

5. Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit befasste sich auf der einen Seite mit Experimenten, mit dem Ziel die Substratspezifität der RNase T1 von Guanosin nach Adenosin zu verändern. Hierfür wurden zunächst zwei neue RNase T1-Varianten dargestellt, gereinigt und charakterisiert, deren Spezifität deutlich in Richtung einer Substratspaltung nach Adenosin-Resten verschoben ist. Beide Varianten enthalten Aminosäureaustausche, die auch in der Variante RV enthalten sind, der RNase T1 Variante mit der bisher größten Spezifitätsverschiebung, die bisher erreicht worden ist. Die wesentliche Bedeutung des Asparagins in Position 46 konnte hierbei deutlich gemacht werden. Neben diesen Experimenten, die dem rationalen Protein-Design zuzuordnen sind, wurde die Herausforderung einer Spezifitätsänderung der RNase T1 auch mit Methoden des evolutionären Protein-Designs angegangen. Hierbei konnte jedoch keine weitere Verstärkung der Spezifitätsverschiebung erreicht werden, was vornehmlich durch ein nicht ausreichend effizientes *Screening*-Verfahren erklärt werden konnte. Aus diesem Grunde wurde für zukünftige Experimente eine auf Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie beruhende *Screening*-Methode etabliert, welche unter Verwendung eines neuartigen, sehr einfach bereitzustellenden RNase-Substrates im Mikrotiterplattenmaßstab ein *Screening* von RNase T1-Bibliotheken mit Komplexitäten größer 20000 pro Platte ermöglicht macht.

Die andere Seite dieser Arbeit befasste sich mit der Vorbereitung von Experimenten, in denen die Fähigkeit von Peptiden, durch kovalente Verknüpfung mit Proteinen deren Transport in Zellen zu bewirken, mit Hilfe der RNase T1 untersucht werden soll. Die Aufnahme der Fusionsproteine soll an Säugerzelllinien untersucht werden, wobei die Aufnahme in die Zellen anhand der cytotoxischen Wirkung des RNase detektiert werden soll. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RNase T1 alle wichtigen Voraussetzungen erfüllt, um als Modellenzym für diese Anwendungen eingesetzt zu werden: RNase T1 lässt sich auf einfachste Art und Weise spezifisch am N-Terminus durch den Umsatz mit NHS-Estern ohne Aktivitätsverlust modifizieren und kann damit praktisch mit beliebigen kupplungsfähigen Peptidsequenzen verknüpft werden. Die Ribonuclease zeigt bei Zugabe ins Kulturmedium von Säugerzellen auch in sehr hohen Konzentrationen als freies Enzym keinerlei toxische Effekte auf die Zellen. Des Weiteren entgeht RNase T1 einer Hemmung durch den ubiquitär vorhandenen cytosolischen Ribonuclease Inhibitor, da sie von diesem nicht erkannt wird. Und schließlich erfüllt die Ribonuclease auch die wohl wichtigste Voraussetzung für einen Einsatz als Toxin-Komponente in den Fusionsproteinen: In cytosolischer Lokalisation wirkt sie schon in geringen Menge cytostatisch und damit toxisch.