

Neuartige Bindemoleküle für die Diagnostik auf der Grundlage eines Strukturproteins

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Hilmar Ebersbach

geboren am 07. Februar 1975 in Halle

Gutachter:

1. Prof. Dr. Rainer Rudolph
2. Prof. Dr. Hans-Joachim Fritz
3. Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag und Ort der öffentlichen Verteidigung: Halle/Saale, den 27.10.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000007513

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007513>]

Abkürzungen

A _{xxx}	Absorption bei Wellenlänge xxx
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
b _{γc}	bovines γ -Kristallin
Cam	Chloramphenicol
CD	Circulardichroismus
CDR	<i>Complementarity Determining Regions</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F _{ab}	Antigenbindendes Fragment aus der variablen und konstanten Domäne eines Antikörpers
F _v	Antigenbindendes Fragment aus der variablen Domäne eines Antikörpers
GdmHCl	Guanidinium Hydrochlorid
Gl.	Gleichung
GSH	Glutathion, reduziert
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HRP	Meerretich Peroxidase
h _{γc}	humanes γ -Kristallin
Ig	Immunglobulin
IMAC	immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-galactopyranosid
Kan	Kanamycin
K _D	Dissoziationskonstante
LMW	<i>low molecular weight marker</i>
MK	monoklonal
min	Minute

moi	<i>multiplicity of infection</i>
M _w	Mittelwert
n.b.	nicht bestimmt
NHS	N-hydroxysuccinimid
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD _λ	Optische Dichte bei der Wellenlänge λ
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PK	polyklonal
POD	Meerrettich-Peroxidase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S.	Seite
scF _v	Durch genetische Fusion erhaltenes antigenbindendes Fragment aus der variablen und konstanten Domäne eines Antikörpers
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SPR	Oberflächenplasmonresonanz
SV	Säulenvolumen
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
™	Trademark
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tri(hydroxymethyl)-aminomethan
v	Volumen
V _{H/L}	Variable Domäne der schweren bzw. leichten Kette eines Antikörpers
w	Gewicht
WT	Wildtyp

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 Antikörper und deren Einsatzgebiete.....	1
1.1.1 Architektur von Antikörpern	1
1.1.2 Einsatzgebiete von Antikörpern	2
1.1.3 <i>in vitro</i> Selektion von Antikörpern.....	5
1.1.4 Antikörperfragmente und deren Eigenschaften	7
1.2 Alternative Bindemoleküle	9
1.3 γ-Kristallin als <i>scaffold</i> für ein alternatives Bindemolekül.....	12
1.4 Zielstellung der Arbeit	15
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien.....	16
2.1.2 Chromatographiematerialien	17
2.1.3 Sonstige Materialien	18
2.1.4 Puffer und Lösungen	18
2.1.4.1 Puffer für die Chromatographie.....	18
2.1.4.2 Sonstige Puffer und Lösungen.....	19
2.1.5 Primer und Plasmide.....	19
2.1.5.1 Primer	19
2.1.5.2 Plasmide	21
2.1.6 Enzyme, Proteine und Antikörper	21
2.1.7 Mikroorganismen	22
2.1.8 Nährmedien	23
2.1.9 Standards und Kits.....	23
2.1.10 Geräte	24

2.2 Methoden	25
2.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> und Expression von Fremdproteinen	25
2.2.1.1 Schüttelkultur	25
2.2.1.2 <i>Deep-well</i> -Kultur.....	25
2.2.1.3 Fed-Batch-Fermentation auf Vollmedium.....	25
2.2.2 Selektion von Bindemolekülen mittels <i>Phage Display</i>	26
2.2.2.1 Herstellung von Helferphagen.....	26
2.2.2.2 Anzucht der Phagen.....	27
2.2.2.3 Bestimmung des Titers von Phagen	27
2.2.2.4 Panning	27
2.2.2.5 Anzucht von Einzelphagen.....	28
2.2.3 Molekularbiologische Techniken	29
2.2.3.1 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	29
2.2.3.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	29
2.2.3.3 Dephosphorylierung von DNA.....	29
2.2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.2.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten.....	30
2.2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.3.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	30
2.2.3.8 Ortsspezifische Mutagenese von Plasmid-DNA	30
2.2.3.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	31
2.2.3.10 Transformation von <i>E. coli</i> mit rekombinanter DNA.....	31
2.2.4 Proteinchemische Methoden	32
2.2.4.1 Zellaufschluss	32
2.2.4.2 Proteinreinigung durch Metallchelat-Affinitätschromatographie.....	32
2.2.4.3 Proteinreinigung durch Gelfiltration	33
2.2.4.4 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie an Protein A.....	33
2.2.4.5 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie an Avidin	33
2.2.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	34
2.2.4.7 Western Blotting.....	34
2.2.4.8 Aufkonzentrierung von Proteinen und Dialyse	35
2.2.4.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	35
2.2.4.10 Bestimmung freier Thiolgruppen	35
2.2.4.11 Kopplung von Oyster556 an primäre Amine von Proteinen	36
2.2.4.12 Kopplung von Phycoerythrin an freie Cysteine von Proteinen	36
2.2.5 Biophysikalische Analysen	36
2.2.5.1 Chemisch induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge.....	36

2.2.5.2 pH induzierte Entfaltungsübergänge	37
2.2.5.3 Temperatur induzierte Entfaltungsvorgänge	37
2.2.5.4 Differential Scanning Calorimetry (DSC)	38
2.2.5.5 CD-Spektroskopie	38
2.2.5.6. Analytische Ultrazentrifugation	39
2.2.5.7 Bindungsnachweis mittels <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	39
2.2.5.8 Bindungsnachweis mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR)	39
2.2.5.9 Untersuchungen zur Clearance	40
2.2.7 Methoden der Strukturanalyse.....	41
2.2.7.1 Kristallisation	41
2.2.7.2 Datensammlung.....	41
2.2.7.3 Modellierung und kristallographische Verfeinerung.....	41
3 ERGEBNISSE	42
3.1 Selektion der bovinen Bibliothek GCUC1 gegen IgG-Fc	42
3.1.1 <i>panning</i> und Phagen-ELISA.....	42
3.1.2 Charakterisierung der bovinen IgG-Fc- bindenden Affilin™-Varianten	45
3.1.3 Nachweis der Bindung mittels Oberflächenplasmonresonanz	48
3.2 Selektion der humanen Bibliothek CR20 gegen IgG-Fc	50
3.2.1 Selektion gegen IgG-Fc und Isolierung bindender Varianten	50
3.2.2 Bindungsanalyse der isolierten Varianten aus der ersten Selektion.....	51
3.2.3 Zweite Selektion gegen IgG-Fc.....	56
3.2.4 Bindungsanalyse der Varianten aus der zweiten Selektion gegen IgG-Fc.....	58
3.3 Selektion der humanen Bibliothek CR20 gegen IgM-Fc	61
3.3.1 Isolierung und Charakterisierung IgM-Fc bindender Varianten	61
3.3.2 Analyse der angereicherten Varianten aus der Selektion gegen IgG- und IgM-Fc.....	64
3.4 Fermentation, Expression und Reinigung von Affilin™-Varianten	65
3.5 Biochemische Charakterisierung einzelner Affilin™-Varianten.....	67
3.5.1 Stabilität gegenüber denaturierenden Agenzien.....	68
3.5.2 Thermische Stabilität.....	69
3.5.3 pH-Stabilität der Proteine	73
3.5.4 Stabilität in Serum	74
3.5.5 Untersuchungen zur <i>Clearance</i>	76

3.6 Kopplung und Markierung von AffilinTM-Varianten	77
3.6.1 <i>In vivo</i> Biotinylierung.....	78
3.6.3 Ungerichtete Kopplung an einen Fluoreszenz-Farbstoff.....	79
3.6.3 Gerichtete Kopplung an einen Fluoreszenzfarbstoff.....	81
3.6.4 Ungerichtete Kopplung an Peroxidase	85
3.7 Strukturaufklärung	87
3.7.1 Strukturaufklärung des humanen γ -Kristallin.....	87
3.7.2 Strukturaufklärung eines IgG-Fc bindenden Affilin TM	90
3.7.3 Kokristallisation des Komplexes aus IgG-Fc und Affilin TM	93
4 DISKUSSION	96
4.1 Isolierung von Immunglobulin bindenden AffilinTM-Varianten	96
4.1.1 Vergleich der γ -Kristallin Bibliotheken mit anderen Bibliotheken.....	96
4.1.2 Einfluss der Bibliothek auf die Qualität der Bindemoleküle.....	99
4.1.3 Möglichkeiten zur Erhöhung der Affinität von Bindemolekülen.....	100
4.2 Vergleich der Stabilität von AffilinTM-Varianten	103
4.2.1 Experimentell ermittelte Stabilitäten von Affilin TM im Vergleich mit anderen Bindemolekülen.....	103
4.2.2 Kraftfeldtheorien zur Bestimmung von theoretischen Stabilitäten	108
4.3 Eigenschaften der potentiellen Bindungsstelle	110
4.4 Anwendbarkeit von AffilinTM-Varianten.....	114
5 ZUSAMMENFASSUNG	119
6 LITERATURVERZEICHNIS	121

ANHANG

1 Einleitung

1.1 Antikörper und deren Einsatzgebiete

1.1.1 Architektur von Antikörpern

Antikörper sind die wichtigsten Funktionsträger der humoralen Immunantwort bei höheren Vertebraten. Sie besitzen die Fähigkeit, immunogene Strukturen hochspezifisch zu binden und Effektorfunktionen zu vermitteln. Dazu zählt die Aktivierung des Komplementsystems oder die Induktion der Phagozytose (Janeway & Traves, 1995).

Antikörpermoleküle setzen sich aus vier Untereinheiten zusammen - je zwei identisch leichte (L-Kette, ca. 25 kDa) und zwei identisch schwere (H-Kette, ca. 50 kDa) Polypeptidketten (Abb. 1). Antikörper werden in fünf Hauptklassen unterteilt, die sich anhand ihrer schweren Ketten den Isotypen IgG, IgM, IgA, IgE und IgD zuordnen lassen. Die einzelnen Ketten falten repetitiv in mehrere kompakte Immunglobulindomänen mit einer Größe von ca. 110 Aminosäuren. Diese Domänen besitzen vorwiegend eine antiparallele β -Faltblattstruktur und werden jeweils durch eine zentrale Disulfidbindung stabilisiert. Die leichten Ketten bestehen aus einer variablen (V_L) und einer konstanten (C_L) Domäne, die schweren Ketten aus einer variablen (V_H) und mehreren konstanten Domänen (C_{H1} bis C_{H3} bzw. bis C_{H4}). Zwischen der C_{H1} - und der C_{H2} -Domäne befindet sich eine Scharnier-Region (*hinge*), von der ausgehend die beiden schweren Ketten durch zwei oder drei Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft sind.

Die Eigenschaft der Immunglobuline, strukturell völlig verschiedenartige Antigene spezifisch zu binden, ist auf ihre molekulare Architektur zurückzuführen (Padlan, 1994). Die Erkennung bzw. Bindung des Antigens wird von den variablen Domänen der leichten und der schweren Kette gemeinsam vermittelt. Die Struktur der variablen Domäne weist konservierte Bereiche auf, die von insgesamt neun β -Faltblattsträngen gebildet werden. Die β -Faltblattstränge werden in jeder variablen Domäne durch drei hypervariable *loops*, so genannte *Complementarity Determining Regions* (CDRs), miteinander verbunden. Die Aminosäuren der insgesamt sechs CDRs bilden mit ihren Wechselwirkungen zum Antigen die eigentliche Antigenbindungsstelle.

Die strukturelle Vielfalt der Antigenbindungsstelle hat ihre Ursache auf genetischer Ebene. Sie beruht im wesentlichen auf der somatischen Rekombination von Gensegmenten der V_L -Domäne bzw. der V_H -Domäne und findet im Verlauf der B-Zellreifung statt (Tonegawa,

1983; Manser *et al.*, 1987). Allein durch die dabei möglichen Kombinationen der vorhandenen Keimbahn-Gensegmente können 10^8 bis 10^{10} unterschiedliche Antikörpermoleküle entstehen (Tonegawa, 1983). Des Weiteren unterliegen die Antikörpergene im Zuge der adaptiven Immunantwort einer Affinitätsmaturierung durch somatische Hypermutation (Parham, 1998). Dabei werden mit hoher Rate Punktmutationen gezielt in diejenigen Bereiche der exprimierten Antikörpergene eingeführt, die für die CDRs kodieren.

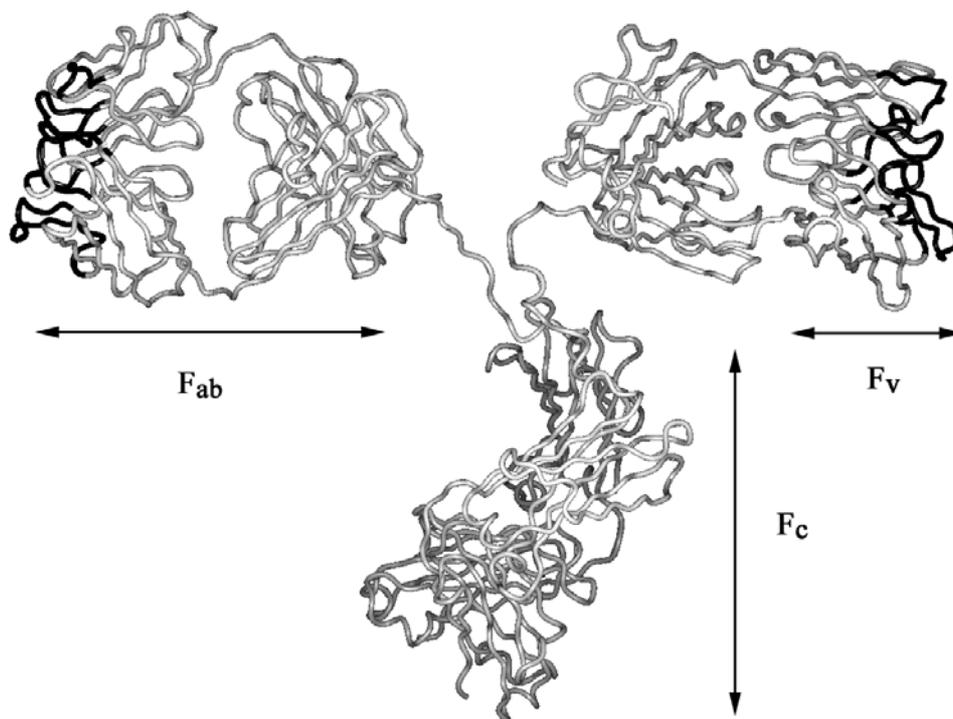


Abbildung. 1: Die dreidimensionale Struktur eines Antikörpers der Klasse IgG1. C α -Darstellung des monoklonalen Antikörpers Mab231 (PDB-Code: 1igt; Harris *et al.*, 1997). Die Antigenbindungsstelle ist in schwarz dargestellt. (Mit freundlicher Genehmigung von Markus Fiedler; Fiedler, 2003).

1.1.2 Einsatzgebiete von Antikörpern

Aufgrund ihrer universellen Bindungseigenschaften finden Immunglobuline in der Analytik, der medizinischen Diagnostik und der Humantherapie eine breite Anwendung. So werden mit Hilfe der ELISA-Technik und Antikörpern in medizinischen Analytiklabors routinemäßig Blutkonserven auf relevante Krankheitserreger untersucht. Dabei werden polyklonale Antikörper, ein Gemisch von Antikörpern mit verschiedenen Bindungsepitopen, am häufigsten eingesetzt.

Es gibt aber auch Bestrebungen, neben der bewährten ELISA-Technik neue Methoden in der Diagnostik zu etablieren, die sich durch höhere Sensitivität, geringere Kosten und kürzere Bearbeitungszeiten auszeichnen. Von mehreren Firmen, wie z. B. Qiagen GmbH oder Bio-Rad Laboratories GmbH, wird versucht, auf der Basis der Luminex[®] xMAP[™]-Technologie Nachweistests zu entwickeln. Diese Technologie sollte im Rahmen dieser Arbeit in Bezug auf ihre Anwendbarkeit für Scil Proteins GmbH getestet werden und wird daher im Folgenden näher beschrieben.

Grundlage der Luminex[®] xMAP[™]-Technologie sind mikroskopisch kleine sphärische Polystyrolpartikel, so genannte Mikrosphären oder *beads*, die in ihrem Inneren zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe enthalten (<http://www.Luminexcorp.com>). Die Variation von verschiedenen Anteilen der beiden Farbstoffe definiert spektral eindeutig unterscheidbare Populationen von *beads*. Derzeit sind einhundert verschiedene Mikrosphären-Typen verfügbar. Jede Spezies der verschiedenen *beads* kann mit einem spezifischen Nachweisreagenz oder Antigen durch einfache Kopplungschemie beschichtet werden (Joos *et al.*, 2002). Auf diese Weise wird es theoretisch möglich, bis zu einhundert verschiedene Nachweisreaktionen simultan in einer Probe durchzuführen; derzeit etabliert sind bis zu 30 (Biagini *et al.*, 2004). Bei Inkubation mit wenigen Mikrolitern einer Probe bindet jede Mikrosphärenpopulation mit dem entsprechend beschichteten Nachweisreagenz ihr spezifisches Zielmolekül. Die auf der Oberfläche der Mikrosphären gebundenen Zielmoleküle werden von einem spezifischen Detektionsmolekül, welches einen grünen Fluoreszenzmarker trägt, auch als Reporter bezeichnet, erkannt (Abb. 2). Im Luminex[®]100-Analysegerät werden Tausende von Mikrosphären innerhalb von Sekunden individuell ausgewertet (Dasso *et al.*, 2002). Ein erster Laser im Gerät dient der Anregung der roten Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb der *beads*, die aufgrund ihrer Fluoreszenzemission klassifiziert werden. Durch einen zweiten Laser wird der grüne Fluoreszenzfarbstoff des Reporters angeregt und die Intensität des emittierten Lichts wird aufgezeichnet. Mit Hilfe des ersten Lasers wird also die Identität des Antigens spezifiziert, während durch den zweiten Laser qualitativ und quantitativ die gebundenen Antikörper nachgewiesen werden.

Innerhalb von weniger als 3 Stunden können mit dieser Technologie bis zu 9.600 diagnostische Tests in einer einzigen 96-Well Mikrotiterplatte durchgeführt werden. Die Luminex[®]-Technologie bietet gegenüber konventionellen Verfahren, wie z. B. ELISA entscheidende Vorteile (Pickering *et al.*, 2002). So erfolgt der Nachweis in einem *well* ohne Waschschrte, womit kürzere Bearbeitungszeiten und geringere Kosten verbunden sind. Aufgrund der sehr hohen Sensitivität benötigt man nur geringste Mengen an Probe und der

Prozess ist vollständig automatisierbar. Die Luminex[®]-Technologie ist daher besonders für Hochdurchsatzanwendungen in den Bereichen der Labordiagnostik (Dunbar *et al.*, 2003; Opalka *et al.*, 2003) und für pharmakologische *screenings* (Hu *et al.*, 2004) sowie Genexpressionsstudien (Yang *et al.*, 2001) geeignet.

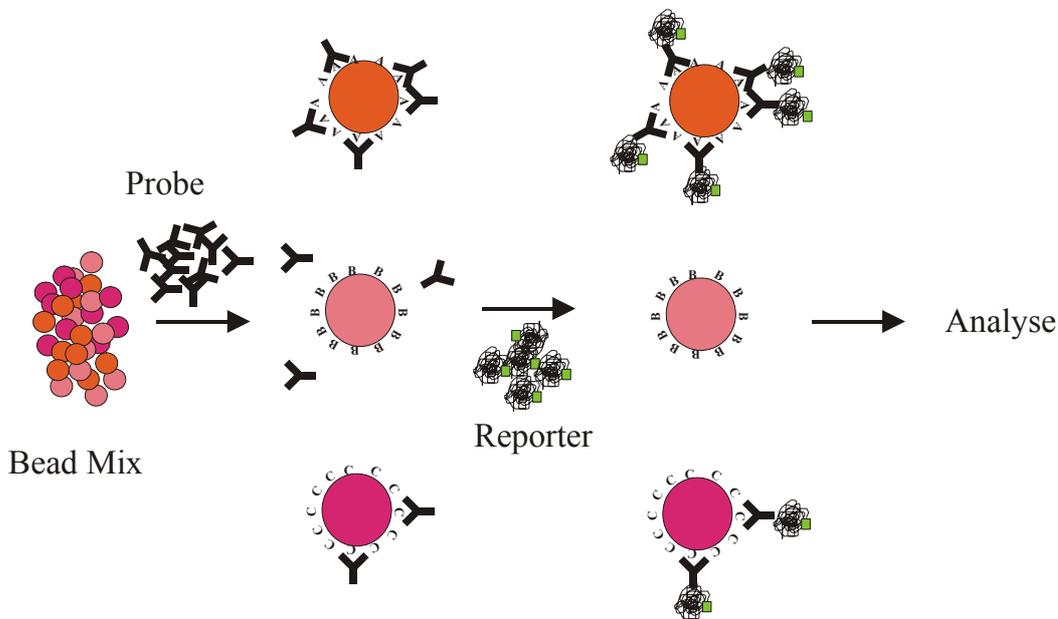


Abbildung. 2: Schematische Darstellung der Bindung und des Nachweises von Molekülen in einem Luminex[®] Assay. Abgebildet sind drei unterschiedliche *bead* Spezies (**Bead Mix**) mit jeweils einem immobilisierten Antigen (**A**, **B** und **C**). Die aus einer Serumprobe (**Probe**) gegen die entsprechenden Antigene gebundenen Antikörper werden von F_{ab}-Phycoerythin-Konjugat (**Reporter**) mit Affinität gegenüber humanen IgG-Fc erkannt und in einem Luminex[®]-Analyse-Gerät qualitativ und quantitativ nachgewiesen (**Analyse**).

Eine ganze Reihe von Antikörpern wird mittlerweile therapeutisch eingesetzt. Der erste zugelassene monoklonale Antikörper war 1997 Rituxan[®]. Dieser Antikörper bindet spezifisch an den B-Zellmarker CD20 und wird Patienten mit *non-Hodgkin's lymphoma* verabreicht (White, 2003; Forero & Lobuglio, 2003). Zevalin[®] ist ebenfalls ein monoklonaler anti-CD20 Antikörper, der mit dem Isotop ⁹⁰Y markiert ist und in der Radioimmuntherapie eingesetzt wird (Hernandez & Knox, 2003). Das Therapeutikum Herceptin[®], ein monoklonaler Antikörper mit Affinität zur extrazellulären Domäne des humanen, epidermalen Wachstumsfaktors 2 (Her2), wurde 1998 zur Behandlung von Brustkrebs zugelassen. Mit der Bindung an Her2 wird die Proliferation der Krebszellen unterdrückt (Menard *et al.*, 2003). Weiterhin wird versucht, die Verwendung von Antikörper als Immunotoxine zu etablieren (Pastan & Kreitman, 2002).

Auch in der Chromatographie finden Antikörper eine breite Anwendung. So werden sie zum einen an Chromatographiematrix gekoppelt um sie anschließend zur Reinigung von Proteinen

mittels Affinitätschromatographie einzusetzen. Ein anderes Anwendungsgebiet ist die Plasmaphorese. Bei dieser Methode werden spezifisch Autoimmun-Antikörper oder Immunkomplex aus dem Blut von betroffenen Patienten abgereichert (Madore, 2002; Schneider, 1998).

Antikörper sind also die in der Diagnostik, der Therapie und der Chromatographie am häufigsten eingesetzten Bindemoleküle, die auch in neu etablierten Methoden, wie z. B. Luminex[®]-Technologie Anwendung finden.

1.1.3 *in vitro* Selektion von Antikörpern

Der moderne Einsatz der Immunglobuline als universelle Bindemoleküle wurde erst praktikabel, nachdem das Methodenspektrum zur Herstellung von Antikörpern und deren Fragmenten nach der klassischen Hybridomtechnik (Kohler & Milstein, 1975) durch deren effiziente funktionelle Produktion in *E. coli* erweitert wurde (Skerra & Pluckthun, 1988). Einen weiteren Meilenstein in der Entwicklung von Antikörpern für eine therapeutische Anwendung war die Herstellung vollständig humaner Antikörper in der Maus mit Hilfe der Xenomouse[®] Technologie (He *et al.*, 2002; Green, 1999; <http://www.abgenix.com>).

Durch *protein engineering* von Antikörpern, vor allem durch Einsatz des *Phage Displays* (Smith, 1985; McCafferty *et al.*, 1990), ist es möglich geworden, maßgeschneiderte Bindungsproteine zu kreieren. Der Einsatz kombinatorischer Antikörper-Bibliotheken ermöglicht heutzutage die Generierung quasi humaner Immunglobuline mit spezifischen Bindungseigenschaften *in vitro* (Knappik *et al.*, 2000).

Die Grundlage aller bekannten Systeme zur Durchmusterung von Proteinbibliotheken ist die Kopplung von Phänotyp und Genotyp einzelner Protein-Varianten. Derzeit finden vier unterschiedliche Verfahren Anwendung - das *Phage Display* (Smith, 1985; McCafferty *et al.*, 1990), das *Ribosome Display* (Hanes & Pluckthun, 1997), das *mRNA Display* (Roberts & Szostak, 1997) und das *Bacterial* und *Yeast Surface Display* (Samuelson *et al.*, 2002; Boder & Wittrup, 1997). Die *Phage Display*-Technologie hat aufgrund der gut etablierten Methodik und einer robusten und einfachen Handhabung die weiteste Verbreitung gefunden und wurde auch im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

Den Grundstein legte Smith (1985) durch die Konstruktion eines Fusionsproteins aus einem Peptidsegment der Restriktionsendonuklease *EcoRI* und dem *minor capsid protein* pIII von filamentösen Phagen der fd/M13-Familie (Übersicht in Model & Russel, 1988). Dabei konnte

die funktionelle Präsentation des Peptid-Antigens auf der Oberfläche des filamentösen Phagen durch Verwendung eines gegen *EcoRI* gerichteten Antikörpers demonstriert werden.

Um mit Hilfe der *Phage Display*-Methode auf gewünschte Eigenschaften einzelner Vertreter aus einer Bibliothek zu selektieren, werden die Varianten auf der Oberfläche von Phagemiden präsentiert. Dazu wird die entsprechende Genbibliothek in einen Phagemidvektor ligiert, so dass die einzelnen Varianten als Fusion mit dem Phagenhüllprotein pIII exprimiert werden (Hoogenboom *et al.*, 1991; Wells & Lowman, 1992). Zur Propagierung der Phagen mit dem entsprechenden Fusionsprotein auf der Oberfläche werden *E. coli*-Zellen mit den Phagemid-Vektoren transformiert und anschließend mit Helferphagen infiziert (Abb. 3). Im Weiteren Verlauf wird der Phagemid-Vektor in einzelsträngiger Form in die Phagen verpackt.

Hauptsächlich werden die nativen Hüllproteine des Helferphagen produziert. Bei geeigneter Genregulation wird dann bei etwa 10 % der Phagen eine der fünf Kopien des Hüllproteins pIII durch ein Fusionsprotein ersetzt und ca. 1 % der Phagen präsentieren zwei Kopien des Fusionsproteins auf der Oberfläche (Lowman *et al.*, 1991; Bradbury *et al.*, 1993; Kretzschmar *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass Phagen, die bindungsaktive Proteindomänen oder Peptide auf ihrer Oberfläche präsentieren, durch Affinitätsanreicherung von nativen Phagen ohne Fusionsprotein abgetrennt werden können (Parmley & Smith, 1988).

Zur Selektion bindungsaktiver Varianten wird die Gesamtheit einer Phagemid-Bibliothek einem Selektionsprozess (*panning*) zugeführt, bei dem Phagen mit den gewünschten Bindungseigenschaften aufgrund ihrer Affinität zu dem immobilisierten Zielmolekül von nicht bindenden Phagen abgetrennt werden (Abb. 3). Die gebundenen Phagen werden eluiert und können *E. coli*-Zellen reinfizieren. Dabei übertragen sie die verpackte Phagemid-DNA auf die infizierte Zelle. Für die Reinfektion eignen sich nur Stämme, die das Gen für die Ausbildung eines Pilus besitzen. Das Phagenhüllprotein pIII bindet an diesen, in der logarithmischen Wachstumsphase gebildeten Pilus, und die Phagen werden über Endozytose aufgenommen. Durch wiederholtes *panning* kommt es zu einer Anreicherung von Phagen mit Varianten der Bibliothek, die eine Affinität zum vorgegebenen Zielmolekül besitzen. Durch die Steigerung der Stringenz der Waschschriffe in den einzelnen *panning* Runden können Varianten selektiert werden, die eine hohe Affinität und Spezifität gegenüber dem *target* aufweisen.

Der Einsatz von Phagen- oder Proteinpräparationen der isolierten Varianten in einem ELISA ermöglicht es, deren individuelle Bindungseigenschaften zu untersuchen (Marks *et al.*, 1991; Clackson *et al.*, 1991).

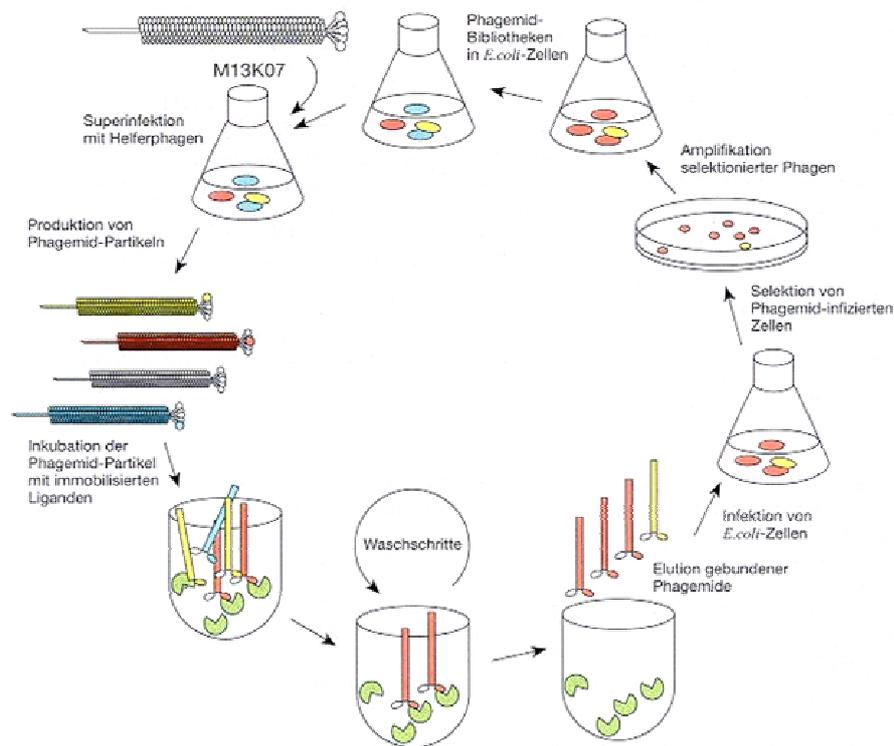


Abbildung 3: Übersicht der Arbeitsschritte während einer *panning* Runde bei der Selektion von *Phage Display* Bibliotheken (Breitling & Dübel, 1997).

1.1.4 Antikörperfragmente und deren Eigenschaften

Die Vorteile der Antikörper als Bindemoleküle beruhen auf ihrer hohen Affinität und Spezifität. Des Weiteren besitzen Antikörper eine hohe Stabilität, was sich unter anderem in ihrer hohen Lager- und Serumstabilität äußert. Einer der größten Nachteile der Antikörper im Hinblick auf therapeutische Anwendungen besteht jedoch in ihrer Größe, die die erforderliche effiziente Gewebepenetration einschränkt (Chester & Hawkins, 1995). Trotz des Ansatzes der Humanisierung von Antikörpern und des Einsatzes kombinatorischer, humaner Bibliotheken können Antikörper nach Applikation im Menschen teilweise eine starke Immunantwort hervorrufen.

Eine große Herausforderung stellt die Herstellung von Antikörpern in der Praxis dar. Antikörper sind Heterodimere, die aus vier Polypeptidketten mit mehreren Disulfidbrücken bestehen. Dies erfordert komplizierte Klonierungsstrategien und führt zu aufwendigen technischen Produktionsverfahren, da stets zwei Strukturgene parallel gehandhabt und gleichzeitig exprimiert werden müssen. Es wird versucht, einige dieser Nachteile durch die Generierung von Antikörperfragmenten, die durch proteolytischen Abbau gezielt hergestellt

werden können, zu vermeiden (Abb. 1). Durch Proteolyse mit Papain und partielle Reduktion kann das antigenbindende F_{ab} -Fragment gewonnen werden, das aus der vollständigen leichten Kette und aus der V_H - sowie der C_{H1} -Domäne besteht. Beide Ketten sind noch durch eine intermolekulare Disulfidbindung kovalent miteinander verknüpft. Die F_{ab} -Fragmente zeigen den Antikörpern vergleichbare Bindungseigenschaften und durch ihre geringere Größe eine verbesserte Gewebepenetration. Allerdings führt auch hier die Disulfidverbrückung zu Problemen bei der technischen Herstellung.

Durch limitierte Proteolyse von Antikörpern kann das kleinste antigenbindende Fragment, das so genannte F_v -Fragment entstehen. Es ist aus den variablen Domänen der beiden Polypeptidketten aufgebaut, welche nicht-kovalent miteinander assoziiert sind (Abb. 1). Die proteinchemische Stabilität von F_v -Fragmenten ist aufgrund der nicht kovalenten Assoziation von V_H - und V_L -Domänen begrenzt.

Diese in Kamelen vorkommenden Antikörper, die lediglich aus zwei schweren Ketten und den dazugehörigen konstanten Domänen C_{H2} und C_{H3} sowie der variablen Domäne V_H bestehen, werden als *single domain antibodies* bezeichnet. Sie besitzen vergleichbare Bindungseigenschaften und Stabilitäten wie herkömmliche Antikörper (Riechmann & Muyldermans, 1999).

Abgeleitet von diesen *single domain antibodies* sind Nanobodies, bestehend aus einer einzelnen variablen Domäne, V_{HH} genannt (<http://www.ablynx.com>). Nanobodies zeigen eine vergleichbare Stabilität zu Antikörpern, besitzen aber keine Disulfidbrücke, was bei der rekombinanten Expression von Vorteil ist (Cortez-Retamozo *et al.*, 2004).

So genannte *single chain* F_v -Fragmente (scF_v) werden durch die Einführung eines flexiblen Peptid-*Linkers* zwischen den beiden variablen V_H und V_L Domänen erzeugt (Raag & Whitlow, 1995). Dadurch erreicht man die Fusion der beiden antigenbindenden Domänen auf einer Polypeptidkette ohne Disulfidbrücke und verbesserte Eigenschaften bei der rekombinanten Proteinexpression. scF_v -Fragmente zeichnen sich aber durch eingeschränkte Faltungseigenschaften, verminderte Proteinstabilität und eine verschlechterte Ligandenbindung aus (Irving *et al.*, 2001; Worn & Pluckthun, 2001).

Antikörper und deren Fragmente weisen also neben ihrer hohen Affinität und Spezifität auch entscheidende Nachteile auf.

1.2 Alternative Bindemoleküle

Die erwähnten, nachteiligen Eigenschaften der Immunglobuline und deren Fragmente, wie ihre Größe und ihre kostenintensive Herstellung, führen zur Suche nach einfacheren molekularen Architekturen, die als künstliche Bindeproteine Einsatz finden könnten. Als solche kommen prinzipiell Proteine mit exponierten Oberflächenstrukturen in Frage, die Aminosäureaustausche tolerieren, ohne dass es dabei zu signifikanten Veränderungen ihrer Faltung kommt (Ku & Schultz, 1995). Diese so genannten Protein-*scaffolds* sollten die beschriebenen Nachteile von Antikörpern und deren Fragmenten nicht aufweisen, aber im Gegenzug eine vergleichbare Affinität und Spezifität gegenüber dem *target* zeigen. Das bedeutet, das *scaffold* und dessen Varianten bzw. Mutanten sollten kleiner als Antikörper sein, eine kostengünstige Herstellung im großen Maßstab, sowie eine hohe Stabilität aufweisen. Die Auswahl eines *scaffolds*, das nur aus einer Polypeptidkette besteht und keine Disulfidbrücke besitzt, bildet eine gute Basis dafür. Unter therapeutischen Aspekten betrachtet, sollten die künstlichen Bindemoleküle klein und nicht immunogen sein. Für eine diagnostische Anwendung sollten sich die Bindemoleküle einfach genetisch oder chemisch mit entsprechenden Markermolekülen fusionieren lassen.

Eine weitere entscheidende Anforderung an ein *scaffold* für ein alternatives Bindemolekül ist die einfache Generierung von qualitativ und quantitativ hochwertigen Bibliotheken. Eine qualitativ hochwertige Bibliothek sollte keine *frame shifts*, Insertionen oder Deletionen innerhalb des *scaffold*-Genes aufweisen. Das *scaffold*-Protein sollte in einer geeigneten *screening* Methode, wie z. B. *Phage Display* oder *Ribosomal Display*, voll funktionell exprimierbar sein. Weiterhin sollte die Bibliothek nur Varianten mit Mutationen in den vorgesehenen Positionen aufweisen. Zur Repräsentation jedes möglichen Aminosäure-Codons sollten die vier Nukleotide in den randomisierten Positionen statistisch gleich verteilt vorliegen.

Das erste beschriebene Protein-*scaffold* ist die Z-Domäne des Immunglobulin bindenden Protein A aus *Staphylococcus aureus* (Nord *et al.*, 1997). Die Z-Domäne besteht aus 58 Aminosäuren und ist aus drei Helices aufgebaut (Jendeberg *et al.*, 1996). Es wurden 13 Aminosäuren in zwei der drei Helices für die Konstruktion der Bibliothek variiert. Die bindenden Varianten werden als Affibodies[®] bezeichnet.

Die so genannten Anticaline[®] beruhen auf dem Bilin-Bindungsprotein aus dem Schmetterling *Pieris brassicae*. Dieses Protein gehört der Familie der Lipocaline an, die für die Bindung und den Transport von physiologisch wichtigen Verbindungen verantwortlich sind. Das Bilin-Bindungsprotein besitzt eine Größe von 174 Aminosäuren und weist zwei intramolekulare

Disulfidbrücken auf. Es besteht aus einem β -barrel mit acht antiparallelen β -Strängen als zentralen Faltungsmotiv (Huber *et al.*, 1987). Jeweils zwei β -Stränge sind durch einen *loop* verbunden (Abb. 4). Diese vier *loops* bilden den Eingang der Bindungstasche und weisen zwischen den einzelnen Vertretern der Lipocalin-Familie hohe Sequenz- und Längenvariabilität auf. Für die Konstruktion einer Bibliothek wurden 16 Positionen in den vier verschiedenen *loops* ausgewählt (Beste *et al.*, 1999).

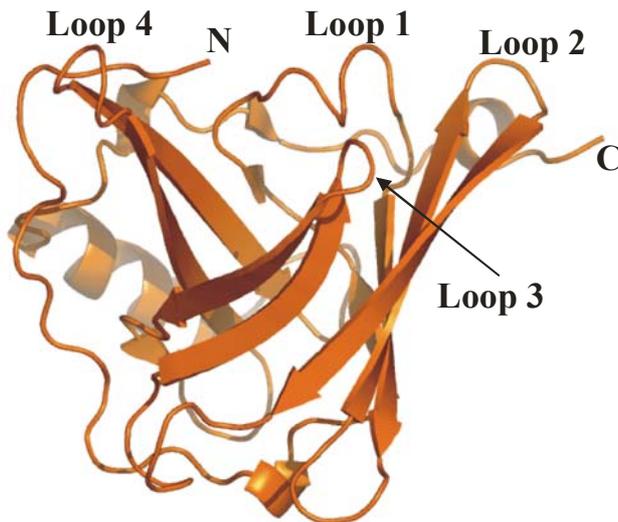


Abbildung 4: Darstellung der Raumstruktur des Bilin Bindungsproteins aus *Pieris Brassicae* (Huber *et al.*, 1987; PDB Code: 1bbp). Gekennzeichnet ist der N- und C-Terminus und die vier *loops*, die den Eingang zur Bindungstasche formen. Es wurde das Programm *pymol* (DeLano, 2002) verwendet.

Als drittes alternatives *scaffold* soll hier Fibronectin beschrieben werden. Fibronectin gehört zur Immunglobulin Superfamilie und ist damit Antikörpern strukturell sehr ähnlich. Als einer der wenigen Vertreter dieser Familie, der als monomeres Protein ohne Disulfidbrücke vorliegt, wurde die humane Fibronectin III Domäne als *scaffold* ausgewählt (Koide *et al.*, 1998). Aufgrund der gemeinsamen Klassifizierung von Fibronectin und Antikörpern ist es nicht überraschend, dass die β -sandwich Struktur der 94 Aminosäuren großen Fibronectin-Domäne mit der Struktur der V_H Domäne von Antikörpern verwandt ist (Main *et al.*, 1992). Wie die CDRs der Antikörper sind auch die *loops* zwischen den β -Strängen der Fibronectin Domäne für Substitutionen, Insertionen und Deletionen zugänglich. Durch die Variation von 10 Aminosäurepositionen in zwei der drei *loops* wurde eine Bibliothek konstruiert (Koide *et al.*, 1998).

Ein weiteres interessantes Protein *scaffold* stellen die Ankyrin *repeats* dar (Binz *et al.*, 2003). Ankyrine kommen in nahezu allen Spezies sowohl intra- als auch extrazellulär, sowie als

membrangebundene Varianten vor. Mehr als 2000 verschiedene Ankyrine sind für viele wichtige Protein-Protein Interaktionen verantwortlich. Eine Ankyrin Domäne besteht aus 33 Aminosäuren, die strukturell aus einem β -turn gefolgt von zwei antiparallelen Helices und einem *loop* aufgebaut ist (Abb. 5). Ein vollständiges Ankyrin-Molekül wird normalerweise von vier bis sechs aufeinander folgenden Domänen gebildet. Durch die Sequenzüberlagerung von verschiedenen Ankyrinen konnten sieben Positionen bestimmt werden, die natürlicherweise an der Ausbildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen involviert sind, und eine extrem hohe Aminosäure-Variabilität zulassen. Durch wiederholtes Aneinanderreihen von mehreren variablen Ankyrin-Domänen können theoretische sehr große Bibliotheken erstellt werden. Durch diese Methode ist sowohl die Erzeugung einer großen Bindungsfläche möglich, als auch die Bildung multifunktionaler Moleküle denkbar (Forrer *et al.*, 2004).

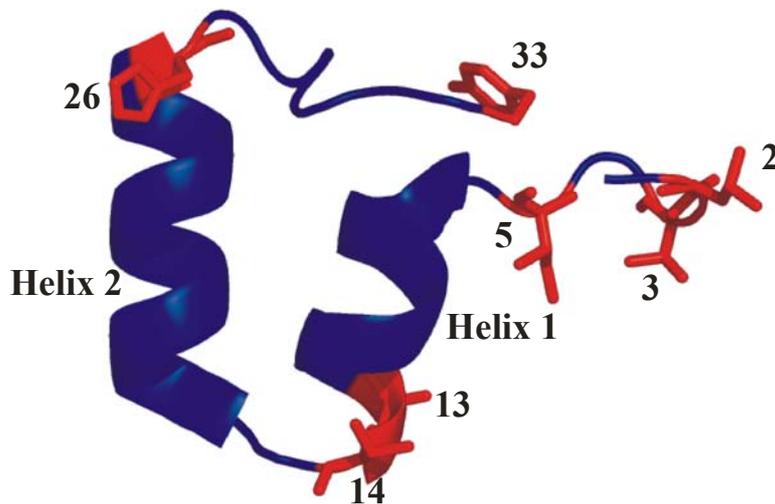


Abbildung 5: Darstellung der Raumstruktur einer Domäne (Aminosäuren 77-109) der Ankyrin-Variante E3_5 (Kohl *et al.*, 2003, PDB Code: 1MJ0). Nummeriert und rot dargestellt sind die variierten Positionen. Es wurde das Programm *pymol* (DeLano, 2002) verwendet.

Neben den Protein *scaffolds* können auch kurze Peptide alternative Bindemoleküle darstellen. In der Literatur sind viele sowohl ungefaltete als auch strukturierte Peptide beschrieben, die aufgrund ihrer Affinität gegenüber verschiedenen Klassen von *targets* isoliert werden konnten (Christmann *et al.*, 1999; Szardenings, 2003; Sidhu *et al.*, 2003). Sie zeigten aber alle in ihrer Handhabung und ihrer Stabilität entscheidende Nachteile gegenüber Protein *scaffolds*.

Eine weitere Klasse, die durchaus starke Bindungsaffinitäten gegenüber verschiedensten *targets* aufweist, ist einzelsträngige DNA oder RNA (Ylera *et al.*, 2002; Brody & Gold, 2000; Burgstaller *et al.*, 2002). So genannte Aptamere können mit Hilfe von SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) aus extrem großen Bibliotheken isoliert

werden (Tuerk & Gold, 1990). Nachteile von Aptameren bestehen in ihrer geringen *in vivo* Stabilität und den hohen Herstellungskosten. Durch chemische Modifizierungen an den Basen der Nukleotide können Aptamere eine höhere Stabilität erreichen (Green *et al.*, 1995). So werden z. B. 2'-amino oder 2'-F-pyrimidin zur Stabilisierung solcher Strukturen eingesetzt (Pagratis *et al.*, 1997).

Ein anderer Ansatz zur Stabilisierung von Aptameren sind Spiegelmerere. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass Enzyme stereoselektiv sind und keine L-RNA oder L-DNA abbauen können (Nolte *et al.*, 1996; Purschke *et al.*, 2003). Zur Isolierung solcher L-Aptamere werden vor der Selektion die entsprechenden *targets* gespiegelt, das heißt es wird mit einer Bibliothek aus D-Aptameren gegen gespiegelte *targets* ein *screening* durchgeführt. Isolierte Bindemoleküle werden anschließend als L-Aptamere synthetisiert und binden ihr natürliches *L-target* auf die gleiche Weise, zeigen aber eine erhöhte Stabilität gegenüber enzymatischem Abbau.

Es sind bereits mehrere verschiedene *scaffolds* zur Generierung alternativer Bindemoleküle auf der Grundlage von Peptiden, Proteinen und DNA- bzw. RNA-Molekülen beschrieben, die in Bezug auf ihre Größe und ihrer Stabilität sowie ihrer technischen Handhabung entscheidende Vorteile gegenüber Antikörpern aufweisen.

1.3 γ -Kristallin als *scaffold* für ein alternatives Bindemolekül

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete γ B-Kristallin ist ein weiterer Vertreter, der als Protein-*scaffold* für ein alternatives Bindemolekül genutzt wird. γ -Kristallin gehört zur Familie der $\beta\gamma$ -Kristalline und ist ein Strukturprotein der Augenlinse mit ubiquitärer Verbreitung in Vertebraten (Jaenicke & Slingsby, 2001). $\beta\gamma$ -Kristalline bilden eine hoch homologe Proteinfamilie, die sich durch zwei strukturell identische Domänen auszeichnet und weitgehend aus β -Faltblattstrukturen besteht (Wistow & Piatigorsky, 1988). Das übergeordnete Strukturmotiv aller $\beta\gamma$ -Kristalline ist die so genannte *greek key* Topologie (Abb. 6). Sie besteht aus vier antiparallelen β -Strängen, von denen zwei übereinander liegend eine Domäne der Kristalline bilden (Blundell *et al.*, 1981). β -Kristalline sind homodimere oder heterooligomere Proteine, während γ -Kristallin ausschließlich als monomeres Protein ohne Disulfidbrücke vorkommt (Bax *et al.*, 1990). Es wird angenommen, dass die Proteinfamilie ausgehend von einer einzelnen Domäne durch Genduplikation gefolgt von Genfusion entstanden ist (Lubsen *et al.*, 1988). Während Proteine mit nur einer Domäne in

Vertebraten nicht gefunden werden, existieren solche Vertreter z. B. in Schleimpilzen (Palme *et al.*, 1997; Jaenicke & Slingsby, 2001).

Die natürliche Funktion der Kristalline beruht auf der Erzeugung eines hohen Brechungsindex in der Augenlinse, was durch eine extrem hohe, lokale Proteinkonzentration von bis zu 860 mg/ml erreicht wird (Kumaraswamy *et al.*, 1996). Bedingt durch diese Funktion sind Kristalline sehr stabile und gut lösliche Proteine. Die Lokalisierung im Inneren der Augenlinse hat weiterhin zur Folge, dass γ -Kristalline keinem *protein turn over* unterliegen. $\beta\gamma$ -Kristalline weisen damit eine der längsten Lebensdauern auf, die für Proteine bekannt ist (Jaenicke, 1996). Punktmutationen im Genom führen zur Aggregation der γ -Kristalline in der Augenlinse und sind eine Ursache der Bildung von Katarakten und der Einschränkung des Sehvermögens (Heon *et al.*, 1999).

Der am besten charakterisierte Vertreter dieser Proteinfamilie ist das bovine γ -Kristallin. Die Raumstruktur konnte für den Wildtyp des Proteins bei verschiedenen Auflösungen und für eine ganze Reihe von Punktmutanten bestimmt werden (Najmudin *et al.*, 1993; Kumaraswamy *et al.*, 1996; Norledge *et al.*, 1996). Dabei zeigte sich, dass das Protein über eine hydrophobe Spalte zwischen den beiden Domänen stabilisiert wird (Abb. 6). Gebildet wird diese Spalte durch die intramolekularen Wechselwirkungen von sechs hydrophoben Resten, bestehend aus drei Resten in der N-terminalen Domäne und den topologisch identischen drei Resten in der C-terminalen Domäne (Wistow *et al.*, 1983). Die Stabilität ist dagegen weitgehend unabhängig von dem kurzen Peptid, das die beiden Domänen verbindet (Mayr *et al.*, 1994).

Bovines γ -Kristallin weist eine Größe von ca. 20 kDa auf und zeichnet sich durch eine außergewöhnlich hohe Stabilität aus. Es ist gegenüber 8 M Harnstoff bei neutralem pH-Wert resistent. Im pH-Bereich von 1 bis 9 liegt es in seinem nativen Zustand vor (Rudolph *et al.*, 1990; Sharma *et al.*, 1990), und selbst bis zu einer Temperatur von 75°C ist das Protein in 7 M Harnstoff stabil (Jaenicke, 1994). γ -Kristalline zeigen eine rekombinante, cytosolische Expression mit sehr hohen Ausbeuten (Mayr *et al.*, 1994).

Aufgrund dieser Eigenschaften erfüllt das γ -Kristallin alle Anforderungen an ein *scaffold* für die Generierung alternativer Bindemoleküle.

Durch Fiedler & Rudolph, 1999) wurde eine Phagemid-Bibliothek auf der Grundlage des bovines γ -Kristallin als Gerüstprotein erstellt. Es wurden acht Aminosäuren mit Hilfe von Computermodellierung ausgewählt, die im bovines γ -Kristallin oberflächenexponiert sind, und sich in einem β -Faltblatt befinden (Abb. 6). Ohne Berücksichtigung des Startmethionins befinden sich diese Aminosäuren an den Positionen 2, 4, 6, 15, 17, 19, 36 und 38. An diesen

acht Positionen sollten alle 20 möglichen Aminosäuren zufällig eingebaut werden. Das sollte durch den Einbau des Codons NNK, wobei N für alle vier möglichen Nukleotide und K für alle Nukleotide außer Adenosin codiert ist, an den variablen Positionen gewährleistet werden. Das Ausschließen des Adenosins an der dritten Nukleotidposition des Codons verhindert den Einbau der Stop-Codons TGA und TAA in den *scaffold* Gen-*pool* der Bibliothek. Die theoretische Größe der entstehenden bovinen γ -Kristallin Bibliothek entspricht 10^{10} verschiedenen Protein-Varianten.

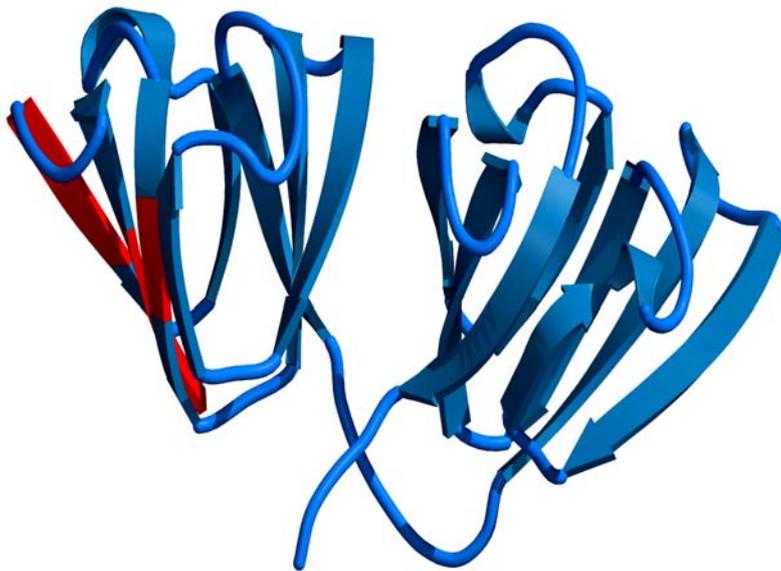


Abbildung 6: Strukturmodell des bovinen γ -Kristallins (Kumaraswamy *et al.*, 1996; PDB-Code: 1AMM). Dargestellt ist das $C\alpha$ Rückgrat mit den entsprechenden Sekundärstrukturmotiven. Rot abgebildet sind die drei β -Stränge, die für die Randomisierung ausgewählt wurden. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms *pymol* (DeLano, 2002) erstellt.

Einzelne Mitglieder der bovinen γ -Kristallin-Bibliothek GCUC1 und der humanen γ -Kristallin-Bibliothek CR20 werden als AffilinTM bezeichnet. Die Bibliothek GCUC1 besaß ca. 10^5 verschiedene Varianten des bovinen γ -Kristallins, die je ca. 1000-mal repräsentiert waren. Aus dieser Bibliothek konnten nach mehreren *panning*-Runden gegen das Steroidhormon Östradiol AffilinTM-Varianten des bovinen γ -Kristallins isoliert werden, die tatsächlich nur in den acht veränderten Positionen Substitutionen der Aminosäuren aufwiesen. Nach der Umklonierung und rekombinanter Überexpression dieser Varianten konnte eine spezifische Bindung an Östradiol mit einer Affinität im μ M-Bereich nachgewiesen werden (Fiedler & Rudolph, 1999). Diese Ergebnisse zeigten, dass auf dem bovinen γ -Kristallin vorher nicht vorhandene Bindungseigenschaften *de novo* generiert werden können und es sich generell als Gerüstprotein zur Isolierung von alternativen Bindemolekülen eignet.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob sich das γ -Kristallin *scaffold* bzw. deren Varianten für die Bindung an Proteinstrukturen eignen.

Es sollte nachgewiesen werden, dass neben den zu Beginn der Arbeit vorliegenden Hapten bindenden, bovinen Varianten, auch Antikörperfragmente wie IgG-Fc bzw. IgM-Fc spezifisch durch Varianten aus der bovinen γ -Kristallin Bibliothek GCUC1 und später aus der humanen γ -Kristallin Bibliothek CR20 erkannt werden können.

Potentielle Kandidaten sollten nach dem *screening* mit Hilfe von *Phage Display* und der Isolierung rekombinant hergestellt und gereinigt werden, um sie danach in ihren Bindungseigenschaften in Bezug auf Affinität und Spezifität zu charakterisieren. Anschließend sollte eine proteinchemische Analyse der Stabilität, insbesondere gegenüber Temperatur, GdmHCl, pH sowie im humanen Serum erfolgen.

Weiterhin sollte geprüft werden, ob sich diese Affilin[™]-Varianten für den Einsatz in der Chromatographie oder der Diagnostik, z. B. der Luminex[®]-Technologie eignen. In einem diagnostischen Assay, basierend auf der Luminex[®]-Technologie, sollen die isolierten Affilin[™]-Varianten anstelle von Antikörperfragmenten zur Anwendung kommen.

Voraussetzung für den Einsatz eines Affilin[™] in dieser Technologie ist, neben einer ausreichend hohen Affinität und Spezifität, vor allem die Zugänglichkeit des Moleküls für die Markierung mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen. Die isolierten Affilin[™]-Varianten sollten deshalb, unter Verwendung verschiedener sowohl genetischer als auch chemischer Methoden, mit Markermolekülen fusioniert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte weiterhin die Raumstruktur des humanen γ -Kristallins und der isolierten Varianten durch Kristallisation bestimmt werden. Aus der Ermittlung der Raumstruktur des Bindungskomplexes nach Kokristallisation beider Bindungspartner sollten außerdem detaillierte Erkenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen Affilin[™] und Ligand möglich werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid-Bisacrylamidlösung, 37,5 : 1	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agar	E. Merck KGaA, Darmstadt
Agarose	E. Merck KGaA, Darmstadt
Agarose- <i>Nusieve</i>	BWM Application Vallensbark Strand, Dänemark
Agarose- <i>Seakem</i>	BWM Application Vallensbark Strand, Dänemark
L-Arginin, Hydrochlorid	Ajinomoto Europe Sales GmbH, Hamburg
D-(+)-Biotin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Borsäure	Calbiochem GmbH, Schwalbach
Bromphenolblau	E. Merck KGaA, Darmstadt
Citronensäure Monohydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
DTT	E. Merck KGaA, Darmstadt
EDTA-Dihydrat	Calbiochem GmbH, Schwalbach
DTNB	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Essigsäure	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 99,8%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
α -D-Glucose	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
GSH	E. Merck KGaA, Darmstadt
GdmHCl	E. Merck KGaA, Darmstadt
Harnstoff	Calbiochem GmbH, Schwalbach
Hefeextrakt	E. Merck KGaA, Darmstadt
Hefeextrakt für Fermentation	OHL Y Deutsche Hefewerke, Hamburg
HEPES	E. Merck KGaA, Darmstadt
Imidazol	E. Merck KGaA, Darmstadt
IPTG	DUCHEFA Biochemie BV, Niederlande
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Kaliumchlorid	Calbiochem GmbH, Schwalbach

Kaliumdihydrogenphosphat	Calbiochem GmbH, Schwalbach
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	Calbiochem GmbH, Schwalbach
Magnesiumsulfat, Heptahydrat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
β -Mercaptoethanol	Calbiochem GmbH, Schwalbach
Natriumacetat	Calbiochem GmbH, Schwalbach
Natriumchlorid	Calbiochem GmbH, Schwalbach
Natriumdihydrogenphosphat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Nickelsulfat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Oyster [®] 556	denovo biolabels, Münster
PEG 6000	Calbiochem GmbH, Schwalbach
PEG 20000	Calbiochem GmbH, Schwalbach
PEG 35000	E. Merck KGaA, Darmstadt
Polypropylenglykol PLURIO [®] P2000	BASF, Ludwigshafen
SDS	Calbiochem GmbH, Schwalbach
Surfactant P20	Biacore, Uppsala, Schweden
Triethylamin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Trypton	E. Merck KGaA, Darmstadt
Tween 20	E. Merck KGaA, Darmstadt

2.1.2 Chromatographiematerialien

HiTrap [™] Chelating HP	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
HiTrap [™] rProtein A FF	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Ni-NTA HIS-Bind [™]	Novagen GmbH, Darmstadt
PD10-Säule, Sephadex [™] 25	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
SoftLink [™] Soft Release Avidin Resin	Promega GmbH, Mannheim
Superdex 75 Prep Grad	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Superdex 200 Prep Grad	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg

2.1.3 Sonstige Materialien

<i>Deep-well</i> -Platten	Qiagen GmbH, Hilden
Dialyseschlauch Spectra/Por	Spectrum-Laboratories, Rancho Domingues, USA
ELISA-Platte (Polysorb [®] , Maxisorb [®] , Polystyren)	Nunc GmbH, Wiesbaden
Glucosestäbchen, Uri Glucose, Heiland	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Klebefolie, für ELISA	Qiagen GmbH, Hilden
Klebefolie für Kristallisation CrystallClear	JenaBioscience GmbH, Jena
Klebefolie, steril, für die Anzucht	Qiagen GmbH, Hilden
Kristallisationsplatte CombiClover	JenaBioscience GmbH, Jena
Konzentratoreinheit	Amicon Ultra 15, Millipore, Schwalbach
Loops für Kristallisation	Hampton Research
Nitrocellulose-Transfer-Membran Protran BA 83	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel

2.1.4 Puffer und Lösungen

2.1.4.1 Puffer für die Chromatographie

Affinitätschromatographie mittels IMAC

NPI-10	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
NPI-20	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0
NPI-50	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol, pH 8,0
NPI-500	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8,0

Affinitätschromatographie mit SoftLink™ Agarose

SL 1	100 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,0
SL 2	100 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,0, 5 mM Biotin
SL 3	10 % Essigsäure

Affinitätschromatographie mit HiTrap™ rProtein A FF

PA 1	2 x PBS, pH 7,3
PA 2	100 mM NaCitrat, pH 3,0

Gelchromatographie

GF 1	2 x PBS, 2 mM EDTA, PH 7,3, 2 mM DTT
------	--------------------------------------

2.1.4.2 Sonstige Puffer und Lösungen

PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,3
TAE	40 mM Tris/HAc; pH 8,5; 2 mM EDTA
TBE	89 mM Tris/HCl; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA; pH 8,3
TE	10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA
Coomassie-Färbelösung	40 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,1 % (w/v) Coomassie R250
Coomassie-Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure; 10 % (v/v) Ethanol
Geltrocknungslösung	5 % (v/v) Glycerin; 20 % (v/v) Ethanol
SDS-Laufpuffer	50 mM Tris/HCl; pH 8,0; 200 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer	40 % (v/v) Glycerin; 250 mM Tris/HCl; pH 8,0; 0,5 % (w/v) SDS; 0,6 % (w/v) Bromphenolblau; 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
SDS-PAGE Trenngelpuffer	3 M Tris/HCl, pH 8,0; 0,4 % (w/v) SDS
SDS-PAGE Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS
6 x Ficoll (DNA-Auftragspuffer)	15 % (v/v) Ficoll 400; 30 mM EDTA; 0,06 % (w/v) Bromphenolblau; 1 % (w/v) SDS
Lysis-Puffer	NPI-10; 0,05 % (w/v) Lysozym; 100 mM MgSO ₄ ; 5-10 U Benzoase
ELISA-Waschpuffer 1	PBS; 0,1 % (v/v) Tween 20
ELISA-Waschpuffer 2	PBS
ELISA-Blockierungslösung	PBS; 3 % BSA; 0,5 % (v/v) Tween 20
Biacore-Puffer PBS-ET	PBS; pH 7,3; 3 mM EDTA; 0,005 % (v/v) Tween 20
HBS-EP	10 mM HEPES; pH 7,4; 150 mM NaCl; 3 mM EDTA; 0,005 % (v/v) Surfactant P20

2.1.5 Primer und Plasmide

2.1.5.1 Primer

Die Primer wurden von den Firmen Operon GmbH, Köln oder MWG Biotech, Ebersberg im Auftrag synthetisiert.

Mutagenese-Primer

Mu6D-QC-Trp-for	5' GGG GGA TAT CTG GTT TAC TGA GGA CCG GGG 3'
Mu6D-QC-Trp-rev	5' CCC CGG TCC TCA GTA AAC CAG ATA TCC CCC 3'
Mu4G-QC-Trp-for	5' CGA TCC CGT TTT GGG AGG ACC GGG GCT TCC 3'
Mu4G-QC-Trp-rev	5' GGA AGC CCC GGT CCT CCC AAA ACG GGA TCG 3'
pet20b(+)NdeNco for 5'	CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCC ATG GGG AGG ATC AAG 3'
pet20b(+)NdeNco rev5'	CTT GAT CCT CCC CAT GGG TAT ATC TCC TTC TTA AAG 3'
A7Cys4Ser for	5' CCA TGG GTC TGA TCT CTT TCT CTG AAG ACC G 3'
A7Cys4Ser rev	5' CGG TCT TCA GAG AAA GAG ATC AGA CCC ATG G 3'
Gly4SerCys HindIII	5' GGG GGA AGC TTT TAT CAG TGG TGG TGG TGG TGG TGA TGG TGA TGG CAA GAT 3'
A7Cys4Ser-Nde	5' GGA GAT ATA CAAT ATG GGT CTG ATC TCT TTC TCT G 3'
QC-F1-Pos15 for	5' GCT TTC CAG GGT CGT CAG TAC GTG TGC ACG 3'
QC-F1-Pos 15 rev	5' CGT GCA CAC GTA CTG ACG ACC CTG GAA AGC 3'
QC-F1-Pos 38 for	5' GCA ACT CCA TCA GGG TTC AGT CCG GTT GCT GG 3'
QC-F1-Pos 38 rev	5' CCA GCA ACC GGA CTG AAC CCT GAT GGGA GTT GC 3'

PCR-Primer

bgc-pCANT-rev-Xho	5' CCG CTC GAG ATA AAA ATC CAT CAC CCG 3'
hgcXhoI	5' GCT TCC TCG AGG TAC AAA TCC AATG AC 3'
ggbSfiI	5' GTT CCT TTC TAT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GG 3'
ggbBstEII	5' CGC AGG AAG TAC TGG TGA CCC TGG TAG TTC G 3'

Sequenzier-Primer

Sequenzier-Primer waren an ihren 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD700 bzw. IRD800 markiert und wurden ausschließlich von MWG Biotech, Ebersberg bezogen.

pETProm LONG	5' GCG AAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AG 3'
pETTerm	5' GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG GC 3'
pCantab	5' CCA TGA TTA CGC CAA GCT TTG GAG CC 3'
pAC5-SeqForw	5' CCG GCT CGT ATA ATG TGT GGA ATT GTG AGC GG 3'

2.1.5.2 Plasmide

Tabelle 1: Übersicht der eingesetzten Plasmide und ihrer Verwendung.

Plasmid	Verwendung	Referenz
pET 11a	Insertion verschiedener Gene über <i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I zur Expression ohne His-Tag; Amp-Resistenz	Studier & Moffatt, 1986
pET 20b(+)	Insertion verschiedener Gene über <i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I zur Expression mit His-Tag; Amp-Resistenz	Studier & Moffatt, 1986
pET 20b(+) Nde-Nco	Insertion verschiedener Gene über <i>Nco</i> I/ <i>Xho</i> I zur Expression mit His-Tag; Amp-Resistenz	Diese Arbeit
pUBS 520	Coexpression der für <i>E. coli</i> seltenen t-RNA <i>ArgU</i> ; Kan-Resistenz	Brinkmann <i>et al.</i> , 1989
pCANTAB 5E	Insertion der bovinen und humanen γ -Kristallin-Gen-Bibliothek für das Screening mittels <i>Phage Display</i> ; Amp-Resistenz	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
pBIRA cm	Coexpression von Biotin-Ligase; Cam-Resistenz	Avidity, Denver, USA
pAC 5	Insertion verschiedener Gene über <i>Nco</i> I/ <i>Xho</i> I zur <i>in vivo</i> Biotinylierung über den Avi-Tag; Amp-Resistenz	Beckett <i>et al.</i> , 1999 Avidity, Denver, USA

2.1.6 Enzyme, Proteine und Antikörper

<i>Bst</i> E II, <i>Dpn</i> I, <i>Hind</i> III, <i>Nco</i> I, <i>Nde</i> I, <i>Xho</i> I	Promega GmbH, Mannheim
<i>Taq</i> -, <i>Pfu</i> -Polymerase, T4 DNA-Ligase	Promega GmbH, Mannheim
Alkalische Phosphatase (Shrimps)	Promega GmbH, Mannheim
Lysozym, BSA	E. Merck KGaA, Darmstadt
Benzoase	Sigma Chemie GmbH, München
IgG-Fc; IgM-Fc; IgA, PK	Dianova GmbH, Hamburg
IgG-Fc Subtyp 1, MK	Roche Diagnostics, Penzberg
α hyc-AK, Maus, Klon 98.4.1, MK	Biogenes GmbH, Berlin
α hyc-AK-HRP Konjugat, Maus, Klon 98.4.1, MK	Biogenes GmbH, Berlin
α -Maus-AK-HRP Konjugat, Hase, PK	Sigma Chemie GmbH, München
α -Penta-His-AK HRP Konjugat, Maus, MK	Qiagen GmbH, Hilden
α -E-tag-AK, Maus, MK	Sigma Chemie GmbH, München
Avidin-HRP Konjugat	Sigma Chemie GmbH, München

2.1.7 Mikroorganismen

Bacteriophagen

M13 Helferphagen - II' (M13mp1), *ori* p15A, *kan^r* (Tn903) (Vieira & Messing, 1987)

M13 Helferphagen (M13KO7; Invitrogen GmbH, Karlsruhe) dienen der Infizierung von F'-positiven Bakterien zur Herstellung von Phagen mit und ohne AffilinTM als Fusionsprotein mit dem Phagenhüllprotein P III.

Escherichia coli

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten *E. coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac⁻, F'[proAB, lacIqZM15, Tn10, (Tet^r)]</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987
Nova-Blue (DE3)	<i>endA1, hsdR17, (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac F'[proAB, lacI qZM15, Tn10 (Tet^r)]</i> (DE3- λ cIst857, <i>ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7 gene 1</i>)	Novagen, Darmstadt
BL 21 (DE3)	<i>hsdS, gal</i> (λ cIst857, <i>ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7 gene 1</i>)	Studier & Moffatt, 1986
TG1	<i>supE, hsdΔ5, thi Δ(lac-proAB), F'[traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZ ΔM15]</i>	Gibson, 1984

Zellbänke

Bibliothek GCUC1	<i>E. coli</i> TG1; pCANTAB 5 E; bovines γ -Kristallin CrgB, SwissProt-Eintrag: P02526 (http://us.expasy.org/sprot) Randomisierte Positionen 2, 4, 6, 15, 17, 19, 36, 38 (ohne Berücksichtigung des Startmethionin)
Bibliothek CR20	<i>E. coli</i> XL1-Blue; pCANTAB 5 E; humanes γ -Kristallin CrgB, SwissProt-Eintrag: P07316 (http://us.expasy.org/sprot) Randomisierte Positionen 2, 4, 6, 15, 17, 19, 36, 38 (ohne Berücksichtigung des Startmethionin)

2.1.8 Nährmedien

LB	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl
SOBAG	2 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 20 g/l Glucose; 10 mM MgCl ₂ ; 100 µg/ml Ampicillin
SOC	20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgSO ₄ ; 10 mM MgCl ₂ ; 4 g/l Glucose
Vollmedium Fermentation	50 g/l Hefeextrakt; 5 g/l Glucose; 11 g/l K ₂ HPO ₄ ; 0,5 g/l NH ₄ Cl; 0,68 g/l MgSO ₄
Feeding-Lösung	30 % (v/v) Hefeextrakt; 25 % (v/v) Glycerin
2 x TBY	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 5 g/l MgSO ₄
2 x YT	17 g/l Trypton; 10 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl

Alle Medien wurden 20 min bei 121°C sterilisiert. Für feste Nährböden wurde den entsprechenden Medien vor dem Autoklavieren 1,5 % Agar zugesetzt. Zur Kultivierung der Mikroorganismen unter selektiven Bedingungen wurde im Medium die in Tab. 3 angegebene Endkonzentration des entsprechenden Antibiotikums eingestellt.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Konzentrationen der eingesetzten Antibiotika.

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Tetracyclin	12,5 mg/ml	12,5 µg/ml
Chloramphenicol	30 mg/ml	30 µg/ml

Die Antibiotika wurden nach den Angaben des Herstellers gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.1.9 Standards und Kits

1 kb Marker	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
100bp Marker	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BioRobot™ Kit	Qiagen GmbH, Hilden
BugBuster™	Novagen, Darmstadt
CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit	MBI Fermentas, St. Leon Roth

ECL™ Western Blotting Detection Reagents	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Expand High Fidelity™ Kit	Roche Diagnostics, Penzberg
Kristallisationskits JBScreen 1-10	Jena Bioscience GmbH, Jena
LMW	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
MinElute™	Qiagen GmbH, Hilden
PCR-Purification	Qiagen GmbH, Hilden
Prestained Protein	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
PlasmidPrep	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaquick™ Gelextraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Quickchange™ PCR Mutagenese Kit	Stratagene, La Jolla, USA
PhycoLink® R-Phycoerythrin-Conjugation Kit	Europa Bioproducts, Cambridge, England
TMB Plus	Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Kopenhagen, Dänemark

2.1.10 Geräte

Äkta Explorer	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Biacore X und Biacore 3000	Biacore, Uppsala, Schweden
Constant Cell Disrupter Z Plus 4 kW	IUL Instruments GmbH, Königswinter
DNA Sequenzer Long ReadIR 4200	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg
ELISA Reader Sunrise	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
ELISA Washer Columbus	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Fermenter Biostat C DCU	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Fluoreszenzspektrometer FluoroMax 3	Jobin Yvon GmbH, Grasbrunn
FPLC HiLoad	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Gel Doc 2000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gene Pulser II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop MZ 16	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Bensheim
Pentax Z20	Pentax GmbH, Hamburg
Schüttler innova™ 4330	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Sonoplus GM 2200/ MS73 (Schallkopf)	Bandelin Electronic, Berlin
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Temperatur controller LFI-3751	Wavelength Electronics, Bozeman, USA
Ultrazentrifuge Optima XL-A	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
UV-VIS Spektrometer Cary 300	Varian GmbH, Darmstadt
VP-DSC Mikrocalorimeter	Microcal, Central Milton Keynes, UK
Zentrifuge Avanti J-20, J-25, J-30i	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von *E. coli* und Expression von Fremdproteinen

2.2.1.1 Schüttelkultur

Für die Anzucht von *E. coli* im Schüttelkolben wurde zunächst eine Vorkultur hergestellt. Dazu wurden 20 ml LB- oder 2 x YT-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und bei 37°C und 200 rpm über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde die Vorkultur 1:100 in frischem LB- oder 2 x YT-Medium verdünnt und bei 37°C und 200 rpm bis zum Erreichen einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,6 - 0,8$ geschüttelt. Bei dieser optischen Dichte erfolgte die Expression nach Induktion mit 1 mM IPTG für 4 h bei 37°C bzw. 30°C oder über Nacht bei 28°C unter ständigem Schütteln bei 200 rpm. Es schloss sich eine Zentrifugation für 20 min bei 5000 x g und die Lagerung des daraus erhaltenen Pellets bis zur weiteren Verwendung (s. 2.2.4.1) an.

2.2.1.2 Deep-well-Kultur

Für die parallele Anzucht von 10 und mehr Klonen, wie z. B. die Einzelphagenanzucht oder die Anzucht zur Reinigung über den BioRobot™ Kit, wurden 24 x 5 ml *Deep-well*-Platten verwendet. Dazu wurden die vorher sterilisierten Platten mit maximal 3 ml des entsprechenden Selektionsmediums befüllt und mit jeweils einer Einzelkolonie beimpft. Die Platten wurden anschließend mit einer luftdurchlässigen, sterilen Klebefolie verschlossen und zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen bei maximal 180 rpm und 37°C bzw. 30°C bis $OD_{600} = 0,6$ inkubiert. Es schloss sich die Induktion der Proteinexpression durch 1mM IPTG oder die Induktion der Propagation der Phagen durch Zugabe von Helferphagen (s. 2.2.2.5) an. Nach 4 h Induktion der Proteinexpression wurden die Kulturen in den *Deep-well*-Platten für 30 min und 4000 x g zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung (s. 2.2.4.1) bei -20°C gelagert.

2.2.1.3 Fed-Batch-Fermentation auf Vollmedium

Die Fermentationen wurden in einem Biostat C DCU mit 10 l Arbeitsvolumen und einem digitalen Mess- und Regelsystem durchgeführt. Dazu wurden 6 l eines Mediums aus 50 g/l Hefeextrakt und 0,5 g/l NH_4Cl im Bioreaktor 60 min bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde das Medium unter sterilen Bedingungen mit 5 g/l Glucose; 0,68 g/l $MgSO_4$; 11 g/l K_2HPO_4 sowie mit 0,1 g/l Ampicillin versetzt. Dieses Medium wurde mit 900 ml einer 8 h alten LB-Vorkultur angeimpft, so dass zu Beginn der Fermentation eine optische Dichte

von ca. $OD_{600} = 0,4$ vorlag. Die Fermentation wurde bei 37°C durchgeführt. Die Regulierung des pH-Wertes zwischen 7,0 und 7,2 erfolgte mit 15%iger Ammoniaklösung und 15%iger Phosphorsäure. Als Antischaummittel wurde eine 50%ige Polypropylenglykollösung verwendet. Nach dem Verbrauch der anfänglich zugesetzten Glucose wurden bei einer optischen Dichte zwischen $OD_{600} = 10$ und $OD_{600} = 15$ kontinuierlich variierende Mengen einer Feeding-Lösung zugeführt. Der Verbrauch der Glucose wurde anhand des steigenden Sauerstoffpartialdrucks und mit Hilfe von Glucoseteststäbchen festgestellt. Die Temperatur wurde ca. 2 h nach Feedingstart auf 30°C abgesenkt. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte 30 min nach Beginn des Absenkens der Temperatur bei $OD_{600} = 60$ mit 0,5 mM IPTG für 4 h bei 30°C . Das durch Zentrifugation (20 min, $5000 \times g$, 4°C) erhaltene Pellet wurde bis zur weiteren Aufarbeitung (s. 2.2.4.1) bei -20°C gelagert.

2.2.2 Selektion von Bindemolekülen mittels *Phage Display*

2.2.2.1 Herstellung von Helferphagen

Zu 100 ml 2 x YT-Medium mit $12,5 \mu\text{g/ml}$ Tet wurde 1 ml Inokulum einer stationären Übernacht-Kultur von XL-1 Blue gegeben und bei 37°C und 220 rpm bis $OD_{600} = 0,4$ inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur mit den kommerziell erhältlichen Helferphagen M13K07 mit einer moi von 10 infiziert und für 1 h bei 37°C 100 rpm inkubiert. Nach dem Zusatz von $50 \mu\text{g/ml}$ Kan wurde die Kultur zur Phagenproduktion bzw. Phagenfreisetzung bei 30°C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Die Phagen wurden durch 15 min Zentrifugation bei $10800 \times g$ vom Bakterienpellet getrennt. Aus dem Zentrifugat wurden die Phagen durch Zugabe von 1/5 Volumen PEG/NaCl (20 % PEG 6000 [w/v]; 2,5 M NaCl) und Inkubation für mindestens 1 h auf Eis gefällt. Nach der Zentrifugation für 30 min bei $3300 \times g$ und 4°C wurde das erhaltene Phagenpellet in 4 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Phagen erneut durch Zugabe von 1/5 Volumen PEG/NaCl gefällt, pelletiert und in 2 ml PBS resuspendiert. Von der erhaltenen Phagenlösung wurden Zellbruchstücke durch Zentrifugieren für 10 min bei $11600 \times g$ und RT entfernt. Abschließend wurde die Phagenlösung durch Membranen mit einer Porengröße von $0,22 \mu\text{m}$ filtriert. Zur Titerbestimmung der erhaltenen Phagenlösung wurde in Anlehnung an Day & Wiseman, 1978 ein Absorptionsspektrum von 320 nm bis 240 nm aufgenommen und die Konzentration nach Gleichung 2.1 berechnet .

$$\text{Phagen/ml} = \frac{(A_{269} - A_{320}) \times 6 \cdot 10^{16}}{\text{Anzahl der Basen des Phagen-genoms}} \quad \text{Gl. 2.1}$$

mit

A_{269} Absorption der Proteinlösung bei 269 nm
 A_{320} Absorption der Proteinlösung bei 320 nm

2.2.2.2 Anzucht der Phagen

Zur Anzucht von Phagen für das Panning wurden 1 l bzw. 100 ml 2 x YT-Medium mit 2 % Glucose und 100 µg/ml Amp mit 1 % Inokulum der jeweiligen Zellbank bei 37°C und 220 rpm bis $OD_{600} = 0,4$ inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur nach Zugabe von Helferphagen mit einer MOI von 10 zur Infektion für 1 h bei 37°C und 100 rpm inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann 20 min bei 1000 x g zentrifugiert, und das Pellet in 100 ml 2 x YT-Medium mit 8 mM GSH, 100 µg/ml Amp und 50 µg/ml Kan resuspendiert. Die Phagenproduktion bzw. Phagenfreisetzung erfolgte bei 30°C und 200 rpm über Nacht. Zur Isolierung der Phagen wurde das Protokoll wie unter „Herstellung von Helferphagen“ (s. 2.2.2.1) beschrieben, verwendet.

2.2.2.3 Bestimmung des Titers von Phagen

Die Phagen-Konzentration wurde von isolierten Helferphagen und ausgewählter Wasch- sowie der Elutionslösung bestimmt. Hierzu wurden Verdünnungsreihen der Phagen-Lösungen in sterilem PBS bis zu einer maximalen Verdünnungsstufe von 10^{-8} , d. h. mit einem typischen Phagen-Gehalt von 10^3 bis 10^4 cfu/ml hergestellt. Von einer exponentiell wachsenden Zellkultur XL1-Blue wurden 90 µl zu 10 µl der kurz zuvor auf 37°C temperierten Phagen-Verdünnung gegeben. Zur Kontrolle der verwendeten Bakterienkultur auf Kontamination mit Phagen wurde zusätzlich 90 µl dieser Kultur mit 10 µl PBS versetzt. Alle Ansätze wurden für 30 min bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden anschließend kurz auf Eis gestellt und die gesamte Suspension auf LB/Amp Platten ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C wurde der Phagen-Titer durch Auszählen der Klone als cfu/ml bestimmt.

2.2.2.4 Panning

Von den isolierten Phagen (s. 2.2.2.2) wurde 1 ml mit 1 ml 6 % BSA in PBS für 1 h bei RT geblockt. Währenddessen wurden die über Nacht bei RT mit 100 µl einer 10 µg/ml Lösung des Zielmoleküls in PBS beschichteten Vertiefungen einer Mikrotiterplatte dreimal mit PBS; 0,1 % Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden freie Bindungsstellen der Vertiefungen mit je 300 µl PBS; 3 % BSA; 0,5 % Tween 20 für 2 h bei RT geblockt. Es folgte ein dreimaliges Waschen der Vertiefungen mit PBS; 0,1 % Tween 20. Nach Zugabe von je 100 µl der geblockten Phagen pro Vertiefung erfolgte eine Inkubation für 1 h bei RT und 20 rpm. Ungebundene bzw. schwach gebundene Phagen wurden durch verschieden stringentes Waschen entfernt. Die noch gebundenen Phagen wurden durch Zugabe von 100 µl 100 mM Triethylamin und Inkubation für 10 min bei RT eluiert. Zur Neutralisation der basisch eluierten Phagen wurden diese mit 500 µl 1 M Tris/HCl pH 7,4 versetzt. Danach wurde die Vertiefungen dreimal mit PBS gewaschen.

Stark gebundene Phagen, die trotz Elution in der Mikrotiterplatte verblieben waren, wurden direkt zur Reinfektion mit 100 µl einer exponentiell wachsenden Zellkultur ($OD_{600} = 0,4$) von XL1-Blue für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Reinfektion von XL1-Blue Zellen mit den basisch eluierten Phagen wurden 750 µl des neutralisierten Eluates mit 9 ml XL1-Blue Zellen mit einer $OD_{600} = 0,4$ für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, getrennt nach basisch eluierten Phagen und stark gebundenen Phagen, auf 16 x 16 cm Platten mit SOBAG-Medium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung in einem erneuten Panning oder der Einzelphagenanzucht (s. 2.2.2.5) wurden die erhaltenen Klone bzw. Zellbänke mit ca. 12,5 ml 2 x YT-Medium; 20 % Glycerin von den Platten abgeschwemmt und bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

2.2.2.5 Anzucht von Einzelphagen

Zur Anzucht von Einzelphagen wurden 92 Einzelkolonien der entsprechenden Panningrunde oder Zellbank von den SOBAG-Platten in 24 x 5 ml Deep-Well-Platten mit je 2 ml/well 2 x YT-Medium mit 2 % Glucose und 100 µg/ml Amp überführt und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Zusätzlich wurde pro Platte eine Einzelkolonie mit dem Gen für humanes- γ -Kristallin WT im Phagemid-Vektor als Kontrolle mitgeführt. Autoklavierte 24 x 5 ml *Deep-well*-Platten wurden mit je 2,5 ml/well 2 x YT-Medium mit 2 % Glucose und 100 µg/ml Ampicillin mit 1 % Inokulum der Übernacht-Kultur beimpft und die Bakterienkulturen bei 37°C und 180 rpm bis OD_{600} ca. 0,4 inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen mit 2,5 µl pro well Helferphagen M13K07 mit 10^{13} cfu/ml infiziert und für 1 h bei 37°C und 100 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 2,5 ml pro well 2 x YT-Medium, 8 mM GSH, 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin resuspendiert und über Nacht bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Zur Gewinnung des Phagen-Überstandes erfolgte eine Zentrifugation der Platten bei 4600 rpm. Fällung und Pelletierung der Phagen wurden – wie unter „Herstellung von Helferphagen“ (s. 2.2.2.1) beschrieben - durchgeführt und das Phagenpellet in ca. 200 µl PBS resuspendiert. Durch diese Prozedur konnten die Phagen konzentriert und anschließend in einem ELISA (s. 2.2.5.7) eingesetzt werden.

2.2.3 Molekularbiologische Techniken

2.2.3.1 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Je nach benötigter Menge wurde Plasmid-DNA hoher Reinheit unter Verwendung des QIAfilter™ Mini-, Midi-, oder Spinprep-Kits nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die mit diesen Methoden isolierte DNA wurde für die DNA-Sequenzierung und für Klonierungen eingesetzt.

2.2.3.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden gemäß den Angaben der Hersteller unter Verwendung der entsprechend mitgelieferten Puffer eingesetzt. Für präparative Spaltungen wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl pro 1 µg Plasmid-DNA 1 bis 3 U Enzym eingesetzt und der Reaktionsansatz 1 - 6 h bei der vorgegebenen Temperatur inkubiert. Genomische DNA und PCR-Produkte wurden 14 h verdaut.

2.2.3.3 Dephosphorylierung von DNA

Für die Dephosphorylierung wurde 1 U Alkalische Phosphatase und das entsprechende Volumen des mitgelieferten, 10fach konzentrierten Puffers direkt zum Ansatz pipettiert. Die Mischung wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert und die Phosphatase anschließend für 15 min bei 65°C inaktiviert. Der gesamte Ansatz wurde mit Hilfe einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt. Es schloss sich die Isolierung der DNA an (s. 2.2.3.7).

2.2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur DNA-Amplifikation wurden sowohl *Pfu*-DNA-Polymerase, als auch Taq-DNA-Polymerase sowie der Expand High Fidelity Kit verwendet.

Die Reaktionen wurden nach dem vom Hersteller vorgeschlagenen Protokoll angesetzt. Bei Bedarf wurde zur Auflösung von Sekundärstrukturen der eingesetzten Primer bis zu 5 % [v/v] DMSO eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen, unter denen die DNA-Amplifikation durchgeführt wurde, variierten in Abhängigkeit von DNA-*Template* und den eingesetzten Primern. Begonnen wurde immer mit einem ersten Denaturierungsschritt von 3 min bei 95°C. Danach folgten 20 bis 30 wiederholende Zyklen der Denaturierung, Primer-Anlagerung und Synthese. Die Denaturierung bei 95°C dauerte 30 bis 45 sec, die Primer-Anlagerung erfolgte für 30 bis 45 sec bei einer Temperatur, die sich in erster Linie nach der Schmelztemperatur der Primer richtete. Sie variierte zwischen 45°C und 68°C. Die Dauer des Syntheseschrittes richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Produktes, wobei *Pfu*-Polymerase ca.

1 kb pro min bei 72°C und *Taq*-Polymerase ca. 2 kb/min bei 70°C synthetisiert. Zum Abschluss der PCR erfolgte eine Endsynthese für 5 min entsprechend der eingesetzten Polymerase bei 70°C oder 72°C. Die Amplifikation wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.3.6) überprüft.

2.2.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationsreaktionen wurden mit 40 – 50 ng Plasmid-DNA, 200 ng Fragment-DNA und 0,5 U T4-DNA-Ligase in dem vom Hersteller mitgelieferten Ligase-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt. Die Inkubationstemperatur betrug 16°C, die Dauer der Reaktion ca. 16 h. Anschließend wurde der Ligationsansatz transformiert (s. 2.2.3.10).

2.2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten mittels horizontaler Gelelektrophorese wurden die Proben mit 1/6 Volumen 6 x Ficoll versetzt und bei konstanter Spannung von 8 mV/cm aufgetrennt. Die Herstellung der Agarosegele erfolgte mit TAE-Puffer, der gleichzeitig als Laufpuffer verwendet wurde. Präparative Agarosegele wurden bei einer Größe der zu isolierenden DNA-Fragmente unter 1 kb mit 3 % – 4 % *Nusieve*-Agarose, bei Fragmenten über 1 kb mit 1 % *Seakem*-Agarose hergestellt. Für analytische Zwecke wurden Gele mit 1- 1,5 % Agarose verwendet. Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurden die Gele 15 min in Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) gefärbt und anschließend mit dem GelDoc 2000 System analysiert.

2.2.3.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung von QIAquick™ Gelextraction Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.3.8 Ortsspezifische Mutagenese von Plasmid-DNA

Zur ortsspezifischen Mutagenese von Plasmid-DNA kamen zwei Methoden zum Einsatz:

1. Quickchange™, welches den Angaben des Herstellers folgend, verwendet wurde und
2. die Megaprimer-Methode (Esser, 2000). Für letztere wurde ein Primer mit den entsprechenden Insertionen bzw. Austauschen so geplant, dass er einen komplementären Überhang von mindestens je 18 bp 5' und 3' zu der zu verändernden Position aufwies. Ein weiterer Primer wurde 600-1000 bp *upstream* oder *downstream* des ersten Primers geplant. Anschließend wurde mit der Plasmid-DNA als *Template* zuerst das PCR-Produkt zwischen

den beiden Primern amplifiziert, um dann ähnlich der Quickchange™-Methode im zweiten Schritt dieses PCR-Produkt als Megaprimer für die Amplifizierung des gesamten Plasmides zu nutzen.

2.2.3.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach Präparation (s. 2.2.3.1) nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Fluoreszenzmarkierte Abbruchfragmente wurden mittels *cycle sequencing* unter Verwendung des CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kits in Anwesenheit von Didesoxynukleotiden und 5'-fluoreszenzmarkierten Sequenzierprimern erhalten. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des halbautomatischen DNA-Sequenzierers *Long ReadIR 4200*.

2.2.3.10 Transformation von *E. coli* mit rekombinanter DNA

Für die Aufnahme von Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen fanden im Rahmen dieser Arbeit zwei Methoden Anwendung. Mit Hilfe der CaCl₂-Methode (Sambrook *et al.*, 1989), die typischerweise 10⁵ - 10⁶ Transformanden pro µg Plasmid-DNA lieferte und damit die ineffizientere der beiden Methoden darstellt, wurde vorwiegend gereinigte Plasmid-DNA (s. 2.2.3.1) transformiert. Dazu wurden 200 µl der frisch hergestellten oder der bei -80°C gelagerten und auf Eis aufgetauten Bakterienzellsuspension mit 5 - 10 µl der DNA-Lösung gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Inkubation für 90 sec bei 42°C und 2 min auf Eis wurde die gesamte Suspension mit 800 µl SOC-Medium (37°C) versetzt und für 45 min bei 37 °C und 700 rpm im Schüttler inkubiert. 100 - 1000 µl der Zellsuspension wurden auf Selektionsmedium ausgestrichen. Die Platte wurde anschließend über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die zweite Methode der Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*-Stämme erfolgte durch Elektroporation, wobei vorwiegend Plasmid-DNA von Ligationsansätzen (s. 2.2.3.5) verwendet wurde. Zur Vorbereitung der Zellen für die Elektroporation wurden 400 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes angeimpft. Die Bakterienkultur wurde bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 4000 x g, 4°C) geerntet. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nacheinander wurden die Zellen in 400 ml, 200 ml und 40 ml 10 % (v/v) Glycerin gewaschen und letztlich in 400 µl 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Die Zellen wurden zu je 40 µl aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert. Für die Elektroporation wurden 40 µl elektrokompente Bakterienzellen mit 1 bis 10 ng Plasmid-DNA in einer eisgekühlten Transformationsküvette (0,1 mm) bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω gepulst. Die Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 60 min bei 37°C unter Schütteln bei 500 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert und bei 37°C für 16 h inkubiert.

2.2.4 Proteinchemische Methoden

2.2.4.1 Zellaufschluss

Zum Aufschluss der erhaltenen Bakterienpellets wurden diese in 5fachen Volumen (w/v) Lysis-Puffer resuspendiert und für 1 h bei RT inkubiert. Es schloss sich für Volumina über 250 ml der Zellaufschluss unter Verwendung des Constant Cell Disrupter Z Plus an. Dabei wurden drei Durchläufe bei 1,7 kBar durchgeführt.

Für Volumina unter 250 ml wurden die Zellsuspension durch Ultraschall unter Verwendung des Sonoplus GM 2200/ MS73 für 5 x 15 sec bei 25 % Intensität aufgeschlossen. In beiden Fällen schloss sich eine Zentrifugation bei 75000 x g für 30 min an. Der Überstand wurde zur chromatographischen Reinigung (s. 2.2.4.2) eingesetzt.

Bakterienpellets aus *Deep-well*-Kulturen (s. 2.2.1.2) wurden in 1 ml PBS resuspendiert und mit 1/5 Volumen BugBuster™ versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen nach Protokoll des BioRobot™ Kit, den Angaben des Herstellers entsprechend, aufgearbeitet.

2.2.4.2 Proteinreinigung durch Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC) beruht auf der Wechselwirkung von Cystein- oder Histidin-Seitenketten zu Übergangsmetallionen. Dies wird bei der rekombinanten Proteinexpression ausgenutzt, in dem Expressionsvektoren so konstruiert sind, dass sie sechs oder mehr Histidine an die zu exprimierenden Proteine C- oder N-terminal fusionieren.

Die Reinigung der Fusionsproteine erfolgte unter Verwendung von Chelating Agarose Fast Flow, einer Chromatographie-Matrix mit NTA-Gruppen als Chelatbildner und Ni²⁺ als Übergangsmetallionen. Die lösliche Proteinfraction der entsprechenden Expressionszellen wurde mit einer Flussrate von 1-2 ml/min auf eine vorher mit NPI-10 Puffer äquilibrierten 5 ml HiTrap™-Chelating HP Säule oder einer 140 ml Ni-NTA- HIS-Bind™ Säule mit Hilfe eines FPLC- oder ÄKTA-Systems gepumpt. Anschließend wurde mit mindestens 20 SV NPI-20 Puffer bei einer Flussrate von 5 ml/min gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten innerhalb von 10 SV zwischen 20 und 250 mM Imidazol in NPI. Proteine mit einem Deca-His-Tag wurden nach oben beschriebenen Verfahren an das Säulenmaterial gebunden, allerdings mit NPI-50 mM gewaschen und in 10 SV mit einem linearen Gradienten zwischen 50 und 500 mM Imidazol in NPI Puffer eluiert. Regeneriert und gelagert wurden die Säulen entsprechend den Vorgaben des Herstellers.

2.2.4.3 Proteinreinigung durch Gelfiltration

Zur Auftrennung und Reinigung heterogener Proteinproben oder Abtrennung niedermolekularer Verunreinigungen im Anschluss an die Affinitätschromatographie wurde die Gelfiltrations-Chromatographie angewandt, die eine Auftrennung verschiedener Moleküle nach ihrer Größe und Form erlaubt.

Hierzu wurde eine Superdex 75 Gelfiltrationssäule mit einem Bettvolumen von 150 ml bzw. 1,8 l unter Verwendung von Puffer GF 1 als Laufpuffer eingesetzt. Der Puffer war zuvor durch Anlegen eines Vakuums für 30 min unter Rühren filtriert und entgast worden. Die Chromatographie wurde bei einer konstanten Flussrate von 0,8 ml/min bzw. 1 ml/min mit einem FPLC- bzw. einem ÄKTA-System durchgeführt. Die Proteinproben wurden mit Hilfe von Probenschleifen mit einem Volumen von bis zu 2 % des Bettvolumens der Säule aufgetragen.

2.2.4.4 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie an Protein A

Für die Reinigung und die gleichzeitige Aufkonzentrierung von IgG-Fc, das nach Reinigung durch Gelfiltration Verunreinigungen aufwies, wurde eine Affinitätschromatographie an Protein A verwendet. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass Protein A aus *Staphylococcus aureus* spezifisch Immunglobuline bindet.

Auf eine mit Puffer PA 1 äquilibrierte 1 ml HiTrap™ rProteinA FF Säule wurde bei einer Flussrate von 2 ml/min mit Hilfe eines FPLC- oder ÄKTA-Systems die entsprechenden Proben aufgetragen. Es wurde mit 10 SV Puffer PA 1 bei 2 ml/min gewaschen und anschließend in einem Stufengradient mit Puffer PA 2 über 5 SV bei 1 ml/min eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden sofort mit 1/10 Volumen 1 M Tris/HCl, pH 8,0 gemischt

2.2.4.5 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie an Avidin

Zur Reinigung von Affilin™-Varianten, die über den AviTag und die Koexpression von BirA *in vivo* biotinyliert wurden, eignete sich SoftLink™ Soft Release Avidin Resin. Diese Matrix ermöglicht es, biotinylierte Proteine zu binden und anschließend mit freiem Biotin zu eluieren. Dazu wurde eine Säule mit 5 ml Säulenmaterial nach den Angaben des Herstellers mit Biotin gesättigt, denaturiert und regeneriert. Anschließend wurde sie mit Puffer SL 1 äquilibriert und mit der löslichen Proteinfraction der Expressionszellen bei einer Flussrate von 0,5 ml/min beladen. Es wurde mit 10 SV Puffer SL 1 bei 2 ml/min mit Hilfe eines FPLC- oder ÄKTA-Systems gewaschen. Eluiert wurde mit Puffer SL 2 über 5 SV mit 1 ml/min. Zur Regeneration der Säule wurde das Avidin mit Puffer SL 3 für 30 min denaturiert und anschließend für mindestens 1 h mit Puffer SL 1 renaturiert.

2.2.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) angewendet. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Elektrophoresekammern der Firma Bio-Rad. Die Gele hatten Abmessungen von 8 x 10 cm und waren 0,75 mm dick. Dabei wurde eine kommerziell erworbene Lösung so verdünnt, dass Sammelgele 5 % und Trenngele 15 % Acrylamid enthielten. Proteinproben wurden mit 1/5 ihres Volumens mit SDS-Probenpuffer versetzt und wenn nicht anders beschrieben 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden 5 bis 10 µl der entsprechenden Probe in die Sammelgeltaschen aufgetragen. Die Proteine wurden durch Anlegen einer Spannung von 200 V für 50 min in SDS-Laufpuffer aufgetrennt.

SDS-Polyacrylamid-Gele wurden zur Visualisierung der Proteine mit Coomassie-Färbelösung in der Mikrowelle auf 100°C erhitzt und weitere 5 min unter leichtem Schwenken gefärbt. Anschließend wurde ungebundener Farbstoff mit Coomassie-Entfärbelösung (s. 2.1.5.2) ausgewaschen.

2.2.4.7 Western Blotting

Die durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine (s. 2.2.4.6) wurden wie von Towbin beschrieben auf eine Nitrocellulose-Transfer-Membran übertragen (Towbin *et al.*, 1979). Nitrocellulose-Membran, Gel und Filterpapier wurden in Transfer-Puffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,05% SDS) getränkt und als Stapel aus drei Lagen Filterpapier, Nitrocellulose-Membran, Gel und drei weiteren Lagen Filterpapier blasenfrei zwischen die beiden Elektroden einer *Semi-Dry-Blotting* Apparatur gelegt. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte mit 0,8 mA/cm² innerhalb von 2 h. Nach Anfärbung mit PonceauS-Färbelösung (0,2% PonceauS in 3% TCA) wurden die Banden der Markerproteine markiert und die Membran anschließend in H₂O entfärbt und 30 min mit Blockier-Lösung (3% BSA in PBS; 0,02% Tween-20) abgesättigt. Die Immundekoration einzelner Proteine erfolgte durch eine 60-minütige Inkubation mit spezifischen Antikörpern, die 1:500 bis 1:2000 in Blockier-Lösung verdünnt waren. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min mit Blockier-Lösung gewaschen und 60 min mit sekundärem Antikörper (Anti-Maus-Peroxidase-Konjugat) in Blockier-Lösung 1:2000 verdünnt, inkubiert. Nach erneutem Waschen in Blockier-Lösung erfolgte der Nachweis der Proteine durch Chemilumineszenz mit ECL™ Western Blotting Detektion Kit.

2.2.4.8 Aufkonzentrierung von Proteinen und Dialyse

Verdünnte Proteinlösungen wurden zur Konzentrierung in einen Dialyseschlauch (MWCO 3000) überführt. Der Dialyseschlauch wurde bei 10°C in PEG 35000 eingebettet und die Proteinlösung bis zum gewünschten Volumen eingeeengt. Eine weitere Methode zur Aufkonzentrierung war die Zentrifugation der Proteinlösungen in einer Konzentratoreinheit mit einer Ausschlussgröße von 5 kDa bei 3500 x g und 4°C. Die Proteinlösungen wurden auf ein der gewünschten Konzentration entsprechendes Volumen eingeeengt und anschließend eventuell aggregiertes Protein durch Zentrifugation (27000 x g, 4°C, 30 min) abgetrennt.

Für die Dialyse von Proteinlösungen wurden diese in Dialyseschläuche überführt und anschließend durch mehrmaligen Pufferwechsel ein vollständiger Pufferaustausch zwischen Proteinlösung und Dialysepuffer sichergestellt.

2.2.4.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Eine schnelle Methode zur Quantifizierung der Proteinkonzentration einer Probe ist die Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Dazu wurden 20 µl einer Proteinlösung mit 980 µl Bio-Rad Protein Assay gemischt und nach 10 min die Absorption bei 595 nm bestimmt. Mit Hilfe einer Eichkurve, die mit BSA in einem Konzentrationsbereich von 0,1 mg/ml bis 1 mg/ml aufgenommen wurde, erfolgte die Abschätzung der Proteinkonzentration.

Konzentrationsbestimmungen gereinigter Proteine wurden spektroskopisch an einem UV/VIS Spektrophotometer durchgeführt. Die Konzentrationen der Proteinlösungen wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (Gl. 2.2) berechnet.

$$A_{280} = \epsilon_{280} \times c \times d \quad \text{Gl. 2.2}$$

mit

A_{280}	Absorption der Proteinlösung bei 280 nm
ϵ_{280}	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm in $M^{-1} \times cm^{-1}$
c	Proteinkonzentration in M
d	Schichtdicke der Küvette in cm

Die Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine wurden nach Gill und von Hippel (Gill & von Hippel, 1989) oder mit Hilfe des Programms PortParam Tool (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) bestimmt.

2.2.4.10 Bestimmung freier Thiolgruppen

Zur Bestimmung der freien SH-Gruppen (Haber, 1972) wurden zu 1 ml Proteinlösung (50 - 350 µg Protein in 100 mM Tris/HCl; pH 8,0) 30 µl DTNB-Lösung (4 mg/ml DTNB in 100 mM Tris/HCl; pH 8,0) zugegeben. Leerwert 1 stellte 1 ml Proteinlösung mit 30 µl Puffer (100 mM Tris/HCl; pH 8,0) dar. Als Leerwert 2 diente 1 ml Puffer (100 mM Tris/HCl; pH 8,0) mit 30 µl DTNB-Lösung. Die Ansätze wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und

die Absorption bei 410 nm gemessen. Die Absorptionen der Leerwerte 1 und 2 wurden von der Absorption des Testansatzes abgezogen. Aus dem resultierenden Absorptionswert wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von DTNB-SH nach Gleichung 2.2 die molare Konzentration an freien SH-Gruppen berechnet ($\epsilon_{410} [\text{DTNB-SH}] = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und durch die eingesetzte Proteinkonzentration dividiert. Als Ergebnis wurde die Anzahl der freien Thiolgruppen pro Proteinmolekül erhalten.

2.2.4.11 Kopplung von Oyster556 an primäre Amine von Proteinen

Die chemische Kopplung von Affilin[™]-Varianten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oyster[®]556 wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Affilin[™]-Variante wurde mit 1 mg/ml gegen 10 mM Phosphat-Puffer pH 7,4 dialysiert. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde in 20 μl trockenem DMF gelöst und das Affilin[™] in einem molaren Überschuss von 5 : 1 direkt zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 Volumen 10%iger Glycin-Lösung abgestoppt. Ungekoppelter, freier Fluoreszenzfarbstoff wurde anschließend vom Kopplungsansatz mittels einer PD10-Säule abgetrennt.

2.2.4.12 Kopplung von Phycoerythrin an freie Cysteine von Proteinen

Verwendet wurde der PHYCOLINK[®] R-Phycoerythrin Conjugation Kit entsprechend den Angaben des Herstellers. Dazu wurde das freie Cystein des Affilin[™] mit Hilfe von 10 mM DTT für 30 min reduziert und das DTT anschließend über eine PD10-Säule wieder entfernt. Das reduzierte Affilin[™] wurde nun über das Cystein in einem molaren Verhältnis von 5 : 1 an das Maleimid-aktivierte Phycoerythrin gekoppelt. Im nächsten Schritt wurden freie, ungebundene Thiole mit N-Ethylmaleimid inaktiviert. Abschließend wurde das Affilin[™]-PE-Konjugat von freiem Affilin[™] mittels Gelfiltration abgetrennt und bei 4°C gelagert.

2.2.5 Biophysikalische Analysen

2.2.5.1 Chemisch induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge

Zur Messung von Entfaltungs- bzw. Rückfaltungsübergängen wurden native bzw. in 6 M GdmHCl denaturierte Proteinlösungen in Puffer (100 mM NaH_2PO_4 , pH 6,0, 2 mM EDTA, 2 mM DTT) mit Denaturierungsmittelkonzentrationen zwischen 0 und 6 M verdünnt und mindestens 48 h bei 20°C oder 30°C inkubiert. Anschließend wurde ein Emissionsspektrum der jeweiligen Proteinlösung an einem Fluoromax3 Spektrofluorimeter in 1 cm Küvetten mit 5 nm Spaltbreiten des Anregungs- und Emissionsstrahls aufgenommen. Protein-

konzentrationen, Anregungs- und Auswerte-Wellenlängen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. Die exakte Bestimmung der Denaturierungsmittelkonzentration erfolgte refraktrometrisch mittels Gl. 2.3 für Guanidinium Hydrochlorid (Pace, 1986). Die Auswertung der gemessenen Übergänge erfolgte nach Pace & Scholtz, 1997 unter der Annahme eines Zwei-Zustands-Modells.

$$[\text{GdmHCl}] = 57,147 \times \Delta N + 38,68 \times \Delta N^2 - 91,6 \times \Delta N^3 \quad \text{Gl.2.3}$$

mit

[GdmHCl]: Konzentration an Guanidinium Hydrochlorid in mol/l
 ΔN : Differenz der Brechungsindices zwischen Proteinlösung mit und ohne Denaturierungsmittel

2.2.5.2 pH induzierte Entfaltungsübergänge

Fluoreszenzmessungen zur pH induzierten Entfaltung wurden an einem Fluoromax3 Spektrofluorimeter in 1 cm Küvetten mit 5 nm Spaltbreiten des Anregungs- und Emissionsstrahls durchgeführt. Proteinkonzentrationen, Anregungs- und Auswerte-Wellenlängen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. Es wurden 25 μl Proteinlösung zu 1 ml des jeweiligen Puffers pipettiert und 48 h bei 20°C inkubiert. Die eingesetzten Puffer für die verschiedenen pH-Bereiche sind in Tab. 4 angegeben. Alle Spektren wurden pufferkorrigiert.

Tabelle 4: Puffer für pH-induzierte Entfaltung.

pH-Bereich	Puffer
pH 1,3 – 3,8	100 mM Glycin
pH 3,3 – 7,8	100 mM NaCitrat; 200 mM Na ₂ HPO ₄
pH 7,8 – 9,0	200 mM Tris/HCl
pH 9,0 – 12,5	100 mM Glycin

2.2.5.3 Temperatur induzierte Entfaltungsvorgänge

Temperaturübergänge wurden an einem Fluoreszenzspektrometer mit Peltier-Element in rührbaren 1 cm Küvetten mit 5 nm Spaltbreiten des Anregungs- und Emissionsstrahls durchgeführt. Die Steuerung der Temperatur der Küvetten-Halterung wurde über das Peltier-Element mit Controller durch das Programm Datamax gesteuert. Dabei wurde nach einer Verzögerung von 3 sec bei einer maximalen Abweichung der Temperatur von 0,2°C für jedes

Grad zwischen 10°C und 80°C bei einer Heizrate von 1°C/min ein Emissionsspektrum aufgenommen. Proteinkonzentrationen, Anregungs- und Auswertewellenlängen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. Alle Spektren wurden pufferkorrigiert. Die Proteine wurden vor der Messung gegen 50 mM NaH₂PO₄; pH 6,0; 2 mM EDTA dialysiert.

2.2.5.4 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Zur Messung von Temperatur induzierten Entfaltungsvorgängen wurde auch die *Differential Scanning Calorimetry* unter Verwendung des Microcalorimeter VP-DSC eingesetzt. Prinzipiell wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Die Proteinlösungen wurden zuvor mindestens 24 h bei RT gegen den jeweiligen Messpuffer dialysiert. Die Referenzkammer wurde anschließend mit ca. 800 µl entgastem Messpuffer und die Probenkammer entweder mit ca. 800 µl entgastem Messpuffer oder mit ca. 800 µl entgaster Proteinlösung befüllt. Die Proteinkonzentration betrug 500 µg/ml. Die geeichten Flüssigkeitsfüllstände in beiden Kammern erhielt man mit Hilfe einer Hamiltonspritze mit reduziertem Aufsatz. Mit dieser Spritze wurde die Flüssigkeit bis zu dem vorgegebenen Füllstand abgesaugt. Danach wurden beide Kammern druckdicht verschlossen. Mit Hilfe der Steuersoftware wurde eine Heizrate von 1,5 °C/min eingestellt. Nach 15 min *prescan* bei 20°C wurde zwischen 20°C und 80°C alle 16 sec die entsprechende aufgenommene Wärmeenergie als Differenz zwischen Proben- und Referenzkammer aufgezeichnet.

2.2.5.5 CD-Spektroskopie

Fern-UV-CD-Spektren wurden an einem Aviv 62A DS Spektrometer in Quarzglasküvetten mit Schichtdicken von 0,1 cm aufgenommen. Die Spektren wurden mindestens 12fach akkumuliert und bei einer Zeitkonstante von 3 s und 1 nm Bandbreite gemessen. Alle Spektren wurden pufferkorrigiert und bei 20°C aufgenommen. Die gemessene Elliptizität Θ wurde anhand Gl. 2.4 in die mittlere residuelle Elliptizität $[\Theta]_{\text{MRW}}$ umgerechnet.

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \times 100 \times M_r}{c \times d \times N_A} \quad \text{Gl. 2.4}$$

mit

Θ	gemessene Elliptizität in Grad
$[\Theta]_{\text{MRW}}$	mittlere residuelle Elliptizität
M_r	Molekularmasse in Dalton
c	Proteinkonzentration in mg/ml
d	Schichtdicke der Küvette in cm
N_A	Anzahl der Aminosäuren im Proteinmolekül

2.2.5.6. Analytische Ultrazentrifugation

Sedimentations- und Gleichgewichtsläufe wurden in einer Optima XL-A analytischen Ultrazentrifuge in einem AN60Ti-Rotor bei 20°C durchgeführt. Sedimentationsläufe erfolgten bei 20000 rpm, Gleichgewichtsläufe bei 40000 rpm in Doppelsektorzellen. Die Auswertung der experimentellen Daten wurde mit Hilfe eines von A. Minton entwickelten Programms von Dr. Hauke Lilie durchgeführt (Rivas *et al.*, 1999). Die Berechnungen beruhen auf der Annahme, dass das spezifische Volumen der Proteine 0,734 ml/g betrug (Harding, 1997).

2.2.5.7 Bindungsnachweis mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Zum Nachweis der Bindung von AffilinTM-Varianten an ihr Zielmolekül mittels ELISA wurden ELISA-Mikrotiterplatten mit einer 10 µg/ml Lösung des entsprechenden Targets, dem AffilinTM oder dem entsprechenden Antikörper bzw. BSA in PBS beschichtet. Wenn nicht anders angegeben, wurden pro Vertiefung 50 µl der entsprechenden Lösung pipettiert. Zum Schutz vor Verdunstung wurden die Vertiefungen der Platten während aller Inkubationsschritte mit einer selbstklebenden Folie verschlossen. Die Platten wurden über Nacht bei RT inkubiert und anschließend dreimal mit ELISA-Waschpuffer 1 (s. 2.1.5.2) gewaschen. Danach wurden die einzelnen Vertiefungen mit 350 µl ELISA-Blockierungslösung (s. 2.1.5.2) gefüllt und für 2 h bei RT inkubiert. Die Platten wurden dann wiederum dreimal mit ELISA-Waschpuffer 1 gewaschen. Entsprechend dem Aufbau des ELISAs wurden nun 50 µl des AffilinTM oder des Targets in PBS in verschiedenen Konzentrationen in die Vertiefungen pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Ungebundenes Protein wurde durch dreimaliges Waschen mit ELISA-Waschpuffer 1 entfernt. Im nächsten Schritt wurden 50 µl des entsprechenden Antikörpers (z. B. anti-human-γ-Kristallin) gegebenenfalls als Konjugat mit Peroxidase in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung in PBS in die Vertiefungen gegeben und wiederum für 1h bei RT inkubiert. Bei Verwendung sekundärer Antikörper schloss sich nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer 1 eine weitere Inkubation mit 50 µl eines mit POD konjugierten Antikörpers in PBS an. Danach wurden die Platten dreimal mit ELISA-Waschpuffer 1 und dreimal mit ELISA-Waschpuffer 2 gewaschen und anschließend für maximal 15 min mit der TMB-Plus[®]-Substratlösung inkubiert. Aufgrund der Umsetzung des Substrates durch die Peroxidase erfolgte ein Farbumschlag von farblos nach blau. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 0,2 M H₂SO₄ gestoppt und anschließend in einem ELISA-Reader bei 450 nm die Absorption gegen die Referenzwellenlänge von 620 nm für jede Vertiefung gemessen.

2.2.5.8 Bindungsnachweis mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Zur Bestimmung der Wechselwirkung von AffilinTM und IgG-Fc bzw. IgM-Fc fand das BIAcoreX bzw. das Biacore3000 System Verwendung. Die Herstellung der Sensorchips

erfolgte durch Kopplung eines der Bindungspartner an die Chipoberfläche. Es wurde ungerichtet über primäre Amine gekoppelt. Hierzu wurde prinzipiell nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Für die Kopplung über primäre Amine wurde auf die mit EDC/NHS aktivierte Carboxymethyl-Dextran Oberfläche über die Flusszelle eine 50 µg/ml IgG-Fc- bzw. IgM-Fc-Lösung in 50 mM NaCitrat-Puffer; pH 5,0 aufgetragen. Die jeweilige Lösung wurde solange über den Chip geleitet, bis die gewünschte Differenz des Response-Signals erreicht wurde. Anschließend wurden die noch unbesetzten Bindungsstellen auf der Chipoberfläche mit Ethanolamin über 7 min inaktiviert. Der Referenzkanal wurde aktiviert und anschließend ohne Kopplung eines Proteins inaktiviert. Als Laufpuffer dienten die unter 2.1.5 angegebenen Puffer HBS-EP bzw. PBS-ET. Zur Messung der Bindung wurden nacheinander verschiedene Konzentrationen des entsprechenden Proteins über den Chip geleitet. Für Konkurrenzexperimente wurde die jeweilige zu messende AffilinTM-Variante vorher mit den die Bindung kompetitierenden Liganden bzw. anderen Zielmolekülen in verschiedenen Konzentrationen gemischt und ebenfalls über den Chip geleitet. Die Dauer der Assoziations- und Dissoziationsphasen betrug, wenn nicht anders beschrieben, 3 min. Die Messungen wurden bei 20°C bzw. 25°C mit Flussraten von 10 - 30 µl/min durchgeführt. Die gemessenen Daten wurden mit dem Programm BIAevaluation Version 3.1 unter der vereinfachenden Annahme einer Bindungsstöchiometrie von 1:1 ausgewertet.

2.2.5.9 Untersuchungen zur Clearance

Als *Clearance* wird die Verweildauer von Molekülen im Blutstrom bezeichnet. Ziel der Untersuchung war die Bestimmung der *Clearance* zur Überprüfung der prinzipiellen Eignung von AffilinTM-Varianten in der Therapie.

Als Testobjekte dienten männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 200 g. Zum Startzeitpunkt wurde den Ratten 1 ml des entsprechenden Proteins mit einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS in die Schwanzvene injiziert. Dies entspricht einer Dosis von 4,5 mg/kg Körpergewicht. Zu verschiedenen Zeiten wurde ca. 1 ml Blut retroorbital entnommen. Neun Tieren wurde das Protein injiziert. Zur Blutentnahme wurden die neun Tiere in drei Gruppen mit je drei Tieren geteilt. Der ersten Gruppe wurde nach 1 min, 30 min und 240 min, der zweiten Gruppe nach 5 min, 60 min und 480 min und der dritten Gruppe nach 15 min, 120 min und 1440 min Blut entnommen. Die aufgearbeiteten Serumproben wurden bis zur Messung bei -20°C tiefgefroren. Zum Nachweis der AffilinTM-Konzentration im Blut wurde die Oberflächenplasmonresonanz genutzt. Dazu wurde ein CM5 Chip mit ca. 5000 RU anti-hyc-AK immobilisiert. Die Serumproben wurden unmittelbar nach dem Auftauen 1:100 in PBS verdünnt und bei einer Flussrate von 30 µl/min für 10 min bei 25°C über den Chip geleitet. Zur Regeneration wurden 30 µl 100 mM Citratpuffer; pH 3,0 bei einer Flussrate von 30 µl/min über die Flusszellen geleitet.

2.2.7 Methoden der Strukturanalyse

2.2.7.1 Kristallisation

Die Proteinkristallisation wurde nach der Methode der Gasphasendiffusion mit sitzendem Tropfen in 24-Well-Kristallisationsplatten CombiClover durchgeführt. Für einen ersten Screen wurden die Kristallisationskits JBScreen 1-10 mit 240 verschiedenen Kristallisationsbedingungen verwendet. Dafür wurden 500 µl Kristallisationspuffer in das Reservoir pipettiert. Die Tropfen wurden aus gleichen Volumina Proteinlösung und Kristallisationspuffer gebildet und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. In den ersten Screens betrug die Tropfengröße 4 µl. Die Platten wurden nach der Befüllung mit Klebefolie CrystallClear luftdicht verschlossen. Die Kristallisation wurde mit dem Mikroskop beobachtet und zur Dokumentation fotografische Aufnahmen angefertigt.

2.2.7.2 Datensammlung

Die Datensammlung erfolgte mit Hilfe von Synchrotronstrahlung an der *beamline* BL1 (Protein Structure Factory, Bessy, Berlin) mit einer Wellenlänge von 0,85 Å. Als Detektor diente der CCD-Messkopf MAR 165CCD (Marresearch, Norderstedt). Für die Messung wurde der entsprechende Kristall zuvor mit einer Gefrierschutzlösung (Kristallisationspuffer mit 10 % Glycerin) für ca. 15 s bei RT inkubiert und dann direkt, mittels eines *loops* (0,05–0,1 mm Ø) auf dem Goniometerkopf angebracht. Dort wurde der Kristall in einem kontinuierlichen Stickstoffstrom schockgefroren und bei 110 K ein entsprechender Datensatz aufgenommen. Raumgruppe und Zelldimension der Kristalle wurden mit der Autoindexierungs-Routine in DENZO (Otwinowski, 1993) bestimmt. Alle Daten wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK integriert bzw. skaliert (Otwinowski, 1993).

2.2.7.3 Modellierung und kristallographische Verfeinerung

Die Modellierung wurde durch Prof. Milton T. Stubbs (Institut für Biotechnologie, Universität Halle) durchgeführt. Die Strukturen wurden mit der Methode des molekularen Ersatzes (Rossmann & Blow, 1962) gelöst. Dabei diente die Struktur des bovinen-γ-B-Kristallins (Kumaraswamy *et al.*, 1996) als Suchmodell (PDB-Zugangscode: 1AMM) für die Struktur des nativen humanen-γ-B-Kristallins. Die Struktur des nativen humanen-γ-B-Kristallins diente später als Suchmodell für die Struktur der Variante SPC-1-G3. Die Verfeinerungen wurde mit dem Programm CNS (Brunger *et al.*, 1998) durchgeführt. Auf einen Verfeinerungszyklus folgte die Berechnung von Elektronendichtekarten und die manuelle Inspektion und Korrektur des Modells unter Nutzung des Programms O (Jones *et al.*, 1991).

3 Ergebnisse

Die Eignung des bovinen γ -Kristallin als *scaffold* zur Generierung alternativer Bindemoleküle konnte bereits am Beispiel des Zielmoleküls Östradiol, einem Vertreter der Haptene, gezeigt werden (Fiedler & Rudolph, 1999).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Fragestellung war, ob sich das *scaffold* auch zur Generierung von Bindemolekülen gegen Proteine eignet. Als Zielmoleküle für diese Untersuchungen wurden der Fc-Teil der humanen Immunglobuline G und M ausgewählt. Die Isolierung von Bindemolekülen gegen IgG-Fc und IgM-Fc war ein Kooperationsprojekt zwischen Scil Proteins GmbH und Multimetrix GmbH (Regensburg), mit dem Ziel, diese Varianten in einem diagnostischen Assay auf der Grundlage der Luminex[®] Technologie einzusetzen. Dabei sollten hoch spezifische Affilin[™]-Varianten gegen IgM-Fc für eine Abreicherung von IgM-Molekülen vor einem Assay zur Detektion von IgG-Molekülen isoliert werden. IgG-Fc bindende Affilin[™]-Varianten sollten dagegen für diesen Assay eine hohe Affinität gegenüber dem Zielmolekül aufweisen, um sie als Sekundärantikörper einzusetzen. Darüber hinaus könnten solche Fc-Teil bindenden Affilin[™]-Varianten auch für Anwendungen in der Chromatographie entwickelt und eingesetzt werden.

3.1 Selektion der bovinen Bibliothek GCUC1 gegen IgG-Fc

3.1.1 *panning* und Phagen-ELISA

Zur Isolierung von bovinen γ -Kristallin Varianten, die spezifisch humanes IgG-Fc binden, wurde das polyklonale Zielmolekül für den *panning*-Prozess an der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert. Die Ausgangsbibliothek GCUC1 wurde amplifiziert (s. 2.2.2.2) und mit Hilfe von Helferphagen wurden Phagen erzeugt, die auf ihrer Oberfläche die verschiedenen Varianten des bovinen γ -Kristallins präsentierten. Die Phagen wurden isoliert, und auf ihre Bindung an IgG-Fc selektioniert. Durch verschiedene Waschbedingungen sollten die ungebundenen und schwach bindenden Phagen entfernt werden. In Tab. 5 sind die Waschbedingungen für die einzelnen *panning*-Runden aufgelistet. Die erhaltene Anzahl an reinfizierten *E. coli*-TG1 Kolonien, entspricht der Anzahl an eluierten Phagen.

Tabelle 5: Übersicht der Waschbedingungen und Anzahl der erhaltenen Phagen der einzelnen *panning*-Runden bei der Selektion der bovinen Bibliothek GCUC1 gegen IgG-Fc.

<i>panning</i> - Runde	Waschbedingung	Anzahl eluierter Phagen
1	10 x PBS, 0,1 % Tween 20 10 x PBS	2×10^6
2	15 x PBS, 0,1 % Tween 20 15 x PBS	3×10^3
3	20 x PBS, 0,1 % Tween 20 20 x PBS	1×10^4

Die Anzahl der eluierten Phagen sank in der zweiten *panning*-Runde aufgrund der steigenden Stringenz der Waschbedingungen. Durch die Anreicherung und Amplifizierung von Phagen, die IgG-Fc binden, stieg in der dritten Runde die Anzahl der eluierten Phagen leicht an.

Die Bindungseigenschaften der gegen IgG-Fc gerichteten, angereicherten Phagen wurden mittels ELISA getestet. Untersucht wurde die Bindung der Phagen an IgG-Fc, BSA und die unspezifische Bindung an die Oberfläche der Mikrotiterplatte. Als Kontrolle wurden die *wells* ohne Phagen inkubiert. Zur Detektion der gebundenen Phagen wurde ein anti-M13-Antikörper mit Peroxidase-Konjugation eingesetzt (Abb. 7).

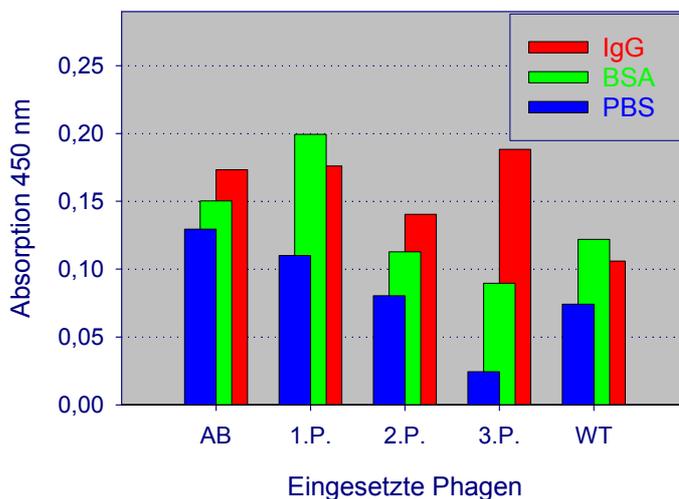


Abbildung 7: ELISA zur Überprüfung der Bindungseigenschaften der Phagen in den einzelnen *panning*-Runden (1. P., 2. P., 3. P.) bzw. der Ausgangsbibliothek (AB) und des bovinen γ -Kristallin WT (WT). Die Absorption der Kontrolle (PBS anstelle von Phagen) wurde von den Meßdaten abgezogen. Beschichtet wurde mit je 10 $\mu\text{g/ml}$ IgG-Fc oder BSA bzw. PBS. Die Phagen wurden unverdünnt zugegeben und als Detektionsantikörper diente ein anti-M13-AK-POD Konjugat in einer Verdünnung von 1:5000.

Vergleicht man die einzelnen *panning*-Runden und die Ausgangsbibliothek hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften, kann man nicht von einer Anreicherung sprechen (Abb. 7). Dennoch läßt sich in der dritten Runde eine Verschiebung der Bindungsspezifität zugunsten von IgG-Fc als Target feststellen. Allgemein ist anzumerken, dass die Unterschiede in der Bindung zwischen dem Target und den Kontrollen im Vergleich zu dem relativ hohen Hintergrundsignal sehr klein sind. Aus diesem Grund erlaubt dieser ELISA keine genaue Aussage über die Anreicherung während der Selektion.

Nach der Testung des Phagen-*pools* sollten einzelne Phagen mit bindenden bovinen γ -Kristallin Varianten aus der 3. *panning*-Runde isoliert werden. Von 92 einzelnen Klonen der 3. *panning*-Runde wurden monoklonale Phagen hergestellt und isoliert (s. 2.2.2.5). Diese wurden in einem Einzelphagen-ELISA auf ihre Bindung an IgG-Fc bzw. BSA untersucht (Abb. 8). Es ist zu erkennen, dass einige spezifisch bindende Phagen bzw. bovine γ -Kristallin Varianten isoliert werden konnten.

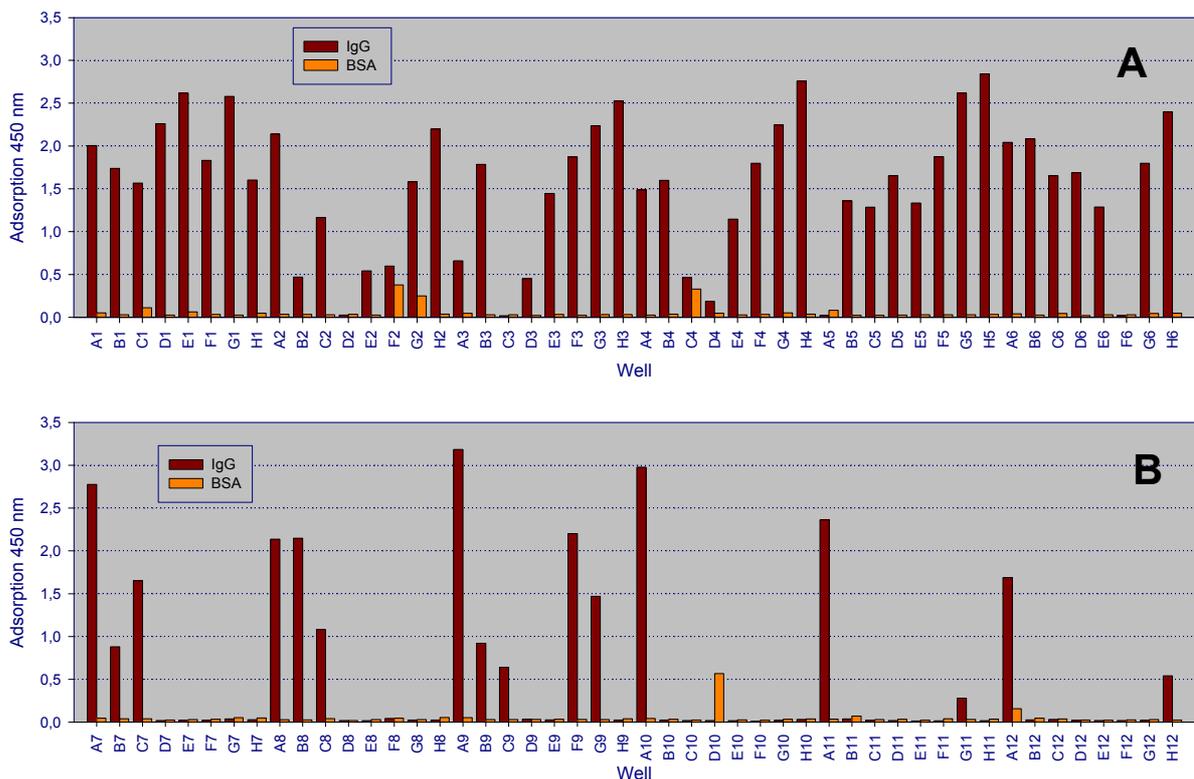


Abbildung 8: ELISA zur Überprüfung der Bindung von isolierten Phagen aus Einzelkolonien der 3. *panning*-Runde von GCUC1 gegen IgG-Fc. Als Kontrollen dienen isolierte Phagen mit dem bovinen γ -Kristallin WT (G12, H12) bzw. Überstände von Zellen ohne Phagemid (E12, F12). Die Beschriftung der X-Achse (**A**) (A1 bis H6) und (**B**) (A7 bis H12) definiert die Position der *wells* in der Mikrotiterplatte bei der Phagenanzucht. Beschichtet wurde mit 10 μ g/ml IgG-Fc und BSA. Die Phagen wurden unverdünnt zugegeben und als Detektionsantikörper diente ein anti-M13-AK-POD Konjugat in einer Verdünnung von 1:5000.

3.1.2 Charakterisierung der bovinen IgG-Fc- bindenden AffilinTM-Varianten

Es wurden 56 Einzelphagen identifiziert, die eine deutliche spezifische Bindung an IgG-Fc zeigten. Alle 56 positiven Klone wurden einer DNA-Sequenzierung unterzogen (s. 2.2.3.9). Mit dem Sequenzierprimer pCANTAB wurden die inserierten Gene für das bovine γ -Kristallin in Vorwärtsrichtung sequenziert. Von den 56 isolierten Klonen konnten lediglich die Klone Mu4G und Mu6D identifiziert werden, die keinen *frame shift* aufwiesen (Tab. 6). Überraschenderweise enthielten beide Klone an einer der acht zur Randomisierung zugelassener Position ein TGA-Stop-Codon, welches eigentlich durch die Verwendung von NNK Triplets bei der Erstellung des synthetischen scaffold Gen-*pools* ausgeschlossen sein sollte.

Es wurde eine Western Blot-Analyse (s. 2.2.4.7) von Zellrohextrakten aus *E. coli*-Zellen, die zuvor zur Expression des Fusionsprotein aus bovinem γ -Kristallin und pIII-Phagenprotein induziert wurden, durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass trotz Stop-Codon beide Varianten Mu4G und Mu6D als Fusionsprotein mit einer erwarteten Größe von 66 kDa exprimiert wurden (Abb. 9). Der Nachweis des Fusionsproteins erfolgte über den am C-Terminus des bovinen γ -Kristallins befindlichen *E-tag*, gegen den ein Antikörper verfügbar war. Offensichtlich erfolgte hier eine Trypophan-Suppression für das Codon TGA, welche im *E. coli*-Stamm TG1 beobachtet wird (Engelberg-Kulka & Schoulaker-Schwarz, 1996).

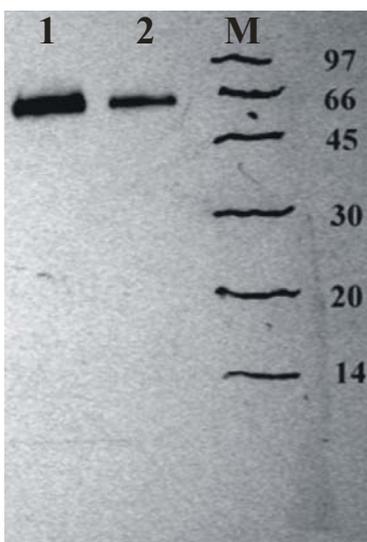


Abbildung 9: Immunologischer Nachweis des Fusionsprotein aus bovinem γ -Kristallin und pIII-Phagenprotein. Aufgetragen wurden Zellrohextrakte von Zellen der exprimierten Variante Mu6D (Bahn 1) und Mu4G (Bahn 2). M kennzeichnet die Bahn mit dem Marker LMW und den entsprechenden Größen in kDa. Die Proteine wurden mit Hilfe von α -*E-tag*-AK und α -Maus-AK-HRP Konjugat nachgewiesen.

Die beiden Varianten Mu6D und Mu4G, die trotz Stop-Codon eine Expression gezeigt hatten, sollten zur weiteren Charakterisierung in einen geeigneten Vektor zur Proteinüberexpression umkloniert werden. Dafür wurde der Vektor pET20b (Novagen) ausgewählt, der es erlaubt, das exprimierte Protein über den C-terminal fusionierten His₆-tag mittels Affinitätschromatographie (IMAC) zu reinigen. Die beiden Varianten Mu6D und Mu4G wurden daher von dem Phagemid-Vektor pCANTAB in den Vektor pET20b umkloniert. Für eine höhere Ausbeute bei der rekombinanten Proteinexpression wurde anschließend noch das jeweilige TGA-Stop-Codon in ein TGG-Tryptophan-Codon umgewandelt. Unter Verwendung der Primerpaare Mu6D-QC-Trp-for und Mu6D-QC-Trp-rev für die Variante Mu6D und Mu4G-QC-Trp-for und Mu4G-QC-Trp-rev für die Variante Mu4G erfolgte eine Quickchange™-Mutagenese. Der Austausch wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft und die entstandenen Vektoren pET20bMu6DTrp und pET20bMu4GTrp anschließend in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21 (DE3) mit dem Plasmid pUBS520 kotransformiert. Auf dem Plasmid pUBS520 ist die für *E. coli* seltene Argenin-tRNA *ArgU* codiert. Die Expression dieser tRNA wird ebenfalls, wie das rekombinante Protein, durch Zugabe von IPTG induziert, was zu einer Steigerung der Expressionsrate führt. In Tab. 6 sind die DNA- bzw. die daraus resultierenden Proteinsequenzen der beiden Varianten im Vergleich zum bovinen γ -Kristallin WT abgebildet.

Tabelle 6: DNA- und Proteinsequenzen der aus der *Selektion* gegen IgG-Fc isolierten Varianten Mu6D Trp und Mu4G Trp an den acht variablen Positionen im Vergleich zum bovinen γ -Kristallin WT (byc-WT). Dargestellt sind die Sequenzen der Varianten nach dem Austausch des TGA-Stop-Codons gegen ein TGG-Codon (**W**) in Position 4 (Mu6D Trp) bzw. Position 6 (Mu4G Trp).

AS-Position	2	4	6	15	17	19	36	38
DNA								
byc-WT	AAG	ACT	TAC	TGC	GAG	AGC	CGC	GAC
Mu6D Trp	GAT	TGG	ACT	GAT	CAT	AAG	GCG	CAG
Mu4G Trp	GCG	CCG	TGG	TCG	ACG	TCT	CGT	CTG
Protein								
byc-WT	K	T	Y	C	E	S	R	D
Mu6D Trp	D	W	V	D	H	K	A	Q
Mu4G Trp	A	P	W	S	T	S	R	L

Die beiden Varianten wurden im 1,5 l Maßstab im Schüttelkolben nach Induktion mit IPTG überexprimiert. Die Varianten konnten anschließend über den C-terminalen His₆-tag aus der löslichen Proteinfraction mittels Ni-NTA-Agarose Säule abgetrennt werden (s. 2.2.4.2). In einem weiteren Reinigungsschritt erfolgte eine Gelfiltration an Superdex 75 (s. 2.2.4.3).

Mit den beiden gereinigten Proteinen wurden ELISAs durchgeführt. Für den Nachweis wurde das Anti-Tetra-His-Peroxidase Konjugat verwendet, welches den His₆-tag der exprimierten bovinen γ -Kristallin-Varianten spezifisch erkennt.

In Abb. 10A ist deutlich erkennbar, dass die Variante Mu6D Trp, entgegen der Variante Mu4G Trp und dem bovinen γ -Kristallin WT, sehr spezifisch an IgG-Fc bindet, wobei eine Dissoziationskonstante von 11 μ M berechnet wurde. Eine Bindung an IgM-Fc, BSA bzw. die Mikrotiterplatte wurde dagegen für die Variante Mu6D Trp nicht detektiert (Abb. 10B).

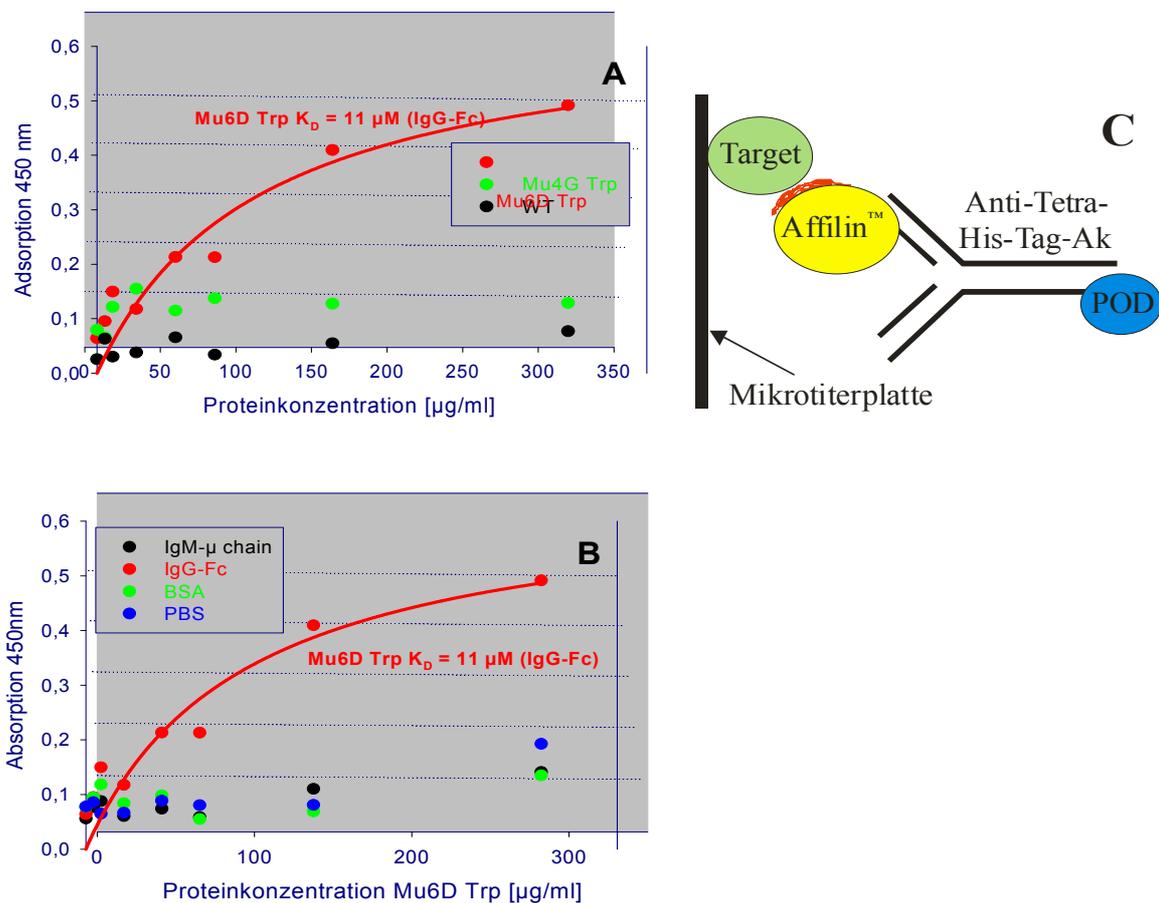


Abbildung 10: **A** ELISA zur Überprüfung der Bindung von gereinigtem Protein der Varianten Mu6D Trp, Mu4G Trp und bovinem γ -Kristallin WT an IgG-Fc. **B** ELISA zur Überprüfung der Bindung von gereinigtem Protein der Variante Mu6D Trp an IgG-Fc, IgM-Fc, BSA bzw. an die Mikrotiterplatte. Beschichtet wurde mit 10 μ g/ml IgG-Fc, IgM-Fc und BSA bzw. PBS. Als Detektionsantikörper diente ein anti-Tetra-His-tag-AK-POD Konjugat in einer Verdünnung von 1:2000. Die dargestellten Absorptionswerte sind Mittelwerte aus drei Parallelmessungen. **C** Schematischer Aufbau des ELISA

3.1.3 Nachweis der Bindung mittels Oberflächenplasmonresonanz

Die aus den ELISA-Experimenten ermittelten Dissoziationskonstanten sollte durch Oberflächenplasmonresonanz (Biacore), einer weiteren Methode zur Messung von Bindung bzw. Dissoziationskonstanten, bestätigt werden. Dazu wurden etwa 1000 RU IgG-Fc auf einen CM5-Chip immobilisiert (s. 2.2.5.8). Dabei wurde das IgG-Fc über primäre Amine, wie z. B. die der Lysin-Seitenkette, kovalent an die Chipoberfläche gekoppelt. Verschiedene Konzentrationen (1 μ M, 5 μ M und 10 μ M) der Variante Mu6D Trp wurden über den Chip geleitet (Assoziationsphase) und anschließend mit Laufpuffer gewaschen (Dissoziationsphase). Es wurden die in Abb. 11 gezeigten Sensogramme aufgenommen. Mit Hilfe des Programms BiaEvaluation[®] konnten Dissoziationskonstanten aus dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziationsphasen und der Assoziationsphasen bestimmt werden. Diese lagen im Bereich von 6 μ M – 15 μ M und bestätigten damit die Ergebnisse der ELISA-Experimente.

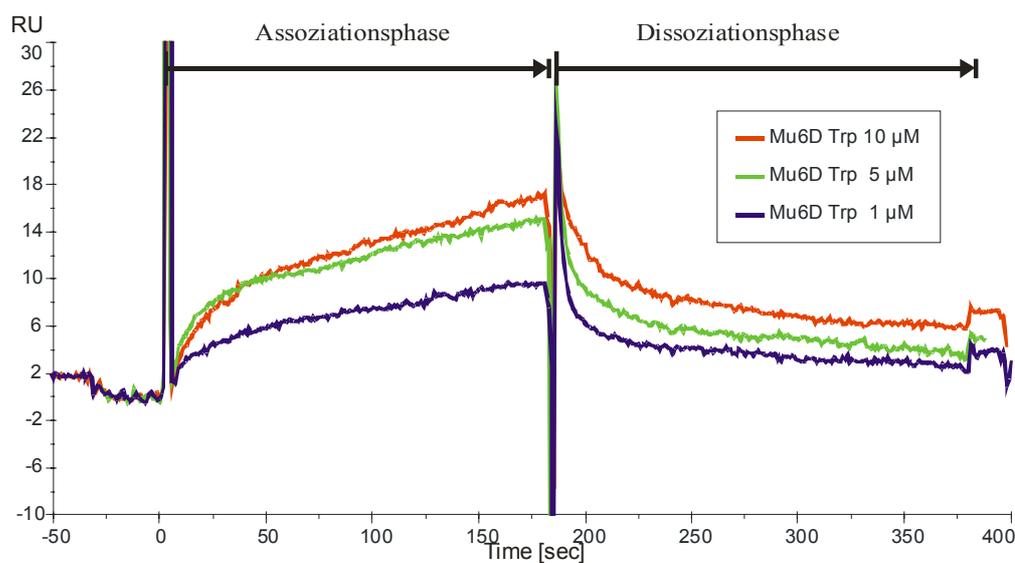


Abbildung 11: Sensogramme der Biacore-Experimente zur Bindung der Mutante Mu6D Trp an IgG-Fc. Es wurden 1000 RU IgG-Fc an einen CM5-Chip immobilisiert, und Mu6D Trp in Konzentrationen von 1 μ M (blau), 5 μ M (grün) und 10 μ M (rot) über den Chip geleitet. Die Assoziations- und Dissoziationsphase betrug jeweils 3 min. Als Laufpuffer diente HBS-EP mit einer Flussgeschwindigkeit von 30 μ l/min.

Mit Hilfe von Konkurrenzexperimenten sollte die Spezifität der Bindung der Variante Mu6D Trp nachgewiesen werden. Dazu wurde die Variante vor der Messung am Biacore mit einem molaren Überschuss an IgG-Fc inkubiert. Bei einer spezifischen Bindung an IgG-Fc hat dies eine verminderte Bindung an das am Chip immobilisierte IgG-Fc und damit ein geringeres Messsignal zur Folge.

Das konnte man für die Variante Mu6D Trp anhand des veränderten Kurvenverlaufs und eines geringeren Messsignals beobachten (Abb. 12, Kurve blau). Das Ergebnis zeigt, dass es sich um eine spezifische Wechselwirkung handelt und nicht eine unspezifische Affinität der Variante mit der Chipoberfläche vorliegt.

Die Messung der Wechselwirkung von IgG-Fc mit dem Chip zeigte keine nachweisbare Bindung (Kontrolle).

Versucht man die Bindung mit BSA zu kompetitieren (Abb. 12, Kurve grün), erhält man einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die Variante Mu6D Trp ohne Kompetitor (Abb. 12, Kurve rot), was dafür spricht, dass sich die Bindung der Variante an IgG-Fc nicht durch BSA kompetitieren läßt.

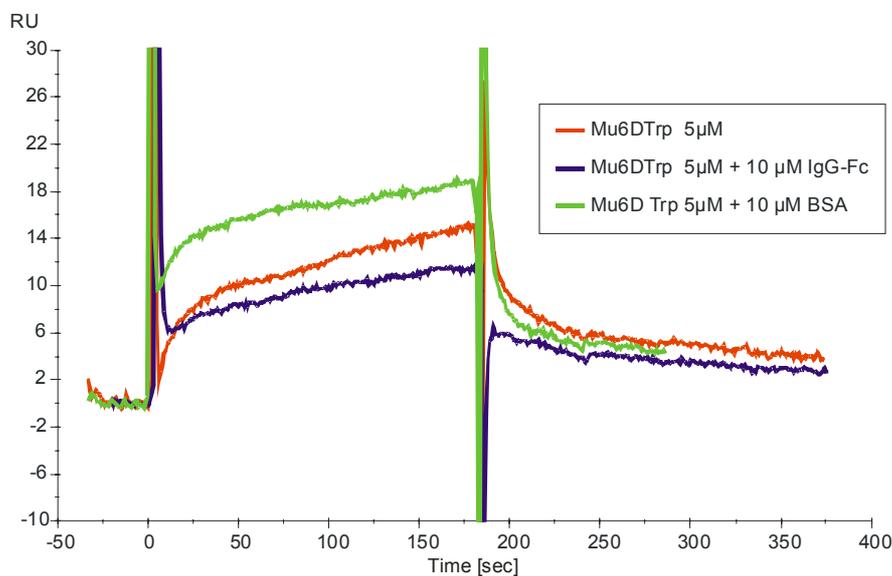


Abbildung 12: Sensogramme der Biacore-Experimente zur Konkurrenz der Bindung der Mutante Mu6D Trp an einen mit IgG-Fc immobilisierten CM5-Chip. Es wurden 1000 RU an IgG-Fc immobilisiert. Zur Konkurrenz der Bindung wurde eine 5 µM Lösung an Mu6D Trp (rot), eine 5 µM Lösung an Mu6D Trp mit 10 µM IgG-Fc (blau) bzw. 10 µM BSA (grün) versetzt und über den Chip geleitet. Die Assoziations- und Dissoziationsphase betrug jeweils 3 min. Als Laufpuffer wurde HBS-EP mit einer Flussgeschwindigkeit von 30 µl/min verwendet.

Im Ergebnis der Selektion der bovinen γ -Kristallin-Bibliothek GCUC1 mit 10^5 unabhängigen Varianten konnte nach drei *panning*-Runden gegen IgG-Fc eine bovine γ -Kristallin Variante isoliert werden, die spezifisch das Target bindet. Die Dissoziationskonstante konnte durch ELISA- und Biacore-Experimente mit 1×10^{-5} M bestimmt werden. Die Eignung des bovinen γ -Kristallin für die Isolierung von Protein bindenden AffilinTM-Varianten konnte damit nachgewiesen werden.

3.2 Selektion der humanen Bibliothek CR20 gegen IgG-Fc

Nach dem erfolgreichen Nachweis der Eignung von bovinem γ -Kristallin als Gerüstprotein für die Generierung von Bindemolekülen lag der Ansatz nahe, auf der Grundlage des homologen humanen γ -Kristallin eine Bibliothek zu konstruieren. Eine solche Bibliothek hätte entscheidende Vorteile gegenüber der bovinen γ -Kristallin Bibliothek. Zum einen zeichnet sich humanes γ -Kristallin durch eine geringere Immunogenität im Menschen aus, was für einen therapeutischen Einsatz von humanen- γ Kristallin Varianten, aber auch für die Separation und Reinigung von therapeutischen Proteinen von Vorzug wäre. Zum anderen würde man mit einer größeren und qualitativ besseren Bibliothek, die eine größere Anzahl an korrekten Varianten aufweist, höher affine AffilinTM-Varianten mit größerer Wahrscheinlichkeit isolieren können. Mit den Erfahrungen der Konstruktion der bovinen γ -Kristallin Bibliothek wurde von Tanja Lisse (Scil Proteins GmbH, Halle) eine neue Bibliothek, auf der Grundlage des Genes für humanes γ -B-Kristallin (*grygB*) erstellt. Es wurden die gleichen acht Positionen randomisiert, die bereits für das bovine γ -Kristallin ausgewählt worden waren. In Kooperation mit der Firma Genart GmbH (Regensburg) konnte eine quantitativ und qualitativ hochwertige Bibliothek erzeugt werden. Sie hat eine Größe von 5×10^8 unabhängigen Klonen, wobei jeder Klon ca. 120-mal vertreten ist. Qualitativ gesehen haben über 80 % der Klone nur in den acht variablen Positionen die vorgesehenen Substitutionen und besitzen keine weiteren Mutationen noch zeigen sie den Einbau der Stop-Codons TAA bzw. TGA.

3.2.1 Selektion gegen IgG-Fc und Isolierung bindender Varianten

Im Rahmen dieser Arbeit sollten spezifische humane AffilinTM-Varianten mit Hilfe des *Phage Display* gegen den polyklonalen, humanen Fc-Teil von IgG selektiert und isoliert werden. Dafür wurde zuerst eine, der wie unter 3.1.1 beschriebenen *panning*-Runden durchgeführt. In dieser einen *panning*-Runde wurde zweimal mit PBS, zweimal mit PBS und 3 % BSA sowie zweimal mit PBS gewaschen.

Es wurde, wie unter 3.1.1 beschrieben, ein Einzelphagen-ELISA durchgeführt und 12 im ELISA positive Klone sequenziert. Von den 12 Klonen waren sieben Klone korrekt, das heißt sie besaßen nur in den acht variablen Positionen Substitutionen. Drei dieser Klone wiesen jedoch in einer der variablen Positionen ein *amber*-Stop-Codon (TAG) auf. Die sieben Klone wurden in den Expressionsvektor pET20b umkloniert. Die so erhaltenen Expressionsklone

wurden einer Testexpression zur Überprüfung der löslichen Proteinexpression unterzogen. Für die Testexpression wurde *E. coli* BL21 (DE3), bzw. NovaBlue (DE3) für Klone mit *amber* Stop-Codon, mit den entsprechenden Expressionsvektoren transformiert. Lediglich die drei Klone SPC-1-A1, SPC-1-A7 und SPC-1-G3 waren in der löslichen Proteinfraction nachweisbar. Die DNA- und Proteinsequenzen dieser drei Klone sind in Tab. 7 dargestellt.

Tabelle 7: Vergleich der DNA- und Proteinsequenzen der acht variablen Positionen der aus der Selektion gegen humanes, polyklonales IgG-Fc isolierten humanen AffilinTM-Varianten und des humanen- γ Kristallin WT (*hyc*-WT).

AS-Position	2	4	6	15	17	19	36	38
DNA								
<i>hyc</i> -WT	AAG	ACC	TAC	AGC	GAA	ACC	AGG	GAG
SPC-1-A1	TTT	TGG	ATG	AGG	GAT	GGT	AAG	AAG
SPC-1-A7	CTG	TGT	TCT	AGG	ATG	CTG	AAT	TGG
SPC-1-G3	TCT	ATT	CTT	ATT	GGT	ACT	GTG	CAG
Protein								
<i>hyc</i> -WT	K	T	Y	S	E	T	R	E
SPC-1-A1	F	W	M	R	D	G	K	K
SPC-1-A7	L	C	S	R	M	L	N	W
SPC-1-G3	S	I	L	I	G	T	V	Q

3.2.2 Bindungsanalyse der isolierten Varianten aus der ersten Selektion

Die drei mit guter Ausbeute löslich exprimierbaren AffilinTM-Varianten SPC-1-A1, SPC-1-A7 und SPC-1-G3 wurden im 1,5l Maßstab überexprimiert und in zwei Chromatographieschritten (IMAC und Gelfiltration) gereinigt. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden Biacore-Experimente durchgeführt. Dazu wurde wie unter 3.1.3 beschrieben auf einen CM5-Chip IgG-Fc immobilisiert und anschließend verschiedene Konzentrationen der AffilinTM-Varianten gemessen. Sensogramme von sechs verschiedenen Konzentrationen der Variante SPC-1-A7 wurden mit Hilfe der BiaEvaluation[®] Software unter Annahme einer 1:1 Stöchiometrie ausgewertet und eine Dissoziationskonstante von ca. 280 nM bestimmt (Abb. 13). Für die Variante SPC-1-A1 konnte eine Dissoziationskonstante von 230 nM und für die Variante SPC-1-G3 von 830 nM durch diese Biacore-Experimente bestimmt werden.

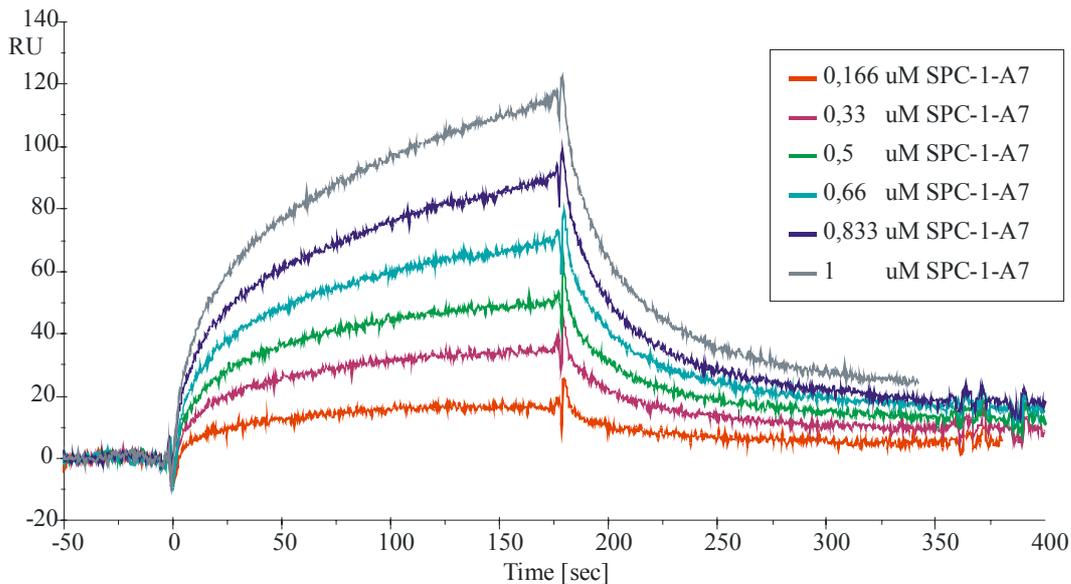


Abbildung 13: Sensogramme der Biacore-Experimente zur Bindung von SPC-1-A7 an einen mit IgG-Fc immobilisierten CM5-Chip. Nach Immobilisierung von 180 RU IgG-Fc wurden 1 μ M (grau), 833 nM (blau), 666 nM (türkis), 500 nM (grün), 333 nM (magenta) und 166 nM (rot) SPC-1-A7 über den Chip geleitet. Die Assoziations- und Dissoziationsphase betrug jeweils 3 min. Als Laufpuffer wurde HBS-EP mit einer Flussgeschwindigkeit von 30 μ l/min verwendet.

Zur Überprüfung der spezifischen Bindung an IgG-Fc wurden am Biacore Konkurrenzexperimente durchgeführt. Wie bereits unter 3.1 beschrieben, wurden die AffilinTM-Varianten allein bzw. nach 5-minütiger Vorinkubation mit IgG-Fc über einen CM5-Chip geleitet, auf dem 180 RU IgG-Fc immobilisiert war. Die jeweils verwendeten Konzentrationen an AffilinTM bzw. Kompetitor sind neben den erhaltenen Sensogrammen in Abb. 14 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung an das immobilisierte IgG-Fc bei allen drei AffilinTM-Varianten spezifisch durch freies IgG-Fc kompetitiert werden konnte. Als Kontrolle wurde IgG-Fc in den eingesetzten Konzentrationen über den Chip geleitet und zeigte keine Änderung des Resonanzsignals.

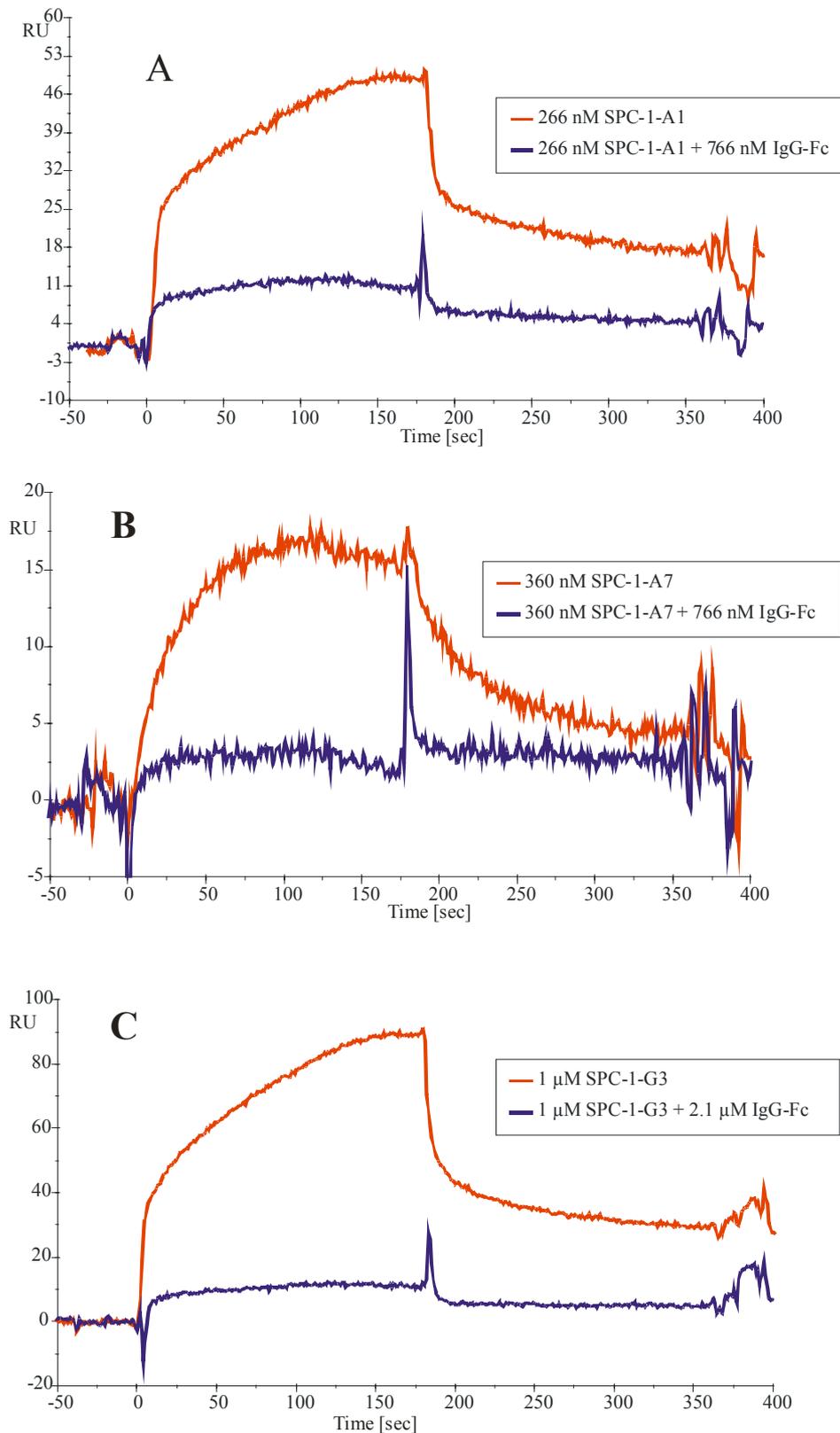


Abbildung 14: Sensogramme der Biacore-Experimente zur Konkurrenz der Bindung der AffilinTM-Varianten SPC-1-A1 (A), SPC-1-A7 (B) und SPC-1-G3 (C) an einen CM5-Chip mit immobilisierten IgG-Fc. Für die Experimente wurden 180 RU an polyklonalem IgG-Fc immobilisiert. Zur Konkurrenz der Bindung wurde die angegebenen Konzentrationen der Varianten und IgG-Fc eingesetzt. Als Laufpuffer wurde HBS-EP mit einer Flussgeschwindigkeit von 30 μ l/min verwendet.

Zusätzlich dazu wurde analog zur Konkurrenz mit IgG-Fc für alle drei Affilin™-Varianten die Konkurrenz mit polyklonalem IgM-Fc, IgA bzw. BSA getestet. Dabei zeigte sich, dass die Bindung der Affilin™-Varianten SPC-1-A7 und SPC-1-G3 an IgG-Fc sowohl durch Zugabe von IgG-Fc und IgM-Fc als auch IgA aber nicht durch Zugabe von BSA kompetitiert werden kann (Daten nicht gezeigt). Die Bindung der Affilin™-Variante SPC-1-A1 an IgG-Fc konnte dagegen nur durch Zugabe von IgG-Fc und IgM-Fc jedoch nicht durch Zugabe von IgA kompetitiert werden (Abb. 15). Als Kontrolle wurden IgG-Fc, IgM-Fc, IgA und BSA in den eingesetzten Konzentrationen über den Chip geleitet und zeigten keine Änderung des Resonanzsignals.

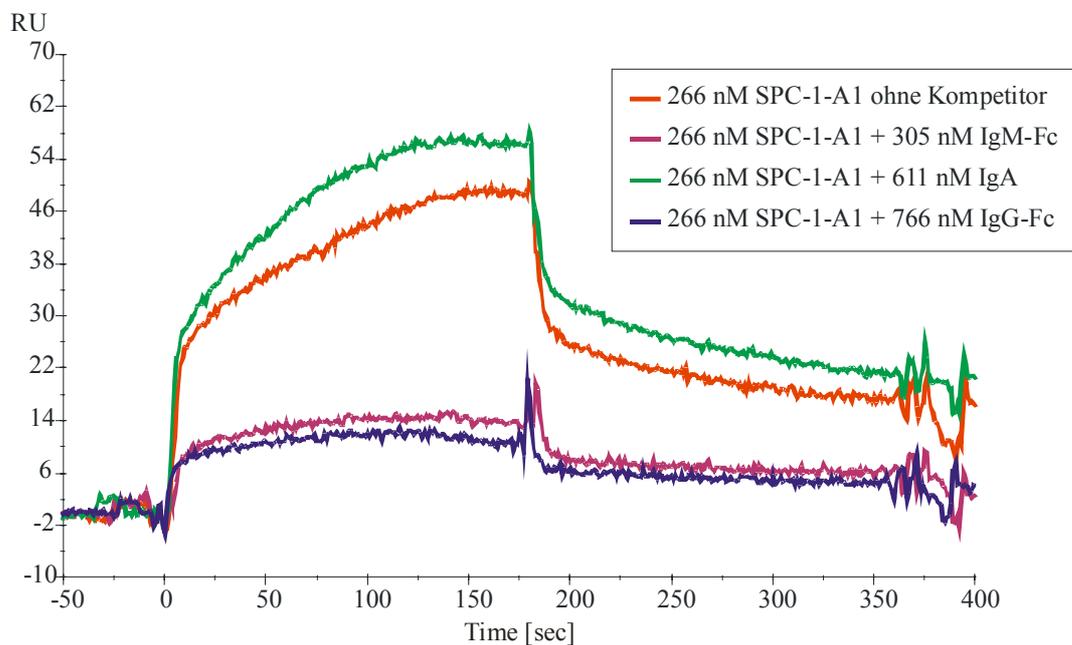


Abbildung 15: Sensogramme der Biacore-Experimente zur Konkurrenz der Bindung der Variante SPC-1-A1 an einen CM5-Chip mit immobilisiertem polyklonalem IgG-Fc. Es wurden 180 RU an IgG-Fc immobilisiert. Zur Konkurrenz der Bindung wurde die angegebene Konzentration der Variante SPC-1-A1 mit der angegebenen Konzentration an polyklonalem IgG-Fc, IgM-Fc bzw. IgA inkubiert und vermessen. Als Laufpuffer diente HBS-EP mit einer Flussgeschwindigkeit von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Anschließend sollte die Dissoziationskonstante mit Hilfe eines ELISA bestimmt werden. Dazu wurde, wie schon unter 3.1.2 beschrieben, die Oberfläche von Mikrotiterplattenvertiefungen mit IgG-Fc beschichtet. Es folgten die Bindung der Affilin™-Varianten an das IgG-Fc und der Nachweis der gebundenen Affilin™-Varianten über den Detektionsantikörper Anti-humanen- γ Kristallin-AK als POD-Konjugat. Es konnten Dissoziationskonstanten für die Bindung der Varianten an das IgG-Fc von 0,8 bis 1,9 μM berechnet werden (Abb. 16). Es konnte ebenfalls für alle drei Varianten eine Bindung an IgM-Fc, dagegen aber keine Bindung an BSA detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

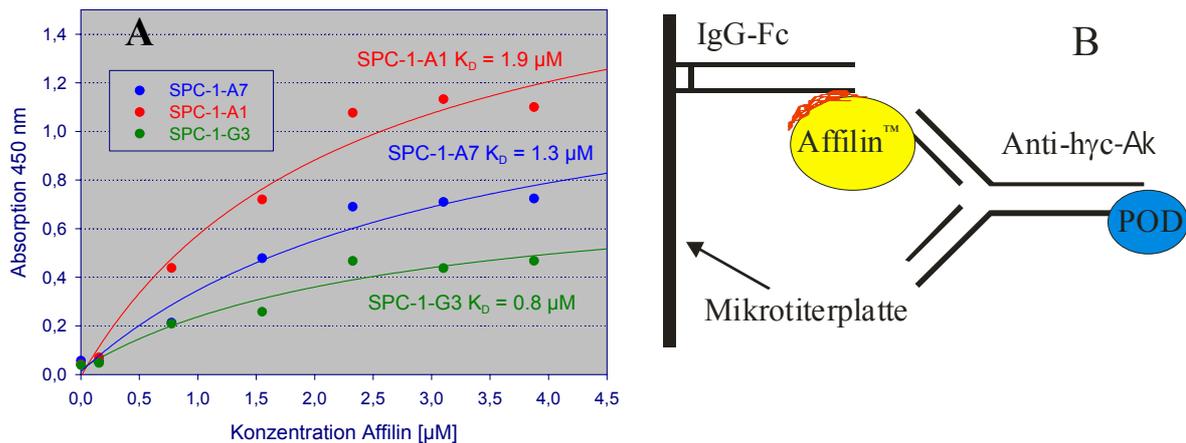


Abbildung 16: **A** Nachweis der Bindung von drei verschiedenen Affilin™-Varianten an IgG-Fc mittels ELISA. Beschichtet wurde mit 10 µg/ml IgG-Fc. Als Detektionsantikörper diente ein anti-hyc-AK-POD Konjugat in einer Verdünnung von 1:1000. Die dargestellten Absorptionswerte sind Mittelwerte aus drei Parallelmessungen. **B** Schematischer Aufbau des ELISA.

Aufgrund der Unterschiede in den bestimmten Dissoziationskonstanten zwischen den Methoden Oberflächenplasmonresonanz und ELISA sollten die Dissoziationskonstanten in einem weiteren ELISA mit verändertem Aufbau verifiziert werden. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit der entsprechenden Affilin™-Variante in einer Konzentration von 10 µg/ml beschichtet. Anschließend erfolgte die Bindung von verschiedenen Konzentrationen von biotinylierten IgG-Fc an die Varianten. Das gebundene IgG-Fc Biotin wurde mit Hilfe von Avidin-POD Konjugat nachgewiesen. Es ergaben sich die dargestellten Bindungskurven, von denen durch eine Kurvenanpassung die Dissoziationskonstanten berechnet wurden (Abb. 17). Die drei Varianten SPC-1-A1, SPC-1-A7 und SPC-1-G3 zeigten eine vergleichbare Bindung mit Dissoziationskonstanten von 86 nM, 69 nM und 50 nM. Die Inkubation der Varianten mit Avidin-POD Konjugat zeigte keine Absorption bei 450 nm.

Die Unterschiede in den durch ELISA bzw. Biacore bestimmten Dissoziationskonstanten könnten auf Mikroaggregate, die nicht mehr spezifisch ihr Zielmolekül erkennen zurückzuführen sein. Somit würde die eingesetzte Konzentration der Affilin™-Varianten im ELISA, wie in Abb. 16 und in den beschriebenen Biacore-Experimenten (Abb. 13), nicht der biologisch aktiven Konzentration entsprechen und die Dissoziationskonstanten in höhere Bereiche verschieben. Im Aufbau des ELISA in Abb. 17 ist die Dissoziationskonstante von der eingesetzten Konzentration an IgG-Fc abhängig, und spiegelt damit die Dissoziationskonstante der biologisch aktiven Affilin™-Varianten wider.

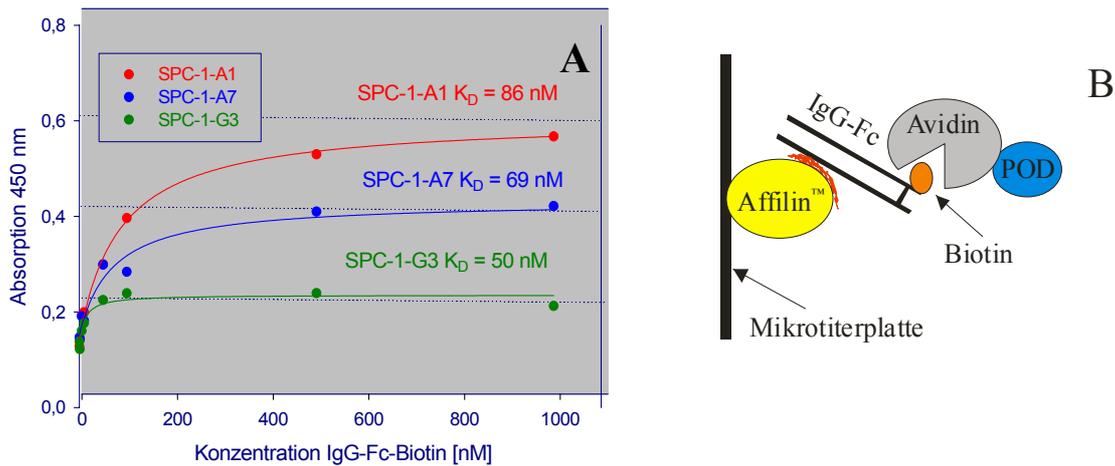


Abbildung 17: **A** Nachweis der Bindung von drei verschiedenen AffilinTM-Varianten an IgG-Fc mittels ELISA. Beschichtet wurde mit $10 \mu\text{g/ml}$ der entsprechenden Variante. Anschließend wurden die *wells* mit verschiedenen Konzentrationen an IgG-Fc-Biotin inkubiert. Als Detektionsantikörper diente ein Streptavidin-POD Konjugat in einer Verdünnung von 1:20000. Die dargestellten Absorptionswerte sind Mittelwerte aus drei Parallelmessungen. **B** Schematischer Aufbau des ELISA.

Aufgrund der Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass drei humane AffilinTM-Varianten isoliert werden konnten, die im Bereich von 10^{-7} M an IgG-Fc binden. Die beiden Varianten SPC-1-A7 und SPC-1-G3 binden alle getesteten Immunglobulinklassen nicht aber BSA. Die dritte Variante SPC-1-A1 zeigte eine Bindung an IgG-Fc und IgM-Fc, aber nicht an IgA und BSA.

3.2.3 Zweite Selektion gegen IgG-Fc

Unter Verwendung der humanen γ -Kristallin Bibliothek CR20 konnten bereits nach einer *panning*-Runde IgG-Fc bindende AffilinTM-Varianten isoliert werden.

Um noch höher affine AffilinTM-Varianten mit deutlich verbesserter Spezifität zu erhalten wurde ein neuer *panning*-Prozess unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Zum einen wurde das Zielmolekül in verbesserter Qualität verwendet. Bisher wurde ein polyklonales Gemisch an IgG-Fc im *panning*-Prozess eingesetzt, währenddessen in folgenden *panning*-Runden ein monoklonales IgG-Fc als *target* eingesetzt wurde. Dieser Fc-Teil, der dem Subtyp 1 zuzuordnen ist, wurde von der Firma Roche bezogen und vor der Verwendung nochmals in zwei Chromatographieschritten (Gelfiltration und Affinitätschromatographie an rProtein A) gereinigt. Des Weiteren wurden hier die Anzahl der *panning*-Runden auf drei erhöht. Außerdem wurde untersucht, ob und mit welchem Erfolg der Zusatz von Arginin den *panning*-Prozess beeinflusst. Dazu wurde vor der dritten *panning*-Runde der Phagen-*pool*

geteilt und ein Teil 1:1 mit 1 M Arginin versetzt. Anschließend wurden die Phagen auf die beschichtete Mikrotiterplatte gegeben und alle Waschschr itte in Anwesenheit von 0,5 M Arginin durchgeführt. Dem anderen Teil des Phagen-*pools* wurde kein Arginin zugesetzt. Die Übersicht der Waschbedingungen der einzelnen *panning*-Runden ist in Tab. 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Übersicht der Waschbedingungen der einzelnen *panning*-Runden bei der 2. Selektion der humanen- γ Kristallin Bibliothek CR20 gegen humanes, monoklonales IgG-Fc. Der Phagen-*pool* der dritten Runde wurde vor dem *panning* geteilt und separat weitergeführt (3 A bzw. 3 B).

<i>panning</i> -Runde	Waschbedingung
1	2 x PBS; 2 x PBS, 3 % BSA; 2 x PBS
2	2 x PBS; 2 x PBS, 3 % BSA 2 x PBS; 0,3 $\mu\text{g/ml}$ humanes IgG-Fc (MK) 2 x PBS; 3 $\mu\text{g/ml}$ humanes IgM-Fc (PK) 2 x PBS
3 A	2 x PBS, 0,1 % Tween 20; 2 x PBS, 3 % BSA 2 x PBS, 1 $\mu\text{g/ml}$ humanes IgG-Fc (MK) 2 x PBS, 10 $\mu\text{g/ml}$ humanes IgM-Fc (PK) 2 x PBS, 0,1 % Tween 20
3 B	Wie 3 A, aber alle Lösungen enthielten 0,5 M Arginin

Nach der dritten *panning*-Runde wurden jeweils 92 Klone im Einzelphagen-ELISA getestet. Aus dem Selektionsprozess, der ohne Zugabe von Arginin erfolgte (Runde 3 A), wurden 18 Klone identifiziert, die im Einzelphagen-ELISA eine Bindung an IgG-Fc, jedoch nicht an BSA bzw. an die Mikrotiterplatte selbst zeigten (Abb. 18). Lediglich zwei der getesteten Klone aus dem Selektionsprozess, bei dem in der dritten Runde 0,5 M Arginin zugesetzt wurde (Runde 3B), zeigten ein deutliches Signal im Einzelphagen-ELISA, was auf die Bindung der Phagen an das Zielmolekül schließen ließ (Daten nicht gezeigt).

Alle 20 Klone wurden sequenziert (Sequenzen im Anhang). Lediglich zwei (SPC-1-B2, SPC-1-F12) der 18 Klone aus dem *panning* ohne Zusatz von Arginin hatten eine Sequenz ohne Stop-Codon und ohne weitere Substitution, Insertion oder Deletion. Vier weitere Klone (SPC-1-C9, SPC-1-E12, SPC-1-G9, SPC-1-E7) zeigten ein TAG-Stop-Codon in einer der variablen Positionen. Die verbliebenen 12 Klone wiesen identische Sequenzen auf. Diese Sequenz beinhaltete allerdings zwei TAG-Stop-Codons in variablen Positionen. Ein Klon mit dieser Sequenz (SPC-1-F1) wurde hinsichtlich seiner Expression und Bindungseigenschaften weiter untersucht (s. 3.3.2). Die beiden Klone (SPC-1-H7a, SPC-1-H8a) aus dem *panning* mit Arginin wiesen eine Sequenz ohne Stop-Codon auf.

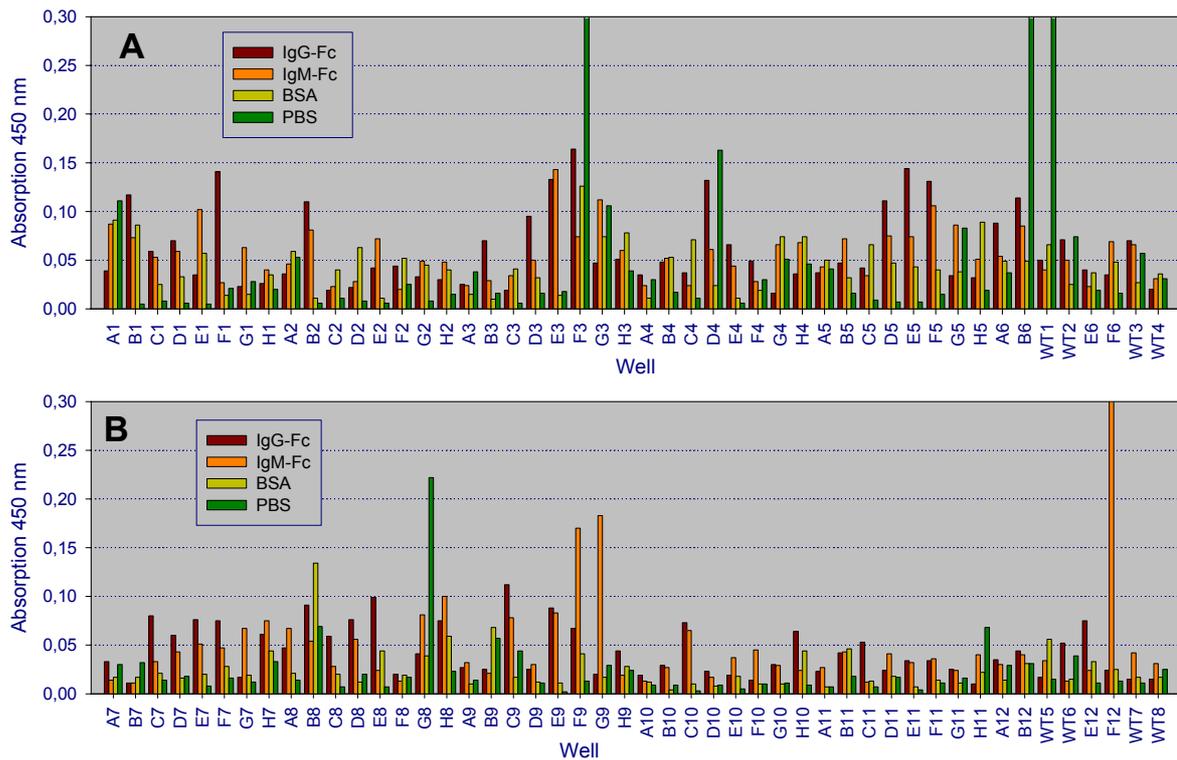


Abbildung 18: ELISA zur Überprüfung der Bindung von isolierten Phagen aus Einzelkolonien der *panning*-Runde 3 A. Als Kontrolle dienten isolierte Phagen aus dem humanen- γ Kristallin WT (WT1-WT8). Die Beschriftung der X-Achse A (A1 bis F6) und B (A7 bis F12) definiert die Position der Vertiefung in der Mikrotiterplatte bei der Phagenanzucht. Beschichtet wurde mit 10 μ g/ml IgG-Fc, IgM-Fc und BSA bzw. PBS. Die Phagen wurden unverdünnt zugegeben und als Detektionsantikörper diente ein anti-M13-AK-POD Konjugat in einer Verdünnung von 1:5000.

3.2.4 Bindungsanalyse der Varianten aus der zweiten Selektion gegen IgG-Fc

Die aus den isolierten unterschiedlichen sechs Gen-Sequenzen des humanen γ -Kristallins des *pannings* 3 A und die zwei Klone des *pannings* 3 B wurden in den Expressionsvektor pET20b umkloniert. In einer anschließenden Testexpression wurde die Löslichkeit der AffilinTM-Varianten analysiert. Für Klone mit TAG-Codon wurde der TAG-Suppressor-Stamm Nova Blue (DE3) transformiert, welcher in 10 % der Fälle anstelle eines TAG-Stop-Codons ein Glutamin einbaut, wodurch die Proteinbiosynthese nicht abgebrochen wird. Dies ermöglichte die Proteinüberexpression der AffilinTM-Varianten mit TAG-Stop-Codon. Klone ohne TAG-Stop-Codon wurden unter Verwendung von *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert.

Bei der Testexpression konnten fünf Klone mit guten Ausbeuten löslich exprimiert werden. darunter die beiden Varianten ohne TAG-Codon (SPC-1-B2, SPC-1-F12) und eine Variante mit TAG-Codon (SPC-1-E12), die aus dem *panning* 3 A stammten, sowie die beiden Varianten (SPC-1-H7a, SPC-1-H8a) des *pannings* mit Arginin (Runde 3 B).

Die mit Hilfe von zwei Chromatographieschritten (IMAC und Gelfiltration, s. 2.2.4.2 bzw. 2.2.4.3) gereinigten Affilin™-Varianten wurden mittels ELISA auf ihre Bindung an IgG-Fc und IgM-Fc getestet. In Abb. 19 sind die Varianten aus dem *panning* ohne Arginin (Runde 3A) dargestellt. Man erkennt eine Bindung der Varianten SPC-1-E12, SPC-1-B2 und SPC-1-F12 an IgG-Fc mit Dissoziationskonstanten von ca. 3 μM . Nicht dargestellt ist die Bindung der drei Varianten an IgM-Fc, für die Dissoziationskonstanten zwischen 12 und 23 μM berechnet wurden (Tab. 9). Eine unspezifische Bindung an BSA war nicht nachweisbar.

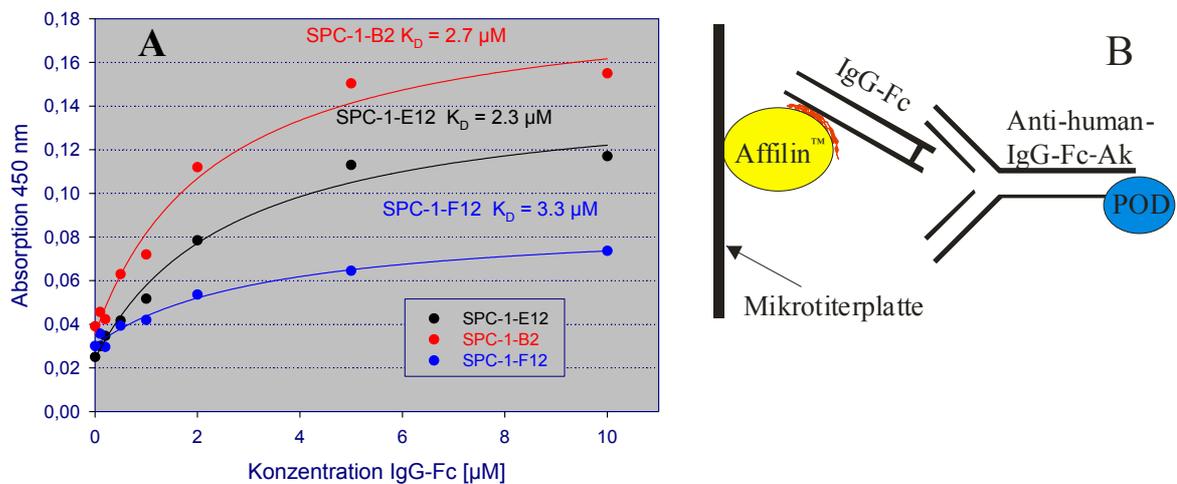


Abbildung 19: **A** ELISA zur Überprüfung der Bindung verschiedener Affilin™-Varianten an IgG-Fc. Beschichtet wurde mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ der entsprechenden Affilin™-Variante in PBS. Humanes IgG-Fc wurde in den entsprechenden Verdünnungen zugegeben und als Detektionsantikörper diente ein AK-POD Konjugat gegen humanes IgG-Fc in einer Verdünnung von 1:10000. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus drei Parallelmessungen. **B** Schematischer Aufbau des ELISA.

Die Dissoziationskonstanten der Varianten SPC-1-H7a und SPC-1-H8a aus dem *panning* mit Arginin (Runde 3 B) lagen im Bereich von 8 μM (Abb. 20). Es konnte ebenfalls eine Affinität zu IgM-Fc mit Dissoziationskonstanten von 9 bzw. 21 μM detektiert werden, aber keine Bindung an BSA. Im Ergebnis der Untersuchung war damit keine Verbesserung der Affinität oder der Spezifität der Affilin™-Varianten durch das *panning* mit Arginin zu erkennen.

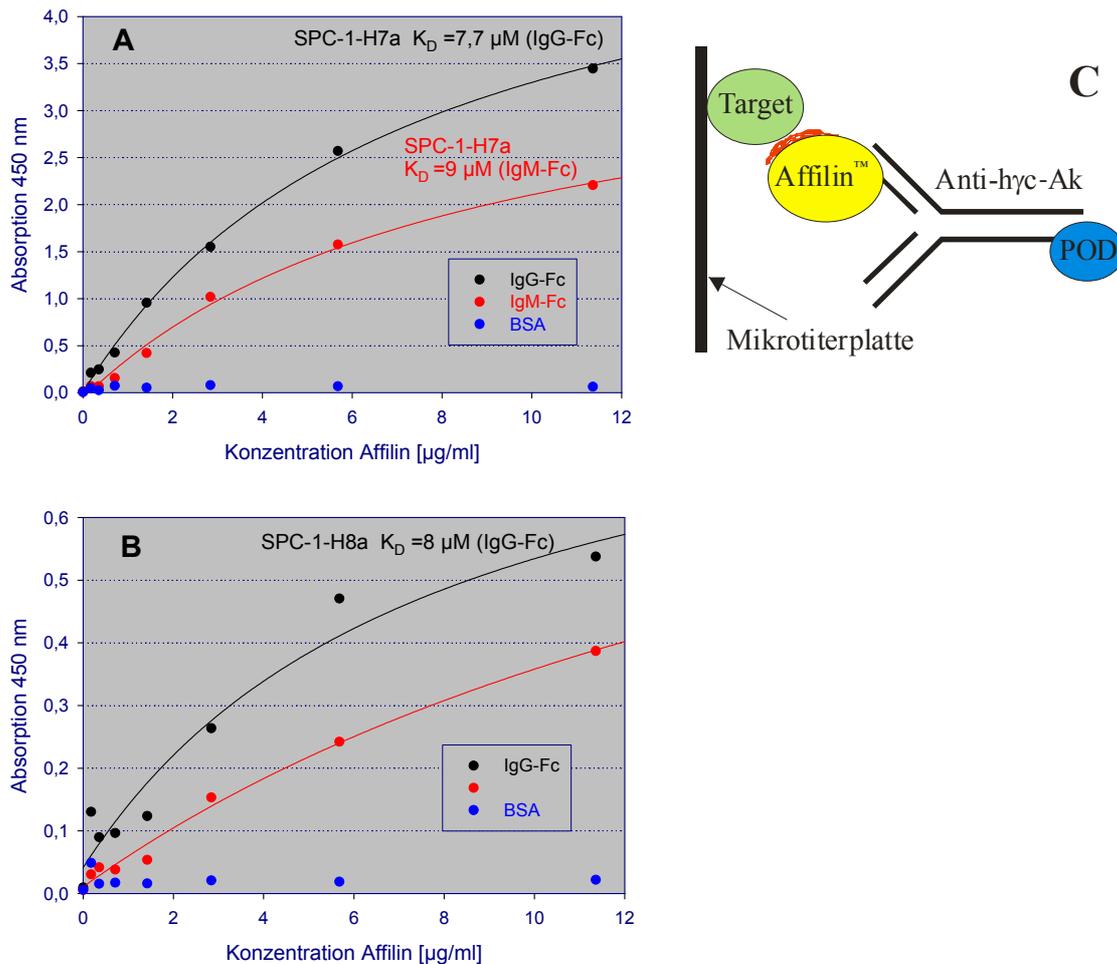


Abbildung 20: ELISA zur Überprüfung der Bindung verschiedener Affilin™-Varianten an IgG-Fc und IgM-Fc. Beschichtet wurde mit 10 $\mu\text{g/ml}$ an IgG-Fc bzw. IgM-Fc in PBS. Die Affilin™-Varianten SPC-1-H7a (A) und SPC-1-H8a (B) wurden in den entsprechenden Verdünnungen zugegeben und als Detektionsantikörper diente ein AK-POD Konjugat gegen humanes- γ -Kristallin in einer Verdünnung von 1:1000. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus drei Parallelmessungen. C Schematischer Aufbau des ELISA.

In einem 1. Selektionsprozess konnten erfolgreich Affilin™-Varianten isoliert werden, die spezifisch ihre Zielmolekül binden. ELISA- und Biacore-Experimente zeigten Dissoziationskonstanten für die Bindung an IgG-Fc von ca. 10^{-7} M. Trotz der deutlich stringenteren Waschbedingungen im 2. Selektionsprozess konnten keine Affilin™-Varianten isoliert werden, die sich durch höhere Affinität oder verbesserter Spezifität gegenüber den Affilin™-Varianten aus dem 1. Selektionsprozess auszeichneten. (Tab. 9). Auch der Einsatz von Arginin trug nicht dazu bei, unspezifische Wechselwirkungen der Phagen zum IgG-Fc zu unterdrücken, um spezifischer bindende oder höher affine Affilin™-Varianten anzureichern. Für eine weitere Charakterisierung vor allem hinsichtlich ihrer Stabilität wurden drei IgG-Fc bindenden Varianten (SPC-1-A1, SPC-1-A7 und SPC-1-G3) mit den höchsten Affinitäten ausgewählt.

Tabelle 9: Übersicht der Affinitäten und Spezifitäten der untersuchten Affilin™-Varianten aus der Selektion der bovinen γ -Kristallin Bibliothek GCUC1 und der 1. und 2. Selektion der humanen γ -Kristallin Bibliothek CR20 gegen IgG-Fc.

Affilin™ - Variante	ELISA K _D IgG-Fc	ELISA K _D IgM-Fc	Biacore K _D IgG-Fc	Biacore Spezifität
GCUC1				
Mu6D Trp	11 μ M	> 300 μ M	6 μ M	n. b.
CR20				
SPC-1-A1	1,9 μ M (Abb. 16) 86 nM (Abb. 17)	3,5 μ M	0,23 μ M	Bindung an IgG und IgM
SPC-1-A7	1,3 μ M (Abb. 16) 69 nM (Abb. 17)	13,3 μ M	0,28 μ M	Bindung an IgG, IgM und IgA
SPC-1-G3	0,8 μ M (Abb. 16) 50 nM (Abb. 17)	4,3 μ M	0,83 μ M	Bindung an IgG, IgM und IgA
SPC-1-H7a	7,7 μ M	9 μ M	n. b.	n. b.
SPC-1-H8a	8 μ M	21 μ M	n. b.	n. b.
SPC-1-B2	2,7 μ M	12 μ M	n. b.	n. b.
SPC-1-E12	2,3 μ M	18 μ M	n. b.	n. b.
SPC-1-F12	3,3 μ M	23 μ M	n. b.	n. b.

3.3 Selektion der humanen Bibliothek CR20 gegen IgM-Fc

3.3.1 Isolierung und Charakterisierung IgM-Fc bindender Varianten

Parallel zum 2. Selektionsprozess mit dem Zielmolekül IgG-Fc wurde eine Selektion mit einem zweiten Protein als Zielmolekül, dem Fc-Teil von polyklonalem humanem IgM, durchgeführt. Für eine spätere eventuelle diagnostische Anwendung sollten Affilin™-Varianten mit hoher Spezifität isoliert werden. Als Ausgangsbibliothek wurde die humane γ -Kristallin Bibliothek CR20 verwendet. Es wurden, wie unter 3.1.1 beschrieben, drei *panning*-Runden durchgeführt. In Anlehnung an die Waschbedingungen der 2. Selektion gegen IgG-Fc, wurde ebenfalls vor der dritten *panning*-Runde der Phagen-*pool* geteilt und ein Teil 1:1 mit 1 M Arginin versetzt. Dieser Teil wurde anschließend mit Lösungen, die zusätzlich 0,5 M Arginin enthielten, gewaschen, während der andere Teil des Phagen-*pools* ohne Arginin behandelt wurde. Die genauen Waschbedingungen sind in Tab. 10 angegeben.

Tabelle 10: Übersicht der Waschbedingungen und Anzahl der erhaltenen Phagen der einzelnen *panning*-Runden bei der Selektion der humanen- γ Kristallin Bibliothek CR20 gegen IgM-Fc.

<i>panning</i> -Runde	Waschbedingung
1	2 x PBS; 2 x PBS, 3 % BSA; 2 x PBS
2	2 x PBS; 2 x PBS, pH 7,3, 3 % BSA 2 x PBS, 0,3 μ g/ml humanes IgM-Fc (PK) 1 x PBS, 3 μ g/ml humanes IgG-Fc (MK) 2 x PBS
3 A	2 x PBS, 0,1 % Tween 20; 2 x PBS, 3 % BSA 2 x PBS, 1 μ g/ml humanes IgM-Fc (PK) 2 x PBS, 10 μ g/ml humanes IgG-Fc (MK) 2 x PBS, 0,1 % Tween 20
3 B	Wie 3 A, aber alle Lösungen wurden mit 0,5 M Arginin

Nach der 3. *panning*-Runde wurden erneut Einzelphagen-ELISAs mit jeweils 92 Klonen angefertigt. Insgesamt zeigten 34 Klone, 20 Klone aus der Selektion ohne Arginin und 15 Klone aus der Selektion mit 0,5 M Arginin, ein deutliches Signal der Bindung an IgM-Fc (Daten nicht gezeigt). Diese Klone wurden alle sequenziert. Dabei wurde 16-mal die gleiche Sequenz mit zwei TAG-Stop-Codons ermittelt, die bereits aus der 2. Selektion gegen IgG-Fc bekannt war. Drei weitere Klone mit identischer Sequenz, wiesen ein TAG-Stop-Codon in einer nicht variablen Position auf. 15 weitere Klone unterschieden sich allesamt in ihrer Sequenz und trugen, wie gewünscht, nur Mutationen an den vorgegebenen acht variablen Positionen. Allerdings besaßen 10 dieser Klone an einer der acht variablen Positionen ein TAG-Stop-Codon, während die restlichen fünf Klone Substitutionen ohne *amber*-Stop-Codon aufwiesen. Alle Gene, außer der 16fach identischen Sequenz mit denn zwei Stop-Codons wurden zur Erstellung von Expressionsvektoren in *pet20b* umkloniert. Die erhaltenen Expressionsvektoren wurden einer Testexpression unterzogen. Nur von sechs Klonen wurde Protein in löslicher Form exprimiert (SPC-2-H1, SPC-2-E11, SPC-2-F11, SPC-2-D10, SPC-2-B2a, SPC-2-D2a). Diese Klone wurden im 1,5 l Maßstab überexprimiert und anschließend die AffilinTM-Varianten in zwei Chromatographieschritten (IMAC und Gelfiltration) gereinigt. Im Folgenden wurde ein ELISA mit den löslich erhaltenen AffilinTM-Varianten durchgeführt. Die höchste Affinität gegenüber IgM-Fc wurde bei der Variante SPC-2-H1 mit einer Dissoziationskonstante von 1,5 μ M beobachtet (Abb. 21). Eine Übersicht der ermittelten Dissoziationskonstanten ist in Tab. 11 gezeigt. Keine der analysierten AffilinTM-Varianten zeigte eine differenzierte Bindungsspezifität gegenüber den hier getesteten Substraten IgM-Fc, IgG-Fc bzw. IgA.

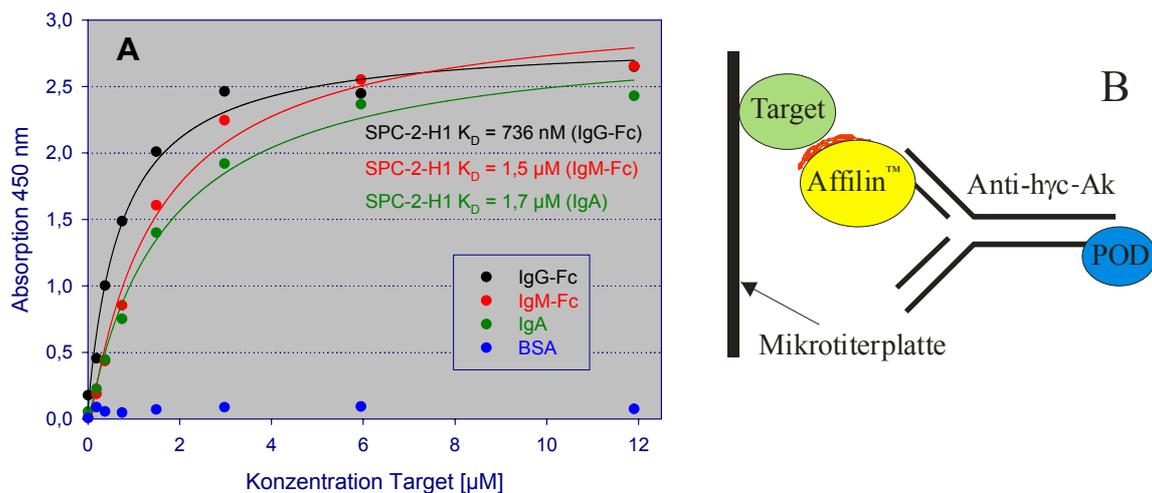


Abbildung 21: ELISA zur Überprüfung der Bindung der Affilin™-Variante SPC-2-H1 gegen IgG-Fc, IgM-Fc, IgA und BSA. Beschichtet wurde je 10 µg/ml Target in PBS. Die Affilin™-Variante wurde in den entsprechenden Verdünnungen zugegeben und als Detektionsantikörper diente ein AK-POD Konjugat gegen humanes-γ-Kristallin in einer Verdünnung von 1:1000. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus drei Parallelmessungen. **B** Schematischer Aufbau des ELISA.

Eine um den Faktor 25 verbesserte Affinität zu IgM-Fc gegenüber IgG-Fc zeigte die Variante SPC-2-E11 und damit eine bei vergleichbarer Affinität höhere Spezifität als die Variante SPC-2-H1 (Tab. 11). Eine vollkommen unspezifische Bindung konnte durch die Kontrolle mit BSA ausgeschlossen werden, da eine Bindung an BSA bei keiner Affilin™-Variante detektiert werden konnte.

Wie bereits bei der Selektion der IgG-Fc bindenden Affilin™-Varianten, konnte auch hier kein bzw. nur ein sehr geringer Einfluss von Arginin auf die Isolierung von höher spezifischen oder höher affinen Varianten beobachtet werden.

Tabelle 11: Übersicht der Dissoziationskonstanten verschiedener Affilin™-Varianten aus dem Selektionsprozess gegen IgM-Fc.

Affilin™-Variante	Dissoziationskonstante		
	IgM-Fc [µM]	IgG-Fc µM]	IgA [µM]
SPC-2-H1	1,5	0,7	1,7
SPC-2-E11	3	80	n. b.
SPC-2-F11	5	14	n. b.
SPC-2-D10	6	2	n. b.
SPC-2-B2a	18	21	n. b.
SPC-2-D2a	7	11	10

3.3.2 Analyse der angereicherten Varianten aus der Selektion gegen IgG- und IgM-Fc

Die AffilinTM-Variante SPC-1-F1 wurde in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Selektionsprozessen in der 3. *panning*-Runde angereichert, und im Einzelphagen-ELISA, der eine erste grobe Abschätzung des Bindungsverhaltens der AffilinTM-Variante als Fusion mit dem Phagenhüllprotein pIII erlaubt, als potentiell bindende Variante identifiziert. Die Sequenz der Variante SPC-1-F1 fand sich in über 50 % aller Klone, die als potentielle IgG-Fc bzw. IgM-Fc bindende Varianten nach dem entsprechenden Einzelphagen-ELISA sequenziert wurden. Eine hohe Bindungsspezifität konnte bei der Variante SPC-1-F1 nicht erwartet werden, da beide im *panning* eingesetzte AK-Fragmente, IgG-Fc und IgM-Fc, Bindungspartner für SPC-1-F1 darstellten. Möglicherweise führte aber eine sehr hohe Affinität zu der Anreicherung dieses Klones im Verlauf des Selektionsprozesses gegen IgG-Fc bzw. IgM-Fc. Zur Überprüfung dieser Vermutung sollte diese Variante näher charakterisiert werden.

Die Untersuchung der Bindungseigenschaften der Variante konnte anfänglich nicht durchgeführt werden, da eine Expression des Genes, das 2 TAG-Stop-Codons trägt, selbst unter Verwendung des *amber*-Suppressorstammes NovaBlue (DE3) erfolglos blieb. Deshalb wurde später durch ortsgerichtete Mutagenese mittels QuickchangeTM unter Verwendung der Primerpaare QC-F1-Pos15 for und QC-F1-Pos15 rev bzw. QC-F1-Pos38 for und QC-F1-Pos38 rev in zwei Schritten die entsprechenden TAG-Codons zu TGG mutagenisiert und das erhaltene Gen in den Expressionsvektor pET20b kloniert. Von diesem Klon SPC-1-F1 15-38 wurde in guter Ausbeute lösliches Protein erhalten.

Zur Analyse der Bindung von SPC-1-F1 15-38 an IgG-Fc und IgM-Fc wurde ein ELISA durchgeführt (Abb. 22). Tatsächlich ließ sich eine Bindung der Variante an die beiden Antikörperfragmente nachweisen, während zu BSA keine Bindungsaffinität beobachtet wurde. Die für SPC-1-F1 15-38 ermittelten Dissoziationskonstanten von 24 μ M gegenüber IgG-Fc und 58 μ M gegenüber IgM-Fc waren im Vergleich zu den übrigen analysierten AffilinTM-Varianten eher gering. Aus den Selektionsprozessen gegen IgG-Fc bzw. IgM-Fc waren AffilinTM-Varianten isoliert worden, die mindestens eine 10fach höhere Bindungsaffinität zu den jeweiligen Zielmolekül aufweisen (Tab. 9, S. 61; Tab. 11, S. 63).

Die AffilinTM-Variante SPC-1-F1 15-38 wurde also weder aufgrund ihrer hohen Affinität zu einem Immunglobulin noch aufgrund einer generell unspezifischen Bindung im *panning* angereichert.

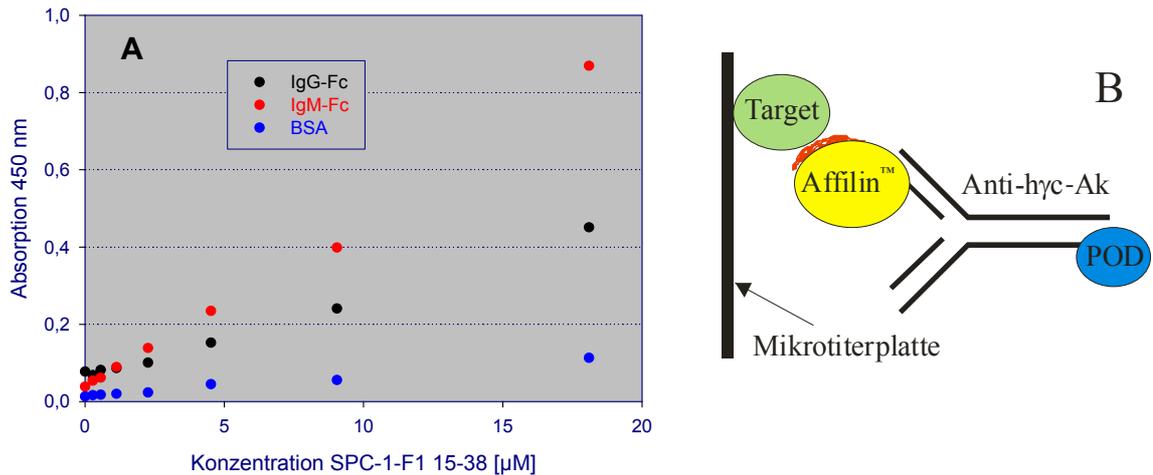


Abbildung 22: **A** ELISA zur Überprüfung der Bindung der Variante SPC-1-F1 15-38 gegen IgG-Fc, IgM-Fc und BSA. Beschichtet wurde mit 10 µg/ml Target in PBS. Die Variante wurde in den entsprechenden Verdünnungen zugegeben und als Detektionsantikörper diente ein AK-POD Konjugat gegen humanes-γ-Kristallin in einer Verdünnung von 1:1000. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus drei Parallelmessungen. **B** Schematischer Aufbau des ELISA.

Auch gegen das zweite Protein-target IgM-Fc konnten aus der humanen-γ-Kristallin Bibliothek CR20 Bindemoleküle isoliert werden. Die Bindungsaffinität gegenüber IgM-Fc mit Dissoziationskonstanten von 10^{-5} bis 10^{-7} , aber vor allem die nachgewiesenen geringe Spezifität gegenüber verschiedenen Immunglobulinen, erfüllen nicht die gestellten Erwartungen an IgM-Fc bindende Affilin™-Varianten für eine diagnostische Anwendung im Luminex®-Assay.

3.4 Fermentation, Expression und Reinigung von Affilin™-Varianten

Die drei IgG-bindenden Varianten SPC-1-A1, SPC-1-A7 und SPC-1-G3 (1. Selektion der humanen-γ Kristallin Bibliothek CR20 gegen IgG-Fc) sollten biophysikalisch charakterisiert und der Strukturaufklärung durch Kristallographie zugeführt werden. Für die Herstellung größerer Mengen an gereinigtem Protein wurden Fed-Batch-Fermentationen der Varianten (in pET20b mit His₆-tag in *E. coli* BL21 mit pUBS520) mit Vollmedium im 10 l Fermenter durchgeführt (s. 2.2.1.3). In Abb. 23 sind die Daten für den Fermentationsprozess der Variante SPC-1-A1 dargestellt.

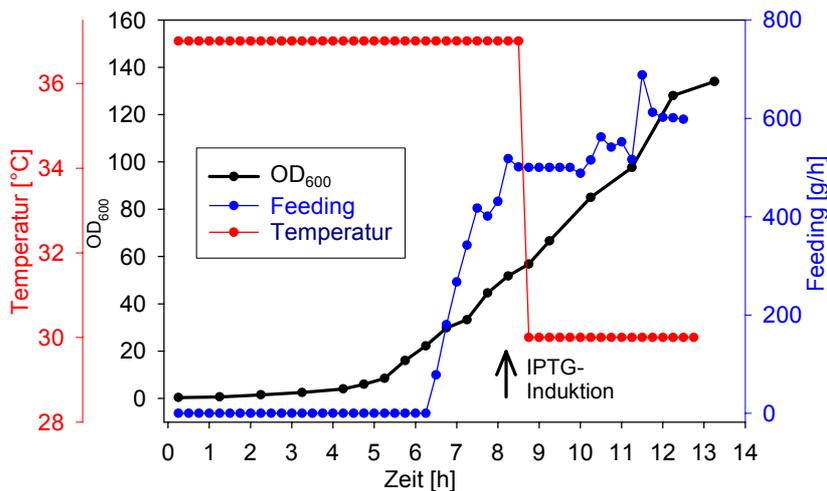


Abbildung 23: Überblick ausgewählter Daten der Fermentation der Variante SPC-1-A1 auf Hefeextrakt-Vollmedium. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Induktion mit IPTG.

Für die Variante SPC-1-A1 wurde eine Zellfeuchtmasse von 1538 g aus ca. 10 l Fermentationskultur erhalten. Eine Übersicht der bei den Fermentationen erreichten Zelldichten, Zellfeuchtmassen, und die Ausbeute an gereinigtem Protein nach der Chromatographie sind in Tab. 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Übersicht über die bei der Fermentation erreichten Zelldichten, Zellfeuchtmassen und über die Ausbeute nach Reinigung verschiedener Affilin™-Varianten.

Affilin™-Variante	Zelldichte [OD ₆₀₀]	Zellfeuchtmasse [g]	Ausbeute gereinigtes Protein [mg Protein / g Zellfeuchtmasse]
SPC-1-A1	134	1538	1,17
SPC-1-A7	62	923	0,33
SPC-1-G3	148	2117	0,45

An den Fermentationsprozess schlossen sich die Aufarbeitung der Zellfeuchtmasse und die Proteinreinigung der exprimierten Varianten an.

Als erster Reinigungsschritt wurde eine Affinitätschromatographie mittels IMAC gewählt (s. 2.2.4.2). Bei Verunreinigungen mit Wirtszellproteinen von mehr als 10 % wurde wiederholt eine Affinitätschromatographie mittels IMAC durchgeführt. Dabei wurde ein flacher Gradient an steigender Imidazolkonzentration zur Elution verwendet. Als abschließender Reinigungsschritt wurde eine Gelfiltration durchgeführt (s. 2.2.4.3). Danach zeigten die Varianten eine Homogenität von mehr als 95 %. Anhand der Affilin™-Variante SPC-1-A1 ist in Abb. 24 exemplarisch der Verlauf einer typischen Reinigung mittels SDS-PAGE dokumentiert.

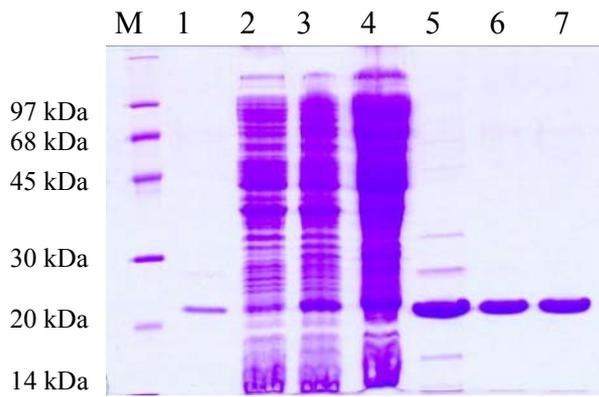


Abbildung 24: SDS-PAGE zur Kontrolle der Reinigung der Variante SPC-1-A1 mittels IMAC und Gelfiltration. Aufgetragen wurde in den Spuren (1) 3 µg Affilin™-Standard, (2) Gesamtzellextrakt vor Induktion, (3) Gesamtzellextrakt nach 4 h Induktion, (4) unlösliche Proteinfraction, (5) Elutionsfraktionen nach der 1. IMAC, (6) Elutionsfraktionen nach der 2. IMAC, (7) Elutionsfraktionen nach der Gelfiltration, (M) LMW Marker. Die Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung visualisiert.

3.5 Biochemische Charakterisierung einzelner Affilin™-Varianten

Nach der Isolierung und Reinigung der ausgewählten Affilin™-Varianten SPC-1-A1, SPC-1-A7 und SPC-1-G3 sollte anhand ihrer biophysikalischen Eigenschaften deren prinzipielle Eignung für die Verwendung in Diagnostik, Chromatographie und Therapie festgestellt werden.

Insbesondere wurden die Stabilitäten der ausgewählten Affilin™-Varianten unter denaturierenden Bedingungen, in humanem Serum sowie die *Clearance* in einem Mausmodell jeweils im Vergleich zum humanen γ -Kristallin WT betrachtet.

Zuvor wurden, um eine Aussage über die Faltung bzw. die Sekundärstruktur der isolierten Affilin™-Varianten treffen zu können, Fern-UV CD-Spektren aufgenommen (s. 2.2.5.5). Anhand der Spektren zeigte sich für die Affilin™-Varianten und den humanen γ -Kristallin WT ein Kurvenverlauf, der für Proteine mit einem überwiegenden Anteil an β -Faltblatt-Strukturen charakterisiert ist. Demnach blieb trotz Aminosäureaustausch innerhalb des β -Faltblattes der N-terminalen Domäne der Affilin™-Varianten die Struktur weitestgehend erhalten.

Weiterhin wurde für die Affilin™-Varianten und den humanen- γ Kristallin WT mittels analytischer Ultrazentrifugation (s. 2.2.5.6) das Molekulargewicht bestimmt. Aus den Messdaten von Gleichgewichtsläufen wurden apparente Molekulargewichte von 20 bis 25 kDa ermittelt, was darauf hinweist, dass alle untersuchten Proteine einen monomeren Zustand aufweisen.

3.5.1 Stabilität gegenüber denaturierenden Agenzien

Zur Untersuchung der Stabilität der AffilinTM-Varianten und des humanen- γ Kristallin WT gegenüber GdmHCl wurden Fluoreszenzemissions-Spektren bei verschiedenen Konzentrationen des Denaturierungsmittels aufgenommen (s. 2.2.5.1). Dabei wurden die Proteinproben bei 280 nm angeregt und die Emission im Bereich von 300 – 400 nm detektiert. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität bei 320 nm herangezogen. Bei 320 nm sinkt die Fluoreszenzintensität während der Entfaltung, was sich durch eine Rotverschiebung des Emissionsmaximums bei zunehmender Lösungsmittelexposition der Tryptophanreste im Protein erklären lässt. Bei der Entfaltung durch GdmHCl sind kooperative Übergänge zu beobachten (Abb. 25). Bei der Auswertung der erhaltenen Messdaten erhält man für die Variante SPC-1-A7 und den humanen γ -Kristallin WT annähernd den gleichen Übergangsmittelpunkt bei 2,7 M GdmHCl. Die anderen beiden Varianten SPC-1-A1 und SPC-1-G3 sind etwas instabiler gegenüber der Denaturierung mittels GdmHCl mit Übergangsmittelpunkten bei 1,9 M bzw. 1,7 M GdmHCl.

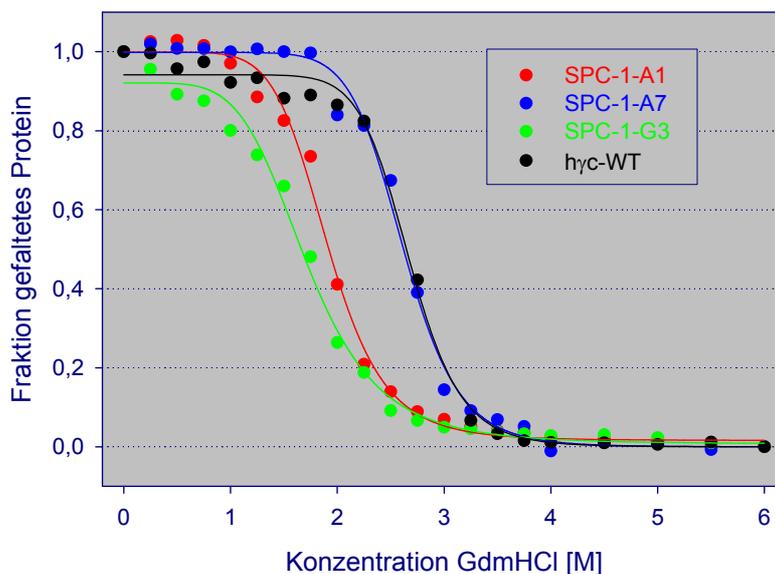


Abbildung 25: Chemisch induzierte Entfaltung durch GdmHCl von humanem γ -Kristallin WT und drei AffilinTM-Varianten. Eingesetzt wurden 25 μ g/ml Protein in 100 mM NaH₂PO₄, pH 6,0, 2 mM EDTA, 2 mM DTT bei der entsprechenden GdmHCl-Konzentration. Die Proben wurden mindestens 48 h bei 30°C inkubiert. Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität bei 320 nm nach Anregung bei 280 nm in 1 cm Küvetten. Alle erhaltenen Werte wurden pufferkorrigiert und normiert.

Bei der Rückfaltung der in 6 M GdmHCl und pH 6,0 vollständig denaturierten Proteine trat sowohl für die AffilinTM-Varianten als auch beim humanen γ -Kristallin WT bei Konzentrationen unter 2 M GdmHCl Aggregation auf. Dies konnte anhand der Lichtstreuung

der inkubierten Proteinproben bei 360 nm festgestellt werden. Als Beispiel sind in Abb. 26 die Intensitäten der Lichtstreuung für die Ent- und die Rückfaltung vom humanen γ -Kristallin WT in GdmHCl dargestellt. Bei der Rückfaltung erkennt man unterhalb einer Konzentration von 2 M GdmHCl deutlich eine Zunahme des Lichtstreusignals, hervorgerufen durch die Aggregation des Proteins.

Die chemisch induzierte Entfaltung war durch diese auftretende Aggregation irreversibel und nicht nach thermodynamischen Gesichtspunkten auswertbar.

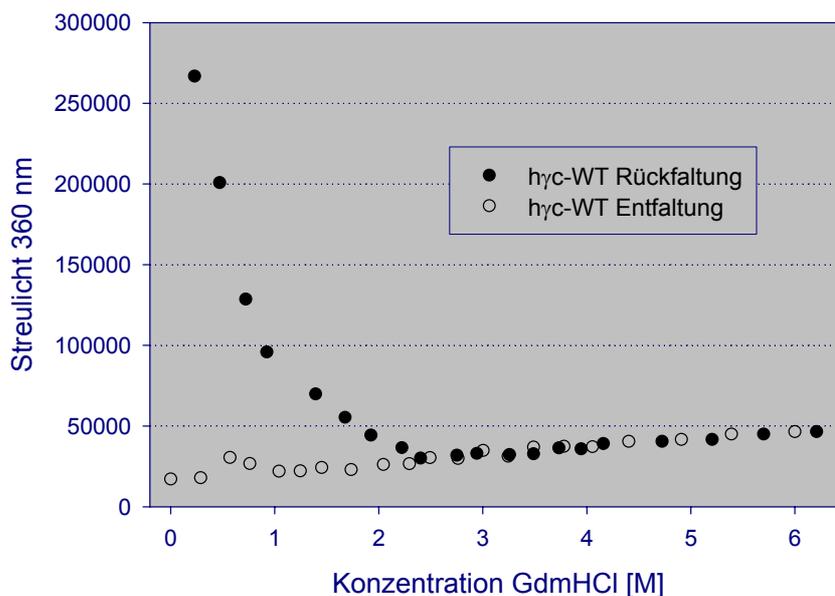


Abbildung 26: Lichtstreuung bei der chemisch induzierten Ent- und Rückfaltung von humanem γ -Kristallin WT durch GdmHCl. Die Lichtstreuung wurde bei 360 nm (Anregungswellenlänge 360 nm) in 1 cm Küvetten detektiert. Eingesetzt wurden 25 μ g/ml Protein in 100 mM NaH_2PO_4 , pH 6,0, 2 mM EDTA, 2 mM DTT bei der entsprechenden GdmHCl-Konzentration. Die Proben wurden mindestens 48 h bei 30°C inkubiert.

3.5.2 Thermische Stabilität

Zur Untersuchung der Stabilität gegenüber Temperatur wurden die Methoden der Fluoreszenzspektroskopie und der *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) angewendet. Zunächst wurden von den verschiedenen Proteinproben Fluoreszenzemissionsspektren bei steigender Temperatur aufgenommen (s. 2.2.5.3). Die Spektren wurden im Bereich von 10-80°C bei einer Temperaturerhöhung um je 1°C aufgenommen. Für die Auswertung wurden die Fluoreszenzintensitäten bei 360 nm zwischen 0 und 100 % normiert.

Dabei zeigten sich keine typischen thermischen Entfaltungskurven (Abb. 27). Die aufgenommenen Messdaten wiesen auf die Aggregation der Proteine während der Temperaturerhöhung hin. Bei der Abkühlung von 80°C auf 10°C kam es zu keiner sichtbaren

Rückfaltung, die relativen Fluoreszenzintensitäten blieben bei 0 %. Da die thermische Entfaltung genauso wie die Entfaltung durch GdmHCl irreversibel verlief, konnten auch hier keine thermodynamischen Parameter bestimmt werden.

Es lassen sich für die einzelnen Proteine lediglich Temperaturwerte angeben, bis zu denen sich die Proteine weitestgehend nativ verhalten bzw. ab welchen die Aggregation, aufgrund der Exposition hydrophober Bereiche im Verlauf der Entfaltung, einsetzt.

Danach läßt sich aus den Kurvenverläufen der temperaturabhängigen Denaturierung erkennen, dass humanes γ -Kristallin WT und die AffilinTM-Variante SPC-1-A7 bis ca. 57°C keine wesentliche strukturelle Veränderung erfahren. Deutlich früher, bei Temperaturen von 52°C bzw. 34°C, treten strukturelle Veränderungen bei den Varianten SPC-1-A1 bzw. SPC-1-G3 auf.

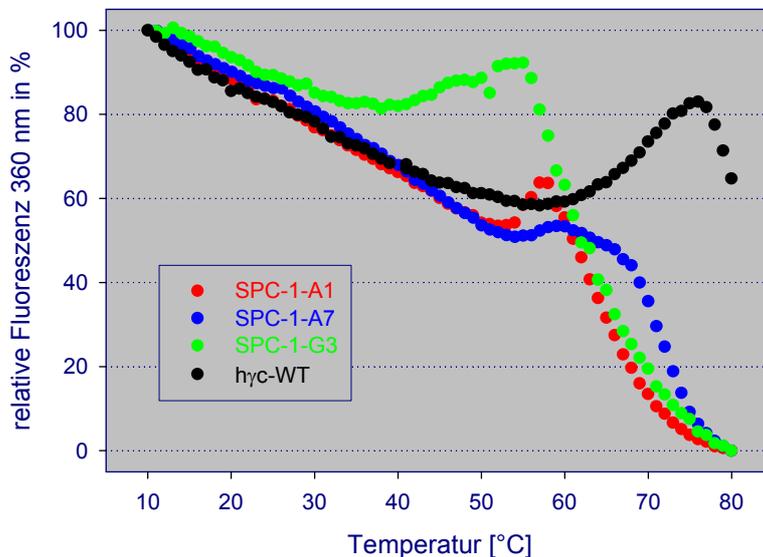


Abbildung 27: Thermische Entfaltung verschiedener AffilinTM-Varianten und humanen γ -Kristallin WT. Eingesetzt wurden 25 $\mu\text{g/ml}$ Protein in 100 mM NaH_2PO_4 , pH 6,0, 2 mM EDTA. Es wurden rührbare 1 cm Küvetten benutzt. Ausgewertet wurde die relative Fluoreszenzintensität bei 360 nm bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm. Die Heizrate betrug 0,5°C/min. Alle erhaltenen Werte wurden pufferkorrigiert und normiert.

Des Weiteren wurde die thermische Stabilität mittels *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) analysiert (s. 2.2.5.4). Dazu wurden die entsprechenden Proteinproben beginnend von 20°C auf 80°C aufgeheizt. Dabei wurde die Heizleistung in mCal/min aufgezeichnet und ausgehend davon die Wärmekapazität C_p in mCal/°C berechnet und gegen die Temperatur aufgetragen (Abb. 28). Ein deutlicher *peak* im Kurvenverlauf weist auf die zusätzlich aufgenommene Wärme während der Entfaltung der Proteine hin. Bei einer reversiblen Entfaltung würde die Kurve auf die Basislinie zurückkehren und auf dieser weiter verlaufen.

Im Fall der AffilinTM-Varianten war ein starker Abfall des Signals zu beobachten. Dies ist auf frei werdende Wärme aufgrund von Aggregationsprozessen zurückzuführen. Auch bei dieser Messmethode war die thermische Entfaltung der γ -Kristalline aufgrund von Aggregation irreversibel. Alle Proteine waren nach dem Abkühlen auf 20°C vollständig aggregiert und zeigten in einem weiteren Heizzyklus keinen nachweisbaren *peak* für eine Entfaltung.

Somit konnten keine thermodynamischen Parameter bestimmt werden. Zum Vergleich der Temperaturstabilität wurden die *peak*-Maxima, die den Mittelpunkt bei der thermischen Entfaltung darstellen, betrachtet. Hierbei zeigte sich der humanen γ -Kristallin WT mit 80°C als das stabilste der untersuchten Proteine. Geringfügig instabiler verhielt sich die Variante SPC-1-A7 mit 72°C. Weitaus instabiler bei der thermischen Entfaltung reagierte die Variante SPC-1-A1 mit 56°C. Die Variante SPC-1-G3 wurde nicht untersucht.

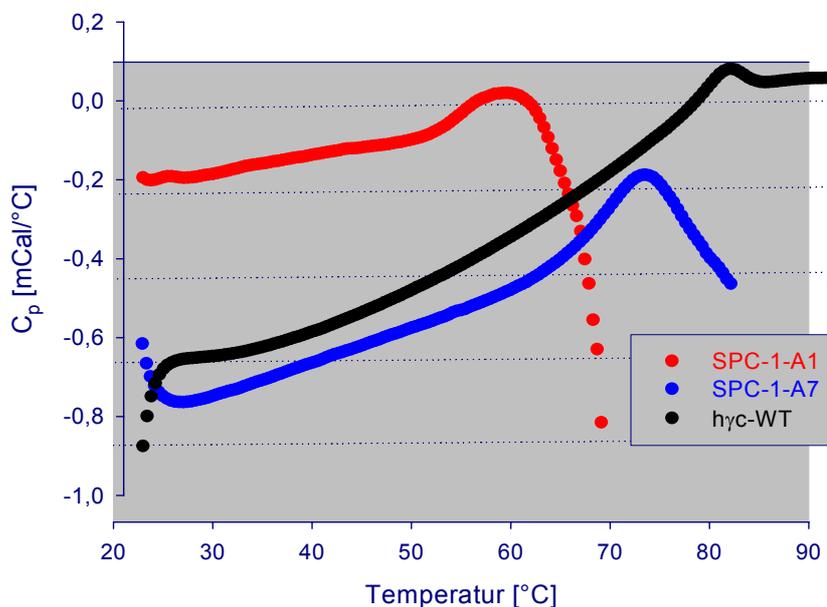


Abbildung 28: Heizkurven aus einem DSC-Experiment für zwei AffilinTM-Varianten und den humanen γ -Kristallin WT. Die Wärmekapazitäten wurden alle 16 sec im Bereich zwischen 20°C und 90°C bei einer Heizrate von 90°C/h aufgezeichnet. Eingesetzt wurden 0,5 mg/ml des entsprechenden Proteins in 100 mM NaH₂PO₄; pH 6,0; 2 mM EDTA. Die dargestellten Kurven sind pufferkorrigiert.

In weiteren DSC-Experimenten sollte nun der Einfluss von Arginin auf die thermische Entfaltung der AffilinTM-Varianten und des humanen γ -Kristallin WT untersucht werden. Hier sollte versucht werden, durch den Zusatz von 1M Arginin die Aggregation der γ -Kristalline zu unterdrücken, um so eine reversible thermische Entfaltung zu erreichen. Dazu wurden die entsprechenden Proteine gegen Phosphatpuffer mit 1 M Arginin dialysiert. Von den Proteinen wurden wiederum in einem DSC-Experiment von 20°C bis 80°C die Temperaturübergänge bestimmt.

Die Auftragung der Wärmekapazitäten gegen die Temperatur unter dem Einfluss von Arginin läßt die Unterdrückung der Aggregation der AffilinTM-Varianten vermuten (Abb. 29). So war kein starker Abfall des Messsignals nach der Entfaltung zu beobachten. Schloss sich allerdings nach der Abkühlung - und somit der möglichen Rückfaltung - ein weiterer Heizzyklus an, konnte man keine signifikante Signalveränderung, hervorgerufen durch eine Entfaltung beobachten. Die Untersuchung aller Proben zeigte bereits nach der ersten Abkühlphase eine starke Aggregation. Demnach verhält sich auch unter dem Einfluss von Arginin die thermische Entfaltung irreversibel und ist nicht nach thermodynamischen Gesichtspunkten auswertbar.

Werden nun die Stabilitäten gegenüber Temperatur anhand der *peak*-Maxima zwischen den Messungen mit und ohne Arginin verglichen, fällt bei allen untersuchten Proteinen eine leichte Destabilisierung durch Arginin auf. So ist das *peak*-Maximum bei humanem γ -Kristallin WT in Anwesenheit von 1 M Arginin von 80°C auf 74°C verschoben. Im Fall der AffilinTM-Varianten bewirkte die Anwesenheit von 1 M Arginin eine Verschiebung der *peak*-Maxima zu 2 – 3 K niedrigeren Temperaturen. Das deutet auf eine destabilisierende Wirkung des Arginin auf die Struktur der hier betrachteten Proteine hin. Eine solche Destabilisierung in Anwesenheit von Arginin wurde bereits früher für RNaseA beobachtet (Lin & Timasheff, 1996).

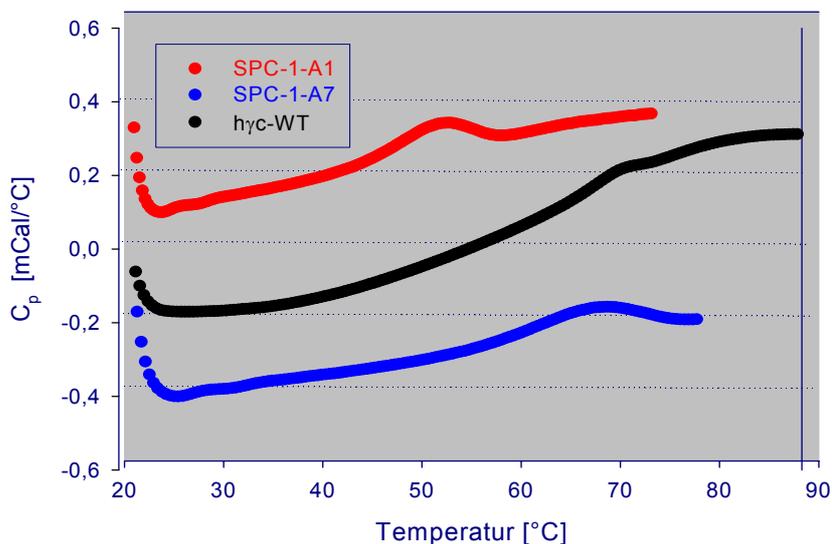


Abbildung 29: Heizkurven aus einem DSC-Experiment für SPC-1-A1, SPC-1-A7 und humanes γ -Kristallin WT. Die Wärmekapazitäten wurden alle 16 sec im Bereich zwischen 20°C und 90°C bei einer Heizrate von 90°C/h aufgezeichnet. Eingesetzt wurden 0,5 mg/ml des entsprechenden Proteins in 100 mM NaH₂PO₄; pH 6,0; 2 mM EDTA; 1 M Arginin. Die dargestellten Kurven sind pufferkorrigiert.

Es wurde weiterhin versucht, durch den Zusatz von GdmHCl eine Aggregation zu unterdrücken und eine reversible thermische Entfaltung zu erreichen. Allerdings konnten durch den Zusatz von 1 M GdmHCl weder die AffilinTM-Varianten noch der humane γ -Kristallin WT reversibel thermisch de- bzw. renaturiert werden (Daten nicht gezeigt). Auch hier, vergleichbar den DSC-Experimenten in Anwesenheit von Arginin, wurde nach der ersten Abkühlphase eine starke Aggregation der Proteinproben beobachtet.

Vergleicht man nun die Lage der *peak*-Maxima aus den DSC-Experimenten und den Beginn der mittels Fluoreszenzspektroskopie ermittelten Aggregation, als Merkmal für eine deutliche Veränderung der nativen Struktur, so ist keine eindeutige Übereinstimmung vorhanden. Aus beiden Experimenten läßt sich aber ablesen, dass eine strukturelle Veränderung beim humanen γ -Kristallin WT bei den höchsten der jeweils ermittelten Temperaturen einsetzt. Bei den IgG-Fc bindenden AffilinTM-Varianten stellte sich wiederum die Variante SPC-1-A7 als die stabilste heraus. Sie ähnelt in ihrer Stabilität dem humanen γ -Kristallin WT. Eine etwas geringere Stabilität weist die Variante SPC-1-A1 auf. Die geringste Stabilität zeigt, wie bei der Entfaltung mittels GdmHCl, die Variante SPC-1-G3.

3.5.3 pH-Stabilität der Proteine

Für eine chromatographische Anwendung, als auch für eine therapeutische mit oraler Verabreichung, sollte ein AffilinTM in der Lage sein, trotz extremer pH-Schwankungen stabil und funktionell zu sein. Die Untersuchung der pH-Stabilität der isolierten AffilinTM-Varianten sollte Aufschluss über eine solche Anwendbarkeit geben. Dazu wurden Fluoreszenz-Emissions-Spektren aufgenommen (s. 2.2.5.2). Ausgewählt wurde die Anregungswellenlänge von 295 nm, bei der ausschließlich die Fluoreszenzeigenschaften der Tryptophanreste, die nicht einer Deprotonierung oberhalb pH 10 unterliegen, betrachtet werden. Zur Auswertung der Daten wurden die Emissionsmaxima der pufferkorrigierten Fluoreszenzspektren ermittelt und gegen den pH-Wert graphisch aufgetragen (Abb. 30).

Eine vollständig denaturierte Probe, bei der sich alle Tryptophanreste des Proteins in einer wässrigen Umgebung befinden, würde ein Emissionsmaximum von 355 nm erwarten lassen (Burstein *et. al.*, 1973). Befinden sich dagegen die Tryptophanreste in einer hydrophoben Umgebung, wie z. B. im Inneren des Proteins oder in der hydrophoben Grenzfläche zwischen zwei Domänen, beobachtet man Emissionsmaxima zwischen 320 und 340 nm.

Für die Varianten SPC-1-A1, SPC-1-A7 und SPC-1-G3 und den humanen γ -Kristallin WT wurden über den gesamten untersuchten pH-Bereich von 1,4 bis 12,5 Emissionsmaxima von

337 bis 343 nm gemessen (Abb. 30). Das heißt, alle hier untersuchten Proteine liegen über den gesamten pH-Bereich in einer nativen, gefalteten Struktur vor. Sie weisen damit eine außergewöhnlich hohe Stabilität in sehr alkalischen oder sauren Lösungen auf.

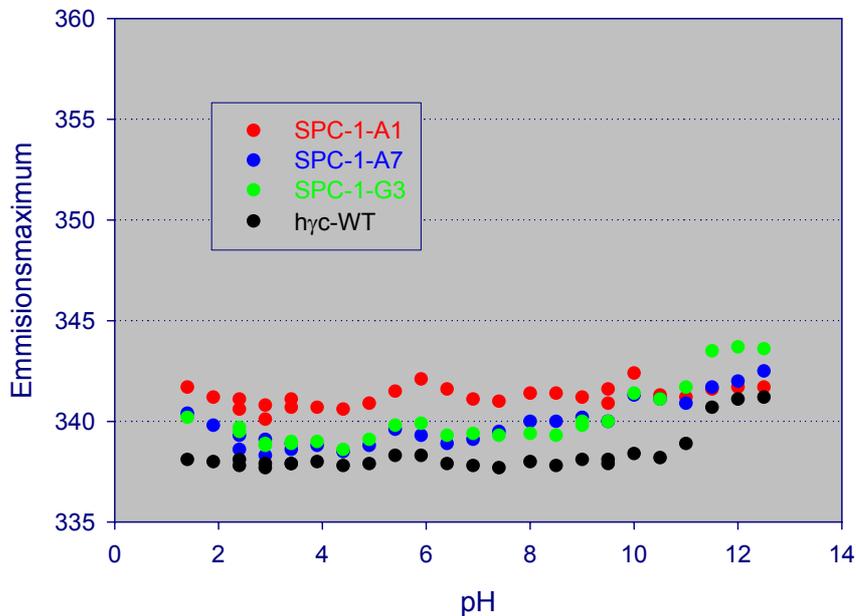


Abbildung 30: pH-induzierte Entfaltung von humanem γ -Kristallin WT und drei Affilin[™]-Varianten. Eingesetzt wurden 25 $\mu\text{g/ml}$ Protein in den in Tab. 4 aufgeführten Puffern bei den entsprechenden pH-Werten. Die Proben wurden mindestens 48 h bei 20°C inkubiert. Die Fluoreszenzmaxima wurden von den pufferkorrigierten Fluoreszenzspektren bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm in 1 cm Küvetten bestimmt.

3.5.4 Stabilität in Serum

Im Hinblick auf die Anwendung der Affilin[™]-Varianten in einem diagnostischen Assay sollte deren prinzipielle Eignung für Analysen in Serumproben untersucht werden. In vorherigen Untersuchungen zur Stabilität gegenüber Temperatur bzw. chaotropen Chemikalien erwies sich SPC-1-A7 als die stabilste Variante und wurde daher hier als Protein mit exprimierten His₆-tag verwendet. Zur Ermittlung der Stabilität im Serum wurde zunächst die Nachweisgrenze der Affilin[™]-Variante in Blutserum mittels ELISA bestimmt. Hierfür wurde anti-hyc-AK als Fangantikörper an einer Mikrotiterplatte immobilisiert und SPC-1-A7 mit Hilfe von anti-Tetra-His-AK-POD Konjugat detektiert.

In ersten Experimenten zeigte sich, dass das Serum mindestens 1:10 in PBS verdünnt werden musste, um das Hintergrundsignal auf ein vernachlässigbares Maß zu reduzieren. Für die Bestimmung der Nachweisgrenze mit dem beschriebenen ELISA wurde das Affilin[™] in verschiedenen Konzentrationen in 1:10 verdünntem Serum pipettiert. Die dabei ermittelte

untere Nachweisgrenze lag bei 100 ng/ml (Abb. 31). Des Weiteren wurde durch diesen Versuch deutlich, dass über einen Konzentrationsbereich von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ bis 1,0 $\mu\text{g/ml}$ eine lineare Signalabhängigkeit besteht. Die nachfolgenden Bestimmungen der Stabilität in Serum wurden daher in diesem Konzentrationsbereich durchgeführt.

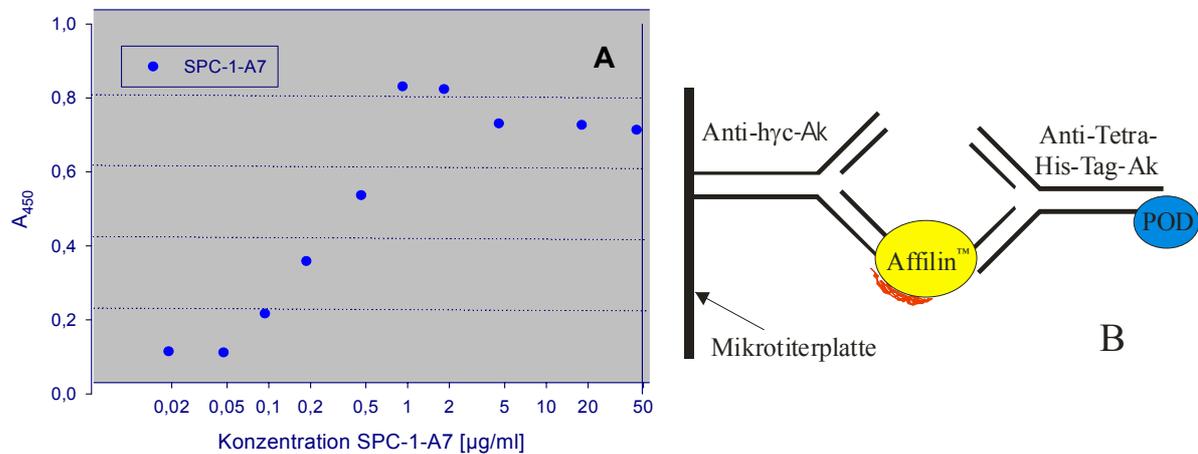


Abbildung 31: **A** ELISA zur Bestimmung der Nachweisgrenze von SPC-1-A7 in humanem Serum. Das Protein wurde in den angegebenen Konzentrationen in Serum (1:10 verdünnt in PBS) verdünnt und auf einer Mikrotiterplatte mit immobilisierten anti-hyc-AK inkubiert. Als Detektionsantikörper diente ein anti-Tetra-His-AK-POD Konjugat in einer Verdünnung von 1:2000. Die dargestellten Absorptionswerte sind Mittelwerte aus drei Parallelmessungen. Alle Messdaten wurden um das Hintergrundsignal, welches von 1:10 in PBS verdünntem Serum ohne SPC-1-A7 erhalten wurde, korrigiert. **B** Schematischer Aufbau des ELISA.

Für die Analyse der Stabilität in Serum wurde 10 $\mu\text{g/ml}$ der Variante SPC-1-A7 mit drei verschiedenen, unverdünnten, humanen Seren bei 37°C inkubiert. Über einen Zeitraum von 120 h wurden Proben entnommen, 1:10 in PBS verdünnt und in oben beschriebener Weise mittels ELISA auf die Nachweisbarkeit von SPC-1-A7 getestet. Es ergab sich eine 100%ige Stabilität über einen Zeitraum von mindestens 6 h und nach Berechnung anhand der Rohdaten eine Halbwertszeit von 26 h (Abb. 32). Da in einem diagnostischen Assay der Detektionsantikörper nicht länger als 6 h im Blutserum inkubiert wird, sollte dieses Zeitfenster ausreichend sein und AffilinTM-Varianten für den Einsatz in der Serumdiagnostik qualifizieren.

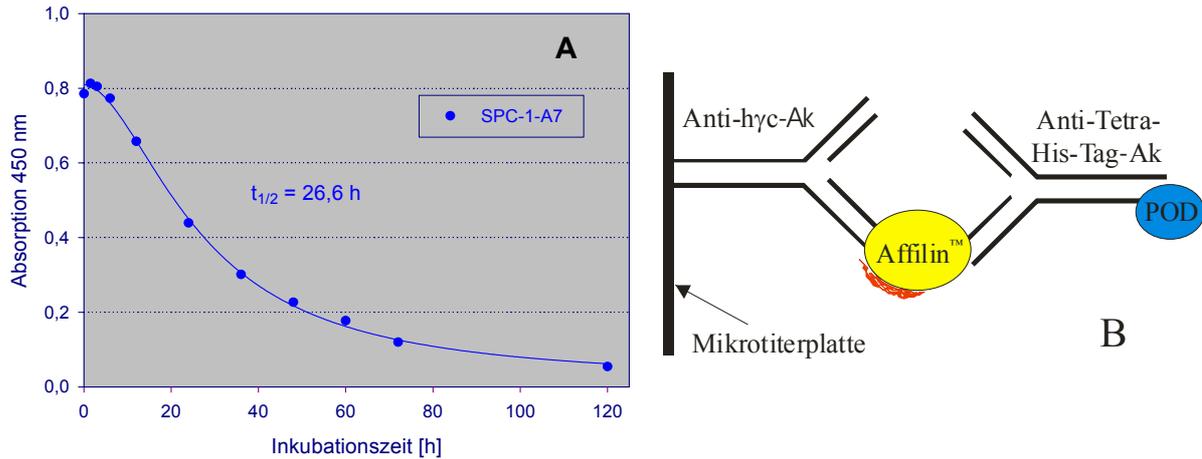


Abbildung 32: **A** ELISA zur Bestimmung der Serumstabilität von SPC-1-A7 in humanem Serum. Eine Konzentration von $10\mu\text{g/ml}$ wurde in Serum verdünnt und über die angegebene Zeit bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die entnommenen Proben 1:10 in PBS verdünnt und auf eine mit anti-hyc-AK beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Als Detektionsantikörper diente ein anti-Tetra-His-AK-POD Konjugat (1:2000). Die dargestellten Absorptionswerte sind Mittelwerte aus drei Parallelmessungen von jeweils drei verschiedenen Seren. Alle Messdaten wurden um das Hintergrundsignal, welches von 1:10 in PBS verdünntem Serum ohne SPC-1-A7 erhalten wurde, korrigiert. **B** Schematischer Aufbau des ELISA.

3.5.5 Untersuchungen zur Clearance

Ein Kriterium für den Einsatz von AffilinTM in der Therapie stellt die Clearance dar. Unter Clearance versteht man die Verweildauer von Molekülen im Blutstrom. Sie ist damit ein Maß für die *in vivo* Serumstabilität, die Gewebepenetration, und die Ausscheidung über die Niere. Um eine objektive Aussage über die Clearance von humanem γ -Kristallin und der Varianten zu bekommen, wurden der humane γ -Kristallin WT und ein pro-NGF bindendes AffilinTM SPC-7-E9 zur Testung ausgewählt. Es wurde bewußt keine IgG-Fc bindende AffilinTM-Variante eingesetzt, da die Verweildauer durch die Bindung des AffilinTM an IgG im Blut des Testobjekts möglicherweise verlängert würde. Damit würden verfälschte Ergebnisse für eine Anwendung der AffilinTM-Varianten erhalten werden. Die Studie wurde in Kooperation mit der Firma Aurigon Life Science GmbH (Tutzingen) durchgeführt. Die Tierexperimente, das heißt die Injektion der Proteine, die Blutentnahme und die Aufbereitung des entnommenen Blutes als Serum wurden von Aurigon Life Science GmbH durchgeführt (s. 2.2.5.9). Als Testobjekte dienten männliche Wistar-Ratten. Zum Nachweis der Proteine im Serum wurden Biacore-Experimente durchgeführt. In ersten Experimenten wurden die notwendige Verdünnung des Serums und der Messbereich mit der unteren und oberen Nachweisgrenze für beide Proteine separat bestimmt.

Es wurde anti-humaner γ -Kristallin-AK auf der Oberfläche eines CM5 Chips immobilisiert und die verdünnte Serumprobe über den Chip geleitet. Jede Probe wurde in drei voneinander unabhängigen Messungen getestet. Für die AffilinTM-Variante SPC-7-E9 und den humanen γ -Kristallin WT konnten aus den Mittelwerten der drei Parallelmessungen annähernd gleiche Halbwertszeiten berechnet werden (Abb. 33). Schon nach wenigen Minuten konnte nur noch die Hälfte des eingesetzten Proteins im Blut detektiert werden. Aufgrund der Erkenntnisse aus der Bestimmung der *in vitro* Stabilität in Serum ist dies wahrscheinlich nicht auf eine Degradation des Proteins zurückzuführen. Es lässt sich eher eine Resorption oder eine Diffusion und somit eine schnelle Gewebepenetration vermuten.

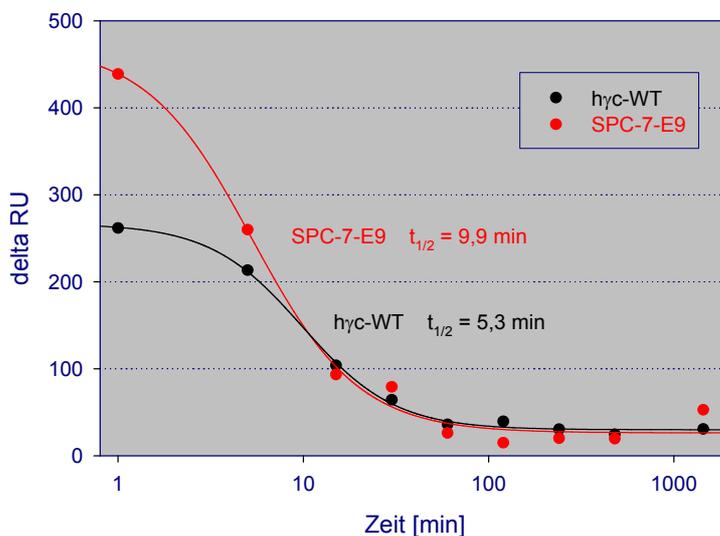


Abbildung 33: Bestimmung der Clearance von humanem γ -Kristallin WT und der AffilinTM-Variante SPC-7-E9. Die Proben wurden 1:100 in PBS verdünnt und anschließend für 10 min bei 25°C bei einer Flussrate von 30 μ l/min über den mit ca. 5000 RU an anti-hyc-AK immobilisierten CM5 Chip geleitet. Gemessen wurden die Differenzen der *Response Units* zur Basis. Die Messpunkte stellen Mittelwerte aus drei Parallelmessungen dar.

3.6 Kopplung und Markierung von AffilinTM-Varianten

Eine weitere, entscheidende Voraussetzung für die angestrebten Applikationen der AffilinTM-Varianten ist deren Zugänglichkeit für Markierungen. Im Hinblick auf einen analytischen Nachweis der AffilinTM-Varianten im Komplex mit ihren Bindungspartnern, wurden im Folgenden verschiedene Markierungsmethoden getestet. Neben einer *in vivo* Biotinylierung der AffilinTM-Varianten wurde versucht, über ungerichtete Aminkopplung ein Fluoreszenzfarbstoff bzw. Peroxidase an AffilinTM-Varianten zu koppeln. Außerdem wurde analysiert, ob bei Einführung eines C-terminalen Cysteins zur nachfolgenden Kopplung, z. B. an Phycoerythrin, die Bindungseigenschaften der AffilinTM-Varianten beeinträchtigt werden.

3.6.1 *In vivo* Biotinylierung

Eine elegante Methode zur gerichteten, spezifischen Markierung von Proteinen stellt die *in vivo* Biotinylierung dar. Dabei ist es nicht notwendig, das gereinigte Protein chemisch mit der entsprechenden Markierung zu koppeln. Vielmehr wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Biotin-Ligase (BirA) Biotin spezifisch an einen Lysinrest einer spezifischen Erkennungssequenz koppelt. Die Erkennungssequenz umfaßt 13 Aminosäuren, die an das zu markierende Protein angehängt bzw. fusioniert werden (Schatz, 1993). Im Fall der AffilinTM-Varianten wurde die Erkennungssequenz C-terminal fusioniert, um zu vermeiden, dass die N-terminale Domäne, in der sich die Bindungsregion befindet, durch das Peptid bzw. das Biotin blockiert wird. Dazu wurden Gene der entsprechenden AffilinTM-Varianten in den Vektor pAC 5 kloniert und zusammen mit dem Vektor pBIRA der Expressionsstamm BL21 kotransformiert. Der Vektor pBIRA kodiert die Biotin-Ligase BirA. Nach Koexpression der beiden durch IPTG induzierbaren Gene, bei gleichzeitiger Zugabe von Biotin zum Kulturmedium, wurden die biotinylierten Proteine aus der löslichen Proteinfraction mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung von SoftLinkTM Soft Release Avidin Resin gereinigt. Der Vorteil des in dem Material verwendeten Avidin ist die auf 10^{-6} M herabgesetzte Affinität zu Biotin. Damit ist eine Elution des gebundenen Protein-Biotin-Komplexes durch Zugabe eines hohen Überschusses an freiem Biotin im Elutionspuffer möglich.

Die AffilinTM-Varianten SPC-1-A1, SPC-1-A7 und SPC-1-G3 wurden im 1,5 l Schüttelkolben im oben genannten Expressionssystem überexprimiert. Während die biotinylierten Varianten SPC-1-A1 und SPC-1-G3 mit Ausbeuten von 400 µg/l erhalten wurden, misslang die Herstellung der biotinylierten Variante SPC-1-A7. Grund für die geringe bzw. fehlende Produktion von biotinylierten AffilinTM ist offensichtlich eine ineffiziente Biotinylierung durch BirA, da durch SDS-Page alle 3 Genprodukte in ähnlichen Mengen in der löslichen Proteinfraction nachgewiesen wurden, wie sie von den AffilinTM-Varianten ohne BirA Erkennungssequenz erhalten wurden.

Die Analyse der Bindungseigenschaften gegenüber IgG-Fc wurde für SPC-1-A1 und SPC-1-G3 mittels ELISA ermittelt. Dazu wurde IgG-Fc auf Mikrotiterplatten immobilisiert, mit den biotinylierten AffilinTM-Varianten inkubiert und diese anschließend unter Verwendung eines Avidin-POD-Konjugates detektiert. Dabei wurden ähnliche Dissoziationskonstanten ermittelt, wie sie bereits für die entsprechenden AffilinTM-Varianten ohne Biotinylierungs-tag und Biotin beobachtet wurden (Abb. 34 und Tab. 9, S. 61).

Damit konnte die erfolgreiche *in vivo* Biotinylierung von zwei AffilinTM-Varianten gezeigt werden. Darüber hinaus erwiesen sich der C-terminale Biotinylierungs-*tag* und das ligierte Biotin ohne Einfluss auf die Bindungsaffinität der Varianten.

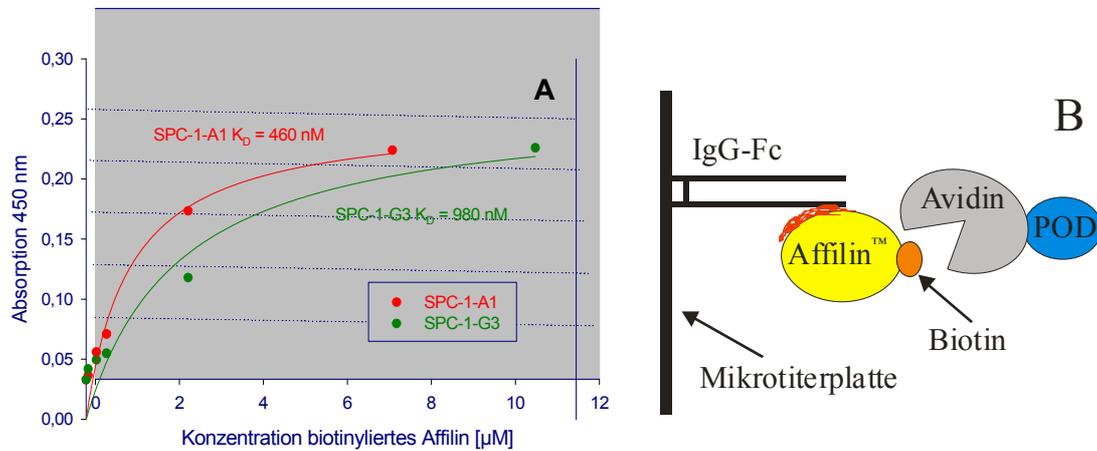


Abbildung 34: **A** Nachweis der Bindung biotinylierten SPC-1-A1 und SPC-1-G3 an IgG-Fc mittels ELISA. Beschichtet wurde mit 10 μg/ml IgG-Fc. Als Detektionsantikörper diente ein Avidin-POD Konjugat in einer Verdünnung von 1:20000. Die dargestellten Absorptionswerte sind Mittelwerte aus drei Parallelmessungen. **B** Schematischer Aufbau des ELISA.

3.6.3 Ungerichtete Kopplung an einen Fluoreszenz-Farbstoff

Eine alternative Möglichkeit der Markierung von Proteinen stellt die ungerichtete Kopplung dar. Dies ist eine einfache, schnelle und kostengünstige Methode zur Kopplung bzw. Markierung von Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzymen an Proteine.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte getestet werden, ob eine ungerichtete Kopplung die Bindungseigenschaften von AffilinTM-Varianten beeinträchtigt. Bei der ungerichteten Kopplung über primäre Amine können auch Lysinreste in Nachbarschaft zur Bindungsregion oder Lysinreste in den variablen Positionen markiert werden, was zu einem Verlust der Bindungseigenschaften führen kann.

Diese Kopplungsmethode wurde mit der Variante SPC-1-A7 und dem Fluoreszenzfarbstoff Oyster556 getestet. Die Kopplungsreaktion wurde bei einem pH-Wert von 8,5 durchgeführt, um die Kopplung an das nahe der Bindungsregion gelegene primäre Amin des N-Terminus zu unterdrücken. Das AffilinTM wurde in zweifach molarem Überschuss zum Fluoreszenzfarbstoff Oyster556 eingesetzt. Nach der Kopplungsreaktion wurde ungekoppelter Fluoreszenzfarbstoff mittels einer PD10 Säule abgetrennt und ein Kopplungsverhältnis von Affilin zu Oyster556 von ca. 1 : 0,8 ermittelt. Dies zeigt, dass nicht jedes AffilinTM mit dem Fluoreszenzfarbstoff

markiert wurde, allerdings wurde keine Abtrennung von unmarkierten Affilin™ vorgenommen.

Um zu testen, ob durch die Kopplung von Oyster556 die Bindung des Affilin™ an IgG-Fc beeinträchtigt wird, wurden Biacore-Experimente durchgeführt. Erneut wurden Verdünnungen an fluoreszenzmarkierten SPC-1-A7 über einen CM5-Chip mit immobilisiertem IgG-Fc geleitet und die Assoziation und Dissoziation verfolgt. Die dabei ermittelte Dissoziationskonstante von 800 nM ist eine um den Faktor 3 geringere Affinität, als die der unmarkierten Variante SPC-1-A7 (Abb. 35 und Tab 9, S. 61).

Die ungerichtete Kopplung hat also kaum Einfluss auf die Bindungsaffinität des Affilin™.

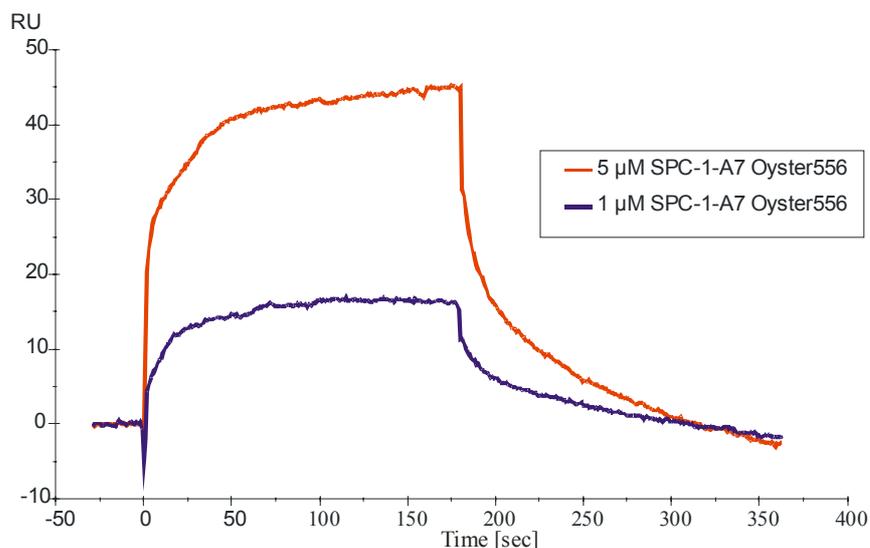


Abbildung 35: Sensogramme der Biacore-Experimente zur Überprüfung der Bindung von SPC-1-A7 Oyster556 an einen CM5-Chip mit immobilisiertem IgG-Fc. Es wurden 1000 RU IgG-Fc auf dem Chip immobilisiert und SPC-1-A7 Oyster556 in Konzentrationen von 1 µM (blau) und 5 µM (rot) über den Chip geleitet. Die Assoziations- und Dissoziationsphase betrug jeweils 3 min. Als Laufpuffer diente HBS-EP mit einer Flussgeschwindigkeit von 30 µl/min.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass durch den chemisch kovalent gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Oyster556 die Bindungseigenschaften von SPC-1-A7 kaum beeinträchtigt werden, sollte im Folgenden in einer Machbarkeitsstudie untersucht werden, ob diese markierte Variante SPC-1-A7 Oyster556 prinzipiell für den Einsatz in der Luminex®-Technologie geeignet ist. Die markierte Variante wurde dazu in einem bereits etablierten Luminex®-Assay getestet.

Für die Experimente wurden zwei verschiedene *bead*-Spezies, entweder mit IgG-Fc oder mit IgM-Fc immobilisiert, verwendet. Die *beads* wurden mit verschiedenen Verdünnungen des Reporters Affilin™-Oyster inkubiert. Verdünnt wurde das Reporterprotein entweder in PBS oder, vergleichbar zu einem diagnostischen Assay, in humanem Serum. Nach Inkubation für 2 h wurden jeweils 10000 *beads* in einem Luminex®100 Analysegerät ausgezählt (Abb. 36).

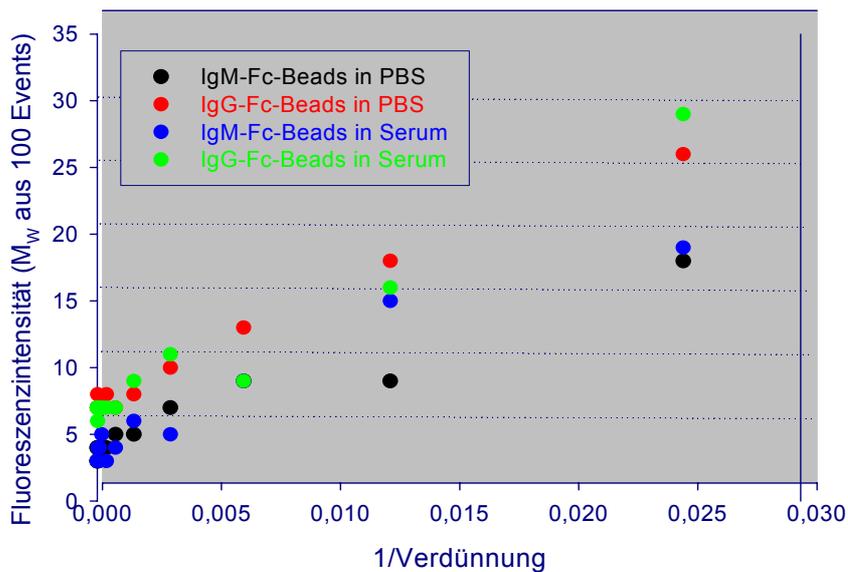


Abbildung 36: Auswertung der Anwendung des Affilin™ SPC-1-A7 Oyster556 in einem Luminex®-Assay. Eingesetzt wurden zwei verschiedene *bead*-Spezies. Immobilisiert wurde an einer Spezies humanes IgG-Fc, an der anderen humanes IgM-Fc. Das Affilin™ wurde in PBS oder humanem Serum verdünnt. Verwendet wurden jeweils 10000 *beads*, von denen 100 Events gezählt wurden.

Die Auswertung des Experimentes zeigte die generelle Funktionalität der Affilin™-Variante SPC-1-A7 Oyster556 in diesem Assay (Abb. 36). Bei den derzeit üblichen Detektionssystemen, die Phycoerythrin bzw. Cy3 markierte F_{ab}-Fragmente als Reporter einsetzen, werden jedoch bis zu 1000fach höhere Signalintensitäten gemessen. Das liegt hauptsächlich daran, dass das Luminex®-System auf die Anwendungen der Fluoreszenzfarbstoffe Phycoerythrin und Cy3 abgestimmt ist.

Durch eine Kopplung an Phycoerythrin sollte der resultierende Affilin™-PE Komplex vergleichbare Ergebnisse wie ein F_{ab}-PE Komplex liefern.

3.6.3 Gerichtete Kopplung an einen Fluoreszenzfarbstoff

Aufgrund der Ergebnisse, die mit Oyster556 markierten SPC-1-A7 erhalten wurden, sollte nun versucht werden, eine Affilin™-Variante gerichtet an Phycoerythrin zu koppeln. Die einfachste Methode der gerichteten Kopplung ist die Markierung über reduzierte und freie, das heißt lösungsmittelzugängliche, Cysteine.

Die Variante SPC-1-A7 besitzt in der Bindungsregion an der variablen Aminosäureposition 4 ein Cystein, das somit lösungsmittelzugänglich ist. Es besteht also die Wahrscheinlichkeit, dass bei einer Kopplung über freie Cysteine die Bindungsregion abgedeckt bzw. blockiert

wird. Es musste somit vor einer Kopplung das Cystein in dieser Position substituiert werden, um anschließend ein freies Cystein am C-Terminus, strukturell weit entfernt von der Bindungsregion, einzuführen.

Das Cystein in Aminosäureposition 4 wurde mit Hilfe der Primer A7Cys4Ser for und A7Cys4Ser rev in einer Quickchange™ PCR (s. 2.2.3.8) durch ein Serin substituiert. Vor der Einführung eines Cysteins am C-Terminus musste der Einfluss der Substitution auf die Bindungseigenschaften untersucht werden. Dazu wurde die durch Quickchange™ PCR entstandene Variante SPC-1-A7Cys4Ser im 1,5 l Schüttelkolben überexprimiert und durch zwei Chromatographieschritte gereinigt. Es wurde die Bindung der Variante im Vergleich zur Ausgangsvariante SPC-1-A7 mittels Biacore untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Substitution des Cysteins in ein Serin keinen großen Einfluss auf die Bindungsaktivität nach sich zog. Für die Variante SPC-1-A7Cys4Ser konnte eine Dissoziationskonstante von 700 nM (Abb. 37) bestimmt werden. Die Variante SPC-1-A7 zeigte in Biacore-Experimenten eine Dissoziationskonstante von 280 nM (Abb. 13, S. 52).

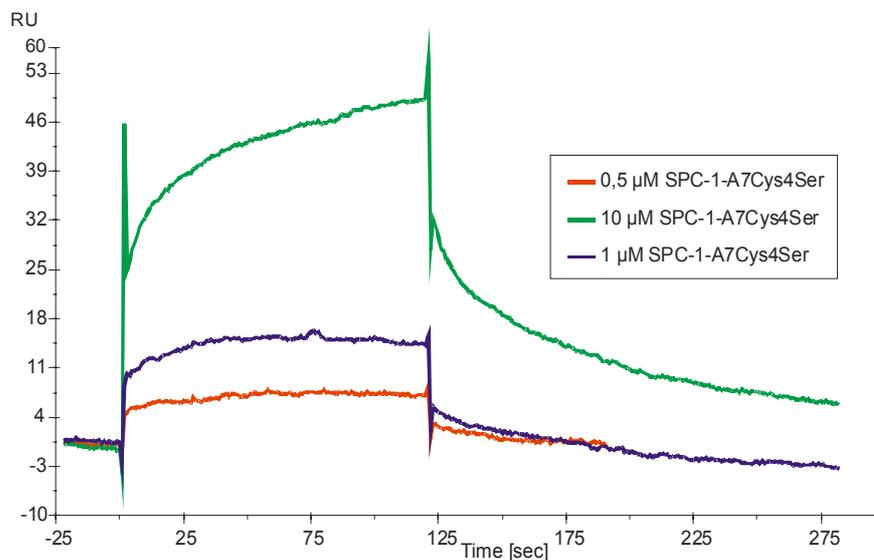


Abbildung 37: Sensogramme der Biacore-Experimente zur Bindung der Variante SPC-1-A7Cys4Ser an einen mit IgG-Fc immobilisierten CM5-Chip. Es wurden 3000 RU an IgG-Fc immobilisiert und die Konzentrationen 10 µM (grün), 1 µM (blau) und 500 nM (rot) an SPC-1-A7Cys4Ser über den Chip geleitet. Die Assoziations- und Dissoziationsphase betrug jeweils 3 min. Als Laufpuffer wurde PBS-EP mit einer Flussgeschwindigkeit von 30 µl/min verwendet.

Nach der erfolgreichen Substitution des Cystein durch Serin ohne Verlust der Bindungseigenschaften sollte nun in einem weiteren Schritt ein zusätzliches Cystein am C-Terminus für eine Kopplung über freie Cysteine eingeführt werden. Dazu war es notwendig, zusätzlich ein kurzes Peptid zwischen dem C-Terminus der Affilin™-Variante und dem Cystein einzuführen. Dieser so genannte *linker* sollte verhindern, dass das Cystein durch die Affilin™-Variante abgeschirmt wird und damit für eine Kopplung nicht zugänglich ist.

Ausgehend von der Mutante SPC-1-A7Cys4Ser wurde mittels Megaprimer-Methode ein *linker*, bestehend aus der Sequenz Gly₂SerGly₄Ser und ein Cystein C-terminal inseriert. Gleichzeitig wurde der His₆-tag um zusätzlich 4 Histidinreste erweitert, um eine effizientere Reinigung mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose zu gewährleisten. Als Template diente das Gen der Variante SPC-1-A7Cys4Ser, das im Vektor pET20b vorlag.

Im weiteren Verlauf wird die so erzeugte Mutante mit C-terminalem *linker*, Cystein und dem Deca-His-tag als SPC-1-A7Dia bezeichnet. SPC-1-A7Dia konnte erfolgreich in *E. coli* BL21 (DE3) im 1,5 l Schüttelkolben überexprimiert und anschließend gereinigt werden. Die Bindung an IgG-Fc wurde mittels ELISA überprüft. Dabei konnte eine Dissoziationskonstante von 500 nM bestimmt werden (Daten nicht gezeigt), die vergleichbar zur in Biacore-Experimenten bestimmte Dissoziationskonstante der Variante SPC-1-A7 von 280 nM (s. Abb. 13, S. 52) bzw. der Dissoziationskonstante der Mutante SPC-1-A/Cys4Ser mit 700 nM (Abb. 37) war.

Um vor der Durchführung der Kopplungsreaktion sicherzustellen, dass der C-terminal eingeführte Cysteinrest tatsächlich lösungsmittlexponiert ist und um auszuschließen, dass die sieben weiteren im humanen γ -Kristallin vorhandenen Cysteine nicht für eine Kopplung zugänglich sind, wurden die freien Cysteine mit Ellman's Reagenz ermittelt (s. 2.2.4.10). Eingesetzt wurden zwischen 25 und 100 μ g Protein der Varianten SPC-1-A7, SPC-1-A7Cys4Ser und SPC-1-A7Dia. Die Ergebnisse sind in Tab. 13 zusammengestellt.

Tabelle 13: Übersicht der Cysteine in verschiedenen Affilin™-Varianten.

Variante	Anzahl Cysteine	Theoretisch zugängliche Cysteine	Anzahl titrierter Cysteine
SPC-1-A7	8	1	3 - 4
SPC-1-A7Cys4Ser	7	0	0
SPC-1-A7Dia	8	1	1

Für die Variante SPC-1-A7 wurde mehr als das eine, theoretisch zugängliche, Cystein in Position 4 titriert. In enger Nachbarschaft existieren Cysteine in den Positionen 18 und 32. Deren Seitenketten sind zwar in das Innere des Proteins gerichtet, und damit theoretisch nicht lösungsmittel exponiert, vorstellbar ist dennoch, dass bei partieller Entfaltung und Unterstützung durch Disulfid-*shuffling* weitere Cysteine für das Ellman's Reagenz zugänglich sind.

Für die Variante SPC-1-A7Cys4Ser war, wie erwartet, kein zugängliches Cystein nachweisbar. Bei der Variante SPC-1-A7Dia war nur ein Cystein nachweisbar. Aufgrund des *linkers* zwischen freiem C-terminalen Cystein und Protein ist der Abstand zum nächsten Cystein im Protein so groß, dass kein Disulfid-*shuffling* auftreten kann.

Die Variante SPC-1-A7Dia war damit für eine spezifische Kopplung geeignet und sollte über das C-terminale Cystein an Phycoerythrin gekoppelt werden. Dazu wurde der Kopplungs-Kit der Firma Prozym mit aktiviertem Phycoerythrin nach den Angaben des Herstellers verwendet. Das Affilin[™] wurde an das aktivierte Phycoerythrin über Maleinimid gekoppelt. Maleinimid reagiert ausschließlich mit reduzierten Cysteinen und hat den Vorteil, dass es durch die entstehende C-S Bindung zu keinem Disulfid-*shuffling* kommen kann. SPC-1-A7Dia wurde in einem fünffachen molaren Überschuss zum Phycoerythrin in die Reaktion eingesetzt. Ungekoppeltes Affilin[™] konnte mit Hilfe einer Gelfiltration an Superdex S 200 abgetrennt werden. Die Kopplungsrate des Affilin[™] an PE wurde im Bereich zwischen 2 : 1 und 3 : 1 bestimmt.

Für die Analyse der Bindung des SPC-1-A7Dia-PE-Konjugates an IgG-Fc wurden erneut Biacore-Experimente durchgeführt. Dazu wurde ein CM5-Chip mit immobilisiertem IgG-Fc verwendet. Das Affilin[™]-PE-Konjugat wurde in verschiedenen Konzentrationen bei einer Flussgeschwindigkeit von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ über den Chip geleitet. Die erhaltenen Sensogramme sind in Abb. 38 gezeigt.

Mit 15 nM lag die bestimmte Dissoziationskonstante deutlich unter der, die für die Affilin[™]-Variante SPC-1-A7Dia ohne PE (500 nM im ELISA) bzw. für die Variante SPC-1-A7 (280 nM in Biacore-Experimenten) und für die Variante SPC-1-A7Cys4Ser (700 nM in Biacore-Experimenten) bestimmt wurden. Diese Erhöhung der Affinität lässt sich wahrscheinlich auf eine erhöhte Avidität zurückführen. Durch die Kopplung von zwei bis drei Affilin[™]-Molekülen auf einem PE-Molekül erhöht sich die lokale Konzentration des Affilin[™] auf der PE-Oberfläche stark. Dies führt zu einer Steigerung der Affinität der Variante SPC-1-A7Dia zu IgG-Fc um den Faktor 10-15.

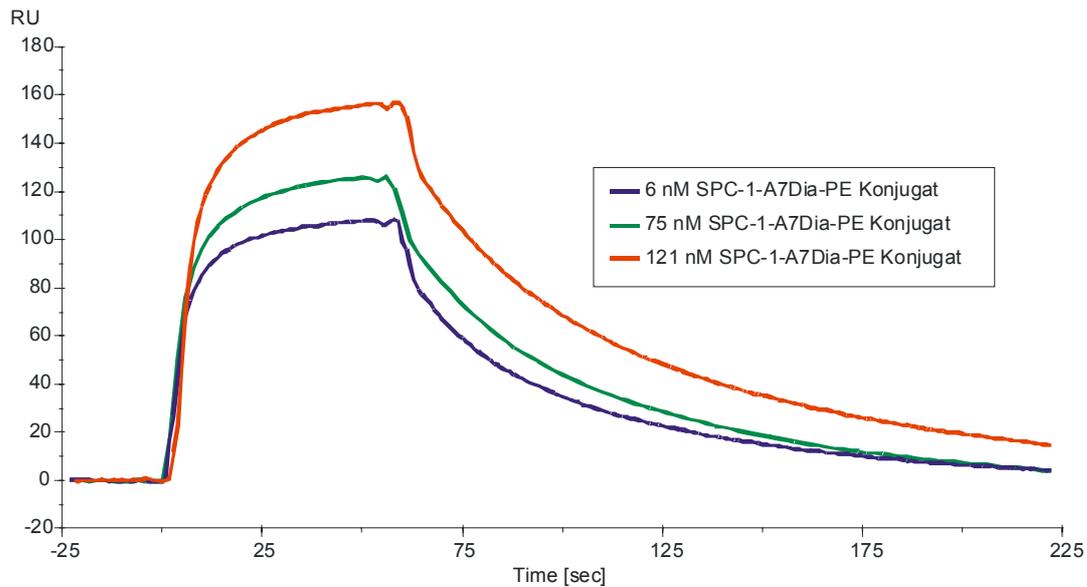


Abbildung 38: Sensogramme der Biacore-Experimente zur Bindung von SPC-1-A7Dia-PE Konjugat an einen CM5-Chip mit immobilisiertem IgG-Fc. Es wurden 3000 RU an IgG-Fc immobilisiert und die Konzentrationen 121 nM (rot), 75 nM (grün) und 6 nM (blau) an SPC-1-A7Dia-PE Konjugat über den Chip geleitet. Die Assoziations- und Dissoziationsphase betrug jeweils 3 min. Als Laufpuffer diente HBS-EP mit einer Flussgeschwindigkeit von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Im Ergebnis der Experimente konnte ein Affilin[™] erfolgreich gerichtet an PE gekoppelt werden. Die Kopplung von zwei bis drei Affilin[™]-Molekülen auf einem PE-Molekül führt zu einer Steigerung der Affinität um den Faktor 10 bis 15 auf 15 nM. Dieses Affilin[™]-PE-Konjugat sollte in weiterführenden Arbeiten im Luminex[®]-Assay im Vergleich zum F_{ab}-PE-Konjugat getestet werden.

3.6.4 Ungerichtete Kopplung an Peroxidase

Eine weitere Methode zur Detektion von Proteinen basiert auf der Verwendung von Marker-Enzymen. Eine weite Verbreitung findet in diesem Zusammenhang die Peroxidase (POD). In der Regel wird die POD ungerichtet über primäre Amine an die entsprechenden Proteine gekoppelt. Die Kopplung einer Affilin[™]-Variante an POD wurde in Kooperation mit der Firma cell trend GmbH aus Luckenwalde als Machbarkeitsstudie durchgeführt. Dabei sollte die zu koppelnde Affilin[™]-Variante nach einem Standard-Protokoll zur Kopplung von Antikörpern ungerichtet, über primäre Amine mit POD markiert werden. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass die ungerichtete Kopplung der Variante SPC-1-A7 an den Farbstoff Oyster556 unter Erhalt der Bindungsaktivität durchgeführt werden kann (s. 3.6.2).

Für die Studie wurde die Variante SPC-1-A7Cys4Ser verwendet. Diese Variante enthielt gegenüber SPC-1-A7 einen Austausch des in der vierten Position befindlichen Cysteins (s. 3.6.3).

In die Kopplungsreaktion wurden 1 mg der Variante SPC-1-A7Cys4Ser und 1 mg der durch Perjodat aktivierten Peroxidase eingesetzt. Eine Abtrennung des ungekoppelten Affilin™ bzw. der ungekoppelten POD vom Kopplungsgemisch erfolgte nicht. Die Bindung an IgG wurde durch ELISA nachgewiesen. Dazu wurde IgG an einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit verschiedenen Verdünnungen des Kopplungsgemisches inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde gebundenes Affilin™-POD Konjugat über die Aktivität mit TMB-Substratlösung nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass die Kopplung von Affilin™ und POD erfolgreich verlaufen war (Abb. 39). Bis zu einer Verdünnung des Reaktionsansatzes von 1:10000 ließ sich POD-Aktivität detektieren. Das ungekoppelte POD im Kopplungsansatz dieses Signal verursacht konnte durch Kontrollen ausgeschlossen werden.

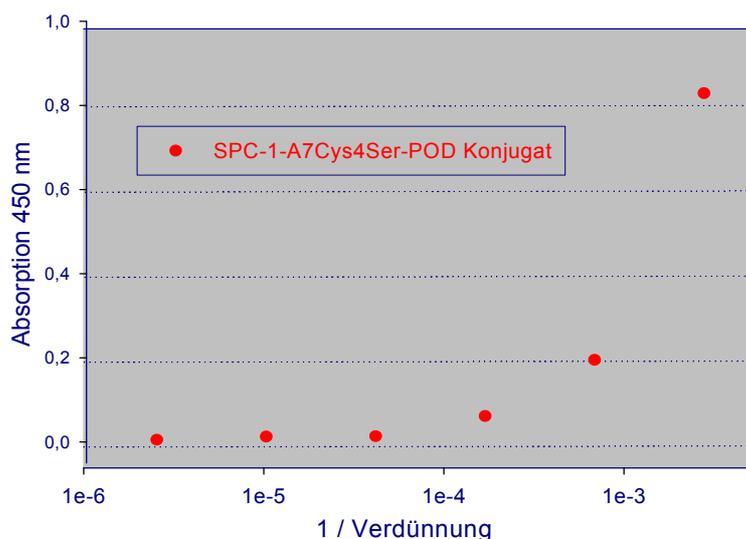


Abbildung 39: Nachweis der Bindung eines Affilin™-POD Konjugates an IgG durch ELISA. Es wurden 10 µg/ml humanes IgG an einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Verschiedene Verdünnungen des Affilin™-POD Konjugates in PBS wurden 1 h auf der Mikrotiterplatte inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde die Aktivität der gebundenen POD durch TMB-Substratlösung nachgewiesen.

Im Ergebnis der Experimente konnte die Kopplung einer Affilin™-Variante an POD erfolgreich gezeigt werden. In einem ELISA-Experiment wurde von dem erhaltenen Affilin™-POD Konjugat auch die Bindung an IgG und die Aktivität der POD nachgewiesen. Die Bindungsregion des Affilin™ bleibt damit auch nach Kopplung über primäre Amine an die mit 40 kDa doppelt so große POD für seinen Bindungspartner zugänglich. Für eine Anwendung eines IgG-Fc bindenden Affilin™-POD Konjugates als Sekundärantikörper sollte die Kopplung im Hinblick auf Effizienz und Ausbeute sowie die Bindungsaffinität des

Kopplungsgemisches optimiert werden. So könnte ein molarer Überschuss der Affilin™-Variante im Kopplungsansatz zu einer mehrfachen Kopplung an POD führen. Dies könnte, wie für den Affilin™-PE-Komplex gezeigt (s. 3.6.3), zu einem Aviditätseffekt und einer damit verbundenen höheren Affinität führen. Die Abtrennung von ungekoppeltem Affilin™ aus dem Kopplungsgemisch sollte eine Steigerung der Absorption der entsprechenden Verdünnungen des gereinigten Affilin™-POD-Konjugates im ELISA bewirken.

3.7 Strukturaufklärung

Zur weiteren Charakterisierung des humanen γ -Kristallin WT und der IgG-Fc bindenden Affilin™-Varianten sollten diese kristallisiert und der Strukturaufklärung zugeführt werden. Diese Experimente sollten Erkenntnisse über die Änderung der Raumstruktur aufgrund der Substitution von acht Aminosäuren in einer Affilin™-Variante und über die Wechselwirkungen im Bindungskomplex aus Variante und IgG-Fc liefern. Es wurde, wie unter 3.4 beschrieben, Protein gereinigt und die Varianten SPC-1-A7 und SPC-1-A1 sowie der humane γ -Kristallin WT zu einer Konzentration von 10 mg/ml aufkonzentriert. Für die Variante SPC-1-G3 wurde eine Konzentration von ca. 5 mg/ml erreicht. Eine Konzentration darüber hinaus führte zu Aggregation der Variante SPC-1-G3. Alle vier Proteine wurden zuerst in einem *Screen* mit 240 verschiedenen Bedingungen auf ihre Fähigkeit Kristalle zu bilden, getestet (s. 2.2.7.1). Ausgehend von den Bedingungen, in denen sich Kristalle oder Kristallvorstufen gebildet hatten, wurde ein verfeinertes *screening* durchgeführt. Dies beinhaltete die Variation des pH-Wertes, der Präzipitanzkonzentration oder der Proteinkonzentration.

3.7.1 Strukturaufklärung des humanen γ -Kristallin

Die Kristalle des humanen γ -Kristallin WT konnten bei einer Proteinendkonzentration im Kristallisationsansatz von 5 mg/ml und 30 % PEG 4000, 100 mM NaAcetat, 100 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA bei 20°C nach 10 Tagen erhalten werden (Abb. 40). Ein Teil der Kristalle konnte präpariert und röntgenkristallographisch mit Hilfe von Synchrotronstrahlung bis zu einer maximalen Auflösung von 1,7 Å vermessen werden (s. 2.2.7.2).

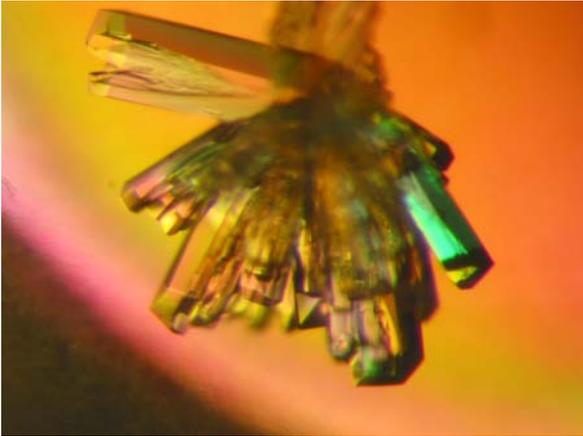


Abbildung 40: Kristall des humanen γ -Kristallin WT. Der Kristall wurde durch Gasphasendiffusion im sitzenden Tropfen erhalten. Bedingung: 30 % PEG 4000; 100 mM NaAcetat; 100 mM $MgCl_2$; 2 mM EDTA; pH 4,6; 20°C. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug 10 mg/ml.

Der Kristall gehört zur hexagonalen Raumgruppe $P3_121$. Die Struktur des bovinen γ -Kristallins B (Kumaraswamy *et al.*, 1996; PDB-Code: 1AMM) wurde in der Methode des *Molecular Replacements* als Homologiemodell herangezogen. Einen Überblick über die Statistik der Datensammlung und Verfeinerung gibt Tab. 14 wieder. Das resultierende Strukturmodell ist im Sekundärstrukturmodus zu sehen (Abb. 41). Deutlich sichtbar ist die Domänenstruktur des Proteins: auf der linken Seite die N-terminale und auf der rechten Seite die C-terminale Domäne.

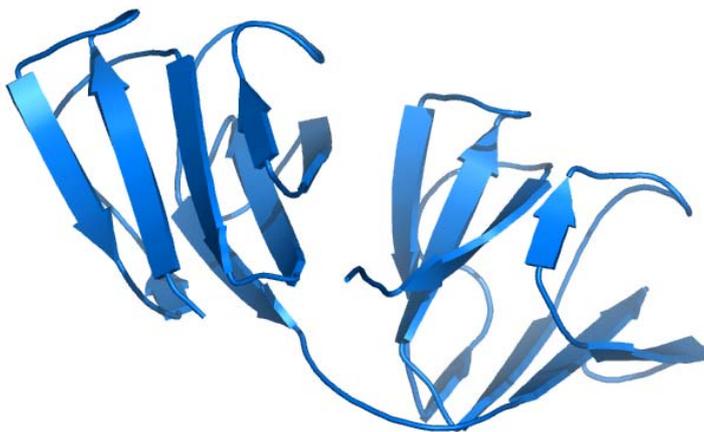


Abbildung 41: Strukturmodell des humanen γ -Kristallin WT. Dargestellt ist ein Sekundärstrukturmodell. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms *pymol* (DeLano, 2002) erstellt.

Bei einem Vergleich mit dem Strukturmodell des bovinen γ -Kristallin zeigte sich eine hohe strukturelle Identität (Abb. 42). Dies konnte aufgrund der hohen Sequenzhomologie beider Proteine von 85 % erwartet werden. In beiden Proteinen ist das Strukturmotiv des *greek key* sowohl in der N- als auch in der C-terminalen Domäne zu erkennen.

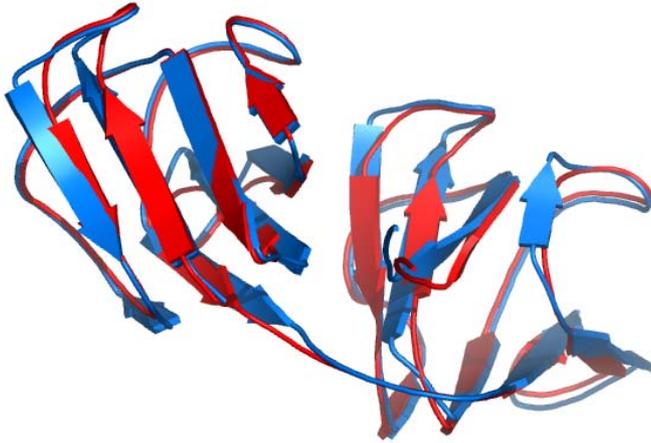


Abbildung 42: Überlagerung des C_{α} -Rückrates der Strukturmodelle von bovinem (rot) und humanem γ -Kristallin (blau). Dargestellt sind jeweils die Sekundärstrukturmodelle. Die Abb. wurde mit Hilfe des Programms *pymol* (DeLano, 2002) erstellt.

Bei der Betrachtung der N-terminalen Domäne mit den acht Aminosäurepositionen, die bei der Herstellung der Bibliotheken variiert wurden, zeigte sich sowohl für das bovine als auch für das humane γ -Kristallin eine gute Lösungsmittel-Zugänglichkeit dieser Positionen. Im Fall des bovinen γ -Kristallins war dies bei der Konstruktion der bovinen γ -Kristallin Bibliothek GCUC1 bereits bekannt. Bei der Konstruktion der humanen γ -Kristallin Bibliothek CR20 wurde diese Zugänglichkeit aufgrund der Sequenzhomologie vorausgesetzt und konnte mit den vorliegenden Ergebnissen nun auch strukturell bestätigt werden (Abb. 43).

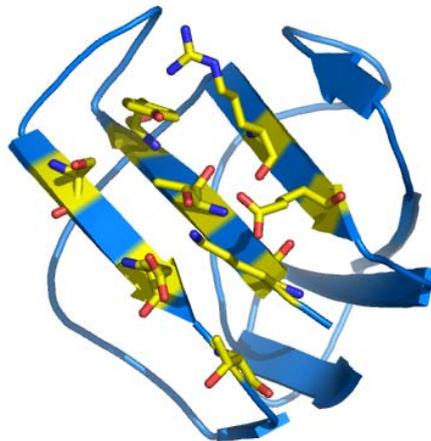


Abbildung 43: Darstellung der N-terminalen Domäne des humanen γ -Kristallin WT im Sekundärstrukturmodus. Zusätzlich dargestellt sind die acht Positionen, die für die Randomisierung ausgewählt wurden. Gewählt wurde für die Darstellung der Atome der Farbcode: C gelb, O rot, N dunkelblau. Die Abb. wurde mit Hilfe des Programms *pymol* (DeLano, 2002) erstellt.

3.7.2 Strukturaufklärung eines IgG-Fc bindenden AffilinTM

Zur Ermittlung der Raumstruktur wurden die drei IgG-Fc bindenden AffilinTM-Varianten SPC-1-A1, SPC-1-A7 und SPC-1-G3 in Kristallisationsexperimenten eingesetzt. Dabei konnte die Bildung von Kristallen lediglich für die Variante SPC-1-G3 beobachtet werden.

Die Kristalle der Variante SPC-1-G3 zeigten im Vergleich zum humanen γ -Kristallin WT eine veränderte Kristallform (Abb. 44). Neben leichter Aggregation bildeten sich kleine, nicht verwachsene Kristalle. Auch die Kristallisationsbedingung unterschied sich von der des humanen γ -Kristallin WT. So konnten Kristalle bei 10 % PEG 20000; 100 mM MES; pH 6,5; 2 mM EDTA und 20°C erhalten werden. Für die Kristallisation der Variante wurde eine Proteinkonzentration von nur 5 mg/ml eingesetzt. Mit Hilfe von Synchrotronstrahlung konnte für einen solch kleinen Kristall ein Datensatz aufgenommen werden.

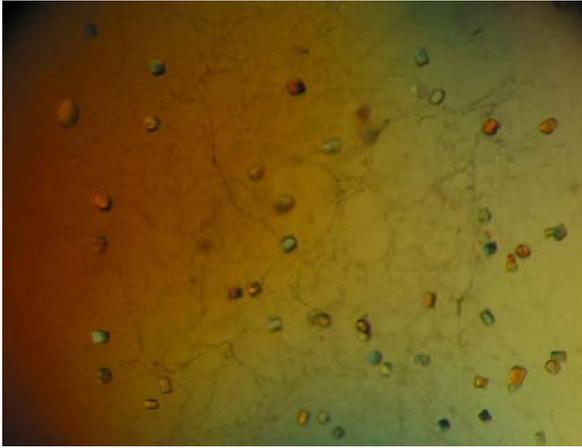


Abbildung 44: Kristalle von SPC-1-G3. Die Kristalle wurden durch Gasphasendiffusion im sitzenden Tropfen erhalten. Bedingung: 10 % PEG 20000; 100 mM MES; pH 6,5; 2mM EDTA, 20°C. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug 5 mg/ml.

Der Kristall der Variante SPC-1-G3 gehörte zur orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$. Die Kristallstruktur der Variante wurde mittels *Molecular Replacement* unter Verwendung der Struktur des humanen γ -Kristallin WT gelöst. Einen Überblick über die Statistik der Datensammlung und Verfeinerung gibt Tab. 14. Die mit einer Auflösung von 2,0 Å ermittelte Struktur der AffilinTM-Variante SPC-1-G3 ist im Vergleich zum humanen γ -Kristallin WT in Abb. 45 dargestellt. Es zeigte sich eine hohe strukturelle Identität zwischen den beiden Proteinen.

Durch die Sekundärstruktur der AffilinTM-Variante SPC-1-G3 konnte nachgewiesen werden, dass bei Substitution in den acht ausgewählten Aminosäurepositionen die β -Faltblattstruktur nicht verändert und das *greek key* Motiv des γ -Kristallins erhalten bleibt. Dennoch konnte bei der Überlagerung der Strukturmodelle der Variante SPC-1-G3 und des humanen γ -Kristallin WT kleine Veränderungen in den *loop* Bereichen (Aminosäuren 8-13 und 136-141) beobachtet werden. Für die *linker* Region (Aminosäuren 81-89) zwischen den beiden Domänen war dies nicht überraschend, da dieser Bereich sehr flexibel ist. Durch diese Flexibilität ist der Bereich in der berechneten Elektronendichtekarte nicht sehr gut aufgelöst.

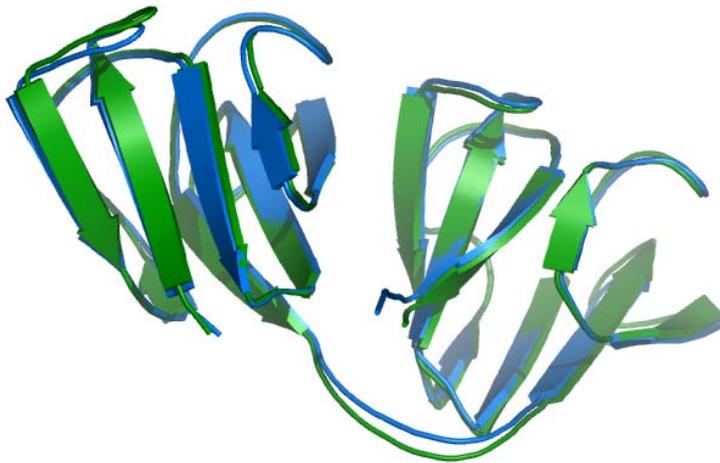


Abbildung 45: Überlagerung der Strukturmodelle von humanem- γ -Kristallin B (blau) und SPC-1-G3 (grün). Dargestellt sind jeweils die Sekundärstrukturmodelle. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms *pymol* (DeLano, 2002) erstellt.

Dagegen ist die Verschiebung des *loops* zwischen dem ersten und zweiten β -Strang wahrscheinlich auf die Veränderung der Aminosäure in der variablen Position 6 zurückzuführen (Abb. 46). Für den bovinen γ -Kristallin WT ist eine Stabilisierung dieses *loops* aufgrund der aromatischer Aminosäuren in Position 6 und 11 bekannt (persönliche Mitteilung Christine Slingsby, Department of Crystallography, Birkbeck College, London, UK). Diese zwei aromatischen Aminosäuren existieren auch im humanen γ -Kristallin WT und sollten dort ebenfalls für eine Stabilisierung verantwortlich sein (Abb. 46).

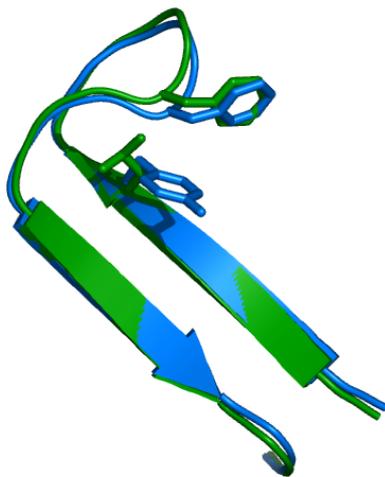


Abbildung 46: Überlagerung der Strukturmodelle der Aminosäuren 1 bis 20 von humanem- γ -Kristallin B (blau) und SPC-1-G3 (grün). Abgebildet sind für beide Modelle die Seitenketten der Aminosäure 6 im *stick*-Modus. Es wurde das Programms *pymol* (DeLano, 2002) genutzt.

Durch die Veränderung der Position 6 von Tyrosin zu Leucin könnte es zu einem „Aufweichen“ der *loop* Struktur kommen. Dies erlaubt es Leu6, in der Variante SPC-1-G3, zwei mögliche Konformationen einzunehmen. In Abb. 47 ist die Elektronendichtekarte mit dem Strukturmodell für SPC-1-G3 dargestellt. In der Mitte der Abbildung erkennt man auch für die zweite Konformation des Leu6 (magenta) eine gut aufgelöste Elektronendichte.

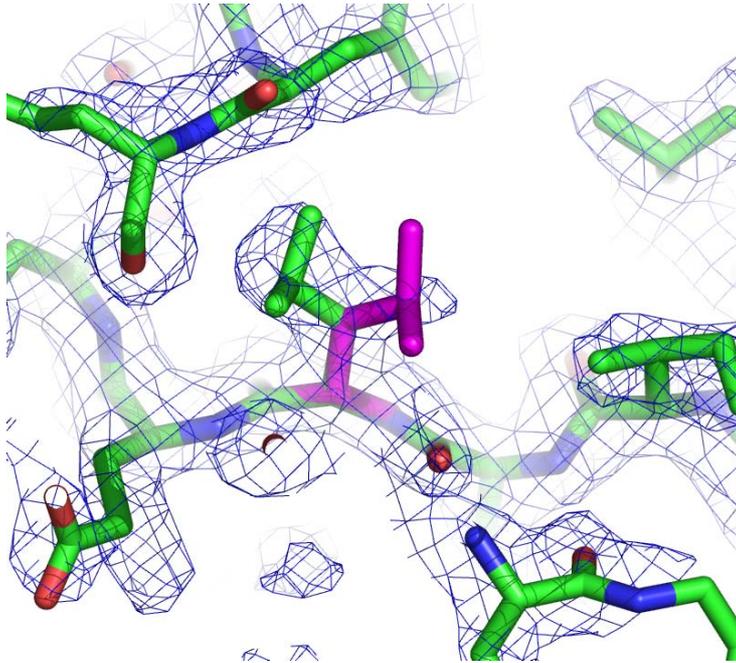


Abbildung 47: Ausschnitt der variablen Position 6 der AffilinTM-Variante SPC-1-G3 bei einer Auflösung von 2,0 Å. Das Konturniveau der 2Fo-Fc-Elektronendichtekarte (blau) entspricht 1,0 σ . Gewählt wurde für die Darstellung der Atome der Farbcode: C grün, O rot, N dunkelblau. In magenta dargestellt ist die zweite mögliche Konformation des Leu6. Das Bild wurde mit dem Programm *pymol* (DeLano, 2002) erstellt.

3.7.3 Kokristallisation des Komplexes aus IgG-Fc und AffilinTM

Um nähere Erkenntnisse über die Wechselwirkungen bei der Bindung von AffilinTM-Varianten an IgG-Fc zu erlangen, sollten Kokristallisationsversuche des Bindungskomplexes durchgeführt werden. Dafür wurden der Fc-Teil des humanen IgG1 und die AffilinTM-Varianten SPC-1-A1 separat gereinigt und aufkonzentriert. Die Variante wurde mit einer Konzentration von 8 mg/ml und IgG-Fc mit 20 mg/ml in einem molaren Verhältnis von 1:1 für die Kristallisation eingesetzt. Die beiden Proteine wurden gemischt und in einem *Screen* mit 240 verschiedenen Bedingungen, auf ihre Fähigkeit Kristalle zu bilden, getestet.

Dabei bildeten sich bei mehreren Bedingungen nach wenigen Tagen Kristalle, wobei zwei verschiedene Kristallformen beobachtet wurden (Abb. 48).

Mit Hilfe von Synchrotronstrahlung wurden für die Kristalle Beugungsbilder erhalten. Bei der Bestimmung der Raumgruppe und der Zelldimension des ersten Beugungsbildes zeigte sich allerdings, dass die Dimensionen denen von IgG-Fc entsprechen und nicht denen, die den gesamten Bindungskomplex beinhalten könnten (Krapp *et al.*, 2003). Für beide Kristallformen konnte ein vollständiger Datensatz aufgenommen und jeweils leicht veränderte Zelldimension bestimmt werden (*Beamline* BW6, DESY, Hamburg).

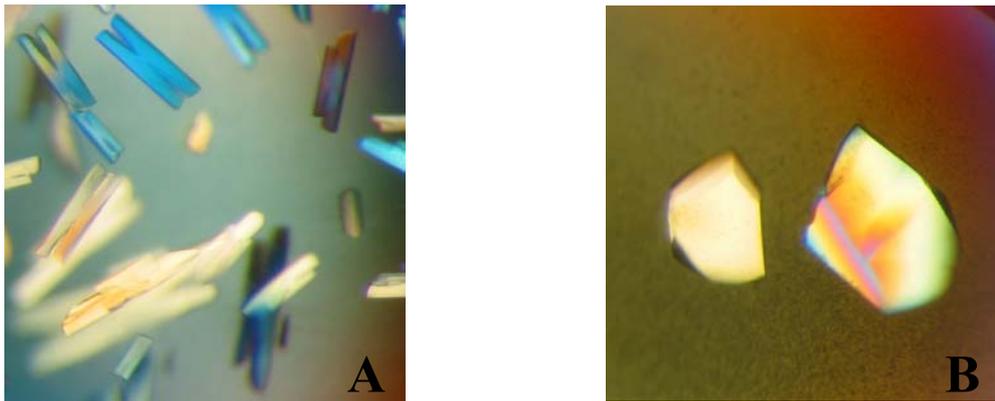


Abbildung 48: Kristalle des Komplexes aus der Variante SPC-1-A1 und IgG-Fc. Die Kristalle wurden durch Gasphasendiffusion im sitzenden Tropfen erhalten. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug 8 mg/ml für die Variante und 20 mg/ml für IgG-Fc (molares Verhältnis 1:1). Bedingungen: **A** 12 % PEG 8000; 5 % Glycerol; 0,1 M KCl; pH 5,0; **B** 8 % PEG 8000; 0,1 M Tris/HCl; pH 8,5.

In weiterführenden Experimenten sollte versucht werden, in Kristallisationsansätzen des Bindungskomplexes aus Affilin[™]-Variante und IgG-Fc einen molaren Überschuss an Affilin[™] einzusetzen. Dies könnte die Bildung von Kristallen des IgG-Fc ohne gebundenes Affilin[™] unterdrücken und zur Kristallisation des Bindungskomplexes führen.

Tabelle 14: Statistik der Datensammlung und Verfeinerung für der Kristalle von humanem γ -Kristallin WT und der AffilinTM-Variante SPC-1-G3.

Parameter	humanes γ -Kristallin	SPC-1-G3
Datensammlung		
Raumgruppe	P3 ₁ 21	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Auflösung (Å)	1,7	2,0
Einheitszelle a, b, c (Å)	45,52, 45,52, 149,76	47,72, 53,95, 62,17
Vollständigkeit (%)	98,5	85,5
Reflexe		
Gemessene Reflexe	75440	33813
Einzelreflexe	20389	9698
R _{Scale}	0,043 (50-1,7 Å)	0,061 (50-2,0 Å)
R _{Scale}	0,186 (1,75-1,7 Å)	0,156 (2,07-2,0 Å)
I / σ	31,9 (50-1,7 Å)	18,74 (50-2,0 Å)
I / σ	5,8 (1,71-1,7 Å)	5,52 (2,02-2,0 Å)
Verfeinerung		
R-Faktor (%)	22,24	26,3
R _{free} (%)	24,53	31,58
B-Faktor (Å ²) über alles	16,8	24,7
B-Faktor (Å ²) Seitenketten	18,6	26,0
Standardabweichungen vom Idealwert		
Bindungslängen (Å)	0,003	0,005
Bindungswinkel (°)	1,11	1,26
Reste (ohne Gly) in der bevorzugten Region des Ramachandran Plots (%)	90,8	87,1
Reste in der erlaubten Region des Ramachandran Plots (%)	9,2	12,9

4 Diskussion

Antikörper finden seit circa zwanzig Jahren in vielen Bereichen der Wissenschaft ihre Anwendung. So werden sie sowohl in der klinischen Diagnostik als auch in Forschungslabors routinemäßig als Detektions- und Forschungsreagenz eingesetzt. Ein weiteres, neueres Anwendungsgebiet, ist die therapeutische Nutzung von Antikörpern. Mittlerweile sind mehrere Antikörper, oder auf ihnen basierende Präparate durch die „*Food and Drug Administration*“ (FDA, Rockville, MD, USA) als Medikamente zugelassen wurden (Hudson & Souriau, 2003). Als Beispiel sei hier Rituxan[®], der erste zugelassene, rekombinante Antikörper erwähnt (1997, Genentech, San Fransisco, USA). Die Notwendigkeit der Optimierung von Antikörpern und Antikörperfragmenten im Hinblick auf kostengünstige Herstellung und Stabilität ist unumstritten. Ein möglicher Lösungsansatz ist die Entwicklung von alternativen *scaffolds*. Dabei könnten die etablierten Methoden der *in vitro* Selektion von Antikörpern auch bei ihren *pendants* Anwendung finden.

Das in dieser Arbeit verwendete alternative Protein-*scaffold*, γ -Kristallin, stellt dabei einen völlig neuartigen Ansatz gegenüber bisherigen Arbeiten dar. So werden im γ -Kristallin *de novo* Bindungseigenschaften erzeugt, das heißt, in einem Strukturprotein wird durch Randomisierung von lösungsmittelzugänglichen Aminosäuren eine vorher nicht vorhandene spezifische Bindungsaktivität erzeugt. Auch die Verwendung einer eher rigiden und planaren β -Faltblattstruktur als Bindungsstelle, anstatt der bei Antikörpern und anderen alternativen *scaffolds* üblichen *loops* oder Helixstrukturen, ist bei diesem *scaffold* erstmals getestet worden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung dieses *scaffolds* als alternatives Bindemolekül für Protein *targets* und die mögliche Anwendung der AffilinTM-Varianten erfolgreich untersucht.

4.1 Isolierung von Immunglobulin bindenden AffilinTM-Varianten

4.1.1 Vergleich der γ -Kristallin Bibliotheken mit anderen Bibliotheken

Die Selektion stellt den ersten und entscheidenden Schritt zur Isolierung von Bindemolekülen dar. Dabei sind Qualität und Quantität der Bibliothek zu Beginn des *panning*-Prozesses entscheidende Kriterien. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit einer größeren und qualitativ besseren Bibliothek auch qualitativ bessere Bindemoleküle isoliert werden können. So zeigte die Bibliothek GCUC1 mit bovinem Ursprung und einer Größe von 10^5

unabhängigen Varianten nach dem Selektionsprozess gegen IgG-Fc viele Varianten mit *frame shift*, das bedeutet, dass sich zusätzliche Insertionen oder Deletionen in ihrer DNA-Sequenz befinden. Nichts desto trotz konnte bei der Variante Mu6D aus dieser Selektion, nach Substitution des Stop Codons, eine Dissoziationskonstante von 10^{-5} M für die Bindung an IgG-Fc bestimmt werden (s. 3.1.2, S. 45). Die Bindung erwies sich darüber hinaus als Immunglobulin spezifisch, da nur IgG-Fc, nicht aber IgM-Fc bzw. BSA gebunden wurden.

Dagegen war die Selektion mit der qualitativ viel hochwertigeren, humanen γ -Kristallin Bibliothek CR20, die 5×10^8 verschiedenen Varianten enthielt, erfolgreicher. Die hohe Qualität der Bibliothek wurde bei der stichprobenartigen Überprüfung der Ausgangsbibliothek gezeigt. Über 80 % der sequenzierten Varianten besitzen eine korrekte Sequenz, ohne zusätzliche Insertion, Deletion oder Mutation neben den acht randomisierten Positionen. Die Verteilung der Nukleotide A, C, G, T in den variablen Positionen ist annähernd gleich. Auch nach mehreren verschiedenen *panning*-Runden mit unterschiedlicher Stringenz der Waschschritte wurden keine Varianten mit *frame shift* angereichert. Aus der ersten Selektion der Bibliothek CR20 konnten IgG-Fc bindende AffilinTM-Varianten mit Dissoziationskonstanten im Bereich von 10^{-7} M isoliert werden.

Es lässt sich feststellen, dass man aus der 1000fach komplexeren und hochwertigeren, humanen Bibliothek CR20 Varianten isolieren konnte, bei denen die Affinität um den Faktor 100 gesteigert war. Allerdings konnte bei diesen Varianten nur eine Spezifität gegenüber Immunglobulinen nachgewiesen werden, was bedeutet, dass die Varianten eine Affinität gegenüber IgG, IgM und IgA nicht aber gegenüber BSA zeigten. Nur die Variante SPC-1-A1 diskriminierte IgA in ihrer Bindungsaffinität (s. 3.2.2, S. 51).

Die Affinitäten der isolierten AffilinTM-Varianten entsprechen den Dissoziationskonstanten von Varianten anderer *scaffolds* bzw. Antikörperfragmenten aus *Phage Display* bzw. *Surface Display* Bibliotheken vergleichbarer Größe. Die Anticalin[®] *Phage Display* Bibliothek, beruhend auf dem *scaffold* eines Lipocalins hat eine der humanen γ -Kristallin Bibliothek CR20 analoge Größe von 3×10^8 Varianten. Aus dieser Anticalin[®] Bibliothek wurden drei Varianten isoliert, von denen Dissoziationskonstanten gegen das Zielmolekül Fluorescein im Bereich zwischen 55 und 536 nM bestimmt wurden (Beste *et al.*, 1999).

Nord *et al.* (1997) beschreiben ebenfalls eine *Phage Display* Bibliothek, bestehend aus 4×10^7 Varianten der Protein Z Domäne des IgG-bindenden Protein A von *Staphylococcus aureus*. Diese Bibliothek, in der 13 Positionen in zwei α -Helices randomisiert sind, wurde gegen drei verschiedene Targets auf hoch affine und spezifische Bindemoleküle durchsucht. Es wurden sowohl gegen *Taq*-Polymerase, humanes Insulin als auch gegen das

Apolipoprotein A-1 Protein Z Varianten mit Dissoziationskonstanten zwischen 2 und 30 μM isoliert. Auffällig waren dabei in allen Varianten sehr schnelle k_{on} und k_{off} -Raten, wie sie auch für die IgG-Fc bindenden AffilinTM-Varianten beobachtet wurden (s. Abb. 13, S. 52).

Das *Phage Display* System wurde ebenfalls zum *screening* von Peptid-Bibliotheken auf Bindung an verschiedene *target* Moleküle genutzt. So beschrieben z. B. Landon *et al.* (2003) das *screening* einer Peptid-Bibliothek gegen das Thomsen-Friedenreich Antigen, das auf vielen Krebszellen, insbesondere auf metastasierenden Zellen exponiert ist. Im Ergebnis konnten lösliche Peptide mit Dissoziationskonstanten um 60 nM isoliert werden.

Für Antikörperfragmente gibt es eine große Vielfalt an *Phage Display* Bibliotheken. So sind ca. 30 % aller derzeit in klinischen Phasen getesteten Antikörper ursprünglich mit Hilfe des *Phage Displays* isoliert wurden (Kretzschmar & von Ruden, 2002). Als Beispiel sei hier ein humaner monoklonaler Antikörper gegen den Insulin-like Wachstumsfaktor I Rezeptor erwähnt (Burtrum *et al.*, 2003). Er wurde aus einer 3×10^{10} großen F_{ab} Bibliothek mit einer Dissoziationskonstanten von 4×10^{-11} M erhalten. Ein weiteres Beispiel ist die Isolierung eines scFv Antikörperfragmentes gegen das Hepatitis B Antigen PreS1, welches von Zhang *et al.* (2004) beschrieben wurde. Aus einer 7×10^8 großen Bibliothek wurde ein scFv Fragment mit einer Dissoziationskonstante im Bereich von 10^{-7} - 10^{-8} M selektiert.

Die *Human Combinatorial Antibody Library* (HuCAL[®]), ein Beispiel für eine kommerziell vermarktete *Phage Display* Bibliothek, beruht mit einer Größe von 2×10^9 Varianten auf *single chain* Antikörper Fragmenten (Knappik *et al.*, 2000). Eine Weiterentwicklung ist die HuCAL Gold[®] Bibliothek, eine voll synthetisch erzeugte Antikörper Bibliothek, mit $1,6 \times 10^{10}$ F_{ab} Varianten. Bei dieser Bibliothek wird eine Abwandlung des *Phage Displays* zur Selektionierung eingesetzt. Beim so genannten CysDisplayTM wird das Antikörperfragment nicht wie beim *Phage Display* genetisch mit dem Phagenhüllprotein PIII fusioniert, sondern nach separater Expression im Periplasma über eine Disulfidbrücke gekoppelt (Lohning, 2004). Die HuCAL Gold[®] Bibliothek wurde auf F_{ab} -Fragmente mit Bindung an den humanen Fibrioblasten Wachstumsfaktor-Rezeptor 3 durchsucht und es konnten F_{ab} -Fragmente mit Dissoziationskonstanten von 1,5 bis 37 nM isoliert werden (Rauchenberger *et al.*, 2003).

Eine dem *Phage Display* ähnliche Methode ist das *Surface Display* mit Bakterien oder Hefen (Samuelson *et al.*, 2002). Bei dieser Methode erfolgt die Präsentation der Proteine der entsprechenden Bibliothek nicht auf der Oberfläche von Phagen, sondern auf der Oberfläche von *Gram*-positiven oder *Gram*-negativen Bakterien bzw. Hefen. Das *Surface Display* unterliegt aber den gleichen Limitationen durch Transformation und *in vivo* Expression wie das *Phage Display*. Charbit *et al.* (1986) beschrieben erstmals das *Cell Surface Display* als

Selektionsmethode in *E. coli*. Später wurde es durch das *Phage Display* als bevorzugte Selektionsmethode abgelöst. Erst durch die Möglichkeit der Selektionierung durch *Flow Cytometry* erfuhr das *Cell Surface Display* neue Impulse.

So konnten Boder *et al.* (2000) durch Kombination beider Methoden ein scFv Antikörperfragment mit einer Dissoziationskonstanten von 48 fM gegen Fluorescein isolieren. Ausgangspunkt für die Generierung einer 10^5 - 10^7 Varianten umfassenden scFv Bibliothek in Hefe war ein *single chain* Antikörper mit einer Dissoziationskonstante von 700 pM.

Mit einer Bibliothek von 10^9 scFv Varianten in *Saccharomyces cerevisiae* konnten Feldhaus *et al.* (2003) Antikörperfragmente gegen verschiedene Targets im Bereich von 3 bis 116 nM durch *Surface Display* in Kombination mit *Flow Cytometry* isolieren.

4.1.2 Einfluss der Bibliothek auf die Qualität der Bindemoleküle

Bei der Nutzung des *Phage Display* Systems zur Selektion der humanen γ -Kristallin Bibliothek CR20 zeigte sich ein methodisches Problem. Sowohl bei der Selektion gegen IgG-Fc als auch gegen IgM-Fc wurden in der dritten *panning*-Runde zu über 50 % Varianten angereichert, die ein oder zwei *amber* Stop Codons in den variablen Positionen besaßen. Die Tatsache, dass keine anderen Stop Codons auftraten, spricht für die Qualität der Bibliothek, da mit dem Einbau der Codons NNK in den variablen Positionen ein Einbau von TGA und TAA ausgeschlossen werden sollte. Die Anreicherung von Varianten mit einem *amber* Stop Codon scheint aber ein systematisches Phänomen zu sein, da diese Varianten weder eine gesteigerte Affinität noch eine gesteigerte Spezifität zeigten. Dies wurde durch die Analyse der Dissoziationskonstanten der Variante SPC-1-F1, die zu über 50 % in der Selektion gegen IgG-Fc bzw. IgM-Fc angereichert wurde, und dann einer Substitution der beiden *amber* Stop Codons in den Positionen 15 und 38 durch Glutamin unterzogen wurden, nachgewiesen (s. 3.3.2). Möglicherweise ist das periplasmatisch exprimierte Fusionsprotein aus AffilinTM-Variante und Phagenhüllprotein für *E. coli* toxisch oder wachstumshemmend. Da die *amber* Stop Suppression für den *E. coli* Stamm XL1 mit nur 10 % beschrieben ist (Miller & Albertini, 1983), würde das *amber* Stop Codon eine um 90 % verringerte Expressionsrate bewirken und damit besäßen solche *E. coli* Klone ein Wachstumsvorteil.

Beim *screening* der Anticalin[®] *Phage Display* Bibliothek zeigte sich überraschenderweise auch bei einer der drei Fluorescein bindenden Varianten ein *amber* Stop Codon, das durch die beschriebene Suppression als Glutamin translatiert wurde (Beste *et al.*, 1999). Dies könnte ein weiterer Hinweis auf das Problem eines toxischen Produktes beim *Phage Display* bzw. bei

der *in vivo* Expression des Fusionsproteins, wie auch bei der γ -Kristallin Bibliothek vermutet, sein.

Die zahlreichen Daten aus der Literatur deuten daraufhin, dass man mit einer größeren Bibliothek auch höher affine Bindemoleküle isolieren kann (Ling, 2003). Beim System der *Phage Display* Selektion ist die Bibliothek allerdings nicht beliebig vergrößerbar und man stößt an eine Grenze der repräsentierten Vielfalt der Varianten (Amstutz *et al.*, 2001; Skerra, 2003). Beim *Phage Display* System liegt die Bibliothek der Bindemoleküle als Fusion mit dem Phagenhüllprotein PIII im Phagemid-Vektor in einem *E. coli* Stamm vor. Dieser Phagemid-Vektor wird durch Transformation in diesen Stamm eingeschleust. Die Limitation beim *Phage Display* System stellt also die Transformation des Vektors dar, die in der Regel auf eine Effizienz von 10^{10} Transformanden beschränkt ist (Jacobs *et al.*, 1990). Eine Erhöhung der Anzahl der randomisierten Positionen würde zwar theoretisch zu einer größeren Komplexität der Bibliotheken führen, kann praktisch jedoch nicht durch das *Phage Display* System dargestellt werden. So stellen acht randomisierte Positionen, wie hier in der humanen γ -Kristallin Bibliothek verwendet, mit einer theoretischen Komplexität von 2×10^{10} die praktisch realisierbare Grenze dar.

Ein weiterer kritischer Punkt für die Qualität der Bindemoleküle ist die Synthese des *scaffold Gen-pools*. Für die Synthese des *Gen-pools* durch verschiedene Methoden, wie PCR oder Primer *assembly*, werden Oligonukleotide verwendet. Bei der Herstellung der Oligonukleotide, vor allem ab einer Größe von über 50 bp, treten Fehler in Form von Deletionen in der Nukleotid-Abfolge auf, was zu *frame shifts* dieser Varianten führt. Mit Hilfe der Trinukleotidsynthese können diese *frame shifts*, durch den Einbau vollständiger Triplet-Codons bei der Synthese der Oligonukleotide, ausgeschlossen (Virnekas *et al.*, 1994) und damit die Qualität der Bibliothek erhöht werden.

4.1.3 Möglichkeiten zur Erhöhung der Affinität von Bindemolekülen

Ist es das Ziel, hoch affine Bindemoleküle zu isolieren, scheint es notwendig, die theoretische Komplexität voll auszuschöpfen bzw. sehr große Bibliotheken zu generieren. Dafür gibt es verschiedene experimentelle Ansätze. Eine Möglichkeit wäre die Anwendung eines *screening* Systems, mit dem Bibliotheken mit mehr als 10^{10} Varianten durchsucht werden könnten. Dieses *screening* System sollte die genannten Nachteile, wie Limitation der Größe der Bibliothek und toxischer Effekte des Bindemoleküls bei der Anzucht des Wirts-Stammes

umgehen. In der Tat existieren *screening*-Systeme, die diese Nachteile nicht aufweisen. So können mit den sich ähnelnden *in vitro* Systemen *Ribosomal Display* und *mRNA Display* Bibliotheken mit bis zu 10^{14} unabhängigen Varianten bearbeitet werden.

Das *Ribosomal Display* wurde erstmals von Mattheakis *et al.* (1994) für das *screening* von Peptid-Bibliotheken beschrieben. Später konnte diese Methode durch Hanes & Pluckthun, (1997) auch für das *Display* von Proteinen etabliert werden.

Von Cho *et al.* (2000) wurde eine Methode beschrieben, die eine qualitative Vorselektionierung der erzeugten Bibliotheken ermöglicht. Die generierten Bibliotheken werden dafür mit einem C- und einem N-terminalen Affinitäts-*tag* exprimiert. Im nächsten Schritt werden nur die Varianten isoliert, die sowohl C- als auch N-terminal mit dem Affinitäts-*tag* exprimiert wurden. Varianten mit *frame shifts* können damit ausgeschlossen werden und im anschließenden *panning*-Prozess werden nur Varianten mit vollständig exprimierter Aminosäuresequenz eingesetzt. Mit so einer vorselektionierten Bibliothek, bestehend aus Peptiden mit α -helicalen und β -Strang Strukturelementen, konnten Wilson *et al.* (2001) mit Hilfe des *Ribosomal Display* Peptide mit Dissoziationskonstanten von 5 nM gegen Streptavidin isolieren. Mit einer Bibliothek von Peptiden auf der Grundlage des *Phage Displays* konnte dagegen nur Varianten mit Affinitäten im mikromolaren Bereich isoliert werden (Schmidt *et al.*, 1996). Ausgehend von der bereits beschriebenen HuCAL[®] scFv Bibliothek wurden mit Hilfe des *Ribosomal Display* Antikörper Fragmente gegen bovines Insulin mit Dissoziationskonstanten um 82 pM isoliert (Hanes *et al.*, 2000).

Die zweite bereits erwähnte, dem *Ribosomal Display* ähnliche Methode ist das *mRNA Display* (Roberts & Szostak, 1997). Dabei wird nicht wie beim *Ribosomal Display* ein mRNA-Ribosom-Protein Komplex für den *panning*-Prozess eingesetzt, sondern zuerst ein Teil der zu translatierenden mRNA mit komplementärer cDNA ligiert. An das 5' Ende der cDNA ist ein *crosslinker*, wie z. B. Pyromycin fusioniert. Mit Hilfe dieses *crosslinkers* wird nach der Translation der cDNA-mRNA-Komplex an die nascierende Proteinkette gekoppelt. Für den *panning*-Prozess wird der cDNA-mRNA-Protein Komplex ohne Ribosom eingesetzt.

Eine robustere Methode ist durch Kurz *et al.* (2001) beschrieben wurden. Nach der Translation und Kopplung durch den *crosslinker* wird die mRNA in cDNA umgeschrieben und so für den *panning*-Prozess ein cDNA-Protein Komplex eingesetzt. Anwendung fand die Methode beim *screening* einer Protein-*scaffold* Bibliothek, auf der Grundlage der humanen Fibronectin III Domäne (Koide *et al.*, 1998). Ausgehend von dieser Bibliothek mit 10^{12} Varianten wurden nach zehn Selektionsrunden mittels *mRNA Display* Fibronectin-Varianten gegen TNF- α mit Dissoziationskonstanten zwischen 1 und 24 nM isoliert (Xu *et al.*, 2002).

Eine weitere Möglichkeit der Generierung höher affiner Bindemoleküle ist eine Affinitätsmaturierung (Hudson & Souriau, 2001; Amstutz *et al.*, 2001; Ladner & Ley, 2001). Ähnlich der Reifung von Antikörpern im Immunsystem kann man die Komplexität der Ausgangsbank theoretisch erhöhen, indem auf Basis der isolierten Bindemoleküle aus der Selektion der Ausgangsbank neue Bibliotheken generiert werden. Durch die verschiedenen Methoden der Affinitätsmaturierung konnte die Affinität von Bindemolekülen in vielen Fällen verbessert werden (Marks, 2004; Fujii, 2004; <http://www.morphosys.de>).

So wurde für ein Anticalin[®], das aufgrund seiner Bindung gegen Digoxigenin isoliert wurde, eine Art CDR-*walking* angewendet. Bei dieser, für Antikörper üblichen Methode, wird von der isolierten Variante ein *loop* erneut randomisiert, während die anderen potentiell variablen Bereiche unverändert bleiben. Damit konnte die Affinität des Anticalins[®] DigA16 um den Faktor 10 von 295 auf 30 nM gesteigert werden (Schlehuber *et al.*, 2000). Ein anderes Beispiel ist ein gegen die *Taq*-Polymerase isolierter Affibody[®] (Nord *et al.*, 1997). Als Maturierungsmethode wurde ein *Helix-shuffling*, dem beschriebenen CDR-*walking* vergleichbar, angewendet, wobei auch hier nur eine der ursprünglich zwei variierten Helices für die Generierung einer neuen Bibliothek erneut randomisiert wurde. Dadurch konnte ein Affibody[®] mit einer Affinität von 30-50 nM isoliert werden, das bedeutet, dass die Affinität um den Faktor 40 gesteigert wurde (Gunneriusson *et al.*, 1999).

Durch die Kombination von *error prone* PCR und DNA-*shuffling* wurde auf der Basis eines Fluorescein bindenden scFv Fragmentes eine neue scFv Bibliothek in Hefe erzeugt (Boder *et al.*, 2000). Aus dieser Bibliothek konnte eine Variante mit einer Steigerung der Affinität um den Faktor 10000 von 700 pM auf 48 fM isoliert werden. Eine Affinitätsmaturierung mittels *error prone* PCR führten auch Xu *et al.* (2002), ausgehend von einer gegen TNF- α isolierten Variante des Fibronectin *scaffold*, durch. Mit einer Fehlerrate der PCR-Reaktion von bis zu 4,8 % wurden neue Varianten generiert, die eine Steigerung der Affinität um den Faktor 50, von 1 nM auf 20 pM, zeigten.

Die Dissoziationskonstanten, die bei der Isolierung von Affilin[™]-Varianten gegen IgG-Fc im Bereich von 10^{-7} M nachgewiesen wurden, sind vergleichbar zu anderen Bindemolekülen, die aus *Phage Display* Bibliotheken mit vergleichbarer Größe erhalten wurden. Eine Erhöhung der Affinität könnte durch die beschriebenen, verschiedenen Methoden der Affinitätsmaturierung erhalten werden. Eine weitere Möglichkeit besteht sicher in der Vergrößerung der Komplexität der Bibliothek und die Anwendung optimierter *display*-Systeme für die Selektion. Dies könnte ebenfalls eine Steigerung der Affinität von Affilin[™]-Varianten herbeiführen.

4.2 Vergleich der Stabilität von AffilinTM-Varianten

4.2.1 Experimentell ermittelte Stabilitäten von AffilinTM im Vergleich mit anderen Bindemolekülen

Das im Rahmen dieser Arbeit gewählte *scaffold*, γ -Kristallin, besitzt gegenüber Antikörpern klare Vorteile in Bezug auf die kostengünstige, rekombinante Herstellung in *E. coli* und gegenüber Antikörperfragmenten besteht zusätzlich der Vorteil der hohen Stabilität. Diese Vorteile sollten auch die isolierten AffilinTM-Varianten aufweisen. Um die Stabilität der einzelnen AffilinTM-Varianten mit der des humanen γ -Kristallin WT zu vergleichen, wurden verschiedene Methoden gewählt. Durch die Experimente zur Bestimmung der Stabilität sollten außerdem die stabilsten AffilinTM-Varianten identifiziert werden, denn nur diese sollten für weiterführende Kopplungsversuche eingesetzt werden. Die ermittelten Stabilitäten sollten dabei die Auswahl erleichtern. Mit Hilfe der bestimmten Stabilitäten sollte eine grundlegende Aussage über die Anwendbarkeit der AffilinTM-Varianten für verschiedene Applikationen getroffen werden. Darüber hinaus ist die Stabilität neben der Affinität ein wichtiges Kriterium für den Vergleich der unterschiedlichen *scaffolds*.

Ein Vergleich der Stabilität von Proteinen wird in der Regel anhand der berechneten ΔG -Werte vorgenommen. Zur Berechnung dieser ΔG -Werte benötigt man reversible Entfaltungsübergänge. Wie schon vom gut charakterisierten bovinem γ -Kristallin bekannt (Mayr *et al.*, 1997; Palme *et al.*, 1997), neigten auch der humane γ -Kristallin WT und die AffilinTM-Varianten bei der thermisch und chemisch induzierten Entfaltung bzw. der Rückfaltung des denaturierten Proteins zur Aggregation. Daher war die Berechnung von ΔG -Werten für die untersuchten Proteine nicht möglich und die Entfaltung konnte nur qualitativ betrachtet werden.

Bei der thermischen Entfaltung, gemessen mit Hilfe der *Differential Scanning Calometry*, zeigte die Variante SPC-1-A1 einen Übergangsmittelpunkt von 56°C, die Variante SPC-1-A7 von 72°C und der humane γ -Kristallin WT von ca. 80°C. Die untersuchten AffilinTM-Varianten sind also gegenüber dem Wildtyp in unterschiedlichen Maße destabilisiert. Andere alternative *scaffolds* zeigen ebenfalls nur eine teilweise Rückfaltung nach der thermischen Entfaltung. So haben Ankyrin-Varianten mit zwei bis vier *repeats* einen Übergangsmittelpunkt von 66°C bis oberhalb 85°C und werden nur teilweise rückgefaltet (Binz *et al.*, 2003). Anticalin[®]-Varianten zeigen interessanter Weise eine höhere Stabilität gegenüber Temperatur als ihr rekombinat hergestellter WT (Schlehuber & Skerra, 2002). Die Autoren konnten durch Messung des CD-

Signals bei 212 nm nach Aufheizen der Proteinlösung auf 80°C und anschließender Abkühlung, bei 20°C noch eine Signalintensität von 90 % messen. Als Übergangsmittelpunkte wurden für das Bilin Bindeprotein aus *Pieris brassicae* (WT) 61,3°C und für das Digoxigenin bindende Anticalin[®] DigA 72,8°C bestimmt. Affibodies[®] zeigen hingegen eine starke Verringerung der thermischen Stabilität gegenüber ihrem WT (Wahlberg *et al.*, 2003). So zeigte eine gegen Protein A isolierte Affibody[®]-Variante einen Übergangsmittelpunkt bei ca. 40°C verglichen mit 75°C bei der Protein Z Domäne (WT).

Antikörper oder Antikörperfragmente zeigen in der Regel ebenfalls irreversible thermische Entfaltung. So konnten für scFv-Fragmente Übergangsmittelpunkte von 43°C bis 61°C bestimmt werden (Orr *et al.*, 2003). Ein scFv-Fragment, das durch *Phage Display* auf höhere Stabilität selektioniert wurde, zeigte einen Übergangsmittelpunkt von 66,2°C. Antikörper aus Kamelen oder Lamas, so genannte *camelid* V_{HH} bzw. *single domain antibodies* zeigen aufgrund ihrer Architektur reversible thermische Entfaltung. Ewert *et al.* (2002) bestimmten deren Übergangsmittelpunkte, vergleichbar zu scFv und einzelnen Antikörperdomänen (V_{H3}) mit 63°C.

Auch die chemisch induzierte Rückfaltung von Affilin[™]-Varianten durch GdmHCl war in Lösung nicht vollständig reversibel. So zeigten alle getesteten Affilin[™]-Varianten und der humane γ -Kristallin WT bei der Rückfaltung des vollständig denaturierten Proteins unterhalb von 2 M GdmHCl Aggregation. Insofern können auch hier nur die Übergangsmittelpunkte der Entfaltung mit anderen Bindemolekülen verglichen werden. Die Variante SPC-1-A7 und der humane γ -Kristallin WT zeigten ähnliche Übergänge mit Mittelpunkten von 2,7 M GdmHCl. Die anderen beiden Varianten SPC-1-A1 und SPC-1-G3 waren gegenüber dem humanen γ -Kristallin WT destabilisiert und zeigten bei der Entfaltung Übergänge bei 1,9 bzw. 1,7 M GdmHCl.

Andere Protein-*scaffolds*, deren Varianten bzw. Antikörperfragmente zeigten vollständig reversible, durch GdmHCl induzierte Übergänge, die nach Pace & Scholtz (1997) ausgewertet werden konnten.

Von isolierten Ankyrin-Varianten, ohne Selektion auf Bindungseigenschaften, mit zwei bis vier *repeats* (s. Kap 1.2) wurde Übergangsmittelpunkte von 2,8 bis 5,1 M gemessen (Kohl *et al.*, 2003). Dabei scheint es aber keine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der *repeats* und der Stabilität gegenüber GdmHCl zu geben. Das Design von Bindemolekülen auf der Grundlage der Fibronectin III Domäne führte zu einer hohen Instabilisierung. So zeigte eine Ubiquitin bindende Fibronectin-Variante bei pH 7,5 einen Übergang bei 2,2 M GdmHCl gegenüber dem der WT Domäne bei 4,6 M (Koide *et al.*, 1998). Darüber hinaus kam es zu

dem Phänomen, dass sowohl der WT als auch eine Variante bei einem pH-Wert von 3,3 eine weitaus höhere Stabilität gegenüber GdmHCl aufwiesen. So beschreiben die Autoren bei diesem pH-Wert für die WT-Domäne ein Übergangsmittelpunkt von 5,6 M und für die Variante von 3,1 M GdmHCl. Eine durch Bindung an Digoxigenin isolierte Anticalin[®] Variante DigA16 zeigte bei einer GdmHCl-Konzentration von 1,8 M ihren Übergangsmittelpunkt (Schlehuber & Skerra, 2002). ScFv Antikörperfragmente, V_H-Domänen und auch *camelid* V_{HH} zeigten zu Affilin[™]-Varianten vergleichbare Übergänge im Bereich von 1,5 bis 3 M GdmHCl (Jung *et al.*, 1999; Ewert *et al.*, 2002).

Die in dieser Arbeit untersuchten Affilin[™]-Varianten zeigten zwar in Lösung keine reversible Rückfaltung nach thermischer oder chemischer Denaturierung, haben aber durchaus vergleichbare Übergangsmittelpunkte zu anderen alternativen *scaffolds* bzw. Antikörperfragmenten. Nach chemischer Kopplung an eine Matrix ließ sich überraschenderweise eine reversible Rückfaltung von Affilin[™]-Varianten nach Denaturierung in GdmHCl mit Hilfe von Biacore-Experimenten nachweisen (persönliche Mitteilung, Erik Fiedler, Scil Proteins GmbH, Halle).

Eine überragende Stabilität zeigten die Affilin[™]-Varianten über den gesamten getesteten pH-Bereich. Anhand der Daten kann man selbst nach 48 h Inkubation bei pH 1,5 bis 12,5 von vollständig nativen Proteinen ausgehen. Für Antikörper bzw. deren Fragmente oder andere alternative *scaffolds* finden sich in der Literatur kaum Daten über deren pH-Stabilität im sehr sauren bzw. alkalischen Bereich. Für Antikörper wurde allenfalls deren Stabilität bei physiologischen pH-Werten in Form von Serumstabilität oder Untersuchungen zur *Clearance* (s. u.) für eine entsprechende Applikation im Menschen getestet. Die einzigen verfügbaren Daten anderer Protein-*scaffolds* wurden für einige Affibodies[®] nach deren Inkubation für 3 h mit 0,5 M NaOH (pH 13,7) beschrieben (Linhult *et al.*, 2003). Alle getesteten Proteine zeigten dabei einen deutlichen Abbau bzw. Hydrolyse. Affilin[™]-Varianten wurden nur bis zu einem pH-Wert von 12,5 getestet und sind daher nicht mit diesen Daten vergleichbar.

Weitere wichtige Kriterien im Hinblick auf eine spätere Anwendung sind die Serumstabilität und Untersuchungen zur *Clearance*. Die getesteten Affilin[™]-Varianten werden hier nur mit Antikörperfragmenten verglichen, da für alternative Protein-*scaffolds* bisher keine Daten verfügbar sind. Die Serumstabilität wird *in vitro* getestet und gibt Auskunft über die Resistenz des untersuchten Proteins gegenüber Serumproteasen. Die getestete Variante SPC-1-A7, die sich in vorherigen Untersuchungen als die Variante mit der höchsten Stabilität erwies (s. o.), wurde im Serum nach verschiedenen Zeiten mittels ELISA nachgewiesen. Ein Nachweis der

Funktionalität, das heißt der Bindung an IgG-Fc, konnte nicht geprüft werden, da die Variante an den Fc-Teil der Immunglobuline im Serum bindet.

Die Variante SPC-1-A7 ließ sich 6 h ohne signifikante Abnahme des Messsignals nachweisen. Erst nach 6 h setzte eine Abnahme des Signals und damit eine Degradation des Proteins ein. Es ließ sich bei 37°C eine Halbwertszeit von über 26 h bestimmen.

Dagegen zeigte ein auf Stabilität optimiertes scFv Antikörperfragment eine Serumhalbwertszeit unter 20 h (Willuda *et al.*, 2001). Eine sehr hohe Serumstabilität zeigten aufgrund ihrer Architektur so genannte Spiegelmere. Diese, auf RNA in der L-Konformation beruhende Bindemoleküle, haben kein natürliches Vorkommen, weshalb sie durch RNasen nicht erkannt werden. Bei einem Spiegelmer mit einer Bindung gegenüber D-Adenosin im μM Bereich ist auch nach 60 h Inkubation in Serum bei 37°C keine signifikante Abnahme der eingesetzten Konzentration zu erkennen (Klussmann *et al.*, 1996).

Mit Hilfe von Untersuchungen zur *Clearance* kann man Aussagen zur *in vivo* Verfügbarkeit im Serum treffen. Der ermittelte Wert wird dabei von mehreren Faktoren beeinflusst. Eine Rolle spielen die Degradation durch Proteasen, die Penetration in umliegendes Gewebe und die Aufnahme bzw. die Funktion in der Leber des getesteten Organismus. Um eine allgemeine Aussage treffen zu können, wurden der humane γ -Kristallin WT und die pro-NGF bindende AffilinTM-Variante SPC-7-E9 eingesetzt. Der Einsatz einer IgG-Fc-bindenden Variante hätte wahrscheinlich das Ergebnis durch die Bildung eines IgG-AffilinTM Komplexes, und dem damit verbundenen Proteaseschutz bzw. der Vergrößerung des Molekulargewichtes, verfälscht.

Für die Variante SPC-7-E9 und den humanen γ -Kristallin WT wurden *in vivo* Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) von 10 bzw. 5 min bestimmt. Bei einer Größe von 22 kDa stehen diese Werte der AffilinTM im Einklang mit scFv-Antikörperfragmenten mit einer Größe von 27 kDa und deren Halbwertszeiten von 2,8 bzw. 7 min (Pietersz *et al.*, 1998; Willuda *et al.*, 1999).

Dagegen zeigte ein F_{ab}-Antikörperfragment mit einer Größe von 50 kDa eine *in vivo* Halbwertszeit von 30 min (Pavlinkova *et al.*, 1999). Antikörper, mit einer Größe von 150 kDa, haben in der Regel viel höhere Halbwertszeiten. Sie bewegen sich in einem Bereich zwischen 20 und 30 Tagen. Epratuzumab[®], ein humanisierter anti-CD22 Antikörper der zur Zeit in einer Phase I/II bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphoma getestet wird, besitzt eine *in vivo* Halbwertszeit von ca. 23 Tagen (Leonard *et al.*, 2003).

Man kann feststellen, dass die *in vitro* Serumstabilität des getesteten AffilinTM mehr als ausreichend für eine diagnostische Anwendung ist. Die *in vivo* Halbwertszeiten der Clearance sind aufgrund der geringen Größe der AffilinTM-Varianten entsprechend gering.

Ein entscheidender Vorteil eines alternativen *scaffolds* sollte unter anderem die Stabilität im Cytoplasma von *E. coli* und damit eine kostengünstige Herstellung sein. Dies bedeutet, dass hohe Expressionsraten bei der rekombinanten Proteinherstellung erreicht werden müssen. AffilinTM-Varianten konnten vorwiegend löslich, cytosolisch in *E. coli* überexprimiert werden. Ohne Optimierung wurden die AffilinTM-Varianten SPC-1-A1, SPC-1-A7 und SPC-1-G3 im 10 l Maßstab fermentiert und anschließend über zwei Chromatographieschritte mit einer Reinheit von 95 % isoliert. In diesen ersten Experimenten ergab sich eine Ausbeute von bis zu ca. 200 mg Protein vor Reinigung bzw. 30-100 mg gereinigtem Protein pro Liter Kultur.

Bei den Angaben in der Literatur bezüglich der Proteinherstellung wird nicht immer eindeutig zwischen Expressionsrate und Ausbeute unterschieden. Vergleichbare Ausbeuten oder Expressionsraten finden sich für Ankyrin-Varianten mit bis zu 200 mg/l Schüttelkultur (Binz *et al.*, 2003). Deutlich geringere Ausbeuten zeigen Affibody[®]-Varianten mit 3-10 mg/l (Nord *et al.*, 1997) und 1-3 mg/l für die Fibronectin III Domäne (Xu *et al.*, 2002). Im Vergleich dazu werden scFv Antikörperfragmente mit bis zu 10 mg/l periplasmatisch in *E. coli* (Willuda *et al.*, 1999) oder mit 1-2 mg/l im Baculovirus-System hergestellt (Worn & Pluckthun, 1998). Die geringsten Ausbeuten sind für Anticaline[®] mit 0,1-0,8 mg/l beschrieben (Schlehuber & Skerra, 2002). Anticaline[®] müssen aufgrund der vorhandenen Disulfidbrücken periplasmatisch in *E. coli* exprimiert werden.

AffilinTM-Varianten, genauso wie Ankyrin-Varianten, erfüllen also die Anforderung einer kostengünstigen Proteinherstellung mit hohen Expressionsraten in *E. coli*.

Alle erörterten Parameter zu Stabilitäten bzw. Expressionsraten oder der Clearance sind als Übersicht in Tab. 15 noch einmal zusammengestellt.

Tabelle 15: Übersicht der Stabilität und der Proteinexpression für verschiedene alternative *scaffolds* bzw. Antikörper und deren Fragmente. Die angegebenen Werte für Temperatur und GdmHCl entsprechen den Übergangsmittelpunkten, die Werte für Serum und Clearance entsprechen den Halbwertszeiten.

Parameter	Affilin™	Ankyrin	Anticalin®	Fibronectin	AK, -fragmente
T [°C]	56-80	66-85	61-72	WT 90	43-66
GdmHCl [M]	1,7-2,7	2,8-5,1	1,8	2,2 pH 7,5 3,1 pH 3,3	1,5-3
pH	1,5-12,5	-	-	-	-
Serum [h]	26	-	-	-	< 20 scFv
Clearance	5-10 min	-	-	-	30 min F _{ab} < 30 d AK
Ausbeute [mg/l Kultur]	< 200 * 30-100 * ^s	< 200 *	0,1-0,8 #	1-3 *	< 10 #

* Cytosolische Expression in *E. coli*

Periplasmatische Expression in *E. coli*

^s nach Reinigung

4.2.2 Kraftfeldtheorien zur Bestimmung von theoretischen Stabilitäten

Mit Hilfe von Kraftfeldtheorien können auf der Grundlage von ermittelten Raumstrukturen theoretische Stabilitäten berechnet werden. Die bestimmten Strukturen des humanen γ -Kristallin WT und der Variante SPC-1-G3 dienen dabei als Berechnungsgrundlage. Kraftfeldtheorien betrachten Wechselwirkungen von einzelnen Atomen, wie z. B. van der Waals Wechselwirkungen. In Betracht kommen außerdem Abweichungen von Standard-Bindungslängen und -winkeln. Die für jedes Atom berechneten Werte werden aufsummiert und man erhält eine Gesamtenergie. Diese berechneten Werte sind Absolutwerte, die sich in Abhängigkeit von der eingesetzten Kraftfeldtheorie unterscheiden. Sie sind aber auf keinen Fall mit experimentell bestimmten Stabilitäten oder ΔG -Werten zu vergleichen. Die berechneten potentiellen Energien dienen dem Vergleich von verschiedenen Zuständen eines Proteins oder dem Vergleich verschiedener Varianten eines Proteins.

Zur Berechnung wurde die Kraftfeldtheorie charmm27 eingesetzt (Brunger *et al.*, 1986). Der Unterschied zwischen dem humanen γ -Kristallin WT und der Variante SPC-1-G3 besteht in den Aminosäuresubstitutionen der acht variablen Positionen in der N-terminalen Domäne. Also sollte der experimentell beobachtete Unterschied in den Stabilitäten auf der Veränderung

der N-terminalen Domäne beruhen. Berechnet man nun für die N-terminale Domäne von Aminosäureposition 1-80 die potentielle Gesamtenergie, sieht man einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Proteinen. So ist die N-terminale Domäne des humanen γ -Kristallin WT theoretisch weitaus stabiler als die Variante (Tab. 16).

Der größte Unterschied ist in den van der Waals Wechselwirkungen zu erkennen. Obwohl die acht substituierten Aminosäuren lösungsmittlexponiert sind, haben sie offensichtlich ungünstige Wechselwirkungen mit anderen Aminosäuren bzw. deren Seitenketten. So wird z. B. die stabilisierende Wechselwirkung von zwei aromatischen Seitenketten von Phe11 und Tyr6 beim humanen γ -Kristallin WT bei der AffilinTM-Variante durch die Substitution von Leu6 zerstört (Abb. 46, S. 92). Dadurch wird die Position des *loops* der Aminosäuren 7-12 leicht verändert und das Leu6 nimmt in der Variante zwei stabile Konformationen an, welches anscheinend eine Destabilisierung bewirkt. Die acht variablen Positionen beeinflussen jede für sich die Stabilität des gesamten Proteins. Für eine weiterführende Analyse müssten die gesamten Wechselwirkungen aller acht variablen Positionen im Vergleich zu den Wechselwirkungen der Positionen im humanen γ -Kristallin WT betrachtet werden.

Als zweites wurden die theoretischen Gesamtenergien der C-terminalen Domäne beider Proteine berechnet. Dies sollte als Kontrolle des theoretischen Ansatzes dienen, da die C-terminale Domäne beider Proteine strukturell vollkommen identisch ist. Es wurden für die C-terminale Domäne die Aminosäuren 90-172 betrachtet. Der Linker zwischen den beiden Domänen von Position 81-89 wurde nicht betrachtet, da er nur geringen Einfluss auf die Stabilität haben sollte (Mayr *et al.*, 1994). Die potentiellen Gesamtenergien für die C-terminale Domäne des humanen γ -Kristallin WT und der Variante SPC-1-G3 sind annähernd gleich, wobei die Differenz auf die geringere Datenqualität des Strukturmodells der Variante SPC-1-G3 zurückzuführen ist (s. Tab. 14, S. 95). Der prozentuale Unterschied der Gesamtenergien der beiden betrachteten Proteine ist für die N-terminalen Domäne mit 60 % viel größer als bei der C-terminalen mit 13 %.

Die experimentell nachgewiesene geringere Stabilität der Variante SPC-1-G3 im Vergleich zum humanen γ -Kristallin WT gegenüber verschiedenen Einflüssen wie GdmHCl oder Temperatur lässt sich somit auch theoretisch mit Hilfe von Kraftfeldtheorien nachweisen.

Tabelle 16: Vergleich der theoretischen Stabilitäten, berechnet auf der Grundlage der Raumstruktur der Variante SPC-1-G3 und des humanen γ -Kristallin WT (hyc-WT) mit Hilfe der Kraftfeldtheorie charmm27. In die Berechnungen gingen jeweils die N-terminale Domäne mit den Aminosäuren 1-80 und die C-terminale Domäne mit den Aminosäuren 90-172 ein.

Protein	SPC-1-G3	hyc-WT	SPC-1-G3	hyc-WT
Domäne	N-terminal	N-terminal	C-terminal	C-terminal
	[kcal/mol]	[kcal/mol]	[kcal/mol]	[kcal/mol]
Total Potential Energy	-738,5	-1869,6	-2224,3	-2537,3
	(39,5 %)	(100 %)	(87,6 %)	(100 %)
Bond Stretching	140,3	134,6	153,1	140,9
Angle Bending	216,9	207,8	227,2	221,0
Urey-Bradley	27,4	27,7	31,4	31,2
Improper Dihedral	13,8	12,5	13,8	11,24
Torsion Angle	375,6	369,1	382,1	350,8
Van der Waals	491,8	-121,8	57,8	-170,8
Charge-Charge	-2004,2	-2499,5	-3089,7	-3121,8

4.3 Eigenschaften der potentiellen Bindungsstelle

Über CD-Spektroskopie konnten bereits erste Aussagen über die Beibehaltung der Struktur und Faltung der Varianten getroffen werden. Aber erst durch die Bestimmung der Raumstruktur der Variante SPC-1-G3 und des humanen γ -Kristallin WT erhält man eine genaue Aussage über die Faltung der Proteine. Es wurde ersichtlich, dass durch die Substitution der acht lösungsmittlexponierten Aminosäuren die generelle Struktur bzw. die einzelnen Strukturmodule nicht verändert wurden. Es ist anzunehmen, dass auch die anderen beiden IgG-bindenden Varianten SPC-1-A1 und SPC-1-A7 strukturell dem humanen γ -Kristallin WT sehr ähnlich sind. Die Kokristallisation der IgG-bindenden Varianten mit IgG-Fc war bisher nicht erfolgreich. Mit Hilfe der Raumstruktur des Komplexes könnte man eine Aussage über die Art der Wechselwirkung zwischen dem AffilinTM und dem Target IgG-Fc treffen. Durch die Identifizierung des genauen Bindungssepitops und der Bestimmung der Aminosäuren, die in die Bindung involviert sind, ergäbe sich die Möglichkeit eines rationalen Designs einer AffilinTM-Variante mit verbesserten Bindungseigenschaften. Diese

Variante könnte durch Einbeziehung von weiteren bzw. durch Optimierung der bereits in die Protein-Protein Wechselwirkungen involvierten Aminosäuren eine höhere Affinität und Spezifität erreichen. Das so genannte *structure-based drug design* wurde bereits in der Literatur als ein Ansatz beschrieben, mit dem Liganden oder Rezeptoren in ihrer Wechselwirkung optimiert werden können (Guo & Hobbs, 2003).

Mit Hilfe der berechneten Oberflächen der Proteine lassen sich allerdings auch Vermutungen über die Art der Wechselwirkung anstellen. Es wird aus Abb. 49 ersichtlich, dass sich die geladene und polare Oberfläche des humanen γ -Kristallin WT zu einer ungeladenen eher apolaren Bindungsstelle bei der Variante SPC-1-G3 verändert. Auffällig ist die Seitenkette des Glutamins in der Position 38. Obwohl diese Aminosäureposition sich am Rand der potentiellen Bindungsstelle befindet, ragt die Aminosäureseitenkette aufgrund ihrer Größe fast in den zentralen Bereich der Bindungsregion hinein. Damit ist sie im Bindungszentrum die einzige polare, hydrophile Aminosäure. Für die Bindung an IgG-Fc kann man also eher hydrophobe Wechselwirkungen als Ursache für die Bindung bzw. Affinität annehmen. Es ist aber auch ein Einfluss des Aminosäurerestes Gln38 vorstellbar.

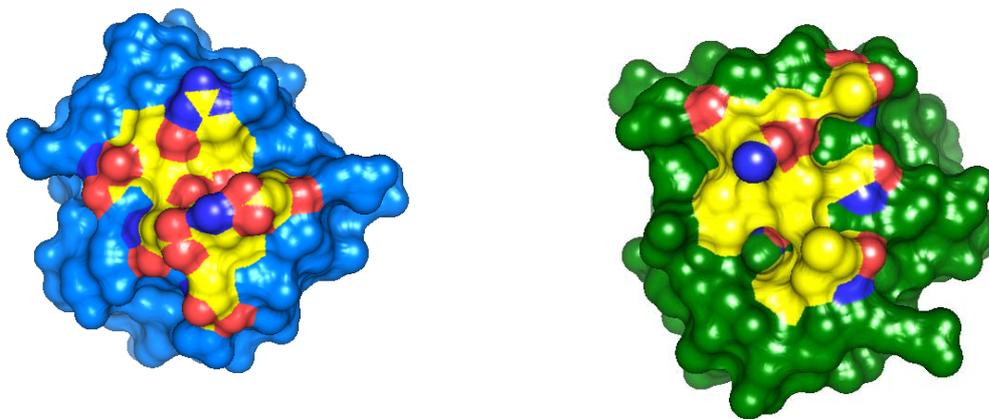


Abbildung 49: Oberflächenmodelle von humanen γ -Kristallin WT (blau) und SPC-1-G3 (grün). Farblich hervorgehoben sind die acht randomisierten Aminosäurepositionen 2, 4, 6, 15, 17, 19, 36, 38. Für die Darstellung der Atome wurde der folgende Farbcode gewählt: C gelb, O rot, N dunkelblau. Die Abb. wurde mit Hilfe des Programms *pymol* (DeLano, 2002) erstellt.

Für die anderen beiden IgG-bindenden Varianten SPC-1-A1 und SPC-1-A7, von denen die Raumstruktur nicht gelöst werden konnte, lassen sich nur Vermutungen über die Wechselwirkungen zum Bindungspartner aufgrund der Aminosäuren in den variablen Positionen anstellen (Tab. 17). Die Variante SPC-1-A1 besitzt einen hohen Anteil an geladenen Aminosäureseitenketten. Dies lässt auf eine vollkommen andere Wechselwirkung mit IgG als bei der Variante SPC-1-G3 und damit auf ein anderes Bindungsepitop schließen.

Die Variante SPC-1-A7 besitzt sowohl apolare als auch polare Aminosäureseitenketten. Interessanterweise enthalten die Variante SPC-1-A7 und SPC-1-A1 an Position 15 ein Arginin. Die anderen sieben variablen Positionen beider Varianten zeigen sehr unterschiedliche Eigenschaften. Das alleinige Vorhandensein des Arg15 weist daher nicht auf das gleiche Bindungsepitop hin. Denkbar ist aber ein stabilisierender Effekt von Arg15, da diese beiden Varianten eine höhere Stabilität aufweisen als SPC-1-G3. Geht man davon aus, dass ein Großteil der variablen Aminosäuren auch in der Bindung involviert sind, binden alle drei Varianten wahrscheinlich an unterschiedliche Epitope des IgG-Fc.

Tabelle 17: Vergleich der Proteinsequenzen der acht variablen Positionen der aus einem *screening* gegen IgG-Fc isolierten Affilin™-Varianten und des humanen γ -Kristallin WT.

AS Position	2	4	6	15	17	19	36	38
hyc-WT	Lys	Thr	Tyr	Ser	Glu	Thr	Arg	Glu
SPC-1-A1	Phe	Trp	Met	Arg	Asp	Gly	Lys	Lys
SPC-1-A7	Leu	Cys	Ser	Arg	Met	Leu	Asn	Trp
SPC-1-G3	Ser	Ile	Leu	Ile	Gly	Thr	Val	Gln

Gelb: ungeladen apolar; Rot: negativ geladen; Grün: ungeladen polar; Blau: positiv geladen

Wie lässt sich nun die vergleichsweise geringe Spezifität der isolierten Varianten erklären? Es wurden sowohl nach einem sehr stringenten *panning*-Prozess gegen IgG-Fc als auch gegen IgM-Fc Varianten isoliert, die beide Immunglobulinklassen binden. Die Fc-Teile der Immunglobuline sind die konstanten Bereiche der Antikörper und sind strukturell, schließt man die zusätzliche J-Domäne von IgM aus, sehr ähnlich. Vergleicht man IgG-Fc und IgM-Fc auf Proteinebene so erhält man eine Homologie von 30 %. Somit ist es relativ schwer, nach nur drei oder vier *panning*-Runden hoch spezifische Bindemoleküle zu isolieren. Die Diskriminierung der Bindung der Variante SPC-1-A1 an IgA könnte im Vorhandensein der geladenen Aminosäureseitenketten begründet sein, die wahrscheinlich spezifische Wechselwirkungen ermöglichen. Alle drei Affilin™-Varianten wechselwirken dennoch spezifisch mit IgG-Fc, da gegenüber BSA keine Bindungsaffinität detektierbar war.

Protein A als kommerziell vermarktetes Bindemolekül für die Chromatographie von Immunglobulinen zeigt auch ein variables Bindeverhalten. So erkennt es quasi alle Subklassen des humanen IgG (außer IgG₃) sowie verschiedene IgG-Moleküle aus anderen Organismen. Es ist aber auch eine variable Bindung an humanes IgM und IgA beschrieben (<http://www.apbiotech.com>).

Eine weitere Erklärung der geringen Spezifität der IgG-Fc bindenden AffilinTM-Varianten gegenüber anderen Immunglobulinen könnte die mit 560 Å² eher geringe Größe der Fläche der potentiellen Bindungsstelle sein. Da bis zum jetzigen Zeitpunkt noch kein AffilinTM in Komplex mit seinem Bindungspartner kristallisiert werden konnte, sind die Anzahl der Wechselwirkungen und die Größe der einbezogenen Fläche schwer abschätzbar.

Für ein Anticalin[®] mit Bindung an Fluorescein konnte durch Strukturaufklärung gezeigt werden, dass von der 500 Å² großen Bindungsstelle nur ca. 300 Å² in die Bindung involviert sind (Korndorfer *et al.*, 2003a). Anticalin[®] und AffilinTM besitzen Bindungsstellen vergleichbarer Größe und weisen eine vergleichbare Affinität und Spezifität auf. Affibodies[®] zeigen bei einer etwas größeren Fläche der Wechselwirkung von 1300 Å² bei der Bindung an IgG ebenfalls zu AffilinTM vergleichbare Affinitäten im Bereich von 10⁻⁷ M (Wahlberg *et al.*, 2003; Høgbom *et al.*, 2003). Werden bei Antikörper alle sechs CDR's in die Wechselwirkung zum Bindungspartner involviert, kann eine Bindungsregion mit einer Fläche von mehreren 1000 Å² entstehen.

Das Beispiel der Antikörper zeigt, dass große Bindungsflächen zu höher affinen Bindemolekülen bzw. zu einer verbesserten Spezifität führen können. Allerdings wird bei den Affibodies[®] ersichtlich, dass eine große Fläche nicht zwangsläufig zur Isolierung von hoch affinen Bindemolekülen führt.

Nicht nur die Größe der Bindungsfläche, sondern auch die Form sollte einen Einfluss auf die Wechselwirkungen zum Bindungspartner haben. Im Fall der Anticaline[®] ist eine hydrophobe Bindetasche für die Erkennung des Liganden verantwortlich (Korndorfer *et al.*, 2003b). Diese scheint für eine hoch affine und spezifische Bindung von kleinen Molekülen, wie Haptenen optimal, sollte aber für große Moleküle nur ungenügend zugänglich sein. Dagegen sollte eine planare Bindungsfläche, wie sie durch das β-Faltblatt beim AffilinTM vorgegeben ist, für eine Bindung an andere planare Flächen von Molekülen, wie z. B. Proteinen predestiniert sein. Durch die Strukturaufklärung einer Ankyrin-Variante konnte gezeigt werden, dass dort aufgrund der Wiederholung der variablen Positionen in aufeinander folgenden Ankyrin-*repeats* eine planare Bindungsfläche entsteht (Kohl *et al.*, 2003). Für Antikörper ist bekannt, dass diese für die Bindung von Proteinen als Antigene alle sechs möglichen hypervariablen Bereiche (CDR's) in die Wechselwirkung einbeziehen und somit eine große, zum Teil ebene Bindungsfläche generieren.

Die Bindungsstelle der AffilinTM-Varianten und wahrscheinlich auch der Ankyrin-Varianten sollte also aufgrund der planaren Architektur von Vorteil für eine Bindung von Proteinen sein.

4.4 Anwendbarkeit von Affilin™-Varianten

Zielsetzung dieser Arbeit war es, ein Affilin™ mit einer hohen Affinität gegen IgG-Fc und ein Affilin™ mit einer hohen Spezifität gegenüber IgM-Fc zu isolieren. Die Eignung der Varianten für den Einsatz in einem diagnostischen Assay im Luminex® System sollte anschließend gezeigt werden. Die IgG-Fc bindenden Varianten sollten dort als sekundäres Detektionsmolekül zum Nachweis verschiedener Antikörper in humanen Seren dienen. Eine hohe Affinität war Grundvoraussetzung für diese Anwendung. Mit Dissoziationskonstanten von ca. 10^{-7} M konnte diese Voraussetzung erreicht werden. Varianten mit Bindung an IgM-Fc sollten eine hohe Spezifität aufweisen, da sie zur Abreicherung von im Serum vorhandener IgM-Moleküle eingesetzt werden sollten. Diese hohe Spezifität konnte bei IgM bindenden Affilin™-Varianten nicht erzielt werden.

Für den Einsatz als sekundäres Detektionsmodul müssen die Affilin™-Varianten mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden. Dies gelang in der vorliegenden Arbeit. Die IgG-Fc-bindende Variante SPC-1-A7 wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oyster556 unspezifisch gekoppelt und anschließend in einem Assay im Luminex® System getestet (s. Abb. 2, S. 4). Dabei zeigte sich die prinzipielle Funktionalität der fluoreszenzmarkierten Variante. Es bestand aber ein Unterschied um den Faktor 1000 in den erhaltenen Fluoreszenzintensitäten zwischen der getesteten Affilin™-Variante und einem als Vergleich parallel getesteten F_{ab}-Phycoerythrin Konjugat mit Bindung an IgG-Fc.

Wie ist dieser Faktor 1000 erklärbar? Phycoerythrin zeichnet sich durch eine 10fach höhere Fluoreszenzintensität in der Emission gegenüber dem Oysterfarbstoff aus. Des Weiteren hat PE eine Quantenausbeute von nahezu 1 im Vergleich zu 0,15 für Oyster556. Der Laser, der zur Anregung der Fluoreszenz genutzt wurde, hatte nur eine fest eingestellte Wellenlänge, die für Phycoerythrin und cy3 optimiert war, nicht aber dem Extinktionsmaximum von Oyster556 entspricht. Hinzu kommt ein Aviditätseffekt für das Fab-Fragment, da es mehrfach auf dem PE gekoppelt ist. Insgesamt könnte also eine mehrfache Kopplung des Affilin™ an PE das Problem der geringen Intensitäten lösen. Diese Annahme sollte experimentell bestätigt werden. Dafür wurde die mutierte Variante SPC-1-A7Dia erfolgreich, über einen C-terminal eingeführten Linker, gerichtet mit PE markiert. Aufgrund der Kopplung von zwei bis drei Molekülen der Affilin™-Variante an ein Molekül des Phycoerythrin kann die festgestellte Steigerung der Affinität des erhaltenen Affilin™-PE Konjugats gegenüber IgG-Fc um einen Faktor 10 durch einen Aviditätseffekt erklärt werden (s. Abb. 36, Kap. 3.6.3). Eine Testung des Affilin™-PE Konjugates im Luminex® Assay steht noch aus.

Eine zweite wichtige Voraussetzung für die Anwendung in einem Luminex[®] Assay ist die Serumstabilität des eingesetzten Affilin[™]. Die *in vitro* Serumstabilität der getesteten Variante SPC-1-A7, die später auch für die Kopplung an Phycoerythrin eingesetzt wurde, betrug bei 37°C über 26 h. Zu beachten ist dabei, dass die Variante über 6 h stabil im Serum vorlag, das heißt es wurden nahezu 100 % des eingesetzten Proteins nachgewiesen. Nach einem Standardprotokoll für einen Luminex[®] Assay würde das Detektionsmolekül, in diesem Fall das Affilin[™] für ca. 2 h mit Serum in Kontakt kommen. Somit ist auch die Serumstabilität der Affilin[™]-Variante mehr als ausreichend für den Einsatz in der Luminex[®] Technologie.

Die Serumstabilität ist aber auch für andere diagnostische Anwendungen, bei denen Serumproben untersucht werden, ein wichtiger Parameter. Eine solche Anwendung wäre die routinemäßige Testung von Blutkonserven auf verschiedene Antikörpertiter. Aber auch für alle anderen Anwendungen, bei denen Antikörpertiter im Blut von Patienten nachgewiesen werden müssen, würde die ermittelte Serumstabilität mehr als ausreichen und ein Affilin[™] könnte als so genannter Sekundäntikörper eingesetzt werden.

In solch klassischen Nachweisassays wird allerdings selten Fluoreszenz als resultierendes Messsignal genutzt. Herkömmlicherweise setzen Routinelabors die ELISA-Technik mit einem POD-Konjugat als Detektionsmolekül ein. Das Messsignal beruht auf einer Absorption. Das Enzym POD setzt in einer Farbreaktion ein Substrat um, wodurch es zu einem Farbumschlag kommt, der spektroskopisch verfolgt werden kann.

Durch die unspezifische Kopplung einer Affilin[™]-Variante an POD konnte auch für diese Anwendung die Funktionalität des Affilin[™] erbracht werden. Die Untersuchungen zur Kopplung einer Affilin[™]-Variante an POD erfolgten im Rahmen einer Machbarkeitsstudie in Kooperation mit der Firma Cell Trend GmbH (Luckenwalde). Nach Optimierung des Kopplungsprotokolls und der gerichteten Kopplung über das zugängliche Cystein der Variante SPC-1-A7Dia könnte die Kopplungseffizienz und die Funktionalität der Variante im Test höchst wahrscheinlich erhöht werden. Durch die gerichtete Kopplung über den C-Terminus würde man, wie im Fall der Kopplung an PE, die Zugänglichkeit der Bindungsstelle erhalten. Einen Aviditätseffekt könnte man, wie bereits nachgewiesen, durch eine mehrfache Kopplung der Affilin[™]-Variante an POD erreichen. Somit wäre eine Affilin[™]-Variante auch für diagnostische Anwendungen in Form eines ELISA einsetzbar.

Schlechte Ausbeuten der Proteinexpression zeigte die *in vivo* Biotinylierung. Der Einsatz eines biotinylierten Affilin[™] als Forschungsreagenz für den Nachweis von Antikörpern wäre aber trotzdem vorstellbar. Die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung ist eine der affinsten biologischen, nicht kovalenten Bindungen. Streptavidin-Konjugate mit Fluorophoren oder

Enzymen sind dabei eine gängige Methode zum Nachweis von biotinylierten Molekülen bzw. deren Bindungspartnern. Dazu sollte die entsprechende Variante mit dem Biotin-*tag* exprimiert, gereinigt und anschließend *in vitro* biotinyliert werden. Dies sollte die Effizienz und Ausbeute der Biotinylierung erhöhen.

Die Kopplung einer AffilinTM-Variante an Phycoerythrin, eines der intensivsten Fluorophore eröffnet auch die Möglichkeit eines Einsatzes des AffilinTM in der *Flow Cytometry*. Sinnvoll wäre dies natürlich hauptsächlich für ein AffilinTM mit Bindungsaffinität zu einem relevanten Zellmarker.

Die isolierten AffilinTM-Varianten sollten nicht nur auf Affinität und Spezifität untersucht werden. Die Charakterisierung ihrer Stabilität gegenüber verschiedenen Einflüssen sollte ebenfalls Aufschluss über die prinzipielle Eignung von AffilinTM-Varianten für Anwendungen in der Therapie und Affinitätschromatographie geben.

Eine chromatographische Anwendung erfordert einige grundlegende Voraussetzungen an einen Bindungspartner bzw. *scaffold*. So sollte eine pH-Stabilität im Bereich pH 2 bis 11 und eine relativ hohe Stabilität gegenüber denaturierenden Chemikalien, wie z. B. GdmHCl bestehen. Diese Bedingungen sind essentiell für eine vollständige Regeneration des Säulenmaterials ohne Verlust an Bindungskapazität. AffilinTM-Varianten zeigten eine solche Beständigkeit gegenüber extremen pH-Werten bzw. GdmHCl und sollten daher sehr gut für chromatographische Anwendungen geeignet sein.

Andere alternative Bindemoleküle sind ebenfalls im Hinblick auf eine chromatographische Eignung getestet worden. Nach Kopplung einiger HSA-bindender Affibodies[®] an Chromatographiematerial wurden sie nach mehrmaliger Regeneration des Säulenmaterials auf ihre Bindungskapazität untersucht. Sie zeigten nach 20maliger Inkubation für 20 min mit 0,1 M NaOH einen Verlust von 15 % ihrer Bindungskapazität (Linhult *et al.*, 2003).

Protein A aus *Staphylococcus aureus*, Ausgangspunkt der Generierung von Affibodies[®], wird bereits chromatographisch zur Aufreinigung von Immunglobulinen eingesetzt (www.apbiotech.com). Nachteile von Protein A sind dabei die harschen Elutionsbedingungen der gebundenen Antikörper von pH 2,5-3,0 und ein Ablösen von der Chromatographiematrix. Da es bei pH Werten unter 3,0 zu einer teilweisen Entfaltung der Antikörperdomänen und diese Entfaltung nicht vollständig reversibel ist, kommt es bei den harschen Elutionsbedingungen zu Verlusten an zu reinigenden Wirkstoff.

Die geringere Affinität der IgG-bindenden AffilinTM-Varianten von ca. 300 nM gegenüber 30 nM von Protein A sollte daher mildere Elutionsbedingungen zur Folge haben. Ein Ablösen der an die Chromatographiematrix gekoppelten Bindemoleküle ist aufgrund der bedingten pH

Stabilität der Bindung an die Matrix kaum zu unterbinden. Bei Protein A sind daher Verunreinigungen mit dem Endprodukt möglich. Dies ist aufgrund der starken Immunogenität des Protein A für den späteren Einsatz des Produktes im Patienten von Nachteil und wird von Zulassungsbehörden für Arzneimittel als kritischer Punkt betrachtet. Humanes γ -Kristallin ist kaum immunogen und würde selbst bei leichter Ablösung vom Chromatographiematerial wahrscheinlich keine Beeinträchtigung in der Verwendung des Antikörpereluates nach sich ziehen. Für den Einsatz in der Chromatographie müsste ein Affilin™ erfolgreich und mit hoher Effizienz und Funktionalität an geeignetes Chromatographiematerial gekoppelt werden. Geeignet wäre da die Variante SPC-1-A7Dia mit einem Linker und einem gut zugänglichen, freien Cystein. Nachteile dieser Variante wären wahrscheinlich die in Biacore Experimenten beobachteten sehr schnellen k_{off} Raten. Eine effiziente Bindung mit anschließender Abreicherung von unspezifisch gebundenem Protein und Elution würde bei diesen k_{off} Raten wahrscheinlich nur zu geringen Ausbeuten führen. Eine Affinitätsmaturierung in Hinblick auf langsamere k_{off} Raten könnte eine chromatographische Anwendung aber möglich machen.

Für eine therapeutische Anwendung sind neben der hohen Spezifität und Affinität und einer geringen Immunogenität die *in vivo* Halbwertszeiten im Serum entscheidend. Diese sind bei den getesteten Affilin™-Varianten mit maximal 10 min sehr gering. Eine mögliche Lösung zur Verlängerung der Halbwertszeiten wäre eine geeignete Modifizierung, wie z. B. eine Pegylierung. Dabei würde eine Kopplung von Polyethylenglycol mit einem bestimmten Molekulargewicht an die therapeutisch wirksame Substanz, das Affilin™, erfolgen.

Es sind bereits mehrere Proteine beschrieben, die durch eine Pegylierung eine erhebliche Verlängerung der *in vivo* Serumhalbwertszeiten erfahren haben. So konnte für ein F_{ab}-Antikörperfragment eine Verlängerung um den Faktor 175 gezeigt werden (Leong *et al.*, 2001). Ein Aptamer mit Bindungsaffinität zu VEGF zeigte nach der Kopplung an 40 kDa Polyethylenglycol eine vergleichbare Affinität zum Target wie die ungekoppelte RNA Variante. Die Serumhalbwertszeit des ungekoppelten Aptamers betrug, dem Affilin™ vergleichbar, 10 min. Für die pegylierte Variante zeigte sich dagegen in der *in vivo* Halbwertszeit eine Steigerung um Faktor 300 auf einen Wert von über 6 h (Bell *et al.*, 1999). Durch eine Pegylierung könnte man auch die Halbwertszeiten bei Affilin™ erhöhen, ohne dabei die Bindungsaffinität einzuschränken. Somit wären sie potentiell auch für die Therapie einsetzbar. Zuvor sollten jedoch pharmakokinetische Studien durchgeführt werden, die einen genaueren Aufschluss über den Verbleib der entsprechenden Affilin™-Variante im Körper bzw. dem Gewebe geben.

Die diskutierten Ergebnisse sind erste Ansätze für eine therapeutische Anwendung. Ein *screening* gegen ein therapeutisch relevantes Target mit der Isolierung hoch affiner und vor allem hoch spezifischer AffilinTM-Varianten steht dafür zunächst im Vordergrund. Bis zur Zulassung als Medikament oder als *medical advice* benötigt man langwierige Forschung, die eine Entwicklung eines optimierten, kostengünstigen Herstellungsprozesses und eine klinische Testung einschließt.

Die getesteten Stabilitäten und Untersuchungen zur Kopplung zeigen die Möglichkeit einer breiten Anwendung von AffilinTM-Varianten kurz- und mittelfristig in der Diagnostik und Chromatographie sowie längerfristig in der Therapie.

5 Zusammenfassung

Antikörper und deren Fragmente sind bei Anwendungen in der Diagnostik und Therapie die am häufigsten eingesetzten Bindemoleküle. Dennoch weisen sie einige erhebliche Nachteile in Bezug auf ihre Herstellung oder ihrer Stabilität auf. Durch die Generierung alternativer Bindemoleküle sollen diese Nachteile umgangen, aber eine vergleichbare Affinität und Spezifität wie bei Antikörpern erreicht werden.

Auf der Grundlage des γ -Kristallins als Gerüstprotein wurden in Vorarbeiten *Phage Display* Bibliotheken erstellt. In diesen Bibliotheken waren acht lösungsmittel-exponierte Aminosäuren auf genetischer Ebene randomisiert. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Bibliotheken auf geeignete Varianten des γ -Kristallins, so genannte AffilinTM-Varianten, in Bezug auf ihre Bindeeigenschaften gegen verschiedene Targets durchsucht.

Aus der Bibliothek GCUC1, beruhend auf dem bovinem γ -Kristallin, wurde erfolgreich ein AffilinTM mit spezifischer Bindung an IgG-Fc isoliert. Die Affinität zu IgG-Fc wurde mit 10^{-5} M bestimmt. Damit wurde erstmal der Nachweis erbracht, dass sich das *scaffold* zur Isolierung von Varianten mit Bindungsaffinität zu Proteinen eignet.

Eine Selektion der komplexeren und qualitativ besseren, humanen γ -Kristallin Bibliothek CR20 gegen IgG-Fc führte zur Isolierung von acht spezifischen AffilinTM-Varianten. Die Varianten mit der höchsten Affinität waren SPC-1-A1, SPC-1-A7 und SPC-1-G3 mit Dissoziationskonstanten für IgG-Fc im Bereich von 10^{-7} M und keiner detektierbaren Bindung an BSA. Die Varianten SPC-1-A7 und SPC-1-G3 zeigten eine Bindung an alle getesteten Immunglobulinklassen. Nur die Variante SPC-1-A1 zeigte in Biacore-Experimenten eine Spezifität der Bindung gegenüber IgA.

Nach einer Selektion der humanen γ -Kristallin Bibliothek CR20 gegen IgM-Fc wurden AffilinTM-Varianten mit Dissoziationskonstanten für Immunglobulin M im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-5} M, jedoch ohne Spezifität gegenüber IgG oder IgA, isoliert.

Die drei IgG-Fc bindenden Varianten SPC-1-A1, SPC-1-A7 und SPC-1-G3 wurden biophysikalisch näher charakterisiert. Es wurden die Stabilitäten gegenüber verschiedenen chemischen und thermischen Einflüssen untersucht und besonders in Hinblick auf potentielle Anwendungen betrachtet. Die Varianten zeigten, im Vergleich zu anderen alternativen Bindemolekülen, moderate Stabilitäten gegenüber GdmHCl und Temperatur, allerdings waren die Übergänge nicht reversibel und es konnten daher keine ΔG Werte berechnet werden. Eine

außerordentlich hohe Stabilität zeigten alle untersuchten AffilinTM-Varianten gegenüber extremen pH Werten. So lagen die Proteine nach Inkubation bei pH 1.5 und 12.5 im nativen Zustand vor. Beispielhaft wurde eine AffilinTM-Variante auf die Stabilität in Serum untersucht. Das Protein war für mehr als 6 h zu 100 % in Serum nachweisbar. Damit erfüllt das AffilinTM essentielle Voraussetzungen für einen Einsatz in der Chromatographie und Diagnostik.

Es konnten die Raumstrukturen des humanen γ -Kristallins und einer IgG-Fc bindenden Variante mit Auflösungen bis 1.7 bzw. 2.0 Å bestimmt werden. Damit wurde die Annahme bestätigt, dass die Randomisierung der acht Positionen nicht die β -Faltblattstruktur der Domäne und damit das *greek key* Faltungsmotiv zerstört.

AffilinTM-Varianten ließen sich sowohl genetisch als auch chemisch mit Markermolekülen ohne Verlust der Bindungsaffinität fusionieren. Durch die Einführung eines C-terminalen *linkers* mit einem endständigen Cystein war es möglich, einfach und effizient ein AffilinTM mehrfach an Phycoerythrin zu koppeln. Bei der anschließenden Analyse des Komplexes konnte ein Aviditätseffekt nachgewiesen werden. Der Einsatz dieses AffilinTM-PE Komplexes scheint für eine diagnostische Anwendung in einem Luminex Assay vielversprechend.

Es konnte gezeigt werden, dass die isolierten AffilinTM-Varianten die Anforderungen an ein alternatives Bindemolekül erfüllen. Diese Anforderungen sind eine hohe Stabilität, gute Löslichkeit, eine kostengünstige Herstellung sowie einfache genetische oder chemische Fusion mit Markermolekülen, verbunden mit einer hohen Affinität und Spezifität gegen jedes beliebige Zielmolekül.

6 Literaturverzeichnis

- Amstutz, P., Forrer, P., Zahnd, C., and Pluckthun, A. (2001). In vitro display technologies: novel developments and applications. *Curr Opin Biotechnol* 12, 400-405.
- Bax, B., Lapatto, R., Nalini, V., Driessen, H., Lindley, P. F., Mahadevan, D., Blundell, T. L., and Slingsby, C. (1990). X-ray analysis of beta B2-crystallin and evolution of oligomeric lens proteins. *Nature* 347, 776-780.
- Beckett, D., Kovaleva, E., and Schatz, P. J. (1999). A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci* 8, 921-929.
- Bell, C., Lynam, E., Landfair, D. J., Janjic, N., and Wiles, M. E. (1999). Oligonucleotide NX1838 inhibits VEGF165-mediated cellular responses in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35, 533-542.
- Beste, G., Schmidt, F. S., Stibora, T., and Skerra, A. (1999). Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1898-1903.
- Biagini, R. E., Sammons, D. L., Smith, J. P., MacKenzie, B. A., Striley, C. A., Semenova, V., Steward-Clark, E., Stamey, K., Freeman, A. E., Quinn, C. P., and Snawder, J. E. (2004). Comparison of a multiplexed fluorescent covalent microsphere immunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of human immunoglobulin G antibodies to anthrax toxins. *Clin Diagn Lab Immunol* 11, 50-55.
- Binz, H. K., Stumpp, M. T., Forrer, P., Amstutz, P., and Pluckthun, A. (2003). Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. *J Mol Biol* 332, 489-503.
- Blundell, T., Lindley, P., Miller, L., Moss, D., Slingsby, C., Tickle, I., Turnell, B., and Wistow, G. (1981). The molecular structure and stability of the eye lens: x-ray analysis of gamma-crystallin II. *Nature* 289, 771-777.
- Boder, E. T., Midelfort, K. S., and Wittrup, K. D. (2000). Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10701-10705.
- Boder, E. T., and Wittrup, K. D. (1997). Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol* 15, 553-557.
- Bradbury, A., Persic, L., Werge, T., and Cattaneo, A. (1993). Use of living columns to select specific phage antibodies. *Biotechnology (N Y)* 11, 1565-1569.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Breitling, F., and Dübel, S. (1997). *Rekombinante Antikörper* (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag).

- Brinkmann, U., Mattes, R. E., and Buckel, P. (1989). High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene* 85, 109-114.
- Brody, E. N., and Gold, L. (2000). Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *J Biotechnol* 74, 5-13.
- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., *et al.* (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54 (Pt 5), 905-921.
- Brunger, A. T., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., and Karplus, M. (1986). Three-dimensional structure of proteins determined by molecular dynamics with interproton distance restraints: application to crambin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3801-3805.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., and Short, J. M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-379.
- Burgstaller, P., Jenne, A., and Blind, M. (2002). Aptamers and aptazymes: accelerating small molecule drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel* 5, 690-700.
- Burtrum, D., Zhu, Z., Lu, D., Anderson, D. M., Prewett, M., Pereira, D. S., Bassi, R., Abdullah, R., Hooper, A. T., Koo, H., *et al.* (2003). A fully human monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor blocks ligand-dependent signaling and inhibits human tumor growth in vivo. *Cancer Res* 63, 8912-8921.
- Charbit, A., Boulain, J. C., Ryter, A., and Hofnung, M. (1986). Probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope; expression at the cell surface. *Embo J* 5, 3029-3037.
- Chester, K. A., and Hawkins, R. E. (1995). Clinical issues in antibody design. *Trends Biotechnol* 13, 294-300.
- Cho, G., Keefe, A. D., Liu, R., Wilson, D. S., and Szostak, J. W. (2000). Constructing high complexity synthetic libraries of long ORFs using in vitro selection. *J Mol Biol* 297, 309-319.
- Christmann, A., Walter, K., Wentzel, A., Kratzner, R., and Kolmar, H. (1999). The cystine knot of a squash-type protease inhibitor as a structural scaffold for *Escherichia coli* cell surface display of conformationally constrained peptides. *Protein Eng* 12, 797-806.
- Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., and Winter, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352, 624-628.
- Cortez-Retamozo, V., Backmann, N., Senter, P. D., Wernery, U., De Baetselier, P., Muyldermans, S., and Revets, H. (2004). Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res* 64, 2853-2857.
- Dasso, J., Lee, J., Bach, H., and Mage, R. G. (2002). A comparison of ELISA and flow microsphere-based assays for quantification of immunoglobulins. *J Immunol Methods* 263, 23-33.

- Day, L. A., and Wiseman, R. L. (1978). A comparison of DNA packaging in the virions of fd, Xf, and Pfl. In *The Single-Stranded DNA Phages.*, D. T. Denhardt, D. Dressler, and D. S. Ray, eds. (Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 605-625.
- DeLano, W. L. (2002). *The Pymol Molecular Graphics System* (San Carlo, CA, DeLano Scientific LLC).
- Dunbar, S. A., Vander Zee, C. A., Oliver, K. G., Karem, K. L., and Jacobson, J. W. (2003). Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. *J Microbiol Methods* 53, 245-252.
- Engelberg-Kulka, H., and Schoulaker-Schwarz, R. (1996). Suppression of termination codons. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology.* (Washington,DC, ASM Press), pp. 909-921.
- Esser, D. (2000) Etablierung proteinbasierter Transfersysteme, Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle.
- Ewert, S., Cambillau, C., Conrath, K., and Pluckthun, A. (2002). Biophysical properties of camelid V(HH) domains compared to those of human V(H)3 domains. *Biochemistry* 41, 3628-3636.
- Feldhaus, M. J., Siegel, R. W., Opresko, L. K., Coleman, J. R., Feldhaus, J. M., Yeung, Y. A., Cochran, J. R., Heinzelman, P., Colby, D., Swers, J., *et al.* (2003). Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Nat Biotechnol* 21, 163-170.
- Fiedler, M. (2003) Neutralisierung eines Inhibitors der neuronalen Regeneration im ZNS: Optimierung des anti-Nogo-A Antikörpers IN-1 durch Protein *Engineering.*, Technische Universität München, Weihenstephan.
- Fiedler, U., and Rudolph, R. (1999). Design von Beta-Faltblatt-Proteinen mit spezifischen Bindungseigenschaften. In Deutsche Patentanmeldung (Deutschland).
- Forero, A., and Lobuglio, A. F. (2003). History of antibody therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* 30, 1-5.
- Forrer, P., Binz, H. K., Stumpp, M. T., and Pluckthun, A. (2004). Consensus design of repeat proteins. *Chembiochem* 5, 183-189.
- Fujii, I. (2004). Antibody affinity maturation by random mutagenesis. *Methods Mol Biol* 248, 345-359.
- Gill, S. C., and von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-326.
- Green, L., Waugh, S., Binkley, J. P., Hostomska, Z., Hostomsky, Z., and Tuerk, C. (1995). Comprehensive chemical modification interference and nucleotide substitution analysis of an RNA pseudoknot inhibitor to HIV-1 reverse transcriptase. *J Mol Biol* 247, 60-68.
- Green, L. L. (1999). Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 231, 11-23.

- Gunneriusson, E., Nord, K., Uhlen, M., and Nygren, P. (1999). Affinity maturation of a Taq DNA polymerase specific affibody by helix shuffling. *Protein Eng* *12*, 873-878.
- Guo, T., and Hobbs, D. W. (2003). Privileged structure-based combinatorial libraries targeting g protein-coupled receptors. *Assay Drug Dev Technol* *1*, 579-592.
- Haber, A. F. S. A. (1972). Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. In *Methods Enzymology*, C. H. Hirs, and S. N. Timasheff, eds., pp. 457-464.
- Hanes, J., and Pluckthun, A. (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 4937-4942.
- Hanes, J., Schaffitzel, C., Knappik, A., and Pluckthun, A. (2000). Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nat Biotechnol* *18*, 1287-1292.
- Harding, S. E. (1997). Hydrodynamic properties of proteins. In *Protein Structure: A Practical Approach*, T. Creighton, ed. (Oxford, UK, IRL Press), pp. 219-251.
- Harris, L. J., Larson, S. D., Hasel, K. W., and McPherson, A. (1997). Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry* *36*, 1581-1597.
- He, Y., Honnen, W. J., Krachmarov, C. P., Burkhart, M., Kayman, S. C., Corvalan, J., and Pinter, A. (2002). Efficient isolation of novel human monoclonal antibodies with neutralizing activity against HIV-1 from transgenic mice expressing human Ig loci. *J Immunol* *169*, 595-605.
- Heon, E., Priston, M., Schorderet, D. F., Billingsley, G. D., Girard, P. O., Lubsen, N., and Munier, F. L. (1999). The gamma-crystallins and human cataracts: a puzzle made clearer. *Am J Hum Genet* *65*, 1261-1267.
- Hernandez, M. C., and Knox, S. J. (2003). Radiobiology of radioimmunotherapy with 90Y ibritumomab tiuxetan (Zevalin). *Semin Oncol* *30*, 6-10.
- Hogbom, M., Eklund, M., Nygren, P. A., and Nordlund, P. (2003). Structural basis for recognition by an in vitro evolved affibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 3191-3196.
- Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P., and Winter, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* *19*, 4133-4137.
- Hu, H., Aizenstein, B. D., Puchalski, A., Burmania, J. A., Hamawy, M. M., and Knechtle, S. J. (2004). Elevation of CXCR3-binding chemokines in urine indicates acute renal-allograft dysfunction. *Am J Transplant* *4*, 432-437.
- Huber, R., Schneider, M., Mayr, I., Muller, R., Deutzmann, R., Suter, F., Zuber, H., Falk, H., and Kayser, H. (1987). Molecular structure of the bilin binding protein (BBP) from *Pieris brassicae* after refinement at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* *198*, 499-513.
- Hudson, P. J., and Souriau, C. (2001). Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. *Expert Opin Biol Ther* *1*, 845-855.
- Hudson, P. J., and Souriau, C. (2003). Engineered antibodies. *Nat Med* *9*, 129-134.

- Irving, R. A., Coia, G., Roberts, A., Nuttall, S. D., and Hudson, P. J. (2001). Ribosome display and affinity maturation: from antibodies to single V-domains and steps towards cancer therapeutics. *J Immunol Methods* 248, 31-45.
- Jacobs, M., Wnendt, S., and Stahl, U. (1990). High-efficiency electro-transformation of *Escherichia coli* with DNA from ligation mixtures. *Nucleic Acids Res* 18, 1653.
- Jaenicke, R. (1994). Eye-lens proteins: structure, superstructure, stability, genetics. *Naturwissenschaften* 81, 423-429.
- Jaenicke, R. (1996). Stability and folding of ultrastable proteins: eye lens crystallins and enzymes from thermophiles. *Faseb J* 10, 84-92.
- Jaenicke, R., and Slingsby, C. (2001). Lens crystallins and their microbial homologs: structure, stability, and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36, 435-499.
- Janeway, C. A., and Traves, P. (1995). *Immunologie* (Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag GmbH).
- Jendeberg, L., Tashiro, M., Tejero, R., Lyons, B. A., Uhlen, M., Montelione, G. T., and Nilsson, B. (1996). The mechanism of binding staphylococcal protein A to immunoglobulin G does not involve helix unwinding. *Biochemistry* 35, 22-31.
- Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S., and Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and location of errors in these models. *Acta Cryst A* 47, 100-119.
- Joos, T. O., Stoll, D., and Templin, M. F. (2002). Miniaturised multiplexed immunoassays. *Curr Opin Chem Biol* 6, 76-80.
- Jung, S., Honegger, A., and Pluckthun, A. (1999). Selection for improved protein stability by phage display. *J Mol Biol* 294, 163-180.
- Klussmann, S., Nolte, A., Bald, R., Erdmann, V. A., and Furste, J. P. (1996). Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat Biotechnol* 14, 1112-1115.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhof, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A., and Virnekas, B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296, 57-86.
- Kohl, A., Binz, H. K., Forrer, P., Stumpp, M. T., Pluckthun, A., and Grutter, M. G. (2003). Designed to be stable: crystal structure of a consensus ankyrin repeat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1700-1705.
- Kohler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X., and Koide, S. (1998). The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J Mol Biol* 284, 1141-1151.

- Korndorfer, I. P., Beste, G., and Skerra, A. (2003a). Crystallographic analysis of an "anticalin" with tailored specificity for fluorescein reveals high structural plasticity of the lipocalin loop region. *Proteins* 53, 121-129.
- Korndorfer, I. P., Schlehuber, S., and Skerra, A. (2003b). Structural mechanism of specific ligand recognition by a lipocalin tailored for the complexation of digoxigenin. *J Mol Biol* 330, 385-396.
- Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber, R., and Sonderrmann, P. (2003). Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J Mol Biol* 325, 979-989.
- Kretzschmar, T., and von Ruden, T. (2002). Antibody discovery: phage display. *Curr Opin Biotechnol* 13, 598-602.
- Kretzschmar, T., Zimmermann, C., and Geiser, M. (1995). Selection procedures for nonmatured phage antibodies: a quantitative comparison and optimization strategies. *Anal Biochem* 224, 413-419.
- Ku, J., and Schultz, P. G. (1995). Alternate protein frameworks for molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6552-6556.
- Kumaraswamy, V. S., Lindley, P. F., Slingsby, C., and Glover, I. D. (1996). An eye lens protein-water structure: 1.2 angstrom resolution structure of gamma B-crystallin at 150K. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52, 611.
- Kurz, M., Gu, K., Al-Gawari, A., and Lohse, P. A. (2001). cDNA - protein fusions: covalent protein - gene conjugates for the in vitro selection of peptides and proteins. *Chembiochem* 2, 666-672.
- Ladner, R. C., and Ley, A. C. (2001). Novel frameworks as a source of high-affinity ligands. *Curr Opin Biotechnol* 12, 406-410.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Landon, L. A., Peletskaya, E. N., Glinsky, V. V., Karasseva, N., Quinn, T. P., and Deutscher, S. L. (2003). Combinatorial evolution of high-affinity peptides that bind to the Thomsen-Friedenreich carcinoma antigen. *J Protein Chem* 22, 193-204.
- Leonard, J. P., Coleman, M., Ketas, J. C., Chadburn, A., Ely, S., Furman, R. R., Wegener, W. A., Hansen, H. J., Ziccardi, H., Eschenberg, M., *et al.* (2003). Phase I/II trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 21, 3051-3059.
- Leong, S. R., DeForge, L., Presta, L., Gonzalez, T., Fan, A., Reichert, M., Chuntharapai, A., Kim, K. J., Tumas, D. B., Lee, W. P., *et al.* (2001). Adapting pharmacokinetic properties of a humanized anti-interleukin-8 antibody for therapeutic applications using site-specific pegylation. *Cytokine* 16, 106-119.
- Lin, T. Y., and Timasheff, S. N. (1996). On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins. *Protein Sci* 5, 372-381.

- Ling, M. M. (2003). Large antibody display libraries for isolation of high-affinity antibodies. *Comb Chem High Throughput Screen* 6, 421-432.
- Linhult, M., Gulich, S., Graslund, T., Nygren, P. A., and Hober, S. (2003). Evaluation of different linker regions for multimerization and coupling chemistry for immobilization of a proteinaceous affinity ligand. *Protein Eng* 16, 1147-1152.
- Lohning, C. (2004). Methods for displaying (poly) peptides/proteins on bacteriophage particles via disulfide bonds. (US, Morphosys AG (DE)).
- Lowman, H. B., Bass, S. H., Simpson, N., and Wells, J. A. (1991). Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. *Biochemistry* 30, 10832-10838.
- Lubsen, N. H., Aarts, H. J., and Schoenmakers, J. G. (1988). The evolution of lenticular proteins: the beta- and gamma-crystallin super gene family. *Prog Biophys Mol Biol* 51, 47-76.
- Madore, F. (2002). Plasmapheresis. Technical aspects and indications. *Crit Care Clin* 18, 375-392.
- Main, A. L., Harvey, T. S., Baron, M., Boyd, J., and Campbell, I. D. (1992). The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions. *Cell* 71, 671-678.
- Manser, T., Wysocki, L. J., Margolies, M. N., and Gefter, M. L. (1987). Evolution of antibody variable region structure during the immune response. *Immunol Rev* 96, 141-162.
- Marks, J. D. (2004). Antibody affinity maturation by chain shuffling. *Methods Mol Biol* 248, 327-343.
- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D., and Winter, G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 222, 581-597.
- Mattheakis, L. C., Bhatt, R. R., and Dower, W. J. (1994). An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9022-9026.
- Mayr, E. M., Jaenicke, R., and Glockshuber, R. (1994). Domain interactions and connecting peptides in lens crystallins. *J Mol Biol* 235, 84-88.
- Mayr, E. M., Jaenicke, R., and Glockshuber, R. (1997). The domains in gammaB-crystallin: identical fold-different stabilities. *J Mol Biol* 269, 260-269.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., and Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554.
- Menard, S., Pupa, S. M., Campiglio, M., and Tagliabue, E. (2003). Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene* 22, 6570-6578.
- Miller, J. H., and Albertini, A. M. (1983). Effects of surrounding sequence on the suppression of nonsense codons. *J Mol Biol* 164, 59-71.

- Model, P., and Russel, M. (1988). Filamentous bacteriophage. In *The Bacteriophages* (New York, Plenum Press), pp. 375-456.
- Najmudin, S., Nalini, V., Driessen, H. P., Slingsby, C., Blundell, T., Moss, D., and Lindley, P. (1993). Structure of bovine gB (g II)-crystalline at 1.47 Å. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *49*, 223-233.
- Nolte, A., Klussmann, S., Bald, R., Erdmann, V. A., and Furste, J. P. (1996). Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nat Biotechnol* *14*, 1116-1119.
- Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M., and Nygren, P. A. (1997). Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain. *Nat Biotechnol* *15*, 772-777.
- Norledge, B. V., Mayr, E. M., Glockshuber, R., Bateman, O. A., Slingsby, C., Jaenicke, R., and Driessen, H. P. (1996). The X-ray structures of two mutant crystallin domains shed light on the evolution of multi-domain proteins. *Nat Struct Biol* *3*, 267-274.
- Opalka, D., Lachman, C. E., MacMullen, S. A., Jansen, K. U., Smith, J. F., Chirmule, N., and Esser, M. T. (2003). Simultaneous quantitation of antibodies to neutralizing epitopes on virus-like particles for human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 by a multiplexed luminex assay. *Clin Diagn Lab Immunol* *10*, 108-115.
- Orr, B. A., Carr, L. M., Wittrup, K. D., Roy, E. J., and Kranz, D. M. (2003). Rapid method for measuring ScFv thermal stability by yeast surface display. *Biotechnol Prog* *19*, 631-638.
- Otwinowski, Z. (1993). Proceedings of the CCP4 study weekend. In *Proceedings of the CCP4 study weekend.*, L. Lawyer, N. Isaacs, and S. Bailey, eds. (Warrington, U. K., Daresbury Laboratory), pp. 56-62.
- Pace, C. N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol* *131*, 266-280.
- Pace, C. N., and Scholtz, M. J. (1997). Measuring the Conformational Stability of a Protein. In *Protein Structure: A Practical Approach*, T. Creighton, ed. (Oxford, UK, IRL Press.), pp. 299-322.
- Padlan, E. A. (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* *31*, 169-217.
- Pagratis, N. C., Bell, C., Chang, Y. F., Jennings, S., Fitzwater, T., Jellinek, D., and Dang, C. (1997). Potent 2'-amino-, and 2'-fluoro-2'-deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor. *Nat Biotechnol* *15*, 68-73.
- Palme, S., Slingsby, C., and Jaenicke, R. (1997). Mutational analysis of hydrophobic domain interactions in gamma B-crystallin from bovine eye lens. *Protein Sci* *6*, 1529-1536.
- Parham, P. (1998). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Immunol Rev* *162*.
- Parmley, S. F., and Smith, G. P. (1988). Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* *73*, 305-318.
- Pastan, I., and Kreitman, R. J. (2002). Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Investig Drugs* *3*, 1089-1091.

- Pavlinkova, G., Beresford, G. W., Booth, B. J., Batra, S. K., and Colcher, D. (1999). Pharmacokinetics and biodistribution of engineered single-chain antibody constructs of MAb CC49 in colon carcinoma xenografts. *J Nucl Med* *40*, 1536-1546.
- Pickering, J. W., Martins, T. B., Schroder, M. C., and Hill, H. R. (2002). Comparison of a multiplex flow cytometric assay with enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibodies to tetanus, diphtheria, and Haemophilus influenzae Type b. *Clin Diagn Lab Immunol* *9*, 872-876.
- Pietersz, G. A., Patrick, M. R., and Chester, K. A. (1998). Preclinical characterization and in vivo imaging studies of an engineered recombinant technetium-99m-labeled metallothionein-containing anti-carcinoembryonic antigen single-chain antibody. *J Nucl Med* *39*, 47-56.
- Purschke, W. G., Radtke, F., Kleinjung, F., and Klussmann, S. (2003). A DNA Spiegelmer to staphylococcal enterotoxin B. *Nucleic Acids Res* *31*, 3027-3032.
- Raag, R., and Whitlow, M. (1995). Single-chain Fvs. *Faseb J* *9*, 73-80.
- Rauchenberger, R., Borges, E., Thomassen-Wolf, E., Rom, E., Adar, R., Yaniv, Y., Malka, M., Chumakov, I., Kotzer, S., Resnitzky, D., *et al.* (2003). Human combinatorial Fab library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. *J Biol Chem* *278*, 38194-38205.
- Riechmann, L., and Muyldermans, S. (1999). Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains. *J Immunol Methods* *231*, 25-38.
- Rivas, G., Stafford, W., and Minton, A. P. (1999). Characterization of heterologous protein-protein interactions using analytical ultracentrifugation. *Methods* *19*, 194-212.
- Roberts, R. W., and Szostak, J. W. (1997). RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 12297-12302.
- Rossmann, M. G., and Blow, D. M. (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst* *15*, 24-31.
- Rudolph, R., Siebendritt, R., Nesslauer, G., Sharma, A. K., and Jaenicke, R. (1990). Folding of an all-beta protein: independent domain folding in gamma II-crystallin from calf eye lens. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 4625-4629.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. edn (Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Samuelson, P., Gunneriusson, E., Nygren, P. A., and Stahl, S. (2002). Display of proteins on bacteria. *J Biotechnol* *96*, 129-154.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *74*, 5463-5467.
- Schatz, P. J. (1993). Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in Escherichia coli. *Biotechnology (N Y)* *11*, 1138-1143.

- Schlehuber, S., Beste, G., and Skerra, A. (2000). A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin. *J Mol Biol* 297, 1105-1120.
- Schlehuber, S., and Skerra, A. (2002). Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant -- a so-called 'anticalin' -- using a molecular random approach. *Biophys Chem* 96, 213-228.
- Schmidt, T. G., Koepke, J., Frank, R., and Skerra, A. (1996). Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol* 255, 753-766.
- Schneider, K. M. (1998). Plasmapheresis and immunoabsorption: different techniques and their current role in medical therapy. *Kidney Int Suppl* 64, S61-65.
- Sharma, A. K., Minke-Gogl, V., Gohl, P., Siebendritt, R., Jaenicke, R., and Rudolph, R. (1990). Limited proteolysis of gamma II-crystallin from calf eye lens. Physicochemical studies on the N-terminal domain and the intact two-domain protein. *Eur J Biochem* 194, 603-609.
- Sidhu, S. S., Fairbrother, W. J., and Deshayes, K. (2003). Exploring protein-protein interactions with phage display. *ChemBiochem* 4, 14-25.
- Skerra, A. (2003). Imitating the humoral immune response. *Curr Opin Chem Biol* 7, 683-693.
- Skerra, A., and Pluckthun, A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038-1041.
- Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- Studier, F. W., and Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.
- Szardenings, M. (2003). Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. *J Recept Signal Transduct Res* 23, 307-349.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Tuerk, C., and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505-510.
- Vieira, J., and Messing, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol* 153, 3-11.
- Virnekas, B., Ge, L., Pluckthun, A., Schneider, K. C., Wellnhofer, G., and Moroney, S. E. (1994). Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 22, 5600-5607.

- Wahlberg, E., Lendel, C., Helgstrand, M., Allard, P., Dincbas-Renqvist, V., Hedqvist, A., Berglund, H., Nygren, P. A., and Hard, T. (2003). An affibody in complex with a target protein: structure and coupled folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 3185-3190.
- Wells, J. A., and Lowman, H. B. (1992). Rapid evolution of peptide and protein binding properties in vitro. *Curr Opin Biotechnol* *3*, 355-362.
- White, C. A. (2003). Rituxan immunotherapy and zevalin radioimmunotherapy in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Pharm Biotechnol* *4*, 221-238.
- Willuda, J., Honegger, A., Waibel, R., Schubiger, P. A., Stahel, R., Zangemeister-Wittke, U., and Pluckthun, A. (1999). High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. *Cancer Res* *59*, 5758-5767.
- Willuda, J., Kubetzko, S., Waibel, R., Schubiger, P. A., Zangemeister-Wittke, U., and Pluckthun, A. (2001). Tumor targeting of mono-, di-, and tetravalent anti-p185(HER-2) miniantibodies multimerized by self-associating peptides. *J Biol Chem* *276*, 14385-14392.
- Wilson, D. S., Keefe, A. D., and Szostak, J. W. (2001). The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 3750-3755.
- Wistow, G., Turnell, B., Summers, L., Slingsby, C., Moss, D., Miller, L., Lindley, P., and Blundell, T. (1983). X-ray analysis of the eye lens protein gamma-II crystallin at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* *170*, 175-202.
- Wistow, G. J., and Piatigorsky, J. (1988). Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Annu Rev Biochem* *57*, 479-504.
- Worn, A., and Pluckthun, A. (1998). An intrinsically stable antibody scFv fragment can tolerate the loss of both disulfide bonds and fold correctly. *FEBS Lett* *427*, 357-361.
- Worn, A., and Pluckthun, A. (2001). Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol* *305*, 989-1010.
- Xu, L., Aha, P., Gu, K., Kuimelis, R. G., Kurz, M., Lam, T., Lim, A. C., Liu, H., Lohse, P. A., Sun, L., *et al.* (2002). Directed evolution of high-affinity antibody mimics using mRNA display. *Chem Biol* *9*, 933-942.
- Yang, L., Tran, D. K., and Wang, X. (2001). BADGE, Beads Array for the Detection of Gene Expression, a high-throughput diagnostic bioassay. *Genome Res* *11*, 1888-1898.
- Ylera, F., Lurz, R., Erdmann, V. A., and Furste, J. P. (2002). Selection of RNA aptamers to the Alzheimer's disease amyloid peptide. *Biochem Biophys Res Commun* *290*, 1583-1588.
- Zhang, Z. C., Hu, X. J., and Yang, Q. (2004). Generation of high affinity human single-chain antibody against PreS1 of hepatitis B virus from immune phage-display antibody library. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* *3*, 77-81.

Biblio- thek	target	panning- Runde	Variante	Position DNA-Codon								Position Aminosäure							
				2	4	6	15	17	19	36	38	2	4	6	15	17	19	36	38
bovin	IgG	4. Runde	Mu6DTrp	GAT	TGA	ACT	GAT	CAT	AAG	GCG	CAG	Asp	Trp	Thr	Asp	His	Lys	Ala	Gln
			Mu4GTrp	GCG	CCG	TGA	TCG	ACG	TCT	CGC	CTG	Ala	Pro	Trp	Ser	Thr	Ser	Arg	Leu
human	IgG	1. Selektion 1. Runde	SPC-1-A1	TTT	TGG	ATG	AGG	GAT	GGT	AAG	AAG	Phe	Trp	Met	Arg	Asp	Gly	Lys	Lys
			SPC-1-A7	CTG	TGT	TCT	AGG	CGT	CTG	AAT	TGG	Leu	Cys	Ser	Arg	Met	Leu	Asn	Trp
			SPC-1-B11	TTT	TTT	CTT	TTG	CGT	CTG	CCG	TAG	Phe	Phe	Leu	Leu	Arg	Arg	Pro	Gln
			SPC-1-C7	CTT	GCG	CTG	TAG	AGG	TCG	GGG	AAT	Leu	Ala	Leu	Gln	Arg	Ser	Gly	Asn
			SPC-1-C8	CTT	AAT	TTG	CTG	GCG	ATG	CGG	TAG	Leu	Asn	Leu	Leu	Ala	Met	Arg	Gln
			SPC-1-G3	TCT	ATT	CTT	ATT	GGT	ACT	GTG	CAG	Ser	Ile	Leu	Ile	Gly	Thr	Val	Gln
			SPC-1-H5	GTT	GTT	ATT	GCT	ATG	GCT	TGT	CGT	Val	Val	Ile	Ala	Met	Ala	Cys	Arg
human	IgG	2. Selektion 3. Runde mit Arginin	SPC-1-H7a	TCG	TGG	TGT	GGG	GAT	CGT	GTG	CTG	Ser	Leu	Cys	Gly	Asp	Arg	Val	Leu
			SPC-1-H8a	GCT	TGG	TTT	GCG	AAG	CGG	GGG	CTG	Ala	Leu	Phe	Ala	Lys	Arg	Gly	Leu

Biblio- thek	target	panning- Runde	Variante	Position DNA-Codon								Position Aminosäure							
				2	4	6	15	17	19	36	38	2	4	6	15	17	19	36	38
human	IgG	2. Selektion	SPC-1-B2	GGT	CGT	CGT	CTG	GAG	GCG	TCG	CGT	Gly	Arg	Arg	Leu	Glu	Ala	Ser	Arg
		3. Runde	SPC-1-F12	TTG	TAT	TTT	TTG	GTG	CAT	TTT	TTG	Leu	Tyr	Phe	Leu	Val	His	Phe	Leu
		ohne Arginin	SPC-1-C9	CTG	TTT	GGT	GAT	TCG	CTG	AGG	TAG	Leu	Phe	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Gln
		SPC-1-E12	TTA	CTG	TTG	CAG	CGT	GTG	GTG	TAG	Leu	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Val	Gln	
		SPC-1-G9	ATT	TTG	TTG	TAG	ACG	GGG	GAG	GAG	Ile	Leu	Leu	Gln	Thr	Gly	Glu	Glu	
		SPC-1-E7	GTT	CTT	TTT	TTT	AGG	ATG	TAG	AGG	Val	Leu	Phe	Phe	Arg	Met	Gln	Arg	
		SPC-1-B3	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-1-F1	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-1-E5	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-1-D5	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-1-E3	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-1-F7	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-1-D8	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-1-E9	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-1-C10	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-1-C7	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-1-D7	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-1-E8	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	

Biblio- thek	target	panning- Runde	Variante	Position DNA-Codon								Position Aminosäure							
				2	4	6	15	17	19	36	38	2	4	6	15	17	19	36	38
human	IgM	1. Selektion	SPC-2-A2a	GTG	TTT	GTG	AGG	GTT	GCG	TAT	AGT	Val	Phe	Val	Arg	Val	Ala	Tyr	Ser
		3. Runde	SPC-2-F4a	TGG	AGG	GTG	GGG	AAG	AAT	AGT	TTG	Trp	Arg	Val	Gly	Lys	Asn	Ser	Leu
		mit Arginin	SPC-2-B2a	TTG	ATT	CTT	AGT	TAG	GTT	AAG	TTG	Leu	Ile	Leu	Ser	Gln	Val	Lys	Leu
		SPC-2-D2a	TCT	CTT	TAT	TAG	GTG	GCT	AAT	TTT	Ser	Leu	Tyr	Gln	Val	Ala	Asn	Phe	
		SPC-2-A12a	TGG	GTT	TTT	TGG	CAT	TAG	CTG	AGT	Trp	Val	Phe	Trp	His	Gln	Leu	Ser	
		SPC-2-D7a	GCT	TAG	TTT	GCG	AAG	CGG	GAG	CTG	Ala	Gln	Phe	Ala	Lys	Arg	Glu	Leu	
		SPC-2-G7a	GTT	AGT	TCT	TGG	TAG	GAT	GAT	GTT	Val	Met	Ser	Trp	Gln	Asp	Asp	Val	
		SPC-2-E5a	TTT	TGT	ACT	GAG	TAG	ATG	AGT	TAG	Phe	Cys	Thr	Glu	Gln	Met	Ser	Gln	
		SPC-2-A1a	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-2-H1a	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-2-B11a	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-2-B12a	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-2-D12a	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-2-C7a	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-2-F7a	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-2-A8a	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-2-C8a	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-2-F8a	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-2-G8a	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	
		SPC-2-C9a	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	

Biblio- thek	target	panning- Runde	Variante	Position DNA-Codon								Position Aminosäure							
				2	4	6	15	17	19	36	38	2	4	6	15	17	19	36	38
human	IgM	1. Selektion	SPC-2-G7	TTT	ATT	CTT	AGT	AAG	GTT	AAG	TGG	Phe	Ile	Cys	Ser	Lys	Val	Lys	Trp
		3. Runde	SPC-2-D10	TTT	TTT	TTG	CTT	GCG	GCG	AAG	CTG	Phe	Phe	Leu	Leu	Ala	Ala	Lys	Leu
		ohne Arginin	SPC-2-F11	CTG	CGT	TAT	AAG	GGG	ATT	ACG	CGT	Leu	Arg	Tyr	Leu	Gly	Ile	Thr	Arg
			SPC-2-H1	TGG	AGG	GTG	GGG	AAG	AAT	AGT	TTG	Trp	Arg	Val	Gly	Lys	Asn	Ser	Leu
			SPC-2-E3	TGG	AGG	GTG	GGG	AAG	AAT	AGT	TTG	Trp	Arg	Val	Gly	Lys	Asn	Ser	Leu
			SPC-2-C12	TGG	AGG	GTG	GGG	AAG	AAT	AGT	TTG	Trp	Arg	Val	Gly	Lys	Asn	Ser	Leu
			SPC-2-C8	GCT	TAG	TTT	GCG	AAG	CGG	GAG	CTG	Ala	Gln	Phe	Ala	Lys	Arg	Glu	Leu
			SPC-2-F9	GTT	CTT	TTT	TTT	AGG	ATG	TAG	AGG	Val	Leu	Phe	Phe	Arg	Met	Gln	Arg
			SPC-2-E11	CTT	CTT	TTT	GGG	GAT	TAG	GAT	GGG	Leu	Leu	Phe	Gly	Asp	Gln	Asp	Gly
			SPC-2-A4	GTT	CTT	GTG	AAT	GGG	GTG	TAG	TGT	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Val	Gln	Cys
			SPC-2-A9	TGG	TTT	TCT	TAG	GGG	AAG	GCG	GAG	Trp	Phe	Ser	Gln	Gly	Lys	Ala	Glu
			SPC-2-F2	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln
			SPC-2-E7	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln
			SPC-2-H2	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln
			SPC-2-G3	CTT	CTT	TTT	TAG	GTG	ACG	AGG	TAG	Leu	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Arg	Gln

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Rainer Rudolph für die Überlassung des Themas. Sein fast alltägliches „Was gibt´s Neues?“ und seine Diskussionsbereitschaft und konstruktiven Vorschläge haben entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen.

Ulrike Fiedler möchte ich für ihr unablässiges Interesse in manchmal auch sehr schwierigen Zeiten danken. Gerade am Anfang der Arbeiten hat sie mir das Verständnis für die Evolution von Proteinen vermittelt. Ihr kritisches Korrekturlesen hat hoffentlich zur Verständlichkeit der Arbeit geführt.

Prof. Milton Stubbs danke ich für die Hilfe bei der Kristallisation, vor allem bei der Datensammlung, der Modellierung und der kristallographischen Verfeinerung der gelösten Kristallstrukturen, was mein Interesse an der Proteinkristallographie geweckt hat.

Hauke Lilie danke ich für viele Diskussionen zu Themen rund um die Arbeit, inklusive der Korrektur dieser Arbeit und natürlich für die Messungen mit „seiner“ Ultrazentrifuge.

Tanja danke ich für die unmittelbare Betreuung im Labor, vor allem der Lösung von Problemen, die frische Doktoranden so haben. Erik danke ich für die Nachfolge-Betreuung vor allem in kristallographischen Fragen.

Der Therapiegruppe von Scil gebührt mein Dank für die abendlichen Sitzungen im Konferenzraum und allen anderen „normalen“ Mitarbeiten von Scil Proteins für die schöne Zusammenarbeit. Besonderer Dank an Jörg und Ede bei der Lösung von Problemen bei der Verarbeitung von Nullen und Einsen.

Der Küchenbesatzung danke ich für ihre Standhaftigkeit.

Der Mittagsgruppe danke ich nicht nur für die aufmunternden Unterhaltungen beim Mittagessen sondern auch für die vielen unvergesslichen Stunden, wenn wir mal wieder etwas Schönes unternommen haben.

Dank an alle Mitarbeiter des Institutes für Biotechnologie für die Unterstützung der Industrie.

Ich danke den Firmen Multimatrix GmbH aus Regensburg für die Luminex-Messungen, Cell trend GmbH aus Luckenwalde für die Kopplungs-experimente mit POD und Aurigon Life Science GmbH für die Durchführung der Clearance.

Die bisher noch nicht erwähnten Korrekturleser Susi, Tanja und Erik haben einen nicht zu unterschätzenden Anteil an Ausdruck, Rechtschreibung und Grammatik der Arbeit.

Susi hab Dank für alles!

Das Wichtigste in meinem Leben ist meine Familie. Danke an Euch alle!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Arbeit bisher weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, noch an einer anderen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe.

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Halle (Saale), den 07.07. 2004

Hilmar Ebersbach

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Hilmar Ebersbach
Anschrift: Rainstraße 7
06114 Halle
Geburtsdatum: 07.02.1975
Geburtsort: Halle/Saale
Familienstand: ledig
Kinder: Johanna, 5 Jahre
Raven, 2 Jahre
Moritz, 2 Jahre

Bildungsweg

09/1981 – 08/1986 7. Polytechnische Oberschule „Dr. Richard Sorge“ in Halle-Neustadt
09/1986 – 08/1991 Kinder- und Jugendsportschule „Friedrich Engels“ in Halle
09/1991 – 07/1993 Sportgymnasium Halle, Abitur mit dem Prädikat „gut“
10/1993 – 09/1994 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/1994 – 09/1995 Wehrdienst in der Panzerpionierkompanie 51 in Hessisch-Lichtenau
10/1995 – 09/1999 Fortsetzung des Biochemiestudiums an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
07/1998 – 09/1998 Diplomprüfungen in den Fächern: Biochemie, Enzymologie, Mikrobiologie, Organische Chemie und Technische Biochemie
10/1998 – 09/1999 Diplomarbeit zum Thema „Mikroheterogenität der 16S-rRNA-Gene in der Gattung *Desulfitobacterium* und physiologische Charakterisierung von Stamm TCP-A“ am Institut für Mikrobiologie unter Leitung von Prof. Dr. J.R.Andreesen,
09.09.1999 Diplomverteidigung mit dem Prädikat „sehr gut“

10/1999 – 03/2000	Forschungsstipendiat der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
04/2000 – 07/2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Dr. Peter Neubauer
seit 08/2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand in der Firma Scil Proteins GmbH zur Anfertigung der Promotionsarbeit