B7-H3).

Die Expression des Proteins ist im Gegensatz zu anderen Familienmitgliedern der B7-Familie, die fast ausschließlich auf Immunzellen zu finden sind, auch auf Normalgewebe wie Leber, Lunge, Blase und Brust exprimiert [71]. Auch CD276-RNA ist im Gegensatz zu den anderen B7 Mitgliedern in nahezu allen humanen Geweben vorhanden. Allerdings wird die Proteintranslation durch microRNAs reguliert [72], sodass sich CD276 dennoch als Ziel für die Entwicklung von Radiopharmaka eignet, da das Protein in vielen humanen Krebsarten wie Prostatakrebs, NSCLC (Non small cell lung cancer), Magenkrebs, Kolorektalkarzinom und Ovarialkarzinom überexprimiert ist [71, 73]. Studien zeigen vor allem bei Prostatakarzinomen, aber auch bei Clear Renal Cell Karzinom, Kolonkarzinom sowie Ovarialkarzinom eine Korrelation der B7-H3 Expression mit Metastasierung, Wiederauftreten des Karzinoms und Todeszeitpunkt des Patienten [74-77]. Seaman *et al.* konnten zudem zeigen, dass CD276 im Falle von pathologischer, nicht aber bei physiologischer Angiogenese überexprimiert ist [78]. Angiogenese spielt eine große Rolle für Tumorwachstum, das

Therapieansprechen sowie den Therapieerfolg. Um Effekte und Planung von Therapien zu optimieren, kann sich die Darstellung von Angiogenese im Tumorgewebe als nützlich erweisen. Eine neuere Studie weist außerdem auf eine erhöhte Sensivität gegenüber Chemotherapeutika sowie reduziertes Auftreten von Metastasen hin, welche über „Gene Silencing“ von CD276 durch RNA-Interferenz mit Signaltransduktionswegen bei nicht-immunologischen Systemen vermittelt wird [79-81].

## 2.5 PDGFR $\beta$

Der Platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR $\beta$ ) gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. PDGFR sind Transmembranrezeptoren, die in die autokrine Wachstumsstimulation von Zellen involviert sind und bei Zellproliferation, Zellmigration und Zellteilung eine wichtige Rolle spielen [82-84]. PDGFR $\beta$  ist im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der PDGF-Familie wie auch CD276 an der Angiogenese beteiligt [85]. Durch Rekrutierung von Perizyten, kommt es zur Gefäßreifung [86]. PDGFR $\beta$ -Expression auf Tumor-Perizyten bei Kolorektalkarzinomen wurde erstmals 1993 von Sundberg *et al.* nachgewiesen [87]. Die Signifikanz der PDGFR $\beta$ -exprimierenden Perizyten bei der Tumor-Angiogenese wurde in vielen weiteren Arbeiten zum einen *in vitro*, zum anderen *in vivo* nachgewiesen [88-90]. Weiterhin ist PDGFR $\beta$  in verschiedenen malignen Tumoren, wie z.B. in Pankreaskarzinomen und Gliomen überexprimiert [91, 92]. Die Tatsache, dass PDGFR $\beta$  sowohl in Tumoren als auch im Zusammenhang mit Angiogenese überexprimiert ist, macht es zu einem interessanten Target für die diagnostische Bildgebung und in der Radiotherapie. Derzeit gibt es verschiedene Strategien der Inhibition des PDGFR $\beta$  durch Imatinib (Glivec®, Novartis), Dasatinib (Sprycel®, Bristol Myers-Squibb) oder Sunitinib (Sutent®, Pfizer), die zur Behandlung chronischer myeloischer sowie akuter lymphatischer Leukämie, Nierenzellkarzinomen und Stromatumoren eingesetzt werden. Aufgrund ihrer Pharmakokinetik ist der Einsatz als Tracer oder Radiopharmazeutikum aber eher unwahrscheinlich. Die Suche nach neuen Möglichkeiten des PDGFR $\beta$ -Targeting für Diagnostika ist deshalb unabdingbar.



## 2.6 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Hochdurchsatzmethoden wie Phage Display und Ribosome Display eingesetzt werden, um spezifisch bindende Peptide gegen Zielstrukturen zu entwickeln, die in Tumorgewebe überexprimiert sind. Diese Peptide können später zur nicht-invasiven Diagnose bzw. auch zur Therapie eingesetzt werden. Als Zielstrukturen wurden CD276 sowie PDGFR $\beta$  identifiziert. Mithilfe von Peptidbibliotheken und Biopanning sollen hoch spezifische Binder gegen rekombinant hergestellte extrazelluläre Domänen identifiziert werden. Nach erfolgreicher Selektion von Peptiden im Biopanning werden Peptide chemisch synthetisiert und mit Radionukliden wie  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{144}\text{Lu}$  oder einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und in Bindungsstudien an Zellen und rekombinanten Proteinen eingesetzt. Diese untersuchen die Affinität, Internalisierung und Spezifität der Bindung. Eine Stabilitätsuntersuchung erfolgt in humanem Plasma. Neben kommerziellen Bibliotheken mit linearen Peptiden werden dabei auch laboreigene Bibliotheken eingesetzt, die auf der Basis von Gerüststrukturen (Miniprotein-Scaffolds) hergestellt werden. Bei erfolgreichem Austesten *in vitro* werden anschließend Bioverteilungsstudien an tumortragenden Tieren sowie Bildgebungsexperimente mit Kleintierkameras (PET und SPECT) durchgeführt.

## 3 Material

### 3.1 Geräte

Autoklav Systec 5075 EL	Systec, Wettenberg
ÄKTApurifier 10	GE Healthcare, München
Analysenwaage	Mettler, Zürich, Schweiz
Bakterien Brutschrank	Memmert, Schwabach
Bakterienkulturschüttler	Sanyo Gallenkamp PLC, Leicester, UK
Bunsenbrenner IBS Fireboy plus	Integra Bioscience, Fernwald
Camera Color View XS digital	Olympus, Hamburg
Chromolith® SemiPrep-Säule RP18e (4,6 × 100 nm)	Merck, Darmstadt
DynoMag™ Spin Magnet	Invitrogen, Darmstadt
Eismaschine MF30	Scotsman, Vernon Hills
Feinwaage (MC 1)	Mettler Toledo, Göttingen
Filmkassette	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
GABI Star	Raytest GmbH, Straubenhardt, Germany
Gefrierschrank (-80 °C) Forma-86C	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Gelapparatur Mini-Protean Tetra Cell	BioRad, München
Gelelektrophorese-Apparatur	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Gene Pulser	Eppendorf, Hamburg
HPLC-System 1100 Series	Agilent Technologies, Waldbronn
Hyper-Prozessor	Amersham Pharmacia, Freiburg
Kleintier-PET (Inveon)	Siemens, Erlangen
Kryo-Einfrierbox	Nalgene, Rochester, USA
Kühl-Gefrierkombination CUP3021	Liebherr, Ochsenhausen
Kühltischzentrifuge Eppendorf 5415R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop BX 50	Olympus, Hamburg
Lichtmikroskop Eclipse TS100	Nikon, Amstelveen, Niederlande
Lyophylle Alpha-2	Christ, Osterode
Magnetrührer (Typ MR11)	Heidolph Instruments, Schwabach
MALDI-TOF-3 Spektrometer	Kratos Instruments, England
Nassblot-Kammer - Criterion blotter	Biorad, München
Magnetic beads M280	Invitrogen, Darmstadt
MALDI-3	Kratos Instruments, England
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau

---

Mikro-Küvette, Quarzglas	Carl Roth, Karlsruhe
Mikrowelle	SHARP, Hamburg
Millipore-Anlage Purelab PlusUV	USF Elga, Ransbach-Baumbach
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop ND1000	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Peptid-Synthesizer	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
pH-Meter (Basic Meter PB-11)	Sartorius AG, Göttingen
Pipetten <10 µl, <200 µl, <1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet pro	Brand, Wertheim
Real-Time PCR System StepOne Plus	Applied Biosystems, Darmstadt
Schütteltisch	Hecht GmbH & Co., Sondheim
Sterilbank (SG-600m)	The Baker Co. Inc., Sanford, ME, USA
Strahlungsmessgerät 8-R5A	Shimadzu, Japan
Stickstofftank Apollo	Messer Griesheim, Krefeld
Synthesizers ABI433A	Applied Biosystems, Darmstadt
TECAN Sunrise	Tecan, Crailsheim
Thermo Cycler MJ-Mini	Bio-Rad, München
Thermomixer (5436)	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (5415 D)	Eppendorf, Hamburg
Ultraspec 3100 pr	Amersham Bioscience, Feiburg
Ultrazentrifuge Discovery 90SE	Sorvall, München
UV-Leuchttisch	Peqlab Biotechnology, Erlangen
Vi-Cell XR	Beckman Coulter, Krefeld
Videoprinter (P91W)	Mitsubishi Electric Corporation, Kyoto, Japan
Vortex-Schüttler Genie 2	Bender & Hobei, Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel
X-Bridge C4 3.5 Säule (4.6 × 150 mm)	Waters Corp., Millford Massachusetts, USA
Zellinkubator HERAcell 240i	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge (Varifuge 3.OR)	Heraeus Instruments, Osterode
γ-Counter(COBRA II D5002)	Packard Instrument, Illinois, USA
γ-Counter (LB951G)	Berthold, Bad Wildbad
γ-Imager	Biospace, San Francisco, USA

### 3.2 Glaswaren

Flaschen	Duran Schott, Mainz
Erlenmeyerkolben	Fisherbrand, Schwerte
Messzylinder	Brand, Wertheim
Glas-Pasteurpipetten	Brand, Wertheim

### 3.3 Chemikalien und Enzyme

3-Aminopropyltriethoxysilan	Roth, Karlsruhe
Aceton	Normapur, VWR Prolabo, Darmstadt
Acetonitril	LiChrosolv®, Merck, Darmstadt
Agar	Sigma-Aldrich Buchs, Schweiz
Agarose	Invitrogen, Darmstadt
Aminosäuren Ribosome Display	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, München
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Ampuwa	Braun, Melsungen
Acetylphosphat	Sigma-Aldrich, München
ATP	Roche, Mannheim
Bicine	Sigma-Aldrich, München
Biotin	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
BSA (Fraktion V, pH 7, lyophilisiert)	Serva, Heidelberg
cAMP	Sigma-Aldrich, München
$C_2H_3KO_2$	Sigma-Aldrich, München
$C_4H_6MgO_4$	Sigma-Aldrich, München
$CaCl_2$	Sigma-Aldrich, München
ChloraminT	Riedel-de Haen, München
Chloramphenicol	Roche, Mannheim
Chloroform	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ciprobay100 (0,5% v/v)	Bayer, Leverkusen
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
DEPC	Roth, Karlsruhe
Dichlormethan (DCM)	Applied Biosystems, Darmstadt
Diethylether	Zentrallager Universität Heidelberg
Diethylpyrocarbonat	Roth, Karlsruhe
DIPEA	Sigma-Aldrich, München

---

DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, München
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA-Polymerase KOD	Merck, Darmstadt
DNA-Polymerase Phusion	Finnzymes, Vantaa, Finnland
DNA-Polymerase Vent	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
dNTPs	Biocat, Heidelberg
D-PBS	PAA, Cölbe
DTT	Invitrogen, Dramstadt
<i>E. Coli</i> S30 Extrakt System	Promega, Mannheim
<i>E. coli</i> MRE 600 tRNA	Roche, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
Entwicklungslösung, Developer	AGFA, Mortsel, Belgien
Essigsäure 100% (Eisessig)	Normapur, VWR Prolabo, Darmstadt
Ethanol AnalR	Normapur, VWR Prolabo, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Fixierer, Rapid fixer	AGFA, Mortsel, Belgien
Fmoc-Aminosäuren	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Folinsäure	Sigma-Aldrich, München
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Gentisinsäure	Fluka, Buchs, Schweiz
D-(+)-Glucose	Roth, Karlsruhe
DEPC	AppliChem, Darmstadt
Glycerin (87%)	Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
GTP	Sigma-Aldrich, München
Harz	Rapp Polymere, Tübingen
HCl	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Heparin	Sigma-Aldrich, München
HEPES	Roth, Karlsruhe
Imidiazol	Sigma-Aldrich, München
IPTG	Fermentas, St. Leon-Rot
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Sigma Aldrich, München
KCl	Merck, Darmstadt
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Kaliumglutamat	Sigma-Aldrich, München

---

Lipofectamin	Invitrogen, Darmstadt
L-Methionin 35S Easy Tag	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Luria Broth Base	Invitrogen, Darmstadt
Lyophille	Christ, Osterode
Maleimid	Merck, Darmstadt
Methanol	Normapur, VWR Prolabo, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz
MgSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Milchpulver (Skim milk powder)	Fluka, Buchs, Schweiz
Morpholin	Fluka, Buchs, Schweiz
N <sub>2</sub> O	Air Liquide, Düsseldorf
NaCl	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Na-Iodid	Sigma-Aldrich, München
NaOH	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumdiethyldithiocarbamat	Fluka, Buchs, Schweiz
Neutravidin	Pierce, Rockford, USA
Nitrofecin	Merck, Darmstadt
Norleucin	Novabiochem, Läufelfingen, Schweiz
O <sub>2</sub>	Air Liquide, Düsseldorf
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, München
PDI	Sigma-Aldrich, München
Phenol Aqua-Roti	Roth, Karlsruhe
Phosphoenolpyruvat	Sigma-Aldrich, München
Plus™ Reagent	Invitrogen, Darmstadt
Polyethylenglycol-8000	Fluka, Buchs, Schweiz
Propidiumiodid 95%	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
Protein Assay	Bio-Rad, München
PyBOP	NOVABIOCHEM® Merck KGaA, Darmstadt
Pyruvatkinase	Sigma-Aldrich, München
RNA Typ XI	Sigma-Aldrich, München
RNA <i>S. cerevisiae</i> Typ III	Sigma-Aldrich, München
RNasin	Promega, Mannheim
RNase OUT	Invitrogen, Darmstadt

---

Rink-Amid-Harz (Bg: 0.17 mmol/g)	RAPP Polymere, Tübingen
RotiphoreseGel Acrylamid 30 (37.5:1)	Roth, Karlsruhe
SDS-b Powder	Gerbu Biotech, Gaiberg
Sevorane®	Abbott, Mannheim
Sinapinsäure	Sigma-Aldrich, München
SOC-Medium	Invitrogen, Darmstadt
Superscript II reverse Transkriptase	Invitrogen, Darmstadt
Surfactant P20	GE, Uppsala, Schweden
tRNA von <i>E. coli</i>	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
TEMED	Bio-Rad, München
Tetrakis(tris-Phenylphosphin)-Palladium 99%	Sigma-Aldrich, München
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich, München
TFA	Roth, Karlsruhe
Thalliumtrifluoracetat $Tl(TFA)_3$	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Thiamin	Sigma-Aldrich, München
Trifluoressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris-Acetat	Sigma-Aldrich, München
Tris-Base	Sigma-Aldrich, München
Tris-aminomethan	Serva, Heidelberg
tris-tBu-DOTA	NOVABIOCHEM® Merck KGaA, Darmstadt
Triton X-100	Promega, Mannheim
Trizma base, minimum	Sigma-Aldrich, München
Trizol	Invitrogen, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Serva, Heidelberg
Ultra-Pure-Agarose	Invitrogen, Darmstadt
Western Lightning® Plus-ECL	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
X-Gal	BTS Biotech, St. Leon-Rot

### 3.4 Verbrauchsmaterialien

6-well-Platten	Nunc, Wiesbaden
Amersham Hyperfilm ECL	GE, Freiburg
Amicon Ultra-15 (MCWO 50 000)	Millipore, Billerica, MA, USA
Cellline CL1000	IBS Integra Bioscience Chur, Schweiz
CelluSpots™	INTAVIS AG, Heidelberg

---

CM5 Chip	GE, Freiburg
Combitips Plus 10 ml und 50 ml	Eppendorf, Hamburg
Dynabeads M280 Streptavidin	Invitrogen, Darmstadt
Einwegpipetten (5, 10 und 25 ml)	Falcon, BD, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	BD, Heidelberg
Filterspitzen 10 µl, 200 µl, 1 ml	Starlab, Hamburg
HiTrap™ MabSelect SuRe™ 5 ml	GE Healthcare, München
HPLC-Gefäße mit Einsatz u. Deckel	VWR, Darmstadt
Impfösen	Roth, Karlsruhe
Incidin Plus	Ecolab, Düsseldorf
Injektionsnadel Sterican, silanisiert	B. Braun, Melsungen
Küvetten (Elektroporator 0,1 cm)	BioRad, München
Kryoröhrchen, 2 ml	Corning, Koolhovenlaan, Niederlande
MicroWell™ Plates V96	Nunc, Wiesbaden
MaxiSorp F96 Immuno-Platten	Nunc, Wiesbaden
Nitrocellulose-Membran	BioRad, München
PD-10 Säule	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pH-Teststreifen Universalindikator	Merck, Darmstadt
Plastikküvetten Mikro	Greiner Bio-One, Essen
Petrischalen Ø 9,2 mm	Nerbe Plus, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1 ml	Starlab, Hamburg
Polystyren Rundbodenröhrchen	BD, Heidelberg
PVDF-Membran 0,2 µm Immunblot	Bio-Rad, München
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf-Netheler, Hamburg
Schraubendeckel Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürmbrech
Skalpelle	Feather, Osaka, Japan
Spitacid	Ecolab, Düsseldorf
Spritzen	Terumo Syringe, Terumo, Leuven, Belgien
Streptavidin Platten	Thermo Scientific, Dreieich
Ultrazentrifugenröhrchen	SETON, Weinheim
Whatmann Chromatographiepapier	Whatmann, Madstone, UK
Zellkulturflasche T25, T75 und T150	TPP, Schweiz
Zellkulturschale 60,1 cm <sup>2</sup>	TPP, Schweiz
Zellkulturschalen 147,8 cm <sup>2</sup>	TPP, Schweiz
Zellschaber	Corning, Koolhovenlaan, Niederlande
γ-Counter-Röhrchen (5 ml)	Greiner Bio-One, Essen



### 3.5 Bakterienstämme und Phagen

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme und Phagen.

Name	Firma	Katalognummer
AVB 99	Avidity	AVB 99
<i>E. coli</i> MRE 600	Roche	109541
ER2738	NEB	E8110S
Helferphage M13K07	Invitrogen	18311-019
TOP 10 One Shot	Invitrogen	C4040
XL-10-Gold	Invitrogen	200314
XL1-Blue	Stratagene	200228

### 3.6 Zellen

In nachfolgender Tabelle 4 sind alle Zelllinien mit Herkunft, Ursprungsgewebe sowie zugehörige Medien und Zusätze angegeben.

Tabelle 4: Zelllinien und deren Herkunft und Ursprungsgewebe mit zugehörigen Medien und Zusätzen.

Name	Herkunft	Organ/Gewebe	Medium	FCS in %	Aussaat pro Well in Mio.
BxPC-3	ATCC, Manassas, VA, USA	Pankreas Adenokarzinom	RPMI 1640+	10	0,3
DU 145	ATCC, Manassas, VA, USA	Prostata Karzinom	RPMI 1640	10	0,5
Hek293	ATCC, Manassas, VA, USA	humane embryonale Nierenzelle transformiert mit humaner adenoviraler DNA Typ 5 (Ad 5)	RPMI 1640	10	0,6
FlpIn™293	Invitrogen, Karlsruhe	Hek293 Zellen transfiziert mit FRT//lacZeo Plasmid	RPMI 1640	10	-
LnCap	ATCC, Manassas, VA, USA	Prostata Karzinom	RPMI 1640	10	1
MCF-7	ATCC, Manassas, VA, USA	Brustdrüsen Adenokarzinom	DMEM	20	0,8
MCF-10A	ATCC, Manassas, VA, USA	Brustdrüse	DMEM-F12	*	0,3
MDA-MB-435	National Cancer Institute, Frederick, MD, USA	Brustdrüsen Karzinom	RPMI 1640	10	0,5
MiaPaCa1	ATCC, Manassas, VA, USA	Pankreas Karzinom	DMEM	10	1
NCI-H460	Bayer Schering Pharma, Dr. Sabine Zitzmann- Kolbe	Large cell lung Cancer	RPMI 1640	10	0,6
PC-3	ATCC, Manassas, VA, USA	Prostata Adenokarzinom	RPMI 1640	10	0,3
PNT-2	ATCC, Manassas, VA, USA	Normales Prostata Epithelium immortalisiert mit SV40	RPMI 1640	10	0,4

\* Das Medium für MCF-10A Zellen wurde wie nachfolgend zusammengesetzt:

5 % Pferdeserum  
 20 ng/ ml EGF  
 0,5 µg/ml Hydrocortison  
 100 ng/ml Cholera-Toxin  
 10 ng/ml Insulin

### 3.7 Medien und Zusätze

Tabelle 5: Verwendete Medien und Zusätze für die Zellkultur.

Name	Firma	Katalognummer
Cholera-Toxin	Sigma	C8052
DMEM	Gibco	10566
DMEM-F12	PAA	E15-889
EGF	Sigma	E4127
FCS	PAA	A15-151
HS	PAA	B15122
Hydrocortison	Sigma	H0135
Hygromyzin B	PAA	P02-015
Insulin	Sigma	I1882
Insulin/Transferrin	PAA	F01-015
OptiMEM	Gibco	11058-021
RPMI 1640	Gibco	61870
RPMI 1640+	Gibco	A1049101
Zeocin	Invitrogen	R250-01

### 3.8 Puffer

Alle Puffer wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Aqua dest. aus einer Millipore Anlage angesetzt und anschließend autoklaviert. Puffer für das Ribosome Display wurden mit Wasser versetzt mit 0,1 % DEPC angesetzt um RNase-Kontaminationen zu vermeiden. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte bei 25°C (Ribosome Display 4°C) mit einem pH-Meter. Die jeweiligen Angaben zur Pufferzusammensetzung sind in den einzelnen Versuchen angegeben.

### 3.9 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas, St. Leon Roth bezogen. Folgende fast digest-Enzyme wurden verwendet:

BamHI, BspEI, EcoRI, HindIII, NcoI, NotI, NsiI, PaeI, PvuI, Sall, SfiI, XbaI, XhoI.

### 3.10 Vektoren

Tabelle 6: Verwendete Vektoren.

Name	Firma	Katalognummer
pcDNA5/FRT™	Invitrogen	K6010-01
pOG44	Invitrogen	V6005-20
PRDV	AG Plückthun, Zürich, Schweiz	-
pSEC	Affimed, Heidelberg	-
pSEX81	Progen Biotechnik	PR3005

### 3.11 Primer

Primer wurden von MWG Eurofins, Ebersberg und Ella Biotech, München bezogen.

Tabelle 7: Primerübersicht.

Name	Sequenz 5'-3'	Verwendung
CD276 for	AAC TTA AGC TTG GGG CCG CCA CCA TGC TGC GTC GGC GGG GCA	Klonierung der extrazellulären Domäne CD276
CD276 rev	GGC TCC GGA TCC ATG TCC CTG CCC TCG ATT GGG CCA GGG GGG AAT GTC A	
MinT10 for	AGC GAT TGC CTG GCG GGC AGC GTG TGC NNN <sub>10</sub> TTC TGC GGC GCA GCA	Min10 Bibliothek
MinT8 for	GCC GCA GAA NNN <sub>8</sub> GCA CAC GCT GCC CGC CAG	Min8 Bibliothek
MinT2 for	TTA CTC GCT CCA TGG GCC TGA TGC GTT GCA AAC AGG ATA GCG ATT GCC TGG CGG GC	Min Bibliothek
MinTNot rev	ATA ATC TTG CGG CCG CCA GAT CTT CCT CAG AGA TCA GTT TCT GTT CAC CGC CGC TTG CTG CGC CGC AGA A	Min Bibliothek Phage Display
MinTSfi rev	ATA ATC TTG GCC CCC GAG GCC CCT GCT GCG CCG CAG AA	Min Bibliothek Ribosome Display
SFTI 6 for	TTA CTC GCT CCA TGG ATG GCC GCC GCC GGC AGG TGT ACT NNN <sub>6</sub> TGT TAT CCC GAT	SFTI 6 Bibliothek
SFTI 8 for	TTA CTC GCT CCA TGG ATG GCC GCC GCC GGC AGG TGT ACT NNN <sub>8</sub> TGT TAT CCC GAT	SFTI 8 Bibliothek
SFTI Not rev	ATA ATC TGC GGC CGC ATC GGG ATA ACA	SFTI Bibliothek Phage Display
SFTI Sfi rev	ATA ATC TTG GCC GAG CCG GCC ATC GGG ATA ACA	SFTI Bibliothek Ribosome Display
pSEX	AGG CTT TAC ACT TTA TGC TTC	Sequenzierung Phage Display Min
SDAm	AGA CCA CAA CGG TTT CCC GAA TTG TGA GC	4. PCR
T <sub>7</sub> B	ATA CGA AAT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC AAC GG	Amplifikation der $\beta$ - Lactamase aus PRDV
tolAKrev	CCG CAC ACC AGT AAG GTG TGC GGT TTC AGT TGC CGC TTT CTT TCT	Amplifikation der $\beta$ - Lactamase aus PRDV
TolAKint	TTC AGT TGC CGC TTT CTT TCT	Reverse Transkription
TolAKint m	TTC AGT TGC CGC TTT CTT TCT TGC TTC AGC	4. PCR
TolAKm	CAC ACC AGT AAG GTG TGC GGT TTC AGT TGC CGC TTT	3./5. PCR
T7m	AT CGA AAT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC AAC GG	3./5. PCR
-96 gIII	CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG	Sequenzierung Phage Display Ph.D.12

### 3.12 Antikörper und Proteine

Tabelle 8: Antikörper und rekombinante Proteine.

Name	Firma	Katalognummer
anti-CD276	abcam	ab89133
anti human IgG <sub>Fcγ</sub> -Fragment	Jackson Immuno Research	109-035-098
anti-mouse IgG-HRP	DakoCytomation	P0161
anti-PDGFR $\beta$	abcam	ab32570
Anti Poly Histidine	R&D Systems	IC050N
anti-rabbit IgG-HRP	R&D Systems	HAF008
Recombinant Human B7-H3 (4Ig)/B7-H3b	R&D Systems	2318-B3

### 3.13 Größenmarker und Ladepuffer

Tabelle 9: Größenmarker und Ladepuffer.

Name	Firma	Katalognummer
6x Orange Loading Dye	Fermentas	R0631
Gene Ruler 50bp DNA Ladder	Fermentas	SM0371
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder	Fermentas	SM0311
Prestained Protein Ladder	Fermentas	SM0671
RiboRuler High Range RNA Ladder	Fermentas	SM1821

### 3.14 Radioisotope

Na <sup>125</sup> I in NaOH	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Na <sup>131</sup> I in NaOH	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Na <sup>111</sup> In in NaOH	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Na <sup>144</sup> Lu in NaOH	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA

### 3.15 Kits

Tabelle 10: Kits.

Name	Firma	Katalognummer
ECL Protein Biotinylation Module	GE Healthcare	RPN2202
FliIn System	Invitrogen	K6010
High Capacity RNA-to-cDNA Kit	Applied Biosystems	4387406
High Pure RNA Isolation Kit	Roche	11828665001
MiniElute reaction Clean Up	Qiagen	28204
Mycoplasmen Detektions-Kit	Roche	11663925910
PCR-Script Amp Cloning Kit	Agilent Biosystems	211188
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	28104
QIAquick Gel Extraction kit	Qiagen	28706
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12263
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen	27106
Qiagen MiniRNeasy	Qiagen	74104
RiboMAX Large Scale RNA Production System T7	Promega	TB166
TaqMan Fast universal PCR Master	Applied Biosystems	4352042
TMB Microwell Peroxidase Substrat System	KPL	50-76-00
Western Lightning Plus-ECL	Perkin Elmer	10400IEA

### 3.16 Computerprogramme und Internetanwendungen

BLAST	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&amp;PAGE">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&amp;PAGE</a>
ClustalW2	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>
ExPASy Translate Tool	<a href="http://web.expasy.org/translate/">http://web.expasy.org/translate/</a>
Image J	<a href="http://rsbweb.nih.gov/ij/">http://rsbweb.nih.gov/ij/</a>
NEBcutter V2.0	<a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/">http://tools.neb.com/NEBcutter2/</a>
Protein calculator V3.3	<a href="http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc2.html">http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc2.html</a>
The human protein atlas	<a href="http://www.proteinatlas.org/ENSG00000113721/cell">http://www.proteinatlas.org/ENSG00000113721/cell</a>
UniProt	<a href="http://www.uniprot.org">www.uniprot.org</a>

EndNote

GenePix 6.0

SigmaPlot 12

### 3.17 Externe Serviceeinheiten

Ella Biotech	Synthese der Triplet-Primer
Eurofins	Sequenzierung von Plasmid-DNA, Standard-Primersynthese
GATC	Sequenzierung von Plasmid-DNA

## 4 Methoden

### 4.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 PCR-Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist eine molekularbiologische Methode, die zur spezifischen Amplifikation von DNA mit bekannten angrenzenden Sequenzen eingesetzt wird. Sie beruht auf dem Prinzip der Verdopplung von DNA durch Polymerasen. Eingesetzt werden spezielle hitzeresistente DNA-Polymerasen, die aus Bakterien gewonnen werden. Die Reaktion findet in einem Thermocycler statt, der die Teilschritte Denaturierung, Annealing und Elongation automatisiert durchführt. Die Reaktion startet mit der Denaturierung der beiden DNA-Stränge bei 95 °C. Kurze, einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) können dann mit den DNA-Einzelsträngen hybridisieren (Annealing), wobei die ideale Temperatur des Annealings ( $T_a$ ) von der Schmelztemperatur und somit vom GC-Gehalt der Primer abhängig ist. Darauf erfolgt mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase (eingesetzt werden Polymerasen mit Eigenschaften, die unspezifische Amplifikation und Primer-Degradierung verhindern -KOD- sowie Proof-Reading Funktion aufweisen -Phusion, Vent) die Synthese des DNA-Abschnitts (Elongation) zwischen den Primern. Die Temperatur sowie die Elongationszeit sind dabei abhängig von der gewählten Polymerase sowie der Größe des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Um den gewünschten DNA-Abschnitt in entsprechender Menge für analytische Zwecke zu erhalten, werden die drei Reaktionen in meist 30 bis 35 Zyklen wiederholt. Zusätzlich zu den sich wiederholenden Zyklen findet eine initiale Denaturierung für drei Minuten und eine finale Elongation für zwei Minuten statt. Durch wiederholte Zyklen von Hitzedenaturierung, Hybridisierung mit spezifischen Oligonukleotid-Primern und Synthese der komplementären DNA entstehen nach jedem Durchlauf DNA-Fragmente, die im nächsten Durchlauf wieder als Matrize dienen. Aufgrund dieses Prinzips ist eine exponentielle Vermehrung der DNA in kürzester Zeit möglich.

Je nach Art der Polymerase, Matrizenlänge und Schmelztemperaturen der Primer (basierend auf der Zusammensetzung von A,T,C und G) läuft jede PCR mit einem optimal definiertem Programm ab, welches durch Testläufe mit Gradienten ermittelt werden muss. Reaktionsansatz und Programm sind in den jeweiligen Versuchen angegeben.

### 4.1.2 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR ist eine Methode, die auf der PCR beruht und zur quantitativen Bestimmung der amplifizierten DNA eingesetzt wird. Die Menge an DNA wird hier durch Messung von Fluoreszenz bestimmt, welche proportional mit der DNA-Menge zunimmt. Eine Quantifizierung erfolgt im Gegensatz zur qPCR in der exponentiellen Phase der PCR nach jedem Elongationszyklus. In der nachfolgenden Arbeit wurden TaqMan Reagenzien verwendet. TaqMan-Sonden, auch Hydrolyse-Sonden genannt, basieren auf der FRET-Methode. Hier befindet sich am einen Ende der Sonde der Fluoreszenzfarbstoff, am anderen Ende ein Quencher. Die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der eingesetzten Taq-Polymerase führt bei der Amplifikation zum Abbau der Sonde am 5' Ende. Die damit verbundene räumliche Trennung von Quencher und Fluoreszenzfarbstoff führt zur Aussendung von Fluoreszenz.

Für Real-Time Analysen wurde RNA aus Zelllinien isoliert wie unter Punkt 4.1.6 beschrieben. Die so gewonnene RNA wurde anschließend mit Hilfe von DNase von DNA-Kontaminationen befreit und mit Hilfe des High Capacity RNA to cDNA Kit von Applied Biosystems in cDNA umgeschrieben (RT+Reaktion). Zusätzlich wurde als Kontrolle RNA ohne Enzymmix angesetzt, so dass keine reverse Transkription stattfand (RT-Reaktion). cDNA aus humanen Tumorklinen wurde als Template für Real-Time-PCR Versuche verwendet. Untersucht wurde die Expression von CD276 auf mRNA Ebene. Folgende TaqMan-Sonden wurden verwendet: CD276 (Applied Biosystems, Hs00228846\_m1) und als interne Kontrolle und zur Normalisierung der Werte eine Sonde zum Nachweis des house-keeping Gens GAPDH (Applied Biosystems, Hs02758991\_g1). Für den Versuch wurde folgender Ansatz verwendet:

Taq-Man Master Mix Universal	10 µl
Sonde	1 µl
Probe (RT-PCR)	entsprechend 500 ng RNA
<hr/>	
Ad. H <sub>2</sub> O dest.	20 µl

Pro Versuch wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt sowie eine Negativkontrolle mit einer RT-Reaktion.

	GAPDH-Sonde		CD276-Sonde		Negativkontrolle
	1	2	3	4	5
Zelllinie A					
Zelllinie B					
	RT+ Reaktion				RT-Reaktion

Folgendes Programm wurde verwendet:

°C	Zeit	
95	20"	
95	1'	x 40
60	20"	
4	∞	

#### 4.1.3 Restriktionsverdau von DNA

Für die enzymatische Hydrolyse von linearer DNA und Plasmid-DNA werden Restriktionsenzyme verwendet. Diese erkennen und schneiden DNA spezifisch anhand einer dem Enzym eigenen Erkennungssequenz. Enzyme sind oft nach dem Bakterium benannt, aus denen sie isoliert wurden. EcoRI z.B. wurde aus dem *E. coli* Stamm R isoliert. Man unterscheidet Enzyme, die „blunt ends“, also Enden ohne Überhang und Enzyme, die „sticky ends“, sogenannte Überhangenden, produzieren. DNA-Fragmente, die sticky ends besitzen, haben den Vorteil, dass sie nur mit Enden religieren können, die mit dem gleichen Enzym geschnitten wurden und somit die gleichen Überhänge aufweisen. In dieser Arbeit verwendete Enzyme sind unter Punkt 3.9 aufgeführt und wurden nach folgendem Reaktionsansatz verwendet:

DNA	≤ 1 µg
10 x Fast Digest Green Buffer	2 µl
Fast Digest Enzym	1 µl
ad. H <sub>2</sub> O dest.	20 µl

DNA wurde für 10 min bei 37°C (SfiI bei 50°C) auf dem Thermoblock inkubiert und anschließend das Enzym bei 65 bzw. 80°C Hitze inaktiviert.

#### 4.1.4 DNA-Gelelektrophorese

DNA ist aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladen. Dies macht man sich zunutze, um DNA-Fragmente der Größe nach in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Das Verhältnis von Masse zu Ladung bleibt konstant, die



unterschiedliche Laufgeschwindigkeit im Agarosegel ist nur anhängig von der Größe und Struktur der DNA (linear, Plasmid, supercoiled). Große Fragmente und stark gewundene Plasmide laufen langsamer als lineare DNA. Die Größe der Fragmente kann anhand eines Größenmarkers bestimmt werden, welcher parallel zu den Proben auf das Gel aufgetragen wird. Nukleinsäuren können mit der interkalierenden Substanz Ethidiumbromid gefärbt und im UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht werden. In allen Versuchen wurden Gele mit 1-2% Agarose in 1 × EP (Elektrophoresepuffer, 2 M Tris, 0,25 M NaAc, 0,05 M EDTA, pH 7,8) zum Lösen in der Mikrowelle einige Minuten aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde Ethidiumbromid in der Endkonzentration von 0,2 µg/ml zugesetzt und die Agarose-Lösung in einen Gelschlitten gegossen und der Taschenkamm eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose und Entfernen des Kammes wurde das Gel vollständig mit 1× EP bedeckt. Die Proben wurden 1:10 mit 10 × DNA-Puffer (42 mg Bromphenolblau, 5,7 ml Glycerin ad. 10 ml Aqua dest.) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80-160 Volt. Als Referenz wurden der Gene Ruler 50 bp und 1 kbp DNA-Marker von Fermentas verwendet.

#### **4.1.5 RNA-Gelelektrophorese**

RNA wurde ebenfalls über Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Puffer und Grundlage zum Gelansatz diente MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)-Puffer (400 mM MOPS, 100 mM NaAc, 20 mM EDTA, pH 7,0). Gele wurden mit Ultra-Pure-Agarose zu einer Konzentration von 1% angesetzt. RNA Proben wurden mit 2 × RNA-Ladepuffer von Fermentas versetzt. Als Größenstandard diente der RiboRuler High Range RNA Marker von Fermentas.

#### **4.1.6 RNA-Extraktion aus Zellen**

Für die RNA-Extraktion wurde jeweils eine T175 Zellkulturflasche mit zu 80% konfluenten Zellen benutzt. Um Kontaminationen mit RNase zu vermeiden, wurden Pipetten und der Arbeitsplatz mit Incidin vorbehandelt sowie RNase freie Filterspitzen und Einmalgefäße verwendet. Alle Arbeiten fanden auf Eis bzw. bei 4°C statt. Zunächst wurde das Medium von den Zellen entfernt und diese mit 10 ml Trizol überschichtet. Um die Zellen zu lösen, wurde ein Zellschaber verwendet. Nach Überführung der abgelösten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen, wurde die Probe gevortext und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Durch anschließende Zugabe von 2 ml Chloroform und kräftiges Schütteln per Hand, kommt es zur Phasentrennung. Nach weiteren zwei bis drei Minuten auf Eis und Zentrifugation bei 4000 rpm für zehn

Minuten, befand sich die RNA in der oberen wässrigen Phase. Diese wurde in ein neues Gefäß überführt. Eine Präzipitation der RNA wurde mittels Mischen und Invertieren der Probe mit gleicher Menge Isopropanol erreicht. Um ein vollständiges Ausfällen zu ermöglichen, wurde die Probe für weitere zehn Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 4000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Das entstehende RNA-Pellet wurde mit vorgekühltem 70%-igem Ethanol in DEPC-Wasser (7 ml) gewaschen und wieder bei 5000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Das luftgetrocknete Pellet konnte nun in 100-300 µl DEPC-Wasser aufgenommen und auf Eis gelöst werden. Nach Konzentrations- und Reinheitsbestimmung wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt.

#### **4.1.7 Proteinextraktion aus Zellen**

##### *4.1.7.1 Gesamtproteinextraktion*

Für die Isolation von Gesamtprotein wurde jeweils eine Flasche T175 mit einer Konfluenz von 80 bis 90% verwendet. Das Medium wurde bis auf 5 bis 10 ml abgesaugt, die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Restliche in der Flasche befindliche Zellen wurden durch Spülen mit Medium überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 1100 rpm für vier Minuten zentrifugiert, in 20 ml PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann zur Lyse in der 10-fachen Menge an 0,1%-igem Triton X-100 versetzt, mit Proteasehemmer (Roche, 04693159001) aufgenommen und gevortext. Zelltrümmer werden durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 4°C und 2700 rpm für zehn Minuten vom nun gelösten im Überstand befindlichen Protein separiert. Proteine wurden bei -20°C gelagert.

##### *4.1.7.2 Isolation von Membran- und Zytoplasmaproteinen*

Für die Proteinernte wurden jeweils fünf Zellkulturflaschen T175 mit einer Konfluenz von 80 bis 90% verwendet. Zunächst wurde das Medium bis auf 5 bis 10 ml abgesaugt und die Zellen mittels eines Zellschabers vom Boden gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach erneutem Spülen mit Medium wurden die Zellen bei 1100 rpm für vier Minuten abzentrifugiert. Um Mediumreste zu entfernen, wurden die Zellen mit PBS gespült und erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 6 ml Puffer A (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) resuspendiert und mit Hilfe eines Glas-Homogenisators die Zellen aufgeschlossen. Die Homogenate wurden zur Entfernung der Zellkerne und

Zelltrümmer für zehn Minuten bei 4°C und 2700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und für 1h bei 25.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Im Überstand befand sich jetzt die Zytoplasmafraktion. Das Pellet beinhaltete die Membranproteine und wurde in Puffer A (50-200 µl variierend je nach Größe des Pellets) aufgenommen. Proteine wurden bei -20°C gelagert.

#### *4.1.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Bradfordmethode*

Für die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde der Protein-Assay von BioRad verwendet. Er basiert auf der Proteinbestimmung von löslichem Protein nach Bradford, bei dem der messbare Farbumschlag mit der proteinkonzentration korreliert. Das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung ändert sich von 465 nm zu 595 nm, wenn es an Protein gebunden ist. Coomassie Blau bindet hauptsächlich an Aminosäurereste, vor allem Arginin.

Das Farbkonzentrat wurde zunächst 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Diese Lösung diente als Standard. Um eine Eichkurve herzustellen, wurden zunächst definierte Mengen an BSA in PBS gelöst (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1 mg/ml). Davon wurden jeweils 10 µl auf 990 µl Standardlösung gegeben, gemischt und in Plastikküvetten überführt. Die Küvetten werden im Photometer gegen die Standardlösung als Nullwert bei 595 nm Wellenlänge gemessen. Anhand der Werte wurde vom Gerät eine Eichkurve erstellt, bei der die Absorption gegen die Konzentration aufgetragen wurde. Mit den zu messenden Proben wurde genauso verfahren wie mit den BSA-Proben. Anhand der Eichkurve werden die Konzentrationen vom Gerät bestimmt.

#### **4.1.8 SDS-Page**

Pro Tasche des SDS-Gels wird eine genau definierte Menge an Gesamtprotein aufgetragen, um die Menge an zu untersuchendem Protein später genau beurteilen zu können. Hierfür wurden entsprechende Mengen an Protein (ca. 2-10 µg) in Wasser verdünnt und mit 4 x SDS-Ladepuffer versetzt (200 mM Tris-HCl pH 6,8, 50 mM EDTA, 590 mM β-Mercaptoethanol, 40% Glycerol, 8% SDS, 0,8% Bromphenolblau) und gevortext. Um die Proteine zu denaturieren, wurden diese auf 95°C für fünf Minuten erhitzt und anschließend kurz zentrifugiert. Für die Herstellung von SDS-Gelen wurden die Apparaturen von BioRad verwendet. Gele wurden nach folgenden Angaben gegossen:

	Angaben in ml		
	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Sammelgel
Aqua dest.	9,9	8,2	4,1
Acrylamidmix	8,3	10	1
1 M Tris pH 6,8	6,3	6,3	-
1,5 M Tris pH 8,8	-	-	0,75
10% SDS	0,25	0,25	0,06
10% APS	0,25	0,25	0,06
TEMED	0,01	0,01	0,006

Für Proteine > 150 kDa wurden 10%-ige Trenngele verwendet.

Das Trenngel wurde zwischen die Glasplatten gegossen und bis zum Polymerisieren mit 100% Isopropanol überschichtet. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt, die Kontaktfläche mit destilliertem Wasser gespült und das Sammelgel gegossen. Für die Auftrennung der Proteine im SDS-Gel wurden die Mini-PROTEAN Tetra Cell-Apparaturen von BioRad verwendet. Die vorbereiteten Proben sowie ein Proteinmarker wurden auf das Gel aufgetragen. Der Lauf wurde bei ca. 180V durchgeführt. Die Lauflänge richtete sich hierbei nach der Größe des nachzuweisenden Proteins. Um die Proteine im Gel sichtbar zu machen, kann das Gel nach dem Lauf unspezifisch mit Coomassie angefärbt werden oder die Proteine mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden (Western Blot).

#### 4.1.9 Coomassie-Färbung

Um Proteine direkt im Gel anzufärben, wurde eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Coomassie lagert sich unspezifisch an basische Seitenketten von Aminosäuren an. Dazu wurde das SDS-Gel für 30 Minuten in der Färbelösung (45% Methanol, 10% Essigsäure, 0,1% Brilliant Blue in Wasser) bei RT auf dem Schüttler geschwenkt. Um überschüssige Farbe auszuwaschen, wurde das Gel anschließend für 1 bis 3 h unter mehrmaligem Wechsel der Lösung bei RT in Entfärber (2,5% Methanol, 7% Essigsäure, 1% Glycerol in Wasser) geschwenkt. Die Proteine werden dann als blaue Banden sichtbar, während das Gel sich wieder entfärbt.

#### **4.1.9 Western-Blot**

Während des Laufs des SDS-Gels wurde die PVDF Membran für fünf Minuten in 100% Methanol vorinkubiert anschließend für 30 Minuten in Transferpuffer inkubiert bzw. die Nitrocellulose-Membran direkt für 30 min in Transferpuffer vorinkubiert.

Nach dem Lauf wurden die Gele von den Glasscheiben getrennt und nach folgendem Schema per Nass-in-Nass-Technik aufgebaut:

Anode  
Schwamm  
2 Whatmanpapiere  
Membran  
Gel  
2 Whatmanpapiere  
Schwamm  
Kathode

Die komplette Apparatur wurde mit Eis ummantelt. Der Transfer erfolgte bei 100 V für 1 h mit vorgekühltem Transferpuffer. Nach dem Transfer wurde die Apparatur abgebaut und die Membran für zehn Minuten in Aqua dest. geschwenkt und anschließend für mind. 30 Minuten in 5% Milch TBST (20 mM Tris Base, 0,14 M NaCl, pH 7,6, 0,1% Tween20) vorgeblockt. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit TBST kann der Primärantikörper verdünnt in 1% Milch TBST zur Membran gegeben werden. Dieser wurde ÜN bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit TBST gewaschen und anschließend mit dem Zweitantikörper verdünnt in 1% Milch TBST für 1 h inkubiert oder bei direkt markierten Antikörpern direkt entwickelt. Die Entwicklung erfolgte mit der Chemilumineszenz-Methode.

#### **4.2 Zellkultur**

##### **4.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen**

Alle Zellen wurden im Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit, wenn nicht anders angegeben, in Zellkulturflaschen angezogen. Zur Anzucht unterschiedlicher Zelllinien dienten verschiedene Medien unter Zugabe entsprechender Seren und Zusätze wie in Tabelle 4 und 5 angegeben. Alle Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmen mittels des Mykoplasmen Detektions-Kits von Roche untersucht.

### **4.2.2 Passagieren von adhärennten Zellen**

Um ein Absterben der Zellen durch Mangel an Nährstoffen oder eine Ansammlung toxischer Stoffe zu vermeiden bzw. um Zellen zu vermehren, werden sie passagiert. Dies erfolgt sobald die Kulturflasche etwa zu 90% konfluent ist. Zellen adhärennten durch unterschiedliche Faktoren wie extrazelluläre Matrixkomponenten (Fibronectin und Laminin) sowie zweiwertige Kationen an Untergründen. Adhärennte, d.h. am Untergrund anhaftende, Zellen können mit EDTA und Trypsin gelöst werden. EDTA (Ethyldiamintetraacetat) chelatiert divalente Kationen, wie Magnesium und Kalzium, welche für die Zelladhäsion z. B. durch Integrine oder Cadherine benötigt werden. Trypsin ist eine Serinprotease, welche innerhalb einer Proteinsequenz nach den Aminosäuren Lysin, Arginin, und Cystein schneidet und so Matrixproteine zerstört, was zu einer Ablösung vom Flaschenboden führt.

Zunächst wurde verbrauchtes Medium von konfluenten Zellen entfernt und diese mit PBS gewaschen. Das Ablösen erfolgte unter Zugabe von Trypsin bzw. bei sensiblen Zellen mit Versene (1 mM EDTA in 1 x PBS, pH 7,4), welches bei 37°C inkubiert wurde. Abgelöste Zellen wurden dann in wenig frischem angewärmtem Medium resuspendiert und je nach Zelllinie in frisches Medium gesplittet.

### **4.2.3 Einfrieren von Zelllinien**

Zur Lagerung und Vermeidung unnötiger Passagen können Zellen durch Kryokonservierung haltbar gemacht werden. 80% konfluente Zellen wurden zunächst mit PBS gespült und durch Trypsin abgelöst. Die durch Zentrifugation bei 1100 rpm und RT pelletierten Zellen wurden dann in auf 4°C vorgekühltem Einfriermedium, bestehend aus dem der Zelllinie entsprechendem Medium und 20% FCS sowie 10% DMSO gelöst, sodass pro Kryoröhrchen und ml 3 Millionen Zellen eingefroren werden konnten. Die abgefüllten Röhrchen wurden im Gefrierschrank im Isopropanolbad zunächst langsam auf -80°C gekühlt, um eine Zellruptur durch Eiskristallbildung zu vermeiden. Nach einer Woche konnten die Röhrchen zur dauerhaften Lagerung in einen mit flüssigem Stickstoff gefülltem Lagerbehälter auf -196°C überführt werden.

#### **4.2.4 Auftauen von Zelllinien**

Kryoröhrchen wurden zunächst im 37°C Wasserbad aufgetaut. Um die Zellen von toxischem DMSO zu befreien, wurde die Zellsuspension in 10 ml vorgewärmten Medium gewaschen und die Zellen bei 1100 rpm bei RT pelletiert und in frisches Medium überführt. Um auch letzte DMSO Spuren zu entfernen, wurde nach 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt.

#### **4.2.5 Zellaussaat für *in vitro* Experimente**

*In vitro* Experimente wurden in 6-well Platten durchgeführt. Pro well wurden Zellen so ausgesät, dass sie nach 24 h Wachstum zum Versuchsstart zu 80% konfluent waren. Zellen wurden wie in Punkt 3.1.2 beschrieben gelöst und im Zellzähler gezählt. Entsprechend der Zelllinie wurden pro well eine definierte Zahl Zellen in 2 ml frischen Medium gegeben und für 24 h inkubiert. Angaben zur Zellzahl bei Aussaat sind in Tabelle 1 beschrieben. Am Versuchstag wurden die Zellen mit 1 ml Blocklösung bestehend aus 1% BSA in frischem Medium, überschichtet und für 1 h inkubiert. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit 1 ml frischem vorgewärmten Medium ohne FCS gewaschen.

### **4.3 Herstellung rekombinanter Zelllinien**

Um Binder für ein Oberflächenantigen mittels eines Biopannings zu erhalten, bedarf es hoch aufgereinigter Zielstrukturen, um Selektion von Negativ-Bindern gegen eventuelle Verunreinigungen zu vermeiden. Im Falle von CD276 sollte mittels Biopanning ein Binder gegen die extrazelluläre Domäne des Membranproteins gefunden werden. Die Herstellung von Proteinen in eukaryontischen Zellen gegenüber der Produktion in Bakterien hat den Vorteil, dass auch posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen erfolgen.

#### **4.3.1 Klonierung der extrazellulären Domäne von CD276**

Die komplette Sequenz des Gens CD276 wurde von ImaGenes, Deutschland unter der Nummer IRATp970D0282D bezogen. Mittels PCR wurde mit den Primern CD276for und CD276rev (Punkt 3.11) die extrazelluläre Domäne sowie das Sekretionssignal bestehend aus Aminosäuren 29-466 amplifiziert. Für die PCR wurde folgendes Protokoll verwendet:

**Ansatz x1**

		°C	Zeit	
Template	0,25 µl			
10 x Vent-PCR-Puffer	2,5 µl	94°C	5'	
MgSO <sub>4</sub> 100 mM	0,4 µl	94°C	25''	
dNTPS 25 mM	0,2 µl	61°C	25''	x 30
DMSO 99%	1,25 µl	72°C	2'	
Je Primer	0,5 µl	72°C	5'	
Vent-Polymerase	0,25 µl	4°C	∞	
Ad. H <sub>2</sub> O dest.	25 µl			

Die Primer sind sogenannte Überhangprimer, welche Restriktionsschnittstellen enthalten, die das spätere Integrieren in die multiple cloning site eines Vektor ermöglichen. Das 1469 bp große Fragment wurde wie unter Punkt 3.1.3 mit HindIII und BspEI geschnitten und in den Vektor pSecEpCAM, der mit den gleichen Enzymen verdaut wurde, mittels der T4-Ligase von Roche nach Angabe des Herstellers ligiert. pSecEpCAM enthält die codierende Sequenz für einen Fc-Teil, der zur späteren Aufreinigung des Zielgenes dient. Das entstandene Produkt pSec\_EDCD276 wurde zur Amplifikation in chemisch kompetente Top 10 Bakterien transformiert. Die Amplifikation erfolgte im Maßstab von 20 ml. Der so amplifizierte Vektor wurde mit Hilfe des Qiagen Maxi-Kits isoliert und aufgereinigt. Um den Teil des Vektors zu isolieren, der für das Fusionsprotein, bestehend aus der extrazellulären Domäne von CD276, und dem Fc-Teil codiert, wurden 10 µg Vektor mit HindIII und XhoI geschnitten und auf ein präparatives Gel aufgetragen, ausgeschnitten und aufgereinigt. Der so entstandene lineare DNA-Abschnitt HindIII\_EDCD276-Fc\_XhoI wurde im letzten Schritt mit dem Transfektionsvektor pcDNA5/FRT™ (Invitrogen, V6520-20), der ebenfalls mit HindIII und XhoI geschnitten wurde, mit Hilfe der T4-Ligase ligiert. Zwischen allen Schritten wurden Kontrollrestriktionen durchgeführt, die auf einem DNA-Agarosegel überprüft wurden.

**4.3.2 Transfektion in Hek Flp-In™-293-Zellen**

Als Expressionssystem wurden humane embryonic kidney Flp-In™-293 Zellen der Firma Invitrogen verwendet (Invitrogen, R750-07). Das Flp-In System (Invitrogen, K6010-01) beruht auf dem System der Kotransfektion der Vektoren pOG44 und pcDNA5. Der pOG44 Vektor exprimiert eine Rekombinase, welche bei der Kotransfektion eine Interaktion der FRT Stellen auf dem pcDNA-Vektor sowie den FRT Stellen im Genom der Flp-In Zelllinie ermöglicht. Dadurch kommt es zur Übertragung eines Fusionsgenes kodiert durch den Vektor pcDNA bestehend aus



CMV-Promotors, des Gens von Interesse sowie einer Hygromylinresistenzkassette zur späteren Selektion.

Für die Transfektion wurden zunächst 1,5 Mio. Hek Flp-In™ Zellen pro Zellkulturschale versetzt mit Zeocin ausgesät. Nach 24 h Stunden konnten die Zellen transfiziert werden. Die Vektoren pcDNA und pOG44 wurden hierbei im Verhältnis 9:1 eingesetzt (Gesamtmenge pcDNA variierend von 0,4 bis 1 µg). Die Transfektion wurde mit Lipofectamin (Invitrogen, 18324) und PLUS Reagent (Invitrogen, 11514-015) von Invitrogen in OptiMEM ohne Zugabe von Serum nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach 3-stündiger Inkubation wurde ein Mediumwechsel zu RPMI1640 mit 10% FCS durchgeführt.

Nach weiteren 24 h wurde ein zweiter Mediumwechsel vollzogen. Stabil transfizierte Zellen konnten nun mit Hygromylin B 10 µg/ml Medium selektiert werden.

#### **4.3.3 Kultur, Ernte und Aufreinigung der extrazellulären Domäne von CD276**

Selektierte Hek Flp-In™ Zellen wurden vereinigt und in Zellkulturflaschen weiter gezogen. Zur weiteren Kultivierung und besseren Ernte des sekretierten Proteins (Fusionsprotein CD276ED-Fc) wurden die Zellen in eine Celline CL1000 Kulturflasche (Sartorius, DC-90005) überführt. Diese hatte den Vorteil, dass Zellen hier auf einer Gas-permeablen Membran adhären, die sich in einem Volumen von 20 ml Nährmedium befindet. Die Membran ist außerdem in ein zweites Kompartiment gebettet, welches durch eine weitere semipermeable Membran mit 1 l Nährmedium verbunden ist. Zellen werden so optimal mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Sekretierte Proteine werden aber von der semipermeablen Membran zurückgehalten und können in kleinen Volumina wöchentlich abgenommen werden. Inokuliert wurde mit  $25 \times 10^6$  Zellen in frischem Komplettmedium bestehend aus RPMI 1640+, 1x Insulin/Transferrin/Selen, 10% FCS sowie 10 µg/ml Hygromylin B. Als Nährmedium im Außenkompartiment diente Komplettmedium ohne FCS. Abgenommenes Medium bzw. Protein aus dem Zellkompartiment wurde bei 4°C und 3000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Das im Überstand enthaltene Protein wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Um die gesammelten Mediumproben auf das Zielprotein zu untersuchen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Hierfür wurden 25 µl Medium pro Abnahme mit 7 µl 4x Ladepuffer versetzt und auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem Zielprotein-spezifischen Antikörper gelöst in 1% Milchpulver in TBST über

Nacht bei 4°C. Wiesen alle Proben eine proteinspezifische Bande auf, wurden sie vereinigt.

Die Aufreinigung aus dem Medium wurde mit einer Äkta-Anlage von GE durchgeführt. Die Purifikation verlief hier über eine MabSelectSuRe (GE, 11-0034-93). Die Säule wurde zunächst mit Bindepuffer (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,2) äquibriert. Gesammeltes Medium wurde vor Auftrag auf die Äkta-Anlage durch einen Filter (Millipore, GPWP09050) von Zellrückständen befreit. Nach erfolgter Säulenbeladung mit dem Medium, wurde das Protein in Fraktionen eluiert (Elutionspuffer: 0,1 M Glycin-HCl, 140 mM NaCl, pH 3,5), um Schädigung des Proteins zu vermeiden mit 1 M Tris-HCl pH 8,8 neutralisiert, vereinigt und mit Hilfe von Amicon Ultra 15-Säulen (Millipore, UFC903024) durch Zentrifugation bei 4°C und 3800 rpm konzentriert. Außerdem erfolgte eine Umpufferung des Proteins in PBS pH 7,4 mittels PD-10 Säulen (GE, 17-0851-01). Zunächst wurden die Säulen mit dem 10-fachen des Probenvolumens äquibriert. Das konzentrierte Protein wurde auf die Säule aufgetragen und anschließend mit 3,5 ml PBS eluiert. Die Proteinkonzentration wurde anschließend mit der Methode nach Bradford bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C in Aliquots.

#### 4.3.4 Biotinylierung der extrazellulären Domäne von CD276

Um die extrazelluläre Domäne von CD276 an magnetische Streptavidin-Beads zu koppeln, wurde das Zielprotein biotinyliert. Hierfür wurde das ECL Protein Biotinylation Module von GE verwendet. Es wurde nach der Anleitung des Herstellers verfahren. Insgesamt wurden 500 µg Zielprotein biotinyliert und anschließend nach Äquibrierung mit 20 ml PBS auf eine PD-10 Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 5 ml PBS in Fraktionen von 500 µl. Diese wurden am Nanodrop gemessen und Proben von 0,2 bis 1,5 vereinigt und zur Aufbewahrung mit 0,2% NaN<sub>3</sub> versetzt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte am Spektrometer bei 280 nm. Die Konzentration wurde mit dem Lambert–Beerschen-Gesetz ermittelt:

$$c \text{ in Mol} = \frac{\Delta E (\text{Absorption bei } 280 \text{ nm})}{\epsilon_{\text{mol}} \times d} \quad c \text{ in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{\Delta E (\text{Absorption bei } 260 \text{ nm})}{\epsilon_{\mu\text{g}/\mu\text{l}} \times d \times MW}$$

$\Delta E$  = Absorption bei OD<sub>280</sub>

$\epsilon_{\text{mol}}$  = Extinktionskoeffizient in M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

$\epsilon_{\mu\text{g}/\mu\text{l}}$  = Extinktionskoeffizient in µg<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> µl

d = Schichtdicke in cm (in unserem Fall = 1)

Zur Kontrolle der Biotinylierung wurde ein ELISA angeschlossen. Dieser erfolgte auf Streptavidin beschichteten Platten von Thermo Scientific (cat.15128). Diese gewährleisten eine Bindung von biotinyliertem Zielprotein auf der Plastikoberfläche. Die Platte wurde zunächst dreimal mit 200 µl PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Beschickung mit 100 µl Zielprotein für 2 h bei RT auf dem Schüttler. Als Anfangskonzentration wurde 500 nM gewählt. Weiterhin wurden 1:2 Verdünnungen in PBS bis zu einer Konzentration von 0,925 nM hergestellt. Als Kontrolle diente ein Well mit PBS. Nach dreimaligem Waschen wurden die Wells mit 100 µl anti-IgG-Fc-Antikörper verdünnt 1:10.000 in PBS beschichtet. Nach einstündiger Inkubation bei RT auf dem Schüttler konnte nicht gebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt werden. Die Auswertung erfolgte mit dem TMB-Kit von KPL. Ausgelesen wurden die Ergebnisse mit dem TECAN sunrise bei 450 nm. Durch graphisches Auftragen von Molarität gegen Absorption erhält man eine Sättigungskurve. Diese gibt Aufschluss über die benötigte Zielproteinmenge für Pannings auf Platten.

#### 4.4 Herstellung von Peptidbibliotheken

Insgesamt wurde mit fünf verschiedenen Bibliotheken gearbeitet. Eine Bibliothek wurde von New England Biolabs bezogen: Ph.D.12, die für lineare Peptide mit einer Länge von zwölf Aminosäuren kodiert. Vier weitere Bibliotheken wurden basierend auf zwei Gerüststrukturen selbst hergestellt. Gerüststrukturen oder Scaffolds haben den Vorteil gegenüber linearen Peptiden, dass der Abbau in humanem Serum durch Faltung und Cysteinbrücken sehr viel langsamer vonstattengeht bzw. gar nicht stattfindet, was für den Einsatz *in vivo* unerlässlich ist. In dieser Arbeit wurden der SFTI (Sun Flower Trypsin Inhibitor)-Scaffold, ein 14 Aminosäuren großes Peptid, das durch Kopf-Schwanz-Zyklisierung mit einer Cysteinbrücke stabilisiert ist, verwendet [93, 94]. Der ursprünglichen Sequenz: GRCTKSIPPICFPD, wurde das Phenylalanin an Position 12 durch Trypsin ersetzt, um eine spätere Markierung mit Jod zu ermöglichen (GRCTKSIPPICYPD). Weiterhin wurde der Mittelteil (Aminosäuren 5-10), durch sechs bzw. acht variable Aminosäuren ersetzt, die durch Tripletprimer bezogen von der Firma ELLA Biotech, München hergestellt wurden, so dass folgende Sequenz entstand: G R C T N<sub>(6 bzw. 8)</sub> C Y P D. Diese Tripletprimer sind so gewählt, dass weder Cystein noch Stoppcodons kodiert werden, um eine zusätzliche Cysteinbrücke und vorzeitiges Abbrechen der Transkription zu verhindern.

Ein weiteres Scaffold ist Min23, welcher auf einer 23 Aminosäuren langen Struktur entnommen, aus dem Kürbis-Trypsin-Inhibitor basiert, die dem CSB-Motiv (Cysteine Stabilized Beta sheet) abgeleitet ist und über zwei Cysteinbrücken verfügt [46].

Die Grundsequenz LMRCKQDSDCLAGSVCGPNGFCG wurde abgewandelt zu: LMRCKQDSDCLAGSVCN<sub>(8 bzw. 10)</sub>FCG. Nachfolgend ist die Herstellung der Min10 Bibliothek für Phage- und Ribosome Display beschrieben. Der Aufbau der Min8, SFTI6 und SFTI8 Bibliothek erfolgte nach dem gleichen Schema.

#### 4.4.1 Herstellung der Min10 Bibliothek für Phage Display

##### 4.4.1 Erste PCR

Die erste PCR zur Generierung der Min10-DNA-Bibliothek mit Tripletprimern wurde wie folgt 16-fach angesetzt:

		°C	Zeit	
<b>Ansatz x1</b>		95	5'	
5 x KOD-Puffer	10 µl	95	15"	
Min1T10 for	2 µl	61	1'	x 25
MinTNot rev	2 µl	72	1'	
KOD-Polymerase	1 µl	72	5'	
H <sub>2</sub> O dest.	ad. 50 µl	4	∞	

Zur Kontrolle der PCR wurden je Probe 2 µl auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Als Referenz diente der 50 bp Marker. Das PCR-Produkt wurde dann mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und diente als Template für die zweite PCR.

##### 4.4.1.2 Zweite PCR

Im zweiten Schritt wurden mittels einer PCR mit Überhangprimern die Schnittstellen NotI und NcoI angefügt, die zur weiteren Klonierung in den Vektor pSEX81 benötigt wurden. Die zweite PCR wurde wie folgt 32-fach angesetzt:

		°C	Zeit	
<b>Ansatz x1</b>				
1. PCR	25 µl			
10 x Vent-Puffer	5 µl			
100 mM MgSO <sub>4</sub>	0,8 µl	94	5'	
25 mM dNTPs	0,4 µl	94	25"	
100% DMSO	2,5 µl	61	25"	x 30
MinT2 for	0,8 µl	72	45"	
MinTNot rev	0,8 µl	72	5'	
Vent-Polymerase	0,5 µl	4	∞	
H <sub>2</sub> O dest.	ad. 50 µl			

Zur Kontrolle und Aufreinigung wurde genauso verfahren wie unter Punkt 4.4.1.1 beschrieben. Die erwartete Bandengröße war 145bp.

#### 4.4.1.3 Klonierung in pSEX81

Zur Klonierung der DNA-Bibliothek (Min10) in den Vektor pSEX81 wurden kompatible Enden durch Restriktion mit NcoI und NotI erzeugt. Hierzu wurde sowohl der Vektor als auch die Bibliothek mit beiden Enzymen verdaut, was einen korrekten Einbau in richtiger Orientierung gewährleistet. Eingesetzt wurden die komplette DNA-Bibliothek sowie 20 µg Vektor, welche getrennt verdaut wurden. Zur Kontrolle wurde ein 1%-iges Gel durchgeführt. Erwartet wurden folgende Banden: pSEX81NcoINotI 4132 und 750 bp und Min10NcoINotI 145 bp. Die DNA-Bibliothek wurde anschließend mit dem MiniElute reaction clean up Kit von Qiagen aufgereinigt. Der Vektor wurde komplett auf ein 2%-iges präparatives Agarosegel aufgetragen und die Bande bei 4132 bp mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt.

Zur Ligation wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:3 mit einer Gesamtmenge von 1 µg DNA eingesetzt. Für die Berechnung der Insertmenge wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Vektor (ng)} \times \text{kbp Insert} \times 3}{\text{kbp Vektor}} = \text{Insert (ng)}$$

Folgende Ligation wurde 5-fach angesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert:

T4 Ligase	1 µl
10 x Ligationspuffer	3 µl
pSEX81NcoINotI	250 ng
Min10NcoINotI	750 ng
<hr/>	
H <sub>2</sub> O dest.	ad. 30 µl

Die Transformation erfolgte in XL-1 Blue elektrisch kompetente Bakterien. Hierzu wurden 10 µl der Ligation und 50 µl der Bakterien in vorgekühlten Reaktionsgefäßen gemischt und in vorgekühlte 0,1 cm Küvetten (Braun) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1800 V. Anschließend wurde sofort mit 1 ml TB-Medium gemischt und alle Transformationsansätze in ein 14 ml Röhrchen vereinigt und für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Die so gewonnene Vorkultur (5 ml) wurde zum Animpfen von 40 ml LB-Medium versetzt mit Glukose (f.c. 2%) und Ampicillin (f.c. 100 µg/ml) genutzt. Die

auf OD<sub>595</sub> 0,5 gewachsene Kultur wurde mit 150 µl Helferphagen versetzt und eine weitere Stunde bei 37°C geschüttelt. Zur Selektion wurde anschließend Kanamycin zu einer Endkonzentration von 30 µg/ml zugegeben und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Zur Lagerung wurden 20 ml der Kultur am nächsten Tag mit 87% Glycerin 2:1 versetzt und bei -80°C gelagert. Die andere Hälfte wurde zur Isolation der Phagenpartikel für 20 Minuten bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert um die in der Kultur befindlichen Bakterien zu sedimentieren. Im Überstand enthaltene Phagen wurden durch Zugabe von 1/5 der Gesamtmenge an PEG/NaCl (20% PEG8000, 2,5 M NaCl) für mindestens 2 h auf Eis gefällt. Phagen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C für 30 Minuten pelletiert. Das so entstandene Pellet wurde in 1 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 100 nM EDTA, pH 7,4) aufgenommen und erneut mit 1/5 PEG/NaCl gemischt. Nach einer Fällung von 30 Minuten auf Eis konnten die Phagen bei 13.000 rpm und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert und erneut in 1 ml TE-Puffer aufgenommen werden um PEG-Reste zu entfernen. Nach letzter Zentrifugation bei 13.000 rpm für fünf Minuten befanden sich die Phagen im Überstand und konnten als Bibliothek genutzt werden. Um die Einsatzmenge für das Panning zu bestimmen, wurde abschließend eine Titerbestimmung durchgeführt. Hierzu wurden Verdünnungen von 10<sup>-2</sup> bis 10<sup>-12</sup> in TE-Puffer hergestellt. Je Probe wurden 495 µl TE-Puffer mit 5 µl Phagen gemischt mit 250 µl XL-1 Bakterienkultur (üN Kultur) versetzt, gemischt und auf LB-GA Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Anzahl der Klone gibt Aufschluss über die Anzahl der Phagenpartikel pro ml.

Zur Kontrolle der Bibliothek hinsichtlich Diversität und DNA-Sequenz wurden außerdem einzelne Klone gepickt, in LB-GA-Medium gezogen und die Phagemide mittels Plasmid Mini Kit von Qiagen isoliert. Diese konnten dann mit Hilfe des pSEX-Primers und GATC sequenziert werden. Die Sequenzen wurden anschließend auf die Min-Struktur untersucht.

## 4.4.2 Herstellung der Min-Bibliothek für Ribosome Display

### 4.4.2.1 Erste und zweite PCR

Erste und zweite PCR wurden wie unter Punkt 4.4.1.1 und 2 angesetzt. Für die Klonierung in PRDV werden die Schnittstellen NcoI und SfiI benötigt. Anstelle des Primers MinNotrev wurde deshalb MinSfilrev verwendet.

### 4.4.2.3 Klonierung in PRDV

Ausgangspunkt für das Ribosome Display ist eine DNA-Bibliothek mit vorangestelltem T7-Promotor, 5' stem loop und einer Ribosomenbindestelle (RBS). Um die Formation von Ribosomenkomplexen zum Panning zu ermöglichen, ist außerdem ein 3' stem loop ohne Stopp-Codon nötig. Diese werden durch die Klonierung in den PRDV [50] an das PCR-Produkt angefügt. Um die DNA-Bibliothek in PRDV (4279 bp) zu klonieren, wurden kompatible Enden durch Restriktionsverdau erzeugt. Bibliothek und PRDV wurden mit SfiI und NcoI geschnitten und die Bibliothek mit Hilfe des MiniElute Reaction Clean Up Kits aufgereinigt (erwartete Banden bei 100 bp). Für den Vektor PRDV wurden folgende Banden erwartet: 3432 und 847 bp. Die Aufreinigung des geschnittenen Vektors (Bande 3432 bp) erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen.

Für die Ligation von Bibliothek und Vektor (100 ng) wurde die Bibliothek in 5-fachem Überschuss eingesetzt. Die Berechnung erfolgte wie unter Schritt 4.4.1.3. Insgesamt wurden 18 Ligationen zur Herstellung der Bibliothek verwendet. Die Ligation erfolgte wie unter Punkt 4.4.3.1 mit der Roche T4-Ligase üN bei 4°C.

### 4.4.2.4 Dritte PCR

Die dritte PCR wurde zur Amplifikation durchgeführt. Ergebnis ist ein lineares PCR-Produkt welches als Startmaterial für die *in vitro* Transkription dient. Ansatz der PCR erfolgte nach folgendem Schema:

#### Ansatz x1

Ligation	5 µl			
10 x Vent-Puffer	5 µl			
100 mM MgSO <sub>4</sub>	0,8 µl	°C	Zeit	
25 mM dNTPs	1 µl	95	5'	
100% DMSO	2,5 µl	95	30"	
T7 <sub>m</sub>	1 µl	55	30"	x 35
TolAK <sub>m</sub>	1 µl	72	1'	
Vent-Polymerase	1 µl	72	5'	
H <sub>2</sub> O dest.	ad. 50 µl	4	∞	

Das PCR-Produkt wurde auf einem 1%igem Agarosegel kontrolliert und nachfolgend durch präparative Gelextraktion aufgereinigt. Zur Kontrolle der Bibliothek wurden zwei Transformationen nach Anleitung des Herstellers (Kurzprotokoll) in chemisch kompetente One Shot Top 10 Bakterien durchgeführt. Eingesetzt wurden je Transformation 5 µl Ligation. Transformierte Zellen oder Transformationsansätze wurden auf LB-Amp/IPTG/X-Gal Platten ausplattiert. Am nächsten Tag konnten weiße Klone gepickt und Minipräparationen der Plasmide durchgeführt werden. Die Kontrolle der Bibliothek erfolgte durch Restriktionsverdau von 5 µl der Plasmid-Mini-Probe mit EcoRI und NcoI. Erwartet wurden die Banden 3428 und 500 bp. Zeigten sich die erwarteten Banden, wurde die restliche Probe sequenziert. Als Startprimer wurde der Standard T7 Primer gewählt.

#### **4.5 Phage Display**

Die Phage Display-Technologie wurde in zwei unterschiedlichen Varianten eingesetzt. Zum einen die käufliche Bibliothek Ph.D.12 von NEB sowie eine weitere Methode, welche von Haberkorn *et. al.* speziell für größere Scaffold-Peptide modifiziert wurde. Im nachfolgenden werden beide Methoden beschrieben.

##### **4.5.1 Phage Display mit der Ph.D.12 Bibliothek**

###### *4.5.1.1 Panning Ph.D.12*

Zur ersten Panningrunde wurden  $4 \times 10^{10}$  Plaque forming units (Pfu) der Bibliothek eingesetzt, welche in 500 µl Blockpuffer bestehend aus 0,1% BSA in TBST (pH 7,0, 0,1% Tween20), auf dem Schüttler für 30 Minuten vorinkubiert wurden. Gleichzeitig wurden  $2 \times 50$  µl Streptavidin Beads  $3 \times$  mit 100 µl Blockpuffer gewaschen, in 500 µl Blockpuffer aufgenommen und ebenfalls für 30 Minuten geschüttelt. Die Separation der Beads von Puffer erfolgte dabei mit dem DynaMagnet von Invitrogen. Die so vorgeblockte Bibliothek wurde zusammen mit vorgeblockten Beads (entsprechend 50 µl Ausgangsvolumen) und 100 nM eines biotinylierten Negativtargets, welches ebenfalls einen IgG-Fc-Teil enthält, für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Binder gegen das Negativtarget sowie den Fc-Teil werden von den Beads zurückgehalten. Die Bibliothek, die sich nun im Überstand befand, wurde somit auf IgG-Fc-Binder vorselektiert. Diese reduzierte Bibliothek wurde anschließend zu 100 nM biotinyliertem CD276 gegeben und für 1 h auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Binder gegen CD276 konnten nun mit Hilfe des Biotin-Tags durch Zugabe von frischen vorgeblockten Beads (entsprechend 50 µl



Ausgangsvolumen) gebunden werden. Die Mischung wurde für weitere 15 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Um Nichtbinder bzw. schwache Binder zu eliminieren, wurden die Beads außerdem 6 × mit 500 µl Blockpuffer gewaschen. Die Waschschriffe wurden mit steigender Panningrunde auf bis zu 10 erhöht um das Waschen stringenter zu machen und niedrigmolare Binder zu selektieren. Weiterhin wurde ein Waschschriff mit TBS angefügt um restliches Tween20 zu entfernen. Die Elution der gebundenen Phagen erfolgte mit einem sauren Elutionspuffer (0,2 M Glycin-HCL, pH 2,2) für 15 Minuten auf dem Schüttler. Um eine Schädigung der Phagen zu vermeiden, wurde der Überstand anschließend in einem neuen Reaktionsgefäß zügig mit 100 µl 1 M Tris-HCL pH 9,1 gemischt um die Lösung zu neutralisieren.

Direkt im Anschluss wurden die Phagen mittels ER2738 Bakterien amplifiziert. Hierzu wurde eine 20 ml Kultur mit einer OD von 0,01 bis 0,05 mit dem gesamten Eluat versetzt und für 4,5 h bei 37°C im Bakterien-schüttler geschwenkt. Zur Isolation der Phagen wurde die Kultur anschließend bei 5000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Die Phagen befanden sich dabei noch im Überstand, Bakterien wurden sedimentiert. Um die Phagenpartikel zu fällen, wurde anschließend 1/5 Volumen PEG/NaCl zugegeben, 10 × invertiert und über Nacht bei 4°C inkubiert.

#### *4.5.1.2 Aufreinigung der Phagenpartikel Ph.D.12*

Die durch PEG beschwerten Phagen konnten dann bei 5000 rpm für 30 Minuten bei 4°C abzentrifugiert werden. Das entstandene Pellet wurde luftgetrocknet, in 1 ml TE-Puffer aufgenommen, mit 1/5 Vol. PEG/NaCl versetzt, invertiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Die pegylierten Phagenpartikel konnten nun in einer Tischzentrifuge bei max. Geschwindigkeit für 15 Minuten zentrifugiert werden. Sedimentierte Phagen wurden in 1 ml TE-Puffer gelöst, erneut für fünf Minuten zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Phagen wurden in die nächste Panningrunde eingesetzt.

#### *4.5.1.3 Phagentiter Ph.D.12*

Um die Amplifikation der Phagen zu überprüfen sowie den Titer zu bestimmen, um die Einsatzmenge in eine neue Panningrunde zu ermitteln, wurden die Phagen  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  und  $10^{-12}$  in 1 ml TE-Puffer pH 7,4 verdünnt. Die Verdünnungen wurden anschließend mit 300 ml einer Kultur von ER2738 (OD 0,5) versetzt, kurz invertiert und für zehn Minuten bei RT inkubiert. In Rundbodenröhrchen wurden währenddessen 3 ml Agar-Top (LB-Medium versetzt mit 7 g Agar, autoklaviert) vorgelegt (max. 45°C). Zügig wurden die Verdünnungen sowie 1 ml TE-Puffer zur

Kontrolle zugegeben. Die komplette Lösung wurde durch Schwenken auf IPTG/X-Gal-LB-Platten (f.c.: IPTG 1,25 µg/ml, X-Gal 1 µg/ml) verteilt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag konnten die blauen Klone ausgezählt und die erforderliche Menge entsprechend  $10^{11}$  Pfu für die nächste Panningrunde ermittelt werden.

#### **4.5.2 Panning mit dem M13-Phagensystem**

##### *4.5.2.1 Panning und Aufreinigung des M13-Phagensystems*

Das Panning des M13-Phagensystems entsprach bis zum Amplifikationsschritt dem des Pannings von Ph.D.12 (Punkt 4.4.1.1). Ausgangsmenge der Phagen waren hier  $10^{10}$  Pfu. Zur Vermehrung der Phagen wurden hier zunächst 500 µl einer ÜN-Kultur von XL-1 Blue Bakterien mit dem Phageneluat und 2 ml LB-Medium gemischt und für 1 h bei 37°C im Bakterieneschüttler geschwenkt. Anschließend wurde diese Vorkultur in 20 ml LB-Medium versetzt und 2% Glukose sowie 100 µg/ml Ampicillin zugegeben und eine weitere Stunde geschüttelt. Zur Verpackung der Phagenproteine bedarf es hier eines Helferphagen, des M13-Phagen. 150 µl wurden hiervon der Kultur zugesetzt und eine weitere Stunde geschüttelt. Zum Abschluss wurde Kanamycin in der Konzentration 30 µg/ml zugegeben und über Nacht weiter geschüttelt. Die Aufreinigung der Phagenpartikel erfolgte dann wieder nach dem gleichen Protokoll der Ph.D.12 Bibliothek (Punkt 4.4.1.2).

##### *4.5.2.2 Phagentiter des M13-Phagensystems*

Die Titrierung der Phagen erfolgte wie bei Ph.D.12 mit den Verdünnungsstufen  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  und  $10^{-12}$  in 500 µl TE-Puffer. Diese wurden anschließend mit 250 µl einer ÜN-Kultur von XL-1 Blue gemischt und sofort auf LB-GA-Platten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Durch Auszählen der Klone wurden der Titer und die Einsatzmenge für die nächste Panningrunde bestimmt ( $10^{11}$  Pfu).

## 4.6 Ribosome Display

Die Methode des Ribosomen-Displays wurde größtenteils nach Protokollen von Christian Zahnd und Andreas Plückthun durchgeführt. Grundlagen waren das Protokoll „Ribosome Display selecting and evolving proteins *in vitro* that specifically bind to a target“ von NATURE METHODS [62] sowie das Buchkapitel 21 “Ribosome display: A technology for selecting and evolving proteins from large libraries” von Birgit Dreier und Andreas Plückthun aus dem Buch PCR Protocols [95].

Alle Puffer, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien wurden nach Angabe des Protokolls hergestellt und bezogen. Wichtig ist, da es sich hier um Arbeiten mit RNA handelt, der Ansatz aller Puffer mit DEPC-versetztem (0,1%) destilliertem autoklaviertem Wasser erfolgt.

Für das Panning wurde nicht das Mikrotiter-Platten-System verwendet, stattdessen wie für das Phage Display Streptavidin Beads von Invitrogen.

### 4.6.1 *In vitro* Transkription

Grundlage der *in vitro* Transkription war die DNA-Bibliothek, die wie unter Punkt 4.4.2 beschrieben, hergestellt wurde. Die DNA-Bibliothek verfügte über den für die Transkription wichtigen T7 Promotor mit einer RNA-Polymerase-Bindestelle. Eingesetzt wurden 5-10 µg der dritten PCR (= DNA-Bibliothek). Die Reaktion erfolgte mit dem RiboMAX Large Scale RNA Production System T7 von Roche nach folgendem abgewandeltem Protokoll:

T7 Transkriptions 5 x Puffer	10 µl
rNTPs	12,5 µl
DNA-Template in Wasser	ad. 25 µl
T7 Enzymmix	2,5 µl
H <sub>2</sub> O (Nukelase frei)	ad. 50 µl

Die *in vitro* Transkription wurde für drei Stunden bei 37°C im Wärmeblock inkubiert. Um eventuelle DNA-Reste zu entfernen, wurde anschließend DNase (1 U/1 µg Template) zugegeben und nochmals für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Aufreinigung wurde das MiniRNeasy Kit von Roche verwendet. Die Probe wurde anschließend mit 30 µl RNase freiem Wasser eluiert und im Nanodrop gemessen. 10 µg wurden für die nachfolgende *in vitro* Translation aliquotiert und in flüssigem Stickstoff sofort tiefgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Weiterhin wurde die Qualität der RNA auf einem 1%-igem MOPS-Agarosegel überprüft. Hierzu wurden 1 µl der RNA Probe mit 1,5 µl H<sub>2</sub>O dest. (Nuklease frei) und

2,5 ml RNA Ladepuffer gemischt und mit dem RiboRuler von Fermentas aufgetragen. Erwartet wurde eine Bande bei 500 bp.

#### 4.6.2 *In vitro* Translation

Die *in vitro* Translation erfolgte mit selbst hergestellten Komponenten. Alle Schritte wurden, wenn nicht anders angegeben auf Eis, im Kühlraum bei 4°C bzw. in gekühlten Zentrifugen durchgeführt. Alle Reaktionsgefäße wurden zunächst mit 0,1% BSA in PBS vorgeblockt. Die *in vitro* Translation wurde wie nachfolgend angesetzt:

Premix	41 µl
Ribosomen	50 µl + 10 µg <i>in vitro</i> Transkription
PDI (22 µM)	2 µl
Methionin (200 µM)	2 µl
H <sub>2</sub> O dest (Nuklease frei)	5 µl

Die Reaktion wurde für zehn Minuten bei 37°C im Wärmeblock inkubiert, mit 440 µl WBT (50 mM Tris (zunächst pH auf 7,5 einstellen!), 150 mM NaCl, 50 mM MgAc, 0,05% Tween20, mit 0,22 µm filtern) abgestopppt und 12,5 µl Heparin (Heparinstocklösung 200 mg/ml) zugegeben = WBTH-Puffer. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis, konnte die Probe bei 13.000rpm für fünf Minuten zentrifugiert werden. Der Überstand mit den Ribosomen-RNA-Peptid-Komplexen wurde zum Pannen verwendet.

#### 4.6.3 Panning des Ribosome Displays

Pannings wurden mit Streptavidin Beads (Invitrogen 112.05D) und biotinylierten Targets im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Die angegebene Bindungskapazität der Streptavidin Beads ist 200 pmol pro mg Beads. Die Konzentration der Beads ist 10 mg/ml. Pro Versuch wurden 50 µl Beads verwendet, die zunächst in 0,1% BSA PBS gewaschen und in 25 µl Endvolumen aufgenommen wurden. Die theoretische Bindekapazität des Zielproteins ist demzufolge 100 pmol. Eingesetzt wurden pro Panningrunde 100 nM des biotinylierten Zielproteins, was zu einer Absättigung der Bindestellen der Beads führt. Um eine mögliche Bindung an Beads auszuschließen, wurde zusätzlich ein Panningschritt gegen Beads eingeführt. Streptavidin-Binder wurden so vor dem eigentlichen Panning selektiert und verworfen. Der Überstand der *in vitro* Translation wurde im ersten Schritt mit 25 µl Beads gemischt und 15 Minuten auf dem Overheadshaker geschüttelt. Gleichzeitig wurde ein Negativtarget, welches ebenfalls über einen Fc-Teil verfügt mit 25 µl Beads gemischt. Streptavidin bzw. Beads-Binder konnten dann mit Hilfe des DynaMagnet isoliert werden. Die im

Überstand vorselektierte Bibliothek wurde im zweiten Schritt für 1 h auf die mit 100 nM biotinylierten Negativtarget beschickten Beads gegeben und auf dem Overheadshaker gemischt. Die reduzierte Bibliothek, die sich nun im Überstand befand, wurde dann zu 100 nM biotinyliertem CD276 gegeben. CD276-Binder konnten dann mit Hilfe des DynaMagnet isoliert werden. Um Nichtbinder und schwache Binder zu entfernen, wurden die Beads zunächst sechsmal (in steigenden Panningrunden bis zu achtmal) mit je 200 µl WBTH-Puffer gewaschen. Um eine Dissoziation der Ribosomen-RNA-Peptid-Komplexe zu erreichen, wurden 200 µl Elutionspuffer (50 mM Tris-Acetat, 150 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 7,5, 0,22 µm filtern) zugefügt, der eine Spaltung der Ribosomenuntereinheiten herbeiführt und somit die mRNA frei wird. Da es sich bei der freiwerdenden mRNA um sehr niedrige Konzentrationen handelt, wurde außerdem 5 µl RNA von *S. cerevisiae* (50 µg/ml) zugegeben, um die Isolation mit einem Kit zu erleichtern. Der Mix wurde für 15 min auf dem Overheadshaker geschüttelt. Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem High Pure RNA Isolation Kit von Roche (Elutionsvolumen 30 µl).

#### 4.6.4 reverse Transkription der mRNA

Die reverse Transkription der mRNA in cDNA erfolgte mit Hilfe der SuperScript II reversen Transkriptase (Invitrogen, 18064-022), die eine reduzierte RNase H Aktivität und eine erhöhte thermale Stabilität besitzt. Durch die erhöhte Hitzeresistenz werden eine höhere Spezifität und eine größere cDNA Ausbeute erreicht.

Primer TolAkint	3 µl		
25 mM dNTPs	3 µl	5'	65°C
RNA (komplettes Eluat)	30 µl		
<hr/>			
5 x FS-Puffer	12 µl		
DTT	6 µl	2'	42°C
RNaseOUT	3 µl		
<hr/>			
SSRT II	1,5 µl	50'	42°C

Abschließend wurde die Probe zur Inaktivierung der SSRT 10 min bei 70°C inkubiert.

#### 4.6.5 Vierte und fünfte PCR

Zur Amplifizierung der cDNA wurde eine vierte PCR durchgeführt. Um eine erneute *in vitro* Transkription und Translation zu ermöglichen, müssen der T7-Promotor, die RBS sowie die stem loops erneut angefügt werden. Dies wurde durch Überhangprimer in zwei aufeinanderfolgenden PCRs realisiert. Der Primer T7m

enthält die codierende Sequenz für den T7-Promotor, der Primer SDAm die RBS sowie den 5' stem loop und die Primer TolAkm und TolAKintm den 3' stem loop sowie den tolA Spacer. Beide PCRs wurden mit Hot Start Polymerasen der Phusion (Finnzymes, F-540S) und der Vent-Polymerase (NEB, M254S) angesetzt, die durch proof reading und der Hot Start Methode eine höhere Genauigkeit beim Ablesen des Matrizenstrangs bzw. spezifischere Anlagerung der Primer ermöglichen. Je PCR wurde zunächst die optimale Template menge bestimmt. Eingesetzt wurden jeweils 0, 1, 2 und 5 µl Template.

**4.PCR**

cDNA	0, 1, 2 und 5 µl		
5 x Phusion buffer	10 µl	°C	Zeit
dNTPs 10 mM	1 µl	98	1'
SDAm	1 µl	98	10" x 35
TolAKintm	1 µl	72	30"
Phusion Polymerase	0,5 µl	72	5'
H <sub>2</sub> O dest.	ad. 50 µl	4	∞

**5.PCR**

4. PCR	0, 1,2 und 5 µl		
10 x Vent buffer	5 µl	°C	Zeit
MgSO <sub>4</sub>	0,8 µl	94	5'
dNTPs 10 mM	1 µl	94	20"
T7m	1 µl	55	20" x 25
TolAkm	1 µl	72	30"
Vent Polymerase	1 µl	72	5'
H <sub>2</sub> O dest.	ad. 50 µl	4	∞

Zur Kontrolle wurden je PCR-Probe 2 µl auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Als Größenstandard diente der 1 kb Marker von Fermentas. Entsprachen die Banden dem gewünschten Produkt, wurde ein präparatives Gel mit der restlichen Probe durchgeführt. Die gesuchte Bande wurde mittels Skalpell ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen aufgereinigt. Nach der Purifikation wurde die DNA erneut auf einem Agarosegel kontrolliert und im Nanodrop gemessen. Die so aufgereinigte DNA, die für eine vorselektierte Bibliothek gegen CD276 kodierte, konnte nun wieder zur *in vitro* Transkription zur zweiten Panningrunde eingesetzt werden (5-10 µg).

## 4.7 Peptidsynthese

Alle Peptidsynthesen, Markierung mit Radionukliden sowie Modifikationen wurden von Thomas Lindner, Dr. Frederic Zoller und Dr. Felix Nissen (Abteilung Nuklearmedizin/ Radiopharmazeutisches Labor, Universitätsklinikum Heidelberg) durchgeführt. Die Peptide wurden durch automatisierte Festphasen-Peptidsynthese an einem ABI 433A-Peptidsynthesizer von Applied Biosystems nach dem Merrifield-Prinzip hergestellt [96].

Die Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen wurde mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) an einem Agilent 1100 HPLC System durchgeführt. Bei allen HPLC-Verfahren wurde ein Gradient von 100 % Wasser zu 100 % Acetonitril mit je 0,1% TFA über 5 min zur Elution folgender Säulen verwendet: Chromolith® Performance RP-18e, 100-3 mm mit einem Fluss von 2 ml/min sowie Chromolith® Performance RP-18e, 100-4.6 mm mit einem Fluss von 4 ml/min. Massenspektrometrische Analysen (HPLC-MS) wurden an einem Thermo Scientific Exactive Massenspektrometer in Kombination mit einer Agilent 1200-Analyse durchgeführt. Eine Waters Hypersil GOLD aQ 200 x 2.1 mm Säule wurde bei einem Fluss von 200 µl/min über 30 min bei 60°C eingesetzt.

### 4.7.1 Festphasensynthese linearer Peptide

Die Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden in 10-fachem Überschuss zum Rinkamid-Trägerharz (Tentagel R RAM) eingesetzt. Um die Bildung von Sulfoxiden zu vermeiden, wurde Norleucin anstelle von Methionin eingesetzt. Als Kopplungsreagenz diente HBTU/DIPEA in NMP. Grundlage der Synthese stellt die kovalente Verknüpfung der C-terminal aktivierten Aminosäure an den geschützten N-Terminus des Peptidyl-Harzes. Die N-terminal Schutzgruppe Fmoc (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) erfolgte durch 20 % Piperidin in NMP. Die Qualität der Kopplung wird durch die Messung der Absorption der Abspaltung bei 301 nm bestimmt.

Die Abspaltung der Peptide vom Trägerharz erfolgte mit TFA/H<sub>2</sub>O/Triisopropylsilan (95:2,5:2,5) für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden Peptide mit eiskaltem Diethylether gefällt, zentrifugiert, mehrfach mit Diethylether gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:1) aufgenommen und mittels präparativer HPLC mit einer Gilson 321-Anlage ausgestattet mit einer Merck Chromolith® SemiPrep RP-18e, 100-10 mm Säule mit einem Fluss von 10ml/min über 10 min oder mit einer Waters XBridge BEH130 PREP C18 5 µm OBD

19 x 150 mm Säule und einem Fluss von 20ml/min über 20 min aufgereinigt. Das finale Produkt wurde nach Lyophilisation als weißer Feststoff erhalten und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **4.7.2 Faltung von Miniprotein-Scaffolds**

Die oxidative Faltung zur Ausbildung der Disulfidbrücken sowie Aufarbeitung der Miniprotein-Scaffolds erfolgte durch Frederic Zoller sowie Thomas Lindner wie in der Dissertation von Frederic Zoller (Klinische Kooperationseinheit Nuklearmedizin, DKFZ Heidelberg) sowie der Publikation von Zoller *et al.* beschrieben [97].

#### **4.7.3 Radiomarkierungen mit I-125 und I-131**

Alle Peptide wurden durch elektrophile aromatische Substitution an einem Tyrosinrest mit Iod Isotopen radioaktiv. Sofern kein Tyrosin in der kodierenden Sequenz der Peptide enthalten war, wurde diese Funktion bei der Festphasensynthese C- bzw. N-terminal eingefügt. Die Iodierung erfolgte mittels der Chloramin-T-Methode [98]. Chloramin-T wird als oxidierendes Reagenz zur Herstellung von aktivem „I+“ verwendet. Für die Markierung wurden 5 µl Peptids ( $10^{-3}$  M) in Wasser oder DMSO und 25 µl Phosphatpuffer (0,25 M, pH 7,5) zu 1- 15 MBq Na-<sup>125</sup>I in 0.01 M NaOH hinzugefügt. Durch Zugabe von 5 µl Chloramine-T Lösung (2.8mg/ml in Wasser) wurde die Iodierungsreaktion gestartet. Nach einer Inkubation von 30 sec bei RT wurde die Reaktion mit 10 µl einer gesättigten Methionin-Lösung abgestopt. Die Isolierung des radiomarkierten Produkts erfolgte durch radio-HPLC an einem Gynotek P-580-HPLC ausgestattet mit einem UV/VIS- und  $\gamma$ -Detektor auf einer Merck Chromolith® Performance RP-18e, 100 4.6 mm Säule (Flussrate 2ml/min über 10 min). Die radioaktive Peptid-Lösung wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.



## 4.8 *In vitro* Peptid-Charakterisierung

Alle nachfolgenden Versuche wurden dreifach zeitlich unabhängig ausgeführt. Pro Versuch wurden je Zeitwert drei Wells angesetzt und daraus resultierende Mittelwerte und Standardabweichungen in Diagrammen dargestellt.

### 4.8.1 Bindungskinetiken an immobilisiertem Protein

Um die spezifische Bindung von Peptiden an die extrazelluläre Domäne der Zielproteine zu untersuchen, wurden Bindungsstudien auf immobilisiertem Protein durchgeführt. Hierzu wurde das rekombinante Zielprotein auf maxisorp Platten von Nunc (44-2404) immobilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS pH 7,4 wurde das Protein in 100 µl PBS auf 50 nM verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Referenz dienten Wells, die nur mit PBS ohne Zugabe von Zielprotein behandelt wurden. Entfernung von ungebundenem Protein erfolgte durch zwei Waschschrte mit PBS. Das zu untersuchende <sup>125</sup>I markierte Peptid wurde so in PBS pH 7,4 (= Stammlösung) gelöst, dass pro 100 µl Stammlösung im γ-Counter 100.000 Counts gemessen wurden. Für die spätere Berechnung wurden jeweils dreimal 100 µl abgenommen, in PE-Röhrchen überführt und im γ-Counter als Standard gemessen. Pro well wurden 100 µl der Stammlösung auf das immobilisierte Protein gegeben. Die Inkubation erfolgte bei RT für eine Stunde. Nach Abnahme der Peptidlösung und zweimaligem Waschen mit 100 µl PBS wurde gebundenes Peptid durch 0,3 M NaOH gelöst und in PE-Röhrchen überführt. Die Berechnung der gebundenen Dosis wurde auf 1 Millionen Zellen und einen Standard von 100.000 Counts bezogen.

$$\frac{\% \text{ Bindung}}{\text{Dosis}} = \frac{\text{Counts}}{\square \text{Standard} \times 100}$$

### 4.8.2 Peptid-Arrays

Peptid Arrays wurden von der Firma INTAVIS Heidelberg von Daniel Maisch im Rahmen des Konsortiums MobiTech hergestellt. Prinzip des CelluSpots™ ist es, Cellulose-Peptid-Konjugate auf die Oberfläche von Glasobjektträgern zu spotten. Vorteil der Methode ist die Bindung der Peptide an Cellulose, was eine 1000-fach höhere Menge an Protein pro Fläche erlaubt. Die CelluSpots™ wurden mit dem Peptid PDGFR-P1 nach folgendem Schema gespottet: An erster Stelle befindet sich das Originalpeptid. Von oben nach unten wurde der Reihe nach die erste, zweite,

dritte usw. Aminosäure des Peptids durch alle restlichen 20 möglichen Aminosäuren ausgetauscht, sodass eine Randomisierung des kompletten Peptids erfolgte. Nach Inkubation mit dem Targetprotein und anschließender Detektion mit einem spezifischen Antikörper ließ sich die Bindung von Peptid-Targetprotein nachweisen. Auf diese Weise lassen sich Peptide mit besseren Bindungseigenschaften finden.

Die CelluSpots™ wurden zunächst für 2 h unter Schütteln bei RT mit 4%-igem Milchpulver in PBS pH 7,4 vorgeblockt. 0,1 µM der Proteine CD276, PDGFRβ, sowie EGFR als Kontrollprotein, wurden anschließend für 3 h in 4%-igem Milchpulver in PBS bei RT inkubiert. Die Blocklösung wurde abgenommen und die Membran dreimal mit PBS 0,02% Tween20 gewaschen. Die Antikörper wurden in 4% Milch PBST (Tween20 0,02%) unter Schütteln für 1 h bei RT inkubiert und die CelluSpots konnten nach dreimaligem Waschen mit 0,02% Tween20/PBS ausgewertet werden. Die Detektion erfolgte mittels ECL-Methode für HRP gekoppelte Antikörper bzw. bei Fluoreszenz-markierten Antikörpern durch Einscannen der Slides.

#### 4.8.3 Bindungskinetiken an Zellen

Um die Bindung von Peptiden an verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlicher Expression zu bestimmen, wurden Bindungsversuche an unterschiedlichen Tumorzelllinien durchgeführt. Für eine Bindungskinetik wurde die Bindung folgender Zeitpunkte bestimmt: zehn Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten, 120 Minuten, 240 Minuten, 360 Minuten und 480 Minuten. Zusätzlich wurde die Plastikbindung getestet. Hierfür dienten Wells, die 24 Stunden mit Medium inkubiert und anschließend entsprechend den Wells mit Zellen behandelt wurden. Um die Zellzahl pro Well berechnen zu können, wurden außerdem drei Wells extra angesetzt. Diese wurden im Zellzähler ausgewertet, der Mittelwert bestimmt und zur Berechnung verwendet.

Das zu untersuchende <sup>125</sup>I markierte Peptid wurde so in PBS pH 7,4, 2% BSA verdünnt (= Stammlösung), dass pro 50 µl Stammlösung im γ-Counter 1 Millionen Counts gemessen wurden. Für die spätere Berechnung wurden jeweils dreimal 50 µl abgenommen, in PE-Röhrchen überführt und im γ-Counter als Standard gemessen. Nach dem Blocken der Zellen, wurden 50 µl Stammlösung in 1 ml Medium ohne FCS verdünnt und auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann im 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Brutschrank inkubiert. Zur Auswertung wurde die Peptid-Medium-Lösung nach entsprechender Zeit abgezogen und die Zellen dreimal mit 1 ml PBS pH 7,4 gewaschen. Nach Zugabe von 0,3 M NaOH konnten die Zellen mit einem

Zellschaber abgekratzt, in ein PE-Röhrchen überführt und im  $\gamma$ -Counter gemessen werden. Mit den Wells ohne Zellen (= Plastikwerte) wurde genauso verfahren.

Die Berechnung der gebundenen Dosis wurde auf 1 Millionen Zellen und einen Standard von 1 Millionen Counts bezogen. Pro Zeitwert und Zellzahl wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

$$\frac{\% \text{ Bindung} / \text{Dosis}}{1 \text{ Mio. Zellen}} = \frac{\text{Counts} / \square \text{ Zellzahl}}{\text{Standard} \times 1 \text{ Mio.} \times 100}$$

#### 4.8.4 Spezifische Bindung

Ziel der Kompetition ist es, den  $IC_{50}$  Wert (halbe, maximale inhibitorische Konzentration) eines Peptids zu bestimmen. Hierfür wurde zusätzlich zum radioaktiv markierten Peptid das nicht markierte Peptid (Kompetitor) zu den Zellen gegeben. Markiertes und nicht-markiertes Peptid konkurrieren um die Bindestellen am Zielprotein. Durch Zugabe steigender Konzentrationen von Kompetitor wird die Bindung des radioaktiv markierten Peptids verringert. Es wurden Kompetitorkonzentrationen von  $10^{-12}$  bis  $10^{-4}$  M eingesetzt. Zusätzlich wurde die Bindung ohne Zugabe von Kompetitor bestimmt. Pro Kompetitorkonzentration wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Durchführung entsprach der einer Bindungskinetik. Unterschied ist nur die zusätzliche Zugabe von Kompetitor, der vorher in PBS gelöst wurde. Die Berechnung der Bindung erfolgte wie unter Punkt 4.8.2 beschrieben.

#### 4.8.5 Bestimmung von internalisierter und extrazellulär gebundener Aktivität

Um den Anteil an internalisiertem und extrazellulär gebundenem Peptid zu bestimmen, wurde zusätzlich vor dem Lyseschritt mit NaOH ein Waschriff mit saurem Glyzin-HCL-Puffer pH 2,8 eingefügt. Weiterhin wurden in einem zweiten Ansatz Zellen bei  $37^{\circ}\text{C}$  und  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Inkubation bei  $4^{\circ}\text{C}$  verhindert eine Internalisierung von Peptiden. Zellen sowie die Stammlösung wurden wie unter Punkt 3.7.1 beschrieben vorbereitet. Nach Inkubation des radioaktiv markierten Peptids, wurde nach zweimaligem Waschen mit 1 ml PBS extrazellulär gebundenes Peptid durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Glyzin-HCL pH 2,8 gelöst. Nach zehn Minuten Inkubation bei RT, konnte der Glycinpuffer abgenommen und in ein PE-Röhrchen zur Messung überführt werden. Nach zwei weiteren Waschriffen mit 1 ml PBS wurden die Zellen

wie im Versuch Bindungskinetik lysiert und ebenfalls im  $\gamma$ -Counter gemessen. Anteil an internalisiertem bzw. extrazellulär gebundenem Peptid wurde in Prozent anteilig an der Gesamtbindung angegeben.

#### **4.8.6 Stabilität in humanem Serum**

In Hinsicht auf den späteren Einsatz *in vivo* in Tumor tragenden Mäusen für Organverteilungsstudien und bildgebende Verfahren sowie als Tracer oder zum Einsatz bei PRRT im Menschen, wurden mit  $^{125}\text{I}$  markierte Peptide einem Stabilitätsversuch in humanem Serum (Sigma) unterzogen. Markiertes Peptid wurde hierzu bei 37°C in Serum inkubiert und nach 5, 30, 60, 120 und 240 min im Verhältnis 1:1 mit Acetonitril auf Eis gefällt. Serumproteine wurden durch einen Zentrifugationsschritt von fünf Minuten bei 1300 rpm von leichteren Peptiden separiert, welche sich im Überstand befanden. Der Überstand des Serumverdaus konnte nun mittels RP-HPLC analysiert werden.

#### **4.8.7 Stabilität *in vitro***

Um die Stabilität von Peptiden während eines *in vitro* Versuches zu ermitteln, wurde zu Zeitpunkten der Bestimmung der Bindung, Mediumüberstand abgenommen, bei 3000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und durch direktes Einspritzen auf eine Chromolith-Säule per HPLC analysiert.

#### **4.9 *In vivo* Peptid-Charakterisierung**

Im Hinblick auf den späteren Einsatz als Tumordiagnostikum, das heißt als Radiotracer bzw. PRRT wurden Peptide zusätzlich zur Analyse in humanem Serum auch *in vivo* in Nacktmäusen getestet. Als Modell diente der von Charles River, Frankreich bezogene Mausstamm BALB/c nude (Nomenklatur CANn.Cg-Foxn1<sup>nu</sup>/CrI), welcher keinen Thymus besitzt somit T-Zell und immunodefizient ist und sich deshalb zur Inokulation von Xenotransplantaten eignet. Mäuse waren bei Ankunft sechs bis neun Wochen alt und wurden in VentiRacks gehalten. Tiere wurden mit Pellets der Firma PROVIMI KLIBA SA, CH-4303 Kaiseraugst und der Katalognummer 3302 M/R Spezialstämme >25 KGY sowie autoklaviertem Wasser versorgt. Alle Tierexperimente wurden von Ursula Schierbaum und Karin Leotta (Klinische Kooperationseinheit Nuklearmedizin, DKFZ Heidelberg) nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

#### 4.9.1 Tumorinokulation

Je nach Versuch wurden Tumore am Bein für SPECT-Analysen und am Rumpf für Organverteilungsstudien inokuliert. Zunächst wurden entsprechende Tumorzellen in Zellkulturflaschen angezogen und in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmen untersucht. Am Transplantationstag, wurden die Zellen wie unter Punkt 3.1.2 gelöst, die Zellzahl im Zellzähler bestimmt und in 10 ml serumfreien OPTI-MEM Medium gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift in OPTI-MEM konnten die Zellen in frischem Medium so aufgenommen werden, dass sich pro 100 µl Medium 4 Mio. Zellen in der Inokulationslösung befanden. Vor der Injektion, wurden die Tiere mit 1 Vol.% Sevorane® (Abbott) und 0,5 l/min med. O<sub>2</sub>. anästhesiert. Pro Tier wurden 4 Mio. Zellen subkutan mittels einer Injektionsnadel gespritzt. Tiere mit Tumoren ab einer Größe von etwa 1 cm<sup>3</sup> wurden für Szintigrafien, Kleintier-PET sowie Organverteilungsstudien eingesetzt.

#### 4.9.2 Intravenöse Peptidapplikation

<sup>131</sup>I oder <sup>125</sup>I markierte Peptide wurden in 0.9% NaCl in einer Konzentration von 5 MBq/ml gelöst. 200 µl der Lösung entsprechen ca. 1 MBq wurden dann in die Schwanzvene der anästhesierten Maus gespritzt. Der Radioligand konnte nun je nach Anwendung von fünf Minuten bis zu 4 h im Blutkreislauf zirkulieren.

#### 4.9.3 γ-Szintigrafie

Die Szintigrafie ist ein bildgebendes Verfahren der nuklearmedizinischen Diagnostik bei der Bilder erzeugt werden, die die Verteilung eines Radiopharmakons zeigen. Das Radiopharmakon wurde hierzu intravenös injiziert und die Verteilung bzw. Anreicherung im Zielgewebe oder Organ detektiert. Die Strahlung kann über einen bestimmten Zeitraum gemessen werden, was einen zeitlichen Ablauf von Aufnahme und Ausscheidung der strahlenden Substanz darstellt. Das Prinzip der Szintigraphie besteht aus γ-Strahlen, die das applizierte Radioisotop aussendet und die auf ein Kristall aus NaI(Tl) auftreffen. Die auftreffenden γ-Quanten werden vom Kristall absorbiert und erzeugen dadurch Lichtblitze (Szintillationen). Die Lichtquanten gelangen ihrerseits über ein optisches Fenster auf die Photokathode eines Photomultipliers wo sie verstärkt und in einen elektrischen Impuls umgewandelt werden [99].

Je Peptid wurden ca. 9 MBq in die Schwanzvene Tumor-tragender Nacktmäuse injiziert. Die Aufnahme in Tumor und Organen wurde über einen Zeitverlauf von 4 Stunden mit einem γ-Imager gemessen. Es wurde ein dynamischer Verlauf zwischen

0-30 min und weitere Szintigramme nach 1 h, 2 h und 4 h aufgenommen. Für die Dauer des Versuchs wurden die Mäuse, wie unter Punkt 4.9.1 angegeben, narkotisiert.

#### 4.9.4 Organverteilungsstudien

Für Organverteilungsstudien wurden Tumore am Rumpf transplantiert. Tiere wurden, wie unter Punkt 4.9.1 beschrieben, anästhesiert.  $^{131}\text{I}$ -markierte Peptide wurden i.v. in die Schwanzvene appliziert. Nach zehn, 60 und 120 Minuten wurden die Tiere unter  $\text{CO}_2$ -Gas getötet. Zunächst wurde das Blut durch die Eröffnung des Herzens gewonnen. Weiterhin wurden folgende Organe sowie der Tumor entnommen, gewogen und mit einem  $\gamma$ -Counter gemessen: Herz, Lunge, Milz, Leber, Niere, Oberschenkelmuskel, Dünndarm und Gehirn. Die Berechnung erfolgte als injizierte Dosis pro Gramm Körpergewicht nach folgendem Schema:

$$\% \text{ ID/g} = \frac{\text{counts} / \text{Gesamtmasse Organ}}{\text{Gesamtinjektionsdosis}} \times 100.000$$

$$\text{Tumor} / \text{Organ} \text{ Verhältnis} = \frac{\% \text{ ID/g Tumor}}{\% \text{ ID/g Organ}}$$

Pro Zeitpunkt wurden jeweils drei Tiere eingesetzt. Werte sind Mittelwerte und daraus resultierende Standardabweichungen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Herstellung der extrazellulären Domäne von CD276

Zur Identifizierung von Peptidbindern gegen das Zielprotein CD276 wurde die rekombinant hergestellte, extrazelluläre Domäne des Transmembranproteins eingesetzt. Diese ist frei zugänglich, auch für nicht in Zellen internalisierende Peptide. Um eine Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins sowie korrekte Glykosylierung zu gewährleisten, wurde das Protein in humanen Hek293-Zellen durch stabile Transfektion zur Expression gebracht. Durch Klonierung der DNA-Sequenz der extrazellulären Domäne von CD276 in einen Zwischenvektor pSECEpCam, der außerdem für einen Fc-Teil kodiert, wurde ein Fusionsprotein geschaffen, welches die spätere Aufreinigung des sekretierten Proteins mittels einer Protein A Säule erlaubt. Dieses Fusionsprotein wurde anschließend in den Expressionsvektor pcDNA des FlpIn-Kits von Invitrogen kloniert. Dieser Vektor enthält eine von FlipRecombinationTarget (FRT)-Seiten flankierte Multiple Cloning Site. Die FRT-Sites stellen durch spätere Kotransfektion mit dem pOG44 Vektor, der für eine Rekombinase kodiert, eine Rekombination mit FRT-Sites im Genom der Hek-FlpIn Zellen her. Das an der extrazellulären Domäne befindliche natürliche Sekretionssignal ermöglicht eine Ausschleusung des Proteins aus den Hek-Zellen in das umgebende Medium. Dieses wurde wöchentlich abgenommen und die Proben per Western Blot mittels eines CD276 spezifischen Antikörpers auf Targetexpression überprüft. Abbildung 6A zeigt einen Western Blot mit Proben der Wochenabnahmen 1 bis 5. Zu sehen sind mehrere Banden der Größe >55 kDa. Nach Aufreinigung des Mediums mittels einer 1 ml MAbSuRe Säule und einer Äkta-Anlage wurden die Proben aufkonzentriert und auf einer SDS-Page aufgetrennt. Abbildung 6B zeigt die Mediumabnahmen in Spur 2 vor Aufreinigung Spur 3 nach Aufreinigung sowie die einzelnen Fraktionen des aufgereinigten Proteins in den Spuren 4 bis 10. Fraktionen 3 bis 12 wurden vereinigt, mit Amicon-Säulen aufkonzentriert und in PBS pH 7,4 umgepuffert.

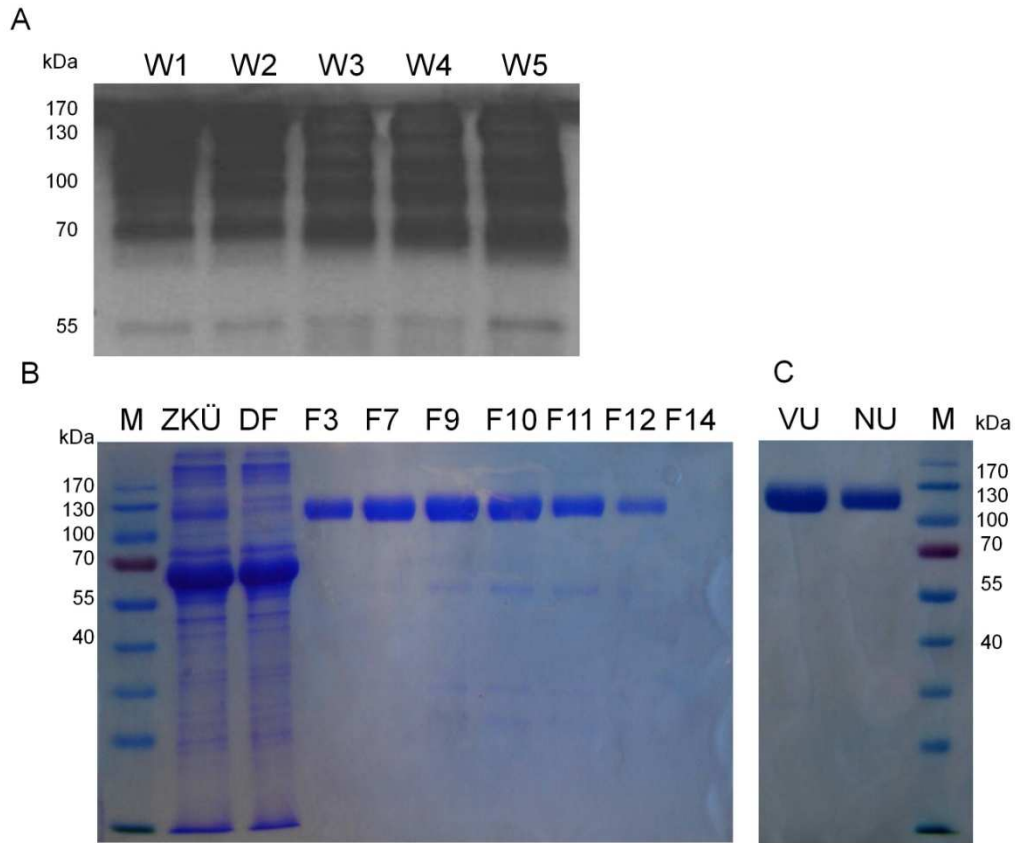


Abbildung 6: Produktion der extrazellulären Domäne von CD276. (A) Western Blot mit einem CD276 spezifischen Antikörper. Aufgetragen wurden Mediumabnahmen der Wochen (W) 1-5. (B) SDS-Gel. M Marker, ZKÜ Medium vor der Aufreinigung durch eine MAbSuRe Säule, DF Durchfluss nach Aufreinigung, F Fraktionen. (C) aufgereinigte extrazelluläre Domäne von CD276, 1 µg Protein pro Spur. VUP vor dem Umpuffern NUP nach dem Umpuffern in PBS pH 7,4, M Marker.

So gewonnenes Protein wurde nach der Konzentrationsbestimmung und dem Biotinylieren zum Biopanning eingesetzt. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse des ELISAs zur Kontrolle der Biotinylierung von CD276. CD276 wurde mittels eines Kits

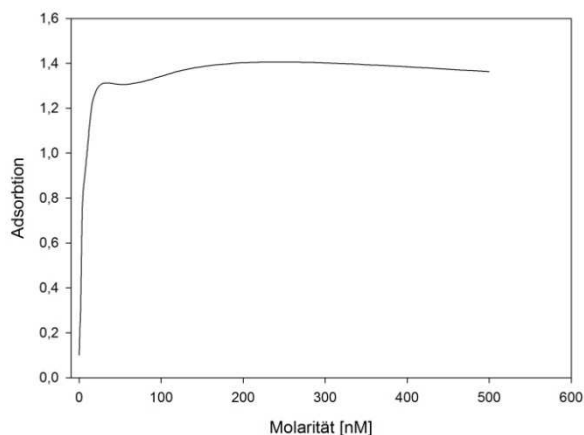


Abbildung 7: ELISA der biotinierten, extrazellulären Domäne von CD276 auf Streptavidin gecoateten Platten. Der Nachweis des Proteins erfolgte mittels eines HRP-gekoppelten anti-Fc Tag Antikörpers. Immobilisiert wurden jeweils 1:2 Verdünnungen ausgehend von 500 nM Protein und einer Kontrolle mit PBS.



unspezifisch biotinyliert, auf Streptavidin beschichtete Platten immobilisiert und anschließend mit einem spezifischen Antikörper für den Fc-Teil detektiert. Zu sehen ist eine Sättigungskurve. Ab einem Wert von 25 nM ist die Wells der Platte mit Protein abgesättigt. Die Biotinylierung war somit erfolgreich.

## **5.2 Screening nach einem geeigneten Zellsystem für die *in vitro* Fehler!**

Textmarke nicht definiert.**Experimente**

### **5.2.1 CD276**

Abbildung 8 zeigt die Bestimmung der Expression von CD276 in den Prostata-Zelllinien PC-3, DU-145, der Brustlinie MCF-7, der Pankreaskarzinomlinie MiaPaCa-1 und der kleinzelligem Lungenkarzinom-Linie NCI-H460. Zunächst wurde das Expressionsniveau auf RNA Ebene mittels Real-Time PCR bestimmt (Abbildung 8A,B). Zur Normalisierung wurde das Gen GAPDH verwendet. Die Zelllinie PC-3 zeigte dabei einen besonders hohen RNA-Gehalt mit einer 735-fach erhöhter Expression im Vergleich zu DU-145 Zellen (=1). Auch die Linie NCI-H460 zeigte eine um den Faktor 27 erhöhte CD276 Expression. Die Linien MCF-7 und MiaPaCa-1 dagegen lagen im Bereich der als Referenz gesetzten DU-145 Linie. Abbildung 8C zeigt die Expression des CD276 Proteins in verschiedenen Tumorzelllinien. Gesamtzelllysate wurden mittels eines Antikörpers auf CD276 Expression untersucht. Als Kontrolle wurde wie auch in der Bestimmung des RNA-Gehalts das Protein GAPDH genutzt, welches in jeder Zelle im gleichen Ausmaß exprimiert wird, da es einen essentiellen Zellvorgang, die Glykolyse, reguliert. Auf Proteinebene zeigte sich ein anderes Bild als auf RNA-Ebene. MCF-7 zeigte die stärkste Expression, PC-3 zeigte ebenfalls eine starke Expression, die drei anderen Zelllinien MiaPaCa-1, DU-145 und NCI-H460 hatten lediglich eine sehr schwache Expression von CD276.

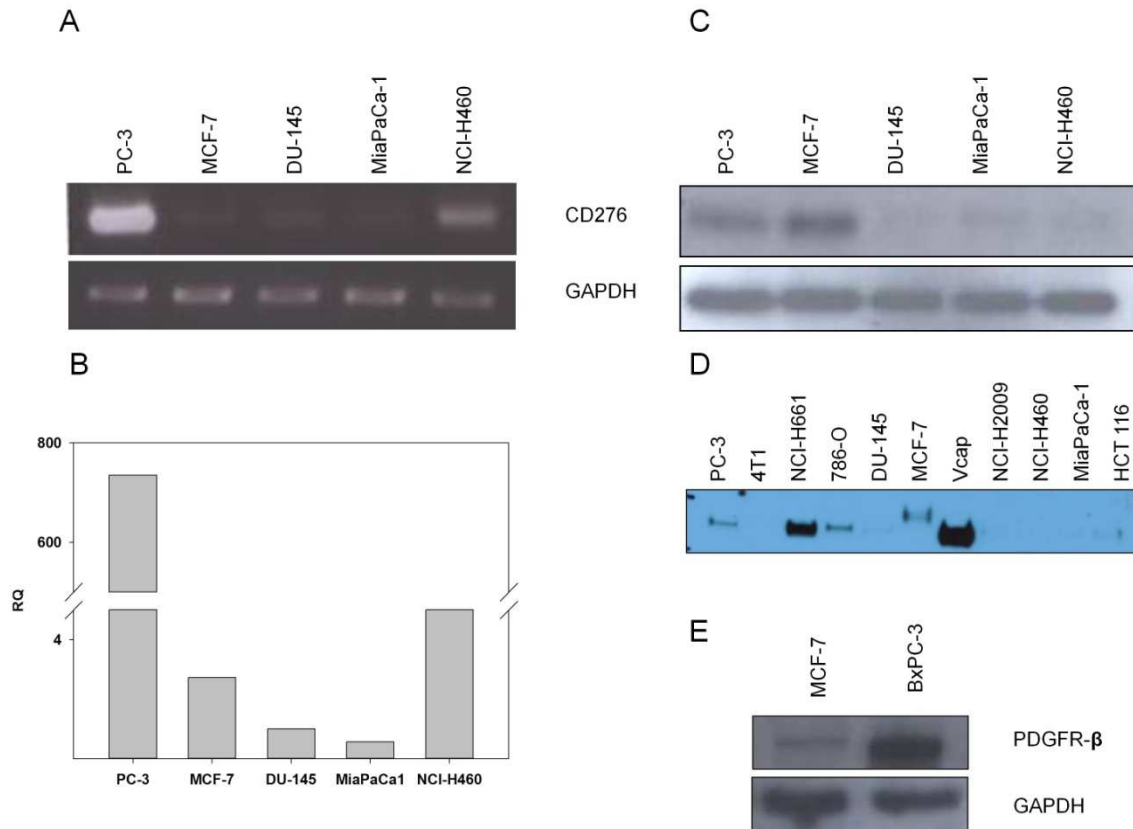


Abbildung 8: Bestimmung der Expression von CD276 und PDGFR $\beta$  in Tumorzelllinien. (A) Real-Time PCR mit einer CD276 spezifischen Sonde. Zur Normalisierung wurde eine Sonde gegen GAPDH verwendet. (B) Relative Expression von CD276 in Tumorzelllinien. Die Expression der Linie DU-145 wurde als 1 gesetzt. (C) Western Blot der Gesamtzelllysate mit einem CD276 spezifischem Antikörper. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen GAPDH verwendet. (D) Western Blot mit der Membranfraktion von verschiedenen Tumorzelllinien mit einem CD276 spezifischem Antikörper durchgeführt von Bayer Schering Pharma. (E) Western Blot der Gesamtzelllysate mit einem PDGFR $\beta$  spezifischen Antikörper. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen GAPDH eingesetzt.

### 5.2.2 PDGFR $\beta$

Zur Analyse der Bindungseigenschaften von identifizierten Peptiden gegen das Zielprotein PDGFR $\beta$ , wurde die Zelllinie BxPC-3 genutzt, welche in der Literatur als PDGFR $\beta$  positiv bewertet wurde. Grundlagen waren hier die Veröffentlichungen von Chung *et al.* sowie Askoxylakis *et al.* [100, 101]. Literatur Ergebnisse wurden in einem Western Blot siehe Abbildung 8D verifiziert. Für alle nachfolgenden Untersuchungen der Peptidbinder gegen PDGFR $\beta$  wurde deshalb die Pankreaskarzinomlinie BxPC-3 verwendet.

### 5.3 Übersicht von identifizierten Peptiden mittels Biopanning

Das Biopanning wurde auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt: zellbasiert mit dem Phage Display und zellfrei mit dem Ribosome Display. Die käufliche Bibliothek

Ph.D.12 sowie SFTI- basierte Bibliotheken wurden für das Phage Display eingesetzt. Die Min23-basierte Bibliothek für beide Techniken. Nach mehrmaligem Versuchen auch die SFTI Bibliothek für das Ribosome-Panning einzusetzen, wurde dies aufgegeben. Es konnten keine Ergebnisse erzielt werden, da der SFTI-Scaffold mit 14 Aminosäuren wohl zu klein für eine optimale Faltung außerhalb des Ribosomenkomplexes war. Tabelle 11 zeigt alle 17 Peptide, die mittels Ribosome- und Phage Display im Rahmen der Promotion gegen das Target CD276 identifiziert wurden.

**Tabelle 11: Übersicht der Peptide identifiziert durch Biopanning gegen die extrazelluläre Domäne von CD276.**

Peptid	Bibliothek	AS-Sequenz	Display Methode
CD276.1	SFTI6	VHVEND	Phage
CD276.2	Min8	HHAWNAHI	Phage
CD276.3	Min10	ILAWYYGVHK	Phage
CD276.4	Min10	AAAWPFQWMI	Ribosome
CD276.5	SFTI8	SYPWEFYQ	Phage
CD276.6	SFTI8	MPHAKGYQ	Phage
CD276.7	SFTI8	TLAHQSNM	Phage
CD276.8	Min10	FVMWLEWPRR	Ribosome
CD276.8	SFTI	FVMWLEWPRR	Phage
CD276.9	PH.D.12	GNHIKNSHSGTSy	Phage
CD276.10	PH.D.12	SGNPASELTTRTy	Phage
CD276.11	PH.D.12	APTAYNKNDWAL	Phage
CD276.12	PH.D.12	TMHQLKTKEHIy	Phage
CD276.13	PH.D.12	KPEGAPHHTNTY	Phage
CD276.14	SFTI6	NPTVRW	Phage
CD276.15	Min10	IEVWPQLHWM	Ribosome
CD276.16	Min10	DPIIDSIFVY	Ribosome
PDGFR $\beta$ -P1	PH.D.12	IPLPPPSRPFFKY	Phage

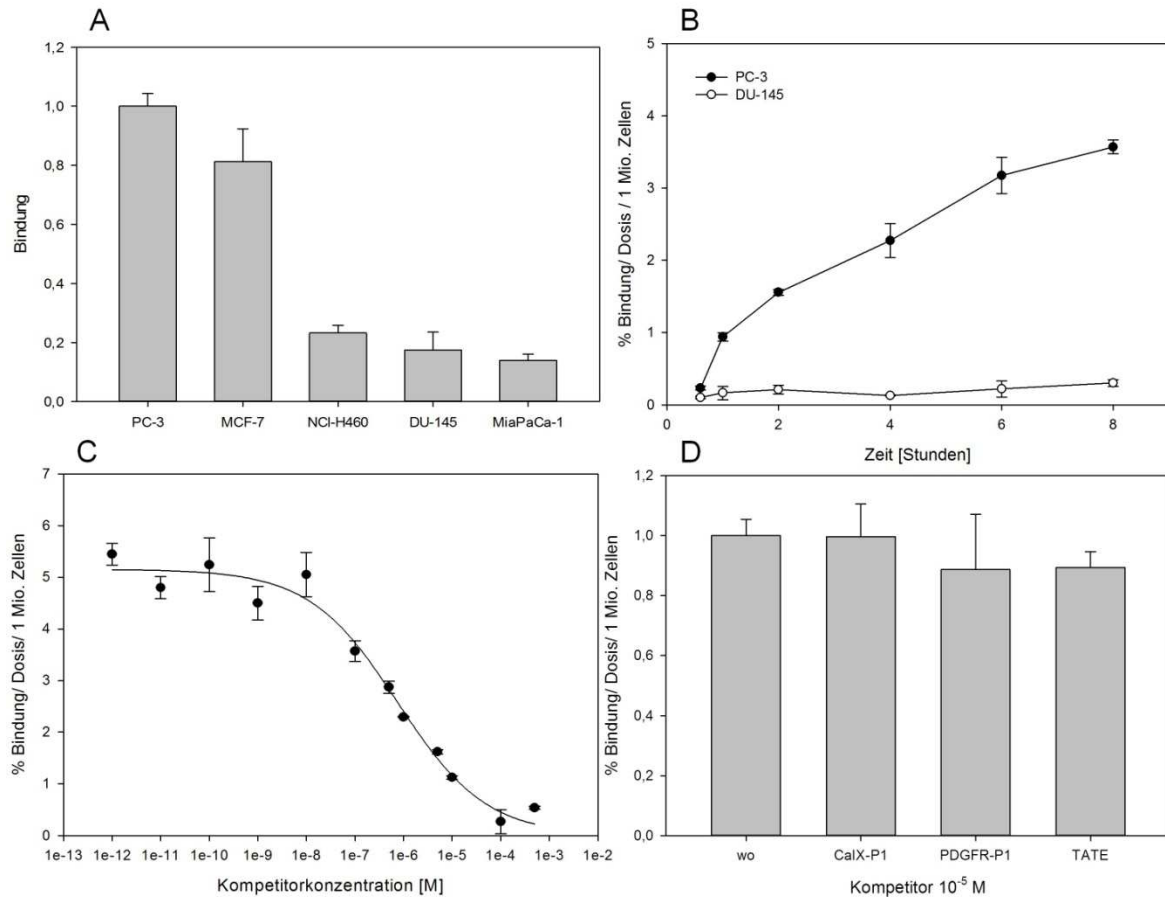
Alle Peptide wurden zunächst auf PC-3 und DU-145 Zellen einem kurzen Kinetikexperiment unterzogen. Es wurde die Bindung nach zehn und 60 Minuten sowie die Plastikbindung bestimmt. Zeigten Peptide Bindung an CD276 exprimierende PC-3 Zellen und schwache bzw. keine Bindung an DU-145 Zellen sowie Plastik, wurden diese weiter evaluiert. Zur Charakterisierung und Optimierung wurden die Peptide CD276.11 und PDGFR-P1, welches im Biopanning sowohl gegen CD276 als auch PDGFR $\beta$  identifiziert worden ist, ausgewählt.

## 5.4 Charakterisierung CD276.11

Das 12-Aminosäuren-Peptid CD276.11 war das elfte identifizierte Peptid gegen die extrazelluläre Domäne von CD276. Nach sechs Panningrunden gegen das rekombinante Protein war das Peptid zu 60% in 24 Phagemid-Klonen enthalten und wurde chemisch synthetisch durch Fmoc-Synthese hergestellt und für *in vitro* sowie *in vivo* Studien radioaktiv markiert.

### 5.4.1 *In vitro* Charakterisierung CD276.11

Zur Charakterisierung wurden zunächst zellbasierte Assays durchgeführt. Um eine Bindung an natürlich exprimiertes Protein auf Zellen nachzuweisen, wurde das Peptid an Position 5, dem Tyrosin, mit  $^{125}\text{I}$  markiert. Bindungsstudien an Zelllinien mit unterschiedlicher CD276 Expression sollten Aufschluss über die Affinität zu natürlich als Membranprotein exprimiertem CD276 geben. Abbildung 9A zeigt die Ergebnisse der Bindungsstudien. Der Assay wurde in Medium nach 60 Minuten Inkubationszeit des radioaktiv markierten Peptids auf den Zellen durchgeführt. Gebundenes Peptid konnte nach mehrfachen Waschschritten und anschließender Zellyse im  $\gamma$ -Counter gemessen werden. Die Bindung an die Linie PC-3 mit hoher CD276 Expression wurde auf 1 gesetzt. Die Bindungen der anderen Linien sind im Verhältnis zu PC-3 dargestellt. MCF-7 zeigte im Western Blot ebenfalls eine hohe CD276 Expression. Die Bindung des Peptids CD276.11 an die Brustkarzinomlinie war ebenfalls hoch. Eine geringe Affinität des Peptids CD276.11 zu den Linien MiaPaCa-1, DU-145 und NCI-H460, welche im Western Blot eine niedrige Expression von CD276 zeigten, konnte beobachtet werden. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Affinität des Peptids mit der Expression des Zielproteins einher ging. Die Linien PC-3 und DU-145 wurden aufgrund dieser Ergebnisse für anschließende Zellassays verwendet. PC-3 wurde hierfür als Positivlinie und DU-145 als Negativlinie eingesetzt. Abbildung 9B zeigt die zeitabhängige Kinetik über 8 Stunden. Das mit  $^{125}\text{I}$ -radioaktiv markierte Peptid wurde auf DU-145 und PC-3 getestet. Die Bindung wurde hierbei in Prozent pro Dosis auf 1 Mio. Zellen bezogen. Zu sehen ist eine deutliche Bindungszunahme auf PC-3 Zellen mit zunehmender Zeit auf bis zu 3,5% nach 8 Stunden Inkubation des radioaktiv markierten Peptids auf Zellen. Die Bindung auf DU-145 Zellen dagegen lag bei etwa 0,01%, was etwa der Plastikbindung von  $^{125}\text{I}$ -CD276.11 entsprach. Um die spezifische Bindung des Peptids zu bestimmen, wurde ein Kompetitionsversuch durchgeführt. Durch gleichzeitiges Inkubieren von kaltem Peptid, das heißt nicht



**Abbildung 8:** *In vitro* Charakterisierung des <sup>125</sup>I markierten Peptids CD276. Die Versuche wurden bei 37°C durchgeführt. Die gebunden Radioaktivität wurde in Prozent pro Dosis auf 1 Million Zellen kalkuliert. Die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben (n=3). (A) Bindung von <sup>125</sup>I-CD276.11 nach 60 Minuten Inkubation des Peptids auf Zellen bei 37°C an Tumorlinien. Die relative Bindung ist im Verhältnis zur Bindung an PC-3 Zellen (Bindung = 1) dargestellt. (B) Kinetik von <sup>125</sup>I-CD276.11 an schwach CD276 exprimierenden DU-145 Zellen und stark CD276 exprimierenden PC-3 Zellen. (C) Wettbewerbsversuch mit unmarkiertem CD276.11 Peptid (=Kompetitor) nach 240 min Inkubation auf PC-3 Zellen. (D) Kontrollwettbewerbsversuche mit den unmarkierten Peptiden CaIX-P1, PDGFR-P1 und TATE in einer Konzentration von 10<sup>-5</sup> M nach 60 min.

markiertem Peptid mit heißem <sup>125</sup>I-markiertem Peptid sollte, sofern es sich um eine spezifische Bindung handelt, die nachzuweisende Bindung des Peptids sinken. Bindestellen werden von kaltem Peptid, welches im Überschuss zugegeben wird, blockiert, was zu einem geringeren Nachweis von gebundenem, radioaktiv markiertem Peptid führt. In nachfolgendem Versuch, dargestellt in Abbildung 9C, konnte eine Konkurrenz von 98% bei Zugabe von 10<sup>-4</sup> M kaltem Peptid erzielt werden. Durch Variation des Kompetitors von 10<sup>-12</sup> auf 10<sup>-4</sup> M wurde zudem ein IC<sub>50</sub> Wert von 750 nM bestimmt. Negativ-Wettbewerbsversuche mit drei weiteren Peptiden zeigten außerdem, dass eine Konkurrenz mit den zufällig gewählten Peptiden TATE [102], CaX-P1 (YNTNHVPLSPKY) [103] und PDGFR-P1 (IPLPPSRPFFK) [101] nicht möglich ist. Abbildung 10 zeigt ein Internalisierungsexperiment. Radioaktiv markiertes CD276.11 wurde hier auf PC-3 Zellen für 60 min inkubiert.

Membrangebundenes Peptid wurde mittels einer Glycin-Lösung mit niedrigem pH von 2,1 entfernt und getrennt gemessen. Die Internalisierte Aktivität entspricht dem Peptid, welches sich in der Zelle befindet. Das Experiment wurde bei zwei Temperaturen durchgeführt: 37°C und 4°C. Eine Internalisierung ist aufgrund der Beteiligung von Enzymen für die Aufnahme in Zellen bei 4°C nicht möglich. Dies zeigte sich auch in dem in Abbildung 10 dargestellten Versuch: Das Peptid wurde bei 4°C nicht internalisiert, bei 37°C dagegen steigt der Anteil der Aktivität auf bis zu 2%, was 87% der Gesamtbindung entspricht, nach 8 Stunden Inkubation an. Membran gebunden sind etwa 0,3% (13% Gesamtbindung) nach 8 Stunden bei 37°C.

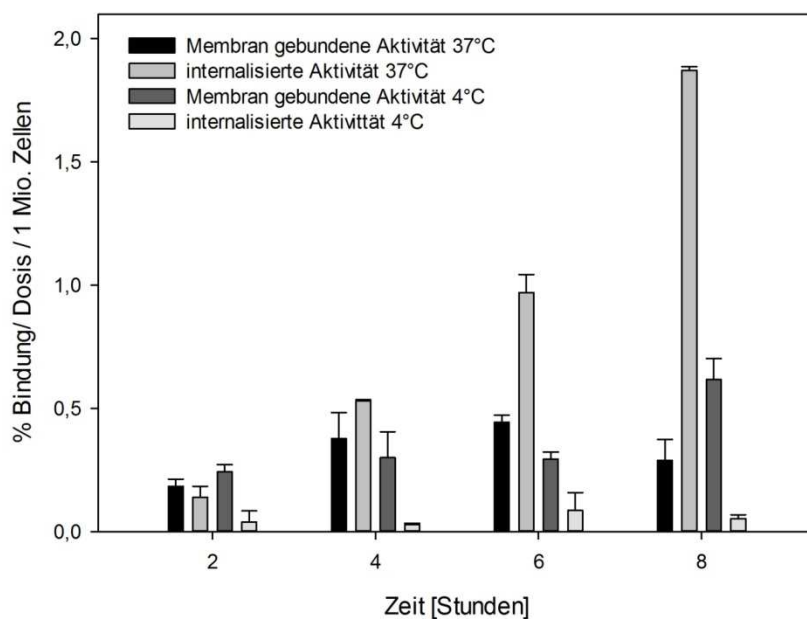


Abbildung 9: Internalisierungsexperiment mit  $^{125}\text{I}$ -Cd276.11 auf PC-3 Zellen. Gebundene Aktivität wurde in Prozent pro Dosis und 1 Millionen Zellen kalkuliert. Werte sind Mittelwerte ( $n=3$ ) und Standardabweichungen.

#### 5.4.2 *In vitro* Stabilität CD276.11

Abbildung 11 zeigt die *in vitro* Stabilität von  $^{125}\text{I}$ -CD276 in humanem Serum. Nach einer Minute Inkubation zeigte sich eine Degradation im Serum. Die Halbwertszeit wurde auf etwa fünf Minuten bewertet. Es entstand ein Metabolit, welcher stabil über einen Zeitraum von 4 Stunden blieb. Weitere Nebenprodukte konnten im Zeitrahmen von 4 Stunden nicht beobachtet werden.

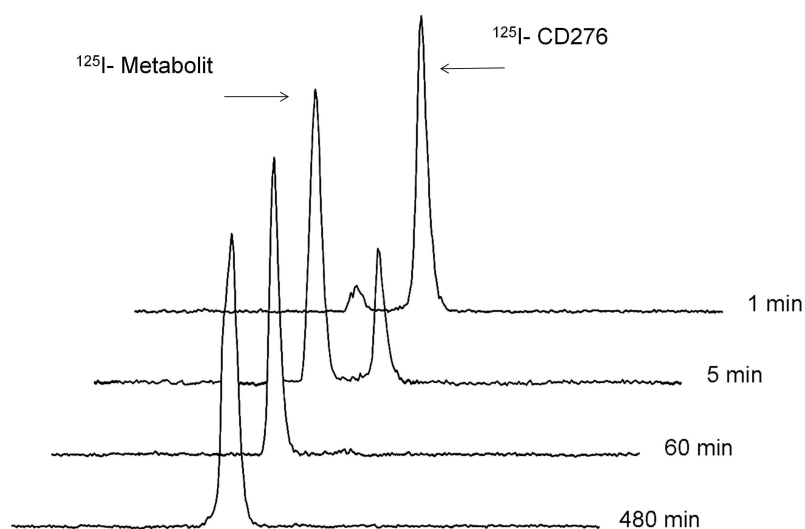


Abbildung 10: *In vitro* Stabilität von  $^{125}\text{I}$ -CD276.11 in humanem Serum.

### 5.4.3 *In vivo* Charakterisierung CD276.11

Für die Untersuchung des *in vivo*-Bindungsverhalten von CD276.11 wurden immundefiziente BALB/c nu/nu Nacktmäuse als Modellorganismus verwendet. Zur Erzeugung von humanen CD276 exprimierenden Tumoren wurden subkutan humane PC-3-Tumorzellen gespritzt. Nach Anwachsen des Tumors auf eine Größe von etwa  $1\text{ cm}^3$  wurden Mäuse für *in vivo* Studien verwendet.

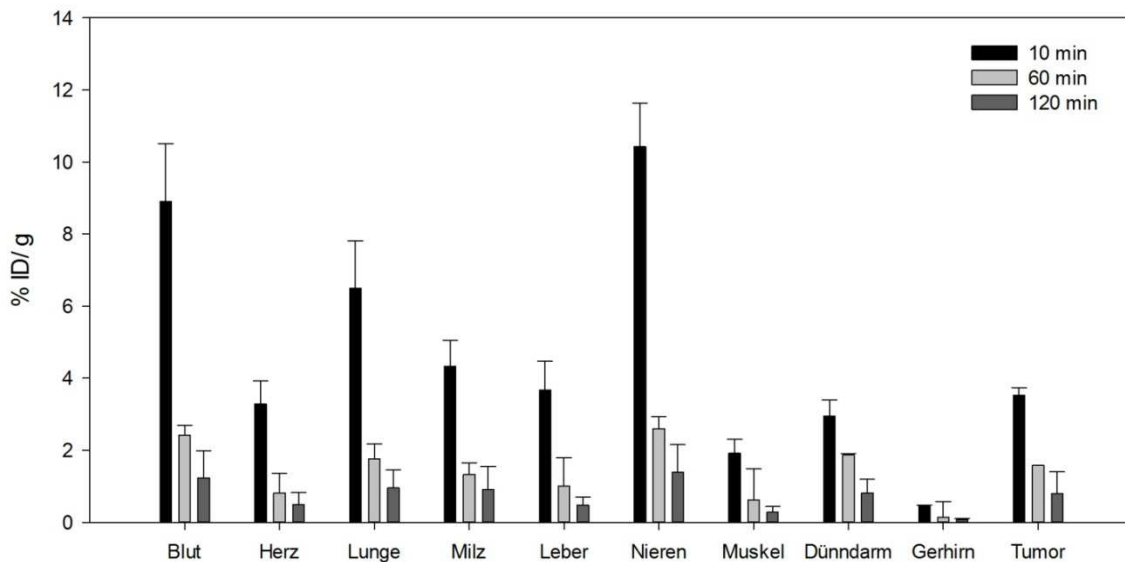
#### 5.4.6.1 Organverteilungsstudien CD276.11

$^{131}\text{I}$ -markiertes Peptid wurde in die Schwanzvene der Mäuse injiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Blut, Tumor und sieben Organen (Herz, Lunge, Milz, Leber, Niere, Muskel und Gehirn) akkumulierte Aktivität gemessen. Ausscheidungs- bzw. Stoffwechselorgane wie Leber und Niere waren von besonderem Interesse. Die prozentuale, inkorporierte Dosis pro g Organ wurde nach 10, 60 und 120 Minuten bestimmt (Abbildung 12). Außerdem wurde ein Tumor/Organ Verhältnis berechnet (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Organverteilung und Tumor zu Organverhältnis von  $^{131}\text{I}$ -CD276.11 in PC-3 Tumor tragenden Balb/c nu/nu Mäusen.**

Tumor / Organ Ratio	10 min	60 min	120 min
Blut	0,40	0,66	0,61
Herz	1,09	1,96	1,57
Lunge	0,55	0,90	0,78
Milz	0,82	1,20	0,86
Leber	0,98	1,58	1,54
Nieren	0,34	0,61	0,53
Muskel	1,87	2,76	2,70
Dünndarm	1,21	0,96	1,01
Gehirn	7,98	12,31	10,39

Abbildung 12 zeigt die Organverteilungsstudie im Zeitverlauf. Die im Tumor gemessene Aktivität von 3,5% sank nach 120 Minuten auf 0,8% ab. Sehr hohe Aufnahmewerte zeigten nach zehn Minuten die Nieren mit 10,4% und die Lunge mit 6,5% ID/g. Hier nahm wie in allen anderen Organen sowie im Blut die Dosis im zeitverlauf von 60 Minuten schnell ab. Das Peptid wurde aus dem Körper ausgewaschen. Tumor zu Organ Verhältnis zeigten aber nach 120 Minuten in allen Organen einen Wert über 1, was einer Akkumulation des Peptids im Tumor entspricht. Lediglich Milz, Lunge und Nieren zeigen einen Wert kleiner 1.



**Abbildung 11: Organverteilungsstudie von  $^{131}\text{I}$ -CD276.11 an PC-3 Tumor tragenden Nacktmäusen BALB/c. Das Peptid wurde i.v. in die Schwanzvene appliziert und Tiere nach 10,20 und 120 min getötet und für Organe, Tumor sowie Blut die Aktivität bestimmt. Werte sind in % injizierte Dosis pro Gramm Organ (% ID/g) angegeben. Angegebene Werte sind Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen.**



#### 5.4.4 Optimierung der Bindungseigenschaften und Identifikation der minimalen Bindesequenz von CD276.11

Um die Bindungseigenschaften des Peptids CD276.11 zu verbessern sowie die minimale Bindungssequenz zu ermitteln, wurden verschiedene Strategien angewandt: Alanin- und Fragment-Scan, Austausch von L-Aminosäuren durch nicht natürliche Aminosäuren, Peptid-Arrays, Zyklisierung, Azetylierung, Einbau in Miniprotein Scaffolds sowie Markierung mit Maleimid.

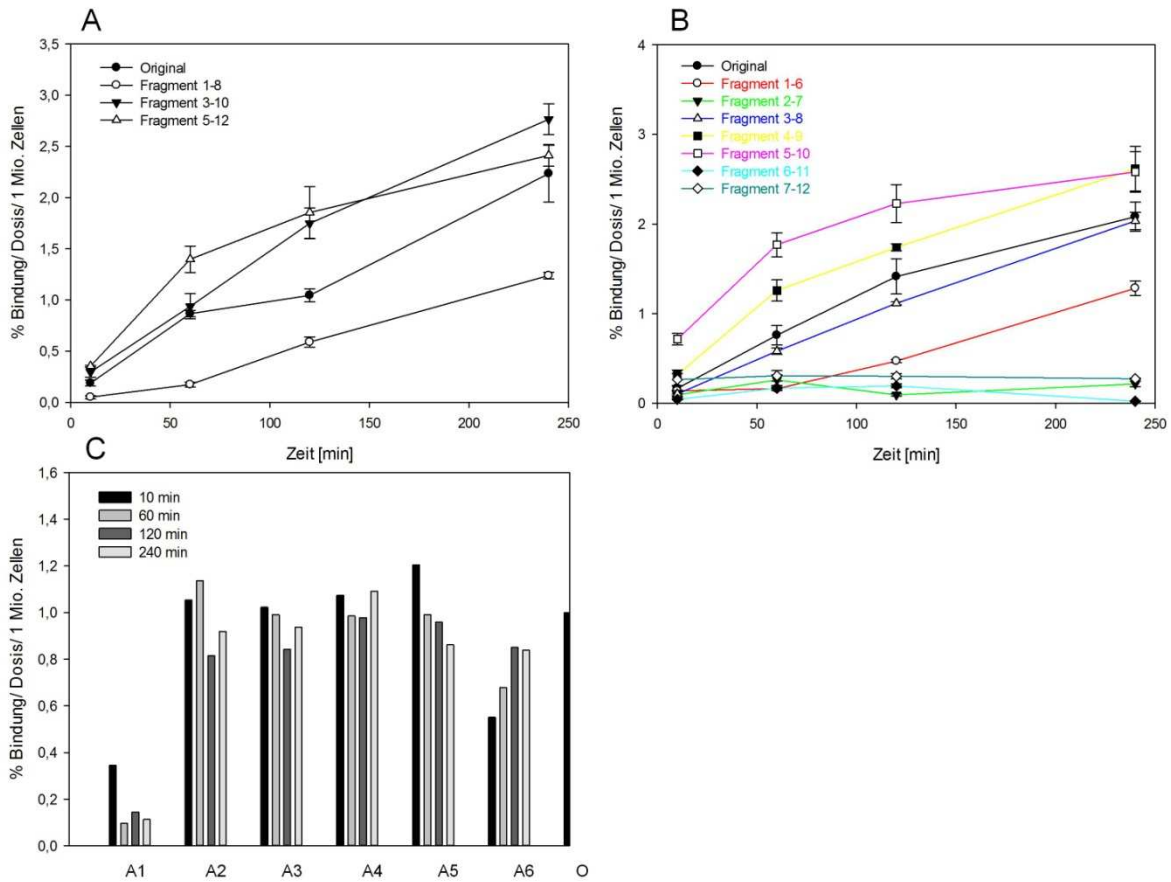
##### 5.4.4.1 Fragment und Alanin-Scan

Zunächst wurde ein Fragment-Scan des 12 Aminosäure-langen Peptids durchgeführt. Es wurden Fragmente des Peptids CD276.11 der Länge 6 und 8 Aminosäuren hergestellt und auf PC-3 Zellen sowie DU-145 Zellen getestet. Tabelle 13 zeigt die Bindung in Prozent nach 240 Minuten Inkubation auf PC-3 Zellen. Die Bindung auf DU-145 und Plastik ist nicht dargestellt. Sie lag im Bereich von 0,01 bis 0,05% Bindung pro Dosis auf 1 Mio. Zellen. Auffallend ist, dass vor allem Fragmente, die aus den Aminosäuren 3 bis 10 bestehen mit gleicher Affinität wie das Original und besser binden. Die 6-er Fragmente CD276.11 3-8, 4-9 und 5-10 zeigen sogar eine höhere Bindung von > 2,2% als das Original zur gleichen Zeit. Abbildungen 13A und B zeigen die Kinetiken, die über einen Zeitraum von vier Stunden auf PC-3 Zellen aufgenommen wurden. Verglichen wurden hier jeweils Fragmente der Länge von 6 AS und 8 AS. Im Vergleich der Fragmente mit 8 AS zeigte sich, dass das Peptid CD276.11 auch ohne die AS Positionen 1-4 ( ${}^1\text{A}{}^2\text{P}{}^3\text{T}{}^4\text{A}$ ) eine Affinität zur Zelllinie PC-3 hatte. Werden die AS Positionen 9 bis 12 ( ${}^9\text{D}{}^{10}\text{W}{}^{11}\text{A}{}^{12}\text{L}$ ) entfernt, fällt die Bindung auf etwa 50% der Originalbindung ab. Fehlen die Positionen 5 bis 8 ( ${}^5\text{Y}{}^6\text{N}{}^7\text{K}{}^8\text{N}$ ), reduziert sich die Bindung erheblich. Dies wird auch im Vergleich der Fragmente der Länge von 6 AS sichtbar. Fragmente, welche die AS Positionen 5 bis 8 enthalten, zeigen eine Bindung. Fehlen die AS 5 bis 8 führt dies zum kompletten Verlust der Peptidbindung an PC-3 Zellen. Um ein mögliches Bindungsmotiv bzw. die minimale Bindungssequenz zu identifizieren und Ergebnisse des Fragment-Scans zu bestätigen, wurde anschließend ein Alanin-Scan des Fragments CD276.11 5-10 auf PC-3 Zellen über einen Zeitraum von 4 h durchgeführt (Abbildung 13C). Hierzu wurden alle sechs Positionen des Fragments 5 bis 10 durch Alanin ersetzt. Aminosäuresequenzen der Alanin-Peptide sind in Abbildung 13D angegeben. Die Bindungskinetiken zeigen einen deutlichen Abfall der Bindung durch den Ersatz der Position 1 von CD276.11 5-10. Position 1 entspricht der Position 5 im Original

CD276.11 Peptid -einem Tyrosin (<sup>5</sup>Y). Auch der Ersatz der Position 6 im Fragment 5 bis 10 – Tryptophan (<sup>10</sup>W)- führte zu einer geringeren Bindungsaffinität an PC-3 Zellen von etwa 70%. Der Ersatz der andern Positionen hatte keinem Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Fragments CD276.11 5-10.

Tabelle 13: Fragmente des Peptids CD276.11 und Bindungsaffinitäten der Kinetikstudien mit <sup>125</sup>I- markierten Peptiden auf PC-3 Zellen.

Peptid	A	P	T	A	Y	N	K	N	D	W	A	L	% Bindung auf PC-3 Zellen nach 240 min
CD276.11													2,2
CD276.11 1-8													1,3
CD276.11 5-12													2,4
CD276.11 3-10													3
CD276.11 1-6													1,3
CD276.11 2-7													0,2
CD276.11 3-8													2,8
CD276.11 4-9													2,7
CD276.11 5-10													2,9
CD276.11 6-11											y		0,2
CD276.11 7-12												y	0,25



**Abbildung 12:** Fragment und Alanin-Scan des Peptids  $^{125}\text{I}$ -CD276.11. gebundene Aktivität wurde in Prozent pro Dosis auf 1 Million Zellen kalkuliert. Die Werte sind als Mittelwerte ( $n=3$ ) und Standardabweichungen angegeben. (A) 8-Aminosäure Fragment Scan. (B) 6-Aminosäure-Fragment-Scan. (C) Alanin-Scan des Fragments CD276.11 5-10. Die Bindung des Fragments CD276.11 5-10 wurde als 1 gesetzt. Bindungen der Alanin-Peptide wurde im Verhältnis zum Fragment CD276.11 5-10 angegeben.

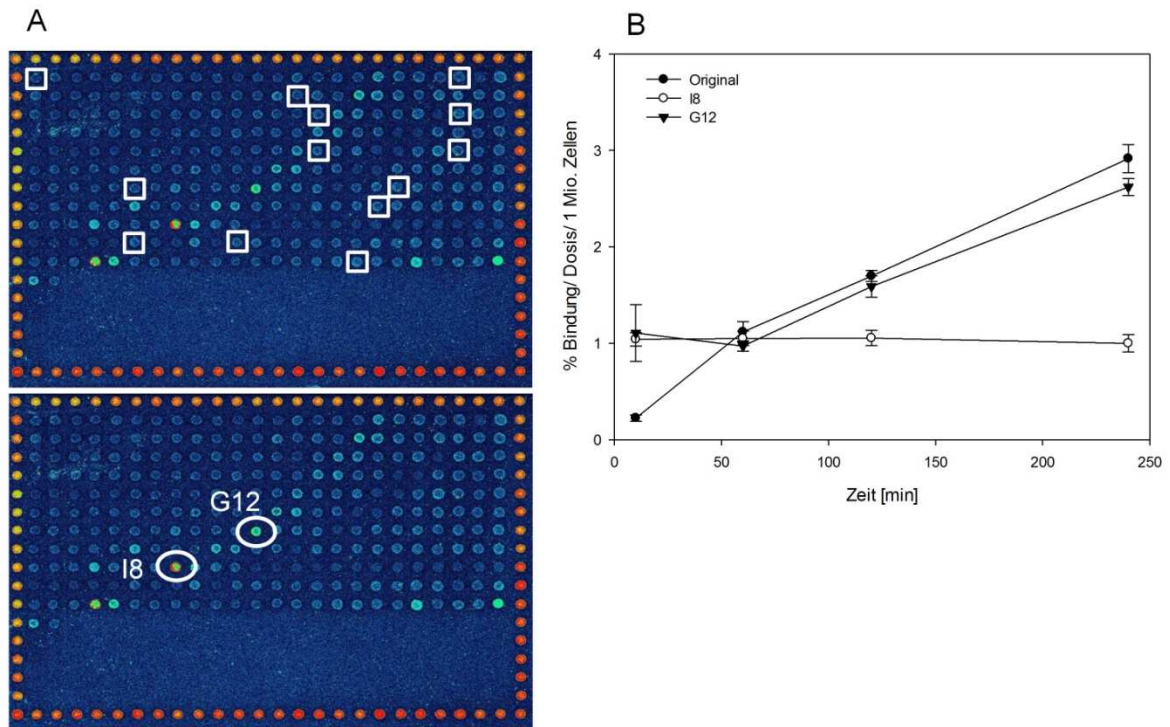
#### 5.4.4.2 Peptid-Arrays CD276.11

Um die Bindungsaffinität des Peptids CD276.11 zu verbessern und die minimale Bindungssequenz an CD276 zu ermitteln, wurde ein Peptid-Array durchgeführt. Durch den Austausch jeder einzelnen Position des Dodekapeptids und Ersatz durch alle 20 natürlichen L-Aminosäuren konnte das gesamte Peptid randomisiert werden. Peptide wurden auf Cellulose-Glasobjektträger gespottet und mit der extrazellulären Domäne von CD276 (R & D) inkubiert. Der Nachweis der Bindung erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen CD276 sowie einem Sekundärantikörper gegen Maus-IgG, welcher mit Alexa Fluor gekoppelt war. Abbildung 14A zeigt den Scan der CelluSpots™. In weißen Quadraten hervorgehoben wurden die Originalpeptide. Weiße Kreise zeigen die Peptide G12 und I 8, welche zur weiteren Charakterisierung auf Zellen aufgrund der hohen Affinität zu CD276 im CelluSpot™ eingesetzt wurden.

Tabelle 14 zeigt die Aminosäuresequenzen der beiden Peptide im Vergleich zum Originalpeptid CD276.11.

**Tabelle 14: Aminosäuresequenzen der Peptidspots G12 und I8 identifiziert durch Peptid-Array von CD276.11.**

Original	A	P	T	A	Y	N	K	N	D	W	A	L
G12	A	P	T	A	Y	N	W	N	D	W	A	L
I8	A	P	T	A	Y	N	K	N	W	W	A	L



**Abbildung 13: (A) Peptid-Arrays (CelluSpots™) von CD276.11 inkubiert mit rekombinantem CD276-His Tag. Die Detektion der Bindung erfolgte mit einem anti-His-Alexa-Fluor gekoppeltem Antikörper. (B) Bindungskinetik auf PC-3 Zellen der Spots G12 und I8 im Vergleich zum Original Peptid CD276.11**

Abbildung 14B stellt die Bindungskinetik auf PC-3 Zellen im Vergleich zum Originalpeptid dar. Das Peptid  $^{125}\text{I}$ -G12 zeigt einen ähnlichen Verlauf der Bindung wie das Originalpeptid. Durch den Austausch von Asparaginsäure zu Tryptophan im Peptid I8 an Position 9 wurde eine gleichbleibende Bindung von etwa 1% pro Dosis an 1 Millionen Zellen erzielt. Weitere Versuche auf DU-145 Zellen mit  $^{125}\text{I}$ -I8 zeigten ebenfalls eine Bindung von 1%. Somit scheint I8 nicht spezifisch zu binden.

#### 5.4.5 Stabilisierungsstrategien CD276.11

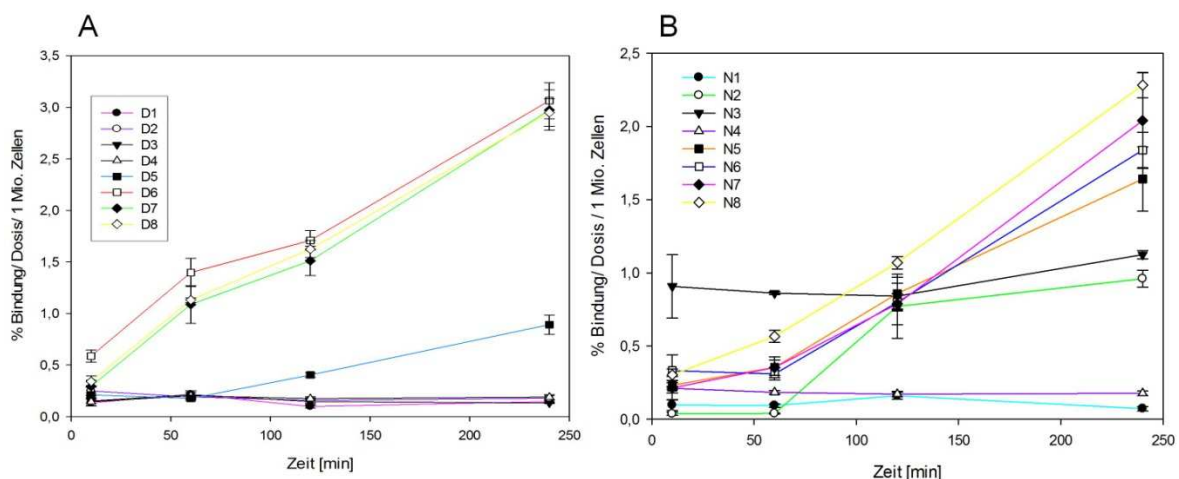
Um die proteolytische Spaltung von CD276.11 durch Serumproteasen zu verhindern, wurden folgende Strategien angewandt: (1) Ersatz der L-Aminosäuren durch D- und methylierte Aminosäuren, welche keine natürlichen Substrate der Serumproteasen

darstellen (2) Zyklierung des Peptids durch Cysteinbrücken (3) Markierung mit Maleimid (4) Markierung mit Chelator DOTA und  $^{144}\text{Lu}$  (5) Einbau in SFTI Scaffold und (6) Ersatz des Tyrosinrestes durch Thyroxin bzw. 3-I-Tyrosin.

**Tabelle 15:** Sequenzen CD276.11 3-10 D-AS Scan und Met-AS Scan. Kleine Buchstaben stehen für D-AS, große Buchstaben für L-AS. Me steht für methylierte AS.

Name	Sequenz	Name	Sequenz
D1	tAYNKNDW	N1	Me-TAYNKNDW
D2	TaYNKNDW	N2	TMe-AYNKNDW
D3	TAYnKNDW	N3	TAMe-YNKNDW
D4	TAYnKNDW	N4	TAYMe-NKNDW
D5	TAYNkNDW	N5	TAYNMe-KNDW
D6	TAYNKnDW	N6	TAYNKMe-NDW
D7	TAYNKNdW	N7	TAYNKNMe-DW
D8	TAYNKNDw	N8	TAYNKNDMe-W

Die in Tabelle 15 aufgeführten Peptide wurden auf ihre Bindung an PC-3 Zellen untersucht. Abbildung 15 zeigt Kinetiken über einen Zeitraum von 4 h. Abbildung 15A stellt einen D-AS-Scan des Peptids  $^{125}\text{I}$ -CD276.11 3 bis 10 dar, Abbildung 15B den Scan mit methylierten AS. In Abbildung 14A wird deutlich, dass der Austausch der Positionen 1 bis 5 des Peptids CD276.11 3 bis 10 (Originalpeptid  $^3\text{T}^4\text{A}^5\text{Y}^6\text{N}^7\text{K}$ ) zu einem erheblichen Bindungsverlust im Vergleich zum Originalpeptid CD276.11 führte. Der Austausch der Positionen 6 bis 8 (Originalpeptid  $^8\text{N}^9\text{D}^{10}\text{W}$ ) dagegen beeinflusst die Bindung nicht.



**Abbildung 14:** D-Aminosäure und Met-Aminosäure-Scan des Fragments CD276.11 3-10 auf PC-3 Zellen bei 37°C. Gebundene Aktivität ist in Prozent pro Dosis und 1 Millionen Zellen angegeben. Werte sind Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen.

Der Ersatz der AS 1 ( $^3\text{T}$ ) und 4 ( $^6\text{N}$ ) führte auch im Methyl-Scan zu einem kompletten Bindungsverlust (Abbildung 13B). Der Austausch der AS Positionen 2 ( $^4\text{A}$ ) und 3 ( $^5\text{Y}$ )

zeigte eine Bindung von etwa 1% / Dosis/ 1 Mio. Zellen nach 4 h Inkubation des Peptids. Hier führt die Modifikation der Positionen 5-8 (Originalpeptid  $^7\text{K}^8\text{N}^9\text{D}^{10}\text{W}$ ) zu keiner eingeschränkten Bindung. Lediglich ein leichter Abfall der Bindungsstärke von 2,3 auf 1,8% Dosis/ 1 Mio. Zellen ist ausgehend von Position 8 zu Position 6 zu beobachten.

Weitere Stabilisierungsstrategien sind in Tabelle 16 aufgeführt. Hier wurden zum Teil auf Basis von Fragmenten von CD276.11 verschiedene Formen der Markierung sowie Zyklisierungsstrategien angewandt. Außerdem wurde das Originalpeptid in die variable Schleife des SFTI Miniprotein-Scaffolds eingesetzt. Alle Peptide wurden auf PC-3 Zellen in Kinetikexperimenten getestet.

**Tabelle 16: Stabilisierungsstrategien von CD276.11, Bindung auf Zellen nach 60 min Inkubation des Peptids.**

Name	auf Basis von AS	Sequenz	Markierung	PC-3 Zellen	DU-145 Zellen
MalFCD	Basis 5-10	FNKNDWAAC	$^{125}\text{I}$	0,4	n.g.
Mal5-10	Basis 5-10	YNKNDWAAC	$^{125}\text{I}$	0,34	n.g.
Mal3-10	Basis 3-10	APTAYNKNDWAAC	$^{125}\text{I}$	0,4	n.g.
MallY	Basis 3-10	TA(3-I-)YNKNDWAC	$^{125}\text{I}$	8	n.g.
Mall4	Basis 3-10	TA(Thyroxin)NKNDWAC	$^{125}\text{I}$	9,9	8,6
Cys7-CD276.11	Basis 3-10	APTAYNKNDWAL	$^{125}\text{I}$	0,28	n.g.
DOTA-Ahx-CD276.11	Original	APTAYNKNDWAL	$^{144}\text{Lu}$	0,21	n.g.
AcCys-CD276.11	Original	APTAYNKNDWAL	$^{125}\text{I}$	0,21	n.g.
DOTA-Ac-CD276.11	Original	APTAYNKNDWAL	$^{144}\text{Lu}$	0,14	n.g.
DOTA-Ahx-CD276.11	Original	APTAYNKNDWAL	$^{144}\text{Lu}$	0,2	n.g.
Ga-CD276.11	Original	APTAYNKNDWAL	$^{68}\text{Ga}$	0,1	n.g.
SFTI	Original	GRCTNAPTAYNKNDWALYPD	$^{125}\text{I}$	0,085	n.g.
CD.276.11-Biotin	Original	APTAYNKNDWAL	$^{125}\text{I}$	0,128	n.g.
CD276.11-Rhodamin	Original	APTAYNKNDWAL	$^{125}\text{I}$	0,2	n.g.
CD276.11-Biotin	Original	APTAYNKNDWAL	$^{125}\text{I}$	0,15	n.g.

Alle in Tabelle 16 aufgeführten Strategien zur Stabilisierung führten zu einem Verlust der Bindung. Lediglich der Austausch von Tyrosin zu Thyroxin an Position 3 des Peptids CD276.11 3-10 (Mall4) zeigte eine erhöhte Bindung von 9,9% an PC-3 Zellen im Vergleich zum Originalpeptid CD276.11 mit 1% Bindung. Das Peptid Mall4

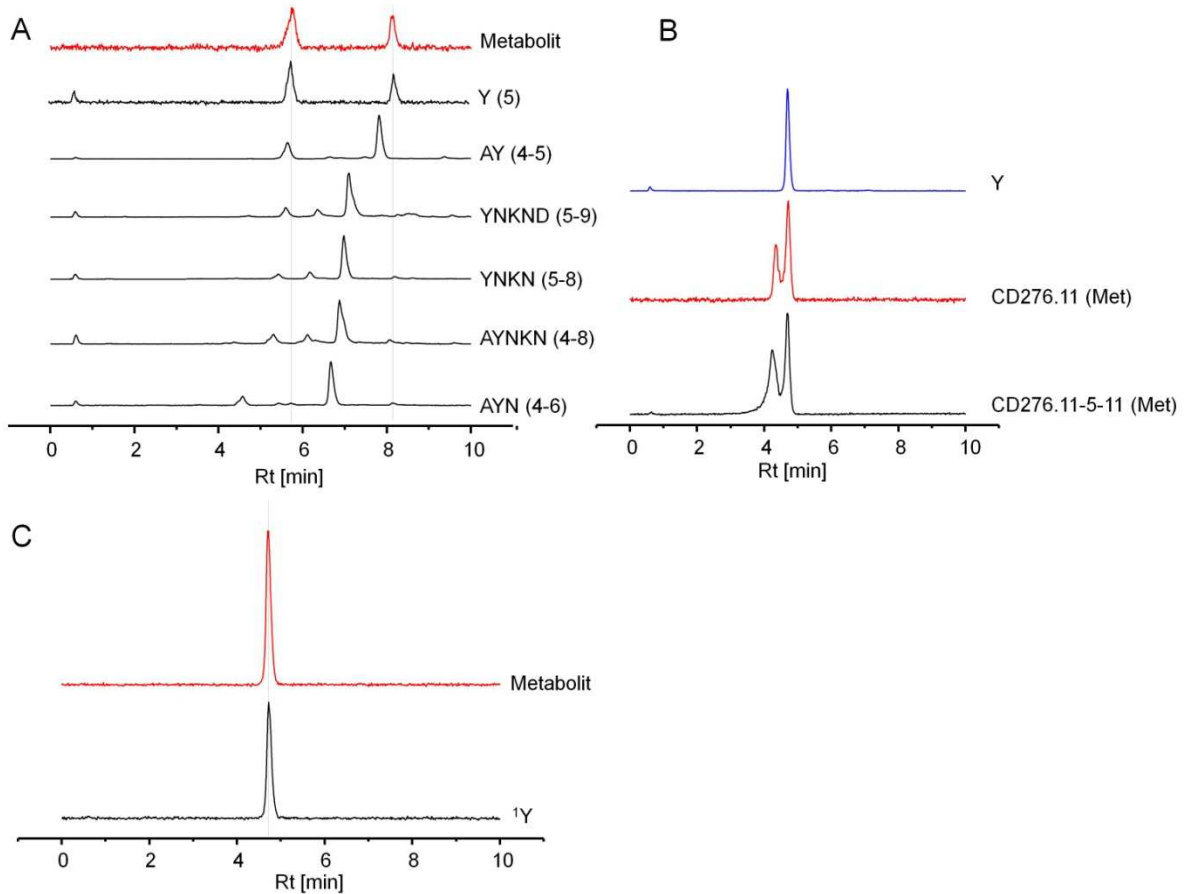
zeigte aber auch eine Bindung an die schwach CD276 exprimierenden Zellen DU-145 von 8,6%.

Auch andere Modifikationen wie Kopplung des CD276.11 Originalpeptids mit Rhodamin, FITC oder Biotin führten zum totalen Bindungsverlust des Peptids.

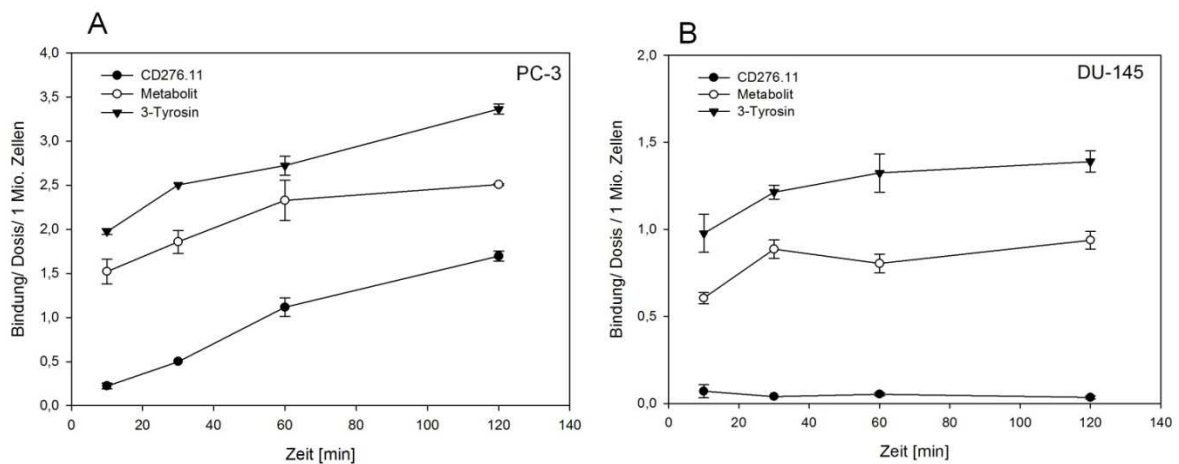
#### **5.4.6 Identifizierung des Metaboliten von CD276.11**

Zur Identifikation des Metaboliten des Peptids CD276.11 wurden HPLC Analysen durchgeführt. Die Bestimmung und der Vergleich der Retentionszeit von Fragmenten mit dem im humanen Serum entstandenen Metaboliten sollten Aufschluss über die Aminosäuresequenz des Metaboliten geben. Zunächst wurden die Fragmente  $^4A^5Y$ ,  $^4A^5Y^6N$ ,  $^4A^5Y^6N^7K^8N$ ,  $^5Y^6N^7K^8N$  und  $^5Y^6N^7K^8N^9D$  hergestellt und mittels HPLC mit dem Metaboliten verglichen. Hier wurde sich die Reaktion der Fragmente, des Metaboliten sowie Tyrosin mit  $Ac_2O$  zunutze gemacht. Diese bewirkt eine Verschiebung der Retentionszeit, so dass auch kleine Fragmente und Tyrosin unterschieden werden konnten. Die HPLC verlief bei einem Gradienten von 0- 30% Azetonitril in Wasser für zehn Minuten. Abbildung 16A zeigt den Vergleich der Fragmente zum Metaboliten (entstanden in humanem Serum aus dem Originalpeptid CD276.11). Der Metabolit zeigt die gleiche Retentionszeit wie das Tyrosin. Beide zeigten einen Peak bei etwa 5,6 und 8,2 Minuten. Alle anderen getesteten Fragmente hatten eine unterschiedliche Retentionszeit, die zwischen sechs und acht Minuten lag.

## 5 Ergebnisse



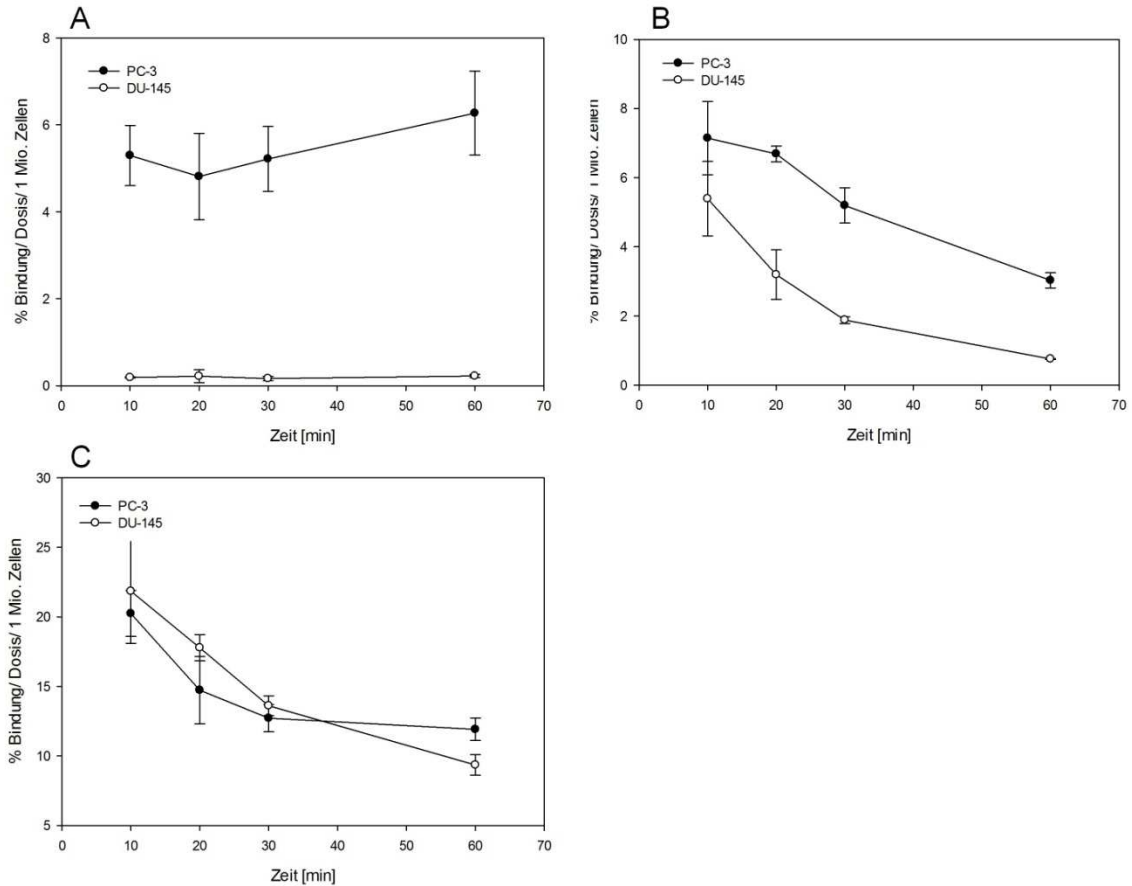
**Abbildung 15:**  $^{125}\text{I}$  radiomarkierte Fragmente und  $^{125}\text{I}$ -Tyrosin im Vergleich zum  $^{125}\text{I}$ -CD276.11 Metabolit. Die Radio-HPLC Daten wurden bei einem Gradienten von 0 – 30% Azetonitril in Wasser und 10 min aufgenommen. (A) Vergleich der Retentionszeiten der Fragmente 4-5, 4-6, 4-8, 5-8 und 5-9 mit Tyrosin und Metabolit. (B) Vergleich der im humanem Serum entstandenen  $^{125}\text{I}$ - markierten Metaboliten aus den Peptiden CD276.11 und CD276.11 5-11 mit  $^{125}\text{I}$ -Tyrosin. (C) Radio-HPLC Daten bei einem Gradienten von 0-20 % Azetonitril in Wasser und 10 min. Vergleich des  $^{125}\text{I}$  radiomarkiertem Metaboliten aus dem Originalpeptid CD276.11 und  $^{125}\text{I}$ -Tyrosin.



**Abbildung 16:** Bindungskinetiken von  $^{125}\text{I}$ -CD276.11,  $^{125}\text{I}$ -Metabolit und  $^{125}\text{I}$ -Tyrosin in PC-3 (A) und DU-145 Zellen (B). Gebundene Radioaktivität wurde als Prozent pro Dosis an 1 Millionen Zellen berechnet. Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3).

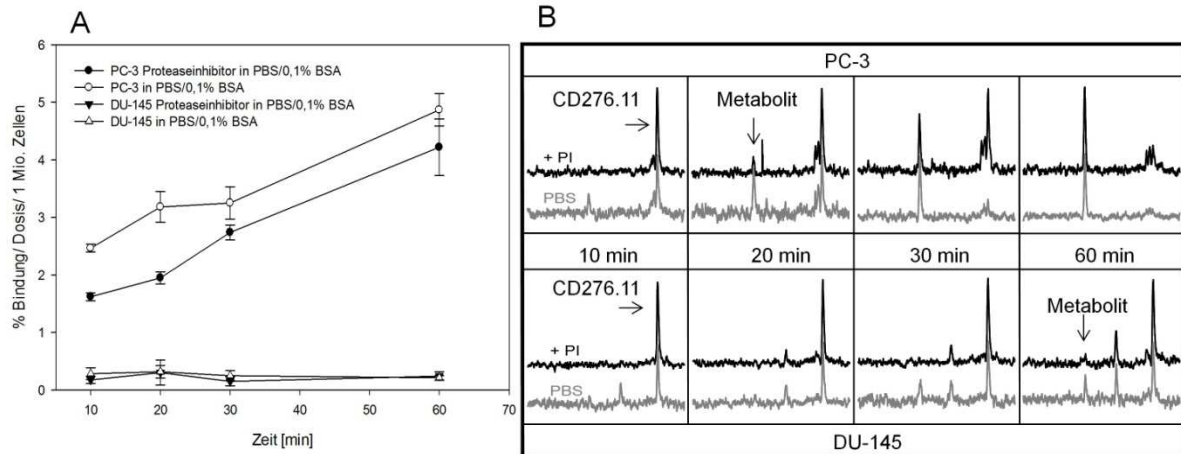


Abbildung 16B stellt den Vergleich der Metaboliten dar, die aus dem Originalpeptid und einem Fragment bestehend aus den Aminosäurepositionen 5 bis 11 durch Inkubation des Peptids CD276.11 in humanem Serum entstanden. Hier wird deutlich, dass die Degradation beim Fragment 5-11 zum gleichen Metaboliten führte. Auch bei einem niedrigerem Gradienten von Azetonitril in Wasser von 0- 20% zeigt sich, dass der Metabolit die gleiche Retentionszeit wie das Tyrosin hatte. Um die Ergebnisse der HPLC Daten zu stützen, wurden anschließend *in vitro* Versuche auf den Zelllinien PC-3 und DU-145 unternommen (Abbildung 17). Verglichen wurden jeweils  $^{125}\text{I}$ -CD276.11,  $^{125}\text{I}$ -Metabolit sowie  $^{125}\text{I}$ -Tyrosin. Gemessen wurde die zeitabhängige Bindung an die zwei Zelllinien von zehn bis 120 Minuten. Abbildung 17 zeigt die Versuche in Zellkulturmedium als Assay-Puffer. Das Originalpeptid zeigte wie schon in Vorversuchen eine Bindung von 3,5% nach 120 Minuten an PC-3 Zellen sowie eine Bindung von 0,03% an DU-145 Zellen. Für den Metaboliten konnte eine Bindung von etwa 2,5% auf PC-3 Zellen und 1% an DU-145 Zellen verzeichnet werden. Das radiomarkierte Tyrosin wurde nach 120 Minuten zu 1,5% an PC-3 Zellen gebunden, was auch etwa der Bindung an DU-145 Zellen entsprach. Der Unterschied der Bindung an die zwei Zelllinien mit unterschiedlichen CD276 Expression war demnach bei dem Originalpeptid am höchsten. Um eine Aufnahme von Tyrosin aus dem Zellkulturmedium zu unterbinden, wurden nachfolgend Kinetiken über einen Zeitraum 60 Minuten in PBS versetzt mit 0,1% BSA als Assay-Puffer durchgeführt (Abbildung 18). Hier zeigte sich, dass die Bindung in PBS im Vergleich zum Zellkulturmedium als Assay-Puffer zunimmt. Das Peptid CD276.11 zeigte bereits nach zehn Minuten eine Bindung von 5%, nach 60 stieg die Bindung auf 6% an PC-3 Zellen. Die Bindung an DU-145 Zellen dagegen lag über den gesamten Zeitraum bei 0,01%. Der Metabolit zeigte nach zehn Minuten eine Bindung von 7%, die aber nach 60 Minuten auf etwa 3% abfiel. Auch zeigte sich eine Bindung an DU-145 Zellen, welche von anfangs 5% auf etwa 1% nach 60 Minuten Inkubation sank. Ein ähnliches Verhalten wies das Tyrosin auf. Hier lag die Bindung an beide Zelltypen nach zehn Minuten aber schon bei etwa 21% und sank nach 60 Minuten auf etwa 10% ab.



**Abbildung 17:** Bindungskinetiken in PBS/ 0,1% BSA als Assay-Puffer über einen Zeitraum von 60 min bei 37°C. Gebundene Radioaktivität wurde in Prozent pro Dosis auf 1 Millionen Zellen bezogen. (A)  $^{125}\text{I}$ -CD276.11. (B)  $^{125}\text{I}$ -Metabolit. (C)  $^{125}\text{I}$ -Tyrosin.

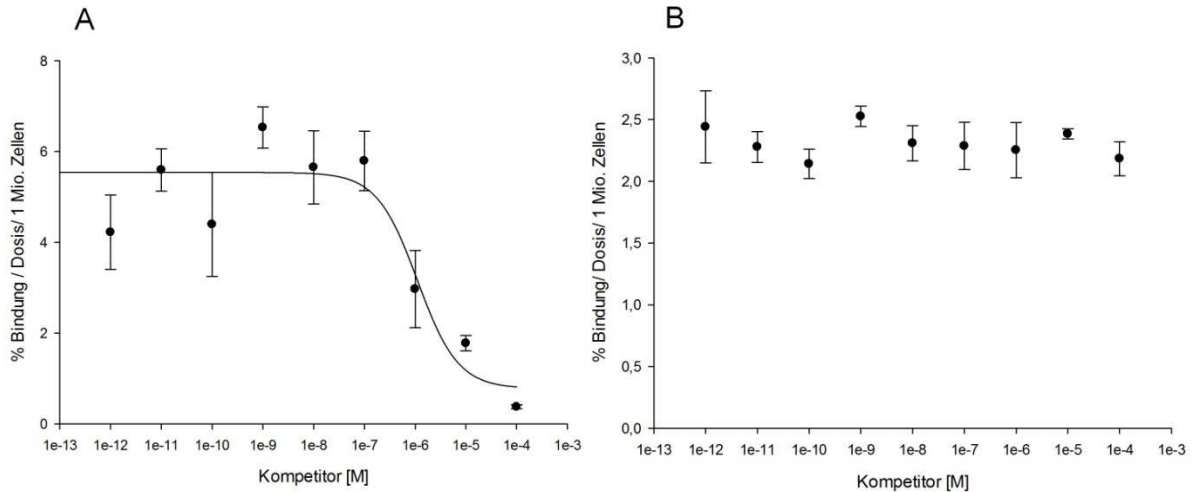
Um einen Abbau des Peptids durch zelleigene Proteasen zu verhindern, wurde im nachfolgenden Versuch dem Assay-Medium PBS/0,1% BSA ein Proteaseinhibitor-Cocktail von Roche zugesetzt. Verglichen wurden die Bindungseigenschaften des Peptids  $^{125}\text{I}$ -CD276.11 mit und ohne Zugabe des Proteasehemmers in PBS/0,1% BSA als Assay-Puffer (Abbildung 19A). Um die Zellen nicht zu schädigen, wurde der Versuch nur über einen Zeitraum von 60 Minuten durchgeführt. Als Kontrolle wurde zudem zu jedem Messzeitpunkt eine Probe des Assay-Puffers genommen und per Radio-HPLC analysiert (Abbildung 19B). Dies ermöglichte eine genaue Aussage über den Grad der Degradation des Originalpeptids bzw. die Menge des entstandenen Metaboliten zu jedem Messzeitpunkt.



**Abbildung 18: (A)** Bindungskinetik von  $^{125}\text{I}$ -CD276.11 auf PC-3 und DU-145 Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  in PBS/ 0,1% BSA als Assay-Puffer. Verglichen wurden die Bindungseigenschaften mit Zugabe von Proteaseinhibitor und ohne Proteaseinhibitor. **(B)** Assay-Pufferüberstände aus dem Kinetikversuch Abb. 19A wurden zu den Zeitpunkten 10, 20, 30 und 60 min abgenommen und per Radio-HPLC untersucht. Schwarze Daten mit Proteaseinhibitor, graue Daten PBS.

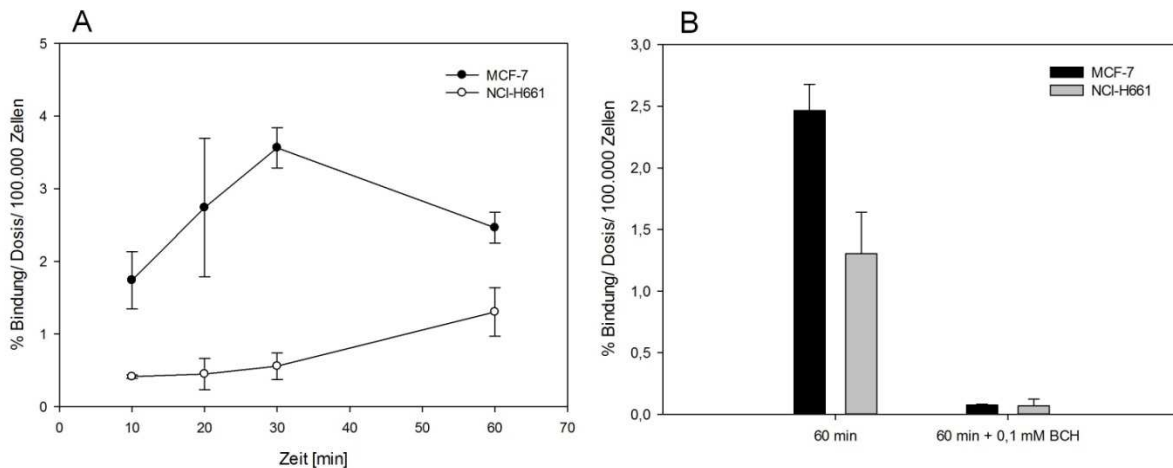
Nach zehn Minuten ist in den HPLC-Daten der Linie PC-3 mit PBS als Assaypuffer bereits ein Metabolit zu sehen. Unter Zugabe von Proteasehemmern entstand dieser erst nach 20 Minuten. Hauptkomponente bis dahin ist das Originalpeptid. Dieses zeigt in den Bindungsstudien eine Bindung von 2% (mit Proteasehemmer) bzw. 3% (ohne Proteasehemmer), was für eine Bindung des Peptids an PC-3 Zellen spricht. Nach 30 Minuten Inkubation auf PC-3 Zellen gleicht sich die Menge an entstandenem Metaboliten an, was auch in der Darstellung der prozentualen Bindung wiedergespiegelt wurde. Bei der Inkubation auf DU-145 Zellen dagegen entstand der Metabolit erst in sehr geringen Mengen nach 60 Minuten Inkubation auf Zellen. Hier wurde keine Bindung an Zellen detektiert, was ebenfalls für eine spezifische Bindung des Originalpeptids an CD276 die überexprimierende Zelllinie PC-3 spricht.

Ein weiterer Versuch sollte zur Aufklärung des Metaboliten führen. In Kompetitionsstudien mit  $^{125}\text{I}$ -CD276 und  $^{125}\text{I}$ -Tyrosin sollte geklärt werden, ob die Bindung von radiomarkiertem Peptid mit kaltem Tyrosin inhibieren ließ. Weiterhin wurde der Versuch radiomarkiertes Tyrosin mit dem kalten Peptid CD276.11 zu kompetitieren unternommen. Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der Kompetitionsversuche. Die Zugabe von Tyrosin führte zu einem Abfall der intrazellulären Radioaktivität nach 240 Minuten Inkubationszeit. Radiomarkiertes Tyrosin dagegen ließ sich nicht durch kaltes CD276.11 inhibieren.



**Abbildung 19:** Gebundene Radioaktivität wurde in Prozent pro Dosis auf 1 Mio. Zellen nach 240 min Inkubation berechnet. Werte sind als Mittelwerte (n=1) und Standardabweichungen angegeben. (A) Kompetitionsversuch von  $^{125}\text{I}$ -Tyrosin mit CD276.11 auf PC-3 Zellen in PBS/0,1% BSA bei 37°C. (B) Kompetitionsversuch von  $^{125}\text{I}$ -CD276.11 mit Tyrosin auf PC-3 Zellen in PBS/0,1% BSA bei 37°C.

Um die Vermutung der Entstehung von Tyrosin zu untersuchen, sollte im nächsten Schritt die Aufnahme der Aminosäure unterbunden werden. Für die Aufnahme von Tyrosin in Zellen ist der LAT-Transporter verantwortlich. Dieser kann durch das nicht-metabolisierbare Aminosäureanalogon BCH (2-Aminobicyclo[2,2,1]heptan-2-carboxylsäure) inhibiert werden. Im folgenden Versuch wurde durch Zugabe von 0,1 mM BCH in einem Kinetikexperiment die Aufnahme von Tyrosin in Zellen blockiert.



**Abbildung 20:** Kinetikexperiment auf CD276 überexprimierenden Tumorzellen MCF-7, NCI-H661 und VCap. Gebundene Radioaktivität wurde in Prozent pro Dosis und 1 Mio. Zellen berechnet. Die Werte sind als Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen angegeben.  $^{125}\text{I}$  markiertes CD276.11 wurde für 60 min auf Zellen inkubiert. In einem parallelen Ansatz wurde zusätzlich 0,1 mM Sch-116 (=BCH) zugegeben.

Abbildung 21 zeigt die Kinetikexperimente von  $^{125}\text{I}$ -CD276.11 auf MCF-7 und NCI-H661 Zellen durchgeführt von Bayer Schering Pharma. Verglichen wurden die Tumorkulturen MCF-7 und NCI-H661, welche im Western Blot als stark CD276 positiv bewertet wurden. Im nachfolgenden Versuch wurde im Kinetikexperiment 0,1 mM BCh zugegeben. Abbildung 21B zeigt, dass auch die Aufnahme von Radioaktivität bei Inkubation mit  $^{125}\text{I}$  markiertem CD276.11 durch Zugabe des LAT-Transporter-Inhibitors sowohl bei MCF-7 als auch NCI-H661 Zellen geblockt werden konnte.

## 5.5 Charakterisierung PDGFR-P1

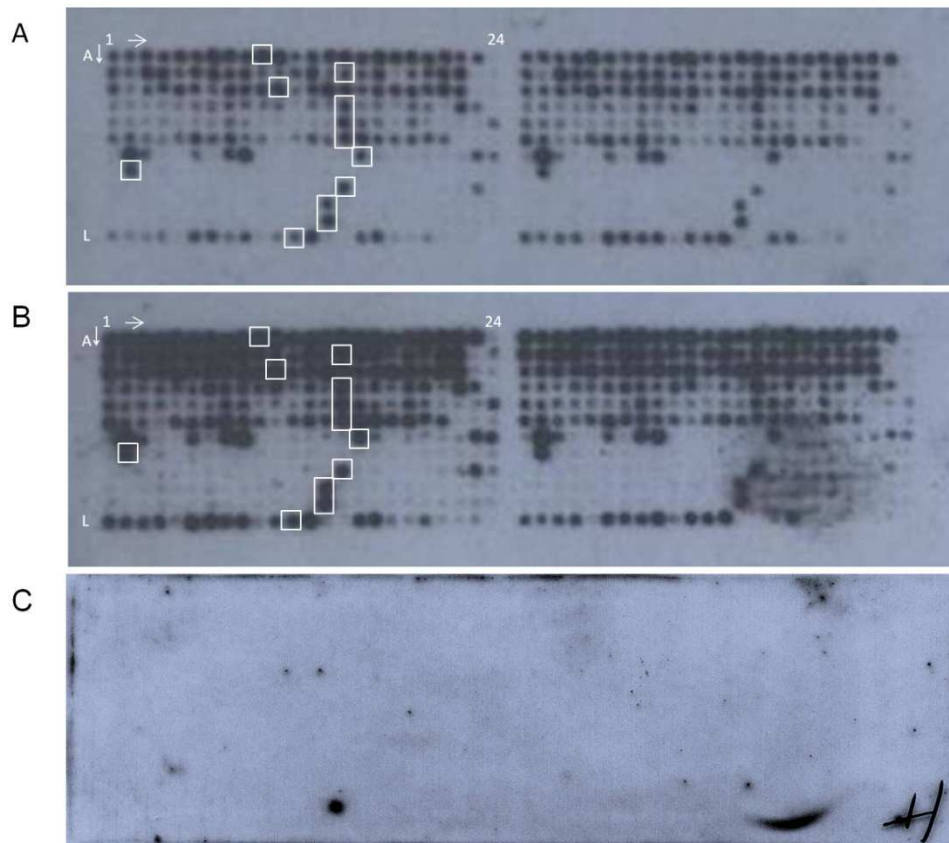
Ein weiteres Biopanning gegen die extrazelluläre Domäne von CD276 mit der Ph.D.12 Bibliothek führte nach vier Panningrunden zur 100%igen Anreicherung der Sequenz IPLPPSRPFFK. Diese Sequenz war bereits in zwei unabhängigen anderen Biopannings gegen die extrazelluläre Domäne von PDGFR $\beta$  identifiziert worden [101]. Pannings gegen PDGFR wurden auf maxisorp-Platten sowie an magnetischen Beads durchgeführt. Hier reicherte sich die Sequenz jeweils zu 40 und 80% an. Der Peptidligand wurde eingehend *in vitro* als auch *in vivo* charakterisiert [101]. Das Peptid trägt den Namen PDGFR-P1, da es als erstes Peptid gegen das Protein PDGFR $\beta$  identifiziert wurde. Im Nachfolgenden wird für das Peptid ebenfalls dieser Namen verwendet. Das Peptid wurde für Zell-basierte Assays zunächst mit  $^{125}\text{I}$  markiert und in Kinetik-, Internalisierungs- und Konkurrenzexperimenten auf BxPC-3 Zellen charakterisiert. Zusätzlich wurden die Bindungseigenschaften an mit PDGFR $\beta$  transfizierten Hek-Zellen untersucht. Diese überexprimieren die Zielstruktur und Bindungen lassen sich im Vergleich zu Wildtyp-Zellen besonders gut nachweisen. Das Peptid zeigte eine Affinität zu BxPC-3 Zellen. Weiterhin konnte eine signifikant erhöhte Bindung an PDGFR $\beta$  transfizierten Hek-Zellen gegenüber untransfizierten Hek-Zellen und mit CalX (Carboanhydrase IX) transfizierten Hek-Zellen gezeigt werden. *In vitro* Konkurrenzversuche mit unmarkierten Peptid in den Konzentrationen  $10^{-12}$  bis  $10^{-4}$  M ergaben einen  $\text{IC}_{50}$  Wert von 1.4  $\mu\text{M}$ . Negative Kontrollpeptide in der Konzentration  $10^{-5}$  M konnten die Bindung an PDGFR $\beta$  exprimierende Zellen nicht inhibieren, was für eine spezifische Bindung spricht. Organverteilungsstudien stützten die Ergebnisse. BxPC-3-Tumor tragende Nacktmäuse wurden mit  $^{131}\text{I}$  markierten PDGFR-P1 i.v. gespritzt. Das Peptid zeigte auch nach Perfusion eine Akkumulation im Tumorgewebe.

Um einen Fehler beim Pannen bzw. eine Kontamination völlig auszuschließen sowie das Peptid und seine Bindungseigenschaften an beide Targets näher zu untersuchen, wurde ein CelluSpot Peptid-Array durchgeführt. Hier konnten sowohl die Bindung an beide Targets CD276 und PDGFR $\beta$  als auch die Bindestelle bzw. minimale Bindesequenz des Peptids untersucht werden.

### 5.5.1 Peptid Arrays PDGFR-P1

Zur Aufklärung der Bindestelle des Peptids an beide Targets wurde ein Peptid-Array durchgeführt. Peptid-Arrays wurden so gespottet, dass in jeder Reihe das Originalpeptid PDGFR-P1 einmal vorkommt. Der Array präsentiert insgesamt 288

verschiedene Peptide. Senkrecht in den Reihen A bis L werden die Aminosäurepositionen dargestellt. Reihe A Position 1, Reihe B Position 2 usw. Waagrecht in den Spalten 1 bis 20 sind die 20 möglichen Aminosäuren positioniert. Spot A1 stellt also das Originalpeptid mit dem Austausch in Position 1 durch die Aminosäure Alanin dar. Spot A10 repräsentiert das Originalpeptid, in Spalte 10 werden alle Positionen durch Isoleucin ersetzt.



**Abbildung 21:** CelluSpots™ des Peptids PDGFR-P1 inkubiert mit 0,1  $\mu\text{M}$  Targetprotein gefolgt von Detektion mit einem anti-Fc Antikörper gekoppelt an HRP. Die Entwicklung erfolgte mittels der Chemilumineszenz-Methode. In weißen Quadraten sind jeweils die Originalpeptide hervorgehoben. (A) CD276. (B) PDGFR $\beta$ . (C) FGFR.

Weiterhin wurden zur Bestimmung der minimal nötigen Bindesequenz Fragmente von vier bis elf Aminosäuren des Peptids in den Spalten 21 bis 24 gespottet. Abbildung 22 zeigt die CelluSpots™, welche zunächst mit den rekombinant hergestellten extrazellulären Domänen der Targets CD276, PDGFR $\beta$  sowie dem Kontrollprotein Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR), welche alle einen Fc-Tg besitzen, inkubiert wurden. Die Detektion der Bindung erfolgte anschließend mit einem anti-Fc Antikörper gekoppelt an HRP (Horse Radish Peroxidase) und der Chemiluminescence Methode durch Auflegen eines lichtempfindlichen Films. Deutlich zeigte sich, dass bei beiden Zielstrukturen das gleiche Bindungsmuster

auftrat, bei FGFR aber keine Bindung nachzuweisen war. Außerdem ergab der Versuch eine höhere Affinität zu PDGFR $\beta$ , die sich durch die allgemein dunkleren bzw. größeren Spots bemerkbar machte. Alle CelluSpots™ trugen jede Peptidsequenz zweifach, auf der linken und rechten Seite. Die Versuche wurden zusätzlich als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Analyse der Spotintensität mittels der Software GenePix 6.0 zeigte, dass sowohl für CD276 als auch PDGFR $\beta$  der Austausch der Aminosäurepositionen <sup>8</sup>R, <sup>9</sup>P, <sup>10</sup>F und <sup>11</sup>F zu einem starken Abfall der Bindungsintensität führten (Abbildung 23). Der Austausch der Aminosäure S an Position 7 zu R, G, oder H verstärkten die Targetaffinität, bei Austausch zu C, L, K, M oder W hingegen sank diese. Der Austausch von <sup>5</sup>P und <sup>6</sup>P resultierte in Derivaten mit gleicher Bindungsstärke oder aber geringerer Bindungsaffinität. Ähnlich verhielt es sich mit den Positionen <sup>4</sup>P und <sup>12</sup>K. Die Positionen 1 bis 3 (<sup>1</sup>I, <sup>2</sup>P und <sup>3</sup>L) konnten durch alle beliebigen Aminosäuren ausgetauscht werden ohne einen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Peptids zu haben. Die Auswertung der gespotteten Fragmente von PDGFR-P1 ergab, dass alle Fragmente, welche die Sequenz SRPFF enthielten, die Fähigkeit zur Targetbindung sowohl an CD276 als auch PDGFR $\beta$  beibehielten. Fehlte eine Position des 5 Aminosäure langen Peptids, führte dies zu geringerer Bindungsintensität. Ebenso verhielt es sich mit Fragmenten, die nur die ersten sechs Positionen von <sup>1</sup>I bis <sup>6</sup>P enthielten. Die Kontrollpeptide der Spots L22 und L23 zeigten keine Bindung an die Targets. Tabelle 17 zeigt die Aminosäuresequenzen der gespotteten Fragmente.

**Tabelle 17: Aminosäuresequenzen und Positionen der gespotteten Fragmente von PDGFR-P1 Fett hervorgehoben sind Fragmente mit der Sequenz SRPFF.**

	21	22	23	24
A	<b>IPLPPSRPFFK</b>	<b>IPLPPSRPFF</b>	<b>PLPPSRPFFK</b>	IPLPPSRPF
B	<b>PLPPSRPFF</b>	<b>LPPSRPFFK</b>	IPLPPSRP	PLPPSRPF
C	<b>LPPSRPFF</b>	<b>PPSRPFFK</b>	IPLPPSR	PLPPSRP
D	LPPSRPF	<b>PPSRPFF</b>	<b>PPSRPFFK</b>	IPLPPS
E	PLPPSR	LPPSRP	PPSRPF	<b>PPSRPFF</b>
F	<b>PSRPFFK</b>	IPLPPP	PLPPS	LPPSR
G	PPSRP	PPSRPF	<b>PSRPFF</b>	<b>SRPFFK</b>
H	IPLPP	PLPPP	LPPS	PPSR
I	PPSRP	PSRPF	SRPFF	RPFFK
J	IPLP	PLPP	LPPP	PPS
K	PPSR	PSRP	SRPF	RPFF
L	PFFK	HAc	Biotin-AWRHPQFGG	AEEQKLISEEDLLR



Code		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
AS	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	Fragmente				
A	I	88	92	96	98	99	99	96	96	96	100	99	87	97	98	100	97	99	99	97	98	100	96	93	56
B	P	102	79	108	106	98	103	106	102	107	96	92	91	105	88	100	99	104	59	97	102	101	101	62	59
C	L	92	77	92	96	100	95	92	101	101	102	100	76	97	102	102	92	93	97	98	91	100	99	58	60
D	P	63	59	48	56	63	74	67	86	79	81	84	27	71	69	100	59	65	33	74	69	67	98	81	52
E	P	76	64	59	47	39	47	46	83	60	26	28	16	40	43	100	82	67	21	73	35	58	60	60	85
F	P	92	99	69	67	88	103	91	104	84	76	30	59	82	71	100	101	94	82	93	87	87	52	54	55
G	S	45	117	90	11	5	87	23	111	112	9	1	4	9	9	21	100	33	3	17	12	60	62	91	80
H	R	8	100	8	9	1	4	4	6	5	5	0	0	3	4	4	4	4	0	0	2	51	52	51	55
I	P	6	2	2	7	0	1	3	0	1	0	0	0	0	5	100	0	1	0	0	0	54	58	87	56
J	F	1	1	1	6	4	1	5	1	1	2	2	0	5	100	6	1	1	2	2	0	50	50	52	51
K	F	2	2	2	9	2	3	11	6	2	3	4	2	14	100	7	5	5	1	1	2	54	54	55	53
L	K	79	72	82	84	29	112	108	100	109	37	85	100	119	32	12	105	111	36	25	57	57	56	54	48

Code		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
AS	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	Fragmente				
A	I	98	100	101	100	100	101	101	99	101	100	101	98	99	100	101	102	101	98	100	101	100	99	96	36
B	P	94	97	99	100	99	100	100	99	94	95	90	99	94	100	99	99	88	96	96	101	99	41	43	
C	L	95	92	96	99	100	98	102	99	98	99	100	93	98	100	101	96	97	97	100	96	101	100	38	25
D	P	79	81	73	79	83	79	97	92	90	86	95	70	85	81	100	82	84	72	88	88	68	97	72	16
E	P	83	72	69	65	52	59	68	88	80	47	52	44	66	67	100	88	70	54	81	59	35	41	37	74
F	P	96	87	73	56	87	91	98	102	96	74	41	75	88	85	100	104	100	90	96	83	72	21	24	28
G	S	87	108	79	39	38	90	65	103	104	35	23	29	32	40	53	100	64	27	41	34	30	31	88	75
H	R	52	100	40	36	23	34	30	36	36	26	18	21	23	21	26	33	21	16	14	17	15	18	20	26
I	P	33	44	35	31	25	22	25	26	22	20	19	18	30	32	100	26	20	14	13	13	18	39	89	36
J	F	27	25	30	34	25	21	27	18	20	20	28	17	26	100	35	20	14	15	12	9	10	9	20	13
K	F	34	25	25	29	22	23	35	25	18	20	19	19	42	100	27	19	14	11	13	10	10	12	19	13
L	K	91	86	87	90	64	104	108	100	99	46	82	100	110	57	28	94	95	36	31	53	19	14	25	7

Abbildung 22: Auswertung der CelluSpots™ mit dem GenePix 6.0 Programm. Spotintensitäten wurden auf das in der jeweiligen Zeile befindliche Originalpeptid PDGFR-P1 (=100% Bindung) bezogen. Die Berechnung der Fragmente wurde auf das Originalpeptid an Stelle A21 bezogen. Originalpeptide sind durch Rahmen hervorgehoben. Grün = geringere Bindungsstärke im Vergleich zum Originalpeptid, Gelb = Bindungsstärke liegt im Bereich des Originalpeptids, Rot = erhöhte Bindungsaffinität. (A) CD276. (B) PDGFRβ.

### 5.5.2 Vergleich der Proteinsequenz von CD276 und PDGFRβ

Da das Peptid PDGFR-P1 zu beiden Zielstrukturen eine Affinität zeigte, sollte nun geklärt werden, ob die extrazellulären Domänen von PDGFRβ und CD276 ähnliche Aminosäureabschnitte aufweisen. Hierzu wurde ein Vergleich der Aminosäuresequenz der beiden Proteine mit Hilfe des Programms ClustalW durchgeführt (Abbildung 24). Verglichen wurden die extrazellulären Domänen der beiden Proteine.

```

1      LVVTPFGPELVLVNSSTFVLICSGSAPVWVERMSQEPPEMAKAQDGTFFSSVLTLTINLTG 60
2      LEVQVPEDPVVALVGTIDATLCCSFSPEPGFSLAQNLNIWQLIDTKQ-----LVHSFAEG 54
      * * * : * * : * * * * : : : : : : : : : : : : * : *

1      LDIGEVFCTHNSRGLTDERKRLYIFVPDPTVGFLEPNDAAELFIFLTEITEITIPCRVT 120
2      QDQGSAYANR---TALFPDLLAQGNASLRLQRVVADEGSFTCFVSIIRDFGSAAVSLQVA 111
      * * : : : : * * * : : * : : : * : : : : : : : : * : *

1      DPQLVVLHEKKGDVALFVVDYHQRGFGIFEDRSYICKTTIGDREVSDDAYVYVRLQVS 180
2      APYSKPSMILEPNKDLRPG-----DTVIITCSSYQG----- 142
      * : : : * : : : : : : : : : : : : * : *

1      SINVSVNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFEWYPRKESGRLVPEFVIDFLLDMPYHI 240
2      -----YPEAEVFWQDGGVPLTGNVITISQMANEQGLFD-----VHSILRVVLGANGTY 190
      : : : : * : : * * : : : : : : : : : : * : : * : *

1      RSILHIPSAELEDSGTTCNVIESVNDHQDEKAINITVWESGYVRLGGEVGTILQFAELHR 300
2      SCLVRNPFVLQQDAHSSVTITPQRSP----IGAVEVQVPEDPVVALVGTIDATLRCFSFSPE 245
      : : : * : : : * * : * * : : : * * * : : * : * : *

1      S----RTLQVVFEAYPPPTVLW-FKDNRLIGDSSAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVRVK 355
2      PGFSLAQNLNIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRIALFPDLLAQG--NASLRLQRVR 303
      . : : : : : : : * : : * * : * : * * . : : : : * * * *

1      VAEAGHYTMRAFHE---AEVQLSFQLQINVFVRVLELSESHPDSEQIVRCRG-RGMPQ 411
2      VADEGSFTCFVSIIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMILEPNKDLRPGDTVIITCSSYRGYPE 363
      * : * * . * * * * . * * * . . * * * : * : * * * *

1      PNIWSACRDLKRCPRELPPILLGNSSEESQLETNVTYWEEEQEFVWVSTLRLQHVDRP 471
2      AEFVWQDGGQVP-----LTGNVITISQMANEQGLFDVHVSVLRVVLGANGTYSCLVRN 414
      : : : * : : : * * * : : * : : . . . : : . : *

1      LSVRCTLRNAVGQDTQEVIVVPHSLPFK 499
2      FVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEA---- 438
    
```

Abbildung 23: Aminosäure-Sequenzvergleich der extrazellulären Domänen von (1) PDGFRβ – AS 33- 532 und (2) CD276 – AS 29- 466.

Abbildung 24 zeigt, dass bis auf Fälle vereinzelter Aminosäuren keine Übereinstimmung in der Sequenz der beiden Targets nachzuweisen war.

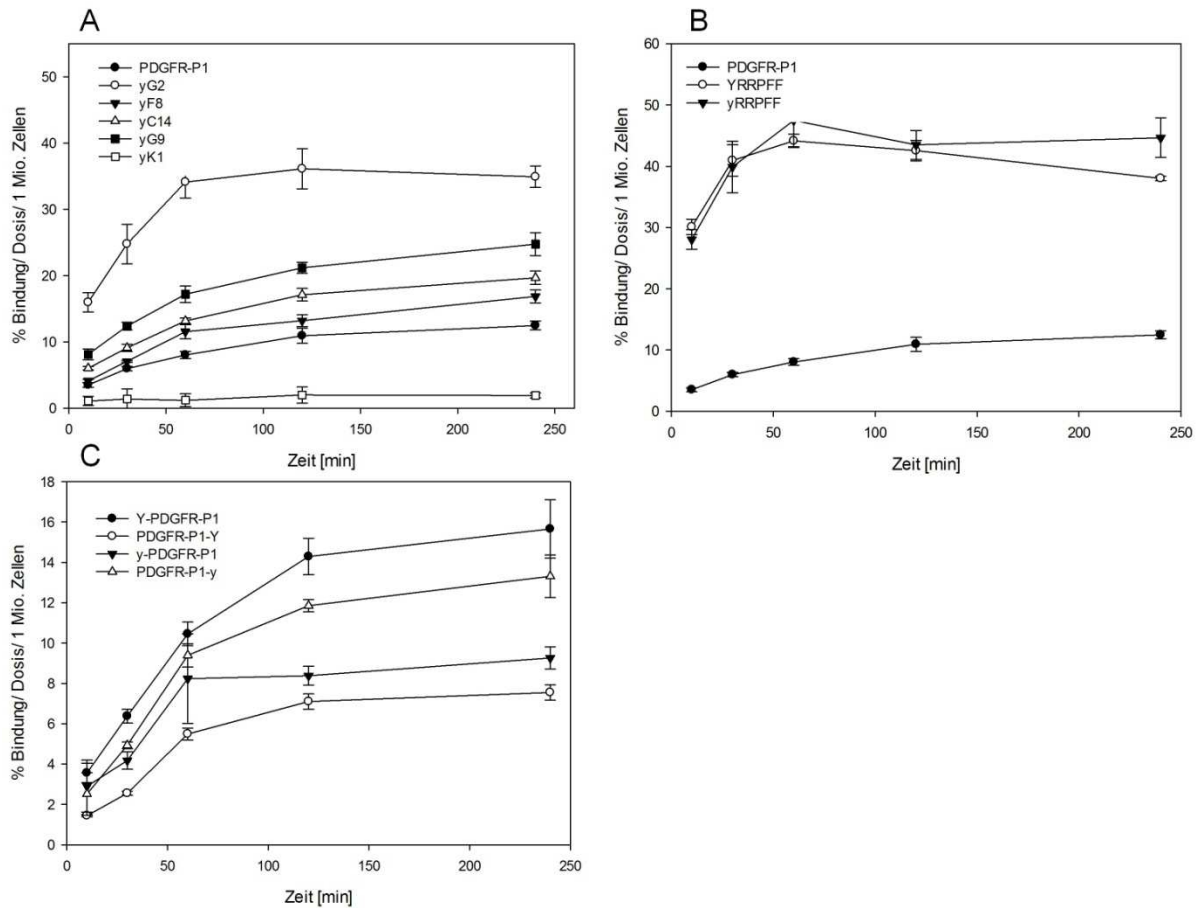
### 5.5.3 Analyse der Derivate von PDGFR-P1

Zell basierte Assays wurden auf der Zellline BxPC-3 durchgeführt, welche sowohl für PDGFRβ als auch CD276 positiv ist. Dies hatte eine Vergleichbarkeit mit den Daten des Originalpeptids zum Ziel.

#### 5.5.3.1 Kinetiken der PDGFR-P1 Derivate

Um die Daten des Peptid-Arrays zu verifizieren, wurden *in vitro* Kinetikexperimente auf BxPC-3 Zellen durchgeführt. Die Peptide der Spots C14, G2, G9, F8 und K1 mit unterschiedlicher Bindungsaffinität zu beiden Zielstrukturen, wurden chemisch synthetisch hergestellt, mit <sup>125</sup>I markiert und mit dem Originalpeptid im Bezug auf Bindung an BxPC-3 Zellen verglichen (Abbildung 25). Kinetikexperimente zeigten eine Bindung von etwa 11% applizierter Dosis auf 1 Mio. Zellen für das Originalpeptid, 34% für yG2, 24% für yG9, 17% für yC14 und 14% für yF8 (Abbildung 25A). Die Bindung von yG2, yG9 und yC14 war dabei signifikant höher als die des

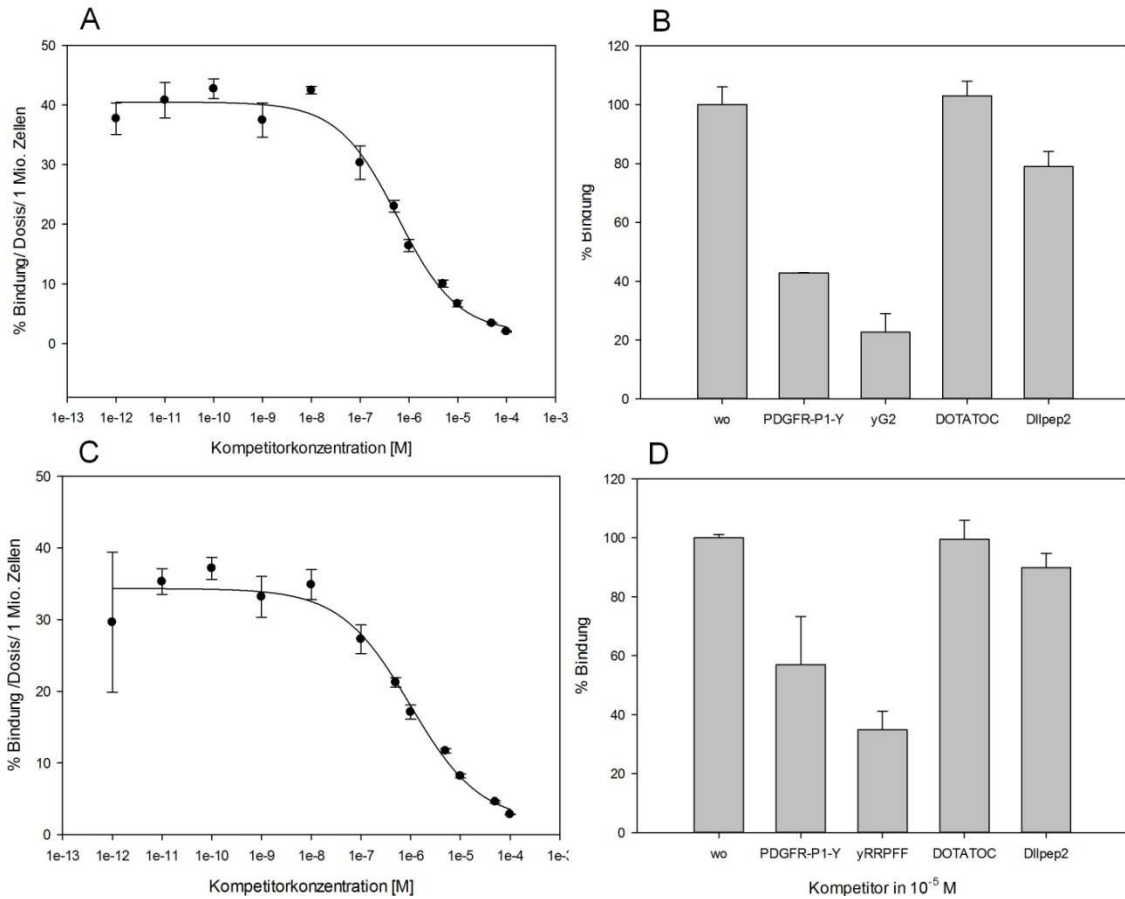
Originalpeptides. Das Kontrollpeptid yK1 zeigte nur 1% Bindung auf BxPC-3 Zellen, was mit den Ergebnissen der CelluSpots™ korreliert. Zusätzlich wurde ein Fragment auf BxPC-3 Zellen getestet. Dieses wurde durch die Verkürzung der Sequenz des Spots G2 erreicht. Da G2 in den Kinetikexperimenten bereits eine erhöhte Bindung an Zellen und die Verkürzung des Originalpeptids im CelluSpot™ eine gleichbleibende Bindungsaffinität bei Kürzung auf die Aminosäuren 7 bis 11 gezeigt hatte, sollte direkt das optimierte Fragment getestet werden (Abbildung 25B). Getestet wurde das Fragment mit einem N-terminalen L- sowie D-Tyrosin im Vergleich zum Originalpeptid. Auch das Fragment zeigte eine signifikant erhöhte Bindung an BxPC-3 Zellen von etwa 40% im Vergleich zum PDGFR-P1. Die Markierung mit <sup>125</sup>I an den unterschiedlichen Tyrosinresten zeigt ebenfalls, dass die Wahl der Konfiguration des Tyrosinrestes keine Auswirkung auf die Bindungseigenschaften des Fragments hatte. Um dies auch für das Originalpeptid zu zeigen, wurde dieses sowohl N-terminal als auch C-terminal mit L- und D-Tyrosin chemisch synthetisiert und mit <sup>125</sup>I markiert. Die Peptide wurden ebenfalls auf BxPC-3 Zellen getestet (Abbildung 25C). Im Vergleich zum Originalpeptid PDGFR-P1-Y zeigte das N-terminal mit L-Tyrosin versehene Peptid eine Steigerung der Bindung von 2%. Das mit D-Tyrosin am C-Terminus erweiterte Peptid dagegen zeigte eine Bindung von etwa 13% der Dosis auf 1 Mio. Zellen im Vergleich zu 7% des Originalpeptids. Das am N-Terminus mit D-Tyrosin versehene Peptid war mit 9% Bindung mit dem Originalpeptid vergleichbar. Aufgrund dieser Ergebnisse sollten der Spot G2 sowie das Fragment RRPFF weiter evaluiert werden.



**Abbildung 24:** *In vitro* Bindungsstudien von PDGFR-P1 Derivaten an BxPC-3 Zellen bei 37°C. Alle Peptide wurden mit  $^{125}\text{I}$  markiert. Gebunden Radioaktivität wurde in Prozent der Dosis an 1 Mio. Zellen berechnet. Die Werte sind als Mittelwerte ( $n=3$ ) und Standardabweichungen angegeben. (A) Vergleich verschiedener Derivate abgeleitet von CelluSpots™. (B) Vergleich des Fragments RRPFF mit dem Originalpeptid. (C) Vergleich verschiedener Tyrosinreste zur Markierung mit  $^{125}\text{I}$ .

### 5.5.3.2 *In vitro* Kompetitionsstudien des Derivates G2 und des Fragments RRPFF

Zur Bestimmung der Spezifität der beiden Derivate von PDGFR-P1 wurden Konkurrenzexperimente auf BxPC-3 Zellen durchgeführt. Unmarkierte Peptide dienten hier als Kompetitoren für die  $^{125}\text{I}$ -markierten, zu untersuchenden Peptide G2 und RRPFF. Zunächst wurde  $^{125}\text{I}$ -yG2 mit unmarkiertem yG2 und das  $^{125}\text{I}$ -Fragment mit unmarkiertem Fragment kompetitiert. Hier diente eine Reihe von verschiedenen Konzentrationen an Kompetitor von  $10^{-12}$  bis  $10^{-4}$  M zur Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$  Wertes (Abbildung 26 A,C).



**Abbildung 25: Kompetitionsversuche auf BxPC-3 Zellen bei 37°C. Gebundene Radioaktivität wurde als Prozent pro Dosis auf 1 Mio. Zellen berechnet. Werte sind Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen. (A) <sup>125</sup>I-yG2 kompetitiert mit yG2. (B) <sup>125</sup>I-yG2 kompetitiert mit PDGFR-P1, DOTATOC und DIIpep2. (C) <sup>125</sup>I-yRRPFF kompetitiert mit yRRPFF. (D) <sup>125</sup>I-yRRPFF kompetitiert mit PDGFR-P1, DOTATOC und DIIpep2.**

Beide Experimente zeigten eine steigende Inhibition der Bindung mit zunehmender Kompetitorkonzentration. Bei einer Kompetitorkonzentration von 10<sup>-4</sup> M wurde für yG2 eine Konkurrenz von 96% erzielt bei einem IC<sub>50</sub> Wert von 480 nM. Das Fragment konnte bei 10<sup>-4</sup> M Kompetitor zu 93% inhibiert werden bei einem IC<sub>50</sub> von 580 nM. Weitere IC<sub>50</sub> Werte konnten für die Konkurrenz von <sup>125</sup>I-PDGFR-P1 mit yG2 und yRRPFF bestimmt werden. Weiterhin wurden sowohl yG2 als auch das Fragment mit dem Originalpeptid kompetitiert. Ergebnisse der Studien zeigt Tabelle 18.

**Tabelle 18: Kompetitionsversuche des Originalpeptids PDGFR-P1 und dessen Derivate. Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes in nM.**

Kompetitoren	<sup>125</sup> I markierte Peptide		
	nM	yG2	yRRPFF
PDGFR-P1-Y		7600	6800
yG2		480	
yRRPFF			580



Tabelle 18 zeigt die IC<sub>50</sub> Werte der Wettbewerbsversuche. yG2 zeigt mit 480 nM die höchste Affinität. Die Konkurrenz mit dem Originalpeptid ergab ebenfalls eine konzentrationsabhängige Inhibition. Askoxylakis *et al.* konnten bereits zeigen, dass auch das Originalpeptid mit 1400 nM eine Spezifität an BxPC-3 Zellen aufwies, welche aber geringer war als die von yG2 und dem untersuchten Fragment.

Weitere Wettbewerbsversuche wurden mit den Kontrollpeptiden DOTATOC und DIIIPep2 durchgeführt. Hier ließ sich keine Konkurrenz nachweisen (Abbildungen 26 B,D).

### 5.5.3.3 *In vitro* Internalisierung von yG2 und yRRPFF

Internalisierungsstudien wurden auf BxPC-3 Zellen durchgeführt. Die Internalisierung wurde parallel bei 37°C und 4°C über einen Zeitraum von 4 Stunden untersucht. Um membrangebundenes Peptid zu lösen, wurde ein zusätzlicher Waschschritt mit einem niedrig pH Puffer in das Kinetikexperiment eingeführt. Erst dann wurden Zellen lysiert und so die internalisierte Aktivität bestimmt. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse der Studien. <sup>125</sup>I-yG2 wird zu 25% in BxPC3 Zellen bei 37°C aufgenommen. Bei 4°C wurde signifikant weniger in Zellen internalisiert. Das Fragment <sup>125</sup>I-yRRPFF dagegen wurde nicht in BxPC-3 zellen aufgenommen.

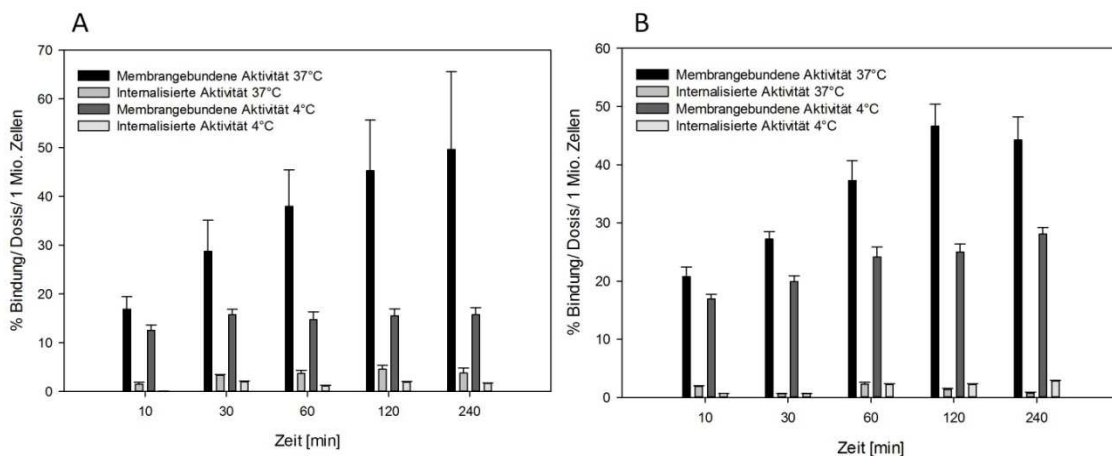


Abbildung 26: Internalisierungsstudien auf BxPC-3 Zellen bei 37°C und 4°C. Gebundene Radioaktivität wurde in Prozent pro Dosis auf 1 Mio. Zellen berechnet. Werte sind Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen. (A) <sup>125</sup>I-yG2. (B) <sup>125</sup>I-yRRPFF.

### 5.5.4 Serumstabilitäten von <sup>125</sup>I-yG2 und <sup>125</sup>I-yRRPFF

Das Peptid yG2 sowie das Fragment yRRPFF wurden nach Radiomarkierung mit <sup>125</sup>I einer Serumstabilitätsmessung unterzogen. Beide Peptide wurden über einen Zeitraum von 240 Minuten in humanem Serum inkubiert und nachfolgend per HPLC

analysiert. Abbildung 28 zeigt die HPLC Daten. Beide Peptide werden im Serum degradiert. Erste Fragmente traten bei yG2 nach etwa 30 min und bei dem Fragment RRPFF nach fünf Minuten Inkubation auf. Eine Halbwertszeit von fünf Minuten konnte für das Fragment, eine Halbwertszeit von etwa 120 Minuten für yG2 ermittelt werden. Das Originalpeptid zeigte eine Halbwertszeit von vier Minuten [101].

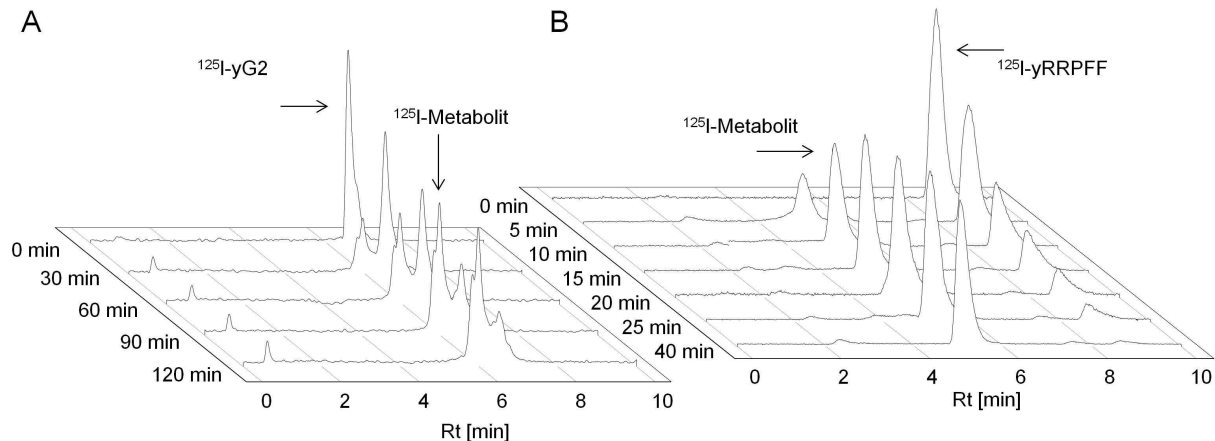


Abbildung 27: *In vitro* Stabilität von (A)  $^{125}\text{I}$ -yG2 und (B)  $^{125}\text{I}$ -RRPFF in humanem Serum.

### 5.5.5 *In vivo* Charakterisierung yG2

Für die Untersuchung des *in vivo*-Bindungsverhalten von yG2 wurden immundefiziente BALB/c nu/nu Nacktmäuse als Modellorganismus verwendet. Zur Erzeugung von humanen CD276 sowie PDGFR $\beta$  exprimierenden Tumoren wurden subkutan humane BxPC-3-Tumorzellen gespritzt.  $^{131}\text{I}$ -markiertes Peptid wurde in die Schwanzvene der Mäuse appliziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Tiere euthanasiert, Blut, Tumor und Organe (Herz, Lunge, Milz, Leber, Nieren, Muskel und Gehirn) entnommen und gemessen. Ausscheidungsorgane wie Leber und Niere sind von besonderem Interesse. Die prozentuale, inkorporierte Dosis pro g Organ wurde nach fünf, 15 und 60 Minuten bestimmt (Abbildung 29). Außerdem wurde das Tumor/ Organ Verhältnis erfasst (Tabelle 19).

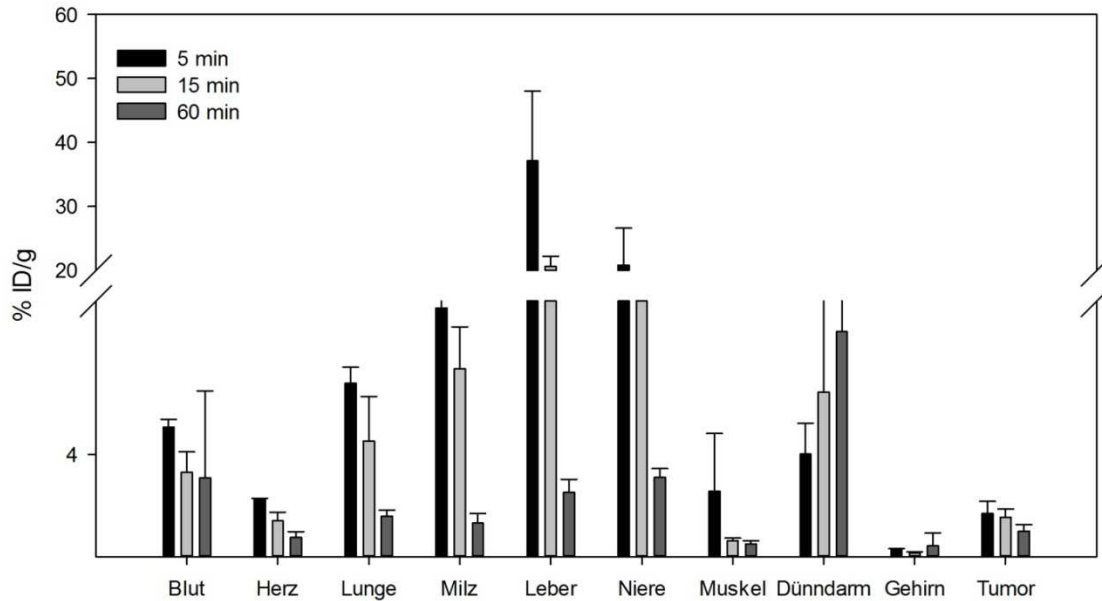


Abbildung 28: Organverteilungsstudie von <sup>131</sup>I-gG2 an BxPC-3 Tumor tragenden Nacktmäusen Balb/c. Peptid wurde i.v. in die Schwanzvene appliziert und Tiere nach 5, 15 und 60 min getötet und für Organe, Tumor sowie Blut die Aktivität bestimmt. Werte sind in % injizierte Dosis pro Gramm Organ (% ID/g) angegeben. Angegebene Werte sind Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen.

Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse der Studie. Das Peptid wird über einen Zeitraum von 60 Minuten aus nahezu allen Organen schnell ausgewaschen. Lediglich im Dünndarm ist über den Zeitraum von 60 Minuten eine Akkumulation von 4 auf 8,8% injizierte Dosis zu sehen. Die Aktivität im Tumor fällt von 1,7 auf 1% im Zeitverlauf relativ langsamer als in Vergleichsorganen. Ausscheidungsorgane wie Leber und Niere zeigen bereits nach fünf Minuten hohe Aktivität, welche aber nach 60 Minuten auf etwa 3% abfällt. Tumor zu Organverhältnisse in Tabelle 19 bestätigen die Ergebnisse. Lediglich in Herz, Muskel und Gehirn liegt der Wert nach 60 Minuten Zirkulation in der Maus über 1.

Tabelle 19: Organverteilung und Tumor zu Organverhältnis von <sup>131</sup>I-gG2 in BxPC-3 Tumor tragenden Balb/c nu/nu Mäusen.

Tumor/Organ Ratio	5 min	15 min	60 min
Blut	0,33	0,54	0,58
Herz	0,75	1,14	1,35
Lunge	0,25	0,38	0,63
Milz	0,17	0,32	0,78
Leber	0,05	0,13	0,40
Nieren	0,08	0,17	0,32
Muskel	0,96	2,35	2,00
Dünndarm	0,42	0,38	0,16
Gehirn	6,51	9,71	5,06



### 5.5.6 Stabilisierungsstrategien für das Fragment RRPFF

Um die kurze Halbwertszeit in humanem Serum zu erhöhen, sollten verschiedene Stabilisierungsstrategien für das Fragment von G2 angewandt werden. Da Proteasen oft natürlich vorkommende L-Aminosäuren als Substrat erkennen, sollten einzelne Aminosäuren des Peptids durch D-AS sowie methylierte (Me)-AS ausgetauscht werden. Eine veränderte Erkennungssequenz sollte den Abbau durch Serumproteasen verhindern und eine *in vivo* Bildgebung und Organverteilungsstudien möglich machen. Tabelle 20 zeigt die Aminosäuresequenzen der Derivate des Fragments von G2.

**Tabelle 20: Aminosäuresequenzen der Derivate des G2 Fragments**

Name	Sequenz	Name	Sequenz
D1	yrRPFF	M1	yMe-RRPFF
D2	yRrPFF	M2	yRMe-RPFF
D3	yRRpFF	M3	yRRMe-PFF
D4	yRRPfF	M4	yRRPMe-FF
D5	yRRPFf	M5	yRRPFMe-F

#### 5.5.6.1 Kinetikexperimente der Derivate von AV2

Nach Radiomarkierung mit  $^{125}\text{I}$  am N-terminalen D-Tyrosin wurden Kinetikexperimente auf BxPC-3 Zellen durchgeführt. Abbildung 30 zeigt, dass für alle Derivate D1 bis D5 die Bindung im Vergleich zum Fragment stieg. Nach 240 Minuten Inkubation auf Zellen konnte eine Bindung von bis zu 70% pro Dosis auf 1 Millionen Zellen nachgewiesen werden. Der Austausch einzelner L-AS zu Me-AS dagegen führte für M1 zu einer besseren Affinität von 63%, für M3 zu einer geringeren Affinität von 30% applizierter Dosis auf 1 Million Zellen. Der Austausch der Positionen 2, 4 und 5 dagegen hatte keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften.

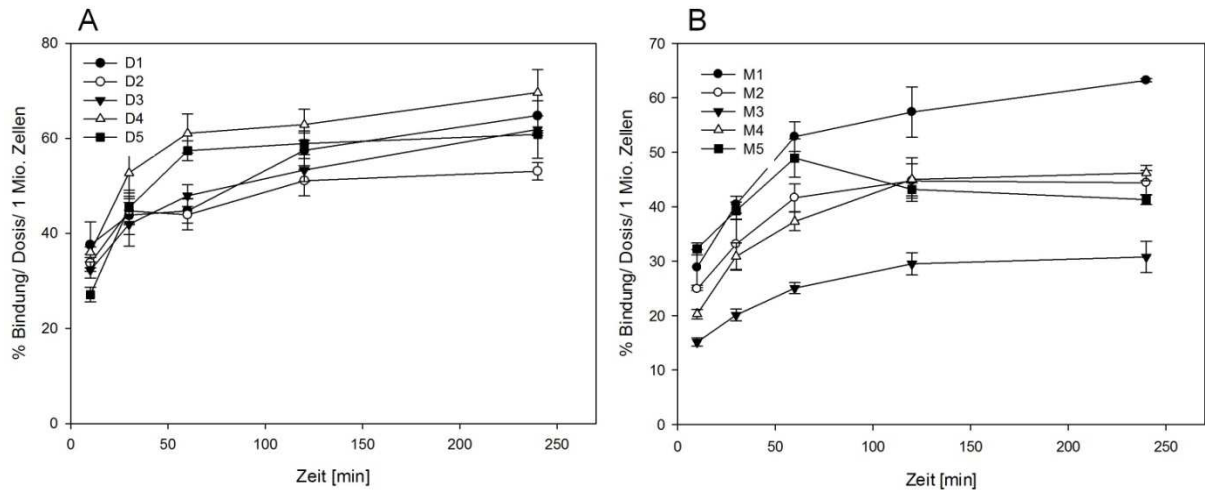


Abbildung 29: Bindungskinetiken von  $^{125}\text{I}$ -markierten Derivaten von AV2 auf BxPC-3 Zellen bei  $37^\circ\text{C}$ . Gebundene Radioaktivität wurde in Prozent pro applizierte Dosis auf 1 Millionen Zellen berechnet. Werte sind Mittelwerte ( $n=3$ ) und Standardabweichungen.

Da der Austausch von L-AS zu D-AS zu einer gesteigerten Bindungsaffinität an BxPC-3 Zellen führte, sollte im Anschluss das komplette Fragment AV2 aus D-AS hergestellt (yrrpff), mit  $^{125}\text{I}$  radiomarkiert und auf BxPC-3 Zellen auf Bindung untersucht werden. Weiterhin wurde das Peptid in der umgekehrten Reihenfolge der AS hergestellt (ffprny), ebenfalls radiomarkiert und auf Zellen getestet. Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse der Bindungskinetiken. Das Peptid yrrpff zeigte nach 240 Minuten Inkubation auf BxPC-3 Zellen eine Bindung von 23%, das Peptid ffprny 17% applizierte Dosis auf 1 Millionen Zellen.

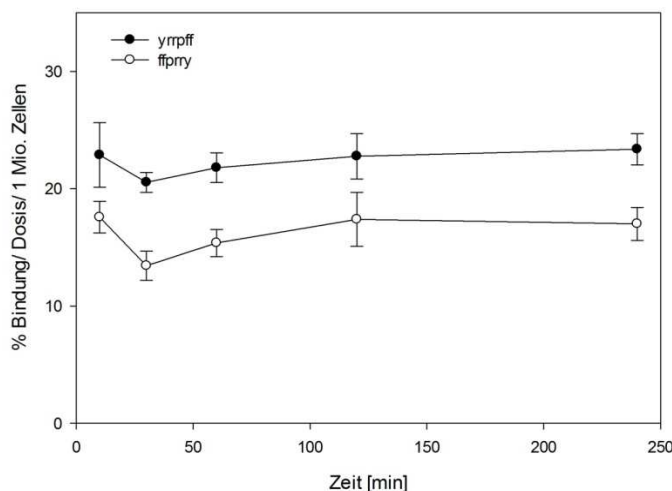


Abbildung 30: Bindungskinetiken von  $^{125}\text{I}$ -yrrpff und  $^{125}\text{I}$ -ffprny auf BxPC-3 bei  $37^\circ\text{C}$ . gebundene radioaktivität wurde in Prozent pro applizierte Dosis auf 1 Millionen Zellen berechnet. Werte sind Mittelwerte ( $n=3$ ) und Standardabweichungen.

### 5.5.6.2 $\gamma$ -Kamerabilder des Peptids yrrpff

Um die Bindung des stabilisierten Derivates yrrpff *in vivo* zu testen, wurden Aufnahmen mit einer  $\gamma$ -Kamera gemacht. Hierzu wurde das Peptid zunächst mit  $^{131}\text{I}$  markiert, einer narkotisierten A431 Tumor tragenden Nacktmaus (Balb/c nu/nu) i.v. appliziert und mittels  $\gamma$ -Kamera gemessen.

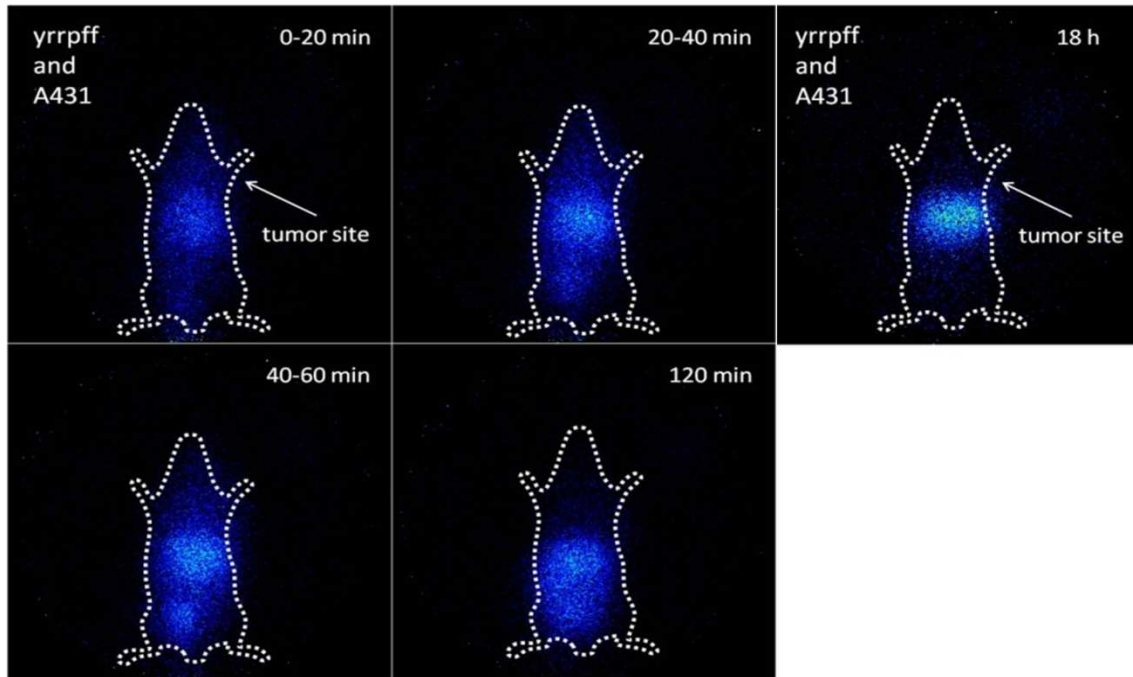


Abbildung 31:  $\gamma$ -Kameraaufnahmen einer A431-Tumor tragenden Balb/c nu/nu Maus.  $^{131}\text{I}$ -yrrpff wurde i.v. appliziert und Bilder nach 20, 40, 60 und 120 min sowie 18h aufgenommen. Bilder bis 120 min entstanden durch Überlagerung von Einzelaufnahmen in den entsprechenden angegebenen Zeiträumen.

A431 wurden auf der Seite [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org) als CD276 positiv (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000103855>) sowie PDGFRbeta positiv (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000113721>) bewertet. Die Maus blieb über einen Zeitraum von 120 Minuten narkotisiert. Im Verlauf der Zeit werden Aufnahmen zu den Zeitpunkten 20 Minuten, 40 Minuten, 60 Minuten und 120 Minuten gemacht. Eine abschließende Aufnahme wurde nach 18h durchgeführt. Abbildung 32 zeigt die Bilder der  $\gamma$ -Kameraaufnahmen des Peptids  $^{131}\text{I}$ -yrrpff. Auch nach 18 h konnte keine Aufnahme in den an der Flanke lokalisierten Tumor beobachtet werden. Das Peptid akkumulierte größtenteils in der Leber und wurde durch den Darm ausgeschieden.

## 6 Diskussion

Das erste synthetische Peptid wurde vor über einem Jahrhundert von Emil Fischer hergestellt. Zu medizinischen Zwecken wurden synthetische Peptide aber erst nach dem Zweiten Weltkrieg in den 40er Jahren eingesetzt. Seit der Einführung der Festphasensynthese in den 60er Jahren, mit der es weit schneller möglich war, Peptide herzustellen, wurde auch an eine Applikation in der Medizin gedacht [104, 105]. Seit dieser Zeit haben sich Peptide als Wirkstoffe und Wirkstofftransporter durchgesetzt, auch wenn sie die allgemein häufiger eingesetzten Antikörper bisher nicht verdrängt haben [106]. Ursache hierfür ist, dass Peptide, wie bereits erwähnt, Nachteile gegenüber größeren Molekülen wie Antikörpern und Antikörperfragmenten haben. Vor allem lineare Peptide sind oft sehr instabil und für den Einsatz *in vivo* nicht geeignet. Häufig werden sie im Serum durch Proteasen degradiert und schnell aus dem Körper ausgeschieden, was eine spezifische Anreicherung im Zielgewebe nicht möglich macht oder aber eine Bindung an die Zielstrukturen verhindert. Die Zirkulation von Peptidfragmenten im Blut kann dann im Gegensatz zur üblicherweise schnellen, renalen Ausscheidung von Peptiden zu einem erhöhten Hintergrund in der Bildgebung führen [107]. Ein weiterer Aspekt ist, dass Peptide oft  $IC_{50}$  Werte im  $\mu M$  Bereich aufweisen.  $IC_{50}$  Werte von Antikörpern liegen normalerweise im nM Bereich, bestenfalls sogar pM. Dennoch gibt es Beispiele von Peptiden wie das Octreotid und das RGD-Motiv, welche an Rezeptoren im nanomolarem Bereich binden und bereits erfolgreich zu klinischen Zwecken eingesetzt werden [97, 103].

Peptide haben dennoch entscheidende Vorteile gegenüber großen Molekülen. Sie können aufgrund ihrer Größe leicht und kostengünstig hergestellt werden. Modifikationen zur Affinitätsverbesserung sowie Erhöhung der Serumstabilität lassen sich relativ leicht durchführen [108, 109]. Auch zeigen sie eine deutlich geringere bis gänzlich fehlende Immunreaktion. Raveh *et al.* konnten zeigen, dass lineare flexible Peptide in der Natur oft Interaktionspartner von Rezeptoren sind [101]. Auch Neduvah *et al.* demonstrieren die Eignung von kurzen linearen Peptiden als Rezeptorliganden [110]. Durch ihre geringe Größe und flexible Struktur sind sie sehr kurzen Sequenzen wie z.B. Transkriptionsfaktoren sowie miRNAs ähnlich, welche natürlicherweise an Rezeptoren und Proteinen binden [111, 112].

## 6.1 CD276.11

Die Sequenz des Peptides CD276.11 wurde nach vier Panning-Runden mit einer linearen 12-mer Peptid-Bibliothek von NEB im Phage Display identifiziert. Um das Peptid hinsichtlich der Affinität zu Zellen zu testen, wurde es chemisch synthetisch hergestellt und mit  $^{125}\text{I}$  markiert. Zellexperimente wurden zunächst auf fünf Zelllinien mit unterschiedlicher CD276-Expression durchgeführt: PC-3 und MCF-7 mit hoher CD276 Expression sowie DU-145, MiaPaCa-1 und NCI-H661 mit geringer CD276 Expression. Kinetikexperimente des radiomarkierten Peptids auf Zellen zeigten, dass die Bindung des Peptids mit der Expressionsstärke korreliert. Auf den beiden stark exprimierenden Linien war eine Bindung nachweisbar, während auf gering CD276 exprimierenden Linien eine Affinität im Bereich der Plastikbindung zu sehen war. Als Positiv- und Negativlinie wurden basierend auf den Western Blot Analysen der Membranfraktionen die Tumorzelllinien PC-3 und DU-145 in nachfolgenden Experimenten verwendet. Eine Kinetik über 8 Stunden zeigte deutlich, dass auf der Positivlinie PC-3 eine steigende Bindung bis etwa 3,5% Bindung pro Dosis und 1 Millionen Zellen erreicht wurde, für DU-145 Zellen aber keine signifikante Bindung sichtbar war. Auch die Kompetitionsversuche von  $^{125}\text{I}$ -markiertem Peptid mit nicht markiertem Peptid sprachen für eine spezifische Bindung. Mit steigender Konkurrentkonzentration sank die nachweisbare Bindung des radioaktiven Peptids. Die Zellbindung konnte nicht durch zufällig gewählte Kontrollpeptide PDGFR-P1, CalX-P1 sowie TATE inhibiert werden. Der berechnete  $\text{IC}_{50}$  Wert lag bei 750 nM, was einer moderaten Spezifität für Peptide entspricht. Internalisierungsexperimente zeigten, dass das Peptid in PC-3 Zellen aufgenommen wurde. Nach 8 Stunden konnten etwa 87% der Gesamtaktivität in Zellen nachgewiesen werden. Die Analyse in humanem Serum ergab jedoch, dass bereits nach fünf Minuten Inkubation eine Degradierung durch Serumproteasen stattfand. Der entstandene Metabolit war über den Zeitraum von 8 Stunden stabil, es konnten keine weiteren Nebenprodukte nachgewiesen werden. Da die Bindung des Peptids auch im Zellversuch nach dem ersten Messwert -zehn Minuten- anstieg, wurde zunächst ein Zusammenhang zwischen der Entstehung des Metaboliten und der Bindung an Zellen vermutet. Da der Metabolit aber eine hohe Halbwertszeit zeigte, also sehr stabil war, wurden im nächsten Schritt Tierversuche unternommen. Nacktmäusen wurden subkutan PC-3 Zellen in die Flanke injiziert. Nach Anwachsen der Tumoren wurde  $^{131}\text{I}$ -markiertes CD276.11 intravenös in die Schwanzvene appliziert. Zu den Zeitpunkten 10, 60 und

120 Minuten wurden die Mäuse euthanisiert, Organe entnommen und die prozentuale Aktivität pro Gramm bestimmt. Deutlich war der rasche Abfall der Aktivität von zehn auf 120 Minuten in allen Organen sowie dem Blut. Auch im Tumor sank die Menge an gemessenem Peptid. Trotz der raschen Auswaschung zeigen die Tumor/ Organ Ratios für fast alle Organe einen Wert über 1 was einer Tumorakkumulation des Peptids entspricht. Nur Lunge, Milz und Nieren zeigten Werte unter 1. Die hohe Anreicherung in den Nieren lässt sich durch die renale Ausscheidung des Peptids erklären. Die Milz ist ein Organ des Immunsystems. Da CD276 in Zusammenhang mit der Immunantwort steht und vor allem auf Immunzellen wie Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert wird [113], lässt sich hier eine Akkumulation erklären. Auch nicht tumoröses Lungengewebe zeigte bei histochemischen Analysen eine CD276 Expression (Human Protein Atlas), was eine Anreicherung auch in gesundem Lungengewebe verursachen könnte.

Um die Bindeeigenschaften des Originalpeptids zu verbessern, wurde ein Peptid-Array durchgeführt. Der Austausch einzelner Aminosäurepositionen durch alle 20 natürlichen Aminosäuren sollte zu einer Aufklärung der Bindestelle sowie verbesserter Bindungsaffinität führen. Insgesamt wurden 288 Peptide auf einen mit Cellulose beschichteten Objektträger (CelluSpot™) gespottet. Zudem wurden Fragmente des Peptids CD276.11 immobilisiert um die minimale Bindesequenz zu ermitteln. Der CelluSpot™ wurde anschließend mit dem Targetprotein CD276 inkubiert und mit einem anti-CD276 Antikörper detektiert. Auffallend war, dass alle Spots insgesamt niedrige Intensitäten zeigten. Ein Problem könnte hier das ungleichmäßige Spotten sein, da auch die Originalpeptide keine deutliche Bindung an die extrazelluläre Domäne von CD276 zeigten. Zur Evaluation wurden die Spots G12 und I8 ausgewählt, da diese mit bloßem Auge eine eindeutig höhere Bindung zeigten. Die Auswertung mittels Software war hier nicht nötig. Markiert mit <sup>125</sup>I zeigten beide Peptide im Kinetikexperiment auf PC-3 Zellen aber im Vergleich zum Originalpeptid keine verbesserten Bindeaffinitäten. Ein möglicher Grund könnte auch hier ungleichmäßiges Spotten mit variierenden Peptidmengen auf den unterschiedlichen Spots sein. Eventuell war genau an Spot G12 eine deutlich höhere Peptidmenge immobilisiert worden. Ein weiteres Indiz dafür ist, dass bei CelluSpots™ eines anderen in der Gruppe identifizierten Peptids auch der Spot G12 als bessere Binder identifiziert wurde, der aber im Zellversuch nicht bestätigt werden konnte.

Der nächste Schritt war die Identifizierung des Metaboliten. Durch eine Fragmentanalyse sollte geklärt werden, aus welchen minimal nötigen Aminosäuren der Metabolit bestand und an welcher Stelle das Originalpeptid möglicherweise durch Proteasen gespaltet wurde. Es wurden Fragmente der Länge 6 bis 8 Aminosäuren chemisch, synthetisch hergestellt, die das komplette CD276.11 Peptid abdeckten. Versuche mit radiomarkierten Fragmenten auf PC-3 Zellen machten deutlich, dass der mittlere Teil des Peptids für die Bindung an Zellen verantwortlich ist. Als minimale Sequenz wurden die Positionen 5 bis 8 identifiziert. Fehlte eine der Positionen, führte dies zum Verlust der Bindung. Diese Ergebnisse wurden auch im Alanin-Scan des Fragments CD276.11 5-10 bestätigt. Auch der D- und Methyl-Aminosäure-Scan des Fragments CD276.11 3-10 brachte ähnliche Ergebnisse. Wurden die Positionen <sup>9</sup>D und <sup>10</sup>W ausgetauscht blieben die Bindungseigenschaften des Fragments erhalten. Der Austausch der Aminosäuren <sup>5</sup>Y, <sup>6</sup>N und <sup>7</sup>K führte zum Bindungsverlust. Auffallend bei allen Fragment-Scans war, dass der Austausch der Aminosäureposition <sup>5</sup>Y zu einem starken Abfall der Bindung führte. Deutlich zu sehen war dies im Alanin-Scan des Fragments CD276.11 5-10. Dies führte zur Vermutung, dass der entstandene Metabolit ein Tyrosinrest oder ein Tyrosinrest verbunden mit einzelnen Aminosäuren sein könnte. Zur weiteren Analyse wurde der Metabolit durch Inkubation großer Mengen des Originalpeptids in humanem Serum und anschließender Fällung der Serumproteine gewonnen. Durch HPLC Analysen mit <sup>125</sup>I markiertem Tyrosin, dem Metaboliten sowie Fragmenten des Peptids CD276.11 sollte nun geklärt werden, um welche Sequenz es sich bei dem Metaboliten handelte. HPLC Daten zeigten, dass der Metabolit mit der gleichen Retentionszeit wie der Tyrosinrest von etwa 5,6 Minuten lief. Auch der Vergleich des Metaboliten, entstanden aus dem Originalpeptid, sowie dem Fragment 5-11 ergaben den gleichen Peak wie Tyrosin. Die Ergebnisse sollten in weiterführenden Schritten in Zell basierten Assays näher untersucht werden. Auch hier wurden das Originalpeptid, der Metabolit und Tyrosin mit <sup>125</sup>I markiert und auf PC-3 Zellen sowie DU-145 Zellen in Kinetikstudien getestet. Hier zeigte sich eine deutlich höhere Bindung von Tyrosin an PC-3 Zellen verglichen mit dem Originalpeptid. Tyrosin band auch an die DU-145 Zellen mit etwa 1,4%, das Originalpeptid zeigte keine Bindung an DU-145 Zellen. Die Kinetik des Metaboliten verlief ähnlich der des markierten Tyrosins. Vorversuche zeigten bereits die Internalisierung des Peptids. Um einer Verfälschung der Ergebnisse durch eventuelle Tyrosinaufnahme sowie eine Zellschädigung

vorzubeugen, wurden kurze Kinetiken in PBS/0,1% BSA als Assaypuffer durchgeführt. Der Metabolit und das Tyrosin zeigten hier den gleichen Kinetikverlauf – beide banden mit etwa der gleichen Affinität an PC-3 und DU-145 Zellen, welche im Verlauf von zehn auf 60 Minuten rapide abfiel. Unterschied war nur die quantitative Menge der Bindung. Tyrosin band mit etwa 20%, der Metabolit nur mit 5 bis 7% der Dosis auf 1 Million Zellen. Ein weiterer Versuch auf PC-3 und DU-145 Zellen sollte Aufschluss über die tatsächlich gemessene Aktivität geben. Parallel zu einem Kinetikexperiment in PBS wurden zu allen Testzeitpunkten Proben des Zellkulturüberstandes genommen und via HPLC analysiert. Auch hier entstand bereits nach zehn Minuten der Metabolit auf PC-3 Zellen nicht aber auf DU-145 Zellen. Die Formation des Metaboliten konnte auch durch die zusätzliche Gabe eines Proteaseinhibitors in das PBS-Assay-Medium nicht unterbunden werden. Die Annahme, dass es sich bei dem Metaboliten tatsächlich um Tyrosin handele, war durch ein weiteres Experiment zu überprüfen. Die Bindung von radiomarkiertem CD276.11 sollte mit unmarkiertem Tyrosin in unterschiedlichen Konzentrationen inhibiert werden. Dies war möglich, nicht aber die Inhibition von radiomarkiertem Tyrosin durch kaltes CD276.11. Weiterhin wurde der Versuch unternommen, den Aminosäuretransporter LAT-1 zu hemmen. Dieser ist für die Aufnahme von Tyrosin in die Zelle verantwortlich [114, 115]. Das Aminosäureanalogon BCH inhibiert die Aufnahme, indem es natürliche Substrate der Aminosäuren nachahmt und somit deren Aufnahme blockiert [116, 117]. Im Zellversuch zeigte sich, dass radioaktiv markiertes Peptid auf CD276 exprimierenden Zellen NCI-H661, MCF-7 und VCap mit unterschiedlichen Affinitäten band. Die Bindung konnte durch Zugabe von 0,1 mM BCH inhibiert werden, was für eine Aufnahme des entstehenden Metaboliten durch das Transportsystem LAT sprach.

Da das Peptid nur eine sehr kurze Halbwertszeit im Serum zeigte und dann vermutlich zu Tyrosin abgebaut wurde, sollte das Peptid durch verschiedene Strategien stabilisiert werden. Die Stabilität eines Peptids kann durch den Austausch von Aminosäuren durch D-Aminosäuren sowie methylierte Aminosäuren verbessert werden. Endogene Peptidasen erkennen nur die natürlich vorkommenden L-Aminosäuren und Schnittstellen werden somit nicht mehr erkannt. Auch die Modifikation von N- und C-Termini z.B. Azetylierung führt oft zu verbesserter Stabilität. Auch Zyklisierungen, die ebenfalls die Termini schützen, erhöhen die Peptidstabilität [118]. Alle angewandten Stabilisierungsstrategien führten zu einem



erheblichen Bindungsverlust, so dass die Ermittlung der Stabilität irrelevant wurde. Eine andere Strategie war die Kopplung mit DOTA. Diese eignet sich vor allem für PET-Studien, da hier Peptide mit  $^{68}\text{Ga}$  markiert werden können. Chelatoren wie DOTA führen oft ebenfalls zu einer erhöhten Peptidstabilität, da sie ein Ende des Peptids modifizieren. Mier *et al.* konnten zeigen, dass bei dem Peptid FROPDOTA positive Effekte auf die Affinität und Bioverteilung nach der Modifikation mit DOTA auftraten [108, 109]. Die Modifikation des CD276.11 Peptids mit DOTA sollte sich ebenfalls positiv auf die Bindeigenschaften auswirken, führte aber zum totalen Bindungsverlust. Auch die Markierung mit Maleimid, durch welche die Markierung am Tyrosin nicht mehr nötig war, schlug fehl. Grundgedanke war hier, dass das in der Aminosäuresequenz enthaltene Tyrosin an der Bindung in erheblichem Maße beteiligt ist. Eine Markierung an anderer Stelle sollte zum einen Stabilität, zum anderen aber auch ein freies Tyrosin schaffen. Dieser Gedanke war auch bei dem Austausch der Versionen mit 3-Tyrosin sowie Thyroxin Hintergrund, aber auch diese führten zu Peptiden ohne Bindung bzw. einer unspezifischen Bindung an Zellen. Auch der Einbau in die Miniprotein-Scaffoldstruktur SFTI ließ die Bindeaffinität erheblich sinken. Scaffoldstrukturen sind Gerüststrukturen, die der Erhöhung der Stabilität von Peptiden dienen. Durch Austausch einer Schleife des ursprünglichen Gerüsts mit einer Peptidsequenz entsteht ein Fusionspeptid, welches eine Halbwertszeit von bis zu 76 Stunden aufweisen kann [94]. Zudem fixiert es die eingebaute Peptidsequenz in eine Struktur, die im besten Fall nötig für die Targetaffinität ist und im ungünstigsten Fall eine Bindung verhindert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass jegliche Modifikation zu einem Bindungsverlust des Peptids führte. Die Fusion mit funktionellen Gruppen, Zyklisierung, Einbau in Miniprotein-Scaffolds und Markierungen mit DOTA und  $^{177}\text{Lu}$  führten zum Affinitätsverlust. Durch verschiedene Zell basierte Versuche konnte gezeigt werden, dass der auf Zellen sowie im humanen Serum entstehende Metabolit ein Tyrosinrest mit Markierung war. Versuche zur Affinitätsverbesserung mittels Peptid-Arrays brachten keine Verbesserung der Bindungseigenschaften. Von Bayer Schering durchgeführte Bindungskinetiken auf CD276 positiven Zellen zeigten aber, dass das Peptid CD276.11 im Zeitverlauf von etwa zehn bis 20 Minuten im PBS/0,1% BSA stabil blieb. Auch hier zeigte sich eine Bindung. Vermutet wurde jetzt, dass das Peptid zwar relativ schnell abgebaut wurde, aber dennoch eine Bindungskapazität für das 12 mer an CD276 vorhanden ist. Auch spricht dafür die

Methode des Pannings, bei der keine humanen Zellen sowie Proteasen beteiligt sind. Auch hier wurde das Peptid als Binder für die extrazelluläre Domäne isoliert. Da kein Abbau stattfand, konnte sich das Peptid in mehreren Runden anreichern und gegenüber anderen potentiellen Bindern behaupten. Ziel sollte es in nächsten Schritten nun sein, das Peptid mit weiteren Schritten zu stabilisieren. Weitere Möglichkeiten der Stabilitätsverbesserung und Affinitätsverbesserung sind PEGylierungen, Glycosylierungen sowie Multimerisierung über Lysinlinker. Multimerisierungen dienen neben der Erhöhung der Stabilität natürlich vor allem der Verbesserung der Bindungskapazität. Durch Verlinkung von mehreren Peptideinheiten zu einem Molekül können mehrere Rezeptoren gleichzeitig gebunden werden. Auch ist der Transport von mehr gebundenem Wirkstoff wie Radionukliden oder Chemoterapeutika pro Molekül zum Zielort möglich. Weiterhin ergibt sich aus der Größe ein verbesserter EPR-Effekt (erhöhte Retentions und Permeabilitätszeit) was zu einer längeren Akkumulation im Zielgewebe führt [119].

## **6.2 PDGFR-P1**

Zielsetzung der Arbeit war es, das Peptid PDGFR-P1 hinsichtlich der Affinität zu den Zielstrukturen CD276 und PDGFR $\beta$  zu untersuchen. Hierzu sollten zwei Fragestellungen angegangen werden: zum einen die Untersuchung der Affinität zu den Zielstrukturen PDGFR $\beta$  und CD276 und zum anderen die Optimierung des Peptids in Bezug auf Serumstabilität sowie Spezifität. Eine IC<sub>50</sub> Bestimmung des Originalpeptids von Askoxylakis *et al.* zeigte einen Wert von 1,4  $\mu$ M [101]. Die Halbwertszeit in humanem Serum des Originalpeptids lag bei vier Minuten. Diese Werte galt es zu verbessern. Mithilfe von Peptid-Arrays sollte geklärt werden, ob PDGFR-P1 an die extrazellulären Domänen der beiden Zielstrukturen bindet und ob die Aminosäuresequenz innerhalb des 12mers unterschiedliche Bindungssequenzen für PDGFR und CD276 aufweist. Peptid-Arrays stellen eine kosten- sowie zeitgünstige Alternative zu Fragment- und Aminosäureaustauschexperimenten dar. In einem Versuch ist es möglich, hunderte verschiedene Peptide gleichzeitig zu testen, was einen Vergleich der Ergebnisse untereinander einfacher und repräsentativer macht. Durch Spotten von Peptiden auf Cellulose beschichtete Glasobjektträger ist es zudem möglich, auch niedrig affine Bindungen zwischen Proteinen und Peptid nachzuweisen. Dies ist durch kovalent an Cellulosefasern gebundene Peptide möglich, was eine bis zu 1000-fach höhere Konzentration des

gespoteten Peptids an einem Ort ermöglicht. Der Aufbau des PDGFR-P1 Peptid-Arrays wurde nach folgendem Schema durchgeführt: jede Aminosäure des Dodekapeptids wurde durch alle 20 natürlichen Aminosäuren ausgetauscht. Zusätzlich wurden Fragmente des Peptids der Länge 4 bis 11 Aminosäuren gespotet. Jeder Objektträger wurde mit insgesamt 288 Peptiden versehen, die in Duplexen angeordnet auf den Untergrund gebunden wurden. Mit Hilfe dieser Peptid-Arrays war es jetzt möglich, verschiedene rekombinant hergestellte, extrazelluläre Domänen von Proteinen mit dem Originalpeptid sowie hunderten Derivaten zu inkubieren und die Bindung zu veranschaulichen. Neben dem Nachweis der Targetaffinität konnte zu dem durch Einzelaminosäureaustausch sowie Fragment-Scans die minimale Bindungssequenz und funktionellen Gruppen [120, 121] bestimmt werden. Ergebnisse der Peptid-Arrays zeigten bei beiden Zielstrukturen ein gleiches Bindungsmuster. Die Array-Ergebnisse demonstrierten eine Bindung der Originalpeptide an PDGFR $\beta$ , nicht aber an FGFR. Dies bestätigten die Ergebnisse der von Askoxylakis *et al.* vorausgegangenen Versuche mit radioaktiv markiertem Peptid auf an maxisorp Platten gebundenes PDGFR $\beta$  [101] und bestärkte die Vermutung der Targetaffinität. Die Ergebnisse zeigten aber ebenfalls das gleiche Muster bei der Zielstruktur CD276. Erwartet wurde hier eine andere Bindestelle, da die Zielstrukturen sich nicht in der Aminosäuresequenz der extrazellulären Domänen gleichen. Die vorausgegangene Vermutung zweier Motive im Peptid war damit hinfällig. Möglich wäre jetzt die Formation einer ähnlichen Bindungstasche in der extrazellulären Domäne beider Zielstrukturen bedingt durch die 3D-Faltung und Struktur der Proteindomänen. Es ist bekannt, dass Proteine mit WW-Domänen bevorzugt Peptide mit Prolin-reichen Sequenzen binden [122]. Das Original- sowie das G2 Peptid beinhalten jeweils 5 Proline in einer 12 Aminosäuresequenz. Davey *et al.* zeigten, dass Proteine, die keine oder nur geringe Ähnlichkeiten in der Primärstruktur haben, aber ähnliche Aufgaben in der Zelle übernehmen, gleiche kurze Bindungsmotive enthalten, sogenannte SLiMs (Short linear Motifs). Die Mehrheit der SLiMs ist etwa drei bis zehn Aminosäuren lang und besteht oft aus mehrfachen variablen Aminosäureresten, was es schwer macht, diese als Motive basierend auf der Aminosäuresequenz eines Proteins zu identifizieren [123]. Stein *et al.* ist es zudem gelungen durch Erstellung einer 3D-Struktur die potentiellen Bindedomänen von Protein-Protein bzw. Protein-Peptid Interaktionen darzustellen. Hier können Bindetaschen und Bindedomänen – DMIs (Domain-Motif Interactions)-,

die durch die Primärstruktur erkenntlich sind, dargestellt werden. Durch Auffinden von Taschen und Darstellung der 3D-Struktur können mögliche Interaktionen per Computer simuliert werden [124]. Möglich wäre also, dass die Zielstrukturen CD276 und PDGFR $\beta$  über eine gleiche Bindetasche bzw. ein gleiches Bindemotiv verfügen, welches für die Affinität des Peptids PDGFR-P1 verantwortlich ist.

Der Austausch einzelner Aminosäuren sowie das Spotten von Fragmenten diene der Aufklärung der Bindungsstelle des Peptides an die Zielstrukturen. Da beide Proteine das gleiche Bindungsmuster im Peptid-Array aufwiesen, dieses aber nicht an FGFR gezeigt werden konnte, wurde davon ausgegangen, dass das Peptid an beide Zielstrukturen mit der gleichen Stelle spezifisch bindet. Nicht nur das Muster der Bindung zwischen den beiden Zielstrukturen war gleich, auch die Spotintensität zeigte das gleiche Muster. Die Auswertung der Daten ergab, dass die Aminosäuren  $^8\text{R}$ ,  $^9\text{P}$ ,  $^{10}\text{F}$  und  $^{11}\text{F}$  unabdingbar für die Targetbindung an beide Proteine waren. Der Ersatz dieser Aminosäuren führte bei allen Austauschen zu einem starken Bindungsverlust. Die Aminosäurepositionen  $^5\text{P}$ ,  $^6\text{P}$  und  $^7\text{S}$  schienen ebenfalls relevant für die Bindung der Zielstrukturen zu sein, da der Austausch hier zu Peptiden mit niedrigerer Affinität verglichen zum Originalpeptid führte. Auch der Austausch von  $^4\text{P}$  und  $^{12}\text{K}$  resultierte in einer geringeren Bindungsstärke. Die Positionen 1-3:  $^1\text{I}$ ,  $^2\text{P}$  und  $^3\text{L}$  schienen nicht wichtig für die Targetaffinität zu sein. Hier war es möglich, die Positionen durch alle 20 Aminosäuren zu ersetzen, ohne einen Einfluss auf das Bindungsverhalten. Neben der Ermittlung der minimalen Bindesequenz konnte aber auch die Steigerung bzw. Abschwächung der Bindungsaffinität zu den Zielstrukturen sichtbar gemacht werden. Einzelne Modifikationen führten zu einer gesteigerten Targetaffinität, so z.B. der Austausch von  $^7\text{S}$  durch R, G oder H.

Um die Ergebnisse des Peptid-Arrays auch *in vitro* zu verifizieren, wurden Zellbasierte Studien auf der Zelllinie BxPC-3 durchgeführt. Diese exprimiert sowohl CD276 als auch PDGFR $\beta$ . Peptide wurden mit einem N-terminalen D-Tyrosin versehen und mit  $^{125}\text{I}$  radioaktiv markiert. Da das Originalpeptid C-terminal ein L-Tyrosin zur Markierung trug, sollte zunächst geklärt werden, wie sich unterschiedlichen Konformationen sowie der Ort des Tyrosin auf die Bindungseigenschaften des Peptids auswirkten. Ein Vorversuch zeigte, dass das Bindungsverhalten durch den Ersatz eines C-terminalen L-Tyrosins durch ein N-terminales D-Tyrosin nicht signifikant verändert wurde. Zu Stabilitätszwecken wurden

deshalb alle Derivate N-terminal mit einem zusätzlichen D-Tyrosin hergestellt, welches zum Markieren mit  $^{125}\text{I}$  verwendet wurde. *In vitro* Kinetikexperimente zeigten die höchste Bindungsaffinität für das Derivat yG2 und die niedrigste für yK1, was die Ergebnisse des Peptid-Arrays bestätigt. Konkurrenzexperimente zeigten, dass radiomarkiertes yG2 durch unmarkiertes Peptid inhibiert werden konnte, nicht aber durch andere Kontrollpeptide. Der  $\text{IC}_{50}$  Wert des Peptids yG2 konnte im Vergleich zum Originalpeptid mit 1400 nM auf 480 nM gesenkt werden. Die Konkurrenz des  $^{125}\text{I}$  markierten yG2 mit dem unmarkierten Originalpeptid konnte ein  $\text{IC}_{50}$  von 7600 nM errechnet werden. Beide Werte sprechen für eine höhere Spezifität des Derivates G2 gegenüber dem Originalpeptid. Internalisierungsexperimente zeigten, dass das Peptid yG2 in BxPC-3 Zellen aufgenommen wurde. Die Eigenschaft der Aufnahme in Tumorzellen ging durch Austausch der Aminosäure  $^7\text{S}$  zu R nicht verloren.

Neben der Steigerung der Affinität, sollte auch die minimal nötige Bindesequenz ermittelt werden. Durch das Spotten von Fragmenten zeigte sich ein Muster, welches die Hypothese der Wichtigkeit der Aminosäuren  $^7\text{S}$ ,  $^8\text{R}$ ,  $^9\text{P}$ ,  $^{10}\text{F}$  und  $^{11}\text{F}$  bestätigt. Alle Fragmente, welche diese minimale Aminosäuresequenz enthielten, zeigten auch die gleichen Bindungseigenschaften wie das Originalpeptid. Fehlten eine oder mehrere Aminosäuren, führte dies zum Verlust der Bindungsaffinität. Da bereits das Derivat yG2 eine höhere Spotintensität sowie eine gesteigerte Bindung an Zellen zeigte, wurde im nachfolgenden das Fragment yAV2 (yRRPFF) chemisch synthetisch hergestellt, mit  $^{125}\text{I}$  markiert und ebenfalls auf BxPC-3 Zellen im Vergleich zum Originalpeptid getestet. Das Fragment besteht aus der minimalen Bindesequenz ( $^8\text{R}^9\text{P}^{10}\text{F}^{11}\text{F}$ ) sowie dem durch Arginin ersetzten Serin an Position 7. Analog zum Fragment AV1 ( $^7\text{S}^8\text{R}^9\text{P}^{10}\text{F}^{11}\text{F}$ ), welches die gleiche Spotintensität wie das Originalpeptid zeigte, sind auch bei dem Fragment AV2 und G2 gleiche Bindungseigenschaften *in vitro* zu sehen. Konkurrenzversuche des  $^{125}\text{I}$ -markierten AV2 zeigten außerdem auch eine erhöhte Spezifität gegenüber dem Originalpeptid mit einem  $\text{IC}_{50}$  Wert von 580 nM.

Serumstabilitätsstudien des Derivates G2 sowie des Fragments AV2 ergaben eine gesteigerte Halbwertszeit von 120 Minuten für das Peptid G2. Die Halbwertszeit des Fragments AV2 war mit fünf Minuten vergleichbar mit der Stabilität des Originalpeptids [101]. Da das Derivat G2 eine moderate Halbwertszeit von 120 Minuten aufwies, wurden im nächsten Schritt Tierversuche unternommen. Nacktmäusen wurden subkutan BxPC-3 Zellen gespritzt. Nach Anwachsen des

Tumors wurde eine Organverteilungsstudie zu den Zeitpunkten fünf, 15 und 60 Minuten nach Injektion des Tracers durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass im Tumor keine Anreicherung des mit  $^{131}\text{I}$  markieren  $\gamma\text{G2}$  zu sehen war. Lediglich im Dünndarm zeigte sich eine Akkumulation, die nach 60 Minuten Zirkulation des Peptids bei 8,8% ID/g lag. In immunhistochemischen Versuchen konnte bei nicht entartetem Material aus dem Verdauungstrakt eine hohe CD276 Expression gezeigt werden. Auch eine PDGFR $\beta$  Expression war bei 18% der Proben nachzuweisen, was die Akkumulation des Peptids im Dünndarm erklären könnte.

Um die Halbwertszeit des Fragments AV2 im humanen Serum zu verbessern, wurde ein D- und Methyl- Aminosäure-Scan durchgeführt. Hier zeigte sich, dass der Austausch einzelner L-Aminosäuren durch D-Aminosäuren sogar zu einer Steigerung der Bindungsaffinität an BxPC-3 Zellen führte. Das Fragment AV2 zeigte eine Bindung von etwa 40%, die Derivate eine Bindung von 53 bis 70% der Dosis auf 1 Mio. Zellen. Der Austausch der Positionen  $^7\text{R}$  im Methylscan führte ebenfalls zu einer verbesserten Bindung an BxPC-3 Zellen. Wurde Position  $^{10}\text{F}$  durch ein methyliertes Phenylalanin ersetzt, sank die Bindung auf 30%. Der Austausch der Positionen  $^8\text{R}$ ,  $^9\text{P}$  und  $^{11}\text{F}$  dagegen hatte keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Fragments AV2. Basierend auf diesen Ergebnissen, wurde der Versuch unternommen, die komplette Sequenz des Peptids mit D-AS zu ersetzen (AV3). Als Kontrolle wurde zudem ein Peptid mit der Sequenz ffprry hergestellt (=AV4). Diese wurden am Tyrosin mit  $^{125}\text{I}$  markiert und ebenfalls auf BxPC-3 Zellen auf Bindungseigenschaften untersucht. Hier zeigte sich, dass beide Varianten mit einer Bindung von 23% für AV4 und 17% für AV3 eine deutlich geringere Affinität als das Fragment AV2 aufwiesen. Erwartet wurde keine Bindung für das Fragment AV4, da es nicht die identifizierte minimale Bindungssequenz aufwies. Eine Hypothese wäre, dass eine Bindung an beide Zielstrukturen durch die Ladung des Peptids zustande kommt. Das Originalpeptid PDGFR-P1 und seine Derivate enthalten die minimale Bindesequenz  $^7\text{S}^8\text{R}^9\text{P}^{10}\text{F}^{11}\text{F}$ . Die Aminosäure Arginin ist basisch und bei neutralem pH positiv geladen. Prolin und Phenylalanin sind unpolar und hydrophob. Denkbar wäre eine Bindung des basischen Peptids an saure Bereiche der Targetproteine oder hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren Prolin, Phenylalanin und den Proteinen CD276 und PDGFR $\beta$ . Die mögliche Bindung des Fragments AV1 durch eine positive Ladung wird durch die Tatsache gestützt, dass das Fragment AV2 mit der Sequenz  $^7\text{R}^8\text{R}^9\text{P}^{10}\text{F}^{11}\text{F}$  durch den Austausch von polarem aber

neutralem Serin zu basischen Arginin die Bindungsaffinität des Fragments erheblich erhöht. Der Austausch des Arginins durch ein methyliertes Arginin führte zu einem Bindungsverlust von etwa 25% gegenüber dem Fragment AV2. Die zusätzliche Methylgruppe könnte die Ladung des Arginins stören und somit zur niedrigeren Bindungsaffinität führen. Eine Szintigraphie nach Injektion des radioaktiv markierten Peptids ffpryy in eine BxPC-3 Tumor tragende Maus zeigte keine Anreicherung des Peptids im Tumor. Die Aktivität akkumulierte hauptsächlich in der Leber.

Das Problem der geringen Serumstabilität des Fragments AV2 könnte durch Einbau in ein Miniprotein-Scaffold zur Verbesserung der Halbwertszeit im Serum behoben werden [39, 97]. Auch der Austausch einzelner Aminosäuren durch D-Aminosäuren ist möglich, da schon gezeigt wurde, dass dieser einen eher positiven Effekt auf die Bindungseigenschaften des Peptids hatten. Hier müsste eine weitere Evaluation der Derivate *in vitro* sowie *in vivo* erfolgen.

Grundsätzlich ist die Verwendung von Peptid-Arrays zur Identifizierung der für die Bindung relevanten Aminosäuren und zur Optimierung der Bindeeigenschaften von Peptiden eine schnelle und kostengünstige Alternative zu Fragment- und Aminosäure-Austausch-Scans. Verschiedene Targetproteine können mit einer großen Zahl an Peptiden inkubiert werden, was eine Vergleichbarkeit der Daten erlaubt, welche so in Zell basierten Assays nicht möglich ist. Der Gebrauch von Peptid-Arrays hat aber auch Nachteile. Das Spotten auf einen planaren Untergrund, trotz Beschichtung mit Cellulose, könnte die Konfiguration der Peptide erheblich beeinflussen. Eine Konformationsänderung hätte eine Verringerung der Targetaffinität zur Folge. Weiterhin ist es aus technischen Gründen nicht möglich, die Peptidmenge eines Spots genau zu dosieren. Dies könnte ebenfalls dazu führen, dass die Spotintensität und das tatsächliche Bindevverhalten des Peptids *in vitro* und *in vivo* nicht korrelieren [125]. Ein weiteres Problem stellt die genaue Quantifizierung der Spotintensität durch die Chemolumineszenz Methode dar. Hier werden schon durch nur geringfügig verschiedene Belichtungszeiten sehr große Unterschiede in der späteren Spotintensität bemerkbar, was einen Vergleich mehrerer Objektträger untereinander nicht möglich macht. Deshalb ist es immer vonnöten, Resultate aus Peptid-Arrays weiter *in vitro* als auch *in vivo* in weiteren Assays zu überprüfen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Originalpeptid PDGFR-P1 im Bezug auf Spezifität und Serumstabilität durch die Anwendung der CelluSpot™ Technologie erheblich verbessert werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass das Peptid eine

Affinität zu CD276 und PDGFR $\beta$  hat, nicht aber zu FGFR. Weiterhin ist es gelungen, das Peptid auf eine minimal nötige Aminosäuresequenz zu kürzen und diese mittels Einbau von unnatürlichen Aminosäuren zu stabilisieren. Die CelluSpot™-Technologie stellt also eine gute Alternative zur Aufklärung von Peptid-Protein Interaktionen dar. *In vivo* Versuche mit dem G2 Derivat zeigten keine Anreicherung im Tumor. Hier muss durch z.B. den Einbau des Peptids in Miniprotein-Scaffolds noch an der Serumstabilität eine Verbesserung erzielt werden.



## 7 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, hoch affine Peptidbinder gegen die Zielstruktur CD276 zu identifizieren und anschließend zu charakterisieren. Hauptaugenmerk lag dabei auf zwei Projekten: der Charakterisierung des Peptids CD276.11 sowie die Evaluation des Peptids PDGFR-P1, welches sowohl PDGFR $\beta$  als auch CD276 bindet.

CD276.11 konnte umfassend untersucht werden. Durch verschiedene Experimente stellte sich heraus, dass das Peptid bei der Inkubation auf Zellen sowie im humanen Plasma degradiert wurde. Der Abbau durch Proteasen konnte auch durch umfangreiche Stabilisierungsstrategien nicht verhindert werden. Es zeigte sich aber, dass das Originalpeptid durchaus in der Lage war, Zellen mit CD276-Expression zu binden. Zukünftige Arbeiten sollten sich auf weitere Methoden zur Stabilisierung konzentrieren. Weiterhin muss geklärt werden, inwiefern es sich bei dem Abbauprodukt, dem Metaboliten, tatsächlich um ein wie angenommen freies, Tyrosin handelt. Dies könnte mit Massenspektrometrie untersucht werden. Hierfür sind allerdings große Mengen an reinem Metabolit nötig. Ein weiterer Ansatz wäre eine vergleichende HPLC Analyse mit freien  $^{125}\text{I}$  markierten Aminosäureresten. Im Vergleich mit allen 20 Aminosäuren könnte geklärt werden, ob es sich um ein freies Tyrosin oder etwa um Tyrosin mit weiteren gekoppelten Aminosäuren handelt.

Im zweiten Projekt wurde das Peptid PDGFR-P1 durch Peptid-Arrays in seiner Affinität zu CD276 und PDGFR $\beta$  exprimierenden Zellen verbessert. Mittels Austausch aller 12 Aminosäurepositionen sowie einer Fragmentanalyse konnte eine minimale Bindesequenz ermittelt werden und das Peptid durch einen Aminosäureaustausch von Serin zu Arginin an Position 7 in dessen Bindeeigenschaften erheblich optimiert werden. Ergebnisse des Peptid-Arrays konnten in Zellversuchen verifiziert werden. Im Gegensatz zum Originalpeptid band das modifizierte Peptid G2 sowie seine Kurzform AV2 etwa vierfach besser an BxPC-3 Zellen. Zusätzlich wurde durch den Aminosäureaustausch eine Verbesserung der Halbwertszeit von vier Minuten auf 120 Minuten erreicht. Diese konnte allerdings nicht für das Fragment AV2 bestätigt werden. Hier sollten sich zukünftige Arbeiten mit der Verbesserung der Stabilität befassen. Zum Beispiel könnte das kurze 5 Aminosäure lange Peptid in den SFTI oder Min23 Miniprotein-Scaffold integriert werden. Auch eine Multimerisierung zur weiteren Affinitätssteigerung wäre denkbar. Durch die Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften wäre auch eine weitere Charakterisierung im Tier denkbar, welche bisher an der zu geringen

Halbwertszeit gescheitert ist. Auch eine PEGylierung könnte zur Verbesserung der Pharmakokinetik führen, die neben der Erhöhung der Peptid-Stabilität eine längere *in vivo* Verweildauer und Tumoraufnahme bewirken kann. Auch die Kopplung mit einem Chelatormolekül oder zytotoxischen Reagenzien kann eine Änderung der *in vivo* Eigenschaften bewirken. Das Peptid G2 sowie seine verkürzte Version AV2 sind gute Ausgangstrukturen für weitere Verbesserungen des Originalpeptids PDGFR-P1. Weiterhin können die Daten des Peptid-Arrays auch Aufschluss über weitere Verbesserungsmöglichkeiten der Affinität geben und Ausgangspunkt für nachfolgende bzw. weitere Optimierungen von PDGFR-P1 sein.

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In der Nuklearmedizin eingesetzte Systeme zur Diagnose und Therapie.....	12
Tabelle 2: Miniprotein-Scaffold-basierte Proteine für die Anwendung in Display Systemen. Modifiziert nach Haberkorn et al. [41]. .....	15
Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme und Phagen.....	33
Tabelle 4: Zelllinien und deren Herkunft und Ursprungsgewebe mit zugehörigen Medien und Zusätzen. ....	33
Tabelle 5: Verwendete Medien und Zusätze für die Zellkultur. ....	34
Tabelle 6: Verwendete Vektoren. ....	34
Tabelle 7: Primerübersicht.....	35
Tabelle 8: Antikörper und rekombinante Proteine.....	36
Tabelle 9: Größenmarker und Ladepuffer.....	36
Tabelle 10: Kits.....	36
Tabelle 11: Übersicht der Peptide identifiziert durch Biopanning gegen die extrazelluläre Domäne von CD276. ....	75
Tabelle 12: Organverteilung und Tumor zu Organverhältnis von <sup>131</sup> I-CD276.11 in PC-3 Tumor tragenden Balb/c nu/nu Mäusen.....	80
Tabelle 13: Fragmente des Peptids CD276.11 und Bindungsaffinitäten der Kinetikstudien mit <sup>125</sup> I- markierten Peptiden auf PC-3 Zellen.....	82
Tabelle 14: Aminosäuresequenzen der Peptidspots G12 und I8 identifiziert durch Peptid-Array von CD276.11.....	84
Tabelle 15: Sequenzen CD276.11 3-10 D-AS Scan und Met-AS Scan. Kleine Buchstaben stehen für D-AS, große Buchstaben für L-AS. Me steht für methylierte AS. ....	85
Tabelle 16: Stabilisierungsstrategien von CD276.11, Bindung auf Zellen nach 60 min Inkubation des Peptids.....	86
Tabelle 17: Aminosäuresequenzen und Positionen der gespotteten Fragmente von PDGFR-P1 Fett hervorgehoben sind Fragmente mit der Sequenz SRPFF.....	96
Tabelle 18: Kompetitionsversuche des Originalpeptids PDGFR-P1 und dessen Derivate. Bestimmung des IC <sub>50</sub> -Wertes in nM. ....	101
Tabelle 19: Organverteilung und Tumor zu Organverhältnis von <sup>131</sup> I-yG2 in BxPC-3 Tumor tragenden Balb/c nu/nu Mäusen. ....	104
Tabelle 20: Aminosäuresequenzen der Derivate des G2 Fragments .....	105

## 9 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: PET/CT 60 min nach i.v. Gabe von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC in einen Patienten mit metastasierenden neuroendokrinen Tumor. Die koronale Sektion zeigt multiple Metastasen in der Leber. .... 11
- Abbildung 2: (Oben) Phage mit genetisch modifiziertem Phagemidvektor. (Unten) Die Peptidbibliothek ist „in frame“ durch einen Spacer mit dem Minor Coat Protein III fusioniert. Das N-terminale Sekretionssignal erlaubt die Präsentation des Fusionsproteins auf dem Phagen. So modifizierte Phagen werden für das Phage Display System eingesetzt. .... 16
- Abbildung 3: Phage Display Zyklus auf immobilisiertem Target-Protein gebunden an magnetische Beads. .... 18
- Abbildung 4: (A) Aufbau der Bibliothek für das Ribosome Display. Umwandlung der DNA Bibliothek in eine mRNA Bibliothek durch *in vitro* Transkription. (B) Der Peptid-Ribosomen-mRNA-Komplex zum Einsatz im Biopanning entstehend durch *in vitro* Translation der mRNA Bibliothek. .... 21
- Abbildung 5: Panningzyklus Ribosome Display auf immobilisiertem Targetprotein an magnetischen Beads. .... 21
- Abbildung 6: Produktion der extrazellulären Domäne von CD276. (A) Western Blot mit einem CD276 spezifischen Antikörper. Aufgetragen wurden Mediumabnahmen der Wochen (W) 1-5. (B) SDS-Gel. M Marker, ZKÜ Medium vor der Aufreinigung durch eine MAbSuRe Säule, DF Durchfluss nach Aufreinigung, F Fraktionen. (C) aufgereinigte extrazelluläre Domäne von CD276, 1 µg Protein pro Spur. VUP vor dem Umpuffern NUP nach dem Umpuffern in PBS pH 7,4, M Marker. 72
- Abbildung 7: ELISA der biotinierten, extrazellulären Domäne von CD276 auf Streptavidin gecoateten Platten. Der Nachweis des Proteins erfolgte mittels eines HRP-gekoppelten anti-Fc Tag Antikörpers. Immobilisiert wurden jeweils 1:2 Verdünnungen ausgehend von 500 nM Protein und einer Kontrolle mit PBS. .... 72
- Abbildung 9: In vitro Charakterisierung des  $^{125}\text{I}$  markierten Peptids CD276. Die Versuche wurden bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die gebunden Radioaktivität wurde in Prozent pro Dosis auf 1 Million Zellen kalkuliert. Die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben (n=3). (A) Bindung von  $^{125}\text{I}$ -CD276.11 nach 60 Minuten Inkubation des Peptids auf Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  an Tumorlinien. Die relative Bindung ist im Verhältnis zur Bindung an PC-3 Zellen (Bindung = 1) dargestellt. (B) Kinetik von  $^{125}\text{I}$ -CD276.11 an schwach CD276 exprimierenden DU-145 Zellen und stark CD276 exprimierenden PC-3 Zellen. (C) Kompetitionsversuch mit unmarkiertem CD276.11 Peptid (=Kompetitor) nach 60 min Inkubation auf PC-3 Zellen. (D) Kontrollkompetitionen mit den unmarkierten Peptiden CalX-P1, PDGFR-P1 und TATE in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M nach 60 min. .... 77
- Abbildung 10: Internalisierungsexperiment mit  $^{125}\text{I}$ -Cd276.11 auf PC-3 Zellen. Gebundene Aktivität wurde in Prozent pro Dosis und 1 Millionen

Zellen kalkuliert. Werte sind Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen.....	78
Abbildung 11: <i>In vitro</i> Stabilität von <sup>125</sup> I-CD276.11 in humanem Serum.....	79
Abbildung 12: Organverteilungsstudie von <sup>131</sup> I-CD276.11 an PC-3 Tumor tragenden Nacktmäusen BALB/c. Das Peptid wurde i.v. in die Schwanzvene appliziert und Tiere nach 10,20 und 120 min getötet und für Organe, Tumor sowie Blut die Aktivität bestimmt. Werte sind in % injizierte Dosis pro Gramm Organ (% ID/g) angegeben. Angegebene Werte sind Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen.....	80
Abbildung 13: Fragment und Alanin-Scan des Peptids <sup>125</sup> I-CD276.11. gebundene Aktivität wurde in Prozent pro Dosis auf 1 Million Zellen kalkuliert. Die Werte sind als Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen angegeben. (A) 8-Aminosäure Fragment Scan. (B) 6-Aminosäure-Fragment-Scan. (C) Alanin-Scan des Fragments CD276.11 5-10. Die Bindung des Fragments CD276.11 5-10 wurde als 1 gesetzt. Bindungen der Alanin-Peptide wurde im Verhältnis zum Fragment CD276.11 5-10 angegeben. ....	83
Abbildung 14: (A) Peptid-Arrays (CelluSpots™) von CD276.11 inkubiert mit rekombinantem CD276-His Tag. Die Detektion der Bindung erfolgte mit einem anti-His-Alexa-Fluor gekoppeltem Antikörper. (B) Bindungskinetik auf PC-3 Zellen der Spots G12 und I8 im Vergleich zum Original Peptid CD276.11 .....	84
Abbildung 15: D-Aminosäure und Met-Aminosäure-Scan des Fragments CD276.11 3-10 auf PC-3 Zellen bei 37°C. Gebunden Aktivität ist in Prozent pro Dosis und 1 Millionen Zellen angegeben. Werte sind Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen. ....	85
Abbildung 16: <sup>125</sup> I radiomarkierte Fragmente und <sup>125</sup> I-Tyrosin im Vergleich zum <sup>125</sup> I-CD276.11 Metabolit. Die Radio-HPLC Daten wurden bei einem Gradienten von 0 – 30% Azetonitril in Wasser und 10 min aufgenommen. (A) Vergleich der Retentionszeiten der Fragmente 4-5, 4-6, 4-8, 5-8 und 5-9 mit Tyrosin und Metabolit. (B) Vergleich der im humanem Serum entstandenen <sup>125</sup> I- markierten Metaboliten aus den Peptiden CD276.11 und CD276.11 5-11 mit <sup>125</sup> I-Tyrosin. (C) Radio-HPLC Daten bei einem Gradienten von 0-20 % Azetonitril in Wasser und 10 min. Vergleich des <sup>125</sup> I radiomarkiertem Metaboliten aus dem Originalpeptid CD276.11 und <sup>125</sup> I-Tyrosin.....	88
Abbildung 17: Bindungskinetiken von <sup>125</sup> I-CD276.11, <sup>125</sup> I-Metabolit und <sup>125</sup> I-Tyrosin und PC-3 (A) und DU-145 Zellen (B). Gebundene Radioaktivität wurde als Prozent pro Dosis an 1 Millionen Zellen berechnet. Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3).....	88
Abbildung 18: Bindungskinetiken in PBS/ 0,1% BSA als Assay-Puffer über einen Zeitraum von 60 min bei 37°C. Gebundene Radioaktivität wurde in Prozent pro Dosis auf 1 Millionen Zellen bezogen. (A) <sup>125</sup> I-CD276.11. (B) <sup>125</sup> I-Metabolit. (C) <sup>125</sup> I-Tyrosin.....	90
Abbildung 19: (A) Bindungskinetik von <sup>125</sup> I-CD276.11 auf PC-3 und DU-145 Zellen bei 37°C in PBS/ 0,1% BSA als Assay-Puffer . Verglichen wurden die Bindungseigenschaften mit Zugabe von Proteaseinhibitor und ohne Proteaseinhibitor. (B) Assay-Pufferüberstände aus dem Kinetikversuch Abb. 19A wurden zu den Zeitpunkten 10, 20, 30 und	

- 60 min abgenommen und per Radio-HPLC untersucht. Schwarze Daten mit Proteaseinhibitor, graue Daten PBS. ....91
- Abbildung 20: Gebundene Radioaktivität wurde in Prozent pro Dosis auf 1 Mio. Zellen nach 240 min Inkubation berechnet. Werte sind als Mittelwerte (n=1) und Standardabweichungen angegeben. (A) Kompetitionsversuch von  $^{125}\text{I}$ -Tyrosin mit CD276.11 auf PC-3 Zellen in PBS/0,1% BSA bei 37°C. (B) Kompetitionsversuch von  $^{125}\text{I}$ -CD276.11 mit Tyrosin auf PC-3 Zellen in PBS/0,1% BSA bei 37°C. ....92
- Abbildung 21: Kinetikexperiment auf CD276 überexprimierenden Tumorzelllinien MCF-7, NCI-H661 und VCap. Gebundene Radioaktivität wurde in Prozent pro Dosis und 1 Mio. Zellen berechnet. Die Werte sind als Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen angegeben.  $^{151}\text{I}$  markiertes CD276.11 wurde für 60 min auf Zellen inkubiert. In einem parallelen Ansatz wurde zusätzlich 0,1 mM Sch-116 (=BCH) zugegeben. ....92
- Abbildung 22: CelluSpots™ des Peptids PDGFR-P1 inkubiert mit 0,1 µM Targetprotein gefolgt von Detektion mit einem anti-Fc Antikörper gekoppelt an HRP. Die Entwicklung erfolgte mittels der Chemilumineszenz-Methode. In weißen Quadraten sind jeweils die Originalpeptide hervorgehoben. (A) CD276. (B) PDGFRβ. (C) FGFR. ....95
- Abbildung 23: Auswertung der CelluSpots™ mit dem GenePix 6.0 Programm. Spotintensitäten wurden auf das in der jeweiligen Zeile befindliche Originalpeptid PDGFR-P1 (=100% Bindung) bezogen. Die Berechnung der Fragmente wurde auf das Originalpeptid an Stelle A21 bezogen. Originalpeptide sind durch Rahmen hervorgehoben. Grün = geringere Bindungsstärke im Vergleich zum Originalpeptid, Gelb = Bindungsstärke liegt im Bereich des Originalpeptids, Rot = erhöhte Bindungsaffinität. (A) CD276. (B) PDGFRβ. ....97
- Abbildung 24: Aminosäure-Sequenzvergleich der extrazellulären Domänen von (1) PDGFRβ – AS 33- 532 und (2) CD276 – AS 29- 466. ....98
- Abbildung 25: *in vitro* Bindungsstudien von PDGFR-P1 Derivaten an BxPC-3 Zellen bei 37°C. Alle Peptide wurden mit  $^{125}\text{I}$  markiert. Gebundene Radioaktivität wurde in Prozent der Dosis an 1 Mio. Zellen berechnet. Die Werte sind als Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen angegeben. (A) Vergleich verschiedener Derivate abgeleitet von CelluSpots™. (B) Vergleich des Fragments RRPFF mit dem Originalpeptid. (C) Vergleich verschiedener Tyrosinreste zur Markierung mit  $^{125}\text{I}$ . ....100
- Abbildung 26: Kompetitionsversuche auf BxPC-3 Zellen bei 37°C. Gebundene Radioaktivität wurde als Prozent pro Dosis auf 1 Mio. Zellen berechnet. Werte sind Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen. (A)  $^{125}\text{I}$ -yG2 kompetitiert mit yG2. (B)  $^{125}\text{I}$ -yG2 kompetitiert mit PDGFR-P1, DOTATOC und DIIIPep2. (C)  $^{125}\text{I}$ -yRRPFF kompetitiert mit yRRPFF. (D)  $^{125}\text{I}$ -yRRPFF kompetitiert mit PDGFR-P1, DOTATOC und DIIIPep2. ....101
- Abbildung 27: Internalisierungsstudien auf BxPC-3 Zellen bei 37°C und 4°C. Gebundene Radioaktivität wurde in Prozent pro Dosis auf 1 Mio. Zellen berechnet. Werte sind Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen. (A)  $^{125}\text{I}$ -yG2. (B)  $^{125}\text{I}$ -yRRPFF. ....102
- Abbildung 28: *in vitro* Stabilität von (A)  $^{125}\text{I}$ -yG2 und (B)  $^{125}\text{I}$ -RRPFF in humanem Serum. ....103

- 
- Abbildung 29: Organverteilungsstudie von  $^{131}\text{I}$ -yG2 an BxPC-3 Tumor tragenden Nacktmäusen Balb/c. Peptid wurde i.v. in die Schwanzvene appliziert und Tiere nach 5, 15 und 60 min getötet und für Organe, Tumor sowie Blut die Aktivität bestimmt. Werte sind in % injizierte Dosis pro Gramm Organ (% ID/g) angegeben. Angegebene Werte sind Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen. .... 104
- Abbildung 30: Bindungskinetiken von  $^{125}\text{I}$ -markierten Derivaten von AV2 auf BxPC-3 Zellen bei  $37^\circ\text{C}$ . Gebundene Radioaktivität wurde in Prozent pro applizierte Dosis auf 1 Millionen Zellen berechnet. Werte sind Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen. .... 106
- Abbildung 31: Bindungskinetiken von  $^{125}\text{I}$ -yrrpff und  $^{125}\text{I}$ -ffpry auf BxPC-3 bei  $37^\circ\text{C}$ . gebundene radioaktivität wurde in Prozent pro applizierte Dosis auf 1 Millionen Zellen berechnet. Werte sind Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen. .... 106
- Abbildung 32:  $\gamma$ -Kameraaufnahmen einer A431-Tumor tragenden Balb/c nu/nu Maus.  $^{131}\text{I}$ -yrrpff wurde i.v. appliziert und Bilder nach 20, 40, 60 und 120 min sowie 18h aufgenommen. Bilder bis 120 min entstanden durch Überlagerung von Einzelaufnahmen in den entsprechenden angegebenen Zeiträumen. .... 107

## 10 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
EGF	Epidermal growth factor
f.c.	final concentration (Endkonzentration)
FCS	fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
GA	Glukose/ Ampicillin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	High performance liquid chromatography
HS	Horse serum (Pferdeserum)
m	Milli
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorbition/Ionisation
Max.	maximal
Med.	medizinisch
Min	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
n.g.	nicht getestet
i.v.	intravenös
OD	Optische Dichte
PDI	Proteindisulfidisomerase
PE	Polyethylen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PET	Positronen Emission Tomography
Pfu	Phage forming units



PRRT	Peptide Receptor Radionuclide Therapy
RP-HPLC	Radiopräparative HPLC
RT	Raumtemperatur
SPECT	Single Photon Emission Computet Tomography
TBS	Tris-gepufferte Saline
üN	über Nacht
Vol.	Volumen
μ	mikro
μl	Mikroliter
'	Minute
"	Sekunde
DNA-Basen	
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

## Aminosäuren

A	Ala Alanin
C	Cys Cystein
D	Asp Aspartat
E	Glu Glutamat
F	Phe Phenylalanin
G	Gly Glycin
H	His Histidin
I	Ile Isoleucin
K	Lys Lysin
L	Leu Leucin
M	Met Methionin
N	Asn Asparagin
P	Pro Prolin
Q	Gln Glutamin
R	Arg Arginin
S	Ser Serin

T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
X	X	beliebige Aminosäure
Y	Tyr	Tyrosin

## 11 Literaturverzeichnis

1. Quinn, M.J., et al., *Cancer mortality trends in the EU and acceding countries up to 2015*. Ann Oncol, 2003. **14**(7): p. 1148-52.
2. Bosetti, C., et al., *Cancer mortality in the European Union, 1970-2003, with a joinpoint analysis*. Ann Oncol, 2008. **19**(4): p. 631-40.
3. Ter-Pogossian, M.M., et al., *A positron-emission transaxial tomograph for nuclear imaging (PETT)*. Radiology, 1975. **114**(1): p. 89-98.
4. Baron, J.C., et al., *Noninvasive measurement of blood flow, oxygen consumption, and glucose utilization in the same brain regions in man by positron emission tomography: concise communication*. J Nucl Med, 1982. **23**(5): p. 391-9.
5. Bodei, L., et al., *Yttrium-labelled peptides for therapy of NET*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2012. **39 Suppl 1**: p. S93-102.
6. Zovato, S., et al., *Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRT) with <sup>177</sup>Lu-DOTATATE in Individuals with Neck or Mediastinal Paraganglioma (PGL)*. Horm Metab Res, 2012. **44**(5): p. 411-4.
7. Pool, S.E., et al., *Multimodality imaging of somatostatin receptor-positive tumors with nuclear and bioluminescence imaging*. Mol Imaging, 2012. **11**(1): p. 27-32.
8. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 789-99.
9. Marzioni, M., et al., *Exendin-4, a glucagon-like peptide 1 receptor agonist, protects cholangiocytes from apoptosis*. Gut, 2009. **58**(7): p. 990-7.
10. Wild, D., et al., *Exendin-4-based radiopharmaceuticals for glucagonlike peptide-1 receptor PET/CT and SPECT/CT*. J Nucl Med, 2010. **51**(7): p. 1059-67.
11. Mather, S.J., et al., *Selection of radiolabeled gastrin analogs for peptide receptor-targeted radionuclide therapy*. J Nucl Med, 2007. **48**(4): p. 615-22.
12. Smith, C.J., et al., *Radiochemical investigations of (99m)Tc-N(3)S-X-BBN[7-14]NH(2): an in vitro/in vivo structure-activity relationship study where X = 0-, 3-, 5-, 8-, and 11-carbon tethering moieties*. Bioconjug Chem, 2003. **14**(1): p. 93-102.
13. Kaltsas, G.A., et al., *Treatment of advanced neuroendocrine tumours with radiolabelled somatostatin analogues*. Endocr Relat Cancer, 2005. **12**(4): p. 683-99.
14. Kwekkeboom, D.J., et al., *Overview of results of peptide receptor radionuclide therapy with 3 radiolabeled somatostatin analogs*. J Nucl Med, 2005. **46 Suppl 1**: p. 62S-6S.
15. Prewett, M., et al., *The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma*. J Immunother Emphasis Tumor Immunol, 1996. **19**(6): p. 419-27.
16. Rao, S.D., M.G. Fury, and D.G. Pfister, *Molecular-targeted therapies in head and neck cancer*. Semin Radiat Oncol, 2012. **22**(3): p. 207-13.
17. Broadbridge, V.T., C.S. Karapetis, and T.J. Price, *Cetuximab in metastatic colorectal cancer*. Expert Rev Anticancer Ther, 2012. **12**(5): p. 555-65.

18. Witzig, T.E., et al., *Phase I/II trial of IDEC-Y2B8 radioimmunotherapy for treatment of relapsed or refractory CD20(+) B-cell non-Hodgkin's lymphoma*. J Clin Oncol, 1999. **17**(12): p. 3793-803.
19. Anderson, D.R., et al., *Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma*. Biochem Soc Trans, 1997. **25**(2): p. 705-8.
20. Marr, A., et al., *Biotechnology techniques for the development of new tumor specific peptides*. Methods, 2011. **55**(3): p. 215-22.
21. Zoller, F., et al., *Endoradiotherapy in cancer treatment--basic concepts and future trends*. Eur J Pharmacol, 2009. **625**(1-3): p. 55-62.
22. Zacher, A.N., 3rd, et al., *A new filamentous phage cloning vector: fd-tet*. Gene, 1980. **9**(1-2): p. 127-40.
23. Barbas, C.F., 3rd, *Recent advances in phage display*. Curr Opin Biotechnol, 1993. **4**(5): p. 526-30.
24. Matthews, D.J. and J.A. Wells, *Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display*. Science, 1993. **260**(5111): p. 1113-7.
25. Scott, J.K. and G.P. Smith, *Searching for peptide ligands with an epitope library*. Science, 1990. **249**(4967): p. 386-90.
26. Miceli, R.M., M.E. DeGraaf, and H.D. Fischer, *Two-stage selection of sequences from a random phage display library delineates both core residues and permitted structural range within an epitope*. J Immunol Methods, 1994. **167**(1-2): p. 279-87.
27. Christmann, A., et al., *Epitope mapping and affinity purification of monospecific antibodies by Escherichia coli cell surface display of gene-derived random peptide libraries*. J Immunol Methods, 2001. **257**(1-2): p. 163-73.
28. Parhami-Seren, B., T. Keel, and G.L. Reed, *Sequences of antigenic epitopes of streptokinase identified via random peptide libraries displayed on phage*. J Mol Biol, 1997. **271**(3): p. 333-41.
29. Mullaney, B.P. and M.G. Pallavicini, *Protein-protein interactions in hematology and phage display*. Exp Hematol, 2001. **29**(10): p. 1136-46.
30. Stephen, C.W., P. Helminen, and D.P. Lane, *Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions*. J Mol Biol, 1995. **248**(1): p. 58-78.
31. Smothers, J.F., S. Henikoff, and P. Carter, *Tech.Sight. Phage display. Affinity selection from biological libraries*. Science, 2002. **298**(5593): p. 621-2.
32. Hartley, O., *The use of phage display in the study of receptors and their ligands*. Journal of Receptor and Signal Transduction Research, 2002. **22**(1-4): p. 373-392.
33. Rodi, D.J. and L. Makowski, *Phage-display technology--finding a needle in a vast molecular haystack*. Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(1): p. 87-93.
34. Russel, M., N.A. Linderoth, and A. Sali, *Filamentous phage assembly: variation on a protein export theme*. Gene, 1997. **192**(1): p. 23-32.
35. Gaytan, P., et al., *Combination of DMT-mononucleotide and Fmoc-trinucleotide phosphoramidites in oligonucleotide synthesis affords an automatable codon-level mutagenesis method*. Chem Biol, 1998. **5**(9): p. 519-27.
36. Kayushin, A.L., et al., *A convenient approach to the synthesis of trinucleotide phosphoramidites--synthons for the generation of oligonucleotide/peptide libraries*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(19): p. 3748-55.

37. Lindner, T., et al., *DNA libraries for the construction of phage libraries: statistical and structural requirements and synthetic methods*. *Molecules*, 2011. **16**(2): p. 1625-41.
38. Smith, G.P., *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. *Science*, 1985. **228**(4705): p. 1315-7.
39. Zoller, F., U. Haberkorn, and W. Mier, *Miniproteins as phage display-scaffolds for clinical applications*. *Molecules*, 2011. **16**(3): p. 2467-85.
40. Weiner, R.E. and M.L. Thakur, *Radiolabeled peptides in oncology: role in diagnosis and treatment*. *BioDrugs*, 2005. **19**(3): p. 145-63.
41. Haberkorn, U., et al., *Endoradiotherapy with peptides - status and future development*. *Curr Med Chem*, 2008. **15**(3): p. 219-34.
42. Nygren, P.A., *Alternative binding proteins: affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold*. *FEBS J*, 2008. **275**(11): p. 2668-76.
43. Smith, G.P. and V.A. Petrenko, *Phage Display*. *Chem Rev*, 1997. **97**(2): p. 391-410.
44. Roberts, B.L., et al., *Directed evolution of a protein: selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(6): p. 2429-33.
45. Smith, G.P., et al., *Small binding proteins selected from a combinatorial repertoire of knottins displayed on phage*. *J Mol Biol*, 1998. **277**(2): p. 317-32.
46. Souriau, C., et al., *New binding specificities derived from Min-23, a small cysteine-stabilized peptidic scaffold*. *Biochemistry*, 2005. **44**(19): p. 7143-55.
47. McConnell, S.J. and R.H. Hoess, *Tendamistat as a scaffold for conformationally constrained phage peptide libraries*. *J Mol Biol*, 1995. **250**(4): p. 460-70.
48. Lehtio, J., T.T. Teeri, and P.A. Nygren, *Alpha-amylase inhibitors selected from a combinatorial library of a cellulose binding domain scaffold*. *Proteins*, 2000. **41**(3): p. 316-22.
49. Schneider, S., et al., *Mutagenesis and selection of PDZ domains that bind new protein targets*. *Nat Biotechnol*, 1999. **17**(2): p. 170-5.
50. Binz, H.K., et al., *High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries*. *Nat Biotechnol*, 2004. **22**(5): p. 575-82.
51. Lu, Z., et al., *Expression of thioredoxin random peptide libraries on the Escherichia coli cell surface as functional fusions to flagellin: a system designed for exploring protein-protein interactions*. *Biotechnology (N Y)*, 1995. **13**(4): p. 366-72.
52. Thai, C.K., et al., *Identification and characterization of Cu(2)O- and ZnO-binding polypeptides by Escherichia coli cell surface display: toward an understanding of metal oxide binding*. *Biotechnol Bioeng*, 2004. **87**(2): p. 129-37.
53. Brophy, S.E., P.D. Holler, and D.M. Kranz, *A yeast display system for engineering functional peptide-MHC complexes*. *J Immunol Methods*, 2003. **272**(1-2): p. 235-46.
54. Hanes, J. and A. Pluckthun, *In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(10): p. 4937-42.
55. Lipovsek, D. and A. Pluckthun, *In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display*. *J Immunol Methods*, 2004. **290**(1-2): p. 51-67.
56. Nikolett, S., et al., *Analysis of the incompatibility determinants of I-complex plasmids*. *J Bacteriol*, 1988. **170**(3): p. 1311-8.

57. Barbas, C., Burton, D., Silverman G., , *Phage Display: A Laboratory Manual*. 2001.
58. Groves, M., et al., *Affinity maturation of phage display antibody populations using ribosome display*. J Immunol Methods, 2006. **313**(1-2): p. 129-39.
59. Mattheakis, L.C., R.R. Bhatt, and W.J. Dower, *An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 9022-6.
60. Stemmer, W.P., *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*. Nature, 1994. **370**(6488): p. 389-91.
61. Zacco, M. and E. Gherardi, *The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: a study on TEM-1 beta-lactamase*. J Mol Biol, 1999. **285**(2): p. 775-83.
62. Zahnd, C., P. Amstutz, and A. Pluckthun, *Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target*. Nat Methods, 2007. **4**(3): p. 269-79.
63. Levenson, S.K. and R.E. Webster, *Nucleotide sequences of the tolA and tolB genes and localization of their products, components of a multistep translocation system in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1989. **171**(12): p. 6600-9.
64. Ryabova, L.A., et al., *Functional antibody production using cell-free translation: effects of protein disulfide isomerase and chaperones*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(1): p. 79-84.
65. Gillet, R. and B. Felden, *Emerging views on tmRNA-mediated protein tagging and ribosome rescue*. Mol Microbiol, 2001. **42**(4): p. 879-85.
66. Jermutus, L., et al., *Tailoring in vitro evolution for protein affinity or stability*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(1): p. 75-80.
67. Zahnd, C., et al., *Directed in vitro evolution and crystallographic analysis of a peptide-binding single chain antibody fragment (scFv) with low picomolar affinity*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18870-7.
68. Chapoval, A.I., et al., *B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 269-74.
69. Prasad, D.V., et al., *Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells*. J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2500-6.
70. Lupu, C.M., et al., *An orthotopic colon cancer model for studying the B7-H3 antitumor effect in vivo*. J Gastrointest Surg, 2006. **10**(5): p. 635-45.
71. Loos, M., et al., *B7-h3 and its role in antitumor immunity*. Clin Dev Immunol, 2010. **2010**: p. 683875.
72. Xu, H., et al., *MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors*. Cancer Res, 2009. **69**(15): p. 6275-81.
73. Castriconi, R., et al., *Identification of 4lg-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12640-5.
74. Zang, X., et al., *B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(49): p. 19458-63.
75. Roth, T.J., et al., *B7-H3 ligand expression by prostate cancer: a novel marker of prognosis and potential target for therapy*. Cancer Res, 2007. **67**(16): p. 7893-900.
76. Zang, X., et al., *Tumor associated endothelial expression of B7-H3 predicts survival in ovarian carcinomas*. Mod Pathol, 2010. **23**(8): p. 1104-12.

77. Parker, A.S., et al., *Evaluation of B7-H3 expression as a biomarker of biochemical recurrence after salvage radiation therapy for recurrent prostate cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011. **79**(5): p. 1343-9.
78. Seaman, S., et al., *Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis*. Cancer Cell, 2007. **11**(6): p. 539-554.
79. Nygren, M.K., et al., *B7-H3 and its relevance in cancer; immunological and non-immunological perspectives*. Front Biosci (Elite Ed), 2011. **3**: p. 989-93.
80. Liu, H., et al., *B7-H3 silencing increases paclitaxel sensitivity by abrogating Jak2/Stat3 phosphorylation*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(6): p. 960-71.
81. Tekle, C., et al., *B7-H3 contributes to the metastatic capacity of melanoma cells by modulation of known metastasis-associated genes*. Int J Cancer, 2012. **130**(10): p. 2282-90.
82. Claesson-Welsh, L., *Platelet-derived growth factor receptor signals*. J Biol Chem, 1994. **269**(51): p. 32023-6.
83. Betsholtz, C., *Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(4): p. 215-28.
84. Eriksson, A., et al., *PDGF alpha- and beta-receptors activate unique and common signal transduction pathways*. EMBO J, 1992. **11**(2): p. 543-50.
85. Wang, H., et al., *Over-expression of PDGFR-beta promotes PDGF-induced proliferation, migration, and angiogenesis of EPCs through PI3K/Akt signaling pathway*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30503.
86. Enge, M., et al., *Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy*. EMBO J, 2002. **21**(16): p. 4307-16.
87. Sundberg, C., et al., *Microvascular pericytes express platelet-derived growth factor-beta receptors in human healing wounds and colorectal adenocarcinoma*. Am J Pathol, 1993. **143**(5): p. 1377-88.
88. Abramsson, A., P. Lindblom, and C. Betsholtz, *Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors*. J Clin Invest, 2003. **112**(8): p. 1142-51.
89. Bergers, G., et al., *Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors*. J Clin Invest, 2003. **111**(9): p. 1287-95.
90. Erber, R., et al., *Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms*. FASEB J, 2004. **18**(2): p. 338-40.
91. Fjallskog, M.L., et al., *Upregulated expression of PDGF receptor beta in endocrine pancreatic tumors and metastases compared to normal endocrine pancreas*. Acta Oncol, 2007. **46**(6): p. 741-6.
92. Nazarenko, I., et al., *PDGF and PDGF receptors in glioma*. Ups J Med Sci, 2012. **117**(2): p. 99-112.
93. Korsinczky, M.L., et al., *Solution structures by 1H NMR of the novel cyclic trypsin inhibitor SFTI-1 from sunflower seeds and an acyclic permutant*. J Mol Biol, 2001. **311**(3): p. 579-91.
94. Boy, R.G., et al., *Sunflower trypsin inhibitor 1 derivatives as molecular scaffolds for the development of novel peptidic radiopharmaceuticals*. Mol Imaging Biol, 2010. **12**(4): p. 377-85.
95. Dreier, B. and A. Pluckthun, *Ribosome display: a technology for selecting and evolving proteins from large libraries*. Methods Mol Biol, 2011. **687**: p. 283-306.

96. Barany, G., N. Kneib-Cordonier, and D.G. Mullen, *Solid-phase peptide synthesis: a silver anniversary report*. Int J Pept Protein Res, 1987. **30**(6): p. 705-39.
97. Zoller, F., et al., *Engineering and functionalization of the disulfide-constrained miniprotein min-23 as a scaffold for diagnostic application*. ChemMedChem, 2012. **7**(2): p. 237-47.
98. Crim, J.W., S.F. Garczynski, and M.R. Brown, *Approaches to radioiodination of insect neuropeptides*. Peptides, 2002. **23**(11): p. 2045-51.
99. Kuwert, G., Haberkorn, Krause *Nuklearmedizin*, ed. Auflage. 2008, Stuttgart, New York: Thieme.
100. Chung, H.W., et al., *Radiosensitization effect of STI-571 on pancreatic cancer cells in vitro*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009. **75**(3): p. 862-9.
101. Askoxylakis, V., et al. *Peptide based targeting of the platelet derived growth factor receptor beta*, Mol Imaging Biol, 2012 July 13.
102. Lewis, J.S., et al., *Comparison of four <sup>64</sup>Cu-labeled somatostatin analogues in vitro and in a tumor-bearing rat model: evaluation of new derivatives for positron emission tomography imaging and targeted radiotherapy*. J Med Chem, 1999. **42**(8): p. 1341-7.
103. Rana, S., et al., *Optimization of a Novel Peptide Ligand Targeting Human Carbonic Anhydrase IX*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e38279.
104. Merrifield, R.B., *Solid-Phase Peptide Synthesis. 3. An Improved Synthesis of Bradykinin*. Biochemistry, 1964. **3**: p. 1385-90.
105. Khosla, M.C., R.R. Smeby, and F.M. Bumpus, *Apparatus for solid-phase peptide synthesis*. Science, 1967. **156**(3772): p. 253-4.
106. Vlieghe, P., et al., *Synthetic therapeutic peptides: science and market*. Drug Discov Today, 2010. **15**(1-2): p. 40-56.
107. Askoxylakis, V., et al., *Challenges in optimizing a prostate carcinoma binding peptide, identified through the phage display technology*. Molecules, 2011. **16**(2): p. 1559-78.
108. Mier, W., et al., *Influence of chelate conjugation on a newly identified tumor-targeting peptide*. J Nucl Med, 2007. **48**(9): p. 1545-52.
109. Zitzmann, S., et al., *Identification and evaluation of a new tumor cell-binding peptide, FROP-1*. J Nucl Med, 2007. **48**(6): p. 965-72.
110. Neduva, V. and R.B. Russell, *Peptides mediating interaction networks: new leads at last*. Curr Opin Biotechnol, 2006. **17**(5): p. 465-71.
111. Ettwiller, L.M., J. Rung, and E. Birney, *Discovering novel cis-regulatory motifs using functional networks*. Genome Res, 2003. **13**(5): p. 883-95.
112. Stark, A., et al., *Identification of Drosophila MicroRNA targets*. PLoS Biol, 2003. **1**(3): p. E60.
113. Cresti, A., et al., *Oxygen surface functionalization of graphene nanoribbons for transport gap engineering*. ACS Nano, 2011. **5**(11): p. 9271-7.
114. Zhang, H., et al., *Aryl functionalization as a route to band gap engineering in single layer graphene devices*. Nano Lett, 2011. **11**(10): p. 4047-51.
115. Llanes-Pallas, A., et al., *Modular engineering of H-bonded supramolecular polymers for reversible functionalization of carbon nanotubes*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(39): p. 15412-24.
116. Borcard, F., et al., *Covalent cell surface functionalization of human fetal osteoblasts for tissue engineering*. Bioconjug Chem, 2011. **22**(7): p. 1422-32.
117. Kim, D.K., et al., *Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1565**(1): p. 112-21.



118. Trabi, M. and D.J. Craik, *Circular proteins--no end in sight*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(3): p. 132-8.
119. Wester, H.J. and H. Kessler, *Molecular targeting with peptides or peptide-polymer conjugates: just a question of size?* J Nucl Med, 2005. **46**(12): p. 1940-5.
120. Hruby, V.J., *Designing peptide receptor agonists and antagonists*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(11): p. 847-58.
121. Hilpert, K., D.F. Winkler, and R.E. Hancock, *Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion*. Nat Protoc, 2007. **2**(6): p. 1333-49.
122. Teyra, J., S.S. Sidhu, and P.M. Kim, *Elucidation of the binding preferences of peptide recognition modules: SH3 and PDZ domains*. FEBS Lett, 2012.
123. Davey, N.E., D.C. Shields, and R.J. Edwards, *SLIMDisc: short, linear motif discovery, correcting for common evolutionary descent*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(12): p. 3546-54.
124. Stein, A. and P. Aloy, *Novel peptide-mediated interactions derived from high-resolution 3-dimensional structures*. PLoS Comput Biol, 2010. **6**(5): p. e1000789.
125. Bock, I., et al., *Application of Cellusspots peptide arrays for the analysis of the binding specificity of epigenetic reading domains to modified histone tails*. BMC Biochem, 2011. **12**: p. 48.

## 12 Anhang

### Publikationen

- Marr A, Nissen F, Maisch D, Altmann A, Rana S, Mier W, Debus J, Haberkorn U, Askoxylakis V, *Peptide arrays for development of PDGFR $\beta$  affine molecules*. Journal of Medicinal Chemistry, eingereicht
- Askoxylakis V, Zitzmann-Kolbe S, Zoller F, Altmann A, Markert A, Rana S, Marr A, Mier W, Debus J, Haberkorn U, *Challenges in optimizing a prostate carcinoma binding peptide, identified through the phage display technology*, Molecules. 2011 Feb 14;**16**(2):1559-78.
- Askoxylakis V, Marr A, Altmann A, Markert A, Mier W, Debus J, Huber PE, Haberkorn U, *Peptide-Based Targeting of the Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta*. Mol Imaging Biol. 2012 Jul **13**.
- Marr A, Markert A, Altmann A, Askoxylakis V, Haberkorn U, *Biotechnology techniques for the development of new tumor specific peptides*, Methods. 2011 Nov;**55**(3):215-22. Epub 2011 May 27.
- Askoxylakis V, Zitzmann-Kolbe S, Zoller F, Altmann A, Markert A, Rana S, Marr A, Mier W, Debus J, Haberkorn U, *Challenges in optimizing a prostate carcinoma binding peptide, identified through the phage display technology*, Molecules. 2011 Feb 14;**16**(2):1559-78.

### Patent

Europäische Patent Anmeldenummer: EP12158795.0

*Peptides based targeting of the platelet derived growth factor receptor beta (PDGFR $\beta$ ) and CD276,*

Prioritätsdatum 12.03.2012.

### Vorträge

EATRIS – Mailand 2010

Annabell Marr, Annette Altmann, Walter Mier, Uwe Haberkorn. *Identification and improvement of new tumor specific peptides using different display-techniques.*

### Poster

Bayer PhD student course, Köln 2010

Annabell Marr, Annette Altmann, Uwe Haberkorn, Walter Mier, Jürgen Debus, Vasileios Askoxylakis. *Identification and characterization of a new peptide targeting carbonic anhydrase IX.*

2<sup>nd</sup> Heidelberger Forum for young life scientists, Heidelberg 2012

Annabell Marr, Thomas Lindner, Annette Markert, Annette Altmann, Shoaib Rana, Walter Mier, Uwe Haberkorn. *Identification and characterization of a new peptide targeting CD276.*

SNM Annual Meeting, Miami Florida USA 2012

Annabell Marr, Thomas Lindner, Annette Markert, Annette Altmann, Shoaib Rana, Walter Mier, Uwe Haberkorn, *Targeting the B7-H3 molecule with high affinity peptides found through phage display technology.*

SNM Annual Meeting, Miami Florida USA 2012

Annabell Marr, Felix Nissen, Annette Altmann, Walter Mier, Uwe Haberkorn, Jürgen Debus, Vasileios Askoxylakis, *Optimization of a PDGFR $\beta$  binding peptide through peptide array analysis.*

## **Danksagung**

Ich möchte allen danken, die mich während meiner Anfertigung der Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Uwe Haberkorn für die Bereitstellung von Thema und Arbeitsplatz. Während meiner gesamten Zeit war er stets am Fortschreiten der Arbeit interessiert und bereit, alle fachlichen Fragen zu klären sowie Anregungen zu geben und trug so wertvoll zum Gelingen der Arbeit bei.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Herrn Priv. Doz. Dr. Walter Mier für die Übernahme des Erstgutachtens sowie für die wissenschaftliche Unterstützung und wertvollen Diskussionen in unserer Kooperation bedanken. Auch bedanke ich mich bei Dr. Karin Müller –Decker für die Übernahme der Prüfung.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Urban sowie Prof. Dr. Eisenhut für die hilfreichen Diskussionen während meiner Vorträge der TAC-Meetings.

Ein besonderer Dank gilt natürlich unserer Arbeitsgruppe unter der Leitung von Dr. Annette Altmann und Dr. Annette Markert für die fachliche Unterstützung und Einarbeitung. Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Dr. med. Vasileios Askoxylakis für die Betreuung bei der Anfertigung der Publikation und des Patents sowie Jennifer Melzer, die hierzu einen Teil der praktischen Arbeit geleistet hat.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Frederic Zoller, Dr. Felix Nissen, Dr. Matthias Strieker und besonders bei Thomas Lindner für alle Diskussionen und Antworten rund um die Chemie sowie die unzähligen Peptidsynthesen bedanken.

Des Weiteren danke ich Dr. Sabine Zitzmann, Dr. Anne Strube, Dr. Purnama Dewi-Wülfing von Bayer Healthcare sowie Dr. Ole Brandt und Dr. Daniel Maisch von Intavis für die gute Zusammenarbeit im Konsortium Biotrace.

Darüber hinaus möchte ich mich bei unserer DKFZ-Einheit, insbesondere Ursula Schierbaum, Karin Leotta sowie Ellen Bender für die unterstützende Zusammenarbeit bedanken.

Vor allem möchte ich mich bei Ulrike, Annette, Gabriela, Sabine, Vasileios und Shoaib für die unzähligen Gespräche gemeinsamen Stunden und Unternehmungen

bedanken. Ich hoffe wir werden uns nicht aus den Augen verlieren. Mein besonderer Dank gilt natürlich und allen voran meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und immer an mich geglaubt haben. Schlussendlich möchte ich mich bei meiner Schwester, Adrian und meinen Freunden bedanken, die immer für mich da waren. Ohne eure Liebe und Rückhalt wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.