



Abschlussbericht für das Projekt

**Optimierung der Sybody Produktion zur Inhibition der onkogenen
Aktivität von ITPKA**

Prof. Dr. rer. nat. Sabine Windhorst

Hamburg, 27.05.2026

1. Thema des Forschungsprojektes

Optimierung der Sybody Produktion zur Inhibition der onkogenen Aktivität von ITPKA

2. Name der Antragstellerin, dienstliche Stellung und Adresse

Sabine Windhorst, Prof. Dr. rer. nat.
AG Leiterin, Wissenschaftlerin
geb. 11.09.1968, deutsch
Institut für Biochemie und Signaltransduktion
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Martinistrasse 52
20246 Hamburg
Tel.: 040-7410-56013
Fax: 040-7410-56818
e-mail: s.windhorst@uke.de
Privatadresse: Am Ochsenzoll 123, 22851 Norderstedt
Tel.: 0151/57433104

3. Zeitraum

Januar bis Dezember 2025

Datum und Unterschrift der Projektleiterin



Hamburg, 27.05.2026

Prof. Dr. Sabine Windhorst

4. Zusammenfassung

Proteine, die den Prozess der Metastasierung direkt kontrollieren, stellen besonders interessante Zielmoleküle für die Therapie aggressiver Tumoren dar. Zu diesen Proteinen zählen Aktinbindepoteine (ABPs), da sie die Zytoskelettdynamik während der Tumorzellmetastasierung direkt regulieren. Der Fokus unserer Arbeitsgruppe liegt darauf, den Mechanismus der onkogenen Aktivität von ABPs aufzuklären, ihre klinische Relevanz zu untersuchen und schließlich Substanzen zu entwickeln, die die Aktinbindung dieser Proteine inhibieren.

In diesem Zusammenhang haben wir in den vergangenen Jahren eine Reihe von ABPs analysiert und arbeiten mittlerweile an der Entwicklung von Molekülen zur Hemmung von ABPs in Tumorzellen. Der vielversprechendste Ansatz ist derzeit die Anwendung synthetischer Nanobodies (Sybodies). Es ist uns bereits gelungen, einen hochaffinen Sybody gegen Cofilin-1 herzustellen, ein Protein mit klar gefalteter und gut definierter aktinbindender Domäne. Gegen solche ABPs lassen sich Sybodies gut selektieren.

Allerdings gibt es auch ABPs mit kurzen, unstrukturierten aktinbindenden Domänen (ABDs), beispielsweise im ITPKA-Molekül. Ziel dieses Projekts war es, Sybodies gegen solche „Short Linear Motifs“ (SLiMs) herzustellen. Hierzu planten wir, unsere gut etablierte Pipeline zur Produktion von Sybodies anzupassen und aufbauend auf unseren Vorarbeiten zu optimieren. Im Detail sah der Arbeitsplan wie folgt aus:

1. Die ITPKA-ABD (das „SLiM“) sollte zweimal hintereinander, verbunden durch einen Linker, exprimiert werden, um die Proteingröße zu erhöhen (Tandem-ITPKA-ABD). Ein ITPKA-ABD-Protein umfasst 66 Aminosäuren; zusammen mit den Linker-Aminosäuren ergibt sich eine Proteingröße von etwa 140 Aminosäuren. Dieses Konstrukt sollte verwendet werden, um die Sybody-Library zu screenen.
2. Wir hatten bereits festgestellt, dass ITPKA-ABD unspezifisch an den Boden von ELISA-Platten bindet. Aus diesem Grund sollte die letzte Selektionsrunde der Sybodies nicht mittels ELISA durchgeführt werden. Stattdessen sollten die Myc-getaggten Sybodies an antikörpergebundene Sepharose A gekoppelt und lösliches Tandem-ITPKA-ABD hinzugegeben werden. Die Bindung der Sybodies an Tandem-ITPKA-ABD sollte schließlich mittels Western Blot unter Verwendung eines Anti-ITPKA-Antikörpers überprüft werden.

Obwohl alle durchgeführten Experimente technisch erfolgreich waren, gelang es nicht, spezifische Sybodies gegen ITPKA zu produzieren. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen: (1) Für die erfolgreiche Produktion von Sybodies gegen Cofilin-1 wurde der Phage-Display-Schritt in Kooperation mit einer Arbeitsgruppe am CSSB durchgeführt. Da der Vertrag unserer Kooperationspartnerin ausgelaufen war, arbeiteten wir mit einem anderen, weniger erfahrenen Wissenschaftler zusammen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass hierbei Fehler auftraten, die für uns nicht nachvollziehbar waren. (2) Die Struktur der ITPKA-ABD eignet sich möglicherweise grundsätzlich nicht für die Interaktion mit Sybodies. Um die Ursache hierfür zu untersuchen, planen wir, die Sybody-Pipeline zunächst erneut mit Cofilin-1 zu testen und anschließend nochmals mit der ITPKA-ABD durchzuführen. Hierzu beabsichtigen wir, den Phage-Display-Schritt in unserem Labor zu etablieren.

5. Bericht über die Ergebnisse

Im ersten Schritt galt es, die Tandem-ITPKA-ABD zu klonieren und Mutationen einzuführen, um die Dimerisierung der ITPKA-ABD zu verhindern. Anschließend sollte das Protein in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden. Diese Schritte waren erfolgreich. In Abbildung 1 ist der letzte Reinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC) dargestellt.

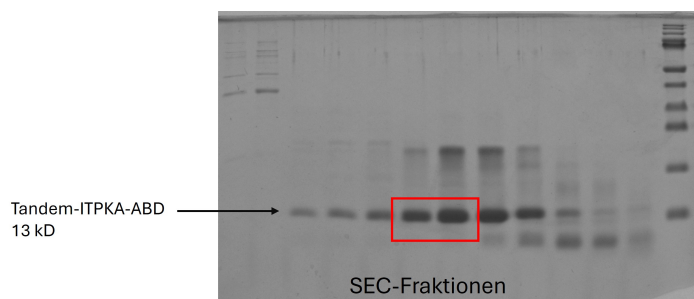


Abbildung 1. Reinigung von Tandem-ITPKA-ABD per Size Exclusion Chromatographie (SEC). Gezeigt sind die unterschiedlichen Fraktionen, die per SDS-PAGE analysiert wurden. Die eingerahmten Fraktionen wurden vereinigt und per Amicon konzentriert.

Die in Abbildung 1 markierten Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und das Protein biotinyliert. Der Erfolg der Biotinylierung wurde mittels Massenspektrometrie überprüft. Anschließend wurde das Protein für die Selektion von Sybodies wie folgt verwendet:

1. Die biotinylierte Tandem-ITPKA-ABD wurde an Strep-Tactin-Beads gekoppelt und mit dem mRNA/Ribosom/Peptid-Komplex (Sybody) inkubiert sowie anschließend gewaschen. Dadurch blieben ausschließlich jene Sybodies gebunden, die die ITPKA-ABD selektiv erkennen. Da der gesamte Komplex einschließlich der mRNA an die Beads gebunden blieb, konnte die Sybody-mRNA mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben werden.
2. Diese cDNA wurde für weitere Selektionsrunden in eine Phagenbibliothek kloniert. Im nächsten Schritt wurden die vorselektierten Sybodies auf der Oberfläche von Phagen exprimiert und mit Tandem-ITPKA-ABD-Biotin-Beads inkubiert. Die an die Beads gebundenen Phagen wurden anschließend in Bakterien transformiert, vermehrt und die von den Phagen exprimierten Sybodies isoliert. Dieser Schritt wurde von einem Kooperationspartner durchgeführt.
3. Anschließend wurde der angereicherte Sybody-Pool in den Vektor *pSb_init* kloniert, um die Sybodies mit einem Myc-His-Tag zu versehen. Die Sybodies wurden anschließend an einen Myc-Antikörper gebunden, der an Sepharose A gekoppelt war. Abweichend vom ursprünglichen Protokoll wurde die Sepharose anschließend mit löslicher Tandem-ITPKA-ABD inkubiert. Nach intensivem Waschen der Beads wurde die Bindung mittels Western Blot unter Verwendung eines Anti-ITPKA-Antikörpers überprüft. Hierzu wurden acht unterschiedliche Sybodies (#1–#8) ausgewählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt. Die Sybodies #1–3 sowie #6–8 zeigten schwache bis starke Signale und wurden daher für weitere Analysen ausgewählt.



Abbildung 2. Bindung von Tandem-ITPKA-ABD an Sybody-Beads. Acht unterschiedliche, an Beads gekoppelte Sybodies wurden mit Tandem-ITPKA-ABD inkubiert. Nach dem Waschen der Beads wurde das gebundene Protein mit SDS-Probenpuffer eluiert und mittels Western Blot unter Verwendung eines Anti-ITPKA-Antikörpers analysiert.

Im nächsten Schritt wurde die cDNA der Sybodies sequenziert und eine AlphaFold-Prädiktion der Tandem-ITPKA-ABD–Sybody-Komplexe durchgeführt (Abbildung 3). Zur Bewertung der Vorhersagequalität wurden der predicted TM-score (pTM) sowie der interface predicted TM-score (ipTM) bestimmt.

Der pTM-Score bewertet, wie plausibel die Gesamtstruktur ist. Ein Wert von $> 0,7$ weist auf eine gute Qualität hin, $0,5–0,7$ gilt als brauchbar und $< 0,5$ als problematisch. Der ipTM-Score bewertet die Qualität der Protein-Protein-Interaktion. Ein Score von $> 0,8$ spricht für eine starke Evidenz einer Interaktion, $0,6–0,8$ liegt im mittleren Bereich, und $< 0,6$ deutet darauf hin, dass keine stabile Interaktion vorliegt.

Wie in Abbildung 3 dargestellt, liegen alle Scores im niedrigen Bereich, was darauf hindeutet, dass Tandem-ITPKA-ABD unspezifisch an die Beads bindet, jedoch keine spezifische Interaktion mit den Sybodies stattfindet.

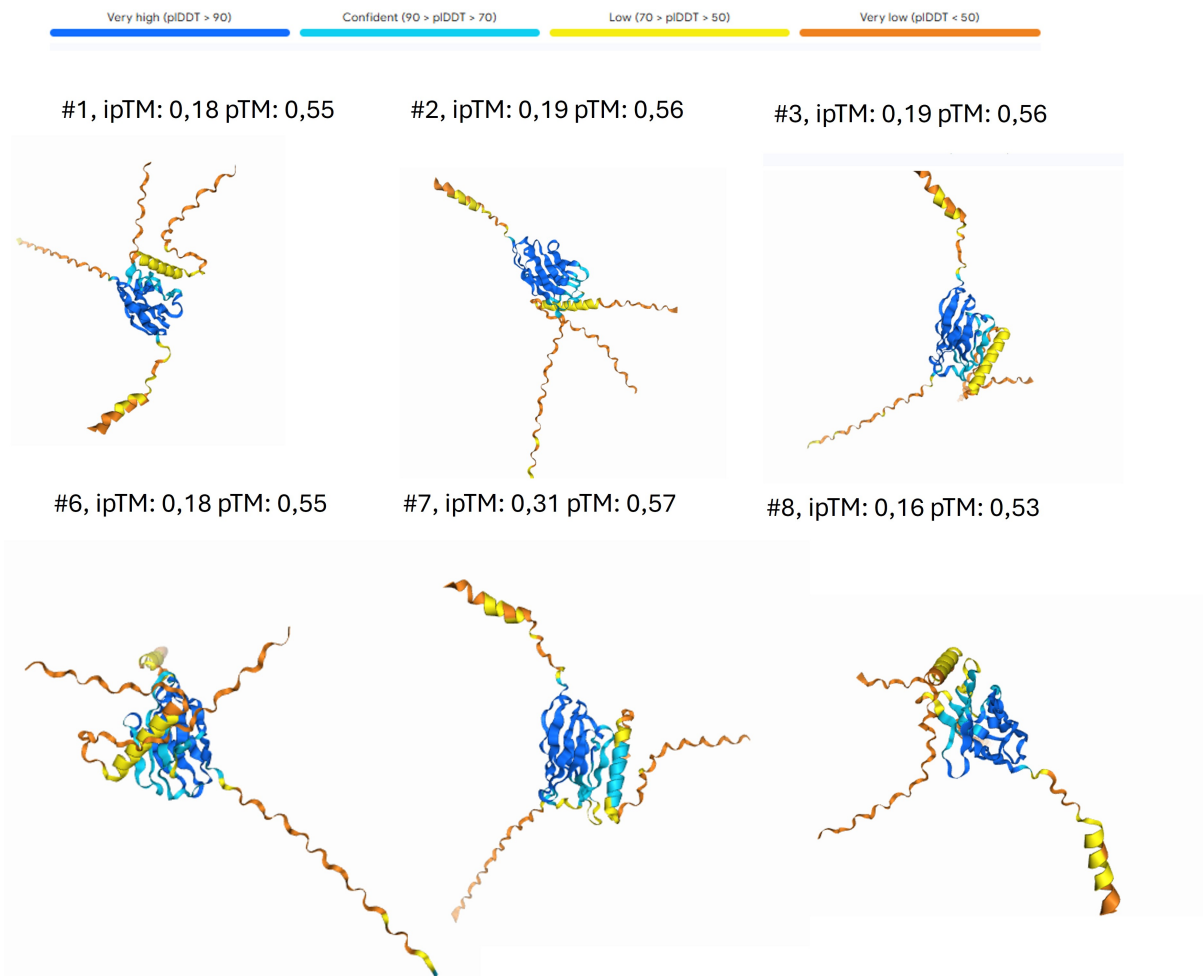


Abbildung 3. AlphaFold-Vorhersage der Interaktion zwischen Tandem-ITPKA-ABD und Sybodies. Die zentralen Bereiche stellen die Sybodies dar, während die peripheren Strukturen den beiden Helices der Tandem-ITPKA-ABD entsprechen. Der Farbcodierungsmaßstab (oben) gibt die Vorhersagegenauigkeit an.

Um abschließend zu prüfen, ob die Sybodies tatsächlich nicht binden, wurden sie in Bakterien exprimiert, gereinigt und die Interaktion mit ITPKA mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht. In Abbildung 4 ist als Positivkontrolle die ITC-Messung von Cofilin-1 und Sybody B12 (aus Paraschiakos et al., 2025) sowie eine exemplarische Messung der Sybodies #1–8 dargestellt (alle Messungen zeigten das gleiche Ergebnis).

Die ITC-Messung von Cofilin-1 und Sybody B12 zeigt einen kontinuierlichen Anstieg der freigesetzten Wärme (kcal/mol) bis zur Sättigung. Diese Wärme entsteht durch die Interaktion zwischen Cofilin-1 und Sybody B12; die Reaktion ist somit exotherm.

Die ITC-Messung zwischen Tandem-ITPKA-ABD und Sybody #7 zeigt hingegen über den gesamten Verlauf keine Veränderung der Wärmeentwicklung. Daraus lässt sich schließen, dass keine Interaktion zwischen Tandem-ITPKA-ABD und Sybody #7 stattgefunden hat, was die Ergebnisse der AlphaFold-Vorhersage bestätigt.

Zusammenfassend gelang es auch mit einer alternativen Methode nicht, Sybodies gegen die ITPKA-ABD zu selektieren.

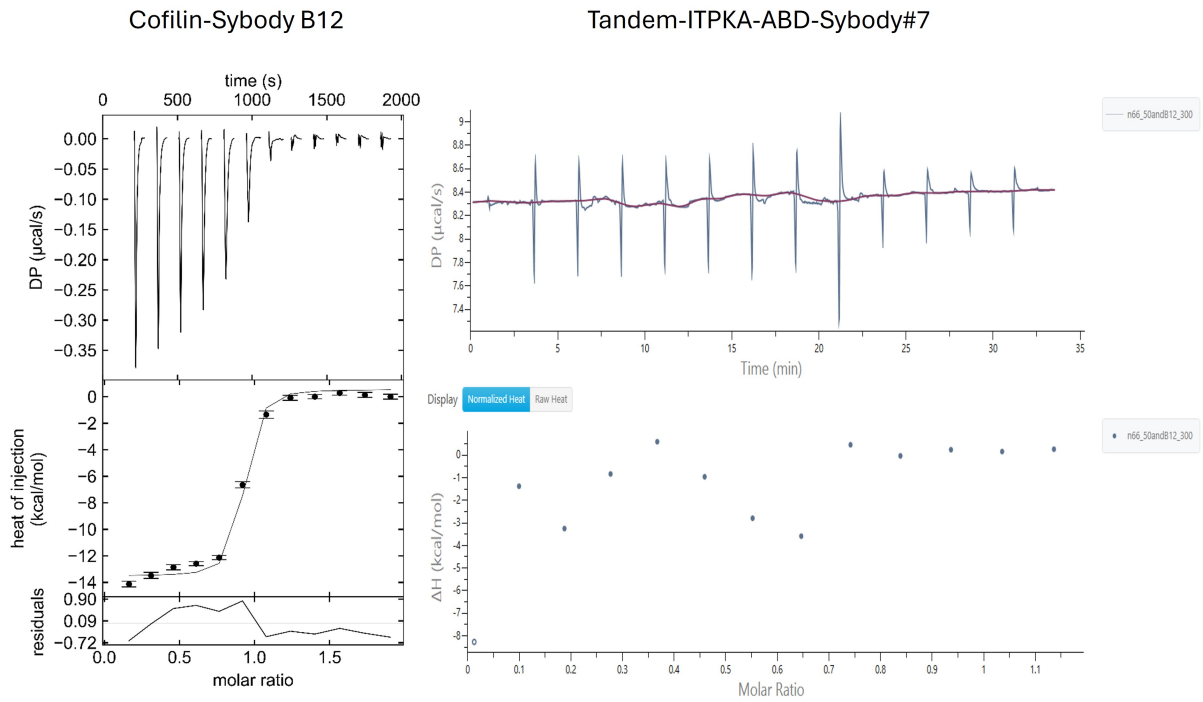


Abbildung 4. ITC-Messungen. Die linke Abbildung zeigt die ITC-Messung zwischen Cofilin und Sybody B12 (Paraschiakos et al., 2025). Die rechte Abbildung zeigt die ITC-Messung zwischen Tandem-ITPKA-ABD und Sybody #7.