

Generierung schaltbarer artifizierlicher Bindeproteine auf Basis von Gerüstproteinen der $\beta\gamma$ -Kristallin Familie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt bei der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dominik Schneider

geb. am 03.11.1981 in Gießen/Hessen

Gutachter/in

1. Dr. habil. Hauke Lilie
2. Prof. Dr. Harald Kolmar
3. Prof. Dr. Peter Neubauer

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.12.2017, Halle (Saale)

Zusammenfassung

Antikörper und deren Fragmente werden derzeit sehr erfolgreich als hochspezifische Bindemoleküle einer Vielzahl von Zielstrukturen für therapeutische, analytische und auch technische Applikationen verwendet. Besonders in technischen Einsatzgebieten, etwa als Liganden in Affinitätschromatographien, ist die Verwendung von Antikörpern jedoch aufgrund der kostenintensiven Herstellung limitiert. Durch die Verwendung artifiziell generierter Bindeproteine können durch die Abfolge von Diversifizierung und Selektion kostengünstig herstellbare Moleküle zur spezifischen molekularen Erkennung von Zielstrukturen generiert werden. Ein durch die hohen Affinitäten dieser Systeme bestimmter, gemeinsamer Nachteil besteht in der Notwendigkeit harter Pufferbedingungen zur Desorption gebundener Zielstrukturen, was zu verringerten Produktqualitäten und Einbußen in der Ausbeute führen kann. Die Eignung zur Herstellung künstlicher Bindeproteine konnte für eine Vielzahl an verschiedenen Gerüstproteinen (*scaffolds*) gezeigt werden, darunter auch die Proteinklasse der β -Kristalline (Fiedler *et al.* 2006; Ebersbach *et al.* 2007).

In der vorliegenden Arbeit werden neuartige künstliche Bindeproteine entwickelt, die auf Ca^{2+} -sensitiven Gerüstproteinen der β -Kristallin-Familie basieren. Diese Bindeproteine fungieren als molekulare Schalter, die eine hohe Affinität zum Zielprotein im Ca^{2+} -gebundenen und eine geringere Bindungsstärke im Ca^{2+} -freien Zustand aufweisen und somit Vorteile konventioneller Systeme mit der Möglichkeit zur schonenden Desorption der Interaktionspartner ermöglichen.

Zur Entwicklung des Bindeproteins wurden in der Literatur beschriebene Kandidaten der Proteinfamilie der β -Kristalline ausgewählt, in *E. coli* rekombinant produziert und anschließend charakterisiert. Anhand der Ergebnisse dieser Charakterisierung wurde das Sporenhüllprotein Protein S aus *Myxococcus xanthus* als aussichtsreichstes *scaffold* zur Generierung Ca^{2+} -abhängiger künstlicher Bindeproteine identifiziert. Als Vorbereitung für eine Bibliotheksgenerierung auf Basis des Protein S wurden Untersuchungen zur Toleranz von Aminosäureaustauschen in den Schleifen-Regionen des Proteins durchgeführt. Über Methoden der ortsgerichteten Mutagenese wurden Varianten des Proteins mit einzelnen Aminosäuresubstitutionen definierter Lokalisation produziert und charakterisiert. Aminosäurepositionen, deren Randomisierung nur geringe Auswirkungen auf die Stabilität oder Löslichkeit des Gerüstproteins zeigten, wurden zu zusammenhängenden Bereichen zusammengefasst. Auf dieser Basis wurden zwei unterschiedliche, partiell überlappende Oberflächenbereiche des Protein S definiert, die sich für die Generierung von Diversität als geeignet erwiesen und zwei entsprechende Bibliotheken mit hoher Diversität und Funktionalität generiert.

Eine der beiden Bibliotheken wurde ausgewählt und für die selektive Anreicherung Ca^{2+} -sensitiv bindender Varianten gegen das Modellprotein sfGFP verwendet. Nach der Etablierung und Charakterisierung zweier unterschiedlicher *display*-Verfahren wurde ein Ribosomen-*display* für die Selektion der Bibliothek eingesetzt. Zur selektiven Anreicherung Ca^{2+} -sensitiver Bindeproteine wurde die Elution gebundener Varianten über die Verfügbarkeit von Ca^{2+} im Puffersystem realisiert.

Zur Identifizierung von Proteinvarianten mit Ca^{2+} -schaltbarer Bindung an die Zielstruktur

sfGFP wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren zur automatisierten Durchmusterung von Proteinvarianten der Selektionsfraktionen entwickelt und mit hohem Durchsatz durchgeführt.

Eine detaillierte Charakterisierung der identifizierten sfGFP-bindenden Varianten zeigte hohe Affinitäten und Spezifitäten mit schaltbarem Charakter der Interaktionen. Die Beste der analysierten Varianten zeigte eine Bindungsstärke im sub-nanomolaren Bereich in Anwesenheit von Ca^{2+} . Es konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von Ca^{2+} nicht nur die Komplexbildung der Protein S-Variante und sfGFP unterbunden, sondern auch bestehende Komplexe dissoziiert werden können.

Für den Nachweis der praktischen Anwendbarkeit der Bindeproteine als neuartige Liganden einer Affinitätschromatographie wurde die aussichtsreichste Protein S-Variante auf der Oberfläche einer säulenchromatographischen Matrix immobilisiert und die Ca^{2+} -abhängige Reinigung der Zielstruktur sfGFP an der hergestellten Affinitätsmatrix gezeigt.

Inhalt

Abkürzungen.....	vi
1. Einleitung.....	1
1.1 Chromatographische Proteinreinigung.....	1
1.2 Antikörper und künstliche Bindeproteine.....	4
1.3 Die $\beta\gamma$ -Kristallin-Familie als <i>scaffold</i> zur Generierung künstlicher Bindeproteine.....	7
1.4 Generierung artifizieller Bindeproteine.....	10
1.5 Zielstellung.....	14
2. Materialien.....	15
2.1 Chemikalien.....	15
2.2 Oligodesoxynukleotide.....	17
2.3 Plasmide.....	17
2.4 Mikroorganismen.....	18
2.5 Helferphagen.....	19
2.6 Nährmedien.....	19
2.7 Puffer und Lösungen.....	20
2.8 Enzyme.....	21
2.9 Antibiotika.....	21
2.10 Kits und Standards.....	22
2.11 Geräte und Zubehör.....	22
2.12 Software.....	26
3. Methoden.....	27
3.1 Mikrobiologische Methoden.....	27
3.1.1 Verwendung von <i>Escherichia coli</i>	27
3.1.2 Verwendung von <i>Myxococcus xanthus</i>	30
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	31
3.2.1 Enzymatische Spaltung und Dephosphorylierung von DNA.....	31
3.2.2 Ligierung von DNA.....	31
3.2.3 Agarosegelelektrophorese.....	32
3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
3.2.5 DNA-Isolierung aus Zellen, Agarosegelen oder PCR-Ansätzen.....	33
3.2.6 Ethanol-Fällung von DNA.....	34
3.2.7 Photometrische Konzentrationsermittlung von Nukleinsäuren.....	34
3.2.8 Sequenzierung von DNA.....	34
3.3 Präsentation von Proteinen über Phagen- <i>display</i> und evolutionäre Selektion durch Ribosomen- <i>display</i>	34

3.3.1	Erstellung einer Protein S DNA-Bibliothek.....	35
3.3.2	Präsentation von Protein S auf der Oberfläche von Bakteriophagen	37
3.3.3	Präsentation von Protein S über Ribosomen- <i>display</i>	38
3.3.4	Gekoppelte <i>in vitro</i> - Transkription und -Translation	38
3.3.5	Immobilisierung zielspezifischer und Ca ²⁺ -abhängiger ternärer Komplexe	39
3.3.6	Isolierung und reverse Transkription von mRNA.....	41
3.3.7	Quantifizierung von cDNA	42
3.3.8	Gekoppelte Restriktion und Ligation	42
3.3.9	Klonierung der DNA-Bibliotheken.....	43
3.4	Proteinchemische und -analytische Methoden	43
3.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.4.2	Automatisierte Proteinreinigung	44
3.4.3	Photometrische Konzentrationsermittlung von Proteinen	47
3.4.4	Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen	47
3.4.5	<i>Differential scanning fluorimetry</i> (DSF).....	47
3.4.6	Amin-spezifische Modifikation von Proteinen	48
3.4.7	ELISA (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)	49
3.4.8	Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie	50
3.4.9	Analytische Ultrazentrifugation	54
3.4.10	Bindungsanalyse von Varianten des Protein S an Myxosporen.....	54
3.5	Massenspektrometrie	55
4.	Ergebnisse.....	56
4.1	Auswahl und rekombinante Produktion potentieller Gerüstproteine basierend auf Kristallin-Homologen	56
4.2	Charakterisierung potentieller Randomisierungsbereiche auf Protein S	60
4.3	Selektion einer Protein S-Bibliothek gegen sfGFP.....	64
4.3.1	Generierung und Charakterisierung naïver Protein S-Bibliotheken.....	64
4.3.2	Selektion der Bibliothek PS_145 gegen sfGFP mittels Ribosomen- <i>display</i>	68
4.4	Identifikation und Charakterisierung sfGFP bindender Protein S-Varianten.....	69
4.4.1	Automatisierte Durchmusterung	69
4.4.2	Sequenzanalyse sfGFP-bindender Bibliotheksvarianten	71
4.4.3	Sekundäranalysen sfGFP-bindender Bibliotheksvarianten.....	73

4.5	Produktion und Charakterisierung von sfGFP-bindenden Einzelvarianten..	76
4.5.1	Rekombinante Produktion sfGFP-bindender Protein S-Varianten ...	76
4.5.2	Bindungsanalysen ausgesuchter Varianten	77
4.6	Detaillierte Analysen der Protein S-Variante CID 24.....	82
4.6.1	Untersuchungen zu molekularen Bindungsmechanismen	82
4.6.2	Ca ²⁺ -Abhängigkeit eines molekularen Schalters basierend auf Protein S CID 24.....	84
4.6.3	Bindungsanalysen mit immobilisierter Protein S-Variante.....	85
4.6.4	Thermodynamische Messungen.....	86
4.6.5	Stöchiometrie und Ca ²⁺ -Abhängigkeit der Komplexbildung von CID 24 und sfGFP	87
4.7	Einsatz des schaltbaren Bindeproteins CID 24 als Ligand zur affinitätschromatographischen Reinigung von sfGFP.....	88
4.7.1	Immobilisierung und Etablierung eines Reinigungsprotokolls auf Basis der Protein S-Variante CID 24	88
4.7.2	Kapazitätsbestimmung bei Verwendung des Ca ²⁺ - schaltbaren Bindeproteins CID 24 als Ligand einer Affinitätschromatographie.	89
4.7.3	Elutionsprofil bei Verwendung des Ca ²⁺ -schaltbaren Bindeproteins CID 24 als Ligand einer Affinitätschromatographie	90
4.7.4	<i>Capturing</i> von sfGFP aus einer verdünnten Lösung.....	90
4.7.5	Reinigung von sfGFP aus Lysaten.....	91
5.	Diskussion.....	94
5.1	Design einer Proteinbibliothek für die Erzeugung schaltbarer Bindeproteine auf Basis von Protein S als Gerüststruktur	96
5.2	Generierung eines künstlichen schaltbaren Bindeproteins gegen sfGFP ...	100
5.3	Charakterisierung der Interaktion zwischen Protein S- Varianten und sfGFP	106
5.4	Verwendung des schaltbaren Bindeproteins CID 24 als neuartigen Liganden für die Affinitätschromatographie	112
6.	Ausblick.....	120
7.	Literaturverzeichnis	122
	Anhang.....	A 1

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Å	Ångström, $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
α	Anti-
A.U.	<i>arbitrary units</i>
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
ATP	Adenosintriphosphat
A _{xxx}	Extinktion bei der Wellenlänge xxx nm
BLI	<i>Bio-layer-Interferometrie</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	freie Calciumionen
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C _H	konstante Domäne der schweren Kette
C _L	konstante Domäne der leichten Kette
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CID	Varianten-Identifikationsnummer (<i>clone-ID</i>)
CM5	Sensorchip mit carboxymethylierter Dextranoberfläche
CV	Säulenvolumen
Da	Dalton
DARPIN	<i>designed ankyrin-repeat protein</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
eGFP	„enhanced“ grünfluoreszierendes Protein (PDB: 2Y0G)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	<i>fragment antigen-binding</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
Fv	<i>fragment variable</i>
g	Erdbeschleunigung ($= 9,81 \frac{\text{m}}{\text{s}^2}$)
GFP	Grünfluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i>
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
ITT	gekoppeltes <i>in vitro</i> -Transkriptions- und -Translationverfahren
IUPAC	<i>international union of pure and applied chemistry</i>
k _a	Assoziationsrate $[\frac{1}{M \times s}]$
k _d	Dissoziationsrate $[\frac{1}{s}]$
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante [M]
LB	<i>lysogeny broth</i>
M	Molar

mAU	milli- <i>absorption units</i>
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight</i>
MC	M-Kristallin aus <i>Methanosarcina acetivorans</i> (PDB:2K1W)
min	Minute
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
<i>M. xanthus, MX</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
n.a.	nicht vorhanden (<i>not available</i>)
n.e.	nicht auswertbar (<i>not evaluable</i>)
n.m.	nicht messbar
NMR	Kernmagnetresonanz-Spektroskopie
p.A.	für die Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Phagen- <i>display</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Polypropylen
PS	Protein S aus <i>Myxococcus xanthus</i> (PDB: 1PRR, 1PRS)
PSh	Protein S-Homolog aus <i>Myxococcus xanthus</i>
PSt	Polystyrol
RD	Ribosomen- <i>display</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RU	Resonanzeinheiten des Biacore T100
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Sedimentationskoeffizient [10^{-13} s]
SA	Streptavidin
S3a	Spherulin 3a aus <i>Physarum polycephalum</i> (PDB:1AG4,1HDF)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie
sfGFP	<i>superfolder</i> -grün fluoreszierendes Protein (PDB: 2B3P)
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
tag	Fusionspeptid
target	Zielmolekül, Antigen
TAT	Twin-Arginin Transport
T _m	mittlere Übergangstemperatur
TMB	3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
v/v	Volumen/Volumen
V _H	variable Domäne der schweren Kette
V _L	variable Domäne der leichten Kette
v/w	Volumen/Masse
wt	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Chromatographische Proteinreinigung

Mit zunehmendem Erfolg rekombinant produzierter Proteine für den Einsatz in Therapie, Diagnostik oder Analytik steigt der Bedarf kostengünstiger und hoch spezifischer Reinigungsmethoden. Neben prokaryotischen Expressionssystemen erfolgt die Produktion komplex aufgebauter Proteine oftmals auch über den Einsatz von eukaryotischen Systemen, was die Entwicklung von effektiven Reinigungsstrategien die mit diesen Systemen kompatibel sind notwendig macht (Chase 1984; Roque und Lowe 2008). Zur Herstellung eines Zielproteins ist die Reinigung aus komplexen Gemischen notwendig. Die entstehenden Produktionskosten der Proteinreinigung können mit 40–80% einen wesentlichen Anteil der Gesamtkosten ausmachen (Ransohoff *et al.* 1990; Labrou und Clonis 1994; Saraswat *et al.* 2013). Allgemeingültige Reinigungsstrategien können nicht definiert werden, da eine Vielzahl an Faktoren eine Rolle spielt. Neben den intrinsischen Eigenschaften des Zielproteins wie dem isoelektrischen Punkt, der Hydrophobizität oder der Größe spielt der geplante Verwendungszweck ebenso eine Rolle wie die Produktionsbedingungen. Bei der Entwicklung neuer Reinigungsstrategien gelten jedoch oftmals ähnliche Grundprinzipien. So richtet sich die endgültige Produktreinheit stets nach dem Verwendungszweck und die Zahl der dafür notwendigen Reinigungsschritte wird minimiert, um Verluste zu verringern. Initiale Reinigungsschritte nach Extraktion oder Homogenisation des Probenmaterials dienen oftmals der Stabilisierung, der grundlegenden Reinigung und der Isolierung des Zielkonstruktes aus großen Volumina.

Zur Produktion von großen Mengen an Protein mit geringer Reinheit für technische Anwendungen reichen oftmals Fällungsreaktionen aus, die kostengünstig durchführbar sind. Mit steigendem Anspruch an Reinheit und Qualität der Zielproteine werden häufig mehrere Reinigungsschritte mit chromatographischen Systemen durchgeführt. Traditionelle Technologien wie Ionenaustausch-, hydrophobe Interaktionschromatographie oder Fällungsreaktionen werden zunehmend durch auf biologischen Interaktionen beruhende Technologien ersetzt (Chase 1984; Roque und Lowe 2008). Seit der Reinigung von α -Amylase über unlösliche Stärke durch Starkenstein (1910) und der Begriffsbildung der Affinitätschromatographie (Cuatrecasas *et al.* 1968) wurde die Forschung nach neuen Liganden und Matrices intensiviert.

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Komplexbildung eines immobilisierten Liganden mit dem zu reinigenden Zielprotein. Neben verwendbaren Trägermaterialien und Immobilisierungstechniken sind daher vor allem auch die Entwicklung neuartiger Liganden und von Desorptionsmethoden gebundener Zielstrukturen von Interesse. So wurden bereits früh aufgrund hoher Substratspezifität in einer Vielzahl von Applikationen immobilisierte Enzyme verwendet. Beispiele umfassen den Einsatz von DD-Peptidase zur Reinigung von Penicillin (Eng *et al.* 1995) oder von Trypsin zur Reinigung von Protease-Inhibitoren (Fritz *et al.* 1970). Neben der Verwendung von immobilisierten Enzymen oder Substraten können auch weitere natürliche Interaktionspartner für eine Reinigung genutzt werden. So lassen sich z.B. für die Reinigung von Antikörpern oder Fc-fusionierten Zielproteinen Immunglobulin-bindende Proteine bakterieller Herkunft verwenden. Typische Beispiele sind die Verwendung von Protein A aus *Staphylococcus aureus* (Goding 1978) oder

Protein G aus C- und G-*Streptococcus*-Stämmen (Bjorck und Kronvall 1984). Da Interaktionspartner für Zielproteine nicht immer verfügbar sind oder sich nicht als Ligand eignen, wurden in den letzten Dekaden unterschiedlichste Systeme beschrieben, um eine Vielzahl an Zielstrukturen für eine affinitätschromatographische Reinigung zugänglich zu machen. Eine Möglichkeit besteht in der genetischen Fusion des Zielproteins mit einem Peptid (*tag*) oder einer Proteindomäne, die für eine spezifische Reinigung verwendet werden können (Arnau *et al.* 2006; Kimple *et al.* 2013). So eignen sich beispielsweise poly-Histidin-Fusionen, deren Komplexbildung mit immobilisierten Metallionen mit Affinitäten im mikromolaren Bereich erfolgt (Porath *et al.* 1975; Hochuli *et al.* 1987; Smith *et al.* 1988). Typischerweise werden sechs (hexa-) bis acht (octa-) Histidine als Fusion verwendet. Auch können spezifische Interaktionen bekannter Bindungspartner genutzt werden, etwa Antigene von Antikörpern wie den Flag-*tag* (Hopp *et al.* 1988) oder Streptavidin-bindende Peptide wie den Strep-*tag* II (Voss und Skerra 1997). Klassische Beispiele für die Verwendung von Fusionsproteinen sind die Glutathion-S-Transferase (Smith und Johnson 1988), hexahistidin-SUMO-Fusionen (Butt *et al.* 2005) oder das Maltose-Bindeprotein (di Guana *et al.* 1988). Die Auswahl des zu verwendenden Fusionskonstruktes richtet sich sowohl nach dem Zielprotein, als auch nach dem Produktionsverfahren. So können zur Verbesserung der Löslichkeit von Zielproteinen Fusionen verwendet werden, die zeitgleich eine schonende affinitätschromatographische Reinigung ermöglichen. So wurde über die genetische Fusion mit einem *tandem-repeat*-Protein der N-terminalen Domäne von Protein S aus *Myxococcus xanthus* die Löslichkeit von humanen Proteinen erhöht und die Möglichkeit zur schonenden Reinigung über einen natürlichen Interaktionspartner ermöglicht (Kobayashi *et al.* 2009).

Vorhersagen darüber, welches der Systeme sich für die geplante Applikation am besten eignet, sind oftmals nicht möglich (Huth *et al.* 1997). Ein Nachteil der genetischen Fusionen mit Peptiden oder Proteinen ist deren potentieller Einfluss auf Eigenschaften des Zielproteins. Neben positiven Effekten wie einer verbesserten Löslichkeit des Zielproteins (Hammarstrom *et al.* 2002; Nallamsetty und Waugh 2006) können auch Konformationsänderungen auftreten (Chant *et al.* 2005) oder die enzymatische- (Kim *et al.* 2001) sowie die biologische Aktivität (Fonda *et al.* 2002) beeinflusst werden. In vielen Anwendungsbereichen ist daher die Entfernung der Affinitätsfusionen nach Reinigung der Zielstrukturen notwendig. Neben chemischen Verfahren, die häufig über eine geringe Spezifität verfügen und die Zielstrukturen modifizieren können (Nilsson *et al.* 1997), werden daher vor allem enzymatische Verfahren für die Entfernung von *tags* verwendet (Pina *et al.* 2014). Proteolytisch aktive Enzyme verfügen über Eigenschaften die es ermöglichen, die Zielproteine ohne zusätzliche Überhänge von Aminosäuren zu generieren. So benötigen beispielsweise die Enterokinase (Knappik und Plückthun 1994) oder der Faktor Xa (Abdullah und Chase 2005) keine spezifische Sequenz oder Aminosäure in der P1' Position des C-Terminus der Erkennungssequenz. Auch die Spaltung von Fusionsproteinen ist im Falle der SUMO-Technologie über konformations-spezifische Proteasen möglich (Butt *et al.* 2005). Die zusätzliche Last für das Expressionssystem im Zuge der Genepression kann jedoch zu geringeren Ausbeuten des Zielproteins führen. Ein Nachteil bei der Abspaltung von Affinitätsfusionen in Produktionsprozessen sind zusätzliche notwendige Inkubationszeiten für die Hydrolyse. Auch kann die Ausbeute an Zielprotein durch unvollständige Spaltung oder unspezifische Proteolyse sinken, was die Zielprotein-abhängige Optimierung der Reaktionsbedingungen notwendig machen kann.

Darüber hinaus ist es in der Regel notwendig, nach Spaltung der Affinitätsfusionen einen weiteren Reinigungsschritt durchzuführen, um das Zielprotein in reiner Form zu erhalten. Um unmodifizierte Zielproteine direkt aus komplexen Gemischen zu isolieren, wurden sowohl für analytische als auch für präparative Reinigungen mit Erfolg Antikörper-basierte Systeme verwendet (Secher und Burke 1980; Hardy *et al.* 2000). Die als Immunoaffinitätschromatographie bezeichnete Technologie verwendet immobilisierte Antikörper oder deren Fragmente zur spezifischen und zum Teil hoch-affinen Bindung von Zielstrukturen. Typische Affinitäten der verwendeten Antikörper zu den Zielstrukturen liegen zwischen 10^{-6} – 10^{-12} M (Moser und Hage 2010). Hohe Affinitäten der verwendeten Liganden zu den Zielstrukturen bieten Vorteile bei der Reinigung, da sie bessere Ausbeuten bei gering konzentriertem Zielprotein ermöglichen. Weiterhin beeinflussen die Bindungsstärke und -kinetik für die Chromatographie wichtige Prozessparameter wie die verwendete Flussrate oder Volumina für Waschschrte (Grabski 2009). Seit der Entwicklung der Hybridoma-Technologie durch Köhler und Milstein (1975) können monoklonale Antikörper generiert werden, was die Generierung homogener Liganden für immunoaffinitätschromatographische Verwendungen ermöglicht. Im Gegensatz zu polyklonal produzierten Antikörpern verfügen monoklonale Antikörper über identische Epitopspezifität, Affinität, Stabilität und strukturelle Eigenschaften. Gerade für die Entwicklung von Desorptionsmethoden nach Reinigung der Zielstrukturen ist die Homogenität der Bindung von Bedeutung, um identisch reproduzierbare Verfahren etablieren zu können. Oftmals sind empirische Ermittlungen der besten Bedingungen für die Elution nötig, da diese sich nicht nur nach dem verwendeten Liganden, sondern auch nach dem zu reinigenden Zielprotein selbst und dessen weiteren Verwendungszweck richtet. Die Bindung zwischen Antikörper und Antigen besteht aus einer Kombination aus ionischen Wechselwirkungen, hydrophoben Interaktionen, Wasserstoffbrücken und van-der-Waals-Interaktionen und ist vollständig reversibel. Grundsätzlich lassen sich Desorptionsmethoden gebundener Zielstrukturen nach verschiedenen Prinzipien gliedern: Schwächung der bestehenden Interaktion zwischen Ligand und Zielprotein, Entfernung von an der Bindung beteiligter Elemente, sowie Konkurrenz oder Änderung der Oberflächenstruktur des Paratopes durch Konformationsänderungen. Eine logische Abfolge bei der Entwicklung eines Elutionsverfahrens richtet sich nach Stringenz und Effektivität der Methoden (Abi-Ghanem und Berghman 2012; Kotadia Bhargav *et al.* 2012). Die Methode der Wahl besteht in der spezifischen Elution des Zielproteins durch Konformationsänderungen des verwendeten Liganden. Diese kann durch die Verfügbarkeit von Cofaktoren wie Metallionen oder chelatierenden Reagenzien wie EDTA erfolgen. So kann die Bindung des gegen das FLAG-tag gerichteten Antikörpers M1 durch die Verfügbarkeit von Ca^{2+} beeinflusst werden (Einhauer und Jungbauer 2001; Einhauser und Jungbauer 2003). Jedoch verfügt der Antikörper in beiden Schaltungszuständen über eine ähnliche Affinität im μM -Bereich (Einhauer und Jungbauer 2003). Für den Einsatz als molekularen Schalter sollten sich die Bindungseigenschaften des Liganden in An- und Abwesenheit des Cofaktors möglichst stark unterscheiden, um eine Reassemblierung der Zielstrukturen während der Elution zu vermeiden, da diese zu einer Verschlechterung des Elutionsprofils und der Ausbeute führt. Eine Möglichkeit zur Verwendung einer konformations- und Kofaktor-abhängigen Reinigungsmethode erfolgt durch die genetische Fusion der Zielkonstrukte mit Calmodulin-bindenden Peptiden (Stofko-Hahn *et al.* 1992). Das Peptid bindet mit nanomolarer Affinität in Anwesenheit von Ca^{2+} an Calmodulin

und ermöglicht daher sowohl eine effektive Bindung als auch stringente Waschschrte, was zu einer hohen Reinheit des Endproduktes führt. Nachteile des Systems liegen neben der Größe des Fusionskonstruktes von 26 Aminosäuren auch in der Elution des Zielkonstruktes, da die Komplexierung von Ca^{2+} durch den Zusatz hoher Salzkonzentrationen (1 M NaCl) unterstützt werden muss (Terpe 2003). Aufgrund vermehrter Bindung von Proteinen aus eukaryotischen Expressionssystemen an Calmodulin ist diese Methode in ihren Einsatzmöglichkeiten zusätzlich begrenzt (Head 1992; Terpe 2003).

Weiterhin können die Zielstrukturen auch spezifisch über kompetitive Methoden eluiert werden (Fitzgerald *et al.* 2011). In diesem Falle können wahlweise das auf dem Liganden befindliche Paratop, oder das auf der Zielstruktur befindliche Epitop adressiert werden. In beiden Fällen jedoch hängt der Erfolg der Elution stark von der Affinität des Liganden zu der Zielstruktur ab und es muss ein hoher molarer Überschuss des Kompetitors verwendet werden. Diese Methode resultiert in der Regel daher in breiten Elutionspeaks (Urh *et al.* 2009). Häufig wird für die Elution gebundener Strukturen von Liganden auf Basis von Antikörpern auf eine Änderung des pH-Wertes zurückgegriffen. Durch einen Pufferwechsel auf pH 2,0–2,5 werden sowohl ionische Wechselwirkungen als auch Wasserstoffbrückenbindungen (Narhi *et al.* 1997) der Bindung zerstört, unter Umständen jedoch auch die native Faltung der Liganden oder des Zielkonstruktes beeinflusst. Niedrige pH-Werte werden nach der Elution schnell neutralisiert, um die Zielproteine nicht weiter destabilisierenden Bedingungen auszusetzen. Meist können jedoch keine starken Basen verwendet werden, da es sonst zu einer Aggregation der Zielkonstrukte kommen kann (Shukla *et al.* 2007; Vazquez-Rey und Lang 2011). Die Verwendung schwächerer Neutralisationssysteme führen allerdings zu einem höheren Volumen für weitere Reinigungsschritte. Analog können auch basische pH-Werte verwendet werden, sofern die Zielproteine unter diesen Bedingungen stabiler sind. Weitere Methoden basieren auf dem Einsatz von chaotropen Salzen, welche es ermöglichen, die Hydrathülle der Bindungsfläche zu zerstören (Singh *et al.* 2003). Auch können weitere denaturierende Agenzien wie Harnstoff oder Guanidinchlorid, die zur partiellen oder kompletten Entfaltung von tertiären Strukturen führen, verwendet werden. Sofern das Zielprotein nicht in nativer Form für weitere Analysen verwendet werden soll, kann eine Elution über die Zugabe von SDS vermittelt werden.

1.2 Antikörper und künstliche Bindeproteine

Trotz der Möglichkeit, Antikörper und deren Fragmente als spezifische und hoch-affine Liganden in affinitätschromatographischen Reinigungen für unterschiedlichste Zielstrukturen zu verwenden, hat diese Technologie auch Nachteile. Diese beruhen vor allem auf der komplizierten Architektur der Antikörper, die als Multidomänenproteine von ca. 150 kDa zur Ausbildung ihrer korrekten Konformation auf Disulfidbrücken angewiesen und posttranslational modifiziert sind (Abbildung 1). Immunglobuline der IgG-Klasse bestehen aus vier Untereinheiten mit je zwei identischen leichten (L-Kette, ca. 25 kDa), und je zwei identischen schweren Polypeptidketten (H-Kette, ca. 50 kDa). Die einzelnen Ketten weisen mehrere Immunglobulindomänen von ca. 110 Aminosäuren mit vorwiegend antiparalleler beta-Faltblattstruktur auf. Eine zentral gelegene intramolekulare Disulfidbrücke stabilisiert jeweils die einzelnen Domänen, eine intermolekulare Disulfidbrücke assoziiert jeweils eine leichte mit einer schweren Kette. Zwischen der CH_1 - und der CH_2 -Domäne befindet sich eine sogenannte

Scharnierregion (*hinge*), in welcher die schweren Ketten in Abhängigkeit der Antikörperklasse über zwei bis drei intermolekulare Disulfidbrücken assoziiert sind. Die leichten Ketten bestehen aus einer variablen (V_L) und einer konstanten Domäne (C_L). Die schweren Ketten der Antikörper hingegen verfügen über eine variable (V_H) und mehrere konstante Domänen. Die Klassifizierung von Immunglobulinen erfolgt anhand der konstanten Domänen (Klasse A, D und G: C_{H1} bis C_{H3} , Klasse E und M: C_{H1} bis C_{H4}).

Durch Proteolyse mit Papain oder Pepsin können funktionale Antikörper-Fragmente generiert werden. Diese sind in Anwendungsbereichen einsetzbar, die nicht auf die durch das Fc-Fragment vermittelte Effektor-Funktionen, wie die Aktivierung des Komplementsystems oder die Induktion der Phagozytose (Janeway und Traves 1995), angewiesen sind. Durch die resultierende geringere Größe der Fab-Fragmente im Vergleich zum Gesamtmolekül bestehen zudem Vorteile, wie einer verbesserten Gewebepenetration bei *in vivo*-Anwendungen oder einer besseren Kopplungsdichte bei Immobilisierung auf festen Matrices in technischen Applikationen.

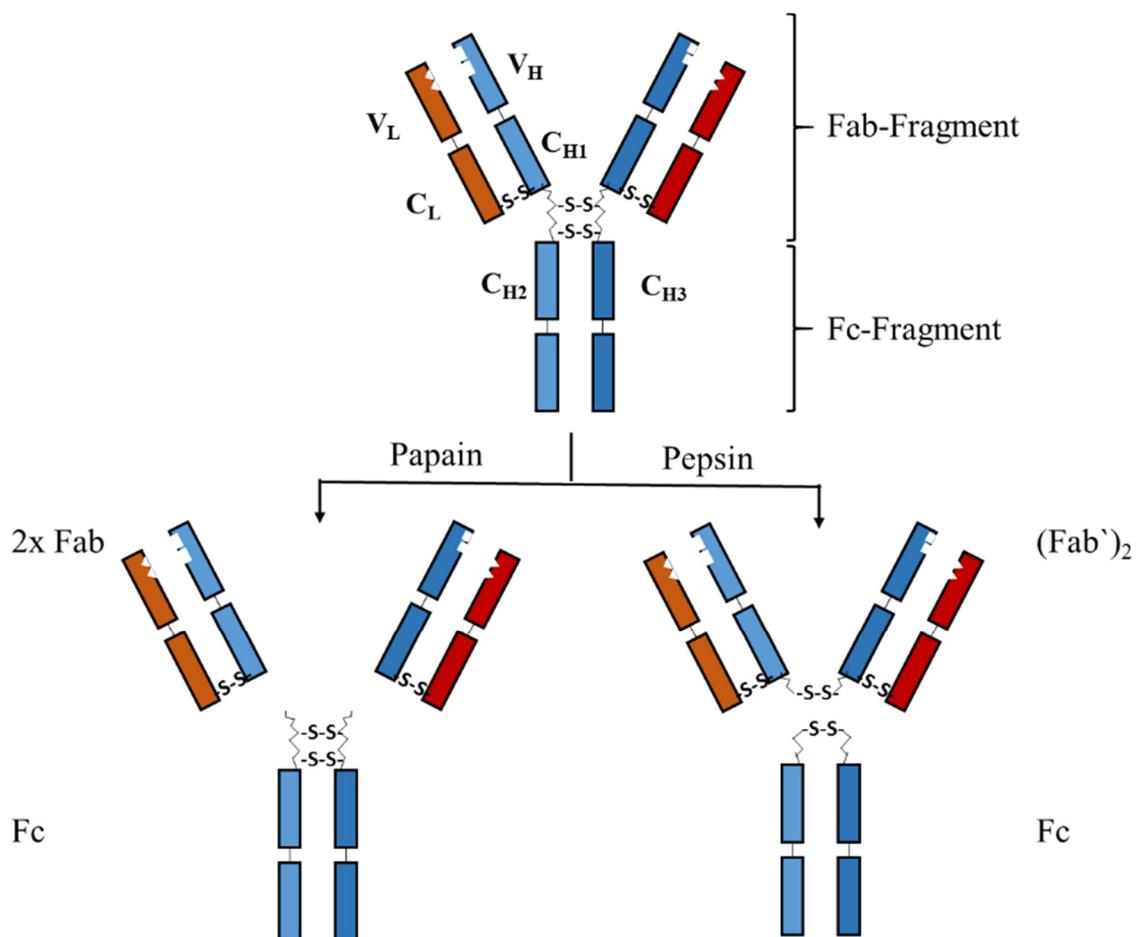


Abbildung 1: Schematischer Aufbau von Immunglobulinen. Modifizierte Darstellung nach Janson (2012).

Antikörper bestehen strukturell aus jeweils zwei identischen leichten und schweren Ketten, welche untereinander durch Disulfidbrücken verbunden sind. Der IgG1-Subtyp weist drei Konstante Domänen auf (C_H). Zwei dieser konstanten Domänen (C_{H2} und C_{H3}) bilden zusammen das Fc-Fragment, welches posttranslational modifiziert ist und auf welche die Effektorfunktionen der Antikörper zurückzuführen sind. Die schwere Kette C_{H1} bildet zusammen mit der konstanten Domäne der leichten Kette (C_L) und den variablen Domänen (V_L und V_H) das Fab-Fragment. Die hypervariablen Schleifenregionen der variablen Domänen werden als *complementarity determining regions* (CDRs) bezeichnet und sind für die Antigenbindung verantwortlich. Durch den enzymatischen Verdau durch Papain (Fab/Fc) oder Pepsin ($\text{F}[\text{ab}]_2/\text{Fc}$) können unterschiedliche Antikörperfragmente erhalten werden.

Die Produktion von monoklonalen Antikörpern umfasst aufgrund der komplexen Architektur komplizierte Klonierungsstrategien sowie die parallele Expression zweier Strukturgene und die Ausbildung korrekter Disulfidbrücken. Prokaryotische Expressionssysteme zeigen Nachteile bei der Produktion funktionaler Antikörper, da das im bakteriellen Zytoplasma vorliegende reduzierende Milieu die Ausbildung von Disulfidbrücken verhindert, was die korrekte Faltung von Antikörpern nicht zulässt und zur Aggregation der Moleküle führt. Die Produktion von Antikörperfragmenten in prokaryotischen Zellen erfolgt daher oftmals wahlweise in Form von *inclusion bodies*, was Rückfaltungsprozesse notwendig macht, oder durch die Sekretion in das bakterielle Periplasma während der Proteinbiosynthese. Da bakterielle Systeme jedoch keine posttranslationale Glykosylierung von Proteinen ermöglichen, ist der Einsatz dieser Systeme bei der Produktion von Antikörpern limitiert, da eine korrekte Glykosylierung für viele (therapeutische) Effektorfunktionen eine Voraussetzung ist. Die Biosynthese von monoklonalen Antikörpern erfolgt daher in der Regel in eukaryotischen Zelllinien wie den *chinese hamster ovary (CHO)*-Zellen. Zusammen mit der Reinigung der Antikörper über Protein A-funktionalisierte Säulen ist diese Produktionsmethode jedoch vergleichsweise kosten- und zeitintensiv, was die Anwendung der produzierten Antikörper für Affinitätschromatographien in großem Maßstab unattraktiver macht.

Um eine kostengünstigere und leicht handhabbare Alternative zu den komplex aufgebauten Antikörpern zu schaffen, wurde seit den 1990er Jahren an der Entwicklung künstlicher Bindeproteine gearbeitet. Das Prinzip der künstlichen Bindeproteine ähnelt dem Konzept der Antikörper, bei welchen sich auf einem konservierten Gerüst (V_H, V_L) hochvariable Schleifenregionen (CDR 1–3) befinden. Analog wird im Falle der künstlichen Bindeproteine auf einem rigiden Gerüst (*scaffold*) in definierten oberflächenexponierten Bereichen Diversität generiert. In anschließenden Selektions- und *screening*-Verfahren werden aus einer so erstellten Bibliothek Derivate mit gesuchtem Eigenschaftsprofil isoliert. Als Gerüstproteine wurden inzwischen über 50 strukturell unterschiedliche Proteine verwendet (Ruigrok *et al.* 2011), die über eine völlig andere Topologie als Immunglobuline verfügen können (Hey *et al.* 2005; Gebauer und Skerra 2009). Kriterien zur Auswahl eines geeigneten Gerüstproteins beinhalten neben einer einfachen Struktur vor allem auch eine hohe thermodynamische Stabilität. In der Regel bestehen *scaffolds* aus nur einer Polypeptidkette und werden nicht posttranslational modifiziert. Viele Gerüstproteine bilden keine intrinsischen Disulfidbrücken aus, was die zytoplasmatische Herstellung in *E. coli* vereinfacht. Da zudem nativ gefaltetes Protein produziert werden kann, entfallen aufwändige *in vitro*-Verfahren zur Rückfaltung, was den Einsatz in industriellem Maßstab begünstigt. Mit einer meist geringen Größe von 10-30 kDa bieten Bindeproteine nicht nur in therapeutischen Anwendungen Vorteile, sondern eignen sich aufgrund verbesserter Effizienzen darüber hinaus für den Einsatz als Ligand in affinitätschromatographischen Ansätzen (Ruigrok *et al.* 2011).

Künstliche Bindeproteine konnten bereits als Liganden für den Einsatz in Affinitätschromatographien verwendet werden (Nord *et al.* 2000; Reina *et al.* 2002; Fiedler *et al.* 2006; Huang *et al.* 2006). In der von Nord *et al.* (2001) beschriebenen Anwendung wurden über ein Phagen-*display* Liganden mit nanomolarer Affinität (100–200 nM) gegen den Blutgerinnungsfaktor VIII generiert. Diese auf der Z-Domäne von Protein A beruhenden Liganden („Affibody“) wurden aus einer Bibliothek mit 13 randomisierten Aminosäurepositionen erhalten. Die Elution des gebundenen Blutgerinnungsfaktors erfolgte über die

Zugabe von 50%igem Ethylenglykol bei pH 6,6. Reina *et al.* (2002) wählten für die Generierung eines neuartigen Liganden für die Immunoaffinitätschromatographie einen *in silico*-Ansatz. Auf Basis einer PDZ-Domäne wurden bindende Varianten mit mikromolarer Affinität zu Organismus-spezifischen C-terminal gelegenen Sequenzmotiven generiert. Grundlage für diese Varianten bildeten computergestützte Berechnungen anstelle kombinatorischer Bibliotheken. Die Immobilisierung der Liganden erfolgte über einen genetisch fusionierten Hexahistidin-*tag* auf einer Nickel-NTA-Matrix. Die Desorption der Zielproteine erfolgte über kompetitive Elution mit Imidazol. Huang *et al.* (2006) beschrieben hingegen die Generierung eines auf der zehnten Fibronectin-Typ-III-Domäne basierenden Liganden („Monobodies“). Aus den mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems selektierten Varianten konnten konformationsspezifische Binder mit mikromolarer Affinität gegen eine Ligand-bindende Domäne des Östrogenrezeptors α generiert werden. Durch Aviditätseffekte bedingt konnte die Elution der Zielproteine jedoch nur über die Zugabe von 3,5 M Harnstoff erfolgen.

Ein kommerziell verfügbares System zur Herstellung von Liganden für eine affinitätschromatographische Reinigung basiert auf der Generierung von Einzeldomänen-antikörperfragmenten ($V_{\text{H}}\text{H}$, Nanobody) des Kamels („CaptureSelect“, Thermo Fisher). Es existieren Liganden für verschiedene Zielstrukturen, vor allem aber für die Reinigung von Antikörpern (z.B. IgG- $\text{C}_{\text{H}}1$ - oder κ/λ -Ketten-spezifisch). Die Liganden zeichnen sich durch eine hohe Stabilität, spezifische Bindung und hohe Affinität aus. Für die Elution der Zielstrukturen werden oftmals saure pH-Bedingungen zwischen pH 2–3 gewählt, wobei für einzelne Liganden auch hohe Salzkonzentrationen von 2 M MgCl_2 oder 1 M NaCl ausreichen. Ein von Fiedler *et al.* (2006) verwendetes künstliches Bindeprotein stammte aus der Familie der $\beta\gamma$ -Kristallin-Familie und zeigte neben einer hohen Affinität zum Zielprotein insbesondere eine sehr hohe intrinsische Stabilität, was harsche Elutionsbedingungen und Regenerationszyklen erlaubt.

1.3 Die $\beta\gamma$ -Kristallin-Familie als *scaffold* zur Generierung künstlicher Bindeproteine

Die Proteinfamilie der $\beta\gamma$ -Kristalline umfasst neben Strukturproteinen der Augenlinse mit ubiquitärer Verbreitung in Vertebraten (Jaenicke und Slingsby 2001) weitere Vertreter in allen drei Reichen des Lebens, wobei sie jeweils unterschiedliche Funktionen übernehmen. So besteht beispielsweise die biologische Funktion des humanen γ -B-Kristallins (hgBC) in der Generierung eines hohen Brechungsindex in der Augenlinse (Kumaraswamy *et al.* 1996). Neben einer hohen intrinsischen Stabilität (Rudolph *et al.* 1990) weist das monomer vorkommende Protein keine Disulfidbrücken auf und ist mit hohen Ausbeuten in prokaryotischen Expressionssystemen produzierbar.

Aufgrund seiner Eigenschaften wurde hgBC bereits erfolgreich als Gerüstprotein genutzt, um durch die Abfolge von Diversifizierung und anschließender Selektion über Phagen-*display* bindende Varianten mit Affinitäten von 10^{-6} – 10^{-7} M gegen verschiedene Zielstrukturen zu generieren (Fiedler und Rudolph 2001; Ebersbach *et al.* 2007). Die verwendeten Bibliotheken basierten auf der Randomisierung von acht Aminosäurepositionen des hgBC auf DNA-Ebene, die für lösungsmittel-exponierte Aminosäuren des Gerüstproteins auf Sekundärstruktur-

elementen codieren. Eine hgBC-Variante mit Affinität im nanomolaren Bereich zu der Präkursor-Form des humanen Nervenwachstumsfaktors (proNGF) konnte erfolgreich auf der Oberfläche einer Säule immobilisiert und für eine die affinitätschromatographische Reinigung der Zielstruktur genutzt werden (Fiedler *et al.* 2006). Ähnlich wie beim Einsatz von Antikörpern als Liganden wurde die Zielstruktur in diesem Falle über eine stringente Senkung des pH-Wertes erreicht. Das Bindeprotein zeichnete sich – im Gegensatz zu vielen Antikörpern – durch eine hohe Resistenz gegen harsche Regenerationsbedingungen unter niedrigem pH- sowie einer NaOH- und GdnHCl-Behandlung aus.

Die Struktur des humanen γ B-Kristallins ist typisch für die Proteinfamilie der $\beta\gamma$ -Kristalline. Das übergeordnete Strukturmotiv besteht aus einer sogenannten *greek key*-Topologie (Blundell *et al.* 1981), die aus zwei antiparallelen β -Faltblättern je Domäne besteht, die über kurze Schleifen verbunden sind (Wistow und Piatigorsky 1988). Trotz ihrer unterschiedlichen Ursprungsorganismen teilen die Vertreter der $\beta\gamma$ -Kristallin-Familie diese typische Topologie (Abbildung 2).

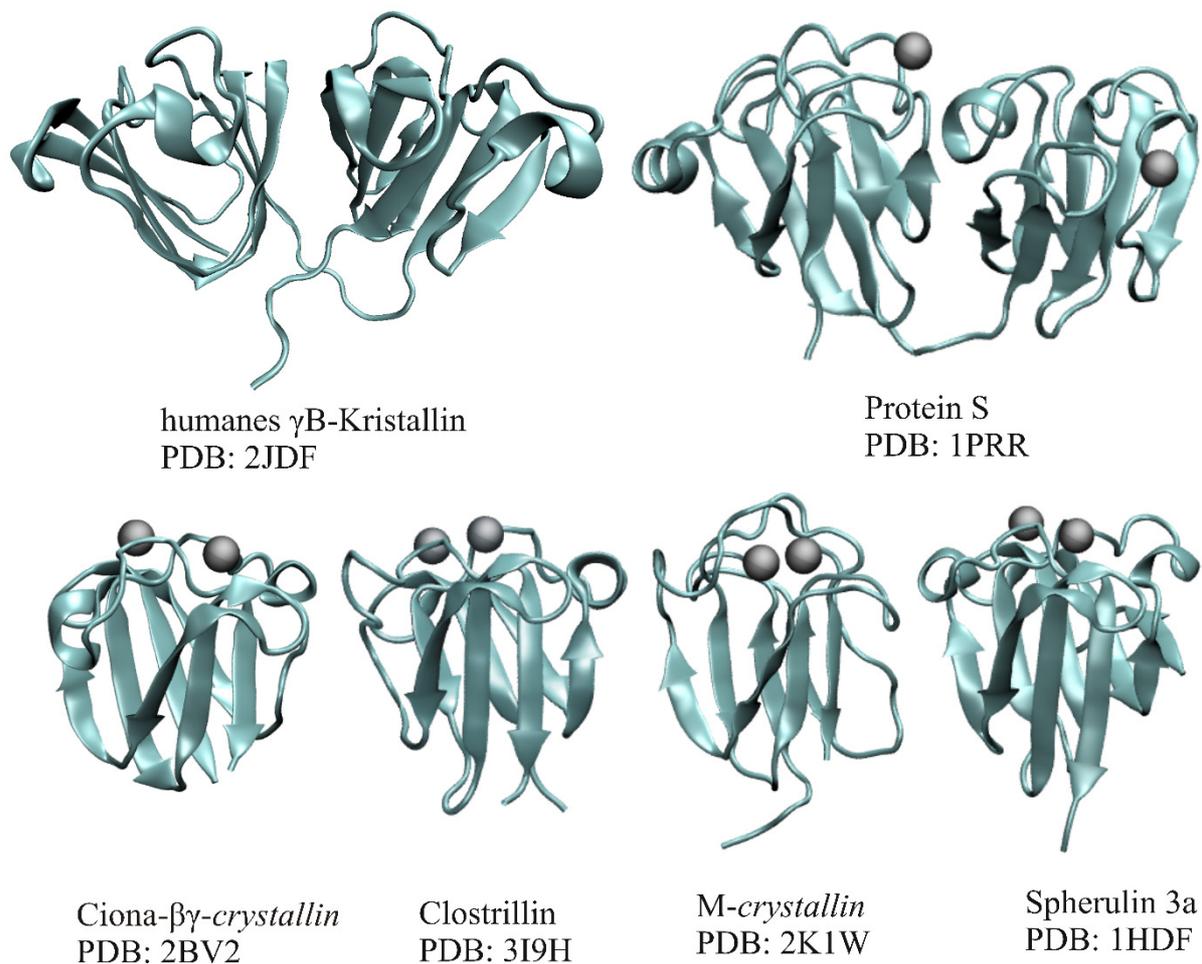


Abbildung 2: Bekannte Strukturen ausgewählter Kristallin-Homologe

Darstellung der Sekundärstrukturelemente ausgewählter Strukturen von Kristallin-Homologen. Humanes γ B-Kristallin (2JDF), Protein S (PDB: 1PRR), Ciona- $\beta\gamma$ -crystallin (PDB: 2BV2), Clostrillin (PDB: 3I9H), M-crystallin (PDB: 2K1W), Spherulin 3a (PDB: 1HDF). Calciumionen wurden als graue Sphären dargestellt. Für zwei Kristallin-Homologe, die in der Literaturrecherche ermittelt wurden (Protein S-Homolog und Geodin), waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine Strukturen verfügbar. Die Abbildungen wurden mit der Software VMD erstellt.

Für einige Vertreter der $\beta\gamma$ -Kristalline konnte gezeigt werden, dass die jeweilige biologische Funktion auf ihrer Fähigkeit beruht, Metallionen zu binden (Tabelle 1). So wurde beispielsweise für das Sporenhüllprotein „Protein S“ aus *M. xanthus* eine Ca^{2+} -abhängige und reversible Adhäsion an der Oberfläche von Myxosporen während deren Reifung beschrieben (Inouye *et al.* 1979). Bei anderen Vertretern dieser Proteinklasse, etwa Spherulin 3a aus *Physarum polycephalum*, deren Produktion durch Stressbedingungen der Zellen induziert wird, ist die genaue biologische Funktion derzeit jedoch nicht bekannt (Jaenicke und Slingsby 2001).

Tabelle 1: Ca^{2+} -bindende Vertreter der $\beta\gamma$ -Kristallin-Familie

Protein	PDB (Apo und Holo)	Molekulare Masse [kDa]	$K_D \text{ Ca}^{2+}$ [μM]	Ursprungsorganismus	Quelle
Spherulin 3a	1AG4 / 1HDF	11,3	9 / 200	<i>Physarum polycephalum</i>	(Clout <i>et al.</i> 2001)
Protein S	1PRR / 1PRS	19,7	27 / 76	<i>Myxococcus xanthus</i>	(Wenk und Jaenicke 1999)
Ciona- $\beta\gamma$ -crystallin	2BV2	18,4	n.a.	<i>Ciona intestinalis</i>	(Shimeld <i>et al.</i> 2005)
M-crystallin	2K1W	9,5	35 / 200	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	(Barnwal <i>et al.</i> 2009)
Clostrillin	3I9H / 3IAJ	7,9	33 / 0,5	<i>Clostridium beijerinckii</i>	(Aravind <i>et al.</i> 2009)
Geodin	4IAU	18,0	n.a.	<i>Geodia cydonium</i>	(Giancola <i>et al.</i> 2005; Vergara <i>et al.</i> 2013)

Die Ca^{2+} -Bindung durch die Vertreter der Kristallin-Familie erfolgt mit Affinitäten im μM -Bereich über ein konserviertes Motiv, das sich in den Schleifenregionen der Proteine befindet. Das von Aravind *et al.* (2009) beschriebene Doppelklammer-Sequenzmotiv der $\beta\gamma$ -Kristalline N/D-N/D-#-#-S/T-S stellt neben den bekannten Ca^{2+} -bindenden Motiven, wie dem EF-Hand-Motiv (Kretsinger 1976; Lewit-Bentley und Rety 2000) und der C2- (Rizo und Sudhof 1998) oder EGF-Domäne (Wouters *et al.* 2005) eine eigene Klasse dar. Topologisch stellen Domänen der $\beta\gamma$ -Kristalline ein doppeltes (3,1)-greek key-Faltungsmuster dar, bei welchen jeweils der dritte von vier Faltblattsträngen innerhalb eines beta-Faltblattes (c und c') mit dem Partner-greek key-Motiv geteilt wird (Abbildung 3 A). Der vierte Faltblattstrang wird über eine Schleife, die das Ca^{2+} -Bindungsmotiv trägt, zurückgeführt, so dass sich pro Domäne zwei gegenläufige Motive gegenüberliegen (Abbildung 3 B).

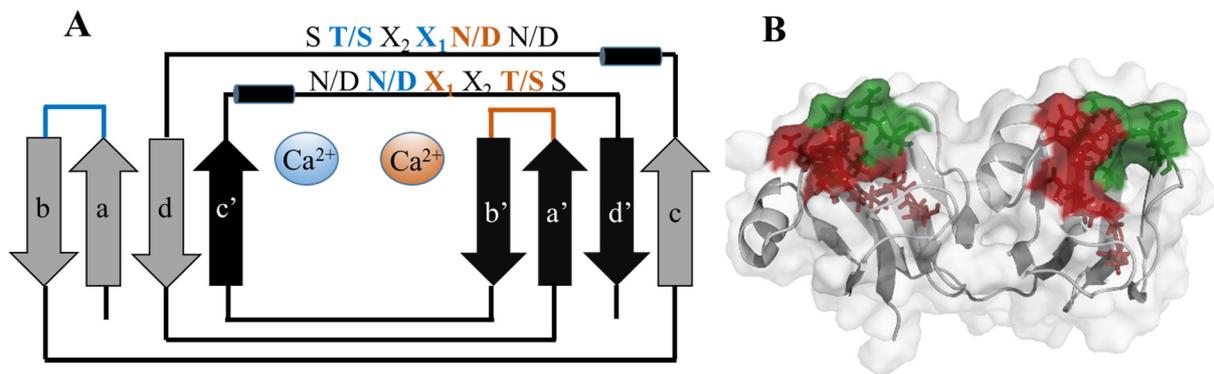


Abbildung 3: Schematische Darstellung des universellen Ca²⁺-Bindungsmotives der β -Kristallin Familie.

(A) Modifizierte schematische Darstellung der β -Kristallin-Topologie und der Ca²⁺-bindenden Motive nach Srivastava *et al.* (2014). Sekundärstrukturelemente wurden als Pfeile (β -Faltblattstränge) und Tonnen (α -Helix) dargestellt, Peptidstränge ohne Sekundärstrukturelemente als gerade Verbindungen. Zwei Ca²⁺ können pro Domäne eines β -Kristallins gebunden werden und sind als Kreise dargestellt. Die an der Bindung der Ionen beteiligten Aminosäuren wurden entsprechend farblich hinterlegt.

(B) Dreidimensionale Anordnung der Ca²⁺-bindenden Motive anhand einer Oberflächendarstellung der Struktur von Protein S aus *M. xanthus* (PDB: 1PRR). Die farblich hervorgehobenen Aminosäuren bilden das für die β -Kristalline beschriebene Sequenzmotiv Ca²⁺-bindender Bereiche. Je Domäne verfügt das Protein S über ein aus zwei Schleifenbereichen gebildetes Sequenzmotiv (rot und grün). Die Darstellung wurde mit der Software PyMol erstellt.

Die Verbindungen zwischen den ersten beiden Faltblattsträngen (a–b und a'–b') weisen jeweils eine β -hairpin-Struktur auf, die ebenfalls bei der Koordination der beiden Ca²⁺ beteiligt ist. Das erste Ca²⁺ wird neben dem hairpin 1 durch zwei Aminosäurereste aus der ersten Schleife (c–d) und einem Aminosäurerest aus der zweiten Schleife (c'–d') komplexiert. Analog wird das zweite Ca²⁺ durch hairpin 2 (a'–b'), zwei Aminosäureresten aus Schleife 2 (c'–d') und einem Aminosäurerest aus Schleife 1 (c–d) komplexiert.

Vergleicht man die örtliche Lage der Calciumionen publizierter Strukturen der Kristallin-Homologe (Abbildung 2, dargestellte Sphären) mit dem beschriebenen Konsensus-Motiv (Aravind *et al.* 2009), so erkennt man eine hervorragende Übereinstimmung. Lediglich die von Bagby *et al.* (1994) in der NMR-Struktur des Protein S (PDB: 1PRR) hinterlegten Bindungsbereiche für Ca²⁺ weichen von dem beschriebenen Konsensus-Motiv ab (Abbildung 2, Abbildung 3). Jedoch wurden die Ca²⁺ in der Messung nicht direkt nachgewiesen, sondern in die Struktur hinein modelliert. Die Kristallstruktur der N-terminalen Domäne des Protein S (PDB: 1NPS) zeigt zwei Ca²⁺, die entsprechend des Konsensusmotives angeordnet sind (Wenk *et al.* 1999). Protein S ist ein saures (pI=4,5) und hitzestabiles Protein, das nach einer thermischen Denaturierung bei 100 °C für zwei Minuten (Inouye *et al.* 1981), oder nach einer chemisch induzierten Entfaltung reversibel zurückfaltet (Wenk und Mayr 1998). Zusammen mit der Ca²⁺-abhängigen biologischen Funktion des Proteins bieten diese Eigenschaften neue Möglichkeiten für die Generierung von artifiziellen Bindeproteinen.

1.4 Generierung artifizieller Bindeproteine

Die Generierung von *de novo*-Bindungseigenschaften auf einem strukturgebenden Gerüstprotein („scaffold“) erfolgt grundlegend durch die Abfolge von Diversifizierung lösungsmittel-exponierter Aminosäurereste und der anschließenden Selektion von Varianten mit gesuchtem Eigenschaftsprofil (Ku und Schultz 1995; Hey *et al.* 2005; Grönwall und Stahl 2009). Neben der durch Substitution generierten Diversität können auch mehrfache Insertionen (Souriau *et al.* 2005; Schilling *et al.* 2014) oder Deletionen Teil der Strategie zur Schaffung eines *de novo*-Paratopes sein. Grundsätzlich wird angestrebt, unter Erhalt der nativen Struktur,

der Stabilität und der Löslichkeit des Gerüstproteins eine möglichst große potentielle Bindungsfläche zu generieren. Die Auswahl entsprechender Positionen des *scaffolds* kann durch unterschiedliche Kriterien erfolgen. Es können, sofern vorhanden, bereits bestehende Interaktionsbereiche des Gerüstproteins als Ausgangspunkt verwendet werden, wie es bei der Generierung unterschiedlicher künstlicher Bindeproteine wie Anticalinen, Affibodies oder Affiline gezeigt wurde (Nord *et al.* 1997; Kim *et al.* 2009; Hoffmann *et al.* 2012).

Auch Strukturen ohne bekannte Interaktionspartner wurden bereits erfolgreich durch eine rationale Auswahl randomisierter Bereiche für die Generierung eines *de novo*-Paratopes verwendet (Ebersbach *et al.* 2007). So können Aminosäurepositionen, welche über eine hohe Substitutionstoleranz verfügen, durch Konsensus-Untersuchung dem *scaffold* ähnlicher Proteine (Binz *et al.* 2004) oder durch *in silico*-generierte Daten (Reina *et al.* 2002), verwendet werden. Es wurden bereits verschiedene Strategien in der Literatur beschrieben, mit denen sich künstliche Bindeproteine gegen verschiedene Zielstrukturen generieren lassen (Binz *et al.* 2005; Hey *et al.* 2005). Analog zu Antikörpern, deren CDR-Regionen aus lösungsmittel-exponierten Schleifen auf einem starren Gerüst bestehen, wurden beispielsweise künstliche Bindeproteine auf Basis der humanen Fibronectin III-Domäne generiert (Koide *et al.* 1998). In anderen Ansätzen wurden Sekundärstrukturelemente der Gerüstproteine randomisiert, um weniger flexible Bindungsflächen zu generieren (Binz *et al.* 2004; Ebersbach *et al.* 2007) und somit den Entropie-Verlust durch Konformationsänderungen bei der Bindung zu verringern (Skerra 2000).

Die Erstellung kombinatorischer Bibliotheken auf Grundlage des gewählten *scaffolds* und der Randomisierungsstrategie erfolgt auf DNA-Ebene. Dies kann durch Primer mit NNK-Motiven erfolgen, bei denen an N-Positionen alle vier Nukleotide vorkommen, an K-Positionen hingegen nur Guanin und Thymidin, wodurch der genetische Code auf 32 Codons reduziert wird. Eine weitere Methode besteht in der Verwendung trinukleotidbasierter Systeme. Durch den Einsatz von fertigen Trinukleotiden bei der DNA-Synthese können die codierenden Sequenzen für beliebige Aminosäuren ortsspezifisch in definierten Verhältnissen hergestellt werden (Virnekas *et al.* 1994). Neben unerwünschten Aminosäuren an bestimmten Positionen der translatierten Bibliotheksvarianten können außerdem Stop-Codons vermieden werden, um die Funktionalität der Bibliotheken zu erhöhen. Die theoretische Diversität der Bibliotheken richtet sich somit nach der Anzahl randomisierter Positionen und zugelassener Codons. Zur spezifischen Anreicherung von Varianten aus den naiven Bibliotheken werden die Phänotypen einzelner Bibliotheksvarianten mit ihrem entsprechenden Genotyp gekoppelt (*display*). Den Komplexen werden anschließend immobilisierte oder immobilisierbare Zielstrukturen präsentiert und bindende Bibliotheksvarianten durch die Entfernung nicht-gebundener Varianten angereichert. Diese als *bio-panning* bezeichneten Verfahren können auf unterschiedliche Weise realisiert werden. Etablierte Verfahren basieren auf der direkten Kopplung der Protein- oder Peptidvarianten mit entsprechender genetischer Information auf molekularer Ebene, wie beim Ribosomen-, (Hanes und Plückthun 1997; Binz *et al.* 2004; Ueda *et al.* 2010; Plückthun 2012) mRNA- (Roberts und Szostak 1997; Cotten *et al.* 2012) oder CIS-*display* (Odegrip *et al.* 2004). Eine weitere Möglichkeit der Präsentation besteht in der Exposition der Protein- oder Peptidvarianten auf der Oberfläche von Bakteriophagen (Smith 1985; Paschke 2006), Hefe- oder Bakterienzellen (Francisco *et al.* 1993; Lipovsek *et al.* 2007; Kronqvist *et al.* 2008).

Der durch diese Systeme auf die Bibliotheken ausgeübte Selektionsdruck kann sich neben der Anreicherung spezifisch an die Zielstruktur bindender Varianten auch auf weitere Merkmale beziehen. Die Strategie einer Selektion umfasst neben der Präsentation einer definierten Menge der Zielstruktur zur selektiven Anreicherung bindender Varianten auch die Zahl und Dauer der durchgeführten Waschschriffe sowie die Methode zur Rückgewinnung der genetischen Information angereicherter Varianten. Weiterhin können Varianten der Bibliotheken mit gewünschten Eigenschaftsprofilen bevorzugt werden.

Beispielsweise kann nach erfolgter Bindung der Varianten an das immobilisierte (oder immobilisierbare) *target* eine Zugabe von nicht-immobilisierbarer Zielstruktur erfolgen. Entsprechend ihrer Dissoziationsraten werden die Bibliotheksvarianten unterschiedlich schnell ein neues Gleichgewicht mit der vorhandenen Zielstruktur eingehen. Durch Entfernung der nachträglich zugegebenen Zielstruktur vor Einstellung eines Gleichgewichtes können Varianten mit einer langsamen Dissoziation bevorzugt (*off-rate*-Selektion) werden. Zur Favorisierung bestimmter Epitope können die Zielstrukturen mit maskierenden Elementen wie bekannten bindenden Strukturen (Antikörper, Bindeproteine, Peptide oder Liganden) vorinkubiert werden (*epitope masking*). Analog zu diesem Ansatz können auch die Bibliotheken vor Zugabe zu den Zielstrukturen mit alternativen Strukturen vorinkubiert werden, um unspezifisch gebundene Proteine, oder bindende Varianten unerwünschter Epitope selektiv zu entfernen. Ebenso können in bestimmten Fällen die Pufferbedingungen oder die Verfügbarkeit von Liganden und Detergenzien für die Konformation der Zielstruktur oder der Bibliotheksvarianten von Interesse sein.

Zellfreie Technologien wie das Ribosomen-*display* bieten den Vorteil, dass sie vollständig *in vitro* durchgeführt werden können und daher nicht durch die Transformationseffizienz von lebenden Zellen limitiert werden. Dies ermöglicht den Einsatz von vergleichsweise großen Bibliotheken von bis zu 10^{14} Varianten (Amstutz *et al.* 2001), wohingegen typische Transformationseffizienzen von *E. coli* die Bibliotheken auf eine Größen von ca. 10^{10} Varianten limitieren. Die Kopplung von Geno- und Phänotyp der Bibliotheksvarianten erfolgt im Ribosomen-*display* durch die Stabilisierung der ternären Komplexe, bestehend aus Ribosom, mRNA und entsprechende naszente Proteinvarianten während der Translation. Die DNA der Proteinvarianten wird genetisch mit einer kurzen Abstandshaltersequenz (*spacer*) und einer Ankersequenz (*stalling*) fusioniert und anschließend *in vitro* transkribiert. Das Design von Ankersequenzen wie der SecM-Sequenz (Gumbart *et al.* 2012) verhindert während ihrer Translation die Bildung von Peptidbindungen innerhalb des Peptidyl-Transferase-Zentrums der Ribosomen. Zusammen mit dem Fehlen von Stop-Codons innerhalb der Sequenz wird die Dissoziation der ternären Komplexe aus mRNA, translatiertem Protein und Ribosom verhindert. Die Abstandshaltersequenz erlaubt dem translatierten Protein gleichzeitig das vollständige Verlassen des ribosomalen Ausgangstunnels. Die ternären Komplexe können direkt für die Selektion verwendet werden. Die Bindung der Komplexe an die Zielstrukturen erfolgt wahlweise in Lösung an immobilisierbare (*selection in solution*) oder auch an bereits immobilisiert vorliegende Zielstrukturen.

Die Rückgewinnung der genetischen Information der gebundenen Proteinvarianten nach der Selektion in Form von mRNA kann über verschiedene Methoden erreicht werden. Prinzipiell kann man zwischen der Freisetzung von ternären Komplexen (mit anschließender RNA-Extraktion) und der direkten Freisetzung der genetischen Information unterscheiden. So können

die ternären Komplexe direkt über die Chelatierung der für die Stabilität notwendigen Mg^{2+} -Ionen vollständig dissoziiert werden. Dies löst die Kopplung von Phäno- und Genotyp der Varianten und ermöglicht die Weiterverwendung des gesamten vorhandenen genetischen Materials, während die Phänotypen an die Zielstrukturen gebunden verbleiben.

Durch die Beeinflussung der Bindung der Bibliotheks-Phänotypen der ternären Komplexe an die Zielstrukturen können auch funktionale ternäre Komplexe freigesetzt werden. Durch die höhere Selektivität der Elution können erneut Varianten mit gewünschten Eigenschaften favorisiert werden. So lässt sich beispielsweise durch enzymatische Verfahren zur Elution die Zugänglichkeit bestimmter Schnittstellen gewährleisten. Auch können kompetitive Methoden zur Dissoziation ternärer Komplexe verwendet werden, um etwa Varianten die gegen bestimmte Epitope gerichtet sind, zu bevorzugen. Durch die gewählten Pufferbedingungen oder die Verfügbarkeit von Kofaktoren und Liganden kann weiterhin versucht werden, die Epi- oder Paratope direkt zu beeinflussen, um entsprechend konformations-sensitive Varianten zu erhalten. Nach der Elution selektierter Varianten wird die mRNA über eine reverse Transkription in cDNA überführt und diese anschließend amplifiziert. Durch die Adaption des Ribosomen-*displays* können neben der Bindung an eine Zielstruktur auch andere Eigenschaften der Proteinvarianten adressiert werden. So wurden bereits Methoden zur Stabilitäts- oder Affinitätsmaturierung von Proteinen in der Literatur beschrieben (Jermutus *et al.* 2001; Zahnd *et al.* 2007a; Buchanan 2012).

1.5 Zielstellung

Die Verwendung von Antikörpern als Liganden in affinitätschromatographischen Systemen bietet aufgrund der hohen Spezifität und Affinität der Bindung viele Vorteile. Die Einsatzmöglichkeiten sind jedoch durch die hohen Produktionskosten der strukturell kompliziert aufgebauten Antikörper limitiert. Weiterhin führt die hohe Bindungsaffinität zu notwendigen harschen Bedingungen bei der Elution der Zielmoleküle, woraus eine geringere Ausbeute, Qualitätseinbußen oder verminderte Säulenkapazitäten resultieren können. Der Einsatz alternativer Gerüstproteine für die Generierung von Liganden zum Einsatz in einer Immunoaffinitätschromatographie kann die Kosten im Vergleich zu Antikörpern zwar maßgeblich senken, jedoch besteht auch für diese Liganden die Notwendigkeit harscher Elutionsmethoden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Klasse von Gerüstproteinen untersucht, um deren intrinsische Eigenschaften für die Generierung neuartiger Bindeproteine zu nutzen. Die Verwendung von Ca^{2+} -sensitiven Gerüststrukturen sollte eine schaltbare Bindung an die Zielstruktur ermöglichen, um steuerbare Bindungszustände des Liganden durch die Verfügbarkeit des Kofaktors zu erzeugen. Nach der Auswahl eines Gerüstproteins aus der Familie der $\beta\gamma$ -Kristalline wurden über Methoden der ortsgerichteten Mutagenese lösungsmittel-exponierter Aminosäurepositionen hinsichtlich ihrer Eignung für die Generierung von Diversität untersucht. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte eine Oberfläche des *scaffolds* definiert werden, die durch die Randomisierung ihrer Aminosäurepositionen zu einer Bindestelle für Zielstrukturen entwickelt werden kann. Diese Bindungsstelle sollte in direkter örtlicher Nähe zu den Ca^{2+} -Bindungsstellen liegen, um die Wahrscheinlichkeit zur Generierung Ca^{2+} -schaltbarer Bindeproteine zu erhöhen.

Zur Anreicherung schaltbarer Bindeproteine aus dieser Bibliothek gegen sfGFP als Zielstruktur musste ein geeignetes Selektionssystem etabliert und verwendet werden. Neben der Präsentation nativer Bibliotheksvarianten musste in diesen Verfahren die Funktionalität zur Ca^{2+} -sensitiven Bindung sichergestellt werden, um schaltbare Varianten anreichern zu können. Für die Hochdurchsatzanalyse von Einzelvarianten der Selektionen sollte ein automatisiertes Verfahren zur Analyse Ca^{2+} -sensitiver Varianten entwickelt werden. Identifizierte Bindeproteine mussten anschließend hinsichtlich ihrer Ca^{2+} -abhängigen Bindungseigenschaften gegen die Zielstruktur sfGFP charakterisiert werden.

Schließlich sollte durch die Verwendung eines so erstellten neuartigen Liganden in einer Affinitätschromatographie ein *proof-of-principle* erbracht werden. Dabei sollten die neuartigen Bindeproteine auf einer Säulenmatrix immobilisiert und für eine Immunoaffinitätschromatographie verwendet werden. Die Charakterisierung der so erstellten Säule sollte belegen dass es möglich ist, die Vorteile konventioneller auf Antikörpern oder künstlichen Bindeproteinen basierender Systeme mit einer neuartigen schonenden Desorptionsmethode gebundener Zielmoleküle zu kombinieren.

2. Materialien

2.1 Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien verfügen, sofern nicht explizit vermerkt, mindestens über einen Reinheitsgrad p.A. und sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol	Applichem (Darmstadt)
AEBSF	Applichem (Darmstadt)
Adenosintriphosphat (ATP)	Applichem (Darmstadt)
Agarose LE	Biozym (HessischOldendorf)
Agarose LEGP	Biozym (HessischOldendorf)
Agarose Sieve GP	Biozym (HessischOldendorf)
Alpha-Lactose-Monohydrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumchlorid	Applichem (Darmstadt)
Ampicillin (Natriumsalz)	Carl Roth (Karlsruhe)
Bacto Agar	Becton Dickinson (Heidelberg)
Bacto Soytone	Becton Dickinson (Heidelberg)
Bacto Tryptone	Becton Dickinson (Heidelberg)
Bacto Yeast Extract	Becton Dickinson (Heidelberg)
Blocker BSA in TBS	Pierce Biotechnology (Rockford,IL,USA)
Blocker <i>protein-free</i>	Pierce Biotechnology (Rockford,IL,USA)
Borsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Applichem (Darmstadt)
10× <i>casein blocking buffer</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Carbenicillin	Carl Roth (Karlsruhe)
Cobalt (II)-Chlorid	Applichem (Darmstadt)
Coomassie R250	Applichem (Darmstadt)
D (+)-Glucose	Carl Roth (Karlsruhe)
Difco Select Soytone	Becton Dickinson (Heidelberg)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem (Darmstadt)
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth (Karlsruhe)
dNTP-Mix (10 mM je Nukleotid)	Fermentas (St. Leon-Rot)
EDTA	Carl Roth (Karlsruhe)
EDTA (für die Molekularbiologie)	Applichem (Darmstadt)
EGTA	Carl Roth (Karlsruhe)
Eisen (III)-chlorid-Hexahydrat	Applichem (Darmstadt)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol (96%), vergällt	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol, reinst	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanolamin	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid (1%)	Carl Roth (Karlsruhe)
Formaldehyd (37%)	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Applichem (Darmstadt)
Glykogen	Roche Applied Science (Mannheim)

Chemikalie	Bezugsquelle
Harnstoff	Carl Roth (Karlsruhe)
HEPES	Applichem (Darmstadt)
Imidazol	Merck (Darmstadt)
Kaliumacetat	Applichem (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Applichem (Darmstadt)
Kaliumhydroxid	Applichem (Darmstadt)
Kanamycin-Sulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
Kupfer (II)-chlorid-Dihydrat	Applichem (Darmstadt)
Laktose (α -Laktose Monohydrat)	Carl Roth (Karlsruhe)
Magnesiumacetat (für die Molekularbiologie)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Applichem (Darmstadt)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Applichem (Darmstadt)
Mangan (II)-chlorid-Tetrahydrat	Applichem (Darmstadt)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Morpholinethansulfonsäure (MES)	Applichem (Darmstadt)
Natriumacetat	Applichem (Darmstadt)
Natriumcarbonat	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Applichem (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Applichem (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS) (20%)	Applichem (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriummolybdat-Dihydrat	Applichem (Darmstadt)
Natriumselenit	Applichem (Darmstadt)
Natriumsulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Applichem (Darmstadt)
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Applichem (Darmstadt)
Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat	Applichem (Darmstadt)
Orange Loading Dye (6 \times)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt)
PageBlue™ <i>Protein Staining Solution</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Applichem (Darmstadt)
rRNA, 16S und 23S, <i>E. coli</i>	Roche Applied Science (Mannheim)
RNase Blaster Solution	Clontech Laboratories (Mountain View, USA)
RNase freies Wasser	Fermentas (St. Leon-Rot)
Salzsäure (37%)	Carl Roth (Karlsruhe)
Schwefelsäure (96%)	Carl Roth (Karlsruhe)
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)
SYPRO Orange	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tetracyclin-Hydrochlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
TMB One (Peroxidase-Substrat)	Kem-En-Tec Diagnostics (Taastrup, DK)
TMB X-tra (Peroxidase-Substrat)	Kem-En-Tec Diagnostics (Taastrup, DK)
Tris (für die Molekularbiologie)	Applichem (Darmstadt)
tRNA, aus <i>E. coli</i>	Roche Applied Science (Mannheim)
Tween-20	Applichem (Darmstadt)
Wasser, Nuklease-frei	Fermentas (St. Leon-Rot)
Zinksulfat-Heptahydrat	Applichem (Darmstadt)

2.2 Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide wurden über die Firma Thermo Fisher Scientific (Ulm) im HPLC-Reinigungsgrad bezogen. Degenerierte Oligodesoxynukleotide wurden durch die Verwendung von Trinukleotiden synthetisiert und über die Firma Ella Biotech im PAGE-Reinigungsgrad bezogen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz (5' nach 3')
PS_RD-Esp3I_fwd	CACGTCGTCTCACCATGGGTACCGGTGCAAATATTACG
PS_RD-Esp3I_rev	ACCATCGTCTCAGGATCCGCTAATACGGATGCTGGAAG
ModLib_fwd	CCAGACTTACGCTCCAATTC
ModLib_rev	TCTGCGTTAACCGAGACTAC
T7P-RBS_fwd	CGCGTATCGGTGATTCAATTCTG
Spacer-SecM_rev	CGGACCTGCACGAATGCC
PS_Quant_1_fwd	CCATGGGTACCGGTGCAAATATTACG
PS_Quant_rev	GATCCGCTAATACGGATGCTGGAAG
PS_SF_sense	CCGGTGCAAATATTACGGTCTTTGAGA
PS_SF_anti	CGCGTCTCAAAGACCGTAATATTTGCA
PS_lib_anti	GTGAATACCACGCGTCTC
PS_RF1_6.1	AGCCATCATAACCGGTCTCGTCTTTNNNNNNNNNNNNNTTTNNN GGCNNNCAGGTTGAGACGCGTGGTATTCAC
PS_RF4_5.1	AGCCATCATAACCGGTCTCAACGCANNNNNNCTGNNNNNNNN NAACAACGAGACGCGTGGTATTCAC
PS_RF5_4.1	AGCCATCATAACCGGTCTCTTCTTCNNNNNNNNNCAGTTCGAT GGTNNNGAAGTTGAGACGCGTGGTATTCAC
PS_RF6_4.1	AGCCATCATAACCGGTCTCTATAANNNNNNNGAGCTGGAGNN NTATGGCATTNNAACAACGAGACGCGTGGTATTCAC

2.3 Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Übersicht über verwendete Plasmide

Plasmid	Verwendung	Resistenz	Bezugsquelle
pJ201	<i>container</i> -Plasmid der Gensynthese	Kanamycin	DNA 2.0 (Menlo Park, CA, USA)
pETAB6H	Expressionsplasmid mit Sequenz für C-terminales (His)6-Fusionspeptid, T7-Promotor, T7-Terminator	Kanamycin	diese Arbeit
pInSALect_fs-1	Leserahmenselektion	Chloramphenicol, Carbenicillin*	(Schneider 2010)

*Resistenz liegt vor, wenn Leserahmen in Abhängigkeit des verwendeten *inserts* korrekt ist

Plasmid	Verwendung	Resistenz	Bezugsquelle
pET28a(+)	Expressionsplasmid mit Sequenz für C-terminales (His) ₆ -Fusionspeptid, T7lac-Promotor, T7-Terminator	Kanamycin	Novagen® (Darmstadt)
pET23SP	Expressionsplasmid mit Sequenz für C-terminales (His) ₆ -Fusionspeptid, T7-Promotor, T7-Terminator	Kanamycin	diese Arbeit
pCD87SA	Phagemid-Vektor mit Tat-Translokationsweg	Chloramphenicol	Dr. Matthias Paschke

2.4 Mikroorganismen

Für die rekombinante Proteinproduktion, die Plasmidvermehrung und die Produktion von MX-Sporen wurden die in Tabelle 5 zusammengefassten Mikroorganismen verwendet.

Tabelle 5: Übersicht über Mikroorganismen

Organismus	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	F- Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (<i>rB- mB-</i>) <i>gal dcm λ</i> (DE3)	(Studier und Moffatt 1986)
<i>E. coli</i> NovaBlue(DE3)	<i>endA1 hsdR17</i> (rK12–mK12+) <i>supE44 thi-1</i> <i>recA1 gyrA96 relA1 lac</i> (DE3) <i>F</i> '[<i>proA+B+lacIqZAM15: :Tn10</i>] (<i>Tet</i> ^r)	Novagen® (Darmstadt)
<i>E. coli</i> ER2738	<i>F</i> ' <i>proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15</i> <i>zzf::Tn10(Tet</i> ^r)/ <i>fhuA2glnV Δ(lac-proAB)</i> <i>thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5</i>	New England Biolabs GmbH (Frankfurt /Main)
<i>E. coli</i> ElectroTen-Blue	Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> <i>Kan</i> ^r [<i>F</i> ' <i>proABlacIqZAM15 Tn10</i> (<i>Tet</i> ^r)]	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac- F</i> '[<i>proAB lacIqZAM15 ::Tn10</i>]	Stratagene (La Jolla, USA)
<i>Myxococcus</i> <i>xanthus</i> DK1622	/	(Kaiser 1979)

2.5 Helferphagen

Tabelle 6: Verwendete Helferphagen

Phage	Beschreibung	Bezug
M13KO7	<i>M13-Phagen-Abkömmling mit Mutation M40l in Gen II. Enthält P15A Replikationsursprung und Kanamycin-Resistenzgen</i>	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

2.6 Nährmedien

Für die Kultivierung von Mikroorganismen wurden die in Tabelle 7 zusammengefassten Medien verwendet. Vor Verwendung wurden alle Nährmedien für 20 min bei 121 °C autoklaviert oder sterilfiltriert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden den Medien bei Bedarf Antibiotika zugesetzt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Verwendete Medien

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl*
LB-Agar	LB-Medium mit zusätzlich 15 g/l Agar
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glucose
1× ZY-Lösung	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt
50× M-Lösung	1,25 M Na ₂ HPO ₄ , 1,25 M KH ₂ PO ₄ , 2,5 M NH ₄ Cl, 0,25 M Na ₂ SO ₄
50× 5052-Lösung	25% (m/v) Glycerin, 25 g/l Glucose, 100 g/l alpha-Lactose-Monohydrat
1.000×Spurenelemente-Lösung	60 mM HCl, 50 mM FeCl ₃ , 20 mM CaCl ₂ , 10 mM MnCl ₂ , 10 mM ZnSO ₄ , 2 mM CoCl ₂ , 2 mM CuCl ₂ , 2 mM NiCl ₂ , 2 mM Na ₂ MoO ₄ , 2 mM Na ₂ SeO ₃ , 2 mM H ₃ BO ₃
ZYM-5052-Autoinduktions-Medium	1× ZY-Lösung, 1× M-Lösung, 1× 5052-Lösung, 2 mM MgSO ₄ , 0,5× Spurenelemente-Lösung
CYE Medium	10 g/l Bacto Casitone; 5 g/L Bacto Hefeextrakt; 10 mM MOPS; 4 mM MgSO ₄ ; pH 7,6
MMC Puffer	10 mM MOPS; 4 mM MgSO ₄ ; 2 mM CaCl ₂ ; pH 7,6
CYE Agar	CYE-Medium mit zusätzlich 15 g/l Bacto Agar; pH 7,6
MMC Agar	MMC-Medium mit zusätzlich 7,5 g/l Bacto Agar; pH 7,6
2YT	17 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl

*Zur Vorbereitung elektrokompenter Zellen wurde die NaCl-Konzentration halbiert.

2.7 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer (Tabelle 8) wurden mit entionisiertem und gefiltertem Wasser hergestellt und vor Verwendung sterilfiltriert. Für SPR-Experimente oder Chromatographie verwendete Puffer wurden zusätzlich für 30 min entgast. Der pH-Wert wurde nach Bedarf mit $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, HCL, NaOH oder KOH eingestellt. Die Lagerung der Puffer erfolgte bei Raumtemperatur oder bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (Puffer für Selektion). Puffer für die Selektion wurden unter den Richtlinien RNase-freier Arbeiten und unter Verwendung RNase-freien Wassers (Fermentas) vorbereitet.

Tabelle 8: Verwendete Puffer

Einsatz für	Puffer	Zusammensetzung
Chromatographie		
	HBSI-20	25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0
	HBSI-50	25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 50 mM Imidazol, pH 8,0
	HBSI-500	25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8,0
	HBS	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4
Ribosomen-display		
	WB	20 mM HEPES, 100 mM KAcO, 50 mM MgCl ₂ , pH 7,4
	BWB_BSA	WB mit 1× BSA Blocker in TBS (Pierce)
	BWB_PF	WB mit 0,9× <i>Protein-free</i> Blocker (Pierce)
	WBCT	WB mit 10 mM CaCl ₂ , 0,05% (v/v) Tween-20
	SBC	WB mit 24,3 mM CaCl ₂ , 0,05% (v/v) Tween-20 und 1× BSA-Blocker in TBS (Pierce)
	WBTG20	WB mit 20 mM EGTA, 0,025 µg/µl tRNA, 0,025 µg/µl rRNA, 0,05% (v/v) Tween-20
	EB40	20 mM HEPES, 100 mM KAcO, 40 mM EDTA, 0,025 µg/µl tRNA, 0,025 µg/µl rRNA
Sonstige Anwendungen		
	SDS-Probenpuffer (5x)	50% (v/v) Glycerin, 250 mM Tris/HCl pH 8,0, 5% (w/v) SDS, 0,05% (m/v) Bromphenolblau, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol
	MES	50 mM MES, 50 mM Tris/HCl pH 7,3, 2% (w/v) SDS, 2 mM EDTA
	MXP	10 mM Tris; 25 mM EDTA; pH 7,6
	MX-Bindungspuffer	10 mM Tris; 50 mM NaCl; 1 mM CaCl ₂ ; pH 7,6
	MX-Waschpuffer	10 mM Tris; 1 M NaCl; 10 mM CaCl ₂ ; pH 7,6
	TAE	40 mM Tris/HAc pH 8,5 mit 2 mM EDTA
	TE	10 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 8,0
	HBST	HBS mit 0,05% (v/v) Tween-20, pH 7,4
	HBSC	HBS mit 10 mM CaCl ₂ pH 7,4
	HBST	HBS mit 10 mM CaCl ₂ und 0,05% (v/v) Tween-20 pH 7,4
	HBSE	HBS mit 5 mM EDTA pH 7,4
	HBSET	HBS mit 5 mM EDTA und 0,05% (v/v) Tween-20 pH 7,4
	PEG/NaCl	20% (w/v) PEG 6000, 2,5 M NaCl

*Bei Verwendung von phosphatgepufferter Saline (PBS) wurden anstelle von HEPES 80 mM Na₂HPO₄ und 15 mM KH₂PO₄ sowie 137 mM NaCl verwendet.

2.8 Enzyme

Verwendete Enzyme, Inhibitoren und Immunkonjugate (Tabelle 9) wurden, sofern nicht anders vermerkt, nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Aktivität der SUMO-Hydrolase wurde vor Verwendung mit bekannten SUMO-Fusionen (Bezugsquelle: Dr. Sven Pfeifer) getestet.

Tabelle 9: Verwendete Enzyme

Art	Bezugsquelle
Restriktionsenzyme	
<i>AgeI</i>	Thermo Scientific (Langenselbold)
<i>BamHI</i>	Thermo Scientific (Langenselbold)
<i>BauI</i>	Thermo Scientific (Langenselbold)
<i>DpnI</i>	Thermo Scientific (Langenselbold)
<i>Eco31I</i>	Thermo Scientific (Langenselbold)
<i>Esp3I</i>	Thermo Scientific (Langenselbold)
<i>ScaI</i>	Thermo Scientific (Langenselbold)
<i>XhoI</i>	Thermo Scientific (Langenselbold)
Polymerasen	
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes (Espoo, FIN)
Maxima reverse Transkriptase	Thermo Scientific (Langenselbold)
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Thermo Scientific (Langenselbold)
Immunkonjugate	
α -His ₆ -Peroxidase-Konjugat (BMG-His-1)	Roche Applied Science (Mannheim)
α -M13-Peroxidase-Konjugat	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
α -Protein S (Huhn; polyklonal)	Dauids Biotechnologie (Regensburg)
α -Huhn-Peroxidase-Konjugat	Dauids Biotechnologie (Regensburg)
Sonstige	
Alkalische Phosphatase (1 U/ μ L)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Benzonase (25 U/ μ l)	Novagen [®] (Darmstadt)
DNase I	Ambion (Darmstadt)
Klenow-Fragment (exo-) (5 U/ μ l)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Applichem (Darmstadt)
RNasin plus RNase Inhibitor	Promega (Mannheim)
SUMO-Hydrolase	Arbeitsgruppe Dr. Pfeifer (Halle/Saale)
T4-DNA-Ligase (5 bzw. 30 U/ μ l)	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.9 Antibiotika

Alle Antibiotika (Tabelle 10) wurden vor Verwendung sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 10: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration Stammlösung [mg/ml]	Lösungsmittel für Stammlösungen	Konzentration in Medium [μ g/ml]
Kanamycin	50	ddH ₂ O	50 (100)*
Chloramphenicol	50	EtOH (50% v/v)	50
Carbenicillin	100	ddH ₂ O	100
Tetracyclin	5	EtOH (50% v/v)	0,1

*Bei Verwendung in ZYM5052-Autoinduktionsmedien wurde die eingesetzte Kanamycinkonzentration verdoppelt.

2.10 Kits und Standards

Verwendete Kits und Standards (Tabelle 11) wurden, sofern nicht anders vermerkt, nach Herstellerangaben eingesetzt.

Tabelle 11: Kits und Standards

Material	Bezugsquelle
Kits	
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
PURExpress <i>in vitro</i> Protein Synthesis Kit	New England Biolabs GmbH (Frankfurt)
PURExpress® <i>Aribosome Kit</i>	New England Biolabs GmbH (Frankfurt)
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce (Rockford, USA)
Wizard Plus SV Midiprep DNA purification Kit	Promega (Mannheim)
Wizard Plus SV Miniprep DNA purification Kit	Promega (Mannheim)
Wizard SV Gel and PCR Clean up System	Promega (Mannheim)
Standards	
1 kbp-DNA-Leiter	Fermentas (St. Leon-Rot)
100 bp-DNA-Leiter	Fermentas (St. Leon-Rot)
NuPAGE Mark 12 MW Standard	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
PageRuler Unstained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Molekularmassenstandards:	GE Healthcare (Uppsala, S)
Conalbumin (75 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ribonuklease A (13,7 kDa), Aprotinin (6,5 kDa)	

2.11 Geräte und Zubehör

Sonstige verwendete Geräte und Materialien wurden in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Verwendete Geräte und Zubehör

Geräte und Zubehör	Bezugsquelle
<i>Absorptions-Spektrophotometer</i>	
UV-Vis Spektrophotometer DU730	Beckman Coulter (Krefeld)
<i>Autoklav</i>	
Systec V75	Systec (Wettenberg)
Laboklav 55-190	SHP Steriltechnik AG (Detzel)
<i>Chromatographiesysteme</i>	
ÄKTAexplorer	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
ÄKTAexpress	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
<i>Chromatographie-Medien:</i>	
<i>Affinitätschromatographie</i>	
HisTrap HP 1 & 5 ml	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Ni ²⁺ -Sepharose HP	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
His MultiTrap FF	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)

Geräte und Zubehör	Bezugsquelle
<i>Größenausschlusschromatographie</i>	
HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
HiPrep 26/10 Desalting	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Superose 12 10/300 GL	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
PD-10 Desalting	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
PD MultiTrap G-25	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
<i>Elektroporationsgerät</i>	
Elektroporator ECM 630 BTX	Harvard Apparatus (Holliston, MA, USA)
<i>Geldokumentationseinheit</i>	
Bio-Vision 3000	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
<i>Gelelektrophorese-Geräte</i>	
Electrophoresis Power Supply	Camlab (Cambridge, UK)
<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	
Owl B1A/B1/B2 EasyCast Mini Gel	Thermo Scientific (Langenselbold)
<i>SDS-PAGE</i>	
XCell SureLock Novex Mini-Cell	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NuPAGE Novex Bis-Tris-Gel (4–12%), 1 mm, 12 oder 17 Taschen	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Criterion™ Dodeca™ Cell	Biorad (München)
Criterion™ 4–20% Tris/HCl Stain-Free™ Precast Gels	Biorad (München)
<i>Koloniepicker & Zubehör</i>	
QPix2	Molecular Devices (Biberach an der Riss)
Qtray (X6023, X6029)	Molecular Devices (Biberach an der Riss)
<i>Laborautomation</i>	
Biomek FXP	Beckman Coulter (Krefeld)
Biomek 3000	Beckman Coulter (Krefeld)
<i>Oberflächenplasmonresonanz</i>	
Biacore T100	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
SA-Chip	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
CM5-Chip	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
<i>Inkubatoren</i>	
Heraeus BK 5060 E-S	Heraeus (Hanau)
INB 400	(Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach)
<i>Kleinschüttelgerät</i>	
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
<i>pH-Messgerät</i>	
inoLab pH720 (Elektrode: SenTix 81)	WTW (Weilheim)
<i>Reinstwasseranlage</i>	
TKA MicroPure	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
<i>Schüttelinkubatoren</i>	
TH 15	Edmund Bühler GmbH (Hechingen)
Innova 44R, 4230	New Brunswick Scientific (Nürtingen)

Geräte und Zubehör	Bezugsquelle
<i>Sicherheitswerkbank</i>	
HeraSafe (Typ KS 12)	Thermo Scientific (Langensfeld)
HeraSafe (Typ HS 12)	Thermo Scientific (Langensfeld)
<i>Plattenlesegeräte</i>	
DTX880 Multimode Plattenlesegerät	Beckman Coulter (Krefeld)
Paradigm Multimode Plattenlesegerät	Beckman Coulter (Krefeld)
<i>Quarzglasküvetten</i>	
Präzisionsküvetten	Hellma (Müllheim)
<i>Rollenmischer</i>	
Stuart SRT9	Bibby Scientific (Staffordshire, UK)
<i>Thermocycler</i>	
Tpersonal	Biometra (Göttingen)
LabCycler gradient 96	Sensoquest (Göttingen)
<i>Thermomixer</i>	
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
<i>Ultraschallgerät</i>	
Vibra Cell VC 750	Sonics & Materials (Newton, CT, USA)
Sonotrode 3 oder 6 mm	Zinsser Analytic (Frankfurt/M.)
<i>Waagen</i>	
Feinanalysenwaage SI-234	Denver Instrument (Bohemia, NY, USA)
Waage SI-2002	Denver Instrument (Bohemia, NY, USA)
<i>Zentrifugen und Rotoren</i>	
Allegra X-15R	Beckman Coulter (Krefeld)
Avanti J-26XP	Beckman Coulter (Krefeld)
Biofuge Fresco 21	Thermo Scientific (Langensfeld)
Galaxy Mini Mikrozentrifuge	VWR International (Darmstadt)
Optima XL-A analytische Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (Krefeld)
Rotor An50Ti	Beckman Coulter (Krefeld)
Rotor FX-6100	Beckman Coulter (Krefeld)
Rotor JA-25.50	Beckman Coulter (Krefeld)
Rotor JA-8.100	Beckman Coulter (Krefeld)
Rotor JS-5.3	Beckman Coulter (Krefeld)
Rotor SX-4750A	Beckman Coulter (Krefeld)
<i>real-time PCR</i>	
LightCycler® 480	Roche Applied Science (Mannheim)
LightCycler® 480 Mikrotiterplatte 96, weiß	Roche Applied Science (Mannheim)
LightCycler® 480 Verschlussfolie	Roche Applied Science (Mannheim)
<i>Reagenz-Reservoirs</i>	
25 ml (steril)	VWR (Dresden)
100 ml (steril)	Laborfachhandel Schubert (Leipzig)

Geräte und Zubehör	Bezugsquelle
<i>Mikrotiterplatten (Kultivierung)</i>	
96-well, U-Boden, PP	Greiner-Bio-One GmbH (Frickenhausen)
96-deepwell, U-Boden, PP	TreffLab (Degersheim, CH)
96-well, U-Boden, PP, 0,5 ml	Nunc (Roskilde, DK)
<i>Mikrotiterplatten (ELISA)</i>	
96-well, F-Boden, PSt, MediSorp	Nunc (Roskilde, DK)
384-well, F-Boden, PSt, HighBind	Greiner-Bio-One GmbH (Frickenhausen)
<i>Mikrotiterplatten (sonstige)</i>	
96-well, F-Boden, PSt, half-area-UV	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
384-well, V-Boden, PP	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
<i>Mikrotiterplatten (Folien und Deckel)</i>	
Abdeckfolien <i>BREATHseal</i>	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Abdeckfolien <i>EASYseal</i>	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Abdeckfolien <i>Breath-easy</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Aluminium <i>seal tape</i>	Nunc (Roskilde, DK)
MTP-Deckel (Art.-Nr.656171)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
<i>sonstige</i>	
2 ml-Reaktionsgefäße Protein LoBind	Eppendorf (Hamburg)
1,5 ml-Reaktionsgefäße Protein LoBind	Eppendorf (Hamburg)
Biotek-washer Elx405	Biotek (Bad Friedrichshall)
Dialyseschlauch Spectra/Por-7, MWCO 1 kDa	Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, CA, USA)
DNA-ExitusPlus	Applichem (Darmstadt)
Dynabeads M-270 Streptavidin	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Dynabeads M-280 Streptavidin	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Elektroporationsküvetten (1 mm)	BTX Harvard Apparatus (Holliston, MA, USA)
Membranfilter (PES, 0,22 µm)	Sartorius (Göttingen)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, IL, USA)
pH-Indikatorstäbchen	Carl Roth (Karlsruhe)
RNase Blaster Solution	Clontech Laboratories (Mountain View, USA)
Spritzenvorsatzfilter (0,22 bzw. 0,44 µm)	TPP (Trasadingen, CH)
Vivaspin 2-Zentrifugalfilter, MWCO 3 kDa	Sartorius (Göttingen)
Vivaspin 500-Zentrifugalfilter, MWCO 3, 5 oder 10 kDa	Sartorius (Göttingen)
3/5/10/50 ml BD Plastipak Luer- Lock	Becton Dickinson (Heidelberg)
Supor 200 PES <i>membrane disc filter</i>	Pall Corporation (Michigan, USA)
Zellkulturröhrchen 14 ml Tube	Greiner-Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Einweg-Plastiksäulen	Thermo Scientific (Langenselbold)
ZipTips®	Merck-Millipore (Darmstadt)

2.12 Software

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Software ist in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Verwendete Software

Programm und Version	Quelle
Biacore T100 Evaluation Software V.1.1	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Biomek [®] Software 3.3	Beckman Coulter
MatLab R2009b	The Mathworks
PyMol 0.99rc6	DeLano Scientific (San Francisco, CA)
QSoft XP	Molecular Devices (Biberach an der Riss)
Roche Light Cycler Software 1.5.0	Roche Applied Science (Mannheim)
SAMI [®] Software 4.0	Beckman Coulter
SnapGeneViewer	GSL Biotech LLC
SigmaPlot 11.0	Systat Software (Erkrath)
UNICORN 4.11 Control-Software	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
VMD 1.9	Universität von Illinois

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Verwendung von *Escherichia coli*

3.1.1.1 Anzucht und Konservierung

Ausgehend von Einzelklon- oder Kryokulturen erfolgte die Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) in LB-Medium unter Zugabe entsprechender Antibiotika (vgl. Tabelle 10) bei 37 °C. Für die Vorkulturen von Genexpressionen (3.1.1.4) wurde dem Medium 0,4% (m/v) Glucose beigefügt. Für größere Ansätze erfolgte die Kultivierung mit 5 ml Medium in Zellkulturröhrchen bei 37 °C und 220 rpm (Schüttelinkubator Innova 44R), die Kultivierung in 96-well-Mikrotiterplatten erfolgte mit 200 µl Medium pro well (Nunc 96-well U-Boden) bei 750 rpm (Schüttelinkubator TH 15). Die kurzfristige Stammhaltung von *E. coli* bis zu vier Wochen erfolgte über Ausstriche auf Agarplatten (Lagerung bei 4 °C). Für die langfristige Lagerung wurden Kryokulturen angelegt. Für diese wurden Übernachtskulturen (37 °C, 220 rpm oder 750 rpm bei Verwendung von Mikrotiterplatten) in LB-Medium mit Glycerol mit einer finalen Konzentration von 10–12% (v/v) versetzt. Die Kulturen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.1.2 Herstellung kompetenter Zellen

Es wurden verschiedene Stämme des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) verwendet, um kompetente Zellen zu generieren. Sofern nicht anderweitig formuliert, wurden stets sterile Materialien, Medien und Lösungen verwendet. Für Kultivierungen wurden den Bakterienstämmen entsprechende Antibiotika zugesetzt (vgl. Tabelle 5).

Elektrokompetente Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde 1 l LB-Medium mit verringerter Salzkonzentration (5 mg/ml NaCl statt 10 mg/ml) mit 10 ml einer Übernachtskultur inokuliert. Die Bakterien wurden bei 37 °C und 220 rpm bis Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm von $OD_{600\text{ nm}} = 0,5\text{--}0,6$ kultiviert. Im Anschluss an die Kultivierung wurden die Zellen für 60 min im Eisbad gekühlt sowie bei $3.000\times g$ für 30 min und 4 °C zentrifugiert. Alle folgenden Schritte wurden unter stetiger Kühlung im Eisbad oder bei 4 °C durchgeführt. Es folgte die Resuspension in 800 ml vorgekühltem bidestillierten Wasser durch kontinuierliches Schwenken der Zentrifugenbecher sowie eine erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Dieser Waschschritt wurde zweimal mit einer schrittweisen Reduktion des Resuspensionsvolumens (0,5 l und 0,2 l) mit 10% Glycerol (v/v) in Reinstwasser durchgeführt. Die Zellen wurden schließlich in 800 µl 10% Glycerol (v/v) resuspendiert und zu 50 µl in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen aliquotiert, um dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert zu werden.

Chemisch kompetente Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen basierte auf einem modifizierten Protokoll nach Inoue (1990). Zunächst wurden 100 ml LB-Mediums in einem 500 ml-Schüttelkolben mit 1 ml einer Übernachtskultur inokuliert. Die Bakterien wurden bei 20–25 °C und 220 rpm bis Erreichen einer optischen Dichte von $OD_{600\text{ nm}} = 0,5\text{--}0,6$ kultiviert und im Anschluss daran für

10 min im Eisbad gekühlt und für 10 min bei $2.500\times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Das Sediment wurde in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, für 10 min im Eisbad inkubiert und erneut unter analogen Bedingungen zentrifugiert. Die Zellen wurden nachfolgend in 4 ml TB-Puffer resuspendiert, mit 290 μl DMSO versetzt und für 10 min im Eisbad inkubiert. Es wurden 100 μl Aliquots der so behandelten Zellen in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.1.3 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Die Methode zur Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA richtete sich nach der Herstellung der kompetenten Zellen. Zur Einschätzung von Transformationseffizienzen wurden 10–100 μl Zellsuspension auf Agarplatten ausplattiert und nach Inkubation über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgezählt.

Transformation elektrokompetenter Zellen

Zur Transformation elektrokompetenter Zellen wurde ein aufgetautes Aliquot mit 1 μl DNA-Lösung (Ligationsprodukt oder gereinigtes Plasmid) versetzt und in eine vorgekühlte Küvette (Spaltbreite 1 mm) überführt. Die Elektroporation wurde entsprechend der *E. coli*-Stämme mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Tabelle 14: Transformationsbedingungen

	<i>E. coli ElectroTen-Blue</i>	andere <i>E. coli</i> -Stämme
Spannung [kV]	2250	1800
Widerstand [Ω]	100	100
Kapazität [μF]	25	25

Nach der Elektroporation wurden die Zellen schnellstmöglich in 1 ml vorgewärmten SOC-Medium aufgenommen und anschließend für 30–60 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 750 rpm in einem 2 ml-Reaktionsgefäß im Thermomixer inkubiert. Für Standard-Klonierungen oder analytische Zwecke wurden anschließend 10–100 μl Zellsuspension auf LB-Agarplatten unter Verwendung entsprechenden Antibiotika (Tabelle 10) ausplattiert und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht inkubiert. Für Leserahmenselektionen (3.3.1) wurde die Zellsuspension komplett auf QTrays mit LB-Agar ausplattiert und die Zellen bei $30\text{--}37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht inkubiert.

Transformation chemisch kompetenter Zellen

Zur Transformation chemisch kompetenter Zellen wurde ein auf Eis aufgetautes Aliquot mit bis zu 5 μl DNA-Lösung versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30 s bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad. Im Anschluss daran wurden die Zellen erneut für 2 min auf Eis gestellt und anschließend in 1 ml vorgewärmten SOC-Medium aufgenommen. Es folgte eine Inkubation für 30–45 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 750 rpm in 2 ml-Reaktionsgefäßen im Thermomixer, bevor 100–1.000 μl der Zellsuspension auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert wurden.

3.1.1.4 Heterologe Expression rekombinanter Proteine

Schüttelkolben

Zur Herstellung rekombinanter Proteine in größerem Maßstab wurden *E. coli*-Zellen in Schüttelkolben mit Schikanen verwendet. Das maximal eingesetzte Kulturvolumen betrug 10–20% des Kolbenvolumens. Als Inokulum wurden Vorkulturen aus LB-Medium mit 0,4% (w/v) Glucose und entsprechenden Antibiotika verwendet. Die Vorkulturen wurden zunächst für 8–10 Stunden bei 37 °C und 220 rpm in Kultivierungsröhrchen oder Kolben mit Schikanen inokuliert. Die autoinduzierenden Expressionskulturen in ZYM5052-Medium (Studier 2005) wurden davon ausgehend 1/100 (v/v) inokuliert und anschließend bei 220 rpm für 17–20 h und 25–37 °C inkubiert. Das Autoinduktionssystem basiert auf einem diauxischen Effekt bei Umstellung des Metabolismus von Glucose auf Lactose, wobei Glycerol als Kohlenstoffquelle verfügbar ist, so dass die Lactose nicht vollständig umgesetzt wird und durchgehend als *inducer* dient. Als Nebenprodukt des Lactose-Metabolismus fällt Allolactose an, welche durch die Bindung an den *lac*-Repressor den *lac*-Operator der Expressionsplasmide induziert. Es erfolgte die Zellernte bei 3.000×g und 4 °C für 20 min. Die Biofeuchtmasse wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Mikrotiterplatten

Die parallele Herstellung rekombinanter Proteine erfolgte über die Kultivierung in 500 µl 96-*well*-Platten (Nunc) oder in 2 ml-*deepwell*-Mikrotiterplatten. Ausgehend von Flüssigkulturen (3.1.1) wurden 200 µl (*deepwell*: 500 µl) ZYM5052-Autoinduktionsmedium (Studier 2005) automatisch über das *colony picker*-System QPix2 (Programm: *replicating* unter Verwendung von *high-capacity pins*), oder manuell 1/100 (v/v) inokuliert. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend mit einer atmungsaktiven Folie versiegelt und für 16–22 h bei 750 rpm und 30–37 °C inkubiert. Die Zellernte erfolgte bei 3.000×g und 4 °C für 20 min, die Biofeuchtmasse wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.1.1.5 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss nach erfolgter Genexpression (3.1.1.4) erfolgte über eine Kombination enzymatischer und physikalischer Faktoren. Die Biomasse wurde zunächst in Phosphat- oder HEPES-gepufferter Saline bei pH 8,0 (siehe 2.7) resuspendiert. Bei präparativen Ansätzen für die Reinigung über Nickel-Chelat-Säulen enthielten die Puffer zusätzlich 20 mM Imidazol. Bei Kultivierung in Mikrotiterplatten wurden feste Volumina an Puffer verwendet (200 µl/*well* bei Verwendung von Nunc U-Boden Mikrotiterplatten und 500 µl bei Kultivierungen mit 1 ml Kulturvolumen in *deepwell*-Platten). Zentrifugierte Zellen aus Kultivierungen in Schüttelkolben wurden in 2–5 ml Puffer pro Gramm Biofeuchtmasse resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden mit Lysozym (auf 200 µg/ml) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (Rollmischer oder Schüttelinkubator).

Zellaufschluss über Ultraschall

Der Aufschluss über Ultraschall erfolgte unter ständiger Kühlung der Proben im Eisbad. Für Probenvolumina unter 1 ml wurde eine 3 mm Sonotrode verwendet, für größere Volumina (1–

10 ml) eine Sonotrode mit 6 mm. Es wurden fünf Pulse à 20 s mit 30-sekündiger Pause bei einer Amplitude von 21% durchgeführt.

Zellaufschluss über Gefrier/Tau-Zyklen

Mit den resuspendierten, in versiegelten 500 µl 96-well-Platten (Nunc) oder in 50 ml-Röhrchen vorliegenden Zellen wurden stets vier Gefrier/Tau-Zyklen durchgeführt. Hierbei wurden die Lysate für 5 min in flüssigem Stickstoff inkubiert und anschließend im temperierten Wasserbad (30 °C) oder im Schüttelinkubator (Mikrotiterplatten 30–40 °C) für 10 Minuten aufgetaut.

Nach erfolgtem Zellaufschluss wurde den Lysaten 2 mM MgSO₄, 10 U/ml Benzonase, sowie 0,5 mM eines Serinproteaseinhibitors (PMSF oder AEBSF) zugegeben, bevor sie auf dem Rollmischer oder im Schüttelinkubator (Mikrotiterplatten) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen erfolgte über einen Zentrifugationsschritt für 30 min bei 4 °C und 50.000×g in 50 ml-Röhrchen oder bei 4.000×g in Mikrotiterplatten.

3.1.2 Verwendung von *Myxococcus xanthus*

3.1.2.1 Anzucht und Konservierung

Sämtliche Kultivierungen von *Myxococcus xanthus* (MX) wurden unter Lichtausschluss bei 32 °C durchgeführt. Bei Verwendung von Submerskulturen wurden stets Schüttelkolben ohne Schikanen verwendet. Das Kulturvolumen betrug dabei nicht mehr als 5% des Kolbenvolumens.

Die Lagerung des Organismus erfolgte ausschließlich in Form von Kryokulturen. Zur Herstellung wurden native Zellen oder chemisch induzierte Sporen aus Submerskulturen verwendet. Ausgehend von Agarplattenkulturen wurden zunächst 50 ml CYE-Medium inokuliert. Nach Wachstum für 18 h bei 32 °C und 160 rpm wurden die Zellen bei 3.000×g und 4 °C für 15 min zentrifugiert und anschließend in 10 ml CYE-Medium resuspendiert. Zur Erstellung einer Lebendkultur wurde den Zellen 2,5 ml DMSO (final 20% (v/v)) zugegeben und die Kulturen bei -80 °C gelagert. Zur Generierung einer Sporenkultur wurden 4 ml der in CYE-Medium resuspendierten Zellen 200 µl DMSO auf 0,05% (v/v) zugegeben und bei 32 °C und 160 rpm über Nacht inkubiert. Im Anschluss daran wurde den Zellen erneut 800 µl DMSO (Endkonzentration 20% (v/v)) zugegeben und 1 ml Aliquots bei -80 °C gelagert.

3.1.2.2 Herstellung von Myxosporen

Myxosporen für Bindungsanalysen von Protein S-Varianten (3.4.10) wurden unter nährstofflimitierten Bedingungen hergestellt. Es wurden sowohl Emerskulturen auf Minimalagar als auch Submerskulturen nach Rosenbluh (1989) verwendet. Beide Arten der Herstellung führten zu Protein S-enthaltenden und -bindenden Sporen, wie sie für die Klasse der fruchtkörperbasierten Sporen beschrieben wurden (White 1975), und sich in ihren Eigenschaften von chemisch induzierten Sporen unterscheiden (Dworkin und Gibson 1964). Zur Herstellung wurden *M. xanthus*-Kryokulturen zunächst auf Vollmedium-Agar (CYE-Agar) ausgestrichen und für 72 Stunden unter Lichtausschluss bei 32 °C inkubiert. Die Kulturen wurden im Anschluss daran mit Minimalmedium (MMC) abgespült und kurz zentrifugiert. Für Emerskulturen wurde der Überstand auf Minimalmedium-Agar getropft und 5 Tage inkubiert.

Im Anschluss daran wurden die gebildeten Sporen mit Minimalmedium abgeschwemmt und analog zu den Submerskulturen gereinigt. Für Submerskulturen wurde Minimalmedium MMC in schikanefreien Schüttelkolben (25 ml Medium in Kolben mit 500 ml Fassungsvermögen) mit den abgeschwemmten Kulturen inokuliert und für 5 Tage bei 300 rpm und 32 °C inkubiert.

Die Reinigung der hergestellten Sporen erfolgte für beide Kultivierungsstrategien analog und diente der Entfernung des natürlich produzierten und gebundenen Protein S von der Sporenoberfläche. Die Sporen wurden nach der Kultivierung durch Zentrifugation geerntet (5.000×g für 10 Minuten bei 4 °C). Das Medium wurde im Anschluss daran verworfen und die Sporen über einen Ultraschall-Puls (15 s, 30% Amplitude) in 25 ml kaltem EDTA-enthaltenden Tris-Puffer (MXP) resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde anschließend dreimal mit Hitzeschritten nach Resuspension der Sporen (10 min bei 70 °C im Wasserbad) wiederholt. Final wurden die Sporen in 1 ml MXP aufgenommen und schließlich in einem Autoklaven inaktiviert (121 °C, 20 min). Die so hergestellten Sporen waren nicht mehr keimfähig, behielten jedoch die Eigenschaft, Protein S zu binden. Nach Inaktivierung wurden die Sporen bei 17.000×g und 4 °C für 5 min geerntet und final in 300 µl MXP resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Enzymatische Spaltung und Dephosphorylierung von DNA

Die enzymatische Spaltung doppelsträngiger DNA erfolgte stets in, nach Herstellerangaben der verwendeten Enzyme, gepufferten Systemen mit den empfohlenen Temperaturen. Die eingesetzten Enzymmengen wurden so gewählt, dass sie in Bezug auf die eingesetzte DNA-Menge und die Reaktionszeit in mindestens dreifachem Überschuss vorlagen, jedoch nie ein höheres Volumen als 10% (v/v) des Gesamtvolumens betrug. Nach beendeter Reaktion wurden die Enzyme thermisch inaktiviert (wahlweise 20 min bei 65 °C oder 10 min bei 80 °C). Bei enzymatischen Spaltungen von Plasmid-DNA wurde der Ansatz mit Alkaliner Phosphatase versetzt (1 U/µg DNA), um die 5'-Enden zu dephosphorylieren und somit den Anteil an Religierungen zu verringern. Die Dephosphorylierung erfolgte wahlweise zeitgleich mit der Restriktionsspaltung oder im Anschluss daran für mindestens 30 min bei 37 °C. Geschnittene DNA-Moleküle wurden nach erfolgter Reaktion über Agarose-Gelelektrophorese (3.2.3) mit anschließender Gelextraktion (3.2.5) gereinigt.

3.2.2 Ligierung von DNA

Die über enzymatische Spaltung erhaltenen DNA-Fragmente mit kompatiblen Überhängen (3.2.1) wurden durch den Einsatz von T4-DNA-Ligase ligiert. Lineare Fragmente wurden in äquimolaren Konzentrationen eingesetzt, bei Klonierung von Vektoren wurde ein Verhältnis von 1:3 (Vektor:Insertionsfragment) eingehalten. Eingesetzte Konzentrationen an DNA und Puffern entsprachen den Herstellerangaben. Zusätzlich wurde den Reaktionsansätzen 5 mM ATP zugesetzt. Die Reaktion erfolgte für 10–16 h bei 16 °C und wurde durch die thermische Inaktivierung des Enzyms bei 65 °C für 10 min beendet. Ligierungsansätze wurden wahlweise direkt für Transformationen von *E. coli*-Zellen verwendet (3.1.1.3), oder zunächst über eine Ethanolfällung (3.2.6) gereinigt.

3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Trennung von DNA-Fragmenten zu analytischen und präparativen Zwecken erfolgte über eine Agarosegelelektrophorese. Alle DNA-Gemische wurden vor der elektrophoretischen Trennung mit $\frac{1}{4}$ ihres Volumens $6\times$ Orange Loading Dye (New England Biolabs GmbH) versetzt. Für Fragmente ≥ 400 bp wurde 1–2%ige (w/v) LE-Agarose verwendet, für Fragmente von 60–700 bp 2–3%ige (w/v) Sieve-Agarose. Die Trennung von Fragmenten unter 60 bp wurde mit 5,5%ige (w/v) SieveGP-Agarose durchgeführt. Die Herstellung der Gele erfolgte stets in dem verwendeten Laufpuffer (TAE Puffer). Für präparative Anwendungen wurde Agarose des Reinheitsgrades *genetic pure* (GP) verwendet. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in horizontalen Gelen mit einer Spannung von 5–6 V/cm für 1–2 Stunden. Zur Visualisierung der DNA nach durchgeführter Elektrophorese wurde das Agarosegel für 20–30 min in einer frisch hergestellten Ethidiumbromid-Lösung (2 $\mu\text{g/ml}$ in TAE) geschwenkt und anschließend über das BioVision 3000-Geldokumentationssystem analysiert.

3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Sowohl für die Identifikation, Amplifikation oder Modifikation von Genabschnitten wurde die Polymerase-Kettenreaktion verwendet (Mullis und Faloona 1987). Zum Einsatz kamen im Rahmen dieser Arbeit *Pfu*- und *Phusion*-DNA-Polymerasen. Die Verwendung der Polymerasen erfolgte nach Herstellerangaben, wobei die genauen Reaktionsbedingungen je nach verwendeter Kombination an *template*-DNA, Primern und Polymerase variierten. Die Hybridisierungstemperatur richtete sich nach der Sequenz der verwendeten Primer, die Dauer der DNA-Amplifikation nach der verwendeten Polymerase und der Gesamtgröße des zu amplifizierenden Konstruktes (*Phusion*: 15–30 s/kbp, *Pfu*: 60 s/kbp).

Einem initialen Denaturierungsschritt folgten 20–35 Zyklen Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese, sowie eine finale DNA-Amplifikation. Verwendete Reaktionsvolumina für PCR-Ansätze überschritten nie mehr als 50 μl pro 200 μl PCR-Gefäß.

3.2.4.1 Amplifikation von Genabschnitten

In Tabelle 15 dargestellt befindet sich eine Übersicht über typische Reaktionsbedingungen für PCR-Amplifikationen.

Tabelle 15: Übersicht über typische PCR-Reaktionsbedingungen

Reagenz	Verwendung pro 50 μl Ansatz	Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	
<i>template</i> DNA	1–50 ng	Initiale Denaturierung	120	95–98	} 20–35 Zyklen
Primer 1	0,5 μM	Denaturierung	10	95–98	
Primer 2	0,5 μM	Hybridisierung	15	50–68	
Polymerase-Puffer	1 \times	Amplifikation	7–25	72	
dNTP	0,2 mM	Finale Amplifikation	120	72	
Polymerase	0,2–1 U				

3.2.4.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Ortsgerichtete Mutagenesen erfolgten in Anlehnung an das Protokoll des *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene). Dieses Verfahren wurde wahlweise manuell oder über ein im Rahmen dieser Arbeit automatisiertes Verfahren für die PCR-Vorbereitung auf einem Biomek 3000-Laborroboter durchgeführt. Typische Reaktionsbedingungen für ortsgerechte Mutagenesen wurden in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Übersicht über typische Bedingungen für ortsgerechte Mutagenesen

Reagenz	Verwendung pro 50 µl Ansatz	Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	
<i>template</i> DNA	5–50 ng	Initiale	120	95	
Primer 1	0,5 µM	Denaturierung			
Primer 2	0,5 µM	Denaturierung	15	95	} 12–15 Zyklen
Polymerase-Puffer	1×	Hybridisierung	15	55	
dNTP	0,2 mM	Amplifikation	60/kbp	68	
<i>Pfu</i> -Polymerase	0,1 U	Finale Amplifikation	120	68	

In Anschluss an die durchgeführte PCR zur ortsgerechten Mutagenese wurden die Ansätze mit 10 U *DpnI* versetzt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Es wurde 1 µl des Ansatzes direkt für die Transformationen von *E. coli*-Zellen (3.1.1.3) verwendet.

3.2.4.3 Einzelkolonie-PCR

Zur Verifikation von DNA mit bestimmter Sequenz in einzelnen bakteriellen Klonen wurde eine Einzelkolonie-PCR mit *Pfu*-DNA-Polymerase und zielsequenzspezifischen Primern durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 10 µl, die Konzentration der eingesetzten Reagenzien entsprach den Herstellerangaben. Als *template*-DNA wurde eine einzelne *E. coli*-Kolonie verwendet.

3.2.5 DNA-Isolierung aus Zellen, Agarosegelen oder PCR-Ansätzen

Zur Isolierung von DNA wurden Kits des Herstellers Promega nach Herstellerangaben verwendet. Für Präparationen von Plasmid-DNA aus *E. coli* im kleinen Maßstab wurde das *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* verwendet, bei größeren Präparationen das *Wizard Plus SV Midipreps DNA Purification Kit*. Zur Isolierung von DNA nach Reinigung über Agarosegele (vgl. 3.2.3) oder nach durchgeführter PCR-Amplifikation (3.2.4) wurde das *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* verwendet. Die Elution der DNA von den Silica-Säulen erfolgte in allen Fällen wahlweise über Nuklease-freies Wasser oder in 10 mM Tris-Puffer pH 8,0. Die Reinigung sehr kleiner Fragmente (unter 100 bp) aus Agarosegelen erfolgte über Agarase-Verdau mit anschließender Ethanol-fällung (3.2.6). Hierfür wurde die Agarase nach Herstellerangaben verwendet. Die ausgeschnittenen Gelbanden wurden zunächst bei

62 °C gelöst und anschließend auf 42 °C temperiert. Dem Ansatz wurden 2 U Agarase pro 100 mg Agarose zugesetzt und für 2 h bei 650 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde 1/3 des Volumens an Ammoniumacetat (10 M) hinzugegeben und der gesamte Ansatz für 10 min bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde für eine Ethanol-fällung (3.2.6) ohne weitere Zugabe von Salzen verwendet.

3.2.6 Ethanol-Fällung von DNA

Zur Konzentrierung und Reinigung von DNA-Lösungen wurde eine Ethanolpräzipitation verwendet. Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde zunächst mit dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol (100% reinst, -20 °C) sowie mit 3,3 M Natriumacetat (finale Konzentration 0,1 M) und optional mit 5% (v/v) Glykogen als Fällungshilfe versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1–12 Stunden bei -20 °C. Nach Zentrifugation (21.000×g, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Präzipitat wurde ein- bis zweimal mit gleichem Volumen an Ethanol (70%, -20 °C) gewaschen und anschließend für 30 min bei 37 °C getrocknet. Die so behandelte DNA wurde final in 10–50 µl Nuklease-freien Wassers oder 10 mM Tris-Puffer pH 8,0 resolubilisiert.

3.2.7 Photometrische Konzentrationsermittlung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsermittlung von DNA-Lösungen erfolgte über UV/Vis-Spektroskopie. Für die Proben wurde ein pufferkorrigiertes Spektrum von 240–330 nm in Quarzküvetten (Firma Hellma mit 1 cm Weglänge) vermessen. Der Zusammenhang der DNA-Konzentration ergibt sich nach dem Gesetz von Lambert-Beer mit:

Gleichung 1: Ermittlung der DNA-Konzentration nach Lambert-Beer

$$A_{260\text{ nm}} = \epsilon_{260\text{ nm}} \times c \times d \quad (\text{Gleichung 1})$$

$A_{260\text{ nm}}$ = Extinktion bei 260 nm korrigiert um die Extinktion bei 320 nm

$\epsilon_{260\text{ nm}}$ = molarer Extinktionskoeffizient bei 260 nm $[\frac{\mu\text{l}}{\text{ng} \times \text{cm}}]$

d = Weglänge des Strahlengangs [cm], c = Konzentration [ng/µl]

Als Extinktionskoeffizient für doppelsträngige DNA wurde der Wert 0,02 $[\frac{\mu\text{l}}{\text{ng} \times \text{cm}}]$ verwendet (Lottspeich 2006).

3.2.8 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten wurden von den Firmen GATC (Konstanz) oder Qiagen (Hilden) durchgeführt.

3.3 Präsentation von Proteinen über Phagen-*display* und evolutionäre Selektion durch Ribosomen-*display*

Zur Anreicherung von Proteinvarianten mit gesuchtem Eigenschaftsprofil aus großen Bibliotheken können sowohl evolutionäre *in vivo*-Selektionssysteme wie das Phagen-*display* (Smith 1985; Paschke 2006), als auch *in vitro*-Verfahren wie das Ribosomen-*display* (Hanes

und Plückthun 1997) verwendet werden. Grundlage aller Verfahren ist die Kopplung von Phänotypen der Bibliotheksvarianten mit ihren entsprechenden Genotypen. So werden zur Selektion mittels Ribosomen-*display* (RD) zunächst stabile ternäre Komplexe aus naszenter Peptidkette, Ribosom und mRNA gebildet. Diese Komplexe werden anschließend hinsichtlich der Bindung der präsentierten Proteinvarianten gegenüber einer immobilisierten Zielstruktur (*target*) selektiert. Zur Rückgewinnung der genetischen Information nach erfolgter Selektion werden die ternären Komplexe zerstört und die mRNA isoliert. Über reverse Transkription mit anschließender cDNA-Amplifikation können die verbleibenden Proteinvarianten als neue DNA-Bibliothek gewonnen werden. Diese Bibliothek kann nun in einem erneuten RD-Zyklus verwendet, oder nach Klonierung in ein Expressionssystem analysiert werden.

3.3.1 Erstellung einer Protein S DNA-Bibliothek

Zur Generierung von Bibliotheken auf Basis des Protein S wurde ein modulares System verwendet. Bereiche des Gens nahe der Ca^{2+} -bindenden Motive (Aravind *et al.* 2009) wurden ausgewählt, um Diversität zu generieren (Abbildung 4 A+B). Die Auswahl basierte auf Ergebnissen durchgeführter Analysen zur Charakterisierung von Varianten des Protein S zur Identifikation geeigneter Aminosäurepositionen (Abschnitt 4.2). Es wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Protein S-Bibliotheken generiert, die in der Summe jeweils über 15 randomisierte Positionen (Lösungsmittelexposition wt-Protein S: ~ 1300 und $\sim 1160 \text{ \AA}^2$) verfügten (Abbildung 4 A).

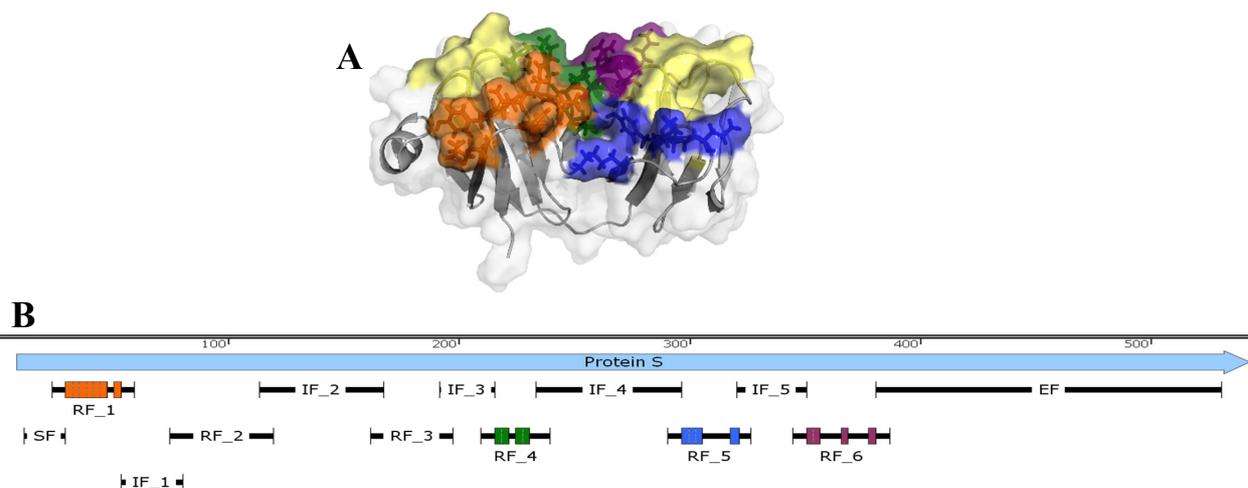


Abbildung 4: Modulares Design für die Generierung von Bibliotheken auf Basis des Protein S

(A) Oberflächendarstellung der für die Randomisierung vorgesehenen Bereiche auf Basis des Protein S, sowie der Calciumionen-bindenden Motive (gelb). Die farblich gekennzeichneten Flächen stellen zusammenhängende Bereiche des Gens von Protein S dar, welche als Module bezeichnet werden. Die Darstellung wurde mit der Software PyMol generiert.

(B) Schematische Darstellung des Gens für Protein S und den modularen Aufbau zur Generierung von Bibliotheksfragmenten. Das Gen von Protein S wurde in konstante (SF, EF und IF) und randomisierte Bereiche (RF) unterteilt.

Die einzelnen Bereiche des Gens gliederten sich in konstante (*intermediate fragments*, IF; Start- und Endfragmente: SF, EF) und randomisierte Abschnitte (*randomized fragment*, RF). Für die modulare Generierung von Bibliotheken wurden die randomisierten Abschnitte ebenfalls mit der wildtyp-Sequenz erstellt, um schnell unterschiedliche Bibliotheken aufbauen zu können (Tabelle 17).

Tabelle 17: Generierung von Bibliotheken basierend auf Protein S

DNA-Fragment	DNA-Abschnitt	Randomisierte Positionen auf Protein-Ebene
Start	1–21	-
RF_1	16–51	6 (Y8,N9,E10,D11,Q13, K15)
IF_1	46–72	-
RF_2	73–111	-
IF_2	106–159	-
RF_3	154–189	-
IF_3	184–207	-
RF_4	202–231	5 (E70, E71, G73, P74, L75)
IF_4	226–288	-
RF_5	283–318	4 (Y97, K98, E99, K104)
IF_5	313–342	-
RF_6	337–378	4 (Q115, A116, R120, D124)
Endfragment	372–522	-

Konstante Fragmente ohne randomisierte Bereiche wurden über eine PCR (3.2.4.1) auf dem Gen für Protein S-Wildtyp oder aber durch Assemblierung phosphorylierter Primer (Startfragment) gewonnen. Für die Gewinnung von randomisierten Fragmenten wurden Oligonukleotide der Firma Ella Biotech (Martinsried) verwendet. Durch den Einsatz von vorgefertigten Trinukleotiden bei der Synthese können codierende Sequenzen für ausgewählte Aminosäuren vermieden werden (Virnekas *et al.* 1994). Bei dem Bibliotheksdesign der Protein S-Bibliotheken wurden für die Aminosäuren Prolin und Cystein codierende Trinukleotide bei der Synthese nicht verwendet. Zur Generierung doppelsträngiger DNA der randomisierten Fragmente erfolgte eine Auffüllreaktion über das Klenow-Fragment. Für diese Reaktion wurden den randomisierten Oligonukleotiden (PS_RF1_6.1, PS_RF4_5.1, PS_RF5_4.1 und PS_RF5_4.1) ein endständiger Primer (PS_lib_anti) äquimolar hinzugefügt. Der Ansatz enthielt weiterhin 1/10 Volumen an Puffer O (Fermentas), und wurde zu Beginn für 5 min bei 95 °C erhitzt. Zur Hybridisierung des endständigen Primers wurde der Ansatz anschließend mit einem Gradienten von -1 Kmin^{-1} auf 37 °C abgekühlt. Es folgte die Zugabe von dNTP auf 60 μM (je dNTP) und 1 U Klenow-Fragment pro 16 μl Gesamtvolumen. Die Elongation erfolgte für 15 min bei 37 °C und endete mit einer Hitzeinaktivierung des Klenow-Fragmentes bei 65 °C für 60 min.

Zur Qualitätsverbesserung der finalen Bibliothek wurden sowohl konstante als auch randomisierte Fragmente einer Leserahmenselektion unterzogen. Verwendet wurde ein in der Arbeitsgruppe modifizierter pInSAlect(*DmdNK+1*)-Vektor (Gerth *et al.* 2004) mit geänderter multipler Klonierungsstelle (Schneider 2010), die eine Klonierung über *AgeI/MluI*-Schnittstellen erlaubt. Nach Klonierung des Zielfragmentes befindet sich auf dem Vektor eine 5' gelegene, für das TAT-Signalpeptid codierende Sequenz und eine 3'-gelegene β -Lactamase codierende Sequenz. Nur insertierte Fragmente ohne Leserahmenverschiebung erlauben die korrekte Expression der β -Lactamase und somit die Vermittlung einer Carbenecillin-Resistenz durch TAT-Transport der Lactamase in das Periplasma. Weiterhin enthält der Vektor codierende Sequenzen für das VMA-Intein aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dieses entfernt die zwischen TAT-Signal und β -Lactamase gelegene Sequenz nach Transkription durch Spleißen,

um zu verhindern, dass Eigenschaften des insertierten Fragmentes nach Translation eine limitierende Rolle bei der Resistenzvermittlung spielen.

Nach Klonierung der Fragmente in den pInSAlect_fs-1-Vektor wurden *E. coli*-ElectroTen-Blue-Zellen über eine Elektroporation transformiert (3.1.1.3) und auf Selektionsmedium ausgestrichen. Nach erfolgter Selektion für 20 h bei 30 °C konnten die Zellen ab gespült und die Plasmide über eine Midi-Präparation gewonnen werden (3.2.5). Zur Verwendung für die Bibliotheksklonierung wurden die leserahmenselektierten Fragmente im Anschluss über eine PCR amplifiziert (3.2.4). Die einzelnen Fragmente wurden mit flankierenden Erkennungssequenzen für Typ IIS-Restriktionsenzyme (5': *Eco31I* und 3': *Esp3I*) generiert. Diese schneiden sequenzunabhängig innerhalb der folgenden fünf 3'-Nukleotide ihrer Erkennungssequenz, womit ein kohäsiver Überhang von vier Basenpaaren entsteht. Somit konnten die einzelnen Fragmente nach entsprechender Spaltung (3.2.1) und Reinigung (3.2.3) iterativ mit benachbarten Fragmenten ligiert (3.2.2) werden. Nach Reinigung der Ligationsprodukte über Agarosegelelektrophorese (3.2.3) wurden die Zwischenprodukte über eine PCR amplifiziert (ModLib_fwd×ModLib_rev; Hybridisierung bei 63 °C mit 6–20 Zyklen) und für die nächste Runde der Bibliotheksassemblierung verwendet.

Die in dieser Arbeit generierten Bibliotheken basieren auf den Modulen RF_1, 4 und 5 (PS_145) beziehungsweise auf den Modulen RF_1, 4 und 6 (PS_146). Alle weiteren RF-Fragmente entsprachen den Wildtyp-Sequenzen. Jede der Bibliotheken umfasste somit 15 randomisierte Positionen mit 18 zugelassenen Aminosäuren pro Position (Δ Cystein, Δ Prolin), mit einer resultierenden theoretischen Diversität von $6,7 \times 10^{18}$ Varianten.

3.3.2 Präsentation von Protein S auf der Oberfläche von Bakteriophagen

Die Herstellung von Phagen erfolgte zu analytischen Zwecken im Mikrotitermaßstab. Die Phagenherstellung erfolgte stets im direkten Anschluss an eine Transformation von *E. coli*-ER2738-Zellen mit pCD87SA-Phagemiden, in welche die entsprechenden Gerüstproteine kloniert wurden. Ausgehend von einer Einzelkolonie wurden 600 μ l 2YT-Medium (+30 μ g/ml Chloramphenicol) inokuliert und bei 30 °C und 250 rpm für 14 h inkubiert. Ausgehend von dieser Kultur wurden im Anschluss erneut 600 μ l 2YT (+30 μ g/ml Chloramphenicol)-Medium mit 15 μ l inokuliert und für 1,5 h bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Die Kulturen wurden auf 26 °C abgekühlt, mit 10 μ l/well M13K07 Helferphagen (6×10^9 pfu/ml; MOI ≈ 1) versetzt und für 30 min bei 26 °C ohne Durchmischung inkubiert. Nach Zugabe von Kanamycin auf 50 μ g/ml wurde der Ansatz erneut für 15 min bei 26 °C und 250 rpm inkubiert und für 10 min bei $3.000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 600 μ l 2YT-Medium (30 μ g/ml Chloramphenicol, 50 μ g/ml Kanamycin und 0,1 μ g/ml Tetracyclin) aufgenommen und für 14 h bei 26 °C und 250 rpm kultiviert. Die Präparation der Phagen erfolgte durch Sedimentation der Bakterienzellen bei $10.000 \times g$ und 4 °C für 20 min. Der Überstand nach Zentrifugation wurde über einen 0,45 μ m-Spritzenfilter gereinigt, und die Phagen durch die Zugabe von $\frac{1}{4}$ des verbleibenden Volumens PEG/NaCl über eine Stunde auf Eis ausgefällt. Zur Sedimentation der Phagen wurde ein Zentrifugationsschritt für 20 min bei 4 °C und $12.000 \times g$ verwendet. Das entstandene Sediment wurde in 0,5 ml kaltem und sterilisiertem HBSC aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Vor Verwendung wurden erneut unlösliche Partikel über einen Zentrifugationsschritt bei $20.000 \times g$ und 4 °C für 5 min entfernt.

3.3.3 Präsentation von Protein S über Ribosomen-*display*

Zur Anpassung der Protein S-Bibliothek an das Ribosomen-*display*-Format wurden die 5'-regulatorischen Sequenzen und die 3'-Anker- und *spacer*-Fragmente über die vorhandenen *AgeI/MluI* Schnittstellen nach Verdau der Konstrukte angefügt (Abbildung 5). Die 3'-Anker-Sequenz basierte in diesem Verfahren auf einem SecM (Gumbart *et al.* 2012) vermittelten *stalling* während der Proteinsynthese am Ribosom. Als Platzhaltersequenz wurde eine auf einem natürlichen Interdomänen-Verbindungsstrang beruhende Sequenz verwendet (Nett *et al.* 2000). Auf RNA-Ebene wurde das Konstrukt durch 5' und an 3' gelegene Haarnadelstrukturen (*stem loop*) vor RNase-Aktivität geschützt. Die Sequenzen der Konstrukte sind dem Anhang zu entnehmen (Abbildung A 6, Abbildung A 7). Bedingt durch die verwendeten Restriktions-schnittstellen zur Klonierung verfügten die Protein S-Varianten bei Präsentation über das RD über drei zusätzliche Aminosäuren, die sich in der Sequenz direkt hinter dem Start-Methionin befinden („MGTG“).



Abbildung 5: Regulatorische Elemente in RD-Bibliotheksdesign auf Basis von Protein S aus *M. xanthus*

Die RD-Konstrukte beinhalteten die für die Transkription und Translation notwendigen T7-Promotor- und Ribosomenbindestellen (RBS) codierende, sowie inerte und strukturbrechende Sequenzen. Das Stop-Codon des Protein S wurde aus der Sequenz entfernt, um eine Dissoziation des Konstruktes zu vermeiden. Als Anker-Sequenz wurde ein SecM-vermitteltes *stalling* mit natürlich vorkommenden Platzhaltersequenzen („L14“) verwendet. Auf RNA-Ebene wurde das Konstrukt über 3' und 5' gelegene Haarnadelstrukturen vor RNase-Aktivität geschützt. Die Konstrukte wurden über einen gekoppelten Restriktions-/Ligierungsansatz generiert.

Sämtliche Arbeiten während der Selektion bis zur vollendeten reversen Transkription (Abschnitte 3.3.4–3.3.6) erfolgte nach den Richtlinien RNase-freier Arbeiten und unter Verwendung RNase-freien Wassers (Fermentas).

3.3.4 Gekoppelte *in vitro*- Transkription und -Translation

Für die Generierung ternärer Komplexe wurde ein gekoppeltes *in vitro*-Transkriptions- und -Translationverfahren (ITT) verwendet. Das in dieser Arbeit verwendete *PURExpress Protein Synthesis Kit* (NEB) bietet den Vorteil gereinigter Komponenten mit geringem RNase-Hintergrund und damit einer erhöhten RNA-Stabilität im Vergleich mit *E. coli* S30-Extrakten. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis gekühlt durchgeführt. Das verwendete Reaktionsvolumen richtete sich nach der Menge eingesetzter DNA und den Herstellerangaben. Maximal wurde ein Reaktionsvolumen von 75 µl mit einer DNA-Konzentration von 29 µg/µl verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt zusätzlich 2,4 U/µl murinen RNase-Inhibitor (NEB) zur Stabilisierung der ternären Komplexe. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Bibliotheks-DNA (3.3.1) gestartet und erfolgte für 20 min bei 37 °C und 500 rpm im Thermomixer. Zum Abstoppen wurde dem Ansatz im Anschluss daran das 4,5fache Volumen an eiskaltem SBC-Puffer zugegeben und der gesamte Ansatz bei 4 °C und 21.000×g für 10 min zentrifugiert. Für eine präferentiell monovalente Präsentation von Proteinvarianten wurde das *PURExpress*[®]

Δ Ribosome Kit (NEB) verwendet und den Reaktionsansätzen ein im Vergleich zur eingesetzten DNA-Menge molarer Überschuss von Ribosomen zugegeben (Tabelle 17).

3.3.5 Immobilisierung zielspezifischer und Ca^{2+} -abhängiger ternärer Komplexe

Die Anreicherung Ca^{2+} -sensitiver Varianten aus den generierten Protein S-Bibliotheken (3.3.1) erfolgte über ein modifiziertes *bio-panning* mit der Präsentation der naszenten Varianten über ribosomale ternäre Komplexe (Abbildung 6). Da die generierten ternären Komplexe (3.3.4) nicht kovalent verknüpft sind, wurden die Bedingungen der Selektion so gewählt, dass diese nicht dissoziieren. Neben einer niedrigen Temperatur werden die ternären Komplexe vor allem durch die Verfügbarkeit von Mg^{2+} stabilisiert. Die Ca^{2+} -Konzentration in Mg^{2+} -haltigen Puffern wurden durch den Einsatz des Chelators EGTA reguliert, welcher über eine signifikant geringere Affinität zu Mg^{2+} ($K_D = 10^{-6}$ M) als zu Ca^{2+} ($K_D = 10^{-11}$ M) verfügt (Martell und Smith 1974). Dies ermöglichte die maßgebliche Reduktion von Ca^{2+} , ohne die ternären Komplexe durch zu geringe Konzentration an Mg^{2+} zu destabilisieren (M. Schneider, persönliche Mitteilung).

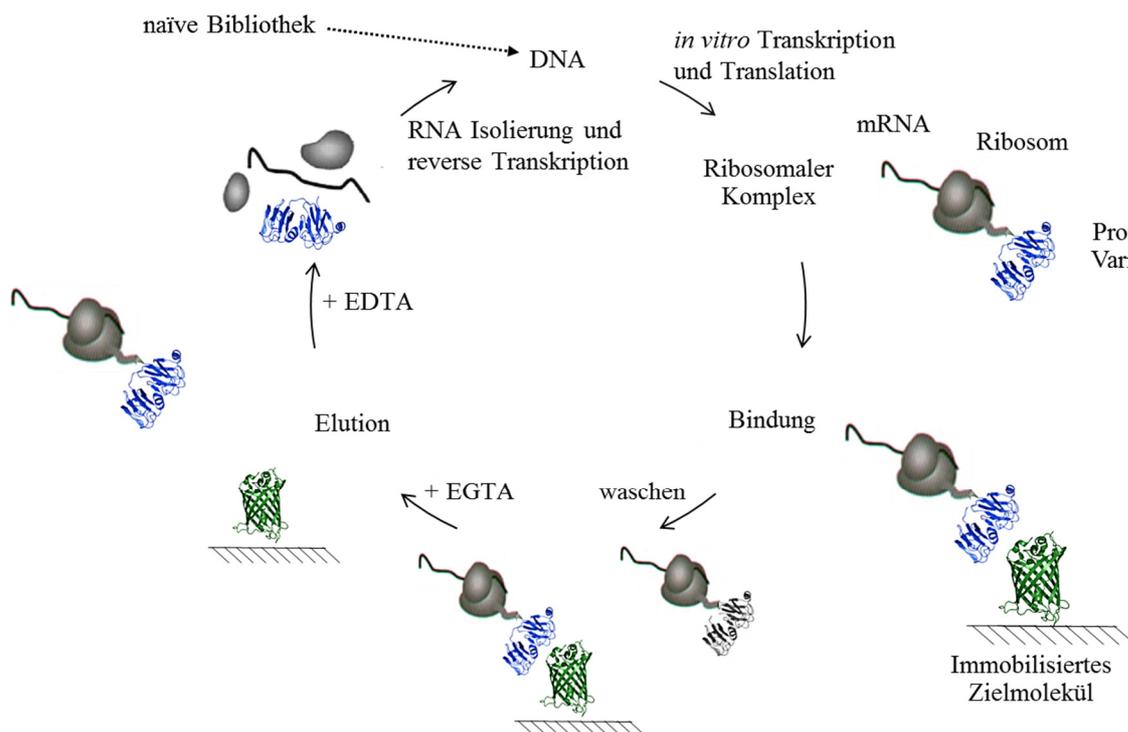


Abbildung 6: Ribosomen-*display* zur selektiven Anreicherung Ca^{2+} -sensitiver Bindemoleküle. Modifizierte Darstellung auf Basis von Amstutz *et al.* (2006).

Basierend auf einer DNA-Bibliothek der Bindemoleküle werden über eine *in vitro*-Transkription und -Translation ternäre Komplexe produziert. Aufgrund einer mit den Bibliotheksvarianten genetisch fusionierten *stalling*-Sequenz und der Abwesenheit von Stop-Codons in der mRNA bleiben die ternären Komplexe erhalten und es erfolgt keine Dissoziation des translatierten Proteins, wodurch die Phänotypen der Varianten mit ihren Genotypen gekoppelt werden. Diese ternären Komplexe werden in der Selektion gegen die Zielstruktur verwendet. Durch Waschschrte werden nicht-bindende Varianten entfernt. Die Elution von Ca^{2+} -sensitiven Varianten erfolgt durch die spezifische Reduktion von Ca^{2+} durch die Zugabe von EGTA. Die ternären Komplexe werden in diesem Schritt durch hohe Mg^{2+} -Konzentrationen weiterhin stabilisiert. Zur Isolierung der mRNA nach einem erfolgten Zyklus werden die ternären Komplexe dissoziiert. Die mRNA wird durch eine reverse Transkription in cDNA überführt, und diese nach Amplifikation für einen weiteren RD-Zyklus verwendet oder für die Analyse von Einzelvarianten eingesetzt.

Vorbereitung magnetischer beads

Zur spezifischen Immobilisierung der biotinylierten Zielstruktur sfGFP (3.4.6) nach erfolgter Bindung der Varianten in Lösung wurden Streptavidin-*beads* verwendet. Für die Selektionsrunden wurden alternierend carboxylierte (M270)- und tosylaktivierte (M280)-*beads* verwendet, um nur die Zielstruktur sfGFP als konstanten Faktor zu präsentieren. Die Menge eingesetzter *beads* wurde entsprechend ihrer Bindungskapazität für das in den Runden des *bio-pannings* benötigten *target* gewählt. Die Kapazität wurde in einem Vorversuch über SDS-PAGE-Analysen ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Die magnetischen *beads* wurden vor Verwendung dreimal mit jeweils 1 ml WB gewaschen. Für den Austausch an Puffern der *beads* wurden diese jeweils für eine Minute an einem Magneten fokussiert und von dem Überstand getrennt. Die Resuspension mit Wasch-, Bindungs- oder Elutionspuffern erfolgte über dreimaliges Pipettieren unter Eiskühlung. Um während der Selektion die unspezifische Wechselwirkung von Bibliotheksvarianten mit den *beads* zu verringern, wurden diese vor Verwendung in 2 ml BWB für 2 Stunden bei 4 °C auf dem Rollmischer inkubiert. Carboxylierte (M270)-*beads* wurden mit BWB_BSA (1% (m/v) BSA), und tosylaktivierte (M280)-*beads* mit BWB_PF (Protein-frei) geblockt. Im Anschluss daran wurden die magnetischen *beads* dreimal mit jeweils 1 ml WBTC äquilibriert.

Selektion in Lösung

Der Überstand der ITT-Reaktion (3.3.4) wurde ab der zweiten Runde der Selektion zweigeteilt, um zeitgleich die Selektion gegen sfGFP und eine Negativkontrolle durchführen zu können. Ab der dritten Runde des Ribosomen-*displays* wurden die ITT-Ansätze zunächst vor der Zugabe zu der Zielstruktur mit gewaschenen und geblockten Magnet-*beads* inkubiert, um den Anteil unspezifisch bindender Varianten zu verringern. Nach Fokussierung der *beads* wurde der Überstand anschließend zweigeteilt.

Der erste Teil der ternären Komplexe wurde mit biotinyliertem sfGFP in Lösung (3.4.6) auf einem Rollmischer inkubiert, die Negativkontrolle enthielt ein analoges Volumen an SB-Puffer. Die Immobilisierung des sfGFP und der daran gebundenen ternären Komplexe erfolgte über die Inkubation mit Streptavidin-beschichteten Magnet-*beads* für 30 min auf einem Rollmischer. Es folgten mehrere Waschschrte mit jeweils 500 µl WBCT. Die Magnet-*beads* wurden zunächst zweimal ohne Inkubationszeit, und anschließend mehrfach mit rundenweise verlängerten Inkubationen gewaschen (Tabelle 18). Zur selektiven Dissoziation von Ca²⁺-abhängig gebundenen Bibliotheksvarianten wurde ein EGTA-haltiger Elutionspuffer verwendet (WBTG20). Die wesentlich stärkere Bindung von EGTA an Ca²⁺ anstelle von Mg²⁺ ($K_{D,Ca^{2+}} = 10^{-11}$ M gegenüber $K_{D,Mg^{2+}} = 5 \times 10^{-6}$ M) (Martell und Smith 1974) wurde genutzt, um die Verfügbarkeit von Ca²⁺ drastisch zu reduzieren und zeitgleich die für die Stabilität der ternären Komplexe notwendige Mg²⁺-Konzentration nicht zu stark zu verringern. Die Ca²⁺-abhängige Elution erfolgte über die Zugabe von 2×100 µl WBTG20. Beide Elutionsfraktionen wurden vereinigt und weiter verwendet.

Der Selektionsdruck wurde rundenweise durch reduzierte *target*-Menge und stringendere Waschschrte erhöht (Tabelle 18). Weiterhin wurde für die fünfte Runde der Selektion eine monovalente Präsentation der Bibliotheksvarianten angestrebt. Dies wurde durch die Verwendung einer definierten Menge an Ribosomen im stöchiometrischen Unterschuss zur eingesetzten DNA in der ITT gesteuert (3.3.4). Weiterhin wurde in der fünften Runde eine

off-rate-Selektion durchgeführt. Nach Bindung der ternären Komplexe an 10 nM biotinyliertes sfGFP für 30 min wurden dem System zusätzlich 1.000 nM nicht-biotinyliertes *target* zugesetzt und für weitere 30 min bei 4°C inkubiert.

Tabelle 18: Übersicht über Selektionsparameter

RD-Zyklus	Prä-inkubation	c _{sf-GFP} [nM]	Ribosomen [#]	DNA Moleküle [#]	Inkubation* [min]	Magnet- <i>beads</i>	Waschen	PCR Zyklen [#]
1	-	1.200	5,4×10 ¹³	1,0×10 ¹²	60	340 µl M-280	1×1 min	35
2	-	1.200	7,7×10 ¹³	2,0×10 ¹²	60	340 µl M-270	2×1 min	33
3	50 µl M-270	1.000	7,2×10 ¹³	1,7×10 ¹²	60	290 µl M-270	5×1 min	28
4	35 µl M-280	100	2,0×10 ¹²	1,0×10 ¹²	60	35 µl M-280	5×2 min	25
5	10 µl M-270	10	2,0×10 ¹¹	1,0×10 ¹²	30	10 µl M-270	8×3 min	25
6	35 µl M-280	100	1,7×10 ¹²	3,5×10 ¹²	60	35 µl M-280	5×3 min	25

* Inkubationszeit mit sfGFP in Lösung

3.3.6 Isolierung und reverse Transkription von mRNA

Der Elutionsfraktion einer Selektionsrunde (3.3.5) wurde zur vollständigen Dissoziation der ternären Komplexe 40 µl 0,2 M EDTA zugegeben. Im Anschluss daran erfolgte die mRNA-Isolierung über das *Roche High Pure RNA Isolation Kit* nach Herstellerangaben mit DNaseI-Verdau zur Entfernung von Rückständen ursprünglich eingesetzter DNA. Die Rückgewinnung der mRNA von den Säulen erfolgte über die Zugabe von 2×48 µl TE-Puffer. Das Eluat wurde anschließend komplett für die reverse Transkription verwendet. Dem Ansatz wurden 2,8 µl des Primers PS_RD-Esp31I_rev (50 pmol/µl) und 7 µl dNTP (jeweils 10 mM) zugegeben. Anschließend wurden Aliquots à 14,5 µl in 0,2 ml PCR-Gefäße verteilt und 4 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert. Nach Abkühlung der PCR-Gefäße auf Eis und kurzer Zentrifugation (100×g) wurden den Ansätzen 5,5 µl der vorbereiteten reversen Transkriptase (Maxima, Thermo Scientific) in entsprechendem Puffer zugegeben (finale Pufferkonzentration: 1x). Weiterhin enthielten die Ansätze 0,5 µl RNasin Plus RNase Inhibitor (1 U). Eines der sechs Aliquots wurde analog zu diesem Vorgehen als Negativkontrolle ohne Zugabe von reverser Transkriptase mitgeführt. Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und für 30 min bei 50 °C inkubiert. Es wurden nach erfolgter Reaktion entsprechende Aliquots vereinigt und 2 µl für die Quantifizierung der cDNA über *real-time*-PCR (3.3.7) entnommen. Vor der ersten Amplifikation nach einer Selektionsrunde wurde das Eluat der reversen Transkription über das *Wizard SV Gel and PCR Clean up System* nach Herstellerangaben gereinigt. Die Elution der cDNA erfolgte in zwei Stufen über die Zugabe von 2×60 µl 10 mM Tris pH 8,0. Die erste

Amplifikation nach der Selektion wurde entsprechend Tabelle 19 durchgeführt, die Zyklenzahl wurde nach der entsprechenden Selektionsrunde gewählt (Tabelle 18).

Tabelle 19: Protein S-spezifische PCR zur Amplifikation von Varianten nach Selektion

Reagenz	Konzentration im Ansatz	Volumen [μ l]	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [s]
H ₂ O		23,4	98	30
HF-Puffer	1 \times	40	98	20
dNTP	0,2 mM	4	68	30
Primer PS_RD-Esp3I_fwd	0,2 pmol/ μ l	8	72	30
Primer PS_RD-Esp3I_rev	0,2 pmol/ μ l	8	72	5 min
gereinigte cDNA	/	115		
Phusion Polymerase	3,2 U	1,6		

25–35
Zyklen

Durch die PS-spezifische Amplifikation sollten Verluste durch RNase-Aktivität in der Selektion verringert werden, da auf diese Weise verkürzte 5'-regulatorische Sequenzen oder unvollständige RD-Anker-Fragmente nicht von Relevanz waren. Die Überführung in ein RD-fähiges Format für eine erneute Selektionsrunde erfolgte über einen gekoppelten Restriktions-Ligierungs-Ansatz (3.3.8).

3.3.7 Quantifizierung von cDNA

Die Quantifizierung von cDNA nach erfolgter reverser Transkription (3.3.6) von Fraktionen des Ribosomen-*displays* erfolgte über eine *real-time*-PCR (PS_Quant_fwd \times PS_Quant_rev, Hybridisierung bei 62 $^{\circ}$ C). Verwendet wurde in dieser Arbeit ein LightCycler[®] 480 System in Kombination mit der *DNA SYBR Green I*-Methode nach Herstellerangaben. Die Auswertung der Messungen erfolgte mithilfe der LightCycler[®] 480-Software über das *crossing point*-Verfahren. Zur Quantifizierung von cDNA in Proben diente eine externe Standardreihe der verwendeten Protein S-Bibliothek.

3.3.8 Gekoppelte Restriktion und Ligation

Um die cDNA-Bibliothek nach reverser Transkription (3.3.6) wieder in ein RD-fähiges Format zu konvertieren, folgten eine Reinigung der cDNA (3.2.5), eine Amplifikation über PCR sowie eine gekoppelte Restriktion/Ligation. Zur Amplifikation der Bibliothek wurden Protein S-spezifische Primer verwendet (PS_RD-Esp3I_fwd \times PS_RD-Esp3I_rev, Hybridisierung bei 68 $^{\circ}$ C), über welche zudem zwei *Esp3I*-Schnittstellen angefügt wurden. Die Zyklenzahl der PCR wurde in den einzelnen RD-Runden angepasst (Tabelle 18). Nach Reinigung der amplifizierten Bibliotheksvarianten (3.2.3) wurden RD-regulatorische und *SecM-stalling*-Sequenzen über eine gekoppelte Restriktion/Ligation wieder angefügt. Durch den Einsatz der Typ IIS-Restriktionsendonuklease enthielten die Konstrukte nach Ligation keine Erkennungssequenz des Enzymes.

Die RD-Konstrukte wurden in einem geringen molaren Überschuss (+5%) im Vergleich zu der DNA der PS-Bibliothek eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in dem empfohlenen Puffer des Restriktionsenzymes (10 μ l Tango-Puffer, Fermentas) in einem Gesamtvolumen von 100 μ l

unter Zugabe von 5 μ l 40 mM DTT und 1 μ l 100 mM ATP. Es wurden zeitgleich 7 μ l *Esp3I* (70 U) und 2 μ l T4-DNA-Ligase (60 U) verwendet. Die Reaktion erfolgte bei 25 °C für 20–23 Stunden. Final wurde der Ansatz für 30 min bei 16 °C inkubiert. Die Enzyme wurden anschließend bei 65 °C für 20 min inaktiviert. Die Bibliothek im RD-Format wurde über ein Agarosegel gereinigt (3.2.3), über eine zweite PCR amplifiziert (T7P-RBS_fwd×Spacer-SecM_rev; Hybridisierung bei 65 °C mit 12 Zyklen) und nach Reinigung über eine Silica-Säule (3.2.5) für weitere Selektionsrunden verwendet.

3.3.9 Klonierung der DNA-Bibliotheken

Zur Analyse von Einzelvarianten nach der Selektion wurden *pools* der einzelnen Selektionsrunden über *AgeI/BamHI*-Schnittstellen in den Expressionsvektor pETAB6H kloniert. Im Anschluss an die Klonierung wurden elektrokompente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit den erstellten Expressionsplasmiden transformiert (3.1.1.3) und für die Produktion einzelner Proteinvarianten verwendet (3.1.1.4, 3.4.2.1).

3.4 Proteinchemische und -analytische Methoden

3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurde basierend auf der Methode nach Laemmli (1970) durchgeführt. Diese beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der durch die Probenvorbereitung einheitlich negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Größe (Weber und Osborn 1969). Für die Elektrophorese wurden NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Gradientengele mit bis zu 15 μ l Proteinprobe pro Tasche verwendet (Protein-Standard: 6 μ l; PageRuler Unstained Protein Ladder; Fermentas). Für die Löslichkeitsanalysen von Protein S-Varianten wurden Criterion™ 4–20% Tris/HCl Stain-Free™-Gele verwendet. Vor Einbringen in die Probenaschen wurden die Proteine mit SDS-Probenpuffer verdünnt (Endkonzentration: 1–2,5fach) und 5 min bei 95 °C inkubiert.

Zur Untersuchung des löslichen Proteinanteils nach heterologer Genexpression in Mikrotiterplatten (3.1.1.4) wurden nach Lyse der Zellen (3.1.1.5) die löslichen und unlöslichen Fraktionen über einen Zentrifugationsschritt (3.000×g, 30 min, 4 °C) getrennt. Es wurden 20 μ l des Überstandes entnommen und für die SDS-PAGE-Analyse verwendet. Das Sediment der unlöslichen Lysatfraktion wurde mit 250 μ l/Kavität HBS gewaschen und anschließend mit 200 μ l/Kavität 8 M Harnstoff, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 sowie 1 mM EDTA resuspendiert. Die Gelelektrophorese wurde mit einer Spannung von 200 V und einem Strom von maximal 1 A über 40 min durchgeführt. Die Polyacrylamidgele wurden zur Entfernung verbleibender Puffersalze und überschüssigem SDS anschließend dreimal je eine Minute lang mit deionisiertem Wasser in der Mikrowelle erhitzt. Zur Visualisierung wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung (PageBlue™) überschichtet, 30 s in der Mikrowelle erhitzt und für mindestens 30 min gefärbt. Anschließend wurden die Gele mit deionisiertem Wasser (mehrmaliger Wechsel) bis zum maximalen Kontrast entfärbt. Die Dokumentation der Gele erfolgte schließlich auf der Weißlichtplatte eines BioVision 3000-Systems.

3.4.2 Automatisierte Proteinreinigung

3.4.2.1 Herstellung von Kristallin-Homologen oder Protein S-Varianten

Zur Produktion von Kristallin-Homologen wurden automatisierte Zweistufenreinigungen verschiedener Größenordnung verwendet. Die genetisch mit einem C-terminal gelegenen Hexahistidin-*tag* fusionierten Proteine wurden in beiden Fällen über eine Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC) mit anschließender Größenausschlusschromatographie (SEC) gereinigt.

Produktion im Schüttelkolbenmaßstab

Für die Reinigungen von Protein aus bis zu 1 l Kulturvolumen rekombinanter *E. coli* wurde ein ÄKTexpress System (GE Healthcare) verwendet. Nach erfolgter Genexpression (3.1.1.4) und erfolgtem Zellaufschluss (3.1.1.5) wurde der filtrierte Überstand mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine 1 ml-HisTrap HP-Säule (GE Healthcare) aufgetragen. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurde die Säule mit 20 CV HBSCI-20 und 5 CV HBSCI-60 (alternativ: NPI-20 und NPI-60) gewaschen. Die Elution erfolgte mittels kompetitiver Verdrängung mit 5 CV HBSCI-500 (NPI-500) mit einer Flussrate von 1 ml/min. Für die automatische Detektion des eluierten Proteins wurden die nachfolgenden Parameter verwendet:

Anzahl *loops*: 5

maximales Peakvolumen: 5 ml

Peak UV-Startwert: 20 mAU

Peak UV-Endwert: 20 mAU

Peak Minimalbreite: 0,5 min

Peak UV-Anfangssteigung: 10 mAU/min

Peak UV-Endsteigung: 20 mAU/min

Die detektierten Proteinfractionen wurden automatisch in systeminternen Schlauchschleifen (*loops*) aufgefangen und maximal 5 ml mit 1 ml/min auf die zuvor äquilibrierte HiLoad 16/60 Superdex 75 *prep grade*-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 1,5 ml/min und wurde automatisch nach 0,55 CV in 2 ml Fractionen (Peaks: 1 ml) gesammelt. Zur Einschätzung der apparenten Molekularmasse wurde eine externe Kalibriergerade mit Molekularmassenstandard (GE Healthcare) verwendet. Der Verlauf der Proteinreinigung wurde über SDS-PAGE Analysen (3.4.1) nachvollzogen.

Produktion im Mikrotitermaßstab

Für die parallelisierte Produktion von Proteinvarianten wurden die rekombinanten *E. coli* mit einem Volumen von 200–1000 µl Medium kultiviert. Für die affinitätschromatographische Reinigung wurde ein teilautomatisiertes System auf einem Biomek 3000 Laborroboter verwendet. Als Puffersystem wurden wahlweise mit 20 mM Phosphat- oder mit 40 mM HEPES-gepufferte Medien verwendet. Salzkonzentrationen und pH-Wert beider Systeme wurden analog gehalten (Tabelle 8). Nach erfolgter Genexpression (3.1.1.4) und durchgeführtem Zellaufschluss (3.1.1.5) in Mikrotiterplatten wurde eine Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC) automatisiert über den Laborroboter vorgenommen. Flüssigkeitstransferschritte wurden über eine integrierte Vakuumstation mit einem Unterdruck

von 250 mbar unter Atmosphärendruck realisiert (Dauer: 30 s). Es wurden 100 µl 80% (v/v) Sepharose (in Wasser) pro *well* mit 2×200 µl Wasser gewaschen und mit 250 µl Puffer (20 mM Imidazol) äquilibriert. Nach Zugabe der aufgeschlossenen Zellen zu der vorbereiteten Sepharose wurden die Ansätze durch mehrmaliges Pipettieren gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elution der adsorbierten Moleküle erfolgte nach Waschschritten (je 200 µl Puffer mit 20 und 50 mM Imidazol) zur Entfernung unspezifisch gebundener Bestandteile über eine kompetitive Verdrängung mit 2×70 µl Elutionspuffer (500 mM Imidazol). Als Alternative zu der beschriebenen Vorgehensweise wurden vorbefüllte FF-Multitrap-Mikrotiterplatten für die Reinigung verwendet. In diesem Falle wurden Flüssigkeitstransferschritte über ein Biomek FX-System realisiert, der Pufferaustausch erfolgte über einen Zentrifugationsschritt (500×g, 2 min). Zur Überführung der gereinigten Proteine in HBS-Puffer wurde im Anschluss an die Reinigung eine Multitrap-G25-Mikrotiterplatte nach Herstellerangaben verwendet.

3.4.2.2 Herstellung von sfGFP und eGFP

Zur Produktion der Zielstruktur sfGFP mit nativem N-Terminus wurde die SUMO (*small ubiquitin-related modifier*)-Fusionsmethode verwendet. Nach Produktion des Fusionskonstruktes über rekombinante Genexpression unter Verwendung von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen und dem pETSUMO_sfGFP-Expressionsvektor (3.1.1.4, Abbildung A4 B) wurden die geernteten Zellen über Ultraschall aufgeschlossen (3.1.1.5) und das Zielprotein in einem mehrstufigen Prozess über ein ÄKTAexplorer-System gereinigt. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4 °C und, sofern nicht abweichend beschrieben, mit einer Flussrate von 5 ml/min durchgeführt. Das Fusionsprotein wurde dabei zunächst über eine N-terminale Hexahistidinfusion affinitätschromatographisch über eine 5 ml-HisTrap HP-Säule gereinigt. Zur Beladung der mit NPI-20 äquilibrierten Säule wurde das Lysat nach erfolgtem Zellaufschluss zunächst filtriert und anschließend mit einem Fluss von 4 ml/min aufgetragen. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurde die Säule mit 6 CV NPI-20 gewaschen. Die Elution erfolgte mit 5 CV NPI-500. Nach Vereinigung der Zielprotein-enthaltenen Fraktionen erfolgte ein Pufferwechsel auf NPI-20 über eine HiPrep 26/10-Säule (Flussrate 10 ml/min). Zur enzymatischen Spaltung des Fusionskonstruktes wurde dem Ansatz 1 µl/ml SUMO-Hydrolase (Tabelle 9) hinzugefügt. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde der Ansatz mit 4 ml/min auf eine zweite 5 ml-HisTrap HP-Säule geladen. Die ebenfalls mit einer Hexahistidinfusion versehene Hydrolase, abgespaltenes SUMO sowie ungespaltenes Fusionsprotein wurden auf der Säule gebunden. Das anhangfreie Zielprotein sfGFP wurde im Durchfluss aufgefangen und über Zentrifugalkonzentratoren (3.4.4) bis auf ein Volumen von 12 ml eingengt. Als finaler Reinigungsschritt erfolgte eine Größenausschlusschromatographie über eine HiLoad 16/60 Superdex 75 *prep grade*-Säule mit einem Fluss von 1 ml/min. Als Laufpuffer wurde PBS mit 1 mM EDTA pH 7,4 verwendet. Die praktischen Arbeiten zur Reinigung der Zielstruktur sfGFP wurden im Rahmen eines Forschungsgruppenpraktikums von Herrn Michael Kauk durchgeführt.

Das verwendete *enhanced GFP* (eGFP) wurde am Institut für Biochemie und Biotechnologie (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) von Herrn Heiko Pultke produziert und freundlicherweise von PD Dr. Hauke Lilie für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.4.2.3 Verwendung des neuartigen Bindeproteins CID 24 als Ligand für eine Immunoaffinitätschromatographie

Zur Untersuchung der neuartigen Proteinvariante CID 24 als Ligand einer Immunoaffinitätschromatographie wurde diese auf einer 1 ml NHS-aktivierten Säule (3.4.6) immobilisiert und in einem ÄKTExpress-System verwendet. Sofern nicht anders vermerkt wurden alle folgenden Untersuchungen bei 4 °C und einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min durchgeführt. Vor Beginn eines Reinigungsverlaufes wurde die CID 24-Säule mit 20 CV HBSC äquilibriert. Nach dem Probenauftrag folgte stets ein Waschschrift von 3 Säulenvolumen HBSC, um ungebundene Proteine zu entfernen. Im Anschluss daran wurde die Konzentration des Ca²⁺ von 10 mM auf 3 mM gesenkt (HBSC3) und die Säule für weitere 5 CV gespült. Die Elution des Zielproteins erfolgte über den Pufferwechsel auf 20 mM EDTA (HBSE) mit einem Fluss von 1 ml/min.

Kapazitätsbestimmung

Zur Abschätzung der Säulenkapazität wurde eine 0,5 mg/ml sfGFP-Lösung in HBSC mit einem Fluss von 0,5 ml/min über die Säule gegeben. Die Detektion von sfGFP im Durchfluss erfolgte über die Messung der Absorption bei 495 nm. Die Kapazität der Säule wurde über das Gesamtvolumen bis zum Erreichen einer signifikanten Menge (5% des maximalen Signales) an sfGFP im Durchfluss berechnet. Die Berechnung erfolgte über die Normierung der Konzentration der Sättigungskurve über die maximale Konzentration des eingesetzten Bindungspartners C/C_0 (Horstmann *et al.* 1986; Hage und Cazes 2005).

Isolierung von sfGFP aus verdünnter Lösung

Zur Isolierung von sfGFP aus verdünnter Lösung wurden 750 ml HBSC mit 1 mg sfGFP ($\frac{1}{750} \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \approx 50 \text{ nM}$) versetzt und mit einem Fluss von 0,5 ml/min auf die Säule aufgetragen. Der Puffer enthielt 100 µg/ml BSA, um den Verlust an sfGFP durch unspezifische Proteinbindung an das Labormaterial zu verringern. Der Reinigungsverlauf nach Probenauftrag erfolgte wie beschrieben.

Affinitätschromatographische Reinigung von sfGFP

Als Machbarkeitsnachweis für die Verwendung des neuartigen Bindeproteins CID 24 als Ligand einer Immunoaffinitätschromatographie wurde sfGFP aus Lysaten unterschiedlicher Zellen gereinigt. Für diese Untersuchungen wurden *E. coli* BL21(DE3)- und *CHO*-K1-Zellen verwendet. Nach Anzucht und Ernte (3.1.1.1, *CHO*: Scil Proteins GmbH, Dr. Bosse-Doenecke) wurden die Zellen in 0,85 ml HBSC-Puffer resuspendiert und über Gefrier/Tau-Zyklen aufgeschlossen (3.1.1.5). Der Puffer enthielt zusätzlich EDTA-freien Protease-Inhibitor (cOmplete[®] Mini, Roche), der gemäß den Herstellerangaben verwendet wurde. Den Lysaten wurden jeweils 50 µl sfGFP in HBSC (20 mg/ml) zugesetzt und das Volumen auf 1 ml eingestellt. Final betrug die optische Dichte des *E. coli*-Lysates $OD_{600} \approx 65$, für die Herstellung des *CHO*-Lysates wurden ca. 20,8 Millionen Zellen verwendet.

Die so vorbereiteten Lysate wurden manuell in eine 500 µl-Probenschleife des ÄKTA-Systems injiziert (finale Beladung: 500 µg sfGFP). Der Probenauftrag auf die zuvor äquilibrierte CID 24-Säule erfolgte mit einem Fluss von 0,5 ml/min. Die Probenschleife wurde anschließend

mit 5 CV gespült, um eine vollständige Beladung zu gewährleisten. Der Reinigungsverlauf nach Probenauftrag erfolgte wie beschrieben.

3.4.3 Photometrische Konzentrationsermittlung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung wässriger Proteinlösungen wurde analog der Konzentrationsbestimmung von DNA (3.2.7) nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz über die Messung der Extinktion bei 280 nm durchgeführt. Als Grundlage für die molaren Extinktionskoeffizienten wurden Berechnungen aus der Primärsequenz der Proteine (Gill und von Hippel 1989) verwendet. Diese wurden wahlweise nach Wilkins *et al.* (1999) über das Programm ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) oder mit analoger Berechnungsgrundlage über MatLab[®] berechnet. Für Messungen einzelner Proben wurden Hellma-Präzisionsküvetten aus Quarzglas SUPRASIL der Firma VWR (Darmstadt) verwendet. Die Messung in 96-well-Mikrotiterplatten (in *half-area*-UV von Greiner Bio-One) erfolgte über ein *Paradigm Multimode Detector* (Beckman Coulter). Die Wegstrecke des Strahlenganges wurde bei einem Volumen von 80 µl/well mit 0,5 cm angenommen (Herstellerangaben). In beiden Messverfahren wurden pufferbereinigte Spektren von 250–330 nm aufgenommen. Das Verhältnis von 280 nm zu 260 nm diente der Abschätzung von DNA-Kontaminationen, zudem diente der Wert bei 320 nm als Hinweis auf Aggregate in den Proben.

3.4.4 Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen

Zur Konzentrierung und Umpufferung von Proteinproben wurden Vivaspin-Zentrifugalfilter (Sartorius, MWCO 3.000 Da) nach Herstellerangaben verwendet. Bei einer Umpufferung von Proteinen wurde mindestens eine theoretische Verdünnung von $1/10^6$ eingehalten.

3.4.5 Differential scanning fluorimetry (DSF)

Zur Einschätzung thermischer Stabilitäten von Proteinen wurde die *differential scanning fluorimetry* (DSF) eingesetzt. Bei dieser Methode wird zur Verfolgung der Proteinentfaltung in einem thermischen Gradienten ein umgebungssensitiver Fluoreszenzfarbstoff verwendet (Epps *et al.* 2001; Pantoliano *et al.* 2001). Das in dieser Arbeit verwendete Fluorophor *Sypro orange*[®] zeigt in wässriger Lösung eine stark reduzierte Fluoreszenz und erfährt durch die Interaktion mit hydrophoben Oberflächen eine erhöhte Quantenausbeute. Die thermisch induzierte Proteinentfaltung exponiert zuvor nicht lösungsmittelzugängliche hydrophobe Bereiche der Proteinproben und resultiert in Anwesenheit des Fluorophors somit in einem erhöhten Fluoreszenzsignal. Zur Verfolgung der Fluoreszenzänderung über den Temperaturgradienten können konventionelle *real-time*-PCR-Geräte verwendet werden (Niesen *et al.* 2007), was die parallele Charakterisierung verschiedener Proteine im Mikrotitermaßstab erlaubt.

DSF-Messungen wurden in dieser Arbeit stets im 96-well-Mikrotiterplattenformat unter Verwendung eines Lightcycler[®] 480-Systems (Roche) mit einer Filterkombination von 465 nm (Anregung) und 580 nm (Emission) durchgeführt (Fluorophor-Maxima: 472/570 nm). Eingesetzt wurden stets 10–20 µg Proteinprobe in einem Gesamtvolumen von 50 µl pro Kavität. Als Puffersubstanz wurden bei diesen Messungen HEPES-basierte Puffer (HBS) verwendet, da diese sowohl über geringe Temperaturabhängigkeiten des pH-Wertes ($\Delta pK_a = -0.14$) (Good *et al.* 1966), als auch über vernachlässigbare Bindung von Ca^{2+} aufweisen (Good und Izawa

1972). Das nach Herstellerangaben 5.000fach konzentriert vorliegende *Sypro orange*[®] wurde 2–5fach im Reaktionsansatz verwendet. Für Untersuchungen von Ca²⁺-abhängigen Stabilitätsänderungen enthielten die Reaktionsansätze zusätzlich entweder 10 mM CaCl₂ oder 2 mM EDTA.

Die Probenvorbereitung wurde wahlweise manuell oder über ein automatisiertes Verfahren auf einem Biomek 3000 Laborroboter durchgeführt. Beide Verfahren lieferten analoge Ergebnisse. Der eingestellte Temperaturgradient auf dem LightCycler[®] 480 betrug 1 K/min und wurde im Bereich von 20–90 °C durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte automatisch über ein in der Programmiersprache MatLab[®] entwickeltes Programm. Sofern nicht explizit anders vermerkt, beziehen sich alle ermittelten apparenten Schmelztemperaturen auf die nichtlineare Approximation einer sigmoidal verlaufenden Boltzmann-Funktion an die gemessene Fluoreszenz im Bereich der Proteinfaltung (Gleichung 2).

Gleichung 2: Boltzmann-Approximation zur Anpassung von Messkurven der DSF

$$y = y_{min} + \frac{(y_{max} - y_{min})}{1 + e^{-\frac{(T_m - x)}{n}}} \quad (\text{Gleichung 2})$$

y_{min}	Minimale Fluoreszenzintensität [RFU]
y_{max}	Maximale Fluoreszenzintensität [RFU]
x	Temperatur [°C]
T_m	Wendepunkt der Übergangskurve (mittlere Übergangstemperatur)
n	Anstieg der Boltzmann-Approximation in T_m

Die als apparente Schmelztemperatur bezeichnete mittlere Übergangstemperatur befindet sich im Wendepunkt dieser Funktion. Dieser wurde über die Berechnung des Maximums der ersten Ableitung der ermittelten Approximation erhalten.

3.4.6 Amin-spezifische Modifikation von Proteinen

Für die selektive Modifikation von Proteinen wurden aminspezifische Reaktionen verwendet. Reaktive primäre Aminogruppen befinden sich an den Lysinseitenketten sowie dem Aminoterminus. Aufgrund verschiedener pKa-Werte lässt sich die Reaktion über den pH-Wert zugunsten einer der reaktiven Gruppen beeinflussen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden bei pH 6,4 durchgeführt, um die Reaktion am Aminoterminus zu begünstigen. Verwendet wurden die Chemikalien Sulfo-NHS-LC-Biotin (6-(Biotin-amido)-hexansäure-sulfosuccinimidylester) für die Modifikation von sfGFP oder NHS-aktivierte Sepharose für die Immobilisierung einer Proteinvariante zum Einsatz als Ligand einer Affinitätschromatographie.

Zur Biotinylierung der Zielstruktur sfGFP wurde ein Kit von Pierce Biotechnology (EZ-Link) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden 2,6 mg sfGFP in 1 ml PBS pH 6,5 für die Modifikation eingesetzt. Die Reaktion wurde mit einem fünffachen molaren Überschuss an Sulfo-NHS-LC Biotin für 30 min bei Raumtemperatur und eine zusätzliche Stunde bei 4 °C durchgeführt. Zur Entfernung freien Biotins wurde die Probe im Anschluss daran über eine Sartorius Ultrafiltrationseinheit (3.4.4) in PBS-Puffer pH 7,4 überführt. Zur Abtrennung nicht biotinylierten Proteins wurde die Probe auf eine nach Herstellerangaben gepackte 5 ml-Mono-Avidin-Säule (Pierce[®] Monomer Avidin Agarose, Thermo Scientific) gegeben. Die Säule

wurde manuell beladen und mit 8×1 ml PBS-Puffer gewaschen. Zur Elution wurden 5×1 ml PBS + 2 mM (D⁺)-Biotin verwendet. Die Fraktionierung erfolgte über Sichtkontrolle des sfGFP in 3×1 ml Fraktionen. Nach Vereinigung der Fraktionen wurde erneut ein Pufferaustausch über eine Sartorius-Ultrafiltrationseinheit (3.4.4) zu HBS pH 7,4 durchgeführt. Zur Verifizierung korrekt modifizierten Zielproteins und zur Detektion anderer Proteinspezies wurden Proben nach Biotinylierung für massenspektroskopische Analysen verwendet (Vgl. Abschnitt 3.5 und Abbildung A 12).

Die Immobilisierung von Protein S-Varianten zum Einsatz in Affinitätschromatographien erfolgte über das HiTrap NHS-*activated* HP-Kit (GE Healthcare) nach Herstellerangaben. Die verwendete Proteinvariante (CID 24) wurde hierfür zunächst in 0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl pH 6,4 überführt (vgl. 3.4.4). Für die Immobilisierung wurden 12,6 mg Protein S in einem Volumen von 1 ml Puffer verwendet.

3.4.7 ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)

Zur Analyse von Proteininteraktionen oder zur Detektion von Protein in verschiedenen Fraktionen wurde in dieser Arbeit ein Antikörper-basierter ELISA verwendet. Dieser wurde wahlweise in 96- oder 384-*well* Mikrotiterplatten durchgeführt. Arbeitsvolumina betragen stets 50 μ l für 96-*well* und 20 μ l für 384-*well* Mikrotiterplatten. Waschschriffe wurden jeweils dreifach mit 300 μ l (384-*well*: 110 μ l) Puffer in Anwesenheit von 0,05% (v/v) Tween-20 durchgeführt (PBST oder HBSCT).

Standard-ELISA

Zunächst wurden zur Vorbereitung eines ELISA 100–500 ng einer Zielstruktur oder im Falle eines Nachweises von Protein in einer Fraktion ein entsprechendes Volumen bei 4 °C über Nacht immobilisiert. Nach dreimaligem Waschen wurden unspezifische Bindungsstellen mit Casein-haltigem Puffer (Sigma) für 2 h bei Raumtemperatur blockiert und die Mikrotiterplatten anschließend erneut dreimal mit Tween-20-haltigem Puffer gewaschen. Bei einer Interaktionsuntersuchung wurde der Interaktionspartner oder entsprechendes Zelllysate (3.1.1.5) zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erfolgten Waschschriffe erfolgte die Detektion gebundener Proteine über einen Peroxidase-konjugierten Primärantikörper (α -His-POD), welcher 1/1000 in Tween-20-haltigem Puffer verdünnt eingesetzt und für eine Stunde in den Kavitäten inkubiert wurde. Bei Verwendung von Phosphatpuffersystemen wurde der Antikörper in Casein-Puffer verdünnt, bei HEPES-Systemen in HBSCT. Nach erneutem Waschen mit Tween-20-haltigem Puffer wurden die Kavitäten mit HBSCT (PBS) gewaschen und mit einem dem verwendeten Mikrotiterplattentyp entsprechenden Volumen Peroxidase-Substrat (TMB One oder TMB Xtra) versetzt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte nach 5–30 Minuten mit 20 μ l (96-*well*: 50 μ l) 0,5 M Schwefelsäure. Zur Auswertung der Signale wurde in einem Mikrotiterlesegerät die Extinktion bei 450 nm gemessen und um die Referenz bei 620 nm korrigiert. Zur Analyse von Ca²⁺-abhängigen Proteininteraktionen wurde stets das HEPES-gepufferte System unter Zugabe von 10 mM CaCl₂ (HBSCT) verwendet. Vor der Detektion erfolgte ein zusätzlicher Waschschriffe mit 5 mM EDTA-Puffer (HBSE) anstelle des Ca²⁺-haltigen Puffers.

Hochdurchsatzanalysen

Für Hochdurchsatzanalysen von Proteinvarianten wurde ein ELISA-Verfahren auf einem Biomek FXp-System (Beckman Coulter) entwickelt. Es wurden Doppelbestimmungen der Proteinvarianten parallel unter permanenter Anwesenheit von Ca^{2+} (HBSCT-Puffer) als auch mit EDTA-Waschschritt (HBSET-Puffer) untersucht. Das Verfahren erlaubte die Analyse Ca^{2+} -abhängiger Bindung von 2576 Varianten an die Zielstruktur sfGFP (500 ng pro Kavität immobilisiert) und wurde im 384-*well* Format durchgeführt. Für diese primäre Analyse von Varianten wurde die Bindung in entsprechenden Lysaten nach Zellaufschluss (3.1.1.5) untersucht, eine vorherige Reinigung der Varianten erfolgte nicht. Für den automatisierten ELISA wurden Leervektorkulturen als Negativkontrollen mitgeführt. Als Positivkontrolle für das Verfahren wurden polyklonale Antikörper gegen eines der Kristallin-Homologe (α -S3a; Verdünnung: 1/1000 in HBS pH 7,4) analog zu der Zielstruktur immobilisiert. In entsprechenden Kavitäten der Mikrotiterplatten wurde analog zu den Protein S-Varianten produziertes Spherulin 3a (S3a) verwendet. Zur Datenauswertung wurde ein in der Programmiersprache MatLab[®] entwickeltes Skript verwendet.

Konzentrationsabhängige ELISA

Zur Abschätzung von Bindungsaffinitäten wurde ein konzentrationsabhängiger ELISA (Friguet *et al.* 1985) durchgeführt. Die verwendeten Proteinproben wurden im Schüttelkolbenmaßstab produziert (3.1.1.4) und über eine Zweistufenreinigung gereinigt (3.4.2). Es wurden serielle Verdünnungen der Proteinvarianten in HBSC und HBSE hergestellt und die Analyse analog zu den beschriebenen Standard-ELISA durchgeführt. Immobilisiert wurden für konzentrationsabhängige Analysen stets 500 ng der Zielstruktur sfGFP auf 384-*well high-bind* Mikrotiterplatten (Greiner). Die Messungen erfolgten unter permanenter Anwesenheit von 10 mM CaCl_2 (HBSCT) oder in EDTA-vermittelter Abwesenheit freier Metallionen (HBSET). Dies umfasste sowohl die verwendeten Bindungs- als auch die Waschpuffer. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte über die Software SigmaPlot unter der Annahme einer 1:1 Stöchiometrie der Bindung und mit Hilfe des hinterlegten Regressionsmodelles (Gleichung 3).

Gleichung 3: Regressionsmodell einer 1:1 Bindungsstöchiometrie in SigmaPlot

$$y = \frac{B_{\max} \times x}{K_d + x} \quad (\text{Gleichung 3})$$

x	Konzentration des freien Liganden [M]
y	Signal einer spezifischen Bindung
B_{\max}	Maximal verfügbare Bindungsstellen
K_d	Konzentration des eingesetzten Liganden bei der Hälfte der maximalen Bindung [M]

3.4.8 Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

Zur Bestimmung bindungskinetischer Parameter neuartiger Bindeproteine zu der Zielstruktur sfGFP wurde die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie verwendet (Turbadar 1959; Liedberg *et al.* 1983; Tudos und Schasfoort 2008). Für alle Messungen wurde ein Biacore T100

System sowie entsprechende Sensorchips der Firma GE Healthcare verwendet. Das Detektionsprinzip der Biacore-Geräte beruht auf einem quantenphysikalischen Phänomen, der Oberflächenplasmon-Resonanz.

Bei auftretender Totalreflektion eines polarisierten Lichtstrahls an der Grenzfläche zwischen einem optisch dichteren und dünneren Medium wird in dem Medium mit dem niedrigeren Brechungsindex aufgrund der Resonanz eine exponentiell abfallende evaneszente Welle hervorgerufen. Die Biacore-Sensorchips bestehen aus einer Glasschicht mit dünn aufgebracht Goldschicht und einer über Thiofunktionen kovalent gebundenen Dextranmatrix, an der einer der beiden Interaktionspartner immobilisiert wird (Chaiken *et al.* 1992). Über ein Prisma wird monochromatisches Licht auf diese Goldschicht eingestrahlt. Die eingestrahlenen Photonen interagieren mit den Elektronen im Metall, was zur Ausbildung einer Plasmaschwingung führt, die als Oberflächenplasmon bezeichnet wird. Im Winkel der Totalreflektion ist die Resonanz und somit auch der Intensitätsabfall des reflektierten Lichts am größten. Diese Energieaufnahme führt bei dem reflektierten Licht zu einem Intensitätsabfall bei definiertem Winkel, welcher direkt linear vom Brechungsindex des optisch dünneren Mediums abhängig ist. Der Brechungsindex wiederum ändert sich proportional zu Masseänderungen an der Sensoroberfläche (Stenberg *et al.* 1991), womit Ad- oder Desorptionen an der funktionalisierten Dextranoberfläche des Sensorchips verfolgt werden können. Die Winkeländerung des Intensitätsabfalls des reflektierten Lichts kann sensitiv gemessen werden und wird als Resonanzsignal (*response units*, RU) bezeichnet.

Immobilisierung von Interaktionspartnern

Zur Bestimmung bindungskinetischer Parameter einzelner Protein S-Varianten nach Selektion (3.3) und Durchmusterung (3.4.7) wurde die zuvor biotinylierte Zielstruktur sfGFP (3.4.6) auf einem Streptavidin (SA)-Chip immobilisiert. Nach Aktivierung des Sensorchips nach Herstellerangaben wurden auf einer Flusszelle 120–140 RU (*response units*) des biotinylierten sfGFP gebunden.

Zur Analyse der Bindungsinteraktion bei immobilisiert vorliegendem Liganden wurde eine ausgesuchte Proteinvariante (CID 24, Abschnitt 4.5.2.2 und Abschnitt 4.7) verwendet. Analog zur Immobilisierung der Variante auf einer NHS-aktivierten Chromatographiesäule (3.4.6) erfolgte die Immobilisierung auf einem CM5-Chip über direkte Aminkopplung mittels EDC/NHS-Chemie (Johnsson *et al.* 1991). Nach Aktivierung des Sensorchips wurden entsprechend den Herstellerangaben 150 RU der Variante CID 24 immobilisiert.

Bestimmung bindungskinetischer Parameter

Zur Analyse von Bindungskinetiken von Protein S-Varianten wurde ein SA-Chip mit immobilisiertem sfGFP verwendet. Es wurden Verdünnungsreihen der Varianten für 180 s mit einer Flussrate von 45 $\mu\text{l}/\text{min}$ über die Flusszelle gegeben. Der Konzentrationsbereich der Verdünnungsreihe richtete sich nach den über einen konzentrationsabhängigen ELISA ermittelten Affinitäten. Die eingesetzten Konzentrationen betragen zwischen 2–50 nM für Varianten mit hoher Affinität und 500 nM bis 10 μM für schwächer bindende Varianten (Tabelle 20).

Tabelle 20: Messbereich für SPR-Analysen von sfGFP-bindenden Varianten des Protein S

CID	Konzentration Ca ²⁺ - Messungen [nM]	Konzentration EDTA- Messungen [nM]
1	1–1.000	1–3.000
5	1–100	1.000–20.000
6 & 7	1–1.000	50–3.000
8	10–300	1–3.000
10	1–100	1–1.000
11	1–100	1.000–50.000
13	1–150	1–1.000
24	1–20	1–1.000
27	1–50	1–3.000
30	1–150	1.000–20.000

Nach der Assoziation wurde die Dissoziation der Varianten für 360 s gemessen. Für alle Messungen wurde eine Doppelbestimmung einzelner Proteinkonzentrationen zu Beginn und Ende der Messzyklen durchgeführt, um die Vergleichbarkeit der einzelnen Verläufe einer Kurvenschar sicherzustellen.

Regenerationsbedingungen der verwendeten Sensor-*chips* zwischen den einzelnen Messungen wurden über ein *scouting* nach Herstellerangaben ermittelt. Untersucht wurde bei Verwendung der SA-Chips 10 mM Glycin-Puffer verschiedener pH-Bereiche (Daten nicht gezeigt, pH = 1,5; 2,0; 2,5 und 3,0). Zur Regeneration von SA-Chips wurde 10 mM Glycin pH 3,0 ausgewählt. Für das *scouting* zur Regeneration von CM5-Chips mit der immobilisierten Protein S-Variante CID 24 wurde zusätzlich HBSET-Puffer pH 7,4 getestet und auch für die anschließenden Messungen verwendet. Die Regenerationsdauer betrug hierbei 60 s bei einem Fluss von 30 µl/min. Die Stabilisierung der Basislinie erfolgte im Anschluss an die Regeneration für 90 s mit dem entsprechenden Laufpuffer. Sämtliche Messungen zur Bestimmung von Bindungskinetiken erfolgten bei 20 °C und wurden unter Abzug einer Referenzzelle ohne immobilisiertes sfGFP gemessen.

Für alle Proteinvarianten wurden zwei unabhängige Messungen in An- und Abwesenheit von Ca²⁺ durchgeführt. Die HEPES-gepufferten Laufpuffer (pH 7,4) enthielten neben 150 mM NaCl und 0,05% (v/v) Tween-20 wahlweise 10 mM CaCl₂ (HBSCT) oder 5 mM EDTA (HBSET). Verdünnungsreihen der Proteinvarianten wurden in den jeweiligen Laufpuffern vorbereitet. Für beide Messungen wurden identische Proteinfractionen der Reinigung (3.4.2.1) verwendet. Zur Analyse der Bindungseigenschaften unter vergleichbaren Bedingungen wie beim Einsatz der Proteinvariante CID 24 als Ligand einer Chromatographie wurde eine Verdünnungsreihe von 1–25 nM sfGFP über die auf einem CM5-Chip immobilisierte Variante geleitet. Die Einstellungen der Messungen entsprachen den Messungen bei Verwendung von SA-Chips mit immobilisiertem sfGFP. Die Regeneration der Messzelle erfolgte in diesem Falle jedoch über die Zugabe von HBSET-Puffer und nicht über Glycin pH 3,0. Für die Untersuchung der Bindungsspezifität wurde in einem analog durchgeführten Versuchsaufbau eine Verdünnungsreihe eGFP untersucht.

Die Auswertung der Messungen erfolgte über die „Biacore T100 *evaluation software*“ entsprechend den Herstellerangaben. Die Berechnung der numerischen Approximation und der kinetischen Parameter erfolgte unter Annahme einer 1:1 Bindungsstöchiometrie mit den in

der Software hinterlegten Bindungsmodellen. Ermittelte K_D -Werte wurden über die kinetischen Parameter k_a und k_d erhalten. Für Varianten, bei welchen die kinetischen Parameter nicht für die Auswertung herangezogen werden konnten, erfolgte die Berechnung der Affinität über die *steady-state*-Gleichgewichte.

Bestimmung thermodynamischer Parameter

Zur Bestimmung thermodynamischer Parameter der Bindung wurde die auf einem CM5-Chip immobilisierte Variante CID 24 verwendet. Gemessen wurde eine Kurvenschar mit 10 Konzentrationen von 1–50 nM sfGFP bei sechs verschiedenen Temperaturbedingungen (5–35 °C). Die Auswertung der Messungen erfolgte über die „Biacore T100 *evaluation software*“ analog der Berechnung der bindungskinetischen Parameter unter Annahme einer 1:1 Bindungsstöchiometrie.

Aus thermodynamischer Sicht ist die Affinität interagierender Proteine durch die Differenz der freien Energie der assoziierten und dissoziierten Zustände definiert. Im Gleichgewicht hängt die freie Enthalpie (ΔG°) mit der Dissoziationskonstante (K_D) zusammen (Perozzo *et al.* 2004) (Gleichung 4):

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_D \quad (\text{Gleichung 4})$$

Mit: R – allgemeine Gaskonstante und T – absolute Temperatur

Die freie Enthalpie (ΔG°) spiegelt die Wahrscheinlichkeit der Komplexbildung wider, enthält aber zunächst keine Informationen über die treibenden Kräfte. Die Unterteilung der Bindungskräfte in enthalpische (ΔH) and entropische (ΔS) Anteile kann weitere Informationen über bestimmende Faktoren der Komplexbildung liefern. Die Enthalpie- und Entropieänderungen sind über die Änderungen der freien Enthalpie verbunden (Williams *et al.* 2004) (Gleichung 5):

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (\text{Gleichung 5})$$

Enthalpieänderungen (ΔH°) beschreiben die im Zuge der Komplexbildung (oder -dissoziation) freiwerdende oder absorbierte Wärme durch die Änderung von nicht-kovalenten Bindungen wie van-der-Waals-Interaktionen, Wasserstoffbrücken oder Ladungsinteraktionen. Entropische Anteile (ΔS°) hingegen können als Änderungen der Freiheitsgrade der Interaktionspartner sowie deren Teile (wie Aminosäureseitenketten) und der umgebenden Lösungsmittel bei Rotation, Bewegung oder Vibration (Holdgate und Ward 2005). Über die Gleichungen 4 und 5 erhält man die lineare Form der van't Hoff-Gleichung unter der Annahme keiner auftretenden Änderungen der Wärmekapazitäten des Systems über die Temperatur:

$$\ln(K_D) = \frac{\Delta H^\circ}{R} \times \frac{1}{T} - \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (\text{Gleichung 6})$$

Durch die Ermittlung des K_D bei verschiedenen Temperaturbedingungen und der Darstellung von $\ln(K_D)$ über die reziproke Temperatur in der van't Hoff Darstellung können ΔH° (Ordinatenabschnitt) und ΔS° (Steigung) aus einer linearen Regression berechnet werden.

3.4.9 Analytische Ultrazentrifugation

Durch Gleichgewichtssedimentation kann die molekulare Masse von Proteinmolekülen und -komplexen sowie deren stöchiometrisches Verhältnis bestimmt werden (Cole *et al.* 2008). Das Sedimentationsgleichgewicht von Protein S-Varianten als Komplex mit sfGFP wurde bei 40.000 rpm und 20 °C gemessen, zur Detektion wurde die intrinsische Fluoreszenz des sfGFP bei einer Wellenlänge von 485 nm verwendet. Für die Ermittlung der Bindungsstöchiometrie wurde eine Verdünnungsreihe von 0–4 µM Protein S in HBSC mit 1 µM sfGFP eingesetzt. Für die Messungen der Ca²⁺-Abhängigkeit der Komplexbildung wurden äquimolare Mengen von 1 µM Protein S CID 24 und sfGFP in HBS-Puffer eingesetzt und eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen von 0–10 mM Ca²⁺ erstellt. Die Experimente an einer analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-A (Beckman Instruments) wurden von Herrn Dr. Hauke Lilie der Abteilung Technische Biochemie (Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt.

3.4.10 Bindungsanalyse von Varianten des Protein S an Myxosporen

Zur Analyse Ca²⁺-abhängiger Sporenbindung von Protein S-Varianten wurde ein zweistufiges Verfahren etabliert. Zunächst wurden hergestellte Myxosporen (3.1.2.2) auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Pro Kavität einer 96-well Mikrotiterplatte (Nunc Medisorp) wurden 5–8 µl der Sporenpräparation in einem Gesamtvolumen von 50 µl MX-Bindungspuffer über Nacht bei 4 °C und 300 rpm im Thermomixer immobilisiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit jeweils 300 µl MX-Bindungspuffer und zur Absättigung unspezifischer Oberflächen eine zweistündige Inkubation mit 300 µl Casein-basierter Blockierlösung (Sigma-Aldrich). Im Anschluss daran wurde ein weiterer Waschschriff sowie zweimaliges Äquilibrieren der immobilisierten Sporen mit jeweils 300 µl MX-Bindungspuffer durchgeführt. Die untersuchten Proteinproben wurden in einem Volumen von 50 µl MX-Bindungspuffer zu den Sporen gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Bindungskapazität der immobilisierten Sporen nicht zu überschreiten, wurden pro Kavität nicht mehr als 20 ng Protein verwendet. Vor Verwendung wurde für die eingesetzten Sporen die Bindungskapazität von 30 ng Protein S-Wildtyp pro 5–8 µl der präparierten Sporen nachgewiesen.

Der Überstand nach Inkubation der Proteinvarianten mit den Sporen wurde als Durchfluss bezeichnet und für eine spätere Detektion des enthaltenen Proteins auf einer neuen Mikrotiterplatte immobilisiert (4 °C, über Nacht). Analog wurden weitere Waschfraktionen à 50 µl mit MX-Waschpuffer (Waschen I und II) sowie die Elution in Anwesenheit von EDTA über die Zugabe von 50 µl MX-Elutionspuffer (Elution I und II) durchgeführt. Die Detektion der Proteinvarianten in den einzelnen Fraktionen erfolgte nach der Immobilisierung über ein ELISA-Verfahren (3.4.7). Der Anteil des Proteins in den Elutionsfraktionen zu allen anderen Fraktionen wurde in Relation gesetzt, um die Bindungseigenschaften der Varianten an die immobilisierten Sporen zu quantifizieren.

3.5 Massenspektrometrie

Zum Nachweis der Identität oder der erfolgreichen Modifikation von Proteinen wurden diese über massenspektrometrische Verfahren analysiert. Bei diesen Methoden werden ionisierte Moleküle entsprechend ihrem Masse-Ladungsverhältnis durch elektromagnetische Felder getrennt. Zur Probenvorbereitung wurden die Proteine über ZipTips® (Merck-Millipore) nach Herstellerangaben entsalzt. Die Untersuchungen mittels *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight* (MALDI-TOF)-Experimenten wurden bei der Abteilung für Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik (Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt.

4. Ergebnisse

Ebersbach *et al.* (2007) zeigten bereits die Eignung der Proteinklasse der $\beta\gamma$ -Kristalline für die Herstellung künstlicher Bindeproteine. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Klasse artifizierter Bindeproteine, welche auf Ca^{2+} -sensitiven Gerüstproteinen aus dieser Proteinfamilie basieren, entwickelt und untersucht. Konformationsänderungen, welche die Gerüstproteine über die Bindung von Ca^{2+} erfahren, sollten verwendet werden, um molekulare Schalter zu generieren. Die auf dieser Grundlage erstellten bindenden Varianten sollten über eine unterschiedliche Affinität zur Zielstruktur in beiden Schaltungszuständen aufweisen, was beispielsweise für Anwendungsgebiete wie Affinitätschromatographien von Interesse ist. In der Klasse der $\beta\gamma$ -Kristalline sind mehrere Ca^{2+} -bindende Proteine beschrieben. Um auf experimenteller Basis zu entscheiden, welches dieser Proteine am besten als Gerüststruktur zur Entwicklung Ca^{2+} -abhängiger künstlicher Bindeproteine geeignet ist, wurden sieben Kandidaten der Proteinfamilie aus der Literatur ermittelt, rekombinant produziert und charakterisiert.

4.1 Auswahl und rekombinante Produktion potentieller Gerüstproteine basierend auf Kristallin-Homologen

Im Unterschied zu bislang verwendeten *scaffolds* der $\beta\gamma$ -Kristallin-Familie sollten im Rahmen dieser Arbeit Ca^{2+} -sensitive Gerüstproteine untersucht werden, um die Möglichkeit zur Generierung schaltbarer Bindeproteine zu untersuchen. Durch eine Literaturrecherche konnten sieben Proteine (Spherulin 3a, Protein S, MC, Ciona- $\beta\gamma$ -*crystallin*, Clostrillin, Geodin, Protein S-Homolog) ermittelt werden, die aus allen drei Reichen der Lebewesen stammen (Tabelle 1, S. 9, Proteinsequenz siehe Tabelle A 1, S. A5). Die Proteine bestehen aus einzelnen Polypeptidketten und beinhalteten Bindungsdomänen für Ca^{2+} . Die jeweilige biologische Funktion der Homologe ist weder von der Ausbildung von Disulfidbrücken noch von weiteren posttranslationalen Modifikationen abhängig (Tabelle 1, Abbildung 2).

Die für die Expression in *E. coli* optimierten Gensequenzen (Firma DNA 2.0) wurden in *container*-Vektoren pJ201 erhalten (2.3) und mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Eco31I* und *XhoI* in pET28a(+)-Expressionsvektoren kloniert (3.2). Nach Verifikation korrekter Sequenzen (3.2.8) wurden die Expressionsvektoren für die Transformation von *E. coli* BL21(DE3) verwendet (3.1.1.3). Die Produktion der Proteine erfolgte über rekombinante Genexpression nach Kultivierung der Bakterien in Autoinduktionsmedium (3.1.1.4) mit anschließender chromatographischer Zweistufenreinigung (3.4.2.1). Bis auf Spherulin 3a konnten alle Proteine erfolgreich mit Ausbeuten bis zu 55 mg/l Kulturvolumen als monomeres Protein in der löslichen Fraktion gewonnen werden (Abbildung 7, Tabelle 21). Spherulin 3a wurde bereits in der Literatur als nicht-kovalent verbundenes Dimer beschrieben (Clout *et al.* 2001), was mit Ergebnissen der Größenausschlusschromatographie korreliert. Für die Proteine Clostrillin und Spherulin 3a konnten in den Chromatogrammen der Größenausschlusschromatographie zusätzliche Peaks registriert werden, welche Multimeren oder Aggregaten entsprachen. Die entsprechenden Peaks konnten jedoch vollständig von den monomeren Proteinspezies getrennt werden.

Zur Verlaufskontrolle der Proteinreinigungen wurden die Ausgangs-, Wasch- und Elutionsfraktionen über SDS-PAGE-Analysen mit anschließender Coomassie-Visualisierung

untersucht (3.4.1). In den Fraktionen der monomeren Proteinspezies konnten nur Banden die den Kristallin-Homologen entsprachen, jedoch keine auf Fremdproteinen basierenden Verunreinigungen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

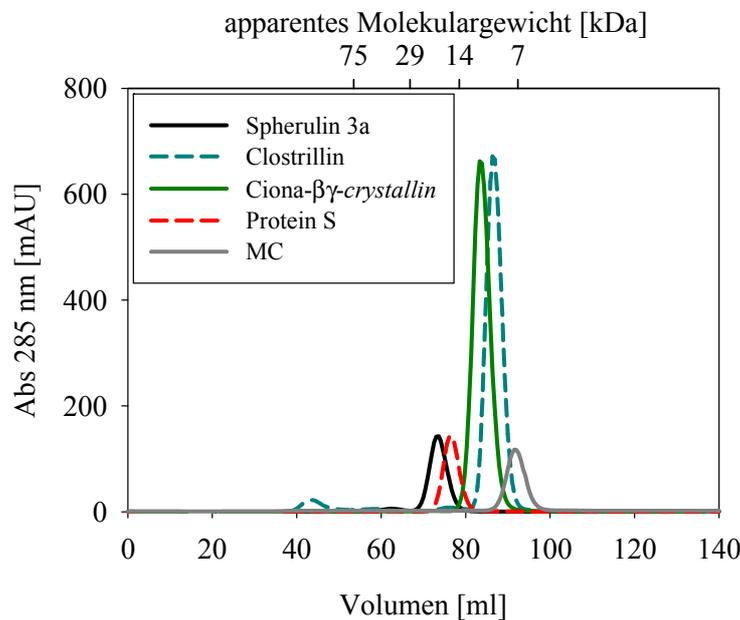


Abbildung 7: Rekombinante Produktion von Kristallin-Homologen

Größenausschlusschromatographie von fünf der sieben rekombinant produzierten und über Nickel-Chelat-Chromatographie gereinigten Kristallin-Homologe. Als Laufpuffer diente HBS pH 7,4. Zur Abschätzung der apparenten Molekularmasse wurde die Säule mit Standardproteinen (GE Healthcare) kalibriert.

Tabelle 21: Ausbeuten bei rekombinanter Produktion von Kristallin-Homologen

Kristallin-Homolog	Ausbeute pro Kulturvolumen [mg/l]
Spherulin 3a	30
<i>Ciona-βγ-crystallin</i>	55
Protein S	46
MC	14
Clostrillin	42
Geodin	35
Protein S-Homolog	25

Die Proteine wurden hinsichtlich ihrer Handhabbarkeit in den für die Entwicklung des künstlichen Bindeproteins benötigten Methoden für Hochdurchsatzanalysen (DSF, ELISA und SDS-PAGE) untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse zu thermischen Stabilitäten und löslicher Produktion bei Verwendung von *E. coli* BL21(DE3) der Homologe sind in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der sehr ähnlichen Eigenschaften der homologen Proteine wurde entschieden, mit einem über zwei Domänen verfügenden Protein weitere Analysen durchzuführen, um eine größere Auswahl an Aminosäurepositionen für die Randomisierung und damit für das Design einer Bindungsstelle zur Verfügung zu haben. Da keine strukturellen Informationen für Geodin

und das Protein S-Homolog-Protein vorlagen, wurde Protein S aus *Myxococcus xanthus* (MX) ausgewählt.

Für die Entwicklung eines *scaffolds* zu einem künstlichen Bindeprotein ist die Erstellung einer Bibliothek randomisierter Varianten erforderlich. Aus dieser Proteinbibliothek müssen anschließend Varianten mit gewünschten Bindungseigenschaften selektiert werden. Hierzu wird die Proteinbibliothek über *display*-Methoden der Zielstruktur (in dieser Arbeit sfGFP) präsentiert. Über die Kopplung der Geno- und Phänotypen der Varianten lassen sich bindende Proteinvarianten der Bibliotheken anreichern.

Es wurden für Protein S verschiedene *display*-Methoden untersucht, um eine Selektion von Ca^{2+} -sensitiven Varianten zu etablieren. Neben der Präsentation des nativen Zielproteins über die Verfahren wurde auch die Möglichkeit der für die Schaltbarkeit notwendigen Ca^{2+} -abhängigen Konformationsänderung untersucht. Zur Etablierung wurde die Ca^{2+} -abhängige Interaktion des Wildtyp-Protein S mit Sporen des *M. xanthus* verwendet (Abbildung 8). Zwecks dessen wurden Fruchtkörper-basierte Sporen des *M. xanthus* produziert (3.1.2.2) und auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert (3.4.10). Der Wildtyp des Protein S wurde als Fusionsprotein im Phagen-*display* (3.3.2) sowie als ternärer Komplex im Ribosomen-*display* produziert (3.3.4) und in Anwesenheit von Ca^{2+} mit den Sporen inkubiert. Es folgten Waschschrte in Anwesenheit von Ca^{2+} und eine Elution der Komplexe über die Zugabe von EDTA-haltigem (bei Verwendung des Phagen-*display*) bzw. EGTA-haltigem Puffer (ternäre Komplexe bei Verwendung des Ribosomen-*display*). Als Positivkontrolle wurde rekombinant produziertes monomeres Protein S (3.4.2.1) in Lösung verwendet.

Die Quantifizierung des in den Wasch- und Elutionsfraktionen enthaltenen Proteins erfolgte über ein ELISA-Verfahren (3.4.7). Der Nachweis rekombinant produzierten Proteins erfolgte über einen gegen die Hexahistidinfusion gerichteten Antikörper (BMG-His-1, Roche). Phagen wurden über den Nachweis des Phagenhüllproteins M13 (α -M13-AK, GE Healthcare) detektiert und auf der Phagenoberfläche präsentiertes Protein S erfolgte durch die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen Protein S (Davids Biotechnologie) mit anschließender Detektion mittels eines peroxidasekonjugierten Sekundärantikörpers (α -Huhn, Davids Biotechnologie). Der Nachweis ternärer Komplexe mit präsentierten Protein S erfolgte über die Quantifizierung der cDNA nach durchgeführter reverser Transkription (3.3.6) über eine *real-time*-PCR (3.3.7).

Die funktionale Immobilisierung von Myxosporen auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten konnte durch die Verwendung von rekombinant produzierten, monomeren Protein S nachgewiesen werden (Abbildung 8 A). Durch die Negativkontrolle ohne immobilisierte Sporen wurde zudem bestätigt, dass die Ca^{2+} -abhängige Interaktion des wt-Protein S nicht unspezifisch durch die verwendete *blocking*-Substanz (Casein) vermittelt werden kann, sondern spezifisch von der Verfügbarkeit von Myxosporen abhängt.

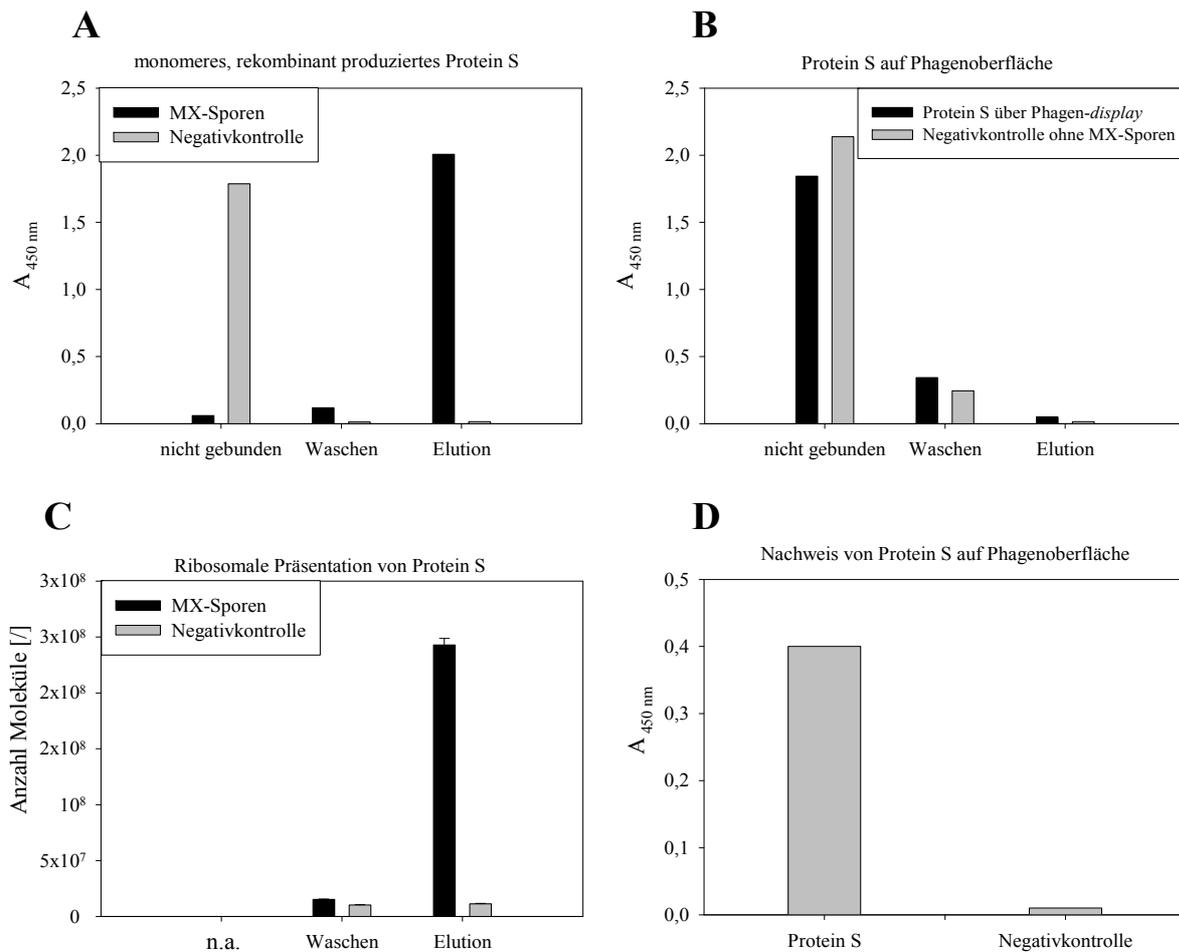


Abbildung 8: Oberflächenpräsentation und Bindungsverhalten von Protein S an immobilisierte Sporen des *M. xanthus*

(A) Untersuchungen mit rekombinant produziertem Protein S mit C-terminaler Hexahistidin-Fusion. Auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisierte Myxosporen wurden mit 20 ng des Proteins in Anwesenheit von 10 mM Ca^{2+} inkubiert. Nicht gebundenes Protein wurde über Waschschrte in Anwesenheit von Ca^{2+} entfernt. Die Elution des verbleibenden Proteins auf der Sporenoberfläche erfolgte über einen Pufferwechsel auf 5 mM EDTA. Der Nachweis des Proteins in den einzelnen Fraktionen der Bindungsanalyse erfolgte über ein ELISA-Verfahren mit einem gegen die Hexahistidin-Fusion gerichteten, mit HRP-konjugierten Antikörper. Als Negativkontrolle wurde das eingesetzte Protein S zu analog vorbereiteten Kavitäten ohne immobilisierte Myxosporen gegeben.

(B) Auf Phagenoberfläche präsentiertes Protein S. Nach erfolgter Produktion von Protein S präsentierenden Phagen wurden die Bindungsstudien analog zu den Experimenten mit rekombinant produziertem Protein durchgeführt. Der Nachweis der Phagen in den Wasch- und Elutionsfraktionen erfolgte über einen gegen das Phagenhüllprotein M13 gerichteten Antikörper (α -M13, GE Healthcare).

(C) cDNA nach reverser Transkription verschiedener Fraktionen im Anschluss an die Präsentation ternärer Protein S-Komplexe. Nach Produktion ternärer Komplexe aus mRNA, Ribosomen und Protein S wurden diese in Anwesenheit von 10 mM Ca^{2+} und einem RNase-Inhibitor für die Bindungsanalysen an Myxosporen eingesetzt. Der Nachweis der Moleküle erfolgte über eine *real-time*-PCR durch die Detektion der erhaltenen DNA über den SYBR Green Farbstoff.

(D) Auf Phagenoberfläche präsentiertes Protein S. Nach der Produktion wurden Protein S präsentierenden Phagen direkt auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert. Der Nachweis erfolgte über die gekoppelte Detektion mit einem gegen die N-terminale Domäne von Protein S gerichteten Primär-, und einem α -Huhn-peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper.

Es konnte gezeigt werden, dass die Präsentation des Proteins auf der Oberfläche von Phagen zwar möglich (Abbildung 8 D), jedoch nicht geeignet war, um eine schaltbare Bindung nachzuvollziehen (Abbildung 8 B). Diese konnte jedoch im Format des Ribosomen-*displays* als ternärer Komplex aus Ribosom, naszentem Protein und entsprechender mRNA nachgewiesen werden (Abbildung 8 C). Anhand dieser Ergebnisse wurde entschieden, dass das Bibliotheksformat der randomisierten Protein S-Varianten und die Selektion als Ribosomen-*display* durchzuführen.

4.2 Charakterisierung potentieller Randomisierungsbereiche auf Protein S

Vor der Generierung von Diversität auf der Oberfläche des Proteins wurden Positionen des Protein S hinsichtlich ihrer Toleranz gegenüber Aminosäureaustauschen untersucht. Informationen über konservierte Motive sowie Positionen mit geringer Toleranz gegenüber Substitutionen waren aus der Literatur nicht verfügbar. Interne Forschungsberichte (Schneider 2010) zu humanem $\gamma\beta$ -Kristallin zeigten jedoch konservierte Motive mit paarweise interagierenden Serin der beta-Faltblattstrukturen mit Phenylalanin der Schleifenregionen, welche in analoger Form ebenfalls in Protein S vorkommen (F11/S41, F58/S81, F101/S130, F146/S169). Diese Motive wurden daher ebenso wie die Ca^{2+} -bindenden Motive der Kristallin-Familie (Aravind *et al.* 2009) nicht für eine Randomisierung in Betracht gezogen. Es wurden 41 lösungsmittlexponierte Aminosäuren des Proteins für eine Mutagenesestudie ausgewählt, die sich in räumlicher Nähe zu den Ca^{2+} -bindenden Strukturen in den Schleifenbereichen des Proteins befinden (Abbildung A 3). Durch Techniken der ortsgerichteten Mutagenese wurde auf genetischer Ebene für jeweils eine der 41 Positionen des Proteins die Wildtypsequenz gegen codierende Sequenzen für unterschiedliche Aminosäuren (Glutamat, Isoleucin, Arginin, Serin bzw. Tyrosin) substituiert. Insgesamt wurden 186 der möglichen 192 Varianten des Proteins generiert (3.2.4.2) und nach Verifikation korrekter Sequenzen (3.2.8) rekombinant hergestellt (3.4.2.1).

Bei der Charakterisierung der Protein S-Varianten sollten essentielle Informationen für die Bibliotheksgenerierung gewonnen werden. Es wurde zunächst untersucht, welchen Einfluss die Substitutionen an verschiedenen Positionen des Proteins auf die Herstellungsmöglichkeiten der Varianten haben. So wurde neben der Produktion als lösliches Protein auch die Ausbeute produzierten Proteins mit dem des Wildtyp-Proteins über SDS-PAGE-Analysen verglichen (3.4.1). Darüber hinaus sollte die Stabilität des Gerüstproteins und die für die angestrebte Schaltbarkeit der Varianten benötigte Ca^{2+} -Bindung erhalten bleiben. Um Aussagen über diese Kriterien treffen zu können, wurden die Proteinvarianten produziert und deren thermisch induzierte Denaturierung über *differential scanning fluorimetry* (DSF) in An- und EDTA-vermittelter Abwesenheit von Ca^{2+} gemessen (3.4.5).

Da die molekularen Mechanismen oder die an der Sporenbindung beteiligten Aminosäuren von Wildtyp-Protein S nicht bekannt sind, wurden ELISA-basierte Untersuchungen zur Bindung der Proteinvarianten an MX-Sporen durchgeführt (3.4.10). Ein existierendes Ca^{2+} -sensitives Paratop auf der Oberfläche des Protein S würde sich in mehrfacher Hinsicht für das Bibliotheksdesign anbieten. Zunächst würde ein bereits bekanntermaßen Ca^{2+} -sensitives Paratop die Wahrscheinlichkeit zur Generierung von schaltbaren *de novo* Bindeproteinen gegen neue Zielstrukturen erhöhen. Weiterhin sollte keine Interaktion der verwendeten Varianten mit dem Interaktionspartner des Wildtyp-Proteins erhalten bleiben um in für späteren Anwendungen ungewollte Interaktionen zu vermeiden.

Nach ortsgerichteter Mutagenese auf Basis des Wildtyp-Protein S im pET23-Expressionssystem (3.2.4.2) wurden korrekt modifizierte Varianten über eine Sequenzierung (3.2.8) verifiziert. Die Produktion der Varianten erfolgte nach Transformation von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit den Plasmiden (3.1.1.3) parallel in 200 μl Autoinduktionsmedium (3.1.1.4). Die Proteinvarianten wurden im Anschluss an die Genexpression über IMAC im Mikrotitermaßstab gereinigt (3.4.2.1).

Die Expressionslevel der erhaltenen Varianten des Protein S in dem eingesetzten System waren durchgehend hoch (Abbildung 9 A). Die Anteile löslich produzierten Proteins variierten zum Teil sehr stark (Abbildung 9 A, Abbildung 11 A), schlecht lösliche Varianten waren jedoch auf die Mutation einzelner Aminosäurepositionen zurückzuführen. Für alle Proteinvarianten konnte nach Produktion im Mikrotitermaßstab qualitativ die erhaltene Fähigkeit zur Ca^{2+} -Bindung über eine Stabilisierung in der DSF-Messung nachgewiesen werden (Abbildung 9 B, Abbildung 11 C).

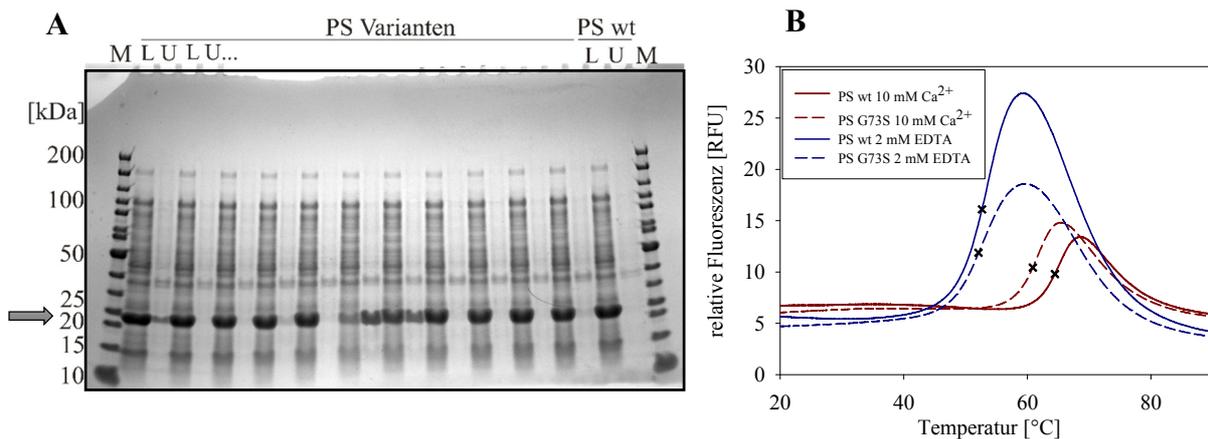


Abbildung 9: Charakterisierung von Protein S-Varianten mit einzelnen Substitutionen von Aminosäuren.

(A) SDS-PAGE-Analyse zur Charakterisierung von löslichem Proteinanteil und Genexpressionsstärke einer Auswahl von Protein S-Varianten bei Verwendung von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit pET23-Vektor. Die Proben wurden über 4–20% Gradientengele getrennt und mittels Coomassie-Färbung visualisiert. Pro Proteinvariante wurden jeweils die lösliche und unlösliche Fraktion nach Genexpression in 200 μl Mikrotitermaßstab aufgetragen. Zur Probenvorbereitung wurde das Sediment nach Zentrifugation der lysierten Zellen (unlösliche Fraktion) in 8 M Harnstoff, 0,1 M Tris, 1 mM EDTA pH 8,0 bei Raumtemperatur solubilisiert. Der Überstand (lösliche Fraktion) wurde direkt 1:5 mit Probenpuffer versetzt und in gleichem Volumen aufgetragen wie die nicht-lösliche Fraktion. Die Auswertung der Gele erfolgte über die densitometrische Bestimmung der Bandenintensitäten der entsprechenden Proteinvarianten (Pfeil). M: Fermentas *PageRuler Unstained*. L: löslicher Überstand. U: unlösliche Fraktion

(B) DSF-Analyse zur Messung thermischer Stabilitäten zweier ausgewählter Proteine. Es wurden 15 μg über IMAC gereinigter Proteinvarianten in Anwesenheit von 10 mM Ca^{2+} (HBSC) und in EDTA-vermittelter Abwesenheit von Ca^{2+} (HBSE) gemessen. Die Messung der thermisch induzierten Proteinentfaltung erfolgte über den Fluoreszenzfarbstoff *Sypro orange*[®] in einen Temperaturbereich von 20–90 °C und mit einer Heizrate von 1 K/min. Die Berechnung der apparenten mittleren Übergangstemperaturen aus den Temperaturübergängen erfolgte über MatLab[®] und wurden für die dargestellten Übergangskurven mit Kreuzen markiert.

Zur Einschätzung der Beteiligung von Aminosäuren an einem existierenden Paratop zur Sporenbindung auf der Oberfläche des Protein S wurden die gereinigten Varianten mit immobilisierten Sporen inkubiert, in Anwesenheit von 10 mM Ca^{2+} gewaschen und über die Zugabe von EDTA-Puffer eluiert (3.4.10). Die Quantifizierung des in den Wasch- und Elutionsfraktionen enthaltenen Proteins erfolgte über ein ELISA-Verfahren (3.4.7, Abbildung 10) unter Verwendung eines gegen die Hexahistidin-Fusion gerichteten Antikörpers (BMG-His-1, Roche).

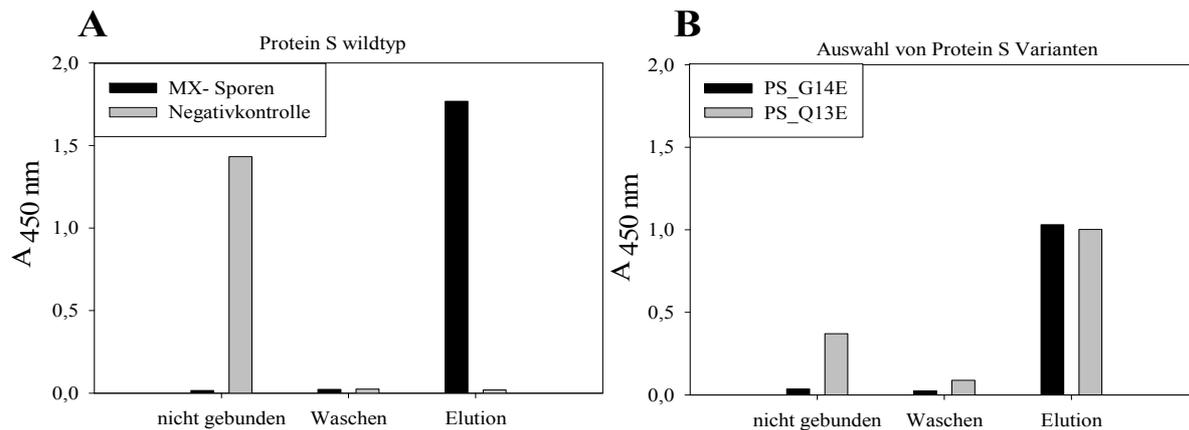


Abbildung 10: Quantifizierung des vorhandenen Proteins in Fraktionen bei Bindung von Protein S und Protein S-Varianten an immobilisierte Sporen des *M. xanthus* (MX) über ELISA

Auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisierte Myxosporen wurden mit 20 ng der Protein-Varianten in HBSC-Puffer (enthält 10 mM Ca^{2+}) inkubiert. Nicht gebundenes Protein wurde über Waschstufen in Anwesenheit von Ca^{2+} entfernt. Die Elution des verbleibenden Proteins auf der Sporenoberfläche erfolgte über einen Pufferwechsel auf HBSE (enthält 5 mM EDTA). Der Nachweis des Proteins in den einzelnen Fraktionen der Bindungsanalyse erfolgte über ein ELISA-Verfahren mit einem gegen die Hexahistidin-Fusion gerichteten Antikörpers (BMG-His-1, Roche). **(A)** Untersuchungen mit rekombinant produzierten Protein S-Wildtyp mit C-terminaler Hexahistidin-Fusion. Als Negativkontrolle wurde Protein S zu analog vorbereiteten Kavitäten ohne immobilisierte Myxosporen gegeben. **(B)** Bindungsanalyse zweier exemplarischer Varianten des Protein S an MX-Sporen. Das Verhältnis der Signale aus der Elutionsfraktion im Vergleich zu der Summe der erhaltenen Signale aller Fraktionen wurde zur Einschätzung der Bindung der jeweiligen Variante an MX-Sporen verwendet.

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte in Abhängigkeit der mutierten Aminosäureposition der untersuchten Varianten. Es wurden bis zu fünf unterschiedliche Austausche (Glutamat, Isoleucin, Arginin, Serin oder Tyrosin) pro Position berücksichtigt (Abbildung 11). Durch einzelne Substitutionen an sechs der untersuchten Aminosäurepositionen (G103, L72, D56, G33, A27, V17) wurde die Löslichkeit der Varianten signifikant verringert, so dass diese Positionen nicht für die Bibliotheksgenerierung in Betracht gezogen wurden. Für alle untersuchten Proteinvarianten wurden signifikant erhöhte thermische Stabilitäten bei Verfügbarkeit von Ca^{2+} während der Messung erhalten. Drei der untersuchten Aminosäurepositionen (Q16, L72, G103) zeigten bei Substitutionen jedoch eine grundlegend verringerte Stabilität. Obgleich die Datenlage nicht ausreicht, um ein Ca^{2+} -sensitives Paratop auf der Oberfläche des Protein S zu definieren, führten bestimmte Austausche (G14, Q16, E71, L72 K98, R120) zu einer wesentlichen Beeinträchtigung der Sporenbindung. Für jeweils alle Varianten von 31 der 41 untersuchten Positionen wurden nur geringe Änderungen der Löslichkeit, Stabilität sowie der Stabilisierung durch Ca^{2+} -Bindung ermittelt. Diese Positionen wurden daher für das Bibliotheksdesign verwendet.

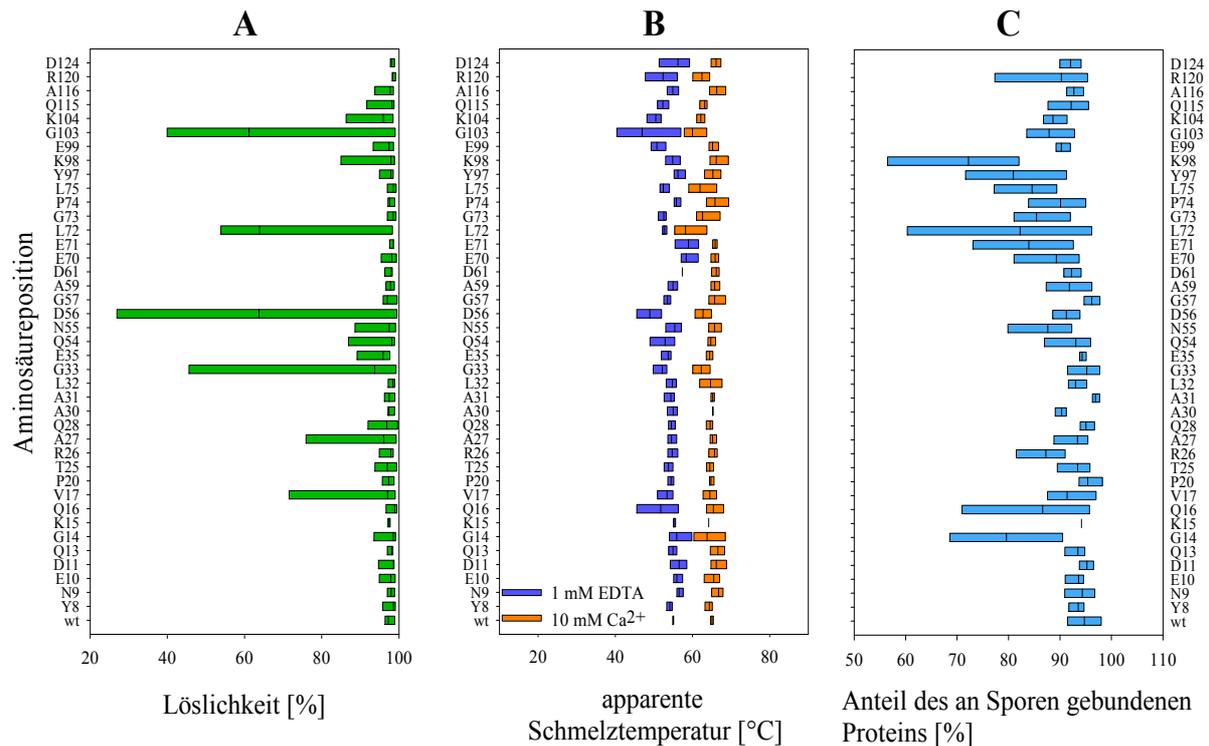


Abbildung 11: Charakterisierung von 186 Varianten des Protein S mit Einzelsubstitutionen von Aminosäuren.

Durch Techniken der ortsgerichteten Mutagenese wurde auf DNA-Ebene für 41 Positionen des Proteins die dem Wildtyp entsprechende Aminosäuresequenz durch unterschiedliche Aminosäuresequenzen (Glutamat, Isoleucin, Arginin, Serin bzw. Tyrosin) substituiert. Aufgrund der breiten Spanne biochemischer Eigenschaften dieser fünf Aminosäuren sollte die Toleranz gegenüber Substitutionen für die einzelnen Positionen bestimmt werden. Dargestellt sind minimale und maximale Werte pro geänderter Aminosäureposition für insgesamt 186 distinkter Proteinvarianten. Der Mittelwert wurde jeweils über eine vertikale Linie gekennzeichnet. **(A)** Bestimmung des Anteils des in der löslichen Fraktion vorhandenen Proteins im Vergleich zu dem gesamt produzierten Protein über SDS-PAGE. **(B)** Messung der apparenten Schmelztemperaturen über DSF in An- (orange) bzw. Abwesenheit (blau) von Ca²⁺. **(C)** ELISA zur Ermittlung des Anteils an Protein S in sporenbindender Fraktion im Vergleich zum gesamt eingesetzten Protein.

Die 31 ausgewählten Aminosäurepositionen wurden über visuelle Korrelation mittels PyMol in sechs jeweils zusammenhängende Bereiche (Module) eingeteilt. Diese Module konnten für die Generierung von Diversität zur Erstellung von Bibliotheken auf Basis des Protein S untereinander oder mit der Wildtyp-Sequenz entsprechenden Modulen frei kombiniert werden. (Tabelle 22).

Tabelle 22: Modulares System zur Generierung von Bibliotheken auf Basis des Protein S

Randomisiertes Modul	Anzahl randomisierter Positionen	Aminosäurepositionen
1	6	Y8, N9, E10, D11, Q13, K15
2	7	T25, R26, A27, A30, A31, L32, I35
3	5	Q54, N55, G57, A59, D61
4	5	E70, E71, G73, P74, L75
5	4	Y97, K98, E99, K104
6	4	Q115, A116, R120, D124

4.3 Selektion einer Protein S-Bibliothek gegen sfGFP

Zur Anreicherung von Proteinvarianten mit bestimmten Eigenschaftsprofilen aus großen Bibliotheken werden Selektionsmethoden verwendet, da eine vollständige Durchmusterung aller Varianten technisch nicht realisierbar ist. Reine *in vitro*-Selektionsmethoden, wie das Ribosomen-*display*, bieten den Vorteil größere Bibliotheksgrößen einsetzen zu können.

4.3.1 Generierung und Charakterisierung naïver Protein S-Bibliotheken

Die Auswahl zur Generierung von Bibliotheken basierend auf Protein S fiel auf insgesamt 4 der 6 definierten Module mit randomisierten Positionen (Abschnitt 4.2, Tabelle 22). Auf Basis der Module 1, 4 und 5 (PS_145) und der Module 1, 4 und 6 (PS_146) wurden zwei Bibliotheken generiert (Abbildung 12). Für beide Bibliotheken wurden somit Bereiche gewählt, welche sich zwischen den Ca^{2+} -bindenden Motiven (Aravind *et al.* 2009) befinden, um die Wahrscheinlichkeit zur Generierung schaltbarer Bindeproteine zu erhöhen (Abbildung 12).

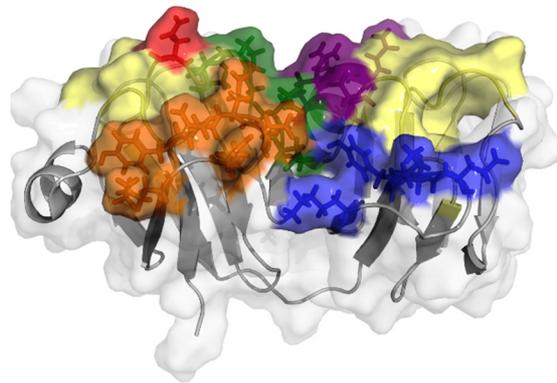


Abbildung 12: Sekundärstrukturelement- und Oberflächendarstellung der für die Randomisierung vorgesehenen Bereiche auf Basis des Protein S (PDB: 1PRR), sowie der Ca^{2+} -bindenden Motive (gelb).

Die farblich gekennzeichneten Flächen stellen zusammenhängende Bereiche des Gens von Protein S dar, welche als Module bezeichnet werden. Orange: Modul 1, grün Modul 4, blau: Modul 5, Magenta: Modul 6. Position N77 wurde in Rot hervorgehoben. Die Darstellung wurde mit der Software PyMol generiert.

Für die Generierung von Diversität wurde ein modulares System, basierend auf Oligonukleotiden der Firma Ella Biotech (Martinsried) verwendet (3.3.1). Durch die Verwendung vorgefertigter Trinukleotide für die Herstellung der Oligonukleotide konnten Sequenzen, die für definierte Aminosäuren codieren von der Synthese ausgeschlossen werden. Die Protein S Bibliotheken wurden unter Ausschluss der Trinukleotide, die für Cysteine und Proline codieren gefertigt. Für die Assemblierung der Bibliotheken wurde zunächst doppelsträngige DNA auf Basis der diversifizierten Oligonukleotide erstellt. Jedes der Fragmente verfügte über 5' und 3' gelegene Erkennungssequenzen für Typ II-S Restriktionsenzyme, was es ermöglichte, das Gesamtkonstrukt sukzessive zu assemblieren (3.3.1). Es wurden $1,5 \times 10^{13}$ Varianten für die Bibliothek PS_145 und $1,2 \times 10^{13}$ für die Bibliothek PS_146 auf DNA-Ebene generiert (3.3.1).

Untersuchungen zur Funktionalität sowie die Charakterisierung von Einzelvarianten der naïven Bibliotheken wurden im Rahmen der Masterarbeit von Anne Muchow durchgeführt (Muchow 2013). Die Analyse von 88 repräsentativen Sequenzen der naïven Bibliothek PS_145 sowie 83

Sequenzen der naiven Bibliothek PS_146 ergab in beiden Fällen eine gute Annäherung an die theoretische Gleichverteilung von 5,6% der Aminosäuren in den randomisierten Bereichen (Abbildung 13). Dem Bibliotheksdesign entsprechend konnten nur einzelne Cysteine und Proline in den Sequenzierungen ermittelt werden und sind auf Punktmutationen zurückzuführen.

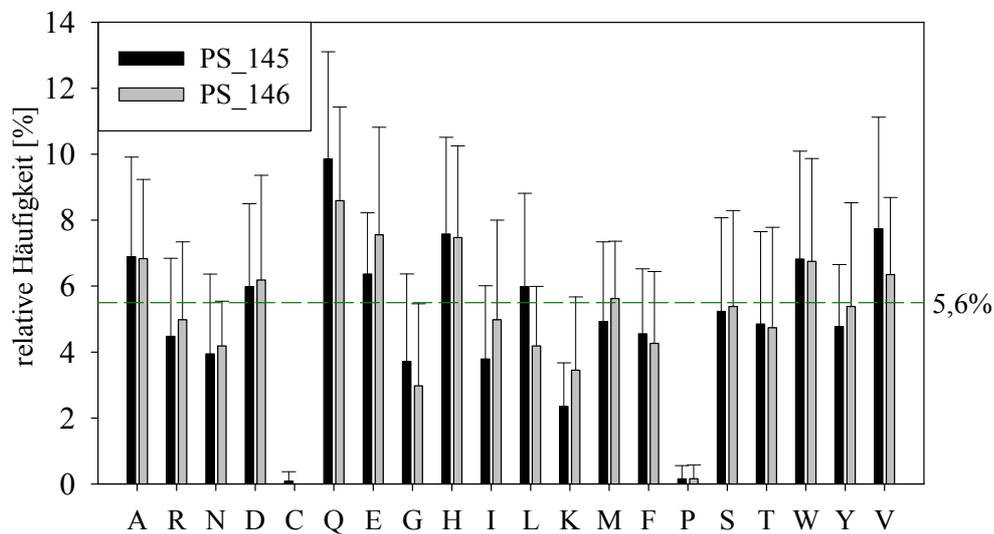


Abbildung 13: Über 15 randomisierte Positionen gemittelte Aminosäureverteilung der naiven Protein S-Bibliotheken. Grundlage für die Berechnung waren 88 (PS_145, schwarz) bzw. 83 (PS_146, grau) funktionale Sequenzen der Protein S-Bibliotheken, welche über jeweils 15 randomisierte Positionen verfügen. Die relativen Häufigkeiten der einzelnen Aminosäuren wurden positionswise gemittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen über alle randomisierten Positionen. Die theoretische Gleichverteilung von 5,6% für 18 Aminosäuren (das Bibliotheksdesign enthielt weder Cysteine noch Proline) ist als grüne horizontale Linie gekennzeichnet. Die dargestellten Daten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Anne Muchow (Muchow 2013) erhoben.

Die Proteinvarianten der naiven Bibliotheken wurden nach Transformation (3.1.1.3) von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit den entsprechenden codierenden Sequenzen in pET23SP-Expressionsvektoren im Mikrotitermaßstab produziert (3.1.1.4). Über SDS-PAGE-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Varianten beider Bibliotheken im Vergleich zu dem unveränderten Gerüstprotein einen deutlich geringeren Anteil löslichen Proteins bei der Produktion aufwiesen (Muchow 2013). Nur eine geringe Zahl von Varianten beider Bibliotheken (34% für Lib_145 und 47% für Lib_146) wies im Vergleich zur gesamten Genexpression einen Anteil löslichen Protein von über 20% auf. Die Charakterisierung der thermischen Stabilität der gereinigten Bibliotheksvarianten erfolgte über automatisierte DSF (3.4.5). Es konnte gezeigt werden, dass die Varianten der Bibliotheken im Vergleich zum Wildtyp-Protein über eine im Schnitt um ~15 K verringerte thermische Stabilität verfügten und nur teilweise durch die Verfügbarkeit von Ca^{2+} stabilisiert werden konnten (49% aller Varianten der PS_145 und 21% der PS_146). Weiterhin wurden die Varianten der naiven Bibliotheken bezüglich ihrer Eigenschaft zur Ca^{2+} -abhängigen Bindung an Sporen des *M. xanthus* untersucht (3.4.10, Abbildung 14).

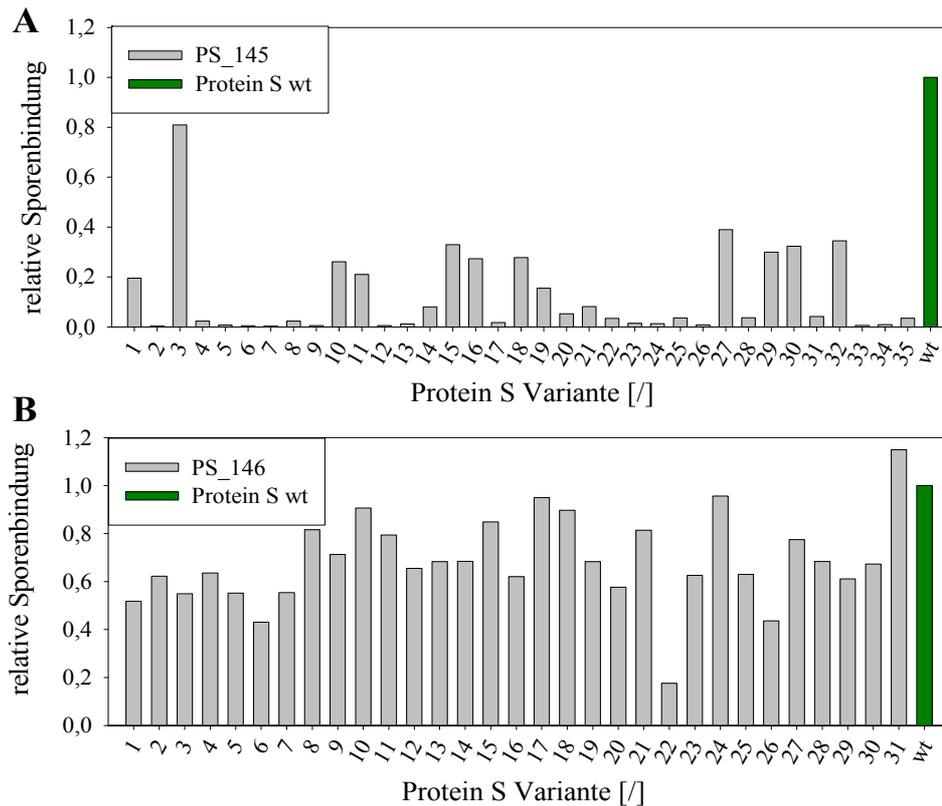


Abbildung 14: Bindung von Einzelvarianten aus naiven Protein S-Bibliotheken an MX-Sporen.

Relativer Anteil an Protein einzelner Varianten der naiven Protein S-Bibliotheken, welcher an immobilisierte MX-Sporen gebunden werden konnte. Zum Nachweis verbleibenden Proteins nach Bindung und Elution der Varianten an Myxosporen wurden die entsprechenden Überstände auf Mikrotiterplatten immobilisiert und die Proteinvarianten über einen α -His-Antikörper detektiert. Die Messungen wurden mit über IMAC gereinigten Proben durchgeführt und die Daten auf das Wildtyp-Protein (grüne Balken) normiert. Die Daten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Anne Muchow generiert (Muchow 2013). **(A)** Protein S-Bibliothek basierend auf Modulen 1, 4 und 5 **(B)** Protein S-Bibliothek basierend auf Modulen 1, 4 und 6.

Für 35 (PS_145) bzw. 31 (PS_146) Proteinvarianten der beiden naiven Bibliotheken konnten aussagekräftige Ergebnisse zur Bindung an den natürlichen Bindungspartner (Sporen des *M. xanthus*) erhalten werden. Die Varianten der beiden Bibliotheken zeigten signifikante Unterschiede in ihrem Bindungsverhalten. Ein willkürlich festgelegter Schwellenwert einer relativen Sporenbindung von 0,1 (entspricht 10% des detektierten Proteins an Sporen gebunden) ergab einen Anteil von 32,4% an Sporen bindender Varianten aus der Bibliothek PS_145 im Gegensatz zu 87% für die zweite Bibliothek PS_146. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die relative Sporenbindung aller Varianten der Bibliothek PS_145 im Durchschnitt mit 13% an Sporen gebundenen Proteins sehr gering ausfiel. Die Ergebnisse legen nahe, dass die randomisierte Oberfläche des Protein S der Bibliothek Lib_145 signifikant mit der natürlichen, Ca^{2+} -abhängigen Bindungsstelle des Proteins für die Myxosporen überlappt. Für die Selektion von Ca^{2+} -sensitiven Varianten wurde daher die Bibliothek PS_145 verwendet, da einerseits die Bindung des natürlichen Interaktionspartners für weitere Anwendungen unerwünscht war und andererseits vermutet wurde, dass ein Ca^{2+} -sensitives Paratop seitens des Gerüstproteins auch für *de novo*-generierte Interaktionen genutzt werden könnte.

Die Protein S Bibliotheken wurden zunächst mit flankierenden Sequenzen für ein Phagen-*display* System ausgelegt. Basierend auf den Ergebnissen der Präsentation des wildtyp-

Protein S (4.1, Abbildung 8) wurde jedoch entschieden, die Bibliothek PS_145 für die Selektion in ein Ribosomen-*display* geeignetes Format zu überführen. Dies erfolgte über die Anpassung der 3' und 5' regulatorischen Elemente in zwei Klonierungsschritten. Die Berechnung der erhaltenen Diversitäten der Bibliothek erfolgte über die Menge der gereinigten DNA.

Die theoretische Bibliotheksgröße bei 15 randomisierten Positionen mit 18 zugelassenen Aminosäuren (Δ Cys, Δ Pro) pro Position beträgt $18^{15} = 6,7 \times 10^{18}$ unterschiedlicher Varianten. Es wurden $1,5 \times 10^{13}$ Varianten für die Bibliothek PS_145 auf DNA-Ebene generiert (3.3.1). Aufgrund der hohen theoretischen Diversität der Bibliotheken ist die Wahrscheinlichkeit mehrfach vorkommender Varianten gering (Patrick *et al.* 2003; Firth und Patrick 2005) (Gleichung 4). Im Folgenden wurde die Diversität der Bibliotheken daher der Molekülzahl gereinigter DNA-Fragmente gleichgesetzt.

Gleichung 4: Diversität von Bibliotheken des Protein S im Phagen-*display*

$$1 - e^{-\frac{1,5 \times 10^{13}}{6,7 \times 10^{18}}} \approx 1 \quad (\text{Gleichung 7})$$

Ausgehend von der Protein S-Bibliothek PS_145, welche ursprünglich im Format für ein Phagen-*display* generiert wurde, erfolgte die Anpassung an das Ribosomen-*display* in zwei Stufen durch die Verwendung vorhandener Erkennungssequenzen für *AgeI* und *BamHI*-Restriktionsendonukleasen (3.3.1).

Zum statistisch sicheren Vorkommen von allen Varianten eines DNA-pools bei Klonierungsschritten würde man eine vielfache Abdeckung benötigen. Betrachtet man die Diversität eines Teilausschnittes einer Gesamtheit, so kann man den Anteil der individuellen Varianten des Teilausschnittes berechnen (Patrick *et al.* 2003). Analog zu der in Gleichung 4 dargestellten Rechnung ergab sich über die Menge gereinigter DNA der Zwischen- und Endprodukte die Abdeckung der Bibliothek (Gleichung 8 und 9) und daraus resultierend die enthaltenen Diversitäten (Tabelle 23). Die finale Protein S-Bibliothek PS_145 für das RD enthielt eine Diversität von $3,3 \times 10^{12}$ Varianten in $5,7 \times 10^{12}$ DNA-Molekülen.

Gleichungen 8 und 9: Abdeckung der Bibliothek PS_145 bei Umklonierung für ein Ribosomen-*display*

$$1 - e^{-\frac{\text{Molekülzahl des Zwischenproduktes}}{\text{Diversität Gesamtheit (PD-Format)}}} = 1 - e^{-\frac{5,8 \times 10^{12}}{1,5 \times 10^{13}}} \approx 0,32 \quad (\text{Gleichung 8})$$

$$1 - e^{-\frac{\text{Molekülzahl des finalen Konstruktes}}{\text{Diversität des Zwischenproduktes}}} = 1 - e^{-\frac{5,7 \times 10^{12}}{1,5 \times 10^{13} \times 0,32}} \approx 0,69 \quad (\text{Gleichung 9})$$

Tabelle 23: Berechnete Diversitäten der Protein S-Bibliothek PS_145 bei Änderung der Präsentationsmethode

Theoretische Bibliotheksgröße	Diversität in PD-Format	Diversität in Zwischenprodukt	Finale Diversität in RD-Format
$6,7 \times 10^{18}$	$1,5 \times 10^{13}$	$4,8 \times 10^{12}$	$3,3 \times 10^{12}$

4.3.2 Selektion der Bibliothek PS_145 gegen sfGFP mittels Ribosomen-*display*

Die Bibliothek PS_145 (4.3.1) wurde im Anschluss an die Synthese für eine Anreicherung Ca^{2+} -abhängig sfGFP-bindender Varianten durch ein Ribosomen-*display*-Verfahren verwendet. Insgesamt wurden sechs Runden des *bio-pannings* mit unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt (Abschnitt 3.3.5; Tabelle 18). Die Bindung der ternären Komplexe an biotiniertes sfGFP erfolgte in Lösung (*selection in solution*), die anschließend durchgeführte Immobilisierung erfolgte über Streptavidin-beschichtete Magnet-*beads*. Die Kapazität der eingesetzten *beads* zur Bindung von biotiniertem sfGFP, sowie die zum Blocken unspezifischer Bindestellen verwendeten Reagenzien wurden in Vorversuchen ermittelt (Daten nicht gezeigt). Als Negativkontrolle wurde ab der zweiten Selektionsrunde HBSC anstelle der Zielstruktur sfGFP verwendet, sämtliche Arbeitsschritte erfolgten analog zu der Selektion mit präsentierter Zielstruktur.

Zur Rekonstitution der Konstrukte nach Amplifikation jeder Selektionsrunde wurde ein gekoppeltes Restriktion-Ligation-Verfahren verwendet (3.3.8). Es wurde zur Analyse des Selektionserfolges die cDNA der EGTA-Elutionsfraktion nach reverser Transkription mittels *real-time-PCR* quantifiziert (Abbildung 15). Zur Kontrolle der verbleibenden eingesetzten Bibliotheks-DNA nach DNaseI-Verdau wurde eine Probe ohne durchgeführte reverse Transkription analysiert. Der Hintergrund an Bibliotheks-DNA war in allen Fällen um den Faktor 70–100 geringer als die cDNA nach reverser Transkription der EGTA-Elutionsfraktion (Daten nicht gezeigt).

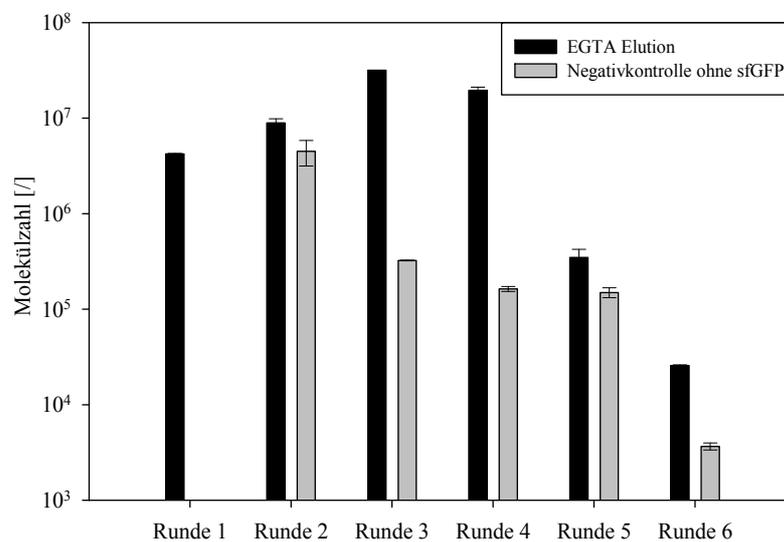


Abbildung 15: Quantifizierung von cDNA über *real-time-PCR* nach reverser Transkription im Ribosomen-*display* bei Selektion sfGFP-bindender Protein S-Varianten der Bibliothek PS_145

In jedem Zyklus des RD-*displays* wurde jeweils die Elutionsfraktion nach EGTA-Elution der ternären Komplexe von der immobilisierten Zielstruktur (schwarz) bzw. von unbeladenen magnetischen *beads* (grau, Runde 1: nicht bestimmt) untersucht. Die Messunsicherheit der *real-time-PCR* wurde durch Dreifachbestimmungen der Proben ermittelt und über Fehlerbalken dargestellt. Für die Messung wurde 1 μl der 120 μl EGTA-Elutionsfraktion verwendet.

Die mit geringer Stringenz durchgeführten ersten beiden Runden der Selektion ergaben eine vergleichbare Menge an DNA in der EGTA-Elutionsfraktion. Die in der zweiten

Selektionsrunde quantifizierte Menge an cDNA der Negativkontrolle ergab ebenfalls Molekülzahlen in gleicher Größenordnung. Durch vermehrte Waschschrte bei ansonsten geringer Stringenz konnte im Vergleich zu der Negativkontrolle in den Runden drei und vier eine Anreicherung spezifisch bindender Varianten erhalten werden. Die in der fünften Selektionsrunde verwendeten stringenten Selektionsbedingungen führten bei einem vergleichbaren Hintergrund unspezifischer Varianten der Negativkontrolle zu einer starken Verringerung der erhaltenen DNA-Moleküle in der EGTA-Elutionsfraktion der Selektion. Die in Runde sechs erhaltenen Messwerte zeigten eine insgesamt verringerte Menge an DNA-Molekülen. Zwar stieg der Anteil spezifisch bindender Moleküle in dieser Runde erneut leicht an, jedoch wurden in der EGTA-Elution weniger Moleküle detektiert als in der vorhergehenden Runde.

4.4 Identifikation und Charakterisierung sfGFP bindender Protein S-Varianten

Zur Identifikation von Protein S-Varianten mit gewünschtem Eigenschaftsprofil nach der Selektion (4.3.2) wurden Varianten einzeln hergestellt und charakterisiert. Um eine möglichst breite Basis von Varianten zur Auswahl für eine detaillierte Analyse zu erhalten, wurden die primären Analysen automatisiert mit hohem Durchsatz durchgeführt.

4.4.1 Automatisierte Durchmusterung

Für die primäre Analyse von Einzelvarianten aus den erhaltenen *pools* der Selektionsrunden (4.3.2) wurde eine ELISA-basierte automatisierte Durchmusterung mit hohem Durchsatz auf einem Beckman Biomek FX^P entwickelt und durchgeführt (3.4.7). Nach Klonierung der Varianten in den Expressionsvektor pETAB6H (3.2, Abbildung A4) über *AgeI/BamHI*-Schnittstellen (3.3.9) wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit den Plasmiden transformiert (3.1.1.3) und auf QTrays vereinzelt. Zur Überführung in 96-*well*-Mikrotiterplatten wurde ein QPix2-Koloniepicker-System verwendet. Abzüglich der verwendeten Kontrollen (2× Leervektor und 2×pET28a(+)_S3a) verblieben 92 Varianten pro Mikrotiterplatte. Die verschiedenen Runden des Ribosomen-*display* wurden mit unterschiedlicher Gewichtung analysiert (Tabelle 24), in der Summe wurden 2576 Varianten untersucht (Abbildung 16 A).

Tabelle 24: Ursprung der untersuchten Varianten in automatisierter Durchmusterung

Selektionsrunde	3	4	5	6
Anzahl Varianten	368	1104	368	736

Die ersten beiden Runden der Selektion wurden aufgrund der geringen Abweichung der ermittelten Molekülzahlen der Elutionsfraktionen zu der Negativkontrolle (4.3.2) nicht berücksichtigt. In der dritten Selektionsrunde wurde eine hohe Diversität an Varianten vermutet, da die Anzahl erhaltener Moleküle im Vergleich zu der Kontrollreaktion sehr hoch war. Aufgrund der geringen Stringenz dieser Selektionsrunde wurden für die Analyse jedoch nur wenige Varianten (368/2576) verwendet. Ein Großteil der untersuchten Varianten stammte aus der vierten Selektionsrunde (1104/2576), da trotz gesteigerter Stringenz der Selektionsrunde (3.3.5) ein großer Teil der Varianten der vorherigen Runde erhalten werden konnte (4.3.2). Die mit hoher Stringenz durchgeführte fünfte Selektionsrunde zeigte ein

geringes Verhältnis spezifisch bindender Varianten im Vergleich zu der Negativkontrolle, daher wurden auch aus dieser Runde nur wenige Varianten analysiert (368/2576). Aufgrund des, im Vergleich zu der vorhergehenden Runde, besseren Verhältnisses spezifisch bindender Varianten der sechsten Selektionsrunde wurden mehr Varianten dieser Fraktion für die Durchmusterung verwendet (736/2576).

Nach Produktion der Proteinvarianten im 96-*well*-Mikrotiterplattenformat (3.1.1.4) wurden die Zellen über Gefrier/Tau-Zyklen aufgeschlossen (3.1.1.5) und die Lysate für die automatisierte Durchmusterung verwendet (3.4.7). Parallel zur Proteinproduktion wurden von allen untersuchten Varianten Rückstellproben als Glycerolkultur gelagert (3.1.1.1), um entsprechend positive Varianten nach den durchgeführten Analysen zur Verfügung zu haben. Zur Detektion an die Zielstruktur gebundener Protein S-Varianten wurde ein Peroxidase-gekoppelter anti-His₆-Antikörper (BMG-His-1) verwendet. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, um die Bindung in permanenter Anwesenheit von Ca²⁺ und mit einem zusätzlich durchgeführten Waschschritt mit EDTA-Puffer zu untersuchen. Die automatisierte Durchmusterung wurde im 384-*well*-Maßstab durchgeführt und umfasste aufgrund der Doppelbestimmungen der 28×96 Varianten 14×384-*well* Mikrotiterplatten. Abweichungen in den verschiedenen Inkubationszeiten aller Mikrotiterplatten eines Laufes betragen unter 5% (Daten nicht gezeigt).

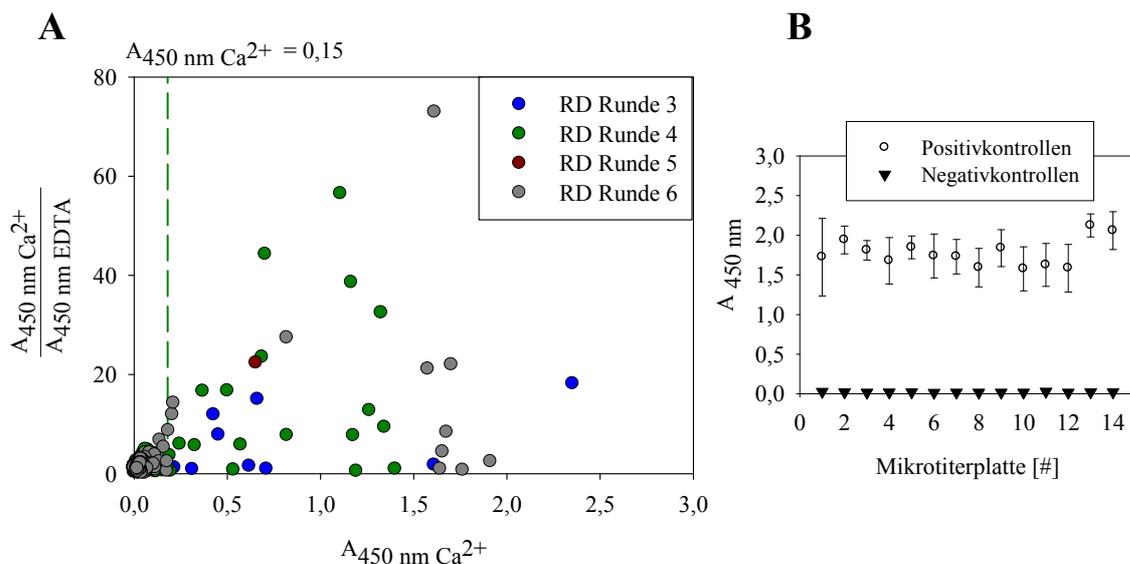


Abbildung 16: Automatisierter ELISA zur Identifikation von Ca²⁺-abhängig sfGFP-bindenden Protein S-Varianten. (A) Signalintensität und Ca²⁺-Sensitivität analysierter Protein S-Varianten in Primäranalyse. Nach der parallelen Genexpression in Mikrotitermaßstab wurden die verwendeten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen über Gefrier/Tau-Zyklen lysiert und unlösliche Bestandteile über einen Zentrifugationsschritt abgetrennt. Die lösliche Lysatfraktion wurde zu 500 ng sfGFP gegeben, welches ungerichtet auf einer *high bind* Mikrotiterplatte immobilisiert wurde. Die Detektion gebundenen Proteins erfolgte über einen gegen die Hexahistidininfusion gerichteten und peroxidasekonjugierten Antikörper (BMG-His-1). Für jede analysierte Variante wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Eine der beiden Messungen erfolgte hierbei in permanenter Anwesenheit von 10 mM Ca²⁺, und die zweite Messung wurde mit einem zusätzlichen EDTA-Waschschritt durchgeführt. Zur Darstellung wurden die Signalintensitäten der Varianten in permanenter Anwesenheit von Ca²⁺ (Abszisse), sowie das Signalverhältnis bei Chelatierung des Ca²⁺ verwendet (Ordinate). Der Schwellenwert für die Auswahl von Varianten für weitere Charakterisierungen wurde als vertikale Linie gekennzeichnet. Die einzelnen Varianten wurden entsprechend ihrer Herkunft aus den RD-Selektionsrunden farblich hervorgehoben (B) Mittelwert und Standardabweichung von jeweils 8 Positiv- und Negativkontrollen pro Mikrotiterplatte für die automatisierte Analyse. Die Positivkontrollen wurden durch die Interaktion eines ungerichtet immobilisierten Antikörpers mit einem Kristallin-Homolog, welches analog zu den Protein S-Varianten über den enthaltenen Hexahistidin-*tag* detektiert werden konnte. Als Negativkontrolle wurden Lysate aus *E. coli* BL21(DE3)-Kulturen mit pET23AB6H-Vektoren ohne zusätzlich eingebrachten Konstrukten verwendet.

Die Auswertung der erhaltenen Mess- und Kontrollwerte erfolgte über ein in MatLab[®] generiertes Skript (3.4.7). Die Durchmusterung ergab insgesamt 42 Varianten mit einer Absorption größer eines Schwellenwertes von $A_{450\text{ nm}, \text{Ca}^{2+}} \geq 0,15$ (Abbildung 16 A). Die Auswertung der mitgeführten Kontrollen ergab eine gute Vergleichbarkeit der Signalintensitäten verschiedener Mikrotiterplatten (Abbildung 16 B) sowie kein signifikantes Hintergrundsignal bei Verwendung von Leervektor-Lysaten. Der Großteil der identifizierten Varianten (27/42) zeigte eine starke Verringerung der Signalstärke nach einem zusätzlichem EDTA-Waschschritt ($\frac{A_{450\text{ nm}, \text{Ca}^{2+}}}{A_{450\text{ nm}, \text{EDTA}}} > 5$). Für weitere Analysen im Mikromaßstab wurden jedoch zunächst alle detektierten Varianten mit dem willkürlich festgelegten Schwellenwert von einer Absorption $A_{450\text{ nm}, \text{Ca}^{2+}} \geq 0,15$ konsolidiert und als Glycerolkulturen bei -20 °C gelagert (3.1.1.1).

4.4.2 Sequenzanalyse sfGFP-bindender Bibliotheksvarianten

Zur grundlegenden Charakterisierung der 42 in der automatisierten Durchmusterung detektierten sfGFP-bindenden Protein S-Varianten (4.4.1) wurden diese sequenziert (3.2.8). Fünf der untersuchten Varianten enthielten ein Stop-Codon (1×), enthielten Insertionen (2×), wiesen Leserahmenverschiebungen (1×) oder Cysteine (1×) auf und wurden nicht weiter verwendet. Zwei Varianten zeigten Signalüberlagerungen durch gemischte Sequenzen und wurden nach einer Transformation von *E. coli* DH5 α mit präparierten Plasmid (3.1.1.3) erneut vereinzelt ausgestrichen und die Plasmid-DNA einzelner Kolonien sequenziert (3.2.5, 3.2.8). Eine weitere Variante zeigte multiple Deletionen in den randomisierten Bereichen und wurde daher ebenfalls ausgeschlossen. In der Summe wurde für 36 Varianten eine fortlaufende Identifikationsnummer (*clone-ID*: CID) vergeben (Tabelle 25). Die Reihenfolge der Varianten ergab sich aus der Zusammenfassung von Sequenzhomologien.

Tabelle 25: Sequenzauswertung identifizierter bindender Varianten gegen sfGFP der Protein S-Bibliothek

CID	Modul 1	Modul 4	Modul 5	zusätzliche Mutation	CID	Modul 1	Modul 4	Modul 5	zusätzliche Mutation
wt-PS	YNEDQK	EEGPL	YKEK		19	GGQWLW	DLQQL	WRAH	/
1	TGYYYF	IIADI	TFQR	/	20	LRDQEL	KMFTV	AQWW	D105V
2	TGYYYF	IDFYF	RFAG	/	21	QWSWFR	ESWYA	NWAG	/
3	TGFHYH	LYVYQ	IWHE	A72T	22	RIAWWK	EFADF	MGTY	/
4	TGFHYH	LYVYQ	IWHE	A72T	23	QQWQMA	EWWDV	HYGS	N80Y, Q103K
5	SGYAFW	MHHWE	LFTR	/	24	QQWQMA	EWWDV	RYQF	N80Y
6	SGYAFW	AARWE	WFRR	/	25	AIWHET	EFWFW	RYNY	/
7	SGYAFW	AARWE	WFRR	/	26	AQWWSR	YWWGW	RYIW	/
8	SGFAYY	ITQWE	KFTT	/	27	NFTPWQ	EEWRL	RFDY	/
9	SGFYMY	HDQLQ	VFGY	/	28	AVWILD	IYFLV	IRAL	/
10	SGFHYG	IWYHS	LFER	V156A	29	TGQQAW	IIHIR	SHAA	/
11	SGYAYR	IIMAH	AFKE	A53G	30	SGYAFW	ILQWN	WFER	/
12	SGYWYA	IHLLV	VHRT	/	31	MYGWTL	YYFYI	WNWA	/
13	SGWYYG	IFWLR	VHLR	/	32	MNQSHD	LYLWH	YHEN	/
14	SGFVMH	IFLFL	WFER	/	33	SGYAYA	LQIRD	VWER	N125D
15	KHERQH	IFWLR	VHLR	/	34	AGILVF	DHQTW	ITQE	/
16	RQLWWQ	DFWSW	RHAA	/	35	SGFYMM	IWTQF	HHVG	D61E
17	MKWWEW	DSTWF	KVQV	/	36	SGFYMM	IWTQF	RFAM	D61E
18	AAYPQI	DKHFF	SIWV	P49R, T170S					

Bedingt durch die Klonierung der Varianten aus den erhaltenen Fraktionen des Ribosomen-*displays* verfügen die Proteinvarianten im Vergleich zu dem wt-Protein S über drei zusätzliche Aminosäuren, die sich in der Sequenz direkt hinter dem Start-Methionin befinden („MGTG“). Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur schließt diese Aminosäuren mit ein, so dass die entsprechenden Aminosäurepositionen sich von den Positionen im wt-Protein unterscheiden (z.B.: wt-Protein S Position N77 im Vergleich zu Protein S-Varianten: N80).

Die Aminosäureverteilung der randomisierten Bereiche nach Selektion zeigte im Vergleich zu der naïven Bibliothek (Abbildung 13) eine Anreicherung von aromatischen Aminosäuren (Phe, Trp, Tyr) sowie zum statistischen Mittel unterrepräsentierte Aminosäuren (Asp, Lys, Met) (Abbildung 17 A). Die im Bibliotheksdesign nicht berücksichtigten Aminosäuren (Cys und Pro) zeigten auch nach der Selektion keine signifikante Repräsentanz (die 1× vorkommende Cystein-enthaltende Variante wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt) und sind in allen Fällen auf eine Punktmutation zurückzuführen.

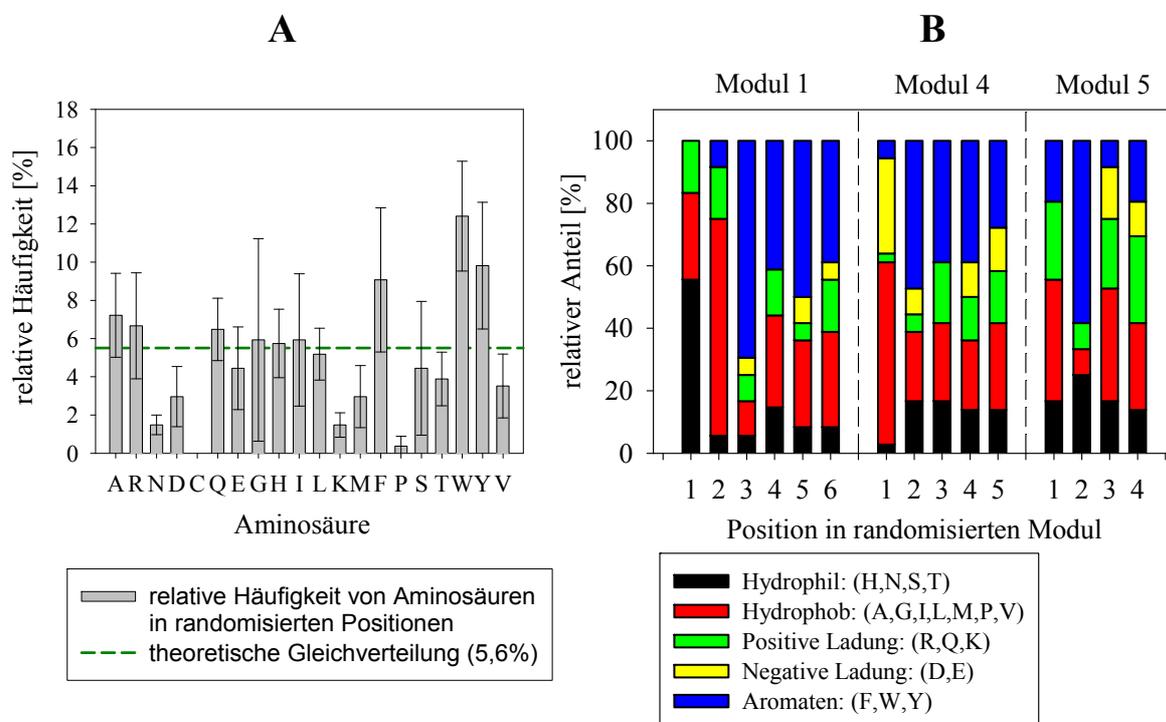


Abbildung 17: Aminosäureverteilung randomisierter Positionen nach Selektion sfGFP-bindender Varianten der Protein S-Bibliothek PS_145

(A) Für 36 Protein S-Varianten ermittelte Aminosäureverteilung der jeweils 15 randomisierten Positionen. Die Standardabweichungen der Verteilung der jeweiligen Aminosäure an einzelnen Positionen des Proteins sind als Fehlerbalken dargestellt. Als Referenzwert ist der statistische Mittelwert bei Gleichverteilung der Aminosäuren gekennzeichnet (gestrichelte Linie). (B) Einteilung der Aminosäuren nach biochemischen Eigenschaften über die drei randomisierten Bereiche der Protein S-Bibliothek PS_145. Die Darstellung erfolgte getrennt nach den DNA-Abschnitten („Module“), auf welchen sich die codierenden Sequenzen der randomisierten Positionen befinden. Für das erste Modul wurden sechs Positionen für die Randomisierung ausgewählt (Y8, N9, E10, D11, Q13, K15), Modul 4 umfasste fünf (E70, E71, G73, P74, L75), und Modul 5 vier Positionen (Y97, K98, E99, K104). Die Aminosäuren wurden folgenden Gruppen zugeordnet: hydrophob (A, G, I, L, M, P, V), hydrophil (H, N, S, T), positive Ladung (K, R, Q), negative Ladung (D, E), aromatisch (F, W, Y).

Die analysierten Varianten zeigten eine hohe Diversität. Es gab lediglich zweimal Anreicherungen identischer Sequenzen (CID 3/4 sowie CID 6/7). Es zeigte sich jedoch vor allem für den ersten der drei randomisierten Bereiche eine hohe Homologie vieler Varianten (Abbildung 17 B, Tabelle 25). Für dreizehn Varianten konnte ein Motiv – beginnend mit Serin oder Threonin, gefolgt von einem Glycin und zwei durch beliebige Aminosäuren getrennte Aromaten („S/TGX_X_“) – identifiziert werden. Auch Varianten mit anderen Motiven verfügten meist über eine aromatische Aminosäure an der dritten Position des ersten randomisierten Moduls (Abbildung 17 B). Für die beiden folgenden randomisierten Module (4 und 5) zeigten sich höhere Diversitäten. An einzelnen Positionen zeigten sich jedoch auch in diesen Abschnitten Anreicherungen bestimmter Aminosäuren. So kamen insbesondere für die erste Aminosäureposition des vierten Moduls (wt-Position E70) vor allem hydrophobe Aminosäuren, und an der dritten Position des fünften Moduls (wt-Position K98) aromatische Aminosäuren vor. Insgesamt waren die drei Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten mit 31,3% über alle randomisierten Positionen vertreten. Außerhalb der randomisierten Bereiche wurde in 11 der 36 (=30,5%) Varianten ein zusätzlicher Austausch festgestellt. Diese zusätzlichen Mutationen waren hinsichtlich ihrer Verteilung und des Typs der eingebrachten Aminosäure willkürlich. Abgesehen von der ohnehin zweifach vorkommenden Varianten CID 3 & 4 (Mutation A72T), gab es nur zwei Mutationen, welche in mehr als einer Variante vorkamen (CID 23 und 24: N80Y und CID 35 & 36: D61E). Aus der Primärstruktur abgeleitete Modelle der Varianten wurden erstellt und sind dem Anhang zu entnehmen (Abbildung A1 und Abbildung A2). Für die sekundären Analysen wurden alle Proteinvarianten weiterverwendet, da die verwendeten Methoden im Durchsatz nicht limitierend waren.

4.4.3 Sekundäranalysen sfGFP-bindender Bibliotheksvarianten

Um die Anzahl von Varianten für eine detaillierte Charakterisierung einzuschränken, wurden die erhaltenen Varianten aus der Durchmusterung (4.4.1) im Mikromaßstab produziert (3.4.2.1) und hinsichtlich ihrer thermischen Stabilität über DSF (3.4.5) und hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften mittels ELISA (3.4.7) charakterisiert. Weiterhin wurden der Anteil löslich produzierten Proteins bei Genexpression im Mikrotitermaßstab über SDS-PAGE analysiert (3.4.1).

4.4.3.1 Lösliche Produktion und Stabilität

Der Anteil an Protein in der löslichen Fraktion bei der parallelen Produktion der Varianten (3.4.1) über *E. coli* BL21(DE) bei 37 °C wurde für alle Proteinvarianten über SDS-PAGE bestimmt (Tabelle 26). Die erhaltenen Kurvenverläufe der DSF-Messungen konnten für 17 von 36 Proteinvarianten über sigmoidale Funktionen approximiert und die daraus resultierenden mittleren Übergangstemperaturen berechnet werden (3.4.5, Tabelle 26). Kurvenverläufe, welche nicht ausgewertet werden konnten zeigten in allen Fällen ein zu geringes Signal, mehrfache Übergangskurven konnten hingegen nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 26: Ermittelte Werte zur Produktion löslichen Proteins und thermische Stabilitäten

CID	Löslichkeit [%]	DSF [°C]		CID	Löslichkeit [%]	DSF [°C]	
		10 mM Ca ²⁺	2 mM EDTA			10 mM Ca ²⁺	2 mM EDTA
1	77	49	46,6	20	17	44,7	47
2	9	n.a.	n.a.	21	19	43,9	41,7
3	14	n.a.	n.a.	22	11	45	n.d.
4	8	n.a.	n.a.	23	10	n.a.	n.a.
5	20	43,2	42,0	24	9	44,9	43,2
6	7	42	n.d.	25	6	n.a.	n.a.
7	6	42	n.d.	26	40	47,6	41,3
8	55	45,8	43,8	27	8,7	44,3	40,3
9	10	n.a.	n.a.	28	3	n.a.	n.a.
10	6	n.a.	n.a.	29	77	48,6	46,81
11	5	41,8	39	30	21	47,8	45,0
12	10	n.a.	n.a.	31	4	n.a.	n.a.
13	5	n.a.	n.a.	32	31	49,3	47
14	9	n.a.	n.a.	33	n.a.	n.a.	n.a.
15	56	46,2	45,4	34	n.a.	n.a.	n.a.
16	15	n.a.	n.a.	35	n.a.	n.a.	n.a.
17	5	n.a.	n.a.	36	n.a.	n.a.	n.a.
18	2	n.a.	n.a.	wt-PS	100	65	55
19	8	42,9	n.d.				

Die untersuchten Varianten zeigten im Vergleich zu dem Wildtyp-Protein signifikant niedrigere mittlere Übergangstemperaturen und verringerte Ausbeuten an löslich produziertem Protein. Ähnliche Werte wurden in vorangegangenen Arbeiten auch für die naiven Bibliotheken ermittelt (Muchow 2013) (Daten nicht gezeigt). Der über die densitometrische Auswertung von SDS-PAGE-Gelen ermittelte Anteil löslichen Proteins im Vergleich zur Gesamtexpression lag bei den Varianten zwischen 2% und 77% löslichen Proteins, wobei 24 (67%) der Varianten eine stark verringerte Löslichkeit von 0–20% aufwiesen. Lediglich 4 der Varianten (11%) zeigten eine gute Löslichkeit von >50%.

Im Vergleich zu dem Wildtyp-Protein lag die durchschnittliche thermische Stabilität der Varianten um 19 K niedriger. Alle Varianten, für welche aussagekräftige und auswertbare Daten erhalten werden konnten zeigten eine Stabilisierung durch die Bindung von Ca²⁺ (Ausnahme: CID 20). Im Schnitt betrug die Differenz der mittleren Übergangstemperaturen in An- und Abwesenheit von Ca²⁺ $\Delta T_m = 2,7$ K und war damit signifikant geringer als bei Wildtyp Protein S ($\Delta T_m = 10$ K).

4.4.3.2 Ca²⁺-abhängige Bindungsspezifität gereinigter Protein S-Varianten

Die aus der Primäranalyse erhaltenen Varianten wurden im Mikrotitermaßstab produziert (3.4.2.1), über IMAC gereinigt (3.4.2.1) und über ELISA analysiert (Abbildung 18). Der ELISA wurde für identische Proben in permanenter Anwesenheit von Ca²⁺ und mit einem zusätzlichen EDTA-Waschschritt durchgeführt. Zur Überprüfung unspezifischer Bindung wurden die Proteinvarianten zudem hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens an globuläre Proteine (BSA, Casein und Lysozym) untersucht (Abbildung A 10).

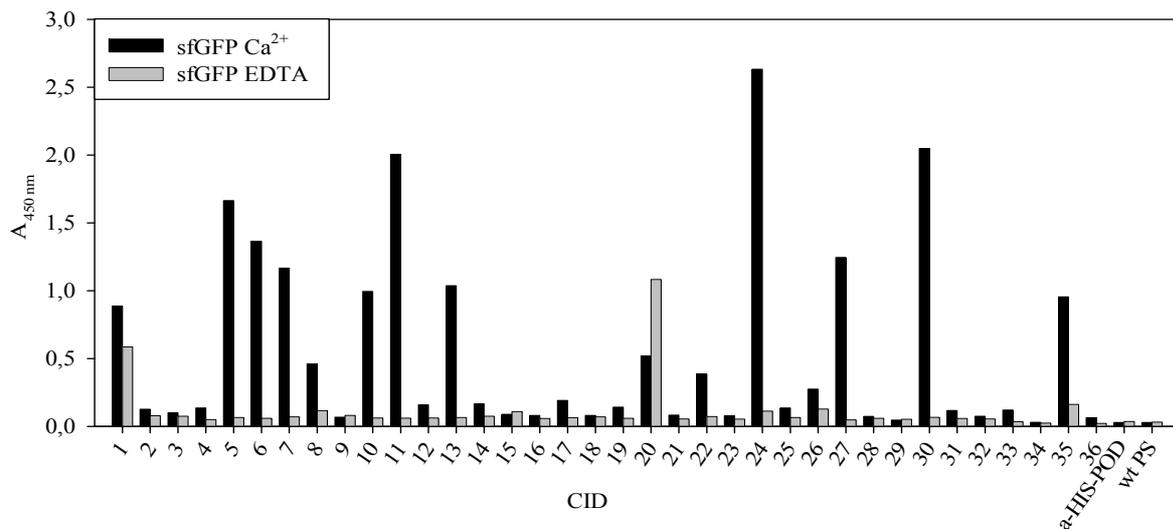


Abbildung 18: ELISA mit gereinigten Protein S-Varianten aus Durchmusterung

Die in der Durchmusterung detektierten sfGFP bindenden Protein S-Varianten wurden nach erfolgter Reinigung über IMAC mittels ELISA hinsichtlich ihrer Ca²⁺-abhängigen Bindung an sfGFP analysiert. Für jede Variante wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Messung erfolgte in permanenter Anwesenheit von Ca²⁺, für eine der Doppelbestimmungen wurde ein zusätzlicher EDTA-Waschschritt durchgeführt, um die Ca²⁺-Abhängigkeit der Bindung zu bestätigen. Als Negativkontrollen wurde das Wildtyp Protein S als auch das zur Detektion verwendete Immunkonjugat (BMG-His-1) mitgeführt.

Für 15 Varianten konnte die Ca²⁺-abhängige Bindung an die Zielstruktur sfGFP reproduziert werden (CID 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 17, 24, 26, 27, 30, 35). Im Falle einer Variante ohne erteilte CID, die Deletionen in der DNA-Sequenz aufwies, konnte eine nicht Ca²⁺-schaltbare Bindung bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Für 21 Varianten konnte im Rahmen der Sekundäranalyse nach Reinigung kein signifikantes Signal ($A_{450\text{ nm}} < 0,2$) mehr erhalten werden von welchen sechs Varianten bereits in dem primären ELISA geringe Signalamplituden ($A_{450\text{ nm}} < 0,2$) zeigten. Für 18 der Varianten ohne signifikante Signale konnten im Zuge der Reinigung über IMAC nur geringe Ausbeuten an Protein erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Dies betraf ebenfalls eine der zweifach erhaltenen Sequenzen (CID 3 und 4). Lediglich eine der Varianten (CID 2) zeigte ein erhöhtes Hintergrundsignal ($A_{450\text{ nm}} > 0,2$) für die Kontroll-Proteine, alle weiteren Varianten zeigten eine spezifische Bindung von sfGFP ($A_{450\text{ nm}} \text{ Kontrollen} < 0,2$ Übersicht siehe Abbildung A 10). Variante CID 20 zeigte in diesem Experiment ein erhöhtes Signal nach erfolgtem Waschschritt mit EDTA und Variante CID 1 zeigte eine weniger effiziente Elution über EDTA als in der Primäranalyse. Aufgrund der guten Löslichkeit (Tabelle 26) der Variante wurde sie dennoch für weitere Untersuchungen verwendet. Die durchgeführten Negativkontrollen zeigten keine unspezifische Bindung des wt-Protein S oder des für die Detektion verwendeten Immunkonjugates.

4.5 Produktion und Charakterisierung von sfGFP-bindenden Einzelvarianten

Für die Proteinproduktion im Schüttelkolben-Maßstab wurden 13 Varianten ausgewählt (CID 1, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 24, 27, 30, 32 und 35). Als Auswahlkriterien wurden neben den erhaltenen Messdaten zu Löslichkeit, Stabilität und Bindungseigenschaften auch die vorhandenen Sequenzinformationen berücksichtigt, um Varianten weiterzuführen, die potentiell an unterschiedliche Epitope der Zielstruktur binden.

4.5.1 Rekombinante Produktion sfGFP-bindender Protein S-Varianten

Für die eingehende Charakterisierung ausgesuchter Proteinvarianten wurden diese im Schüttelkolben-Maßstab produziert (3.1.1.4). Die Kultivierung der rekombinanten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen erfolgte in ZYM-5052 Autoinduktionsmedium. Nach erfolgter Inokulation des Mediums wurden die Kulturen zunächst für drei Stunden bei 37 °C angezogen und anschließend für die Genexpression auf 25 °C abgekühlt, da für die Proteinvarianten bereits eine geringe lösliche Produktion unter Standardbedingungen nachgewiesen werden konnte (4.4.3.1). Typische optische Dichten bei dieser Kultivierungsstrategie betragen $OD_{600nm} = 8-10$. Die Reinigung der Varianten erfolgte über ein ÄKTexpress-System mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie (3.4.2.1), um ein reines Produkt und monomere Proteinspezies für eine detaillierte Charakterisierung zu erhalten (Abbildung 19).

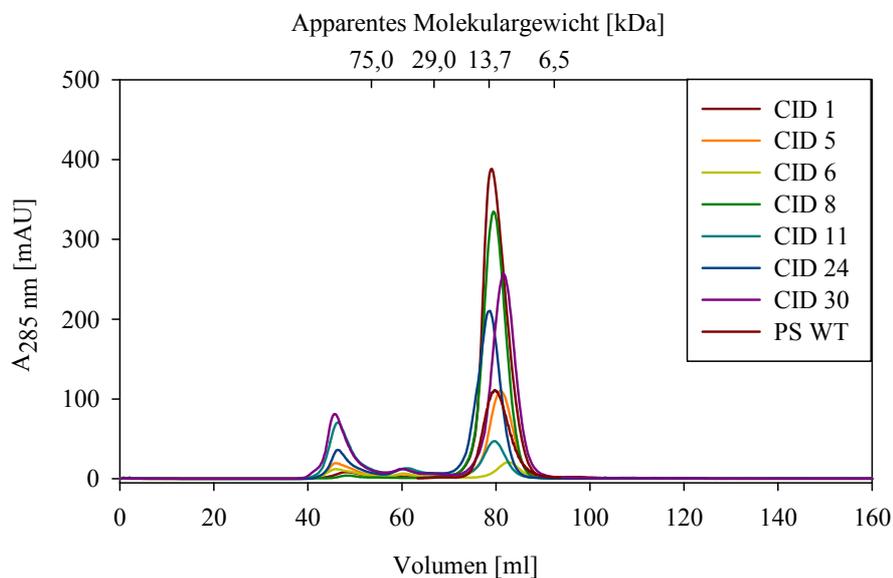


Abbildung 19: Produktion von sfGFP-bindenden Varianten des Protein S im Schüttelkolbenmaßstab

Größenausschlusschromatographie einer Auswahl an Varianten. Im letzten Reinigungsschritt wurde das Eluat der IMAC auf eine Superdex 75 prep grade-Säule aufgetragen. Als Laufpuffer diente HBS pH 7,4. Zur Bestimmung der apparenten Molekularmasse wurde die Säule mit Standardproteinen (GE Healthcare) kalibriert.

Für alle Varianten konnten in den Chromatogrammen der Größenausschlusschromatographie zusätzliche Peaks registriert werden, welche Multimeren oder Aggregaten entsprachen (Abbildung 19). Die entsprechenden Peaks konnten jedoch vollständig von den monomeren Proteinspezies getrennt werden. Für eine der Varianten (CID 24) zeigte eine erneut

durchgeführte analytische Größenausschlusschromatographie keinen erneut sichtbaren Peak, der Aggregaten entspricht (Daten nicht gezeigt). Die erzielten Ausbeuten variierten je nach Protein in einem Bereich von 1–34 mg/l Kulturvolumen (Tabelle 27).

Tabelle 27: Ausbeute bei Produktion von sfGFP-bindenden Varianten des Protein S

CID	Ausbeute pro Kulturvolumen [mg/l]	CID	Ausbeute pro Kulturvolumen [mg/l]
1	34	15	19
5	17	24	15
6 (=7)	1	27	4
8	19	30	17
10	9	32	12
11	5	35	22
13	10		

Zur Verlaufskontrolle der Proteinreinigungen wurden die Ausgangs-, Wasch- und Elutionsfraktionen über SDS-PAGE-Analysen mit anschließender Coomassie-Visualisierung untersucht (3.4.1). In den Fraktionen der monomeren Proteinspezies konnten nur die erwarteten Banden der Protein S-Varianten detektiert werden. Zusätzliche Banden, die auf Protein-basierte Verunreinigungen hinweisen, wurden nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).

4.5.2 Bindungsanalysen ausgesuchter Varianten

Für die Charakterisierung der Interaktionsstärke der Protein S-Varianten und sfGFP wurden zwei unterschiedliche Verfahren (ELISA und SPR) verwendet, um die Ergebnisse durch unabhängige Messprinzipien zu verifizieren. In diesen Analysen sollten vor allem die unterschiedlichen Bindungsverhalten der Varianten unter Verfügbarkeit und Abwesenheit von Ca^{2+} näher charakterisiert werden, um die beste Protein S-Variante für weitere Experimente zu identifizieren.

4.5.2.1 Bindungsanalysen über ELISA

Die rekombinant hergestellten und über eine Zweistufenreinigung produzierten Varianten wurden für eine erste Einschätzung der Bindungsstärke über einen konzentrationsabhängigen ELISA untersucht. Es wurden 500 ng sfGFP pro Kavität in Mikrotiterplatten immobilisiert und die Bindungen der Varianten über einen gegen die Hexahistidinfusion gerichteten, POD-konjugierten Primärantikörper detektiert (3.4.7). Jede der Protein S-Varianten wurde in Anwesenheit von 10 mM Ca^{2+} (HBSC) sowie in EDTA-vermittelter Abwesenheit von Ca^{2+} (HBSE) gemessen (Abbildung 20).

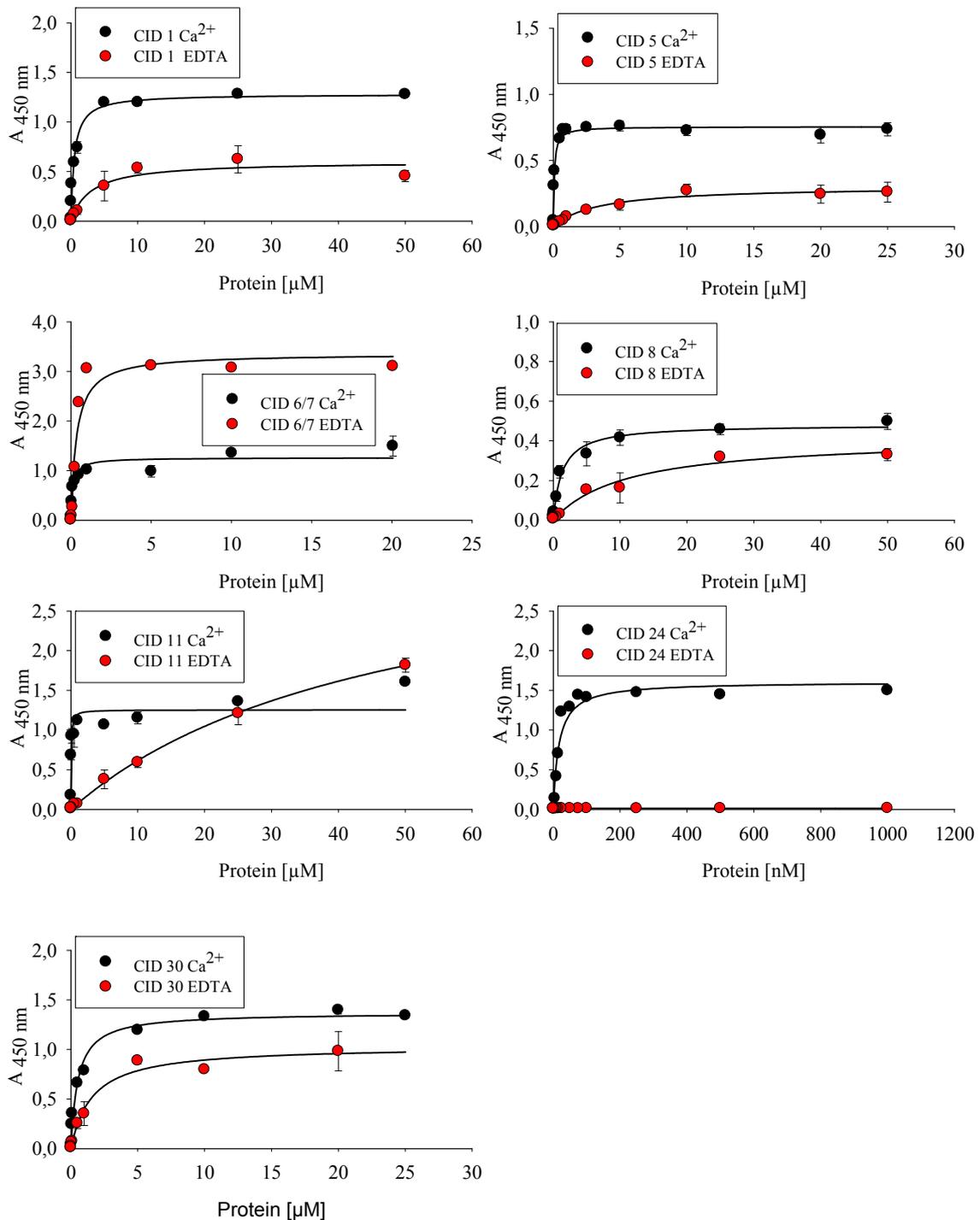


Abbildung 20: Konzentrationsabhängiger ELISA von Protein S-Varianten gegen sfGFP.

Verdünnungsreihen von sieben Proteinvarianten wurden in permanenter Anwesenheit von 10 mM Ca²⁺ (schwarz) oder in EDTA-vermittelter Abwesenheit von Ca²⁺ (rot) analysiert. Die Daten wurden unter der Annahme einer 1:1 Stöchiometrie approximiert (schwarze Linien). Für die Versuche wurden 500 ng sfGFP pro Kavität ungerichtet auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert und mit IMAC und SEC gereinigten Proteinvarianten inkubiert. Die Detektion an gebundenem Protein erfolgte über den Nachweis der Hexahistidinfusion über einen peroxidasekonjugierten Antikörper (BMG-His-1). Jede Messreihe wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt, Standardabweichungen des ELISA wurden als Fehlerbalken dargestellt.

Die erhaltenen Kurvenverläufe für die einzelnen Varianten lassen sich mit hyperbolen Funktionen approximieren (3.4.7) und ergaben Affinitäten im Bereich von 10⁻⁶–10⁻⁹ M (Tabelle 28).

Tabelle 28: Aus konzentrationsabhängigen ELISA ermittelte Affinitäten von sieben sfGFP-bindenden Protein S-Varianten.

CID	$K_{D, \text{Calcium}}$	$K_{D, \text{EDTA}}$	Verhältnis
	[nM]	[nM]	$K_{D, \text{EDTA}} / K_{D, \text{Calcium}}$
1	520 ± 100	3.000 ± 1300	6
5	73 ± 9	3.400 ± 1200	46
6 (=7)	131 ± 32	345 ± 70	3
8	1.300 ± 270	10.900 ± 3100	8
11	47 ± 14	47.600 ± 9500	1013
24	17 ± 2	n.m.	/
30	520 ± 60	1.580 ± 430	3

Bei allen Proteinvarianten konnte eine Ca^{2+} -abhängige Änderung der Affinitäten zu sfGFP beobachtet werden. Zwischen den ermittelten Affinitäten einzelner Varianten in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} lagen die Faktoren zwischen 2,6–1.000. Für eine der Varianten (CID 24) konnte, neben einer sehr starken Bindung in Anwesenheit von Ca^{2+} , keine detektierbare Bindung in Abwesenheit von Ca^{2+} ermittelt werden. Die Plateau-Phasen der einzelnen Varianten in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} zeigten ausnahmslos unterschiedliche Amplituden, was für eine unterschiedliche Art der Bindung spricht. Zwei der Varianten (CID 6 und 11) zeigten ein höheres Plateausignal für den calciumfreien Zustand.

4.5.2.2 Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

Zur quantitativen Bindungsanalyse wurde die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie mit auf einem SA-Chip immobilisierten sfGFP verwendet (3.4.8). Zusätzlich zu den im konzentrationsabhängigen ELISA verwendeten Varianten (4.5.2.1) wurden die Varianten CID 10, 13 und 27 gereinigt und untersucht. Die gereinigten Protein S-Varianten wurden jeweils in HEPES-gepufferter Saline in Anwesenheit von 10 mM Ca^{2+} (HBSCT) oder in EDTA-vermittelter Abwesenheit von Ca^{2+} (HBSET) untersucht (Abbildung 21). Die verwendeten Konzentrationen der Proteine wurden in Tabelle 20 (S. 52) zusammengefasst. In Anwesenheit von Ca^{2+} (HBSCT) wurden Konzentrationen von 1-300 nM Protein, in EDTA-vermittelter Abwesenheit (HBSET) stets höhere Konzentrationen im μM -Bereich verwendet.

Alle untersuchten Varianten zeigten Ca^{2+} -sensitive Bindung an den Interaktionspartner sfGFP (Abbildung 21). Die ermittelten Dissoziationskonstanten der Varianten waren in Anwesenheit von Ca^{2+} in einem Bereich von 10^{-7} – 10^{-10} M (Tabelle 29). Von den 10 analysierten Varianten zeigten drei (CID 10, 11 und 13) eine Affinität von 1–10 nM, fünf weitere (CID 1, 5, 8, 27 und 30) von 10–100 nM und eine Variante eine unspezifische Bindung (CID 6). Für die beste Proteinvariante (CID 24) wurde eine subnanomolaren Dissoziationskonstante in Anwesenheit von Ca^{2+} und keine messbare Bindung in EDTA-vermittelter Abwesenheit von Ca^{2+} ermittelt.

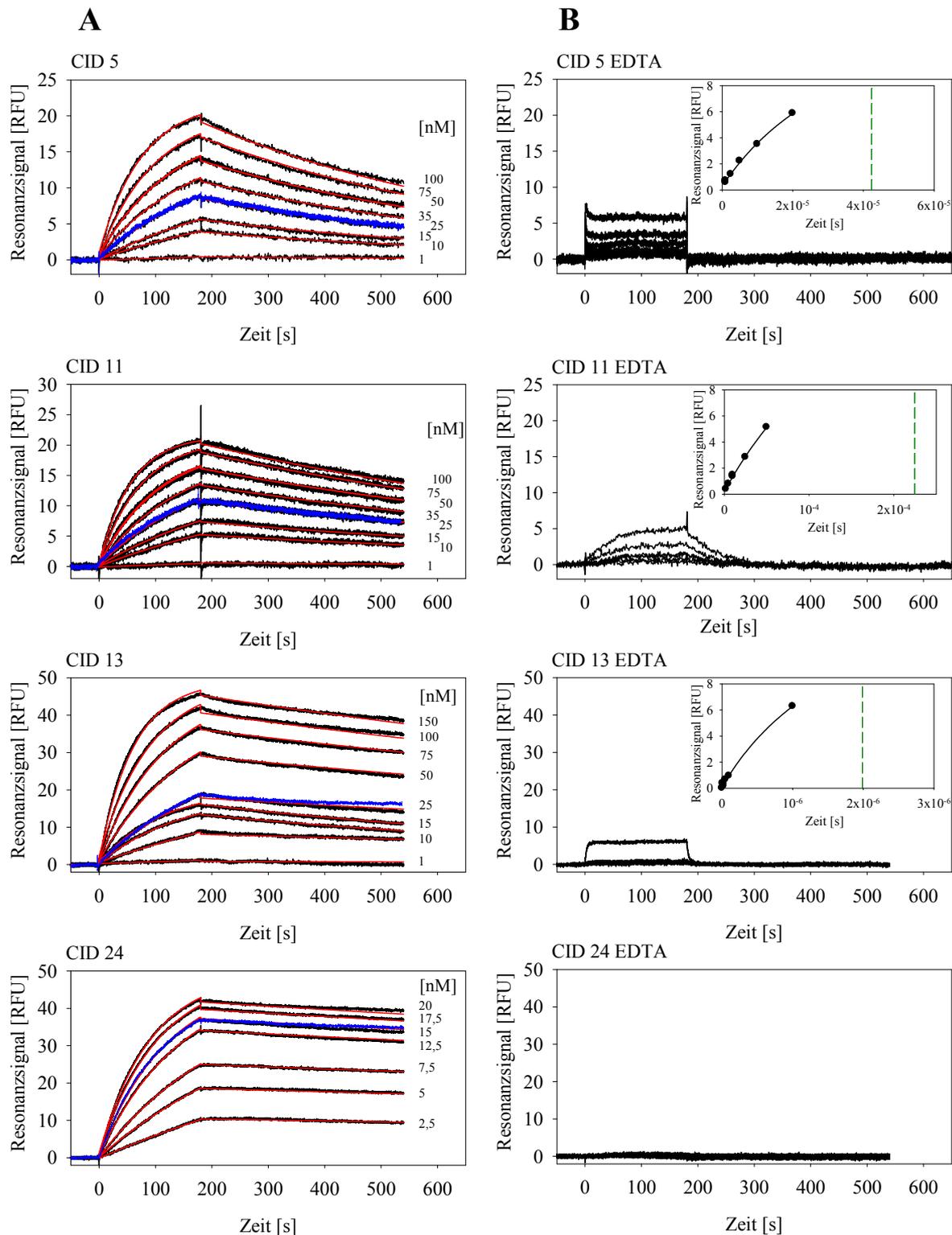


Abbildung 21: Sensorgramme der SPR-Analysen ausgesuchter sfGFP-bindender Protein S-Varianten in An- oder EDTA-vermittelter Abwesenheit von Ca²⁺

Verdünnungsreihen identischer Proben wurden in Anwesenheit von 10 mM Ca²⁺ (A) und in EDTA-vermittelter Abwesenheit freier Calciumionen (B) gemessen. Verwendete Proteinkonzentrationen wurden in Tabelle 25 zusammengefasst. Die Bestimmung kinetischer Parameter erfolgte für die Kurvenverläufe in Anwesenheit von Ca²⁺ (schwarz) durch die Approximation nach einem 1:1-Bindungsmodell mittels Biacore T100 *evaluation software* (rot). Zum Ende der Messzyklen wurden einzelne Konzentrationen des Interaktionspartners erneut gemessen (blau überlagert). Sofern möglich erfolgte die Auswertung Kurvenverläufe im calciumfreien Zustand über die *steady state* Methode (Bildeinschub). Die so geschätzte Affinität wurde als vertikale Linie gekennzeichnet.

Tabelle 29: Über SPR-Analysen ermittelte Affinitäten der Protein S-Varianten in An- und Abwesenheit von Ca^{2+}

CID	$K_{D, \text{Calcium}}$ [nM]	$K_{D, \text{EDTA}}$ [nM]	$k_a \text{ Ca}^{2+}$ [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	$k_d \text{ Ca}^{2+}$ [s^{-1}]
1	76,6*	n.m.	$1,1 \times 10^5$	$8,6 \times 10^{-3}$
5	15,3	n.e.*	$1,1 \times 10^5$	$1,7 \times 10^{-3}$
6 & 7		unspezifische Bindung		
8	78,6	n.m.	$9,1 \times 10^4$	$7,1 \times 10^{-3}$
10	8,8	n.m.	$1,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-3}$
11	6,6	n.e.*	$1,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-3}$
13	4,8	n.e.	$1,1 \times 10^5$	$5,1 \times 10^{-4}$
24	0,65	n.m.	$5,2 \times 10^5$	$3,4 \times 10^{-4}$
27	71,2*	n.m.	$4,7 \times 10^5$	$3,3 \times 10^{-2}$
30	19,9	n.e.	$1,4 \times 10^5$	$2,7 \times 10^{-3}$

* unspezifische Bindung an Referenzzelle

n.m. „nicht messbar“, n.e. „nicht auswertbar“

Die Daten in EDTA-vermittelter Abwesenheit von Ca^{2+} konnten nur qualitativ über die *steady state*-Methode ausgewertet werden. Für keine der Proteinvarianten verblieb eine quantitativ auswertbare Bindung im verwendeten Konzentrationsbereich. Für fünf Varianten (CID 1, 5, 6, 11, 27; siehe Tabelle 29) konnte über den Vergleich der Signale aus Mess- und Referenzzelle eine Tendenz zur unspezifischen Bindung nachgewiesen werden (Abbildung 22).

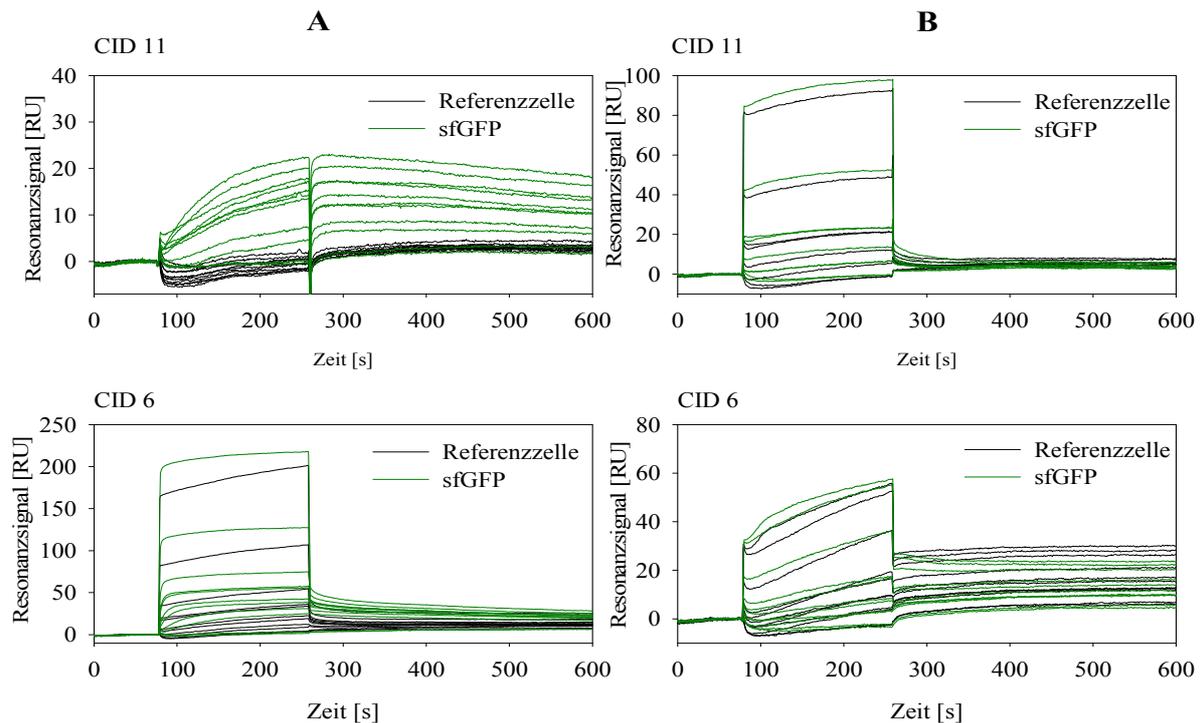


Abbildung 22: Sensorgramme von Mess- und Referenzzelle bei SPR-Analysen von zwei Varianten des Protein S.

Auf der Oberfläche der Messzelle (grüne Kurven) eines Streptavidin-Chips wurden vor Versuchsbeginn 130 RU biotinyliertes sfGFP gekoppelt. Die Referenzzelle (schwarz) wurde analog vorbereitet, jedoch nicht mit sfGFP beladen. (A) Messung von Konzentrationsreihen identischer Proben unterschiedlicher Protein S-Varianten in Anwesenheit von 10 mM Ca^{2+} (B) Messung von Konzentrationsreihen identischer Proben unterschiedlicher Protein S-Varianten unter analogen Bedingungen in Anwesenheit von 2 mM EDTA.

Es zeigten sich sowohl unspezifische Bindungen für einen der beiden Schaltungszustände (CID 11, Abbildung 22 oben), als auch Hintergrundsignale für beide Zustände (CID 6, Abbildung 22 unten).

4.6 Detaillierte Analysen der Protein S-Variante CID 24

Die Protein S-Variante mit dem besten Eigenschaftsprofil wurde für weitere Analysen verwendet. Die mit der laufenden Nummer CID 24 beschriebene Variante wurde zur Charakterisierung der molekularen Wirkungsweise, für Experimente zur Immobilisierung auf einer festen Träger-Matrix sowie für eine detaillierte Charakterisierungen der Interaktion mit sfGFP verwendet.

4.6.1 Untersuchungen zu molekularen Bindungsmechanismen

Zur Untersuchung des molekularen Bindungsmechanismus von CID 24 wurden Schlüsselemente einzeln zurück auf die dem Wildtyp-Protein entsprechende Sequenz geändert (Sequenzalignment siehe Abbildung A 9). Dies umfasste sowohl die drei Bereiche mit randomisierten Positionen (Module), als auch die zusätzliche Mutation der Variante CID 24 an Position N80 (Tabelle 30). Die Konstrukte wurden auf DNA-Ebene über eine PCR amplifiziert (3.2.4), über Restriktionsendonukleasen verdaut (3.2.1) und mit entsprechenden Fragmenten der Wildtyp-Sequenz ligiert (3.2.2). Die Konstrukte wurden in den pETAB6H-Expressionsvektor umklontiert (3.2.1, 3.2.2) und nach Verifizierung der Sequenzen (3.2.8) für die rekombinante Produktion der Proteinvarianten in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen verwendet (3.1.1.3, 3.1.1.4).

Die Konstrukte mit den fortlaufenden Nummern 40–44 wurden über eine Zweistufenreinigung an einer ÄKTApress gereinigt (3.4.2.1) und über Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (3.4.8) analysiert. Für die Messungen wurde ein Streptavidin-beschichteter Chip mit ~130 RU immobilisierten biotinylierten sfGFP verwendet. Alle Varianten zeigten im Vergleich zu der Ursprungsvariante CID 24 signifikant verschlechterte Bindungseigenschaften im Bereich von 10^{-6} M (Abbildung 23, Tabelle 30).

Tabelle 30: Übersicht der, über die *steady state*-Auswertung der Sensorgramme, erhaltenen Affinitäten in Gegenwart von Ca^{2+} und die verwendeten Konzentrationsbereiche der Messungen.

CID	Modul 1	Modul 4	Modul 5	Zusätzliche Austausch	K_D [nM]	Konzentrationsbereich der Messung [μM]
PS wt	YNEDQK	EEGPL	YKEK		/	n.a.
24	QQWQMA	EWWDV	RYQF	N80Y	0,65	0,002-0,02
40	QQWQMA	EWWDV	RYQF	/	690	0,05–30
41	YNEDQK	EWWDV	RYQF	N80Y	1180	0,5–50
42	QQWQMA	EEGPL	RYQF	/	n.e.*	1–60
43	QQWQMA	EEGPL	RYQF	N80Y	n.e.*	1–60
44	QQWQMA	EWWDV	YKEK	N80Y	n.e.*	0,1–1

* n.e. „not evaluable“: keine genaue Quantifizierung im Messbereich möglich

Die Affinitäten von drei Varianten (CID 42–44) konnten im Messbereich nicht genau quantifiziert werden und befanden sich in hohem μM-Bereich. Vergleichsmessungen mit der ursprünglichen Variante CID 24 ergaben reproduzierbare Ergebnisse zu den bereits in Abschnitt 4.5.2.2 gezeigten Sensorgrammen (Daten nicht gezeigt).

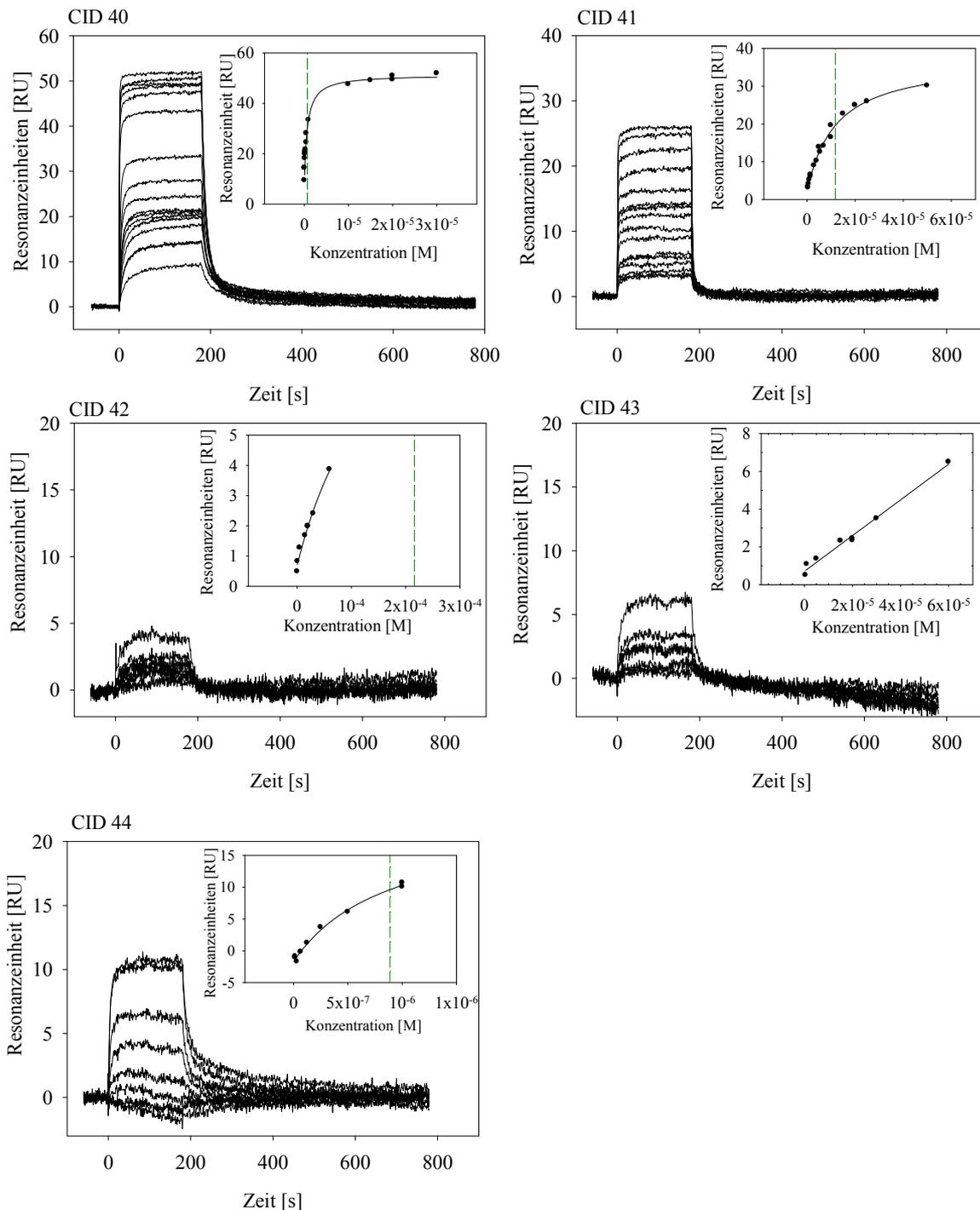


Abbildung 23: Sensorgramme der SPR-Analysen zur Untersuchung des molekularen Mechanismus der Bindung von Protein S-Variante CID 24 an sfGFP.

Auf der Oberfläche der Messzelle eines Streptavidin-Chips wurden vor Versuchsbeginn 130 RU biotinyliertes sfGFP gekoppelt. Serielle Verdünnungen der über IMAC und SEC gereinigten Proteinvarianten wurden in Anwesenheit von 10 mM Ca^{2+} gemessen. Die Auswertung der Kurvenverläufe erfolgte über die *steady state* Methode (Bildeinschub). Die so geschätzten Dissoziationskonstanten wurden als vertikale Linie gekennzeichnet.

Alle Module und auch die zusätzliche Mutation des Gerüstproteins waren für die Interaktion von CID 24 und sfGFP relevant. Bereits die Rückmutation der in der Ca^{2+} -Bindungsstelle gelegenen, zusätzlichen Mutation N80Y zur Wildtyp-Aminosäure Asparagin (Y80N, CID 40) resultierte in einer signifikant schwächeren Bindung der Größenordnung von 10^{-6} M. Einen ähnlichen Einfluss mit Bindungsaffinitäten im Bereich von 10^{-6} M ergab der Austausch der

Aminosäuren des ersten Modules (Abbildung 23, CID 41) zu den Wildtyp-entsprechenden Aminosäuren unter Beibehaltung des Zusatzaustausches N80Y (CID 41). Bei Rückmutation des vierten Modules konnte weder für Variante 80Y (CID 42) noch für Variante 80N (CID 43) eine signifikante Affinität der Bindungspartner zu sfGFP ermittelt werden. Der Austausch des fünften Modules (CID 44) führte ebenfalls zu einer im Vergleich zu der Ausgangsvariante signifikant schwächeren Bindung der Zielstruktur im Bereich von 10^{-6} M. Obgleich alle Module sowie auch die zusätzliche Mutation an Position N80 an der Bindung von sfGFP beteiligt waren, so konnte für Modul 4 der größte Einfluss auf die Bindung ermittelt werden.

Die Messungen der Varianten wurden mit identischen Proben in EDTA-vermittelter Abwesenheit von Ca^{2+} durchgeführt, ergaben jedoch keine auswertbaren Signale (Daten nicht gezeigt). Da alle untersuchten Varianten schlechtere Bindungseigenschaften als die aus den Durchmusterungen erhaltene Variante CID 24 aufwiesen wurden sie in keinen weiteren Experimenten verwendet.

4.6.2 Ca^{2+} -Abhängigkeit eines molekularen Schalters basierend auf Protein S CID 24

Es konnte für Variante CID 24 bereits gezeigt werden, dass gebundenes sfGFP durch die Entfernung von Ca^{2+} aus dem Puffersystem von der Variante eluiert werden kann (Abbildung 18). Um diesen Mechanismus genauer zu untersuchen, wurde eine SPR-Messung durchgeführt. Es wurde eine 100 nM Lösung des Proteins CID 24 in HBSCT-Puffer mit einem Fluss von $10 \mu\text{l}/\text{min}$ auf einen mit 150 RU sfGFP beladenen SA-Chip (3.4.8) geleitet (Abbildung 24, Abschnitt II) und für 160 s in Anwesenheit von Ca^{2+} dissoziiert (Abbildung 24, Abschnitt III). Durch die Injektion von HBSE-Puffer auf den Chip (Abbildung 24, Pfeil) wurde dem System vorhandene Ca^{2+} entzogen und gebundenes Protein dissoziiert (Abbildung 24, Abschnitt IV). Als Referenz der Messung wurde eine analog vorbereitete Flusszelle ohne immobilisiertes sfGFP verwendet.

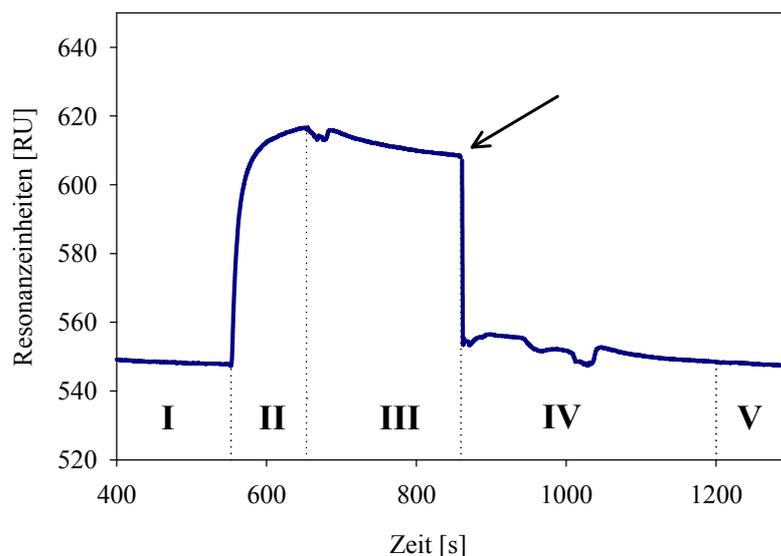


Abbildung 24: Ermittlung der Ca^{2+} -Abhängigkeit des molekularen Schalters CID 24 über SPR

Zur Assoziation von CID 24 an eine mit 150 RU biotiniertem sfGFP beladene Flusszelle eines Streptavidin-Chips wurde eine 100 nM Lösung in HBSCT mit einem Fluss von $10 \mu\text{l}/\text{min}$ über den Chip gegeben (Abschnitt II). Nach Assoziation wurde der Chip mit $10 \mu\text{l}/\text{min}$ HBSCT gespült (Abschnitt III). Die Dissoziation der Komplexe erfolgte über die Injektion von $100 \mu\text{l}$ eines 5 mM EDTA-haltigen Puffers (HBSE) mit $10 \mu\text{l}/\text{min}$ (Abschnitt IV). Der Injektionsstart wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet. Nach erfolgter Dissoziation der Komplexe wurde der Chip erneut mit HBSC bei einer Flussrate von $10 \mu\text{l}/\text{min}$ äquilibriert (Abschnitt V).

Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Komplexbildung der Interaktionspartner in Abhängigkeit von Ca^{2+} erfolgt (4.5.2.2), sondern auch dass bereits assemblierte Komplexe durch die Entfernung von Ca^{2+} dissoziiert werden können. Der zugrunde liegende Bindungsmechanismus der Proteinvariante CID 24 ist vollständig reversibel und der Schaltungszustand des Liganden konnte repetitiv geändert werden (Daten nicht gezeigt). Durch die nahezu identische Basislinie nach erneuter Äquilibration des Systems mit 2 CV HBSC bei 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ konnte nachgewiesen werden, dass der Komplex vollständig durch die Chelation der Ca^{2+} dissoziiert werden kann. Der Schaltvorgang über die Chelatierung des Ca^{2+} führt bei dieser Interaktion zu einer sofortigen Freisetzung des Interaktionspartners sfGFP und verlief nicht in Abhängigkeit der Gleichgewichtsreaktion des Komplexes zwischen Protein und Ca^{2+} . Die Ergebnisse korrelieren mit vorangegangenen ELISA-Experimenten, in welchen keine Bindung der Proteinvariante in EDTA-vermittelter Abwesenheit von Ca^{2+} nachgewiesen werden konnte (Abbildung 20, Abbildung 21).

4.6.3 Bindungsanalysen mit immobilisierter Protein S-Variante

Eine Grundvoraussetzung zur Verwendung der Proteinvariante CID 24 als Ligand einer affinitätschromatographischen Reinigung ist der Erhalt der Schaltungsfunktion bei Immobilisierung des Proteins an eine feste Träger-Matrix. In allen vorangegangenen Experimenten wurde die Proteinvariante in Lösung eingesetzt (4.3.2, 4.5.2.1, 4.5.2.2, 4.6.2). Zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens der an einer stationären Phase gekoppelten Variante CID 24, wurden 150 RU des Proteins über NHS-Chemie auf einem CM5-Chip immobilisiert (3.4.8). Über die Messung einer Kurvenschar verschiedener Konzentrationen von gereinigtem sfGFP (3.4.2.2) in Lösung konnte eine leicht geringere Bindungsstärke im Vergleich der mit immobilisierten sfGFP ermittelten Affinität bestimmt werden (4.5.2.2, Abbildung 25 A). Zur Regeneration zwischen den einzelnen Zyklen wurde ein EDTA-Waschschritt verwendet (3.4.8), da die vollständige Dissoziation des Komplexes bereits gezeigt werden konnte (4.6.2).

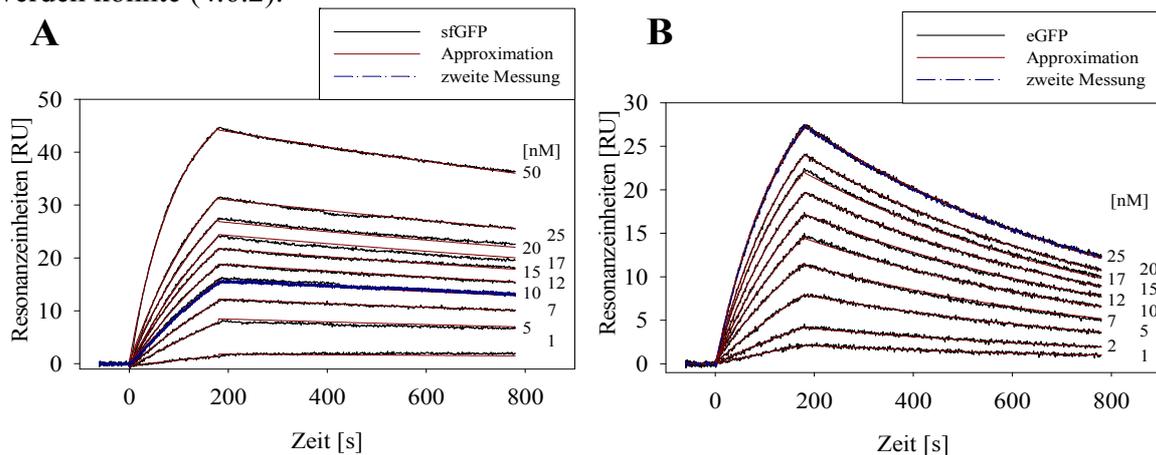


Abbildung 25: Kinetische Bindungsanalyse von sfGFP und eGFP an Protein S-Variante CID 24 über Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie.

Es wurden 150 RU der Protein S-Variante CID 24 über NHS-Chemie auf einem CM5-Chip immobilisiert. Die Messungen der Kurvenscharen (1; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17; 20; 25; 50 nM) von sfGFP (A) und eGFP (B) erfolgten in HBSC-T-Puffer pH 7,4 (schwarz). Die Bestimmung kinetischer Parameter erfolgte durch die Approximation nach einem 1:1-Bindungsmodell mittels Biacore T100 *evaluation software* (rot). Die Regeneration zwischen den Zyklen wurde über die Titration des freien Ca^{2+} durch die Injektion von HBSE-Puffer erreicht. Zum Ende der Messzyklen wurden einzelne Konzentrationen des Interaktionspartners erneut gemessen (blau überlagert).

Unter analogen Bedingungen wurde ein der Zielstruktur sfGFP nahe verwandtes Protein analysiert, das *enhanced* GFP (eGFP, Abbildung 25 B). Es konnte gezeigt werden, dass auch dieses Protein von der Variante CID 24 erkannt und Ca^{2+} -abhängig gebunden werden kann. Die gemessenen Affinitäten sind in der gleichen Größenordnung wie die ermittelte Affinität der Variante CID 24 zu sfGFP (Tabelle 31), zeigt jedoch eine geringfügig veränderte Bindungskinetik der Interaktion.

Tabelle 31: Über SPR-Analysen ermittelte kinetische Parameter der Bindung von sfGFP und eGFP an die immobilisierte Protein S-Variante CID 24

	$K_{D,\text{Calcium}}$ [nM]	$k_a \text{ Ca}^{2+}$ [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	$k_d \text{ Ca}^{2+}$ [s^{-1}]
sfGFP	1,7	2×10^5	$3,3 \times 10^{-4}$
eGFP	5,0	3×10^5	$1,5 \times 10^{-3}$

4.6.4 Thermodynamische Messungen

Zur Charakterisierung der Bindung zwischen der Protein S-Variante CID 24 und sfGFP wurden thermodynamische Untersuchungen über Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie durchgeführt (Abbildung 26). Die Messungen erfolgten mit immobilisierter Variante CID 24 auf einem CM5-Chip (3.4.8). Es wurden Verdünnungsreihen von 10 Konzentrationen zwischen 2,5 und 50 nM sfGFP für sechs Messungen über einen Temperaturbereich von 30 K (5–35°C) verwendet. Die Ermittlung thermodynamischer Parameter erfolgte über die van't Hoff Darstellung $\ln(K_D)$ über $1/T$ mittels der Biacore T100 „*evaluation software*“ (vgl. 3.4.8).

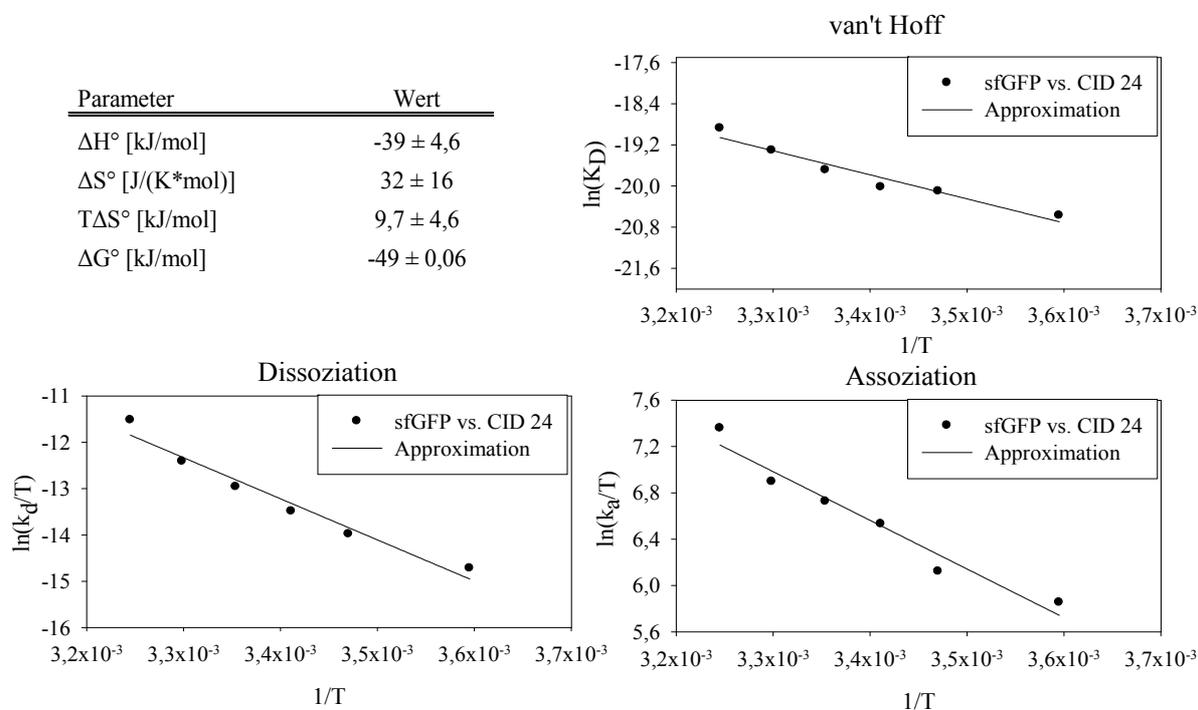


Abbildung 26: Thermodynamische Messungen der Bindung zwischen sfGFP und Protein S-Variante 24 mittels SPR. Für die Analyse wurde ein CM5-Chip mit 150 RU immobilisierter Protein S-Variante CID 24 verwendet. Die Messungen der Kurvenscharen von 2,5–50 nM sfGFP erfolgten in HBST-Puffer pH 7,4. Die Regeneration zwischen den Zyklen erfolgte über die Titration freien Ca^{2+} durch die Injektion von HBSE-Puffer pH 7,4. Es wurden sechs Messungen in einem Temperaturbereich von 5–35 °C durchgeführt. Die Auswertung kinetischer und thermodynamischer Parameter erfolgte über die Biacore T100 Software.

Die Messung ergab eine vornehmlich enthalpisch getriebene, exotherme Bindung mit einer freien Bindungsenergie von $\Delta G^0 = -49 \pm 0,06$ kJ/mol und entspricht einer Wechselwirkung mit einer Affinität von ca. 1 nM.

4.6.5 Stöchiometrie und Ca^{2+} -Abhängigkeit der Komplexbildung von CID 24 und sfGFP

Für die Abschätzung der Stöchiometrie (Abbildung 27 A) und die Abhängigkeit der Interaktion von Ca^{2+} (Abbildung 27 B) der Protein S-Variante CID 24 und sfGFP wurden Gleichgewichtssedimentationen an einer Ultrazentrifuge durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine identische Proteinprobe in EDTA-vermittelter Abwesenheit von Ca^{2+} mitgeführt (Abbildung 27, rot). Die Detektion erfolgte über die intrinsische Fluoreszenz des sfGFP bei 485 nm.

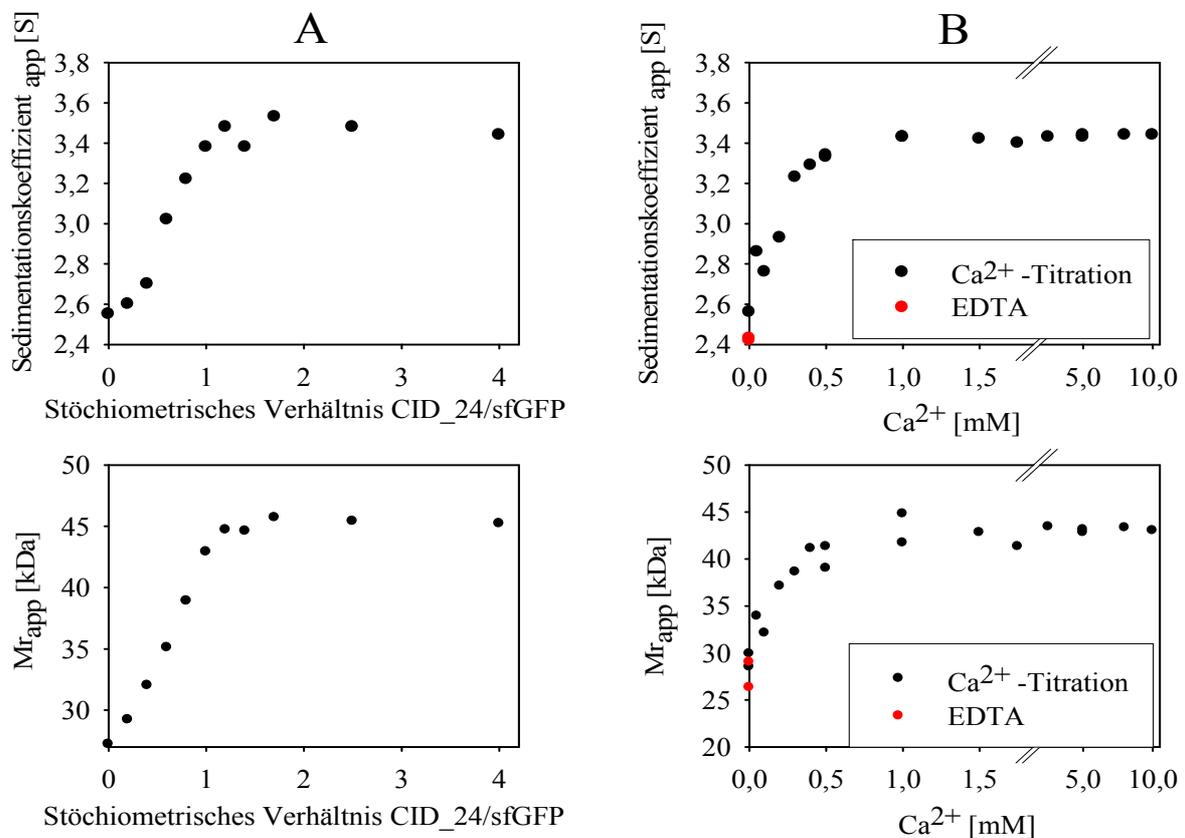


Abbildung 27: Ultrazentrifugationsexperimente des Komplexes zwischen sfGFP und PS CID 24

(A) Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit und des apparenten Molekulargewichtes bei der Komplexbildung von Protein S-Variante CID 24 mit sfGFP mittels analytischer Ultrazentrifugation. Die Messungen wurden bei 40.000 rpm durchgeführt. Für die Experimente wurden zu 1 μM sfGFP die Protein S-Variante 24 mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen zugegeben (0-4 μM). (B) Titrationsexperimente zur Bestimmung der Ca^{2+} -Abhängigkeit der Bindung von Protein CID 24 an sfGFP. Für die Messungen wurden äquimolare Mengen von 1 μM Protein S CID 24 und sfGFP in HBS-Puffer eingesetzt und mit unterschiedlichen Konzentrationen von 0–10 mM Ca^{2+} versetzt.

Die Messungen ergaben in guter Näherung eine 1:1 Stöchiometrie der Bindung und in guter Korrelation zu dem theoretischen Molekulargewicht von 46,8 kDa eine Komplexgröße von etwa 45 kDa. Die Interaktion erfolgte wie erwartet in Abhängigkeit von Ca^{2+} , wobei bereits Konzentrationen von 0,5–1 mM Ca^{2+} ausreichten, um hauptsächlich als Proteinkomplexe vorliegende Interaktionspartner zu erhalten.

4.7 Einsatz des schaltbaren Bindeproteins CID 24 als Ligand zur Affinitätschromatographischen Reinigung von sfGFP

Das schaltbare Bindeprotein CID 24 zeigte in den vorangegangenen Experimenten ein Eigenschaftsprofil, welches den Anforderungen für den Einsatz als Ca^{2+} -sensitiver Ligand einer Affinitätschromatographie sehr gut entspricht. Neben einer spezifischen und in starkem Maße Ca^{2+} -abhängigen Bindung der Zielstruktur sfGFP konnte die Variante auch nach erfolgter Immobilisierung über NHS-Chemie verwendet werden. Für die Entwicklung eines neuartigen Reinigungsverfahrens sollten für die Proteinvariante CID 24 Kopplungsmöglichkeiten auf Säulenmatrices und die Charakteristika entsprechend funktionalisierter und Ca^{2+} -sensitiver Affinitätschromatographiesäulen untersucht werden.

4.7.1 Immobilisierung und Etablierung eines Reinigungsprotokolls auf Basis der Protein S-Variante CID 24

Zur Untersuchung der Verwendbarkeit des neuartigen Bindeproteins CID 24 als Ligand für eine Affinitätschromatographie wurden 12,6 mg der Protein S-Variante über NHS-Chemie auf der Oberfläche einer Säulenmatrix immobilisiert (3.4.6). Nach erfolgter Kopplung des Bindeproteins CID 24 wurde die 1 ml-Säule in einem ÄKTAexplorer-System bei 4 °C mit einem Fluss von 1 ml/min verwendet. Die funktionalisierte Säule wurde zunächst mit 2 CV HBSC-Puffer äquilibriert, um die Verfügbarkeit von Ca^{2+} zu gewährleisten. Das zuvor tag-frei produzierte und über ein zweistufiges Verfahren mit finaler Größenausschlusschromatographie gereinigte sfGFP (3.4.2.2) wurde in HBSC-Puffer verdünnt und 500 µg in einem Volumen von 1 ml auf die Säule aufgetragen (Abbildung 28, Abschnitt I).

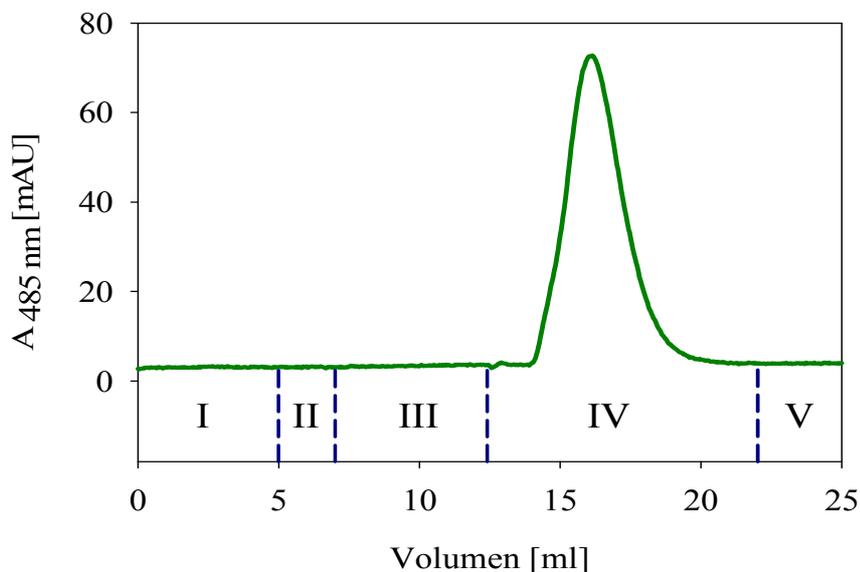


Abbildung 28: Einsatz der Protein S-Variante CID 24 als neuartiger Ligand in einer Affinitätschromatographie. Nach Immobilisierung der Protein S-Variante CID 24 auf einer 1 ml-NHS-aktivierten Säule wurde die Bindung von sfGFP in Abhängigkeit von verfügbaren Ca^{2+} untersucht. Die Messungen erfolgten bei 4 °C an einer ÄKTAexplorer mit einer Flussrate von 1 ml/min. Die Säule wurde mit 0,5 mg/ml sfGFP in 1 ml HBSC pH 7,4 über 5 CV beladen (I) und mit 2 CV HBSC gewaschen (II). Es folgte ein Waschschritt mit verringerter Ca^{2+} -Konzentration von 10 auf 3 mM (III). Die Elution des Zielproteins erfolgte über die Komplexbildung freier Ca^{2+} durch den Pufferwechsel von HBSC3 auf HBSE pH 7,4 (IV). Nach erfolgter Reequilibration (V) des Systems konnte die Säule erneut für die Bindung von sfGFP verwendet werden.

Es folgten zwei Waschschrte mit 2 CV HBSC (10 mM Ca^{2+} , Abschnitt II) und mit 5 CV HBSC3 (HBS + 3 mM CaCl_2 , Abschnitt III). Es konnte im Zuge der Beladung der Säule mit sfGFP und während der durchgeführten Waschschrte mit HBSC und HBSC3 kein sfGFP im Durchfluss über die Messung der $A_{485\text{nm}}$ detektiert werden. Die Elution des Zielproteins erfolgte über die Chelatierung von Ca^{2+} durch den Pufferwechsel auf HBSE (20 mM EDTA, Abschnitt IV) in einem einzelnen Elutionspeak. Die Auswertung der Peak-Geometrie nach IUPAC-Vorgaben ergibt einen *tailing*-Koeffizienten von $T = 1,22$ (Nic *et al.* 2006). Die Säule wurde nach erfolgter Elution der Zielstruktur erneut äquibriert (Abschnitt V) und konnte erneut für die Bindung von sfGFP verwendet werden.

Es konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass die Protein S-Variante CID 24 funktional über NHS-Chemie immobilisiert werden konnte. Die erhaltenen Daten zeigen, dass auch auf der Oberfläche der Säulenmatrix die für die Bindung der Zielstruktur notwendige native Faltung des Protein S CID 24 als auch die Ca^{2+} -abhängigen Konformationsunterschiede für die Generierung einer schaltbaren Bindung realisiert werden konnten. Die funktionalisierte Säule zeigte ein leichtes *tailing* bei der Elution des Zielproteins und wurde im Folgenden für weitere Charakterisierungsschrte verwendet.

4.7.2 Kapazitätsbestimmung bei Verwendung des Ca^{2+} - schaltbaren Bindeproteins CID 24 als Ligand einer Affinitätschromatographie

Zur Einschätzung der Kopplungseffizienz funktional immobilisierter Variante CID 24 wurde die dynamische Bindungseffizienz der Säule ermittelt (3.4.2.3). Es wurde bis zum Erreichen der Sättigung 0,5 mg/ml sfGFP in HBSC-Puffer mit einer Flussrate von 0,5 ml/min über die Säule gegeben (Abbildung 29 A).

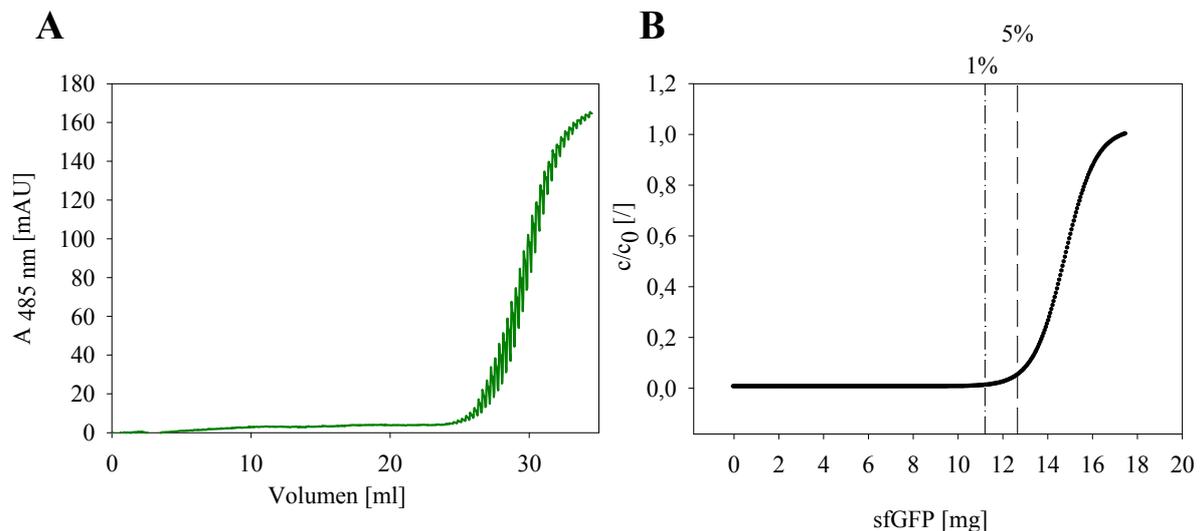


Abbildung 29: Abschätzung der dynamischen Bindungskapazität einer mit Protein S CID 24 funktionalisierten NHS-Säule.

(A) Zur Ermittlung der dynamischen Kapazität wurden 0,5 mg/ml sfGFP in HBSC bis zur Sättigung mit einem Fluss von 0,5 ml/min über eine mit CID 24 immobilisierte Säule geleitet. (B) Berechnung der dynamischen Bindungskapazität der Protein S CID 24-Säule über die Methode des dynamischen Durchbruches. Die ermittelten dynamischen Kapazitäten für 1% bzw. 5% des Durchbruches wurden als vertikale Linien dargestellt.

Die dynamische Bindungskapazität wurde über die Berechnung der Durchbruchkurve (3.4.2.3) ermittelt. Auf Grundlage eines 5%igen Durchbruchs wurde die dynamische Bindungskapazität der Protein S-Säule mit 12,6 mg sfGFP bestimmt (Abbildung 29 B). Unter der Annahme einer 1:1 Bindungsstöchiometrie (Abbildung 27) lag die Kopplungseffizienz von nativ und funktional immobilisierter Protein S-Variante CID 24 damit rechnerisch bei 76,5%.

4.7.3 Elutionsprofil bei Verwendung des Ca^{2+} -schaltbaren Bindeproteins CID 24 als Ligand einer Affinitätschromatographie

Zur Untersuchung des Elutionsprofils wurde eine mit sfGFP gesättigte CID 24-funktionalisierte Säule mit einem ÄKTExpress-System bei 4 °C und einem Fluss von 1 ml/min verwendet. Die Elution erfolgte über den Wechsel des Puffersystems von HBSC auf HBSE (Abbildung 30 A).

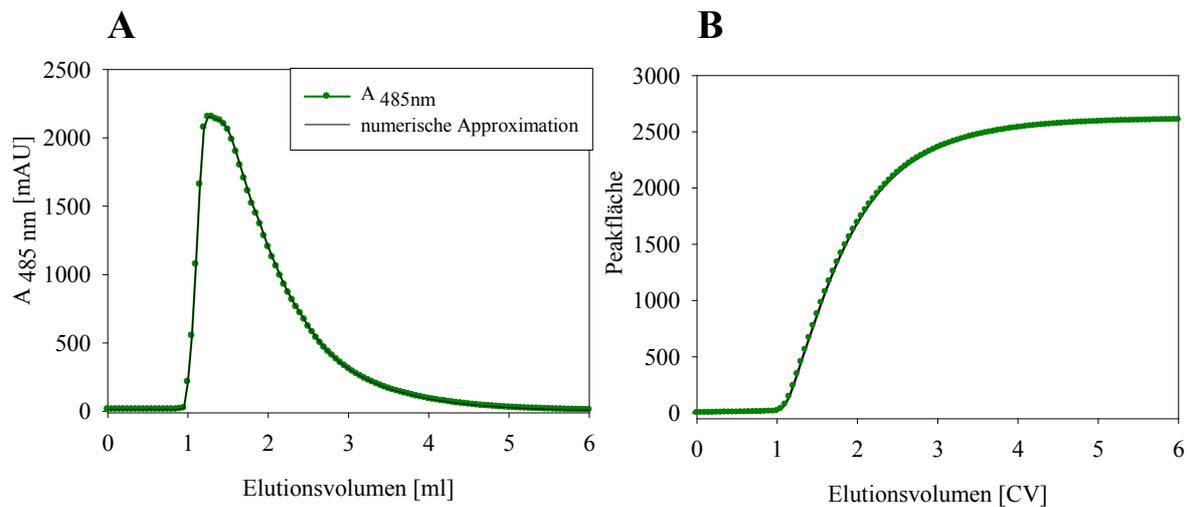


Abbildung 30: Elutionsprofil bei EDTA-Elution einer sfGFP gesättigten CID 24-Chromatographiesäule. (A) Die Elution einer mit sfGFP gesättigten Protein S CID 24-Säule erfolgte durch den Pufferwechsel von HBSC zu HBSE. Die Säule wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min gespült. (B) Integral der Fläche unter der numerischen Approximation bei Elution von sfGFP von einer gesättigten mit Protein S CID 24 funktionalisierten Säule.

Die Elution des Zielproteins erfolgte als Peak mit einem vergleichbaren *tailing*, wie bereits mit geringeren Mengen an gebundenem sfGFP beobachtet wurde (Abbildung 30A, Abschnitt 4.7.1). Die numerische Integration des Peaks im Anschluss an das Totvolumen von 1 ml (Abbildung 30 B) ergab einen Anteil von 65% des Zielproteins im ersten Säulenvolumen der Elution (>91% in 2 CV und 98% in 3 CV).

4.7.4 Capturing von sfGFP aus einer verdünnten Lösung

Zur Isolierung einer mit geringer Konzentration vorliegenden Zielstruktur aus Lösungen werden hohe Affinitäten der chromatographischen Liganden benötigt. Die mit Proteinvariante CID 24 funktionalisierte Säule wurde für ein *capturing* von sfGFP in verdünnter Lösung verwendet (3.4.2.3). Eingesetzt wurde für diesen Versuch 1 mg sfGFP in 750 ml HBSC ($\frac{1}{750} \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \approx 50 \text{ nM}$), zur Verminderung von Verlusten durch unspezifische Bindung an die

verwendeten Materialien enthielt der Puffer 0,1 mg/ml BSA. Die eingesetzte Konzentration an sfGFP war ca. 30fach über dem ermittelten KD-Wert von 1,7 nM bei immobilisiert verwendeter Variante CID 24 (4.6.3). Über die Messung der Absorption bei 485 nm und 280 nm konnte gezeigt werden, dass die Zielstruktur sfGFP erst mit dem Pufferwechsel auf HBSE nach erfolgtem Auftrag eluiert wurde, während BSA kontinuierlich im Durchfluss zu finden war (Abbildung 31).

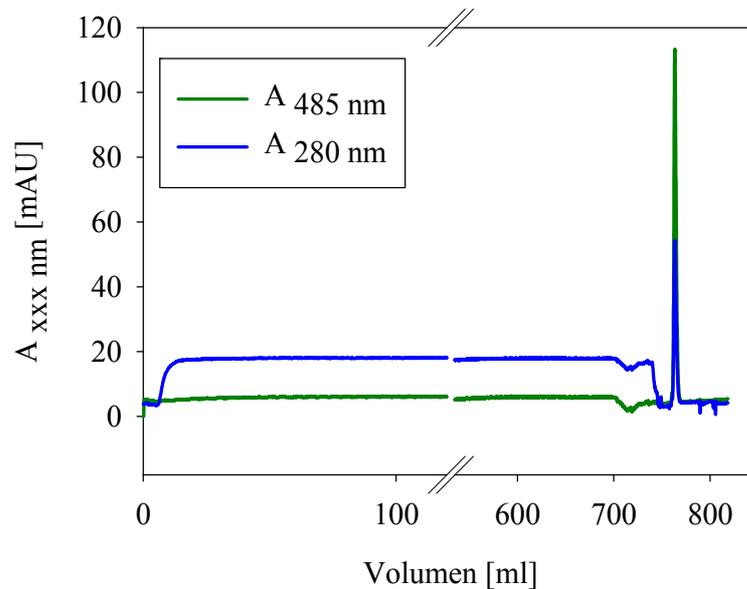


Abbildung 31: Isolierung von sfGFP aus Lösung mit hoher Verdünnung über den Liganden CID 24.

Es wurden 750 ml HBSC-Puffer (+0,1 mg/ml BSA) mit 1 mg sfGFP versetzt und auf die mit der PS-Variante CID 24 funktionalisierten Säule aufgetragen. Die Messungen erfolgten bei 4 °C an einer ÄKTAexplorer mit einer Flussrate von 1 ml/min. Die Elution (Pfeil) erfolgte durch die Chelatierung von Ca^{2+} durch einen Pufferwechsel von HBSC auf HBSE bei einem Fluss von 1 ml/min.

Die Integration der erhaltenen Peakfläche bei Elution des sfGFP mittels HBSE erfolgte über die Unicorn-Software (ÄKTAexplorer). Die berechnete Peakfläche der Reinigung von 1 mg sfGFP aus 750 ml HBSC (+0,1 mg/ml BSA) ergab vergleichbare Werte ($\text{Peak}_{750\text{ ml}} = 324 \text{ [mAU}\cdot\text{ml]}$) wie eine Referenzmessung bei Reinigung von 1 mg sfGFP aus 1 ml HBSC ($\text{Peak}_{1\text{ ml}} = 337 \text{ [mAU}\cdot\text{ml]}$) (Daten nicht gezeigt). Rechnerisch lag die Ausbeute bei der Isolierung der Zielstruktur sfGFP aus einer Lösung mit einer Konzentration von ca. 50 nM damit bei 96,1%.

4.7.5 Reinigung von sfGFP aus Lysaten

Zur Isolierung von sfGFP aus komplexen Gemischen über das immobilisierte Bindeprotein CID 24 wurden Lysate typischer Produktionsstämme (*E. coli* BL21(DE3) und *CHO*) hergestellt und mit 0,5 mg sfGFP versetzt (3.4.2.3). Die optische Dichte des aufgetragenen *E. coli*-Lysates betrug $\text{OD}_{600} \approx 65$, für die Herstellung des *CHO*-Lysates wurden ca. 20,8 Millionen Zellen verwendet. Nach Probenauftrag und Waschschritten der Säule unter Beibehaltung der Verfügbarkeit von Ca^{2+} wurde das Zielprotein durch die Zugabe von EDTA eluiert (3.4.2.3, Abbildung 32).

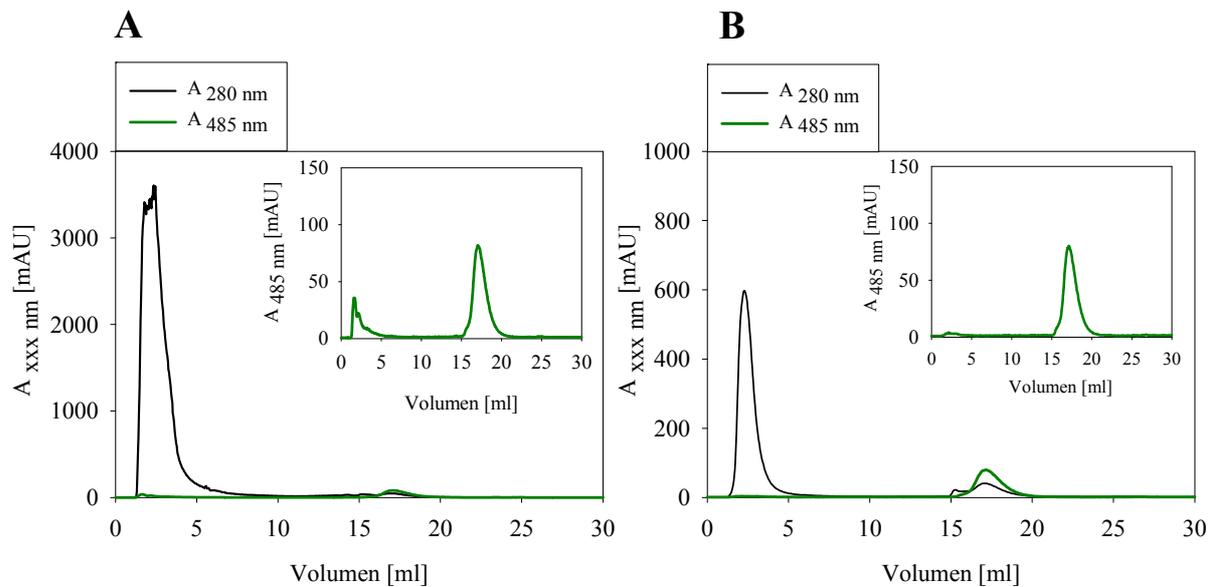


Abbildung 32: Verwendung von Protein S CID 24 als neuartiger Liganden für die Affinitätschromatographie von sfGFP.

Es wurden 0,5 mg sfGFP zu präparierten *E. coli* BL21(DE3) oder *CHO*-Extrakten zugegeben und über eine 1-ml Säule mit über NHS-Chemie immobilisierter Protein S-Variante CID 24 gereinigt. Der Probenauftrag sowie die Waschschritte erfolgten unter Verfügbarkeit von 10 mM Ca^{2+} . Durch die Chelatierung von Ca^{2+} durch EDTA konnte die zuvor gebundene Zielstruktur sfGFP von der Säule eluiert werden (kleines Bild). **(A)** Reinigung von 0,5 mg sfGFP aus Lysaten einer *E. coli* BL21(DE3)-Kultur (finale $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 65$). **(B)** Reinigung von 0,5 mg sfGFP aus Lysaten einer *CHO*-K1 Kultur ($\sim 20,8 \times 10^6$ Zellen).

Die Trennung der Zielstruktur sfGFP aus komplexen Gemischen endogener Proteine typischer Produktionssysteme konnte erfolgreich unter Verwendung des neuartigen, auf Protein S-basierenden Liganden durchgeführt werden. Die Integration der Peak-Flächen ergab eine Ausbeute von 90,4% sfGFP in der Elutionsfraktion bei Verwendung von *E. coli*-Lysaten und von 98,5% bei Verwendung von Lysaten einer *CHO*-K1 Kultur. Die aus diesem Experiment erhaltenen Reinigungsfractionen der Affinitätschromatographie wurden über SDS-PAGE analysiert (Abbildung 33).

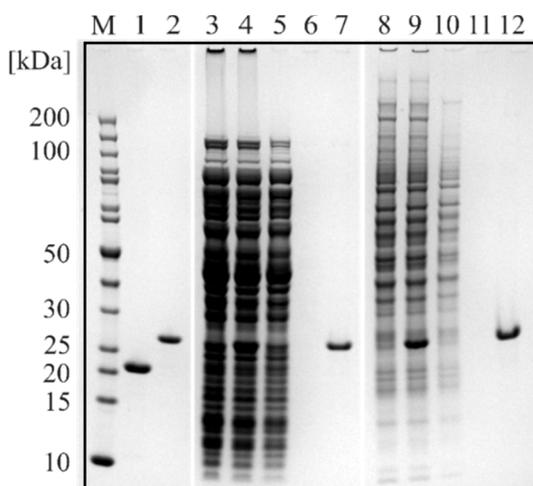


Abbildung 33: SDS-PAGE-Analyse der Reinigungsfractionen bei Verwendung des neuartigen Bindeproteins CID 24 als Ligand zur affinitätschromatographischen Reinigung von sfGFP. Die Proben wurden über 4–12% Gradientengele getrennt und mittels Coomassie-Färbung visualisiert.

M: Molekulargewichtsmarker *PageRuler Unstained Protein Ladder* Spur 1: 2 μg Protein S CID 24, Spur 2: 1 μg sfGFP, Spur 3: Lysat *E. coli*, Spur 4: Lysat aus *E. coli* mit 1 mg/ml sfGFP, Spur 5: Durchflussfraktion *E. coli*, Spur 6: Waschfraktion, Spur 7: Elutionsfraktion bei Reinigung aus *E. coli*-Zellextrakt, Spur 8: Lysat *CHO*-Zellen, Spur 9: Lysat *CHO*-Zellen mit 1 mg/ml sfGFP, Spur 10: Durchflussfraktion *CHO*, Spur 11: Waschfraktion *CHO*, Spur 12: Elutionsfraktion bei Reinigung aus *CHO*-Zellextrakt.

Es konnten in den über SDS-PAGE analysierten Proben der Elutionsfraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung keine Protein-basierten Verunreinigungen der eingesetzten *E. coli*- und *CHO*-Lysate detektiert werden.

Die mit Protein S-Variante CID 24 funktionalisierte Säule konnte ohne Regeneration nach einer Äquilibration mit 5 CV HBSC-Puffer wiederholt für Reinigungen verwendet werden. Die Überlagerung der Elutionsprofile bei Reinigung von 1 mg sfGFP aus HBSC-Puffer vor und nach Lysaten aus *E. coli* BL21(DE3) ($OD_{600} = 10$) und *CHO* ($\sim 5 \times 10^6$ Zellen) ergab vergleichbare Kurvenverläufe (Abbildung 34). Die Integration der Peak-Flächen der Chromatogramme ergab eine rechnerische Ausbeute von $>95\%$ sfGFP für die Reinigung aus Lysaten und aus HBSC-Puffer.

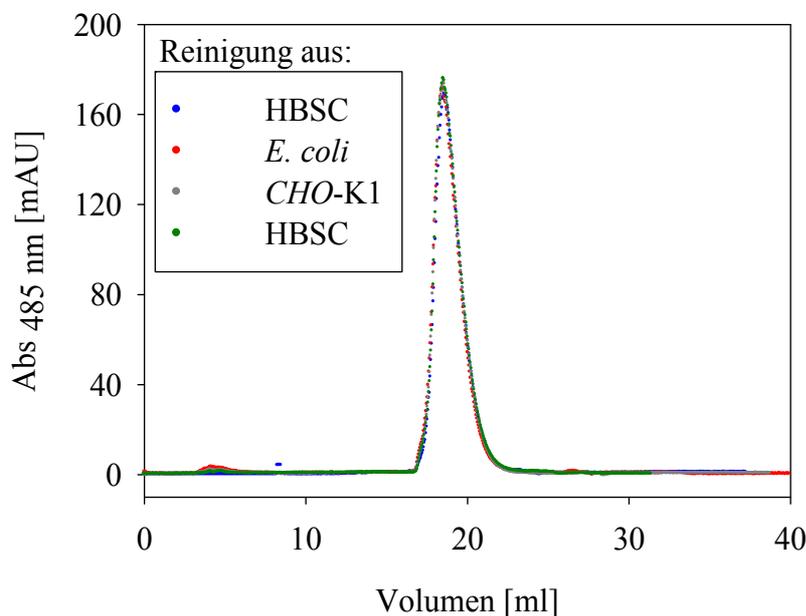


Abbildung 34: Reproduzierbarkeit der Elutionsprofile bei Verwendung des neuartigen Bindeproteins CID 24 als Ligand einer Immunoaffinitätschromatographie zur Reinigung von sfGFP

Es wurden in jedem Reinigungszyklus 1 mg sfGFP aus 1 ml HBSC oder Lysaten von *E. coli* BL21(DE3) ($OD_{600} = 10$) und *CHO-K1* Zellen ($\sim 5 \times 10^6$ Zellen) gereinigt. Der Probenauftrag, sowie die Waschschritte erfolgten unter Verfügbarkeit von 10 mM Ca^{2+} . Die Elution des Zielkonstruktes sfGFP erfolgte durch die Chelatierung des vorhandenen Ca^{2+} über den Pufferwechsel von HBSC auf HBSE.

Das neuartige Bindeprotein CID 24 konnte erfolgreich immobilisiert und für die affinitätschromatographische Reinigung der Zielstruktur sfGFP verwendet werden. Die erhaltenen Daten zeigen, dass ein spezifisches *capturing* der Zielstruktur mit hoher Affinität und ohne Inkubationszeiten realisiert werden kann. Die Ca^{2+} -sensitive Desorption des gebundenen Zielproteins konnte reproduzierbar durch die Chelatierung von Ca^{2+} mit hohen Ausbeuten erfolgen.

5. Diskussion

Die hohe Selektivität und Affinität der Bindung von Antikörpern zu ihren entsprechenden Antigenen führte zu der Entwicklung von vielfältigen Anwendungen sowohl in Therapie, Diagnostik und in technischen Applikationen. Obgleich der komplexe Aufbau von Antikörpern bei therapeutischen Anwendungen für die Vermittlung von Effektorfunktionen des Immunsystems eine große Rolle spielen kann, limitiert diese Komplexität oftmals andere Einsatzgebiete. Dies führte zu dem Einsatz von Antikörperfragmenten (Beckman *et al.* 2007), die jedoch eine geringere Stabilität aufweisen (Holliger und Hudson 2005). Insbesondere bei technischen Applikationen, wie etwa dem Einsatz als Liganden in Affinitätschromatographien, sind Antikörper-basierte Systeme trotz großer Vorteile gegenüber konventionellen Reinigungsmethoden in ihrem Einsatz limitiert.

Die hohen Produktionskosten der vergleichsweise komplex aufgebauten Antikörper sind für einen technischen Einsatz von Nachteil, da gerade hier der Kostendruck eine übergeordnete Rolle spielt und zudem keine Effektorfunktion benötigt wird. Durch den Einsatz von polyklonal hergestellten Antikörpern lassen sich zwar die Produktionskosten senken, jedoch erhält man ein heterogenes Gemisch und höhere chargenabhängige Varianzen. Dies verringert die Reproduzierbarkeit von Reinigungsstrategien und kann eine jeweilige Anpassung der Prozessparameter notwendig machen. Weitere Nachteile bei Verwendung von Antikörpern als Liganden ergeben sich aus der Molekülgröße, da sich mit kleineren Liganden bessere Kopplungseffizienz und somit höhere Säulenkapazitäten ergeben (Ruigrok *et al.* 2011). Ein Nachteil vieler Antikörper-basierter affinitätschromatographischer Systeme besteht zudem in der Notwendigkeit von harschen Elutionsbedingungen für die Gewinnung der Zielstrukturen, welche auf die hohe Affinität der Liganden zurückzuführen ist. Eine hohe Affinität des Liganden zu dem Zielmolekül ermöglicht jedoch bessere Ausbeuten bei verdünnt vorliegenden Proben. Eine bei Graves und Wu (1974) ermittelte Gleichung beschreibt die Bindung der Zielstrukturen an immobilisierte Liganden im Zusammenhang mit der Bindungsaffinität:

$$\frac{\text{gebundene Zielstruktur}}{\text{gesamt Zielstruktur}} \approx \frac{L_0}{K_D + L_0} \quad (\text{Gleichung 10})$$

mit K_D – Dissoziationskonstante im Gleichgewicht und L_0 – Konzentration des Liganden

Eine hohe Affinität der eingesetzten Liganden (K_D klein) resultiert daher in einem größeren Anteil komplexierter Zielstrukturen. Verwendet man die Zielstruktur in verdünnter Lösung (z.B. $L_0 = K_D$), so liegt im Gleichgewicht die Hälfte des gesamt vorhandenen Zielproteins in gebundener, und die zweite Hälfte in freier Form vor. Dieser Zusammenhang wird ebenfalls aus der Definition der Dissoziationskonstante ersichtlich:

$$K_D = \frac{[L][T]}{[LT]} \quad (\text{Gleichung 11})$$

Ein mit höherer Affinität bindender Ligand (K_D klein) wird daher bessere Ausbeuten an Zielprotein liefern als ein Ligand mit weniger hoher Affinität (K_D groß), außer wenn die Konzentration des Zielproteins wesentlich größer als die K_D des verwendeten Liganden ist ($L_0 \gg K_D$).

Um die gebundenen Zielstrukturen nach erfolgter Reinigung zu dissoziieren können verschiedene Methoden verwendet werden. Grundsätzlich lassen sich Elutionsmethoden in verschiedene Prinzipien gliedern: Schwächung der bestehenden Interaktion zwischen Ligand und Zielprotein, Titration von an der Bindung beteiligten Elementen, Konkurrenz, oder durch Konformationsänderungen des Paratopes. Die biochemische Bindung zwischen Ligand und Antigen besteht aus einer Kombination aus ionischen Wechselwirkungen, hydrophoben Interaktionen, Wasserstoffbrücken und van-der-Waals-Interaktionen und ist damit vollständig reversibel. Die Bedingungen zur Schwächung dieser Interaktionen beinhalten bei hoch affinen Interaktionen jedoch oftmals extreme pH-Werte, den Einsatz von chaotropen Salzen oder denaturierenden Agenzien. Neben dem geplanten Verwendungszweck spielen bei der Wahl der Elutionsmethode vor allem die biochemischen Eigenschaften der Zielstrukturen eine Rolle. Sofern möglich, werden zur Vermeidung harscher Methoden für die Elution der gebundenen Zielproteine oftmals kompetitive Verfahren verwendet. Bekannte Methoden sind beispielsweise die Elution von His₆-tag-Fusionen über die Zugabe von Imidazol oder die Konkurrenz von Strep-tag-fusionierten Zielmolekülen mit Desthiobiotin. Der Erfolg einer kompetitiven Elution des Zielproteins hängt direkt mit den Affinitäten der verwendeten Interaktionspartner sowie den eingesetzten Konzentrationen und Volumina zusammen, und kann qualitativ nach Graves und Wu (1974) beschrieben werden:

$$\frac{\text{Eluierte Zielstruktur}}{\text{gebundene Zielstruktur}} \approx \left(\frac{p}{p+1} \right) * \left[\frac{pC_0}{pC_0 + \frac{K_{DComp} * L_0}{K_D}} \right] \quad (\text{Gleichung 12})$$

Mit: p – Verhältnis des Volumens des Kompetitors zum Porenvolumen des Gels. K_D – Dissoziationskonstante des Liganden, K_{Dcomp} – Dissoziationskonstante des freien Kompetitors, C_0 Konzentration des kompetitierenden Liganden, L_0 Konzentration des immobilisierten Liganden.

Aus Gleichung 12 ergibt sich, dass eine kompetitive Elution einer affinitätschromatographischen Reinigung nur technisch sinnvoll zu realisieren ist, wenn entweder die Affinitäten des Kompetitors in einer ähnlichen Größenordnung wie die der Zielstruktur liegen oder in höheren Konzentrationen eingesetzt werden können (bzw. sehr große Elutionsvolumina toleriert werden können). Um den Anteil freien (eluierten) Proteins in einem bestimmten Volumen zu maximieren, werden oftmals sehr hohe molare Überschüsse des Kompetitors eingesetzt. Typische Konzentrationen in Elutionspuffer bei Ni²⁺-Metallchelate-Chromatographien liegen daher bei bis zu 500 mM Imidazol (GE-Healthcare 2007). Bei Verwendung eines Strep-tag[®] II-fusionierten Zielmoleküls mit einer Dissoziationskonstante von ungefähr 1 µM zu Strep-Tactin[®] (Voss und Skerra 1997; Schmidt und Skerra 2007) werden Konzentrationen von Desthiobiotin im unteren mM-Bereich eingesetzt. Kompetitive Elutionsstrategien können daher oftmals bei hoch affinen Interaktionen nicht verwendet werden, weshalb die bestehende Bindung durch die Schwächung der Interaktion gelöst werden muss.

Eine weitere Möglichkeit zur Elution besteht aus der Entfernung an der Bindung beteiligter Komponenten. So können beispielsweise durch die Zugabe von chelatierenden Agenzien, wie EDTA, in Metallchelatechromatographien die verwendeten Metallionen komplexiert und das Zielkonstrukt somit eluiert werden. Nachteile einer solchen Methode liegen in der Handhabung

und Entsorgung der Schwermetallverunreinigungen. Weiterhin können die Schwermetallverunreinigungen einen Einfluss auf das Zielkonstrukt selbst, oder auf Analysemethoden im Anschluss der Reinigung haben.

Für technische Applikationen wäre es dementsprechend vorteilhaft, für die eingesetzten Liganden einen schaltbaren Zustand zu generieren. Für die Beladung einer Matrix sollten möglichst hohe Affinitäten zur Zielstruktur vorhanden sein, um ein effektives *capturing* durchführen zu können („*on*“-Zustand). Eine molekulare Erkennung der nativen Faltung der Zielstruktur würde zudem bei der Vermeidung von Produkt-ähnlichen Verunreinigungen helfen. Für die Elution der Zielmoleküle hingegen wäre eine möglichst geringe Affinität der Liganden zu den Zielstrukturen von Interesse, um kleine Elutionsvolumina realisieren zu können („*off*“-Zustand). Um sensible Zielstrukturen mit geringer Stabilität zu reinigen sind milde Elutionsbedingungen von Vorteil.

Auf Basis einfach aufgebauter Gerüststrukturen („*scaffolds*“) können durch die Abfolge von Diversifizierung und Selektion Varianten mit neuartigen Bindungseigenschaften erhalten werden, die über ähnliche Spezifitäten und Affinitäten wie Antikörper verfügen (Hey *et al.* 2005). Durch die einfache Struktur und die Unabhängigkeit von posttranslationalen Modifikationen sowie von Disulfidbrücken lassen sich diese künstlichen Bindeproteine oftmals kostengünstig im Cytosol von Bakterien wie *E. coli* produzieren. Die Möglichkeit zur Generierung von kostengünstigen Liganden für den Einsatz in einer Affinitätschromatographie, basierend auf dem humanen γ B-Kristallin, wurde bereits gezeigt (Fiedler *et al.* 2006). Wie jedoch auch bei Antikörper-basierten Systemen waren für Liganden auf Basis künstlicher Bindeproteine aufgrund der hohen Affinitäten harsche Bedingungen für die Elution der Zielproteine notwendig. Weitere Vertreter dieser Proteinfamilie wie Protein S aus *M. xanthus* haben *in vivo* calciumregulierte Funktionen. So umgibt während der Sporulation des *M. xanthus* eine Schicht aus Protein S die Außenfläche der Sporen und ist an der Zell/Zell-Adhäsion beteiligt (Inouye *et al.* 1979). Dieser Prozess ist abhängig von der Verfügbarkeit von Ca^{2+} . Gebundenes Protein S in Anwesenheit von Ca^{2+} ist selbst bei hohen Salzkonzentrationen stabil (1 M NaCl), kann jedoch vollständig reversibel durch die Chelatierung freien Ca^{2+} von der Sporenoberfläche gelöst werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ermittelt werden, ob es möglich ist, die intrinsische Eigenschaft der Ca^{2+} -sensitiven Bindung des *scaffolds* auf ein *de novo*-generiertes Paratop gegen eine neue Zielstruktur zu übertragen. Neben einer spezifischen und hoch affinen Bindung sowie der kostengünstigen Produktion in *E. coli* sollte ein so generierter Ligand die schonende Elution der Zielstruktur durch die EDTA-vermittelte Verfügbarkeit freier Ca^{2+} ermöglichen und somit die Vorteile bisher verfügbarer Systeme vereinigen. Als leicht handhabbare, gut detektierbare und wissenschaftlich relevante Zielstruktur wurde eine gut faltende Variante des grün fluoreszierenden Proteins, das *superfolder*-GFP (Pedelacq *et al.* 2006), gewählt.

5.1 Design einer Proteinbibliothek für die Erzeugung schaltbarer Bindeproteine auf Basis von Protein S als Gerüststruktur

Da der molekulare Mechanismus der Bindung von Protein S auf der Sporenoberfläche des *M. xanthus* nicht in der Literatur beschrieben wurde, konnten die an dieser Interaktion beteiligten Reste nicht direkt für eine Randomisierung verwendet werden. Über Methoden der zielgerichteten Mutagenese wurden Varianten mit einzelnen Aminosäuresubstitutionen

hergestellt und hinsichtlich ihrer löslichen Produktion in *E. coli*, ihrer thermischen Stabilität und ihrer Fähigkeit zur Bindung an MX-Sporen untersucht (Abbildung 11, S. 63). Die durchgeführte Analyse zur Sporenbindung über ELISA erlaubte lediglich eine rein qualitative Aussage über die Bindungsstärke der Varianten, wodurch sich nur wesentliche Unterschiede detektieren ließen. Obgleich mit diesen Methoden ein existierendes Paratop zur Ca^{2+} -abhängigen Sporenbindung auf der Oberfläche des Protein S nicht eindeutig eingegrenzt werden konnte, ergaben sich dennoch Informationen für die spätere Bibliotheksgestaltung (Abschnitt 4.2, S.60).

Für acht der untersuchten Positionen ergaben sich Varianten mit signifikanten Unterschieden des an MX-Sporen gebundenen Proteinanteils (G14, Q16, E71, L72, L75, Y97, K98, R120). Da diese apparent schwächere Sporenbindung für die Beeinflussung eines existierenden Paratopes sprechen kann, sollten diese und benachbarte Aminosäurepositionen bevorzugt für die Generierung randomisierter Bereiche in Betracht gezogen werden. Für zwei der acht Positionen (G14, Q16) wurden deutlich verringerte thermische Stabilitäten in der DSF-Messung ermittelt und wurden daher nicht für die Randomisierung verwendet. Jedoch wurden Positionen in örtlicher Nähe ausgewählt, um ein potentiell Ca^{2+} -sensitives Paratop zu generieren. Proteinvarianten mit Substitutionen an Aminosäureposition L72 zeigten einen stark verringerten Anteil löslichen Proteins bei der Produktion in *E. coli*. Die Aminosäureposition wurde daher nicht weiter berücksichtigt. Die Rate der Genexpression wurde in der Korrelation ebenfalls nicht berücksichtigt, da die Expression für alle produzierten Proteinvarianten vergleichbar gut war (Daten nicht gezeigt). Durch visuelle Korrelation mit der Software PyMol wurden die ermittelten Aminosäurepositionen in vier jeweils zusammenhängende Bereiche („Module“) eingeteilt. Durch dieses modulare System konnten in kurzer Zeit verschiedene Bibliotheken auf DNA-Ebene zusammengestellt werden.

Für die ausgewählten Aminosäurepositionen der Randomisierung ergaben sich im Zuge der Untersuchungen mit Einzelsubstitutionen keine eindeutigen Muster für präferierte oder ungünstige Seitenketten eingebrachter Aminosäuren (Daten nicht gezeigt). Für die Generierung von Diversität in diesen Bereichen wurden daher für alle Aminosäuren codierende Basentriplets (bis auf Cystein und Prolin-codierende Sequenzen) zugelassen. Dies konnte durch die Verwendung von vorsynthetisierten Trinukleotiden bei der Oligonukleotidsynthese (Ella Biotech, Martinsried) realisiert werden, was die Zusammensetzung der eingesetzten Codons erlaubt und die Diversität im Vergleich zu über degenerierte Primer erhaltene Bibliotheken erhöht (Krumpe *et al.* 2007). Dabei wurden Cystein-codierende Sequenzen zur Vermeidung von inter- oder intramolekularen Disulfidbrücken der entsprechenden Proteine nicht im Bibliotheksdesign berücksichtigt. Für spätere Anwendungen können mit geringem Aufwand bei Bedarf für eine gerichtete Kopplung an Matrices oder andere Moleküle definiert einzelne Cysteine am N- oder C-Terminus genetisch angefügt werden. Obgleich die randomisierten Bereiche des Protein S in den Schleifenstrukturen keine Sekundärstrukturen ausbilden sind sie aller Wahrscheinlichkeit nach hoch strukturiert. Daher wurden auch keine Prolin-codierenden Sequenzen in diesen Bereichen eingefügt, da diese Aminosäure größere Restriktionen in seiner Konformation aufweist als andere Aminosäuren (Berg *et al.* 2006).

Es wurden über ein modulares System und durch die Verwendung einer fragmentbasierten Leserahmenselektion parallel zwei unterschiedliche Bibliotheken generiert, die über hohe Funktionalität (keine Leserahmenverschiebung, keine Stop-Codone und keine zusätzliche

Mutation außerhalb randomisierter Bereiche) und Diversität verfügten (Tabelle 23, S. 67). Durch die Strategie der Leserahmenselektion von Fragmenten konnten Bibliotheken mit hohen Diversitäten erreicht werden, da man mit dieser Methode im Vergleich zu einer Leserahmenselektion von finalen Konstrukten weniger durch die Transformationseffizienz von *E. coli* limitiert ist. So konnte die Kombination der über PCR vervielfachten Fragmente nach durchgeführter Leserahmenselektion im Zuge der Bibliotheksassemblierung komplett *in vitro* erfolgen. Es wurden daher maximal sechs randomisierte Positionen (Modul 1) pro Fragment in der Leserahmenselektion verwendet, wodurch eine geringere Zahl an Transformanten für die jeweilige Abdeckung der möglichen Varianten benötigt wurde, als im Vergleich zu Bibliotheken mit mehr randomisierten Positionen.

Mit einer Funktionalität von 81% (PS_145) und 75% (PS_146) auf DNA-Ebene waren die hergestellten Bibliotheken von sehr guter Qualität (Muchow 2013). Interpretiert man Varianten als funktional, welche Mutationen aufwiesen die zu keiner Leserahmenverschiebung führen (Nukleotidaustausch außerhalb randomisierter Bereiche oder Insertion/Deletion), wurden sogar Funktionalitäten von 90% für die Bibliothek PS_145 und 85% für PS_146 erreicht. Auf Basis von degenerierten Oligonukleotiden erstellte Bibliotheken zeigen oftmals geringere Sequenzfunktionalitäten. Zur Vermeidung von internen Stop-Codonen werden in degenerierten Primern oftmals reduzierte Sets wie NNK oder NNB verwendet, bei welchen Nukleotide in bestimmten Positionen vermieden werden (N = A/C/G/T, B = C/G/T, und K = G/T). Jedoch kommt beispielsweise in häufig verwendeten NNK-Primern auch die Sequenz des Amber-Stop-Codons („TAG“) mit einer Häufigkeit von 1/32 vor, was insbesondere bei einer Vielzahl randomisierter Positionen zu verkürzten Proteinvarianten in den Bibliotheken führt (Nov 2014). Da der genetische Code zudem degeneriert ist, ergibt sich eine Ungleichverteilung der codierten Aminosäuren. Die Kombination der ungleichen Verteilung von Aminosäuren mit dem Vorkommen verkürzter Proteinvarianten nach erfolgter Produktion reduziert die effektive Bibliotheksgröße (Nov 2014).

So wurden bei Verwendung des artifiziellen Proteins M7 als *scaffold* 46–59% funktionale Sequenzen erhalten (Stordeur 2013), bei Bibliotheken auf Basis von Ubiquitin 68% Sequenzfunktionalität (Hoffmann 2011). Auch im Vergleich zu anderen Trinukleotid-basierten Bibliotheken ohne Leserahmenselektion konnten für die Protein S-Bibliotheken gute Funktionalitäten erzielt werden (Garcia-Ibilcieta *et al.* 2008; Yin *et al.* 2008). Für eine auf dem humanen γ B-Kristallin-basierende Bibliothek konnte mit 89% Sequenzfunktionalität bei Verwendung analoger Verfahren wie für die Protein S-Bibliotheken vergleichbar gute Werte erzielt werden (Persönliche Kommunikation P.Studte, AG „Künstliche Bindeproteine“).

Die Varianten der beiden naiven Protein S –basierten Bibliotheken PS_145 und PS_146 zeigten in der Charakterisierung hinsichtlich ihrer thermischen Stabilität und löslichen Produktion in *E. coli* vergleichbare Werte (Muchow 2013). Obgleich die Untersuchungen von Varianten mit einzelnen Aminosäuresubstitutionen nur geringe Änderungen der Proteineigenschaften ergab (Abbildung 11, S. 63), so führte die Summe der Mutationen für die Bibliotheken im Schnitt zu signifikant verringerter Löslichkeit und Stabilität. Die verhältnismäßig große Zahl randomisierter Aminosäurepositionen ($\frac{15}{173} \cong 8,7\%$) des Protein S dürfte ein wesentlicher Grund für diesen Befund sein (Soskine und Tawfik 2010). Eine verringerte Löslichkeit der randomisierter Bibliotheksvarianten bei Herstellung in *E. coli* sind ein typisches Ergebnis und konnten auch in anderen Bibliotheken der Arbeitsgruppe beobachtet werden (Stordeur 2013).

Da ein großer Anteil unlöslicher Proteinvarianten in einer Bibliothek zu einer verringerten Erfolgswahrscheinlichkeit bei der Generierung von Varianten mit geeignetem Eigenschaftsprofil führt, würde es sich für zukünftige Anwendungen anbieten, die Protein S-Bibliotheken zu optimieren. Ein möglicher Ansatz einer Optimierung wäre die Verringerung der verwendeten Aminosäurepositionen, die für die Randomisierung verwendet werden. Hierbei könnten zunächst die Daten der Varianten mit einzeln substituierten Aminosäuren dienen (Abbildung 11, S. 63). Von Interesse wäre weiterhin, die Bindungsmechanismen des wt-Protein S mit Myxosporen im Detail zu verstehen, um zielgerichtet entsprechende Aminosäuren in das Bibliotheksdesign zu integrieren. Für die Auswahl essentieller Oberflächenbereiche der Bibliotheken wären Experimente zur hochauflösenden Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie von Interesse. Die Datenlage der Varianten mit einzeln substituierten Aminosäuren reichte nicht aus, um das Paratop der Sporenbindung exakt zu identifizieren (Abbildung 11, S. 63). Allerdings konnte durch die Kombination mehrerer Austausche im Rahmen der beiden gestalteten Bibliotheken PS_145 und PS_146 signifikante Unterschiede der Bindung der einzelnen Varianten an Myxosporen nachgewiesen werden (Muchow 2013). Die Ergebnisse der Varianten mit einzelnen Aminosäureaustauschen korrelieren gut mit den in der Masterarbeit von Muchow (2013) erhaltenen Daten der Bibliotheken. Das in Bibliothek PS_145 enthaltene fünfte randomisierte Modul umfasste drei für die Sporenbindung signifikante Aminosäurepositionen (L75, Y97 und K98), während Bibliothek PS_146 in Modul 6 lediglich eine entsprechende Positionen enthielt (R120). Für die Protein S Bibliothek PS_145 konnte entsprechend eine maßgeblich geringere Zahl an Sporen-bindenden Varianten als in der Bibliothek PS_146 ermittelt werden (Abbildung 14, S. 66), was nahelegt, dass die randomisierte Oberfläche der Bibliothek Lib_145 signifikant mit der natürlichen, Ca^{2+} -abhängigen Bindungsstelle des Proteins für Myxosporen überlappt.

Um die Bibliothek ohne Kenntnisse der interagierenden Aminosäurepositionen bei Bindung des Protein S an Myxosporen zu optimieren, könnte man eine erneute Analyse mit unterschiedlichen kleinen Bibliotheken von 2–3 randomisierten Positionen in Betracht ziehen. Dies könnte es ermöglichen, den Einfluss auf die Sporenbindung und Stabilität in Zusammenhang mit bestimmten Regionen des Protein S zu bringen. Das verwendete modulare Design zur Bibliotheksgenerierung (3.3.1) würde es weiterhin ermöglichen, die parallele Vorbereitung vieler Bibliotheken zu automatisieren und somit in kurzer Zeit zu ermöglichen. Die Stabilisierung der Bibliotheksvarianten könnte auch hinsichtlich ihrer späteren Verwendungszwecke als Liganden in chromatographischen Anwendungen von Interesse sein. Typische Prozessparameter während der Regeneration von Chromatographiemedien zwischen einzelnen Chargen beinhalten stringente Reinigungsschritte unter alkalischen pH-Werten. Etablierte Liganden wie Protein A verfügen über eine hohe Stabilität und erlauben vielfache Regenerationszyklen unter stringenten Bedingungen. Obgleich bislang keine Informationen über die chemische Stabilität der neuartigen Protein S basierten Liganden verfügbar sind, so lassen die ermittelten thermischen Stabilitäten (Tabelle 26, S. 74) vermuten, dass solch stringente Bedingungen nicht eingesetzt werden können, ohne die Aktivität der Liganden deutlich zu verringern. Auch existieren keine Informationen über Rückfaltungsprozesse der Varianten, die nach Vorbild des Wildtyp-Proteins nach thermischer oder chemischer Entfaltung (Inouye *et al.* 1981) für die Regenerationen von Säulenmaterialien genutzt werden könnten. Zur

Generierung stabilerer Varianten lassen sich verschiedene Ansätze verfolgen. Neben einer Optimierung der Bibliotheken könnte auch das Gerüstprotein hinsichtlich der alkalischen Stabilität verbessert werden. Basierend auf Verfahren mit hohem Durchsatz könnte man das Gerüstprotein ähnlich dem Verfahren dieser Arbeit zur Charakterisierung eines geeigneten Bereiches für die Generierung von Diversität randomisieren. Beispielweise ließe es sich realisieren, jede Aminosäureposition des *scaffolds* einzeln zu randomisieren, um so (ggf. generisch) stabilisierende Austausche zu identifizieren. Auch über Selektionsverfahren (Chakravarty *et al.* 2000; Plückthun 2012) oder unter Verwendung von *in silico*-generierten Daten lassen sich stabilisierte Proteinvarianten erhalten (Dahiyat 1999).

5.2 Generierung eines künstlichen schaltbaren Bindeproteins gegen sfGFP

Da der größte Teil der Bibliotheksvarianten PS_145 nicht mehr an die Sporen des *M. xanthus* zu binden vermochten (Abbildung 14, S. 66), wurde vermutet, dass die randomisierte Oberfläche des Protein S der Bibliothek Lib_145 signifikant mit der natürlichen, Ca^{2+} -abhängigen Bindungsstelle des Proteins für die Myxosporen überlappt. Für die Selektion von Ca^{2+} -sensitiven Varianten wurde daher die Bibliothek PS_145 verwendet, da einerseits vermutet wurde, dass ein *de novo*-generiertes Ca^{2+} -sensitives Paratop auch für andere Interaktionspartner genutzt werden könnte und andererseits die Bindung des natürlichen Interaktionspartners für weitere Anwendungen unerwünscht war.

Für die Anreicherung Ca^{2+} -abhängiger Protein S Varianten, welche spezifisch das Zielprotein sfGFP binden, wurde ein Ribosomen-*display* verwendet, da eine Ca^{2+} -sensitive Bindung des Wildtyp Protein S an Myxosporen über ein Phagen-*display* nicht gezeigt werden konnte (Abbildung 8, S. 59). Mögliche Ursachen für diesen Befund wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Zur spezifischen Anreicherung Ca^{2+} schaltbarer Proteinvarianten wurde ein modifiziertes *biopanning* über Ribosomen-*display* verwendet. Zur Gewinnung der ternären Komplexe gebundener Proteinvarianten wurde in dieser Arbeit nicht enzymatisch, kompetitiv oder pH-abhängig eluiert, sondern die Verfügbarkeit von Ca^{2+} über die Anwesenheit eines chelatierenden Agens (EGTA) gesteuert. In Vorversuchen mit einer M7-basierten Bibliothek sowie mit Calmodulin konnte gezeigt werden, dass die Mg^{2+} -abhängigen ternären Komplexe trotz der Zugabe von EGTA stabil blieben und die Konzentration an Ca^{2+} zeitgleich signifikant gesenkt werden kann (interner Forschungsbericht, M. Schneider).

Die RNA der Elutionsfraktionen der einzelnen Selektionsrunden wurde gereinigt, entsprechende cDNA über reverse Transkription produziert und diese mittels *real-time*-PCR quantifiziert. Die Titer der so bestimmten RNA-Moleküle der RD-Selektionsrunden deuten auf eine erfolgreiche Selektion hin (Abbildung 15, S. 68). Es wurden insgesamt 1×10^{12} DNA-Moleküle für die erste Runde des RD-*displays* verwendet (Tabelle 18). Aufgrund der notwendigen Klonierungsschritte der Bibliothek zur Überführung der Proteinvarianten in ein RD-kompatibles Format (vgl. 4.3.1) enthielt die eingesetzte Molekülzahl eine etwas geringere Diversität von ca. $5,8 \times 10^{11}$ Varianten (Tabelle 23, S. 67). Aufgrund vorkommender Fehler bei PCR-Schritten und UV-Exposition im Zuge der Reinigung der verwendeten DNA dürfte die reale Diversität etwas höher liegen. Dieser Wert ist vergleichbar mit typischen eingesetzten Diversitäten von ca. 1×10^{12} Molekülen dieses *display*-Systems, jedoch geringer als maximal handhabbar beschriebene Molekülzahlen von ca. 10^{14} Varianten (Dreier und Plückthun 2011). Durch die Verwendung größerer Volumina für die ITT könnten bei Bedarf für zukünftige

Selektionen auch größere Ausschnitte der Bibliothek verwendet werden. Im Vergleich zu Selektionsmethoden wie das Phagen-*display*, welche durch die Transformationseffizienzen von *E. coli* auf ca. 10^9 – 10^{10} Varianten limitiert sind (Paschke 2006), war die eingesetzte Diversität hoch.

Da zu diesem Zeitpunkt keine Informationen über die vorhandene Bibliothek oder über die Generierung schaltbarer Bindemoleküle überhaupt vorhanden waren, wurde als Ziel der Selektion zunächst nicht die möglichst hohe Affinität der erhaltenen Bindeproteine gesetzt, sondern eine gemäßigte Strategie verfolgt. Die ersten drei Runden der Selektion gegen sfGFP fanden unter wenig stringenten Bedingungen mit mäßigen Waschschritten und hohen Konzentrationen der Zielstruktur sfGFP statt (Tabelle 18, S.41). Es wurden in der ersten Selektionsrunde hohe Molekülzahlen detektiert, was auf eine hohe Diversität schließen lässt, da statistisch gesehen nur ein vergleichsweise kleiner Teil der Bibliothek verwendet wurde ($5,8 \times 10^{11}$ von theoretisch $\sim 7 \times 10^{18}$) und der Großteil der vorkommenden Moleküle daher über eine einzigartige Sequenz verfügte. Eine Negativkontrolle wurde in dieser Runde nicht mitgeführt, weshalb keine Information zur Spezifität der erhaltenen Varianten dieser Runde zur Verfügung steht. Durch die mäßige Stringenz der zweiten und dritten RD-Runde wurden bindende Varianten angereichert, was in steigenden cDNA-Molekülzahlen der Elutionsfraktionen und sinkendem Anteil an Molekülen in der Negativkontrolle zu beobachten war (Abbildung 15, S. 68). Das Verhältnis der in der EGTA-Elutionsfraktion detektierten Moleküle zu den detektierten Molekülen in der Negativkontrolle konnte von einem Faktor von 2 (Runde 2) auf einen Faktor von 98 (Runde 3) gesteigert werden (Abbildung 35).

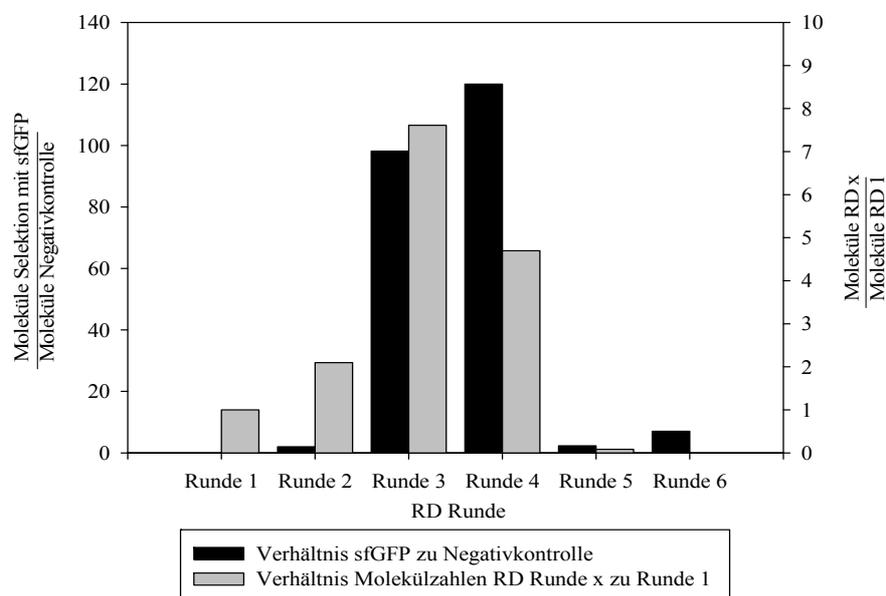


Abbildung 35: Verhältnisse der quantifizierten cDNA-Moleküle nach reverser Transkription im Ribosomen-*display* bei Selektion sfGFP-bindender Protein S-Varianten der Bibliothek PS_145

Das Verhältnis der Moleküle in der EGTA-Elutionsfraktion bei Selektion gegen sfGFP im Vergleich zu der Negativkontrolle wurde in schwarz dargestellt (linke Skala). Die in den einzelnen Runden der Selektion gegen sfGFP erhaltenen Molekülzahlen in Verhältnis zu den Molekülzahlen der ersten RD-Runde wurde in grau dargestellt (rechte Skala).

Es konnte zeitgleich eine leichte Anreicherung von Varianten der EGTA-Elution verzeichnet werden (Faktor: ~ 2), so auch eine deutliche Reduktion an Molekülen in der Negativkontrolle

(Faktor: ~ 10). Eine mögliche Erklärung liegt neben den in Runde 3 stringenter gestalteten Waschschrritten vor allem in der Präinkubation der Bibliotheksvarianten mit leeren, geblockten *beads*. Offenbar waren die mit geringer Stringenz gestalteten Waschschrritte der zweiten Runde alleine nicht ausreichend, um unspezifisch bindende Varianten zu entfernen. Für zukünftige Selektionen sollte eine höhere Stringenz durch vermehrte Waschschrritte ab der ersten- und Präinkubationen mit leeren *beads* ab der zweiten RD-Runde daher in Betracht gezogen werden. Der gesteigerte Selektionsdruck der vierten RD-Runde resultierte in einer weiteren Verbesserung spezifisch gebundener Moleküle bis auf ein Verhältnis von ~ 120 . Dabei wurden im Vergleich zu der vorhergehenden RD-Runde 3 ca. 40% weniger Moleküle in der EGTA-Elutionsfraktion detektiert, der entsprechende Anteil der Negativkontrolle sank jedoch um 50%. Die vierte Selektionsrunde unterschied sich hauptsächlich in der präsentierten Menge der Zielstruktur (100 nM anstelle von 1.000 nM in Runde 3) und dem Verhältnis der eingesetzten Ribosomen zur eingesetzten Menge an DNA. Weiterhin wurden geringfügig stringenter Waschbedingungen verwendet (5×2 min anstelle von 5×1 min).

Die verringerten Molekülzahlen der EGTA-Elutionsfraktion lassen sich gut durch die Entfernung von Varianten mit geringerer Affinität erklären. Sowohl die verringerte Menge an präsentierter Zielstruktur als auch die verringerten Aviditätseffekte bei Einsatz geringerer Mengen an Ribosomen scheinen spezifisch bindende Varianten in dieser Runde bevorzugt zu haben. Die eingesetzten Waschschrritte führten zu einer guten Abreicherung unspezifisch gebundener Moleküle. Die unter deutlich stringenteren Bedingungen durchgeführte fünfte Runde resultierte in einer massiv verringerten Molekülzahl der eluierten Varianten. Während sich die detektierte Zahl an Molekülen in der Negativkontrolle in der gleichen Größenordnung wie in der vorhergegangenen Runde befand, so wurden um zwei Größenordnungen weniger spezifisch bindende Varianten detektiert. Die Stringenz dieser Runde wurde zeitgleich durch mehrere Faktoren erhöht, so dass sich nicht mit Bestimmtheit sagen lässt, welcher Einfluss am größten war. Die unter weniger stringenteren Bedingungen durchgeführte sechste Runde resultierte nicht in erneut erhöhten Titern. Daher kann man schlussfolgern, dass die gewählten Bedingungen der fünften Selektionsrunde zu stringent gestaltet wurden und der größte Teil der spezifisch bindenden Varianten in diesem Schritt aus dem System entfernt wurde. Für zukünftige Selektionen wäre daher neben einer geringeren Stringenz späterer Selektionsrunden vor allem auch eine systematische Untersuchung der einzelnen Einflussgrößen von Interesse. Eine sinnvolle Ergänzung für zukünftige Selektionen wäre eine zusätzliche Präsentation der Zielmoleküle (oder leeren *beads*) in Anwesenheit von EGTA zur Abreicherung von Varianten, die unter Abwesenheit von Ca^{2+} weiterhin eine Bindung zeigen. So könnten auch Varianten entfernt werden, welche in einem der beiden Schaltungszustände über eine (unspezifische) Bindung verfügen. Für die Optimierung einer monovalenten Präsentation der Bibliotheksvarianten könnte in zukünftigen Versuchen die gekoppelt durchgeführte Transkription/Translation in einzelnen Schritten durchgeführt werden. Durch die Entkopplung würde die RNA aller transkribierten Proteinvarianten zeitgleich mit den vorhandenen Ribosomen inkubiert werden, womit die Relation zwischen RNA und freien Ribosomen zu Beginn der Reaktion zeitlich unabhängig für alle Varianten gleich wäre.

Zur Analyse von Einzelvarianten der Selektion wurden in einem automatisierten Verfahren 2576 Protein S-Varianten produziert und mittels automatisiertem ELISA hinsichtlich ihrer Ca^{2+} -abhängigen Bindung an sfGFP analysiert. Obgleich *pool*-Sequenzierungen der einzelnen

RD-Runden auf eine ähnliche Verteilung an Basen in den randomisierten Positionen und damit auf eine verbleibend hohe Diversität hindeuteten (Daten nicht gezeigt), wurden die Varianten aus den Selektionsrunden unterschiedlich gewichtet analysiert (Tabelle 24, S. 69). Der größte Teil der untersuchten Varianten stammte aus der vierten Selektionsrunde, da in dieser Fraktion zum einen die größte Diversität an moderat bindenden Varianten erwartet wurde und der Anteil spezifisch bindender Varianten (im Vergleich mit der Negativkontrolle) am höchsten war ($\frac{\text{Moleküle in EGTA-Elutionsfraktion}}{\text{Moleküle in Negativkontrolle}} \approx 120$). Da zu diesem Zeitpunkt kein Vergleichswert aus publizierten Ergebnissen herangezogen werden konnte, war nicht bekannt, ob eine Schaltbarkeit überhaupt, und insbesondere bei hohen Affinitäten der Interaktionspartner, möglich ist. Weiterhin wurde vermutet, dass durch die höhere Diversität bedingt möglicherweise mehr Varianten, die verschiedene Epitope adressieren, identifiziert werden könnten. Daher wurden entsprechend weniger Varianten aus den unter stringenteren Bedingungen durchgeführten Selektionsrunden 5 und 6 analysiert.

Für die Durchmusterung der hergestellten Proteinvarianten wurde ein automatisierter ELISA mit *E. coli*-Lysaten der Einzelvarianten als Doppelbestimmung in An- und EDTA-vermittelter Abwesenheit von Ca^{2+} durchgeführt. Als Verfahrenskontrolle wurde Spherulin 3a mitgeführt, da für Protein S kein geeigneter Detektionsantikörper für den Nachweis von an Sporen gebundenen Proteins oder für ein *capturing* von Protein S in Lösung zur Verfügung stand (Abbildung 16 B, S. 70). Es konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass weder vorhandene polyklonale Antikörper, noch der gegen die Hexahistidinfusion des Proteins gerichtete Antikörper (Roche, BMG-His-1) Komplexe aus immobilisierten Myxosporen und Protein S nachzuweisen vermochten (Daten nicht gezeigt). Für die Spherulin 3a-Kontrollen wurden auf den ELISA-Mikrotiterplatten anstelle von sfGFP polyklonale Antikörper analog zu der Zielstruktur immobilisiert. Die rekombinante Proteinproduktion und alle Analyseschritte der Kontrolle erfolgten parallel zu den Protein S-Varianten, wodurch sie sowohl eine Kontrolle für die erfolgreiche Genexpression als auch für das verwendete ELISA-Verfahren darstellte. Als Negativkontrolle der Analyse wurden Leervektor-Lysate verwendet. Die durchgehend niedrigen Signale der Negativkontrolle waren ein Indiz, dass es im Verlauf des Verfahrens zu keinen signifikanten Kreuzkontaminationen kam. Die Berechnung des Z-Faktors ($-1 < Z \leq 1$) als Maß der statistischen Effektgröße (Zhang *et al.* 1999) ergab mit 0,66 einen sehr guten Wert des Verfahrens (Gleichung 10):

$$Z = 1 - \frac{3(\sigma_P + \sigma_N)}{|\mu_P - \mu_N|} = 1 - \frac{3(0,19 + 0,004)}{|1,75 - 0,02|} = 0,66 \quad (\text{Gleichung 13})$$

Mit: σ = Standardabweichung, μ = Mittelwert, n = Negativkontrolle, p = Positivkontrolle.

Im Zuge der Primäranalyse wurden 42 Varianten detektiert, welche über eine Signalamplitude größer eines willkürlich festgelegten Schwellenwertes von $\text{Abs}_{450\text{nm}} > 0,15$ verfügten. Eine Darstellung mit Zuordnung der vergebenen Identifikationsnummern (CID) ist dem Anhang zu entnehmen (Abbildung A 11). Die absolute Rate detektierter Varianten lag damit sehr niedrig ($\frac{42}{2576} \hat{=} 1,6\%$). Der hohe Durchsatz analysierter Varianten erwies sich daher als sehr günstig für diesen Charakterisierungsschritt. Die Rate spiegelte sich etwa gleich über die Varianten aller Selektionsrunden wider. Die einzige Ausnahme war RD-Runde 5, aus welcher nur eine

Variante (CID 21) weitergeführt wurde. Im Rahmen dieser Selektionsrunde wurden jedoch auch ein großer Teil der spezifisch bindenden Moleküle aufgrund der hohen Stringenz des *bio panning*s entfernt. Für eine statistisch sichere Abdeckung einer repräsentativen Stichprobe wurden aber zu wenige Varianten dieser Runde analysiert. Für 27 von 42 Varianten (64%) konnte eine sehr starke Abhängigkeit ($\frac{A_{450\text{ nm,Ca}^{2+}}}{A_{450\text{ nm,EDTA}}} > 5$) der Bindung von Ca^{2+} ermittelt werden, für 30 der Varianten (71%) wurde zumindest ein doppelt so starkes Signal in Anwesenheit von Ca^{2+} im Vergleich zu dem Signal mit EDTA-Waschschritt erhalten. Die Primäranalyse der Varianten deutete daher darauf hin, dass die durchgeführte Selektionsstrategie zur Anreicherung Ca^{2+} -sensitiver Varianten erfolgreich war.

Die Sequenzanalyse von 42 in der primären Durchmusterung identifizierten sfGFP-bindenden Protein S-Varianten ergab 36 Varianten, welche für weitere Charakterisierungsschritte geeignet waren. Es konnten signifikante Unterschiede der Aminosäureverteilung innerhalb der randomisierten Bereiche im Vergleich zu der naïven Bibliothek (Abbildung 13, S. 65 sowie Abbildung 17, S. 72) und Sequenzähnlichkeiten festgestellt werden. Auch dies war ein Indiz für einen erfolgreichen angelegten Selektionsdruck während des durchgeführten Ribosomen-*displays*. Vor allem das erste der drei randomisierten Module zeigte ein sehr ähnliches Sequenzmotiv („S/TGX_X_“), wobei die Diversität der beiden weiteren Module größer war. In allen Modulen wurden jedoch an einzelnen Positionen Anreicherungen bestimmter Aminosäuren beobachtet (Abbildung 17, S. 72). Mit 31,3% waren aromatische Aminosäuren in den zuvor randomisierten Bereichen am häufigsten vertreten. Diese Werte passen zu Ergebnissen, die für bindende Varianten anderer Gerüstproteine beschrieben wurden. So wurde bei der Auswertung der Kristallstrukturen von Komplexen mit Monobodies (41% Aromaten) bzw. DARPinS (27% Aromaten) mit ihren jeweiligen Zielstrukturen ähnliche Anteile aromatischer Aminosäuren in den zuvor randomisierten Bereichen ermittelt (Gilbreth und Koide 2012).

Bei insgesamt 10 der 34 einzigartig vorkommenden Sequenzen (zwei Varianten waren jeweils doppelt vorhanden), für die eine fortlaufende Identifikationsnummer vergeben wurde, kamen zusätzliche Mutationen außerhalb der randomisierten Bereiche vor. Diese basierten in allen Fällen auf Punktmutationen der Gene für die Varianten und sind aller Wahrscheinlichkeit nach verfahrensbedingt auf die mehrfach durchgeführten PCR-Zyklen und UV-Expositionen der DNA während der Bibliotheksgenerierung und der Selektion zurückzuführen. Dieser Effekt ist typisch für Ribosomen-*display*-Verfahren und kann beispielsweise durch die Verwendung einer *error-prone*-PCR verstärkt werden. Diese zielgerichtete Evolution kann für eine Affinitäts-Maturierung von Varianten verwendet werden (Zahnd *et al.* 2007b). Die zusätzlichen Mutationen waren hinsichtlich ihrer Verteilung und des Typs der eingebrachten Aminosäure willkürlich. Da sich keine Mutation vermehrt durchsetzen konnte ist es wahrscheinlich, dass sie wahlweise einen geringen Einfluss auf das Verhalten der Varianten haben, oder aber erst in späten Selektionsrunden auftraten.

Zwei der erhaltenen sfGFP-bindenden Protein S-Varianten wurden jeweils in doppelter Ausführung gefunden (CID 3/4 sowie 6/7). Unabhängig voneinander ergaben diese Varianten vergleichbare Werte in der Primäranalyse (Abbildung 36) und lieferten somit ein Indiz für die gute Reproduzierbarkeit des Systems.

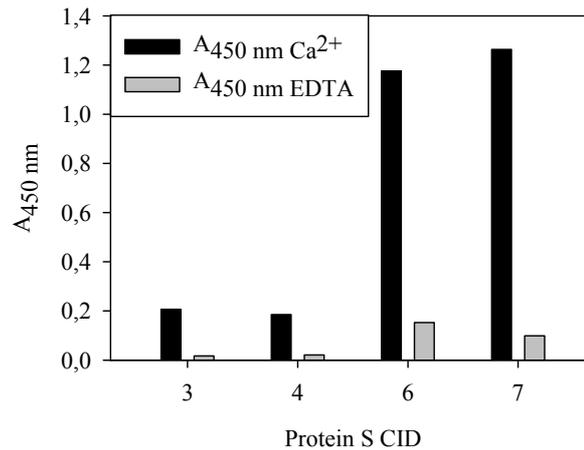


Abbildung 36: Reproduzierbarkeit der Primäranalyse zur Untersuchung Ca²⁺-schaltbarer Bindeproteine über ein automatisiertes ELISA-Verfahren.

Nach der parallelen Genexpression in 200 µl Kulturvolumen wurden die verwendeten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen über Gefrier/Tau-Zyklen lysiert und unlösliche Bestandteile über einen Zentrifugationsschritt abgetrennt. Die lösliche Lysatfraktion wurde zu 500 ng sfGFP gegeben, welches ungerichtet auf einer *high bind*-Mikrotiterplatte immobilisiert wurde. Die Detektion gebundenen Proteins erfolgte über einen gegen den Hexahistidin-*tag* gerichteten und peroxidasekonjugierten Antikörper (BMG-His-1). Für jede analysierte Variante wurde eine Doppelbestimmung mit identischem Lysat durchgeführt. Eine der beiden Messungen erfolgte hierbei in permanenter Anwesenheit von 10 mM Ca²⁺ (schwarz), die zweite Messung wurde mit einem zusätzlichen EDTA-Waschschrift (grau) durchgeführt.

Die weiterführende Analyse der selektierten Proteinvarianten zeigte analog zu den Analysen der naïven Bibliotheken (Muchow 2013) eine deutlich verringerte Stabilität und einen verringerten Anteil löslich in *E. coli* produzierten Proteins im Vergleich zum Wildtyp (Tabelle 26, S. 74). Für einige der Varianten konnten in einem sekundär durchgeführten ELISA mit gereinigten Proben die Bindung an sfGFP nicht reproduziert werden (Abbildung 18, S. 75). Möglicherweise war dies auf geringe Ausbeuten bei der Reinigung der Varianten zurückzuführen, wenngleich keine Korrelation zwischen der Löslichkeit der Varianten und der Reproduzierbarkeit im sekundären ELISA erhalten werden konnte. Aufgrund der durchgehend hohen Expressionsraten der entsprechenden codierenden Sequenzen konnten jedoch alle Proteinvarianten in größerem Maßstab hergestellt werden (Tabelle 27, S. 77), für welche in dieser Charakterisierung ein Signal reproduziert werden konnte. Viele der Proteinvarianten zeigten hohe Anteile an aggregierten Proteinspezies in der Größenausschlusschromatographie nach erfolgter affinitätschromatographischer Reinigung (Abbildung 19, S. 76). Diese Aggregate konnten durch die als zweiten Reinigungsschritt durchgeführte Größenausschlusschromatographie vollständig von der monomeren Proteinspezies getrennt werden, wodurch dieser Reinigungsschritt für eine detaillierte Charakterisierung der Proteinvarianten essentiell war. Die jeweils gereinigten monomeren Proteinspezies zeigten über den Zeitraum dieser Arbeit keine weitere Tendenz zur Aggregation (Daten nicht gezeigt). Welchen Einfluss aggregierte Anteile der untersuchten Proteine in den mit Lysaten durchgeführten Analysen (Abschnitt 4.4) hatten, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Zur Optimierung der Proteinproduktion könnten unterschiedliche Strategien angewandt werden. Da die Protein S-Varianten der Bibliotheken generell eine deutlich verringerte Stabilität aufwiesen, würde sich zunächst eine Optimierung der Proteinsequenz anbieten (vgl. Abschnitt 4.4.3.1 und Abschnitt 5.1). Wie auch für die Optimierung der eingesetzten Bibliotheken wären für diesen Ansatz jedoch Informationen über das Ca²⁺-abhängige Paratop notwendig. Es könnten weiterhin alternative Expressionssysteme, angepasste Prozessbedingungen oder

Kultivierungsmedien verwendet werden. Eine einfache und schnelle Methode könnte die Verwendung von enzymregulierten *fed-batch*-Verfahren sein. So können bei Verwendung der *EnBase*[®]-Technologie (Biosilta, Cambridge, UK) unter Umständen nicht nur höhere optische Dichten bei der Kultivierung, sondern auch ein größerer Anteil an Produkt mit korrekter Faltung erreicht werden (Ukkonen *et al.* 2013).

5.3 Charakterisierung der Interaktion zwischen Protein S-Varianten und sfGFP

Für alle im Schüttelkolben-Maßstab produzierten Proteinvarianten konnte mittels ELISA und SPR-Analysen eine Ca^{2+} -abhängige Änderung der Affinität gegenüber der Zielstruktur bestätigt werden (Abbildung 20, S. 78, Abbildung 21, S. 80). Einige der Varianten zeigten in mindestens einem der beiden Schaltungszustände eine verbleibende Bindung an sfGFP. Die Bindung in EDTA-vermittelter Abwesenheit von Ca^{2+} an sfGFP ist für die meisten Varianten wahrscheinlich nach wie vor spezifisch, da keine Bindung an globuläre Proteine wie Casein, BSA oder Lysozym in einem ELISA-Experiment ermittelt werden konnten (Abbildung A 10, S. A 4). Für die Primär- und Sekundäranalysen der Varianten innerhalb der Durchmusterung (Abbildung 16, S. 70, Abbildung 18, S. 75) wurden zusätzliche EDTA-Waschschritte verwendet, um die Schaltbarkeit der Varianten zu analysieren. Um den Anteil an Varianten mit unspezifischer Bindung in einem Schaltungszustand zu verringern, könnte in Selektionsschritten eine Vorinkubation mit der Zielstruktur in EGTA-Puffer erfolgen. Weiterhin würde es sich für zukünftige Analysen anbieten, die Durchmusterungen in permanenter An- und Abwesenheit von Ca^{2+} für die Doppelbestimmungen der Varianten durchzuführen.

Die für den konzentrationsabhängigen ELISA ermittelten Affinitäten korrelierten mit den erhaltenen Werten der SPR-Messungen, ergaben jedoch im Schnitt schwächere Bindungsstärken. Eine bessere Korrelation hätte durch die Optimierung der eingesetzten Proteinkonzentrationen im ELISA erreicht werden können. Durch den Einsatz von Proteinkonzentrationen in der gleichen Größenordnung wie die entsprechenden Affinitäten hätte eine bessere Auflösung für die Messungen erhalten werden können. Es zeigte sich in den konzentrationsabhängigen ELISA, dass die erreichten Plateauphasen der Varianten in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} nicht auf ein gemeinsames Niveau hinausliefen. Mögliche Erklärungen könnten in der Beeinflussung des Detektionssystems durch Konformationsänderungen der Varianten liegen. So könnte die Zugänglichkeit des His₆-Fusionskonstruktes für das Immunkonjugat beeinträchtigt worden sein, woraus möglicherweise eine verringerte Affinität resultierte.

Eine der untersuchten Proteinvarianten (CID 24) zeigte im konzentrationsabhängigen ELISA kein Signal im calciumfreien Zustand. Über SPR-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass für diese Variante tatsächlich keine Bindung an sfGFP in Abwesenheit von Ca^{2+} erfolgte, und dass es sich dabei nicht um ein Messartefakt aufgrund der Zugänglichkeit der für den Nachweis verwendeten His₆-Fusion handelt (Abbildung 21, S. 80). Für alle in den SPR-Messungen untersuchten Proteinvarianten (CID 1, 5, 6 & 7, 8, 10, 11, 13, 24, 27 und 30) konnten qualitativ gute Resultate erhalten werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Protein S-Varianten in Anwesenheit von 10 mM Ca^{2+} über eine Affinität von 10^{-7} – 10^{-9} M an die Zielstruktur sfGFP verfügen und die Bindung in starkem Maße von der Verfügbarkeit von Ca^{2+} abhängt (Abbildung 21, S. 80). Für Variante CID 11 wurde bereits im konzentrationsabhängigen ELISA eine verbleibende Bindung im calciumfreien Schaltungszustand vermutet, was in folgenden

Experimenten über SPR-Analysen bestätigt werden konnte (4.5.2.2). Für weitere Varianten konnten auch geringe unspezifische Bindungen an die Referenzzelle der SPR-Analyse in einem (CID 1, 5, 8, 11, 27) oder beiden Schaltungszuständen (CID 6/7) detektiert werden (Abbildung 22, S. 81). Für die Proteinvarianten CID 10, 13 und 24 hingegen wurde nur in Anwesenheit von Ca^{2+} eine spezifische Bindung an die Zielstruktur ermittelt. In calciumfreien Zustand konnte für diese drei Varianten keine (CID 13 und 24) bzw. nur eine marginale (CID 10) Bindung ermittelt werden.

Die aus der kinetischen Auswertung der Messungen erhaltenen Affinitäten der Protein S-Varianten im Ca^{2+} -gebundenem Zustand im Bereich von 10^{-7} – 10^{-9} M sind vergleichbar mit Affinitäten anderer künstlicher Bindeproteine (Mouratou *et al.* 2015) oder auch Antikörpern sowie deren Fragmenten, welche typischerweise im Bereich von 10^{-9} – 10^{-11} M liegen. Die SPR-Messungen ergaben qualitativ sehr gute Ergebnisse, welche gut mit einem 1:1 Bindungsmodell beschrieben werden konnten. Für eine ausgesuchte Proteinvariante (CID 24) konnte die Stöchiometrie der Bindung über den Nachweis des Komplexes mittels analytischer Ultrazentrifugation verifiziert werden (Abbildung 27, S. 87).

Im Vergleich zu Bindeproteinen wie DARPs, Nanobodies, Nanofitine oder α REP-Proteine, für welche GFP-bindende Varianten erhalten wurden, erhält man ähnliche Bindungsstärken von 10^{-8} – 10^{-10} M (Rothbauer *et al.* 2006; Kubala *et al.* 2010; Brauchle *et al.* 2014; Schilling *et al.* 2014; Chevrel *et al.* 2015; Huet *et al.* 2015). Durch den Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten können weitere Rückschlüsse gezogen werden (Abbildung 37). Die in dieser Arbeit analysierten Protein S-Varianten zeigten in Anwesenheit von Ca^{2+} ähnliche Werte hinsichtlich ihrer Assoziationsverhaltens (Tabelle 29, S. 81). Unterschiede in der resultierenden Affinität wurden vor allem durch ihre Dissoziationskonstanten bestimmt. Lediglich zwei Varianten (CID 24 und CID 27) zeigten im Vergleich zu anderen Varianten schnellere Assoziationen, wodurch CID 24 in Kombination mit einer sehr langsamen Dissoziation als beste Variante erhalten wurde, wogegen CID 27 eine vergleichsweise moderate Affinität zeigte.

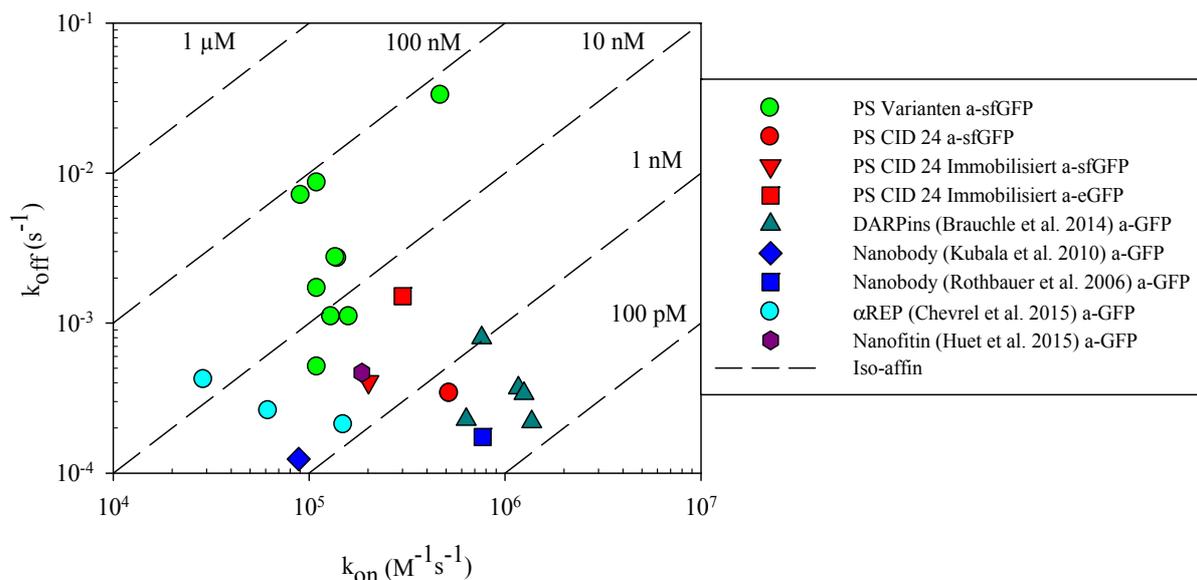


Abbildung 37: Vergleich bindungskinetischer Parameter unterschiedlicher GFP-bindender Proteine

Zur Ermittlung der Bindungskinetiken der Protein S-Varianten (grün), der DARPs (dunkelgrün), der α REP-Proteine (cyan) sowie von Nanobodies (magenta) wurden SPR Messungen verwendet. Die bei Kubala (2010) beschriebenen Daten eines Nanobodies wurden über BLI-Messungen erhalten. Protein S-Variante CID 24 wurde für verschiedene experimentelle Aufbauten verwendet (rot). Iso-affine Linien wurden gestrichelt dargestellt.

Die auf verschiedenen *scaffolds* basierenden Bindeproteine zeigen unterschiedliche Bindungskinetiken. Während die beschriebenen DARPins hinsichtlich beider Geschwindigkeitskonstanten bessere Werte lieferten als die erhaltenen Protein S basierten Bindemoleküle, so wurde für die α REP-Proteine vor allem langsamere Dissoziationen bei ähnlichen Assoziationen ermittelt. Das von Huet *et al.* (2015) beschriebene Bindeprotein (Nanofitin) zeigte sehr ähnliche Werte wie die Protein S-Variante CID 24 nach erfolgter Immobilisierung. Die beiden beschriebenen Nanobodies hingegen unterschieden sich maßgeblich in den Assoziationsraten, während die Dissoziationsraten vergleichbar waren. Für die beste der ermittelten Protein S-Varianten konnten vergleichbare Geschwindigkeitskonstanten wie für die DARPins oder den mit einer Affinität von 0,4 nM hoch affinen Nanobody erhalten werden.

Die Bindung von eGFP im Vergleich zur Bindung von sfGFP zeigte hinsichtlich beider Geschwindigkeitskonstanten Unterschiede, während durch die Immobilisierung der Protein S-Variante CID 24 über NHS-Chemie vor allem die Assoziationsrate bei Bindung von sfGFP beeinflusst wurde (Abbildung 25, S. 85 Abbildung 37, S. 107). Geringere Affinitäten durch Immobilisierungen wurden auch für andere Bindeproteine beschrieben. So wurde bei Twair *et al.* (2014) bei der Immobilisierung von Nanobodies Einbußen in der Affinität mit Differenzen um einen Faktor von ca. 60 berichtet. Ein vergleichbarer Effekt konnte für die Protein S-Variante CID 24 bei der Immobilisierung über NHS-Chemie nicht beobachtet werden und die ermittelten Affinitäten zeigten verringerte Werte mit einem Faktor von ca. 2,3 (Abschnitt 4.6.3, S. 85 sowie Abbildung 37, S. 107). In Anwesenheit von Ca^{2+} zeigte die beste der erhaltenen Protein S-Varianten CID 24 demzufolge eine vergleichbar gute Bindung zu sfGFP wie bindende Varianten, welche auf etablierten alternativen *scaffolds* basieren. Die Besonderheit der in dieser Arbeit beschriebenen Technologie ist jedoch die Abhängigkeit der Interaktion von Ca^{2+} . So konnte für Variante CID 24 selbst bei der Injektion von hohen Proteinkonzentrationen bis 15 μM keine signifikante Interaktion mit sfGFP in Abwesenheit von Ca^{2+} gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

Ein entscheidender Befund der Bindungsanalysen der Protein S-basierten Varianten war, dass die Affinität zu sfGFP sowohl in monomerer als auch in komplexierter Form beeinflusst werden konnte. So konnte durch die Komplexierung von Ca^{2+} durch EDTA nicht nur eine Bindung der Zielstruktur verhindert, sondern auch eine Dissoziation der Proteinkomplexe aus Protein S und sfGFP realisiert werden (Abbildung 24, S. 84). Die Zugänglichkeit der komplexierten Calciumionen der Protein S/sfGFP Komplexe für das chelatierende Agens (EDTA) wurde nicht sterisch gehindert, so dass die Dissoziation des Proteinkomplexes ohne Zeitverzug erfolgen konnte und nicht in Abhängig der Gleichgewichtsreaktion des Komplexes stand. Dies ermöglicht bei Einsatz des Bindeproteins in einer Affinitätschromatographie die Elution des Zielproteins in einem kleinen Volumen, da der Schaltungszustand der Liganden direkt geändert werden kann. Die ermittelten hohen Affinitäten des Bindeproteins mit langsamen Dissoziationsraten hätten zu einer sehr langsamen Dissoziation mit breiten Elutionspeaks geführt, wenn nur die monomere Form der Protein S-Varianten für EDTA sterisch zugänglich gewesen wäre. Weiterhin belegen die Messungen, dass die Protein S/sfGFP Komplexe durch die Interaktion der beiden Partner nicht so stark stabilisiert wurden, dass die geänderte Verfügbarkeit von Ca^{2+} für den Komplex nicht von Bedeutung wäre.

Die Konformationsänderungen des Wildtyp-Protein S bei Bindung von Ca^{2+} (Abbildung A5, S. A3) sind verglichen mit anderen Ca^{2+} -bindenden Proteinen wie Vertretern der EF-Hand Proteine sehr gering (Bagby *et al.* 1994; Dominguez *et al.* 2015). Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen jedoch, dass auch geringe Konformationsänderungen des Protein S genutzt werden können, um ein Bindeprotein mit vollständig unterschiedlichen Schaltungszuständen zu generieren. So konnte gezeigt werden, dass die notwendige Konformationsänderung der Protein S-Varianten für die Änderung des Schaltungszustandes auch bei sehr hohen Affinitäten und trotz verhältnismäßig moderater Bindungsaffinität ($\sim 10^{-6}$ M) des *scaffolds* zu Ca^{2+} (Tabelle 1, S. 9) möglich ist. Weiterhin konnte exemplarisch für eine Variante (CID 24) gezeigt werden, dass die Bindung vollständig reversibel erfolgt und der Schaltungszustand vielfach gewechselt werden kann (Abbildung 24, S. 84, Abbildung 25, S. 85).

Ein weiterer wichtiger Befund ergab sich aus den durchgeführten SPR-Analysen mit immobilisierter Protein S-Variante CID 24. Es konnte gezeigt werden, dass eine Immobilisierung über NHS-Chemie zur nativen und funktionellen Präsentation geeignet ist (Abbildung 25, S. 85). Die Kopplung resultierte in einer geringfügigen Verschlechterung der Affinität (Tabelle 31, S. 86) und erlaubte die Ca^{2+} -sensitive Konformationsänderung, die für die unterschiedlichen Schaltungszustände notwendig ist und somit eine Grundvoraussetzung für den Einsatz der Proteinvariante als Ligand einer Säulenchromatographie darstellt. Für ein der Zielstruktur sehr ähnliches Protein (eGFP) konnte eine vergleichbar starke Bindung nachgewiesen werden (Abbildung 25, S. 85, Tabelle 31, S. 86, sfGFP: 1,7 nM und eGFP 5 nM). Die beiden Zielstrukturen unterscheiden sich durch vier Aminosäuresubstitutionen (eGFP zu sfGFP: S30R, Y39N, F99S und N105T). Die Auswertung der Bindungskinetiken ergab unterschiedliche Dissoziationsgeschwindigkeiten, was ein Hinweis dafür sein kann, dass das Epitop eine Schnittmenge mit diesen Bereichen bildet. Die Oberflächendarstellung von Ladungsverteilungen lösungsmittel-exponierter Aminosäurereste auf Protein S CID 24 und sfGFP ergab ebenfalls keinen eindeutigen Hinweis (Abbildung A 8, S. A4) auf diese Bereiche oder mögliche andere Epitope.

Um die Beiträge zur Interaktion der einzelnen modularen Bereiche sowie der zusätzlichen Mutation N80Y der Protein S-Variante CID 24 zu untersuchen, wurden fünf zusätzliche Konstrukte generiert und charakterisiert (Tabelle 30, S. 82). Sowohl die Summe der Austausche der randomisierten Positionen als auch die zusätzliche Mutation innerhalb des Ca^{2+} -bindenden Sequenzmotives (N80Y) erwiesen sich als essentiell für die Bindung der Variante an sfGFP (Abbildung 23, S. 83). Bereits der Austausch von Y80N (CID 40) führte zu einem stark veränderten Bindungsverhalten zu sfGFP (CID 24: $K_D = 0,65$ nM, CID 40: $K_D = 690$ nM) und zeigte die Notwendigkeit dieser Aminosäuresubstitution außerhalb des randomisierten Bereiches für die Bindung. Der Austausch des ersten oder fünften Modules resultierte in einer ähnlich verschlechterten Bindung im Bereich von 10^{-6} M, was nahelegen könnte, dass in CID 24 aus beiden Bereichen Aminosäuren an der Bindung beteiligt sind. Einen noch größeren Effekt auf die Bindung zeigte jedoch die Veränderung des Modules 4 (CID 42). Nach Rückmutation der beteiligten Aminosäuren konnte keine signifikante Bindung mehr gemessen werden. Die Variation dieser Proteinvariante mit Austausch von N80Y (CID 43) zeigte interessanterweise keine erneut bessere Bindung, was darauf hinweist, dass der molekulare Bindungsmechanismus auch auf der Interaktion der in diesem Modul enthaltenen Aminosäuren basiert. Eine weitere

Erklärung wäre die modifizierte Interaktion durch Konformationsänderungen der Proteinvariante. Diese Möglichkeit ist nicht wahrscheinlich, kann durch die vorliegende Datenlage jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die SPR-Messungen der Varianten CID 42 und 43 zeigte auch bei hohen Proteinkonzentrationen lediglich eine sehr schwache Amplitude, wodurch eine sichere Bestimmung der Affinitäten in diesem Falle nicht möglich war. Da für die Analyse der randomisierten Bereiche keine einzelnen Aminosäurepositionen, sondern stets das gesamte Modul zu der dem Wildtyp-Protein entsprechenden Aminosäuren geändert wurden, lassen sich zu diesem Zeitpunkt keine detaillierten Aussagen über die Beteiligung einzelner Aminosäurereste an der Bindung treffen.

Weiterhin wurden keine Analysen zu der Beteiligung von Aminosäuren außerhalb der randomisierten Bereiche durchgeführt. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Rückmutation eines ganzen Modules zu Konformationsänderungen der Proteinvariante führt. Ein verändertes Bindungsverhalten könnte sowohl durch die direkte Beteiligung der entsprechenden Aminosäuregruppen erfolgen, als auch durch eine modifizierte räumliche Anordnung weiterer Aminosäuren. Ein weiterer interessanter Aspekt war der Befund, dass für alle der Varianten zur Untersuchung des molekularen Mechanismus in EDTA-vermittelter Abwesenheit von Ca^{2+} ebenfalls keine Bindung detektiert werden konnte. Dies zeigt, dass die Varianten durch die Bindung von Ca^{2+} wie auch die Ursprungsvariante noch eine Konformationsänderung erfahren.

Von besonderem Interesse ist die zusätzliche Mutation N80Y der Proteinvariante CID 24, die sich innerhalb des Ca^{2+} -bindenden Motives der Kristallinfamilie befindet (Aravind *et al.* 2009). Die Mutation befindet sich an der zweiten Position der zweiten Schleife des Doppelklammermotives auf der N-terminalen Domäne des Proteins („NYNVSS“ anstelle von „NNNVSS“, Abbildung 12, S. 64). Die auf einer Punktmutation basierende Substitution ist essentiell für die starke und schaltbare Bindung der Proteinvariante (Abbildung 23, S. 83, Tabelle 30, S. 82). Protein S-Variante CID 24 unterscheidet sich hinsichtlich ihrer Aminosäurekomposition signifikant von den angereicherten Motiven anderer Varianten. Nur eine weitere Variante (CID 23) zeigt eine ähnliche Sequenz und unterscheidet sich lediglich durch das dritte Modul (23: HYGS, 24: RYQF) und eine weitere Mutation des Gerüstproteins (Q103K) von Variante CID 24. Diese geringen Änderungen resultierten jedoch bereits in einer signifikanten Änderung der Proteineigenschaften, und Variante 23 wurde nach den sekundären Analysen (Abbildung 18, S. 75) nicht weiter analysiert. Die Variante zeigte im zweiten ELISA mit über IMAC gereinigten Varianten, kein signifikantes Signal. Aller Wahrscheinlichkeit nach waren die aufgrund der geringen Löslichkeit dieser Proteinvariante nur marginalen Ausbeuten der IMAC-Reinigung (Daten nicht gezeigt) der Grund. Sowohl Variante CID 23 als auch Variante CID 24 wurden aus den *pools* der sechsten RD-Runde gewonnen. Aufgrund des starken Einflusses der Mutation N80Y lässt sich vermuten, dass die zugrundeliegende Punktmutation zu einem verhältnismäßig späten Zeitpunkt stattgefunden hat, da sich ansonsten entsprechende Varianten vermehrt angereichert hätten.

Vergleicht man die erhaltenen Affinitäten der Protein S-Varianten hinsichtlich der vermuteten Bindungsfläche mit in der Literatur beschriebenen Werten anderer Gerüstproteine, so wird man ähnliche Verhältnisse finden. Gilbrecht und Koide (2012) verglichen für bindende Varianten vier verschiedener *scaffolds* die in der Interaktionsfläche verborgene Oberfläche mit den

ermittelten Affinitäten. Bei einer Fläche der Größenordnung von $\sim 1.000 \text{ \AA}^2$ wurden in dieser Veröffentlichung bindende Varianten im nanomolaren Bereich zusammengefasst. Berechnet man *in silico* die Lösungsmittelexposition aller Aminosäuren der randomisierten Positionen (+ Zusatzaustausch N80Y) eines Modelles der besten Protein S-Variante (CID 24), so erhält man eine Fläche von knapp 1450 \AA^2 bei einer Affinität von $0,65 \text{ nM}$ gegenüber sfGFP in Lösung (Software: PyMol, Modell von CID 24 siehe Abbildung A1). Ohne bekannte Struktur des Komplexes und Informationen über die an der Bindung beteiligten Aminosäuren kann jedoch keine fundierte Aussage getroffen werden und dieser Wert kann lediglich zu einer ersten Einschätzung herangezogen werden.

Die thermodynamische Charakterisierung der Bindung von CID 24 an sfGFP ergaben eine exotherme und vornehmlich enthalpisch getriebene Bindungsreaktion (Abbildung 26, S. 86). Aufgrund des mit 6 aromatischen Aminosäuren hohen Anteils an Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten der Protein S-Variante CID 24 (Modul 1: QQWQMA Modul 2: EWWDV Modul 3: RYQF Zusätzlich: N80Y) wäre eher eine tendenziell entropisch getriebene Bindung zu erwarten gewesen. Bislang existieren keine Daten über die an der Bindung beteiligten Aminosäuren, wenngleich gezeigt werden konnte, dass alle randomisierten Bereiche für die Wechselwirkung beteiligt sind (Abbildung 23, S. 83). Die über die Auswertung der van't Hoff-Darstellung ermittelten Werte der freien Bindungsenergie von $\Delta G^0 = -49 \pm 0,06 \text{ kJ/mol}$ (Abbildung 26, S. 86) entsprechen einer Wechselwirkung mit einer Affinität von ca. 1 nM und korrelieren sehr gut mit dem aus der kinetischen Auswertung des immobilisierten Protein S CID 24 erhaltenen Wert von $K_D = 1,7 \text{ nM}$ (Abbildung 25, S. 85). Die van't Hoff-Darstellung des logarithmisch aufgetragenen K_D über die reziproke Temperatur ergab eine in guter Näherung lineare Abhängigkeit. Dieser Zusammenhang lässt auf geringe Änderungen der Wärmekapazität bei der Komplexbildung im eingesetzten Temperaturbereich ($5\text{--}35 \text{ }^\circ\text{C}$) schließen (Prabhu und Sharp 2005).

Über die Messung der thermisch induzierten Proteinentfaltung mit einem fluoreszenzbasierten Verfahren (DSF, Abschnitt 3.4.5) konnte gezeigt werden, dass CID 24 in Lösung innerhalb des verwendeten Temperaturbereiches keiner messbaren Entfaltung unterlag (Abbildung 38, S. 112). Trotz der im Vergleich mit anderen Bindemolekülen niedrigen thermischen Stabilität des Proteins (Tabelle 26, S. 74) konnte aufgrund der hohen Kooperativität der Entfaltung eine Temperatur nahe der mittleren Übergangstemperatur verwendet werden. Es konnte gezeigt werden, dass unter $40 \text{ }^\circ\text{C}$ kein Anstieg des Fluoreszenzsignals erfolgte (Abbildung 38, Bildeinschub), was auf eine intakte Konformation der Protein S-Variante innerhalb diesen Temperaturbereiches hindeutet. Durch die Immobilisierung von Proteinen oder Enzymen kann oftmals deren Stabilität erhöht werden (Haouz *et al.* 2001; Singh *et al.* 2013). Durch die Immobilisierung des Protein S CID 24 über NHS-Chemie auf der Oberfläche des aktivierten CM5-Chips oder der Säulenmatrix könnte daher die Gesamtstabilität im Vergleich zu dem in Lösung vorliegenden Protein ebenfalls erhöht sein (keine Daten verfügbar).

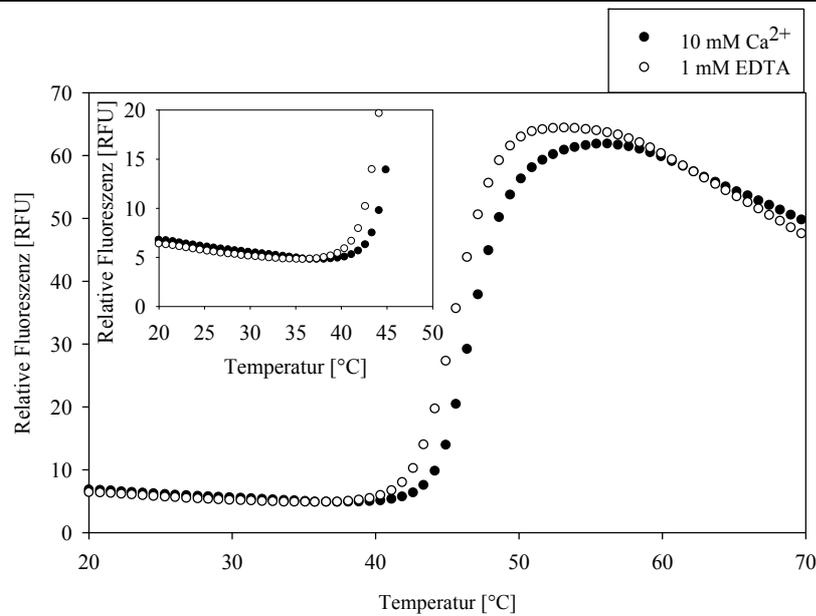


Abbildung 38: Messung der thermisch induzierten Proteinfaltung von Protein S-Variante CID 24 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} über DSF.

Es wurden für die Messungen 5 μg über IMAC und SEC gereinigtes Protein CID 24 in Anwesenheit von 10 mM Ca^{2+} (schwarz) und in EDTA-vermittelter Abwesenheit von Ca^{2+} (weiß) gemessen. Für alle Messungen wurden HEPES-gepufferte Saline pH 7,4 verwendet. Die Messung der thermisch induzierten Proteinfaltung erfolgte über den Fluoreszenzfarbstoff *Sypro orange*[®] über einen Temperaturbereich von 20–90°C und mit einer Heizrate von 1 K/min. Der Temperaturbereich von 20 bis 50 °C wurde gesondert dargestellt (Bildeinschub).

5.4 Verwendung des schaltbaren Bindeproteins CID 24 als neuartigen Liganden für die Affinitätschromatographie

Beispiele von in der Literatur beschriebener schaltbarer Affinitätssysteme sind der gegen das FLAG-Peptid gerichtete monoklonale Antikörper M1 (Prickett *et al.* 1989; Einhauer und Jungbauer 2001), ein gegen Kollektin-LK gerichteter monoklonaler Antikörper (Henriksen *et al.* 2014), Polyol-sensitive Antikörper (Thompson *et al.* 2003) sowie $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -sensitive Aptamere (Wehbe *et al.* 2015). Diese Systeme wurden bereits erfolgreich für die schonende Reinigung der jeweiligen Zielproteine eingesetzt, zeigten jedoch Nachteile hinsichtlich ihrer Schaltbarkeit. Insbesondere für Zielstrukturen, bei welchen eine multivalente Bindung besteht, ist eine vollständige Schaltbarkeit jedoch für die vollständige Desorption essentiell. So wurde für den monoklonalen Antikörper M1 in beiden Schaltungszuständen eine vergleichbar starke Bindung im μM -Bereich zu dem FLAG-Peptid festgestellt (Einhauer und Jungbauer 2001), was zu maßgeblich verringerten Ausbeuten des Zielproteins in der Elutionsfraktion führt. Auch der von Henriksen *et al.* (2014) beschriebene monoklonaler Antikörper zeigte Nachteile bei der Ca^{2+} -sensitiven Reinigung des Zielkonstruktes Kollektin-LK. Die in diesem Falle beobachteten Ausbeuten sowie die Reinheit des Zielproteins in der Elutionsfraktion waren jedoch mit einer Wiederfindungsrate von 38% und einer Reinheit von ca. 41% nicht optimal. Weiterhin sind die bei Verwendung diesen Antikörpers zur Ca^{2+} -sensitiven Reinigung der Zielstruktur benötigten langen Inkubationszeiten von 4 h für technische Applikationen ein großer Nachteil. Auch bei Verwendung von DNA-basierten Bindemolekülen wie Aptameren zur Ca^{2+} - und Mg^{2+} -sensitiven Reinigung von Viruspartikeln wurden aufgrund unvollständiger Schaltbarkeit vergleichsweise geringe Ausbeuten von 33% erhalten (Wehbe *et al.* 2015).

Auch die Interaktion natürlicher Partner kann für eine affinitätschromatographische Reinigung genutzt werden. So können beispielsweise Calmodulin-bindende Peptide (Stofko-Hahn *et al.* 1992) als Fusionskonstrukte dienen, um eine Ca^{2+} -sensitive Reinigung von Zielstrukturen zu ermöglichen. Eine weitere Methode besteht in der Fusion des Zielkonstruktes mit Wildtyp-Protein S, wodurch eine Reinigung mit milden Elutionsbedingungen durch die Komplexierung von Ca^{2+} über eine Matrix aus MX-Sporen erfolgen kann (Kobayashi *et al.* 2009). Ein gemeinsamer Nachteil dieser Technologien besteht jedoch in der Notwendigkeit zur Modifikation der Zielstrukturen, da die genetische Fusion mit einem *tag* oder Fusionspartner in Abhängigkeit des Zielproteins und des geplanten Anwendungsgebietes Nachteile bergen kann (Chant *et al.* 2005; Arnau *et al.* 2006; Pina *et al.* 2014). Durch die Verwendung kurzer Erkennungssequenzen für Affinitäts-*tags* verringert man zwar tendenziell negative Auswirkungen, verringert jedoch auch die Bindungsspezifität, da ähnliche Sequenzmotive in Proteinen wahrscheinlicher werden und die Ausprägung stabiler Faltungen unwahrscheinlicher (von Hagen 2011; Oeffinger 2012).

Die in dieser Arbeit vorgestellte Technologie erfüllt viele Anforderungen, die einen geeigneten Liganden für die Affinitätschromatographie ausmachen und gegenüber bisheriger Systeme signifikante Vorteile bringt. Die Verwendung von Protein S-basierten Bindemolekülen ermöglicht die Reinigung des anhangsfreien Zielproteins mit hoher Affinität der Interaktionspartner, kombiniert mit milden Elutionsbedingungen. Durch die spezifische molekulare Erkennung des Epitopes auf der Zielstruktur werden nur (in diesem Bereich) nativ gefaltete *targets* erkannt, was vorteilhaft gegenüber der Reinigung über Fusions-*tags* sein kann. Die beste der identifizierten Protein S-Variante zeigte neben einer sehr hohen Affinität zum Zielprotein SfGFP in Anwesenheit von Ca^{2+} („on“) eine hervorragende Schaltbarkeit, welche durch die Komplexierung von Ca^{2+} unter Zugabe von EDTA („off“) erfolgte. Obgleich die durch Konformationsänderungen verursachte Schaltung bei Protein S-Varianten zu unspezifischer Bindung in einem der beiden Zustände führen konnte (Abbildung 22, S.81) oder eine verbleibende Bindung an die Zielstruktur sfGFP in EDTA-vermittelter Abwesenheit von Ca^{2+} bestehen konnte, so betraf dies nicht die besten der untersuchten Varianten CID 10, 13 und 24.

Die Immobilisierung der Protein S-Variante CID 24 auf der Oberfläche einer Chromatographiesäule erfolgte über den Einsatz von NHS-Chemie, welche in Proteinen die primären Aminogruppen der Lysin-Seitenketten wie auch des Aminoterminus adressiert. Die Proteinvariante CID 24 verfügt über vier lösungsmittlexponierte Lysine (Aminosäurepositionen K46, K52, K135 und K145), welche ebenfalls im Wildtyp-Protein vorhanden sind (entsprechende Positionen in wt-Protein: K43, K49, K132 und K142). Drei weitere Lysine des Wildtyp-Proteins befinden sich auf dem Gerüstprotein in den randomisierten Bereichen und wurden im Falle von Variante CID 24 gegen andere Aminosäuren ausgetauscht (K15A, K98Y, K104F). Drei der insgesamt vier vorkommenden Lysine von CID 24 befinden sich innerhalb von β -Faltblattstrukturen, ein weiteres innerhalb der Schleifenregion der C-terminalen Domäne (Abbildung 39).

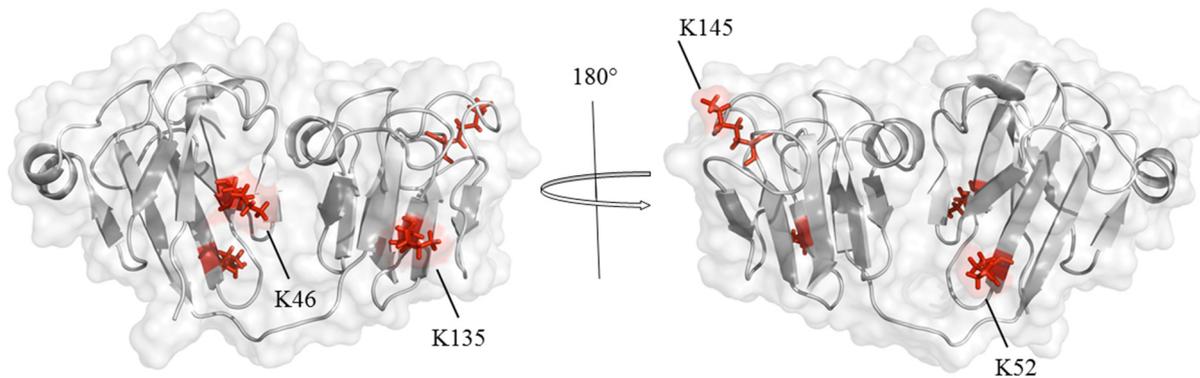


Abbildung 39: Modell von Protein S-Variante CID 24, basierend auf der Struktur des Wildtyp-Proteins (PDB: 1PRR).

Darstellung der Sekundärstrukturelemente und der Oberfläche des Modells von Protein S-Variante CID 24 mit farblich markierten Lysinseitenketten. Die Darstellung wurde mit der Software PyMol generiert. Die Rotamere der Mutagenesen wurden einzeln entsprechend ihrer Wahrscheinlichkeit automatisch durch die Software ermittelt, dem Modell liegen keine strukturellen Berechnungen zugrunde.

Von den vier Lysinen des Proteins befindet sich nur eines in örtlicher Nähe des *de novo*-generierten Paratopes. Zusammen mit dem Aminoterminus des Proteins verfügt CID 24 dementsprechend über fünf Kopplungsmöglichkeiten bei Verwendung von NHS-Chemie für die Immobilisierung. Aufgrund der geringen Spezifität dieser Immobilisierungsmethode ist es denkbar, dass neben dem (unter den gewählten Reaktionsbedingungen) präferiert adressierten Terminus auch die lösungsmittel-exponierten Lysine an der Reaktion beteiligt waren. Die Abschätzung funktional immobilisierter Protein S-Variante CID 24 erfolgte über das Verhältnis des in der Immobilisierung eingesetzten Gesamtproteins von 12,6 mg zu der dynamischen Bindungskapazität an sfGFP (12,65 mg) der hergestellten Säule unter Annahme einer 1:1 Bindungsstöchiometrie. Diese Annahme stand in Einklang zu den guten Näherungen der Regressionen eines 1:1-Bindungsmodelles der SPR-Messungen und konnte mittels Ultrazentrifugation verifiziert werden (Abbildung 25, S. 85 und Abbildung 27, S. 87). Die Messungen ergaben mit 9,6 mg ($\frac{MW_{Protein\ S}}{MW_{sfGFP}} \times Kapazität_{sfGFP} = \frac{20,2\ kDa}{26,6\ kDa} \times 12,65\ mg \triangleq 9,6\ mg$) von 12,6 mg eingesetzter Proteinvariante CID 24 einen hohen Anteil von ca. 76% funktional immobilisierten Proteins (Abbildung 29, S. 89).

Man könnte mutmaßen, dass ein Teil der Proteine trotz der gewählten Bedingungen zur präferentiell terminalen Kopplung (3.4.6) auch über Lysinseitenketten immobilisiert wurden und noch funktional waren. Weiterhin ist denkbar, dass diejenigen Varianten, bei welchen die Kopplung (auch) über Lysin 142 erfolgte, aufgrund sterischer Hinderung nicht mehr funktional präsentiert sind. Die ermittelte Ausbeute funktional gekoppelten Proteins würde gut zu einem theoretischen Wert von $\frac{4}{5} \triangleq 80\%$ günstiger $-NH_2$ Reste für die Reaktion passen. Interessant wäre es in diesem Zusammenhang, z.B. über Techniken der ortsgerichteten Mutagenese Varianten ohne Lysine sowie Varianten mit definierten, einzelnen Lysinen zu erstellen und deren Kopplungseffizienz zu untersuchen. Sollte sich herausstellen, dass die Lysine innerhalb der Sekundärstrukturelemente tatsächlich für eine funktionale Immobilisierung verwendbar sind, könnte man Lysine in zukünftigen Bibliotheken vermeiden, um eine einfache Immobilisierungsstrategie für neue Varianten zur Verfügung zu haben. Zumindest bei den erhaltenen Varianten der Selektion gegen sfGFP waren Lysine mit einem Vorkommen von 6% ohnehin unterrepräsentiert (Abbildung 17, S. 72). Jedoch lässt sich nicht ausschließen, dass für bestimmte Epitope weiterer *targets* Lysine für bindende Varianten benötigt werden.

Informationen, ob das Lysin an Aminosäureposition 142 des *scaffolds* ohne Auswirkung auf Stabilität und Löslichkeit substituiert werden kann, liegen zurzeit ebenfalls nicht vor. Alternativ könnten für eine gerichtete Kopplung an Matrices oder andere Moleküle auch definiert einzelne Cysteine am N- oder C-Terminus genetisch angefügt werden.

Für technische Applikationen ist neben der Spezifität und Affinität der Interaktion besonders die Kapazität der eingesetzten Chromatographiesäulen von hoher Bedeutung. Aufgrund des hohen Anteils funktional immobilisierten Proteins war die Kapazität der in dieser Arbeit hergestellten Chromatographiesäule mit 12,65 mg sfGFP sehr gut. Im Vergleich wurden für alternative sfGFP-spezifische Chromatographiesäulen auf Basis von Nanobodies (GFP-Trap[®], Chromotek GmbH) Kapazitäten mit ca. 700 ng/ml Medium beschrieben (Herstellerangaben). Ein vergleichsweise einfacher Ansatz zur Erhöhung der Säulenkapazität wäre die Erstellung von *tandem repeat* Proteinen für die Immobilisierung. Solche *tandem repeats* wurden für die N-terminale Domäne des Protein S bereits als funktional beschrieben (Kobayashi *et al.* 2009) und könnten möglicherweise auch auf Varianten des Volllängenproteins übertragen werden. Zur Vermeidung sterischer Hinderungen der Zielstrukturen und daraus resultierenden eingeschränkten Verbesserungen der Kapazität könnten diese *repeat* Proteine auch mit genetisch fusionierten und flexiblen Platzhaltersequenzen wie z.B. PAS-Motiven (Schlapschy *et al.* 2013) kombiniert werden.

Die Vorteile eines Liganden mit hoher Affinität für ein effektives *capturing* der Zielstruktur konnten mit der immobilisierten Protein S-Variante CID 24 gezeigt werden (Abbildung 31, S. 91). Die eingesetzte Konzentration des sfGFP betrug mit ca. 50 nM knapp das 30fache des K_D -Wertes des immobilisierten Liganden (Tabelle 31, S. 86, Abbildung 25, S. 85). Der Vergleich der erhaltenen Peak-Flächen nach Elution des Zielproteins ergab eine gute Ausbeute von >95% im Vergleich zu einem *capturing* einer gleichen Menge sfGFP aus einem geringeren Volumen von 1 ml HBSC. Die über Plasmonresonanzspektroskopie (Abbildung 25, S. 85) ermittelte hohe Affinität des immobilisierten Bindeproteins konnten in diesem Experiment bestätigt und erfolgreich für das *capturing* der verdünnt vorliegenden Zielstruktur verwendet werden.

Die Technologie zur milden Desorption über EDTA hat zudem Potential, eine bessere Reinheit der Zielmoleküle realisieren zu können. Über vergleichsweise harsche Methoden wie extreme pH-Werte wird in Antikörper-basierten Systemen die Bindung zwischen Antikörper und Antigen unspezifisch beeinträchtigt. Dies kann dazu führen, dass ebenfalls unspezifisch an die Matrix gebundene Verunreinigungen eluiert werden, da auch deren Wechselwirkungen durch die Pufferbedingungen beeinträchtigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass CID 24 keine unspezifischen Wechselwirkungen zu endogenen Proteinen unterschiedlichen Ursprungs aufweist. Die Analyse der Elutionsfraktion nach erfolgter Affinitätschromatographie aus *E. coli*- oder *CHO*-Zellextrakten über SDS-PAGE ergab ein reines Produkt ohne detektierbare Verunreinigungen (Abbildung 33, S. 92). Die Verwendung von Lysaten aus *CHO*-Kulturen diene hierbei in erster Linie der Präsentation endogener Proteine aus eukaryotischen Zellen zur Überprüfung der Spezifität des neuartigen Bindeproteins. In eukaryotischen Produktionen werden Zielproteine in der Regel sezerniert und verbleiben nicht intrazellulär, so dass Stamm-basierte Verunreinigungen in geringeren Konzentrationen vorkommen würden. Da das in diesen Experimenten eingesetzte Volumen sehr klein war, könnte die insgesamt eingesetzte

Menge an Fremdprotein jedoch eine ähnliche Größenordnung haben wie bei einer typischen Reinigung aus großen Volumina an Zellkulturüberständen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine verbleibenden Verunreinigungen durch DNA oder Endotoxine untersucht. Die Chromatogramme (Abbildung 32, S. 92) zeigten geringe zusätzliche Peaks, die noch vor dem Totvolumen der Säule eluiert wurden und wahrscheinlich auf Verunreinigungen der Anlage zurückzuführen sind. Die Peaks waren zudem vollständig von den eluierten Zielstrukturen getrennt. Aufgrund der hohen Affinität des immobilisierten Liganden in Anwesenheit von Ca^{2+} (Abbildung 25, S. 85) hätten die durchgeführten Waschschriffe jedoch bei Bedarf stringenter gestaltet werden können. Für die Optimierung der Reinigungsstrategie bei Verwendung der schaltbaren Liganden könnte in zukünftigen Arbeiten zunächst der Einfluss von Detergenzien auf die Interaktion untersucht werden, um deren Einsatz in Waschschriffen planen zu können.

Die Kombination der hohen Affinitäten und milden Desorptionsbedingungen dieser Methode bietet grundsätzliche Vorteile für verschiedene Anwendungsgebiete. Neben der Reinigung von vergleichsweise stabilen Zielproteinen wie monoklonalen Antikörpern werden affinitätschromatographische Reinigungsschriffe auch für weniger stabile Zielproteine verwendet. Ein weit verbreitetes Forschungsfeld der in dieser Arbeit verwendeten Zielstruktur GFP liegt in der *in vivo* Lokalisation von Proteinen und der Visualisierung der Dynamik von Genexpressionen (Chalfie *et al.* 1994; Nienhaus und Nienhaus 2014). Zusätzlich zu den mikroskopischen Untersuchungen sind Informationen über die biochemischen Eigenschaften wie der Stabilität, DNA-Bindung, enzymatischen Aktivität oder Komplexbildung der untersuchten Proteine von Interesse. Zur Isolierung der Zielproteine (oder Zielkomplexe) aus komplexen Gemischen werden oftmals affinitätschromatographische Systeme genutzt (Kellogg und Moazed 2002). Aufgrund der geringen Menge vorhandenen Zielproteins bieten hoch-affine Systeme Vorteile für die Reinigung. Antikörper-basierte Systeme können durch Co-Elution von leichten oder schweren Ketten nachfolgende Analysen beeinflussen, was beispielsweise durch die Entwicklung von GFP-bindenden Nanobodies vermieden werden konnte (Rothbauer *et al.* 2008). Nachteile sowohl von Antikörper- als auch Nanobody-basierter Systeme liegen jedoch vor allem auch in den Elutionsbedingungen, welche aufgrund der hohen Affinität der verwendeten Bindemoleküle in der Regel sehr harsch sind und zu geringen Ausbeuten an funktionalem Zielprotein führen können (Burgess und Thompson 2002). Die Verwendung des in dieser Arbeit beschriebenen Bindeproteins CID 24 könnte durch die Kombination der hohen Affinität, Spezifität sowie den milden Desorptionsbedingungen deutliche Vorteile bieten. Als weitere Vorarbeiten wäre es interessant, mehr über das von Variante CID 24 erkannte Epitop auf der Oberfläche von sfGFP zu erfahren. Hierzu wären weitere Experimente zur hochauflösenden Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie notwendig. Weiterhin wäre es von Interesse, bestehende sfGFP-Fusionsproteine für eine Reinigung zu verwenden und kinetische Bindungsparameter mit anhangsfreien sfGFP zu vergleichen.

Besonders für die Reinigung von nicht-kovalent verbundenen Proteinkomplexen, labilen Multidomänenkomplexen oder empfindlichen Enzymen könnten Ca^{2+} -sensitive Reinigungssysteme Vorteile bieten. Jedoch wären auch bindende Varianten gegen stabilere Zielstruktur von Interessen, da sie möglicherweise im Vergleich zu existierenden Methoden weitere Vorteile liefern. So wäre ein interessantes Anwendungsgebiet von Protein S-basierten Bindeproteinen

die Generierung von Fc-Fragment bindenden Varianten. Durch die genetische Fusion von Zielstrukturen mit Fc-Fragmenten von Antikörpern können chimäre Moleküle generiert werden (Carter 2011; Czajkowsky *et al.* 2012), die vor allem für Forschungszwecke verwendet werden. Ein Vorteil dieser Chimären liegt in der Möglichkeit zur Verwendung von generischen Reinigungsmethoden, die den Fc-Bereich adressieren. Jedoch sind bei Verwendung von Protein A-basierten Reinigungsmethoden harsche Desorptionsmethoden notwendig, was zu verringerten Ausbeuten an aktivem Zielmolekül führen kann, da die fusionierten Proteine wesentlich geringere Stabilitäten aufweisen können. Auch eine Verschlechterung der Produktqualität durch Modifikation oder Konformationsänderungen kann die Reinigung funktionaler Zielproteine erschweren, da produktähnliche Verunreinigungen oftmals schwer abtrennbar sind. Dies könnte bei Verwendung eines schaltbaren Liganden möglicherweise vermieden werden. Notwendig wäre für diese Anwendung die Generierung eines Bindeproteins, das an den Fc-Teil von Antikörpern bindet, was durch eine erneute Selektion erreicht werden könnte.

Die molekulare Erkennung von Fc-Teilen durch artifizielle Bindeproteine könnte auch für die Reinigung von Vollängen-Antikörpern verwendet werden. Obgleich bei der Produktion monoklonaler Antikörper niedrige pH-Werte oftmals nicht nur für die Elution, sondern zeitgleich für eine Virusinaktivierung genutzt werden, könnte auch in diesen Verfahren unter Umständen eine schaltbare Bindung Vorteile bieten. So können alternative Systeme wie die Verwendung von Detergenzien für eine Virusinaktivierung verwendet werden, was im Falle von monoklonalen Antikörpern mit geringerer Stabilität von Interesse sein kann. Eine detailliertere Charakterisierung des Chromatographiesystems hinsichtlich der Fähigkeiten zur Abreicherung von Viruspartikeln wäre für zukünftige Untersuchungen notwendig. Da die Desorption der Zielmoleküle durch sehr geringe Unterschiede in der Pufferzusammensetzung erfolgt, könnte das System potentiell (keine Daten verfügbar) eine bessere Trennung als bisherige Systeme bieten, da unspezifisch gebundene Moleküle mit niedrigerer Wahrscheinlichkeit koeluiert werden.

Für die Diagnostik sehr interessante Marker sind lebende zirkulierende Tumorzellen (CTC; *circulating tumor cells*), die in geringen Konzentrationen in den Blutbahnen von Patienten vorkommen (Joosse *et al.* 2014). Der Einsatz schaltbarer Bindeproteine könnte zu einer verbesserten Gewinnung lebensfähiger Zellen führen, ohne auf den Einsatz von Proteasen angewiesen zu sein. So könnte die Desorption der Zellen theoretisch direkt in einem geeigneten Medium für eine weitere Kultivierung stattfinden. Da auf der Oberfläche von Zellen eine Vielzahl der adressierten Marker vorhanden ist, wird es bei einer affinitätschromatographischen Reinigung aller Wahrscheinlichkeit nach zu einer erhöhten Bindung durch Aviditäts-Effekte kommen. Die Ausbeute einer Elution hängt daher in starkem Maße von der vollständigen Desorption aller beteiligten Interaktionspartner ab. Bei Verwendung einer Protease-basierten Elutionsmethode kann es daher notwendig sein, den für die Immobilisierung der Liganden verwendeten *linker* für eine Zugänglichkeit der Protease individuell zu optimieren. Sofern verwendete Proteasen in dem verwendeten Medium der Zellen nicht über die volle Aktivität verfügen, können daher Reinigungsschritte in artifiziellen Puffersystemen notwendig sein, was jedoch auch zu Änderungen der Zellzustände führen kann. Neben verbleibenden Proteasen im Medium kann ein weiterer Nachteil zudem durch den Verbleib des Liganden an den Rezeptormolekülen entstehen. Dieser kann potentiell Effektorfunktionen hervorrufen, oder eine

signifikante Anzahl von Rezeptoren pro Zelle blockieren, wodurch die Viabilität der Zellen oder auch der Zellzustand beeinflusst werden kann (Multhaupt *et al.* 2015). Letztendlich können die verwendeten Säulen bei einer Elution über Proteasen nicht regeneriert und wiederverwendet werden, was die Kosten erhöht.

Für den Einsatz entsprechender schaltbarer Bindemoleküle wäre zunächst die Entwicklung von Varianten mit Bindungseigenschaften gegen typische Tumor-Markerproteine notwendig. Typische Konzentrationen freien Ca^{2+} in Blut liegen in der Größenordnung von 1,0–1,3 mM (Larsson und Ohman 1978) und wären daher wahrscheinlich (Prämisse: ähnliche Ca^{2+} -Abhängigkeit wie analysierte Protein S-Variante) ausreichend hoch für Liganden, die auf Protein S basieren (Abbildung 27, S. 87). Da in der Regel aufgrund der niedrigen Konzentrationen der zirkulierenden Tumorzellen im Blut jedoch große Probenvolumina und hohe Verweilzeiten in Serum benötigt werden, müssten die Liganden über eine hohe Proteasestabilität verfügen. Hinsichtlich der Verwendbarkeit Protein S-basierter Systeme für diese Anwendungsgebiete existieren zurzeit jedoch keine Informationen. Als Sporenhüllprotein wäre für Protein S eine hohe Immunogenizität zu erwarten, was detaillierte Studien über die Ablösung des Proteins von den verwendeten Trägermaterialien vor einer solchen Verwendung notwendig machen würde.

Für Forschungszwecke könnte jedoch auch die schonende Reinigung weiterer Zelltypen durch schaltbare Binder Vorteile bieten. In Abhängigkeit der gesuchten Zellen könnte man auch über eine Bindung in EDTA-vermittelter Abwesenheit und eine Elution über die Zugabe von Ca^{2+} in Erwägung ziehen und Selektionsprozesse dahingehend etablieren. Diese Strategie wäre jedoch effizienter für *scaffolds*, welche eine höhere Affinität zu Ca^{2+} aufweisen als das in dieser Arbeit verwendete Protein S, da die eingesetzten Konzentrationen an Ca^{2+} für die Elution möglicherweise niedriger gewählt werden könnten. Mögliche Kandidaten für die Verwendung als *scaffolds* wären beispielsweise Vertreter der EF-Hand oder C2 Protein-Familien, welche neben hohen Affinitäten zu Ca^{2+} über hohe Konformationsunterschiede in Apo- und Holo-Zuständen verfügen, welche man möglicherweise für die schaltbare Bindung von Zielstrukturen nutzen könnte. Die vergleichsweise moderate Bindung von Ca^{2+} mit 27 und 76 μM durch die beiden Domänen des Protein S (Teintze *et al.* 1988) erlaubt jedoch eine leichte Chelatierung des an das Protein gebundene Ca^{2+} , was die Elution des Zielproteins mit der in dieser Arbeit verfolgten Strategie erleichtert. Bislang existieren jedoch noch keine Daten darüber, wie hoch die Affinität des *scaffolds* zu Ca^{2+} sein muss, um eine Schaltbarkeit der Proteine zu gewährleisten. Auch konnten bislang keine Informationen über die Affinität und Stöchiometrie der Calciumbindung der untersuchten sfGFP-bindenden Proteine oder Varianten der naiven Bibliotheken erhalten werden (Muchow 2013).

Auch für die Optimierung von Proteinen und Enzymen könnte eine mild schaltbare Bindung von Interesse sein. So könnten Enzymvarianten auf der Oberfläche von Trägermaterialien immobilisiert und nach vollzogener Primäranalyse ohne die Notwendigkeit einer erneuten Produktion weiter charakterisiert oder quantifiziert werden (persönliche Kommunikation H. Friis-Madsen, Novozymes). Für die Immobilisierung von GFP-fusionierten Konstrukten könnte die in dieser Arbeit detektierte Protein S-Variante aufgrund der hohen Affinität eingesetzt werden. So könnten beispielsweise Proteinvarianten mit GFP-Fusion über immobilisierte Protein S-Varianten für den Einsatz in SPR-, BLI- oder auch Mikrotiterplatten-basierten Systemen verwendet werden. Ein Vorteil bei Verwendung des Messaufbaus wäre,

dass die zu untersuchenden Varianten mit GFP-Fusion identisch immobilisiert sind und daher keine Effizienzunterschiede der Kopplung in Abhängigkeit der verwendeten Varianten besteht. Weiterhin könnten die untersuchten Varianten nach erfolgter Messung eluiert und für weitere Analysen verwendet werden. Der Verzicht auf eine individuelle Kopplung würde weiterhin Material- und Zeitersparnisse bringen. Auch kann es bei der Interaktionsbestimmung von kleinen Analyten teilweise von Vorteil sein, den kleineren Interaktionspartner zu immobilisieren, um eine bessere Amplitude der Messung zu erhalten. Im Vergleich zu einer Immobilisierung über Fusionspeptide wäre die Immobilisierung über die hoch affine Wechselwirkung effizienter und könnte unter Umständen auch für eine Qualitätskontrolle der Zielkandidaten verwendet werden, wenn nur nativ gefaltete Epitope durch das Bindeprotein erkannt werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit eine neuartige Klasse an Bindeproteinen diskutiert, die kurzfristig hohes Potential vor allem für technische Applikationen bietet. Durch die Verwendung Ca^{2+} -sensitiver Gerüstproteine besteht die Möglichkeit, eine maßgefertigte und schaltbare Bindung zu Zielproteinen zu generieren. Vorteile konventioneller Bindemoleküle können so mit einer einfachen und schonenden Desorption der Zielstrukturen vereint werden. Die Elution der Zielstruktur basiert bei diesem System nicht auf einer kompetitiven Reaktion um bindende Elemente, sondern auf der Änderung der Konformation des verwendeten Bindeproteins, was zeitgleich hohe Affinitäten und effektive Dissoziationen in den jeweiligen Schaltungszuständen ermöglicht. Diese neue Technologie hebt sich von existierenden Alternativen daher deutlich ab und bietet zudem einen interessanten neuen Aspekt von artifiziellen Bindemolekülen gegenüber Antikörpern.

6. Ausblick

Die Strategie zur Generierung einer neuartigen und leicht regulierbaren Bindung an eine vorgegebene Zielstruktur durch die Ausnutzung intrinsischer Eigenschaften der Gerüststruktur war erfolgreich. Die generierten Bibliotheken auf Basis des Protein S zeigten deutlich verringerte Löslichkeit und thermische Stabilität, dennoch konnten erfolgreich Ca^{2+} -sensitive und hoch affin bindende Varianten mit hervorragender Schaltbarkeit gegen sfGFP generiert werden.

Zur Optimierung der bestehenden Protein S Bibliothek wäre eine Strukturaufklärung des Komplexes zwischen CID 24 und sfGFP aber auch zwischen Wildtyp Protein S und MX-Sporen interessant. Der verhältnismäßig große Anteil von 15 randomisierten Positionen auf der Oberfläche des Gerüstproteins ist aller Wahrscheinlichkeit nach Grundlage für die verringerten Stabilitäten der Varianten. Durch eine Optimierung der randomisierten Bereiche ließen sich möglicherweise Bibliotheken mit verbesserten Eigenschaften der enthaltenen Proteinvarianten generieren. Hierbei würde es sich anbieten, das Ca^{2+} -sensitive Paratop des *scaffolds* genau zu charakterisieren und auch alternative Bibliotheksformate zu untersuchen, bei welchen insgesamt weniger Aminosäurepositionen für eine Randomisierung ausgewählt werden. Diese könnten auch auf Basis der vorhandenen Daten von Varianten mit Einzelsubstitutionen von Aminosäuren ausgewählt werden.

Da eine zusätzlich zu den randomisierten Bereichen aufgetretene Mutation der Position N80Y (wt-Position N77) der Proteinvariante CID 24 einen maßgeblichen Einfluss auf das Bindungsverhalten zeigte, wären weitere Untersuchungen zu dem Einfluss von Mutationen in den Ca^{2+} -bindenden Sequenzmotiven sinnvoll. Interessant wäre der Befund, ob durch die Randomisierung dieser Position auch gegen andere *targets* Varianten mit überlegenen Bindungseigenschaften generieren lassen, oder ob es sich um ein sfGFP-typisches Merkmal handelt. Sollte sich diese Position als essentiell erweisen könnte zudem in Betracht gezogen werden, auch weitere Aminosäurepositionen in den Ca^{2+} -bindenden Motiven mit in ein Bibliotheksdesign zu integrieren. Jedoch sollte zunächst eine nähere Charakterisierung auf den Einfluss der Bindungseigenschaften von Ca^{2+} bei einer solchen Mutagenese durchgeführt werden, um die Schaltbarkeit der Varianten einer solchen Bibliothek zu gewährleisten.

Zukünftig durchgeführte Selektionen gegen unterschiedlichste Zielstrukturen könnten mit angepassten Strategien durchgeführt werden. Es konnte gezeigt werden, dass auch hoch-affin bindende Varianten über eine komplett schaltbare Bindung verfügen können und daher kann sich eine Selektion auch in diese Richtung orientieren.

Für die sfGFP bindende Protein S-Variante CID 24 könnte man in folgenden Experimenten zunächst prozesstechnisch relevante Parameter charakterisieren. So wäre es sinnvoll die verwendbare Ionenstärke typischerweise in *downstream* Prozessen verwendeter Salze, die Detergenzverträglichkeit und den Einfluss des pH-Wertes auf die Bindung detailliert zu untersuchen. Zur systematischen Analyse der Wechselwirkungen unterschiedlicher Pufferbedingungen würden sich für solche Untersuchungen eine statistische Versuchsplanung (*design of experiment*) anbieten. Von Interesse wären zudem Informationen über die Basenstabilität um Regenerationsverfahren für die Säulen zu entwickeln. Möglich wäre auch die Untersuchung potentieller Rückfaltungverhalten für die immobilisierte Variante, da zumindest das Wildtyp-Protein nach chemischer und thermischer Entfaltung reversibles Verhalten zeigt (Wenk und Mayr 1998). Für weitere Entwicklungen wäre auch eine Maturierung der erhaltenen Protein S-

Variante auf erhöhte Stabilität und zur Optimierung der Produktion mit verbesserter Löslichkeit sinnvoll. Prinzipiell ließe sich das entwickelte Bindeprotein jedoch auch ohne weitere Vorarbeiten für die Reinigung des Zielproteins verwenden, da es im Vergleich zu etablierten Systemen große Vorteile bietet.

7. Literaturverzeichnis

- Abdullah, N. und Chase, H.A.** (2005). "Removal of poly-histidine fusion tags from recombinant proteins purified by expanded bed adsorption." *Biotechnology and Bioengineering* 92(4): 501-513.
- Abi-Ghanem, D.A. und Berghman, L.R.** (2012). *Immunoaffinity Chromatography: A Review*, InTech.
- Amstutz, P., Binz, H. K., Zahnd, C., and Plückthun, A.** (2006). "Ribosome Display: In Vitro Selection of Protein-Protein Interactions." *Cell Biology - A Laboratory Handbook 1*(3rd Edition): 497-509.
- Amstutz, P., Forrer, P., Zahnd, C. und Pluckthun, A.** (2001). "In vitro display technologies: novel developments and applications." *Current Opinion in Biotechnology* 12(4): 400-405.
- Aravind, P., Mishra, A., Suman, S.K., Jobby, M.K., Sankaranarayanan, R. und Sharma, Y.** (2009). "The betagamma-crystallin superfamily contains a universal motif for binding calcium." *Biochemistry* 48(51): 12180-12190.
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G.E. und Pedersen, J.** (2006). "Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins." *Protein Expression and Purification* 48(1): 1-13.
- Bagby, S., Harvey, T.S., Eagle, S.G., Inouye, S. und Ikura, M.** (1994). "NMR-derived three-dimensional solution structure of protein S complexed with calcium." *Structure* 2(2): 107-122.
- Barnwal, R.P., Jobby, M.K., Devi, K.M., Sharma, Y. und Chary, K.V.** (2009). "Solution structure and calcium-binding properties of M-crystallin, a primordial betagamma-crystallin from archaea." *Journal of Molecular Biology* 386(3): 675-689.
- Beckman, R.A., Weiner, L.M. und Davis, H.M.** (2007). "Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors." *Cancer* 109(2): 170-179.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. und Stryer, L.** (2006). *Biochemistry: international edition*, WH Freeman & Company Limited.
- Binz, H.K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M.T., Briand, C., Forrer, P., Grutter, M.G. und Pluckthun, A.** (2004). "High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries." *Nature Biotechnology* 22(5): 575-582.
- Binz, H.K., Amstutz, P. und Pluckthun, A.** (2005). "Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains." *Nature Biotechnology* 23(10): 1257-1268.
- Bjorck, L. und Kronvall, G.** (1984). "Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent." *Journal of Immunology* 133(2): 969-974.
- Blundell, T., Lindley, P., Miller, L., Moss, D., Slingsby, C., Tickle, I., Turnell, B. und Wistow, G.J.** (1981). "The molecular structure and stability of the eye lens: x-ray analysis of gamma-crystallin II." *Nature* 289: 771-777.
- Brauchle, M., Hansen, S., Caussin, E., Lenard, A., Ochoa-Espinosa, A., Scholz, O., Sprecher, S.G., Pluckthun, A. und Affolter, M.** (2014). "Protein interference applications in cellular and developmental biology using DARPins that recognize GFP and mCherry." *Biology open* 3(12): 1252-1261.
- Buchanan, A.** (2012). "Evolution of protein stability using ribosome display." *Methods in Molecular Biology* 805: 191-212.
- Burgess, R.R. und Thompson, N.E.** (2002). "Advances in gentle immunoaffinity chromatography." *Current Opinion in Biotechnology* 13(4): 304-308.
- Butt, T.R., Edavettal, S.C., Hall, J.P. und Mattern, M.R.** (2005). "SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins." *Protein Expression and Purification* 43(1): 1-9.
- Carter, P.J.** (2011). "Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective." *Experimental Cell Research* 317(9): 1261-1269.
- Chaiken, I., Rose, S. und Karlsson, R.** (1992). "Analysis of macromolecular interactions using immobilized ligands." *Analytical Biochemistry* 201(2): 197-210.
- Chakravarty, S., Mitra, N., Queitsch, I., Surolia, A., Varadarajan, R. und Dubel, S.** (2000). "Protein stabilization through phage display." *FEBS Letters* 476(3): 296-300.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. und Prasher, D.C.** (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." *Science* 263(5148): 802-805.
- Chant, A., Kraemer-Pecore, C.M., Watkin, R. und Kneale, G.G.** (2005). "Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site." *Protein Expression and Purification* 39(2): 152-159.

- Chase, H.** (1984). "Affinity separations utilising immobilised monoclonal antibodies—a new tool for the biochemical engineer." *Chemical Engineering Science* 39(7): 1099-1125.
- Chevrel, A., Urvoas, A., de la Sierra-Gallay, I.L., Aumont-Nicaise, M., Moutel, S., Desmadril, M., Perez, F., Gautreau, A., van Tilbeurgh, H., Minard, P. und Valerio-Lepiniec, M.** (2015). "Specific GFP-binding artificial proteins (alphaRep): a new tool for in vitro to live cell applications." *Bioscience Reports* 35(4).
- Clout, N.J., Kretschmar, M., Jaenicke, R. und Slingsby, C.** (2001). "Crystal structure of the calcium-loaded spherulin 3a dimer sheds light on the evolution of the eye lens betagamma-crystallin domain fold." *Structure* 9(2): 115-124.
- Cole, J.L., Lary, J.W., T, P.M. und Laue, T.M.** (2008). "Analytical ultracentrifugation: sedimentation velocity and sedimentation equilibrium." *Methods in Cell Biology* 84: 143-179.
- Cotten, S.W., Zou, J., Wang, R., Huang, B.C. und Liu, R.** (2012). "mRNA display-based selections using synthetic peptide and natural protein libraries." *Methods in Molecular Biology* 805: 287-297.
- Cuatrecasas, P., Wilchek, M. und Anfinsen, C.B.** (1968). "Selective enzyme purification by affinity chromatography." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 61(2): 636-643.
- Czajkowsky, D.M., Hu, J., Shao, Z. und Pleass, R.J.** (2012). "Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives." *EMBO molecular medicine* 4(10): 1015-1028.
- Dahiyat, B.I.** (1999). "In silico design for protein stabilization." *Current Opinion in Biotechnology* 10(4): 387-390.
- di Guana, C., Lib, P., Riggsa, P.D. und Inouyeb, H.** (1988). "Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein." *Gene* 67(1): 21-30.
- Dominguez, D.C., Guragain, M. und Patrauchan, M.** (2015). "Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes." *Cell Calcium* 57(3): 151-165.
- Dreier, B. und Plückthun, A.** (2011). "Ribosome display: a technology for selecting and evolving proteins from large libraries." *Methods in Molecular Biology* 687: 283-306.
- Dworkin, M. und Gibson, S.M.** (1964). "A System for Studying Microbial Morphogenesis: Rapid Formation of Microcysts in *Myxococcus Xanthus*." *Science* 146(3641): 243-244.
- Ebersbach, H., Fiedler, E., Scheuermann, T., Fiedler, M., Stubbs, M.T., Reimann, C., Proetzel, G., Rudolph, R. und Fiedler, U.** (2007). "Affilin-novel binding molecules based on human gamma-B-crystallin, an all beta-sheet protein." *Journal of Molecular Biology* 372(1): 172-185.
- Einhauer, A. und Jungbauer, A.** (2001). "Affinity of the monoclonal antibody M1 directed against the FLAG peptide." *Journal of Chromatography A* 921(1): 25-30.
- Einhauer, A. und Jungbauer, A.** (2003). "Complex formation of a calcium-dependent antibody: a thermodynamical consideration." *Journal of Chromatography A* 1009(1-2): 81-87.
- Eng, G.Y., Jones, L. und Medina, M.** (1995). "Characterization of an immobilized protein matrix for use in an affinity method for β -lactam antibiotics." *Biotechnology and Applied Biochemistry* 22: 129-144.
- Epps, D.E., Sarver, R.W., Rogers, J.M., Herberg, J.T. und Tomich, P.K.** (2001). "The ligand affinity of proteins measured by isothermal denaturation kinetics." *Analytical Biochemistry* 292(1): 40-50.
- Fiedler, E., Fiedler, M., Proetzel, G., Scheuermann, T., Fiedler, U. und Rudolph, R.** (2006). "Affilin™ Molecules: Novel Ligands for Bioseparation." *Food and Bioproducts Processing* 84(1): 3-8.
- Fiedler, U. und Rudolph, R.** (2001). "Fabrication of beta-pleated sheet proteins with specific binding properties." (WO 01/04144).
- Firth, A.E. und Patrick, W.M.** (2005). "Statistics of protein library construction." *Bioinformatics* 21(15): 3314-3315.
- Fitzgerald, J., Leonard, P., Darcy, E. und O'Kennedy, R.** (2011). "Immunoaffinity chromatography." *Methods in Molecular Biology* 681: 35-59.
- Fonda, I., Kenig, M., Gaberc-Porekar, V., Pristovaek, P. und Menart, V.** (2002). "Attachment of histidine tags to recombinant tumor necrosis factor-alpha drastically changes its properties." *ScientificWorldJournal* 2: 1312-1325.
- Francisco, J.A., Campbell, R., Iverson, B.L. und Georgiou, G.** (1993). "Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(22): 10444-10448.

- Friguet, B., Chaffotte, A.F., Djavadi-Ohanian, L. und Goldberg, M.E.** (1985). "Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay." *Journal of Immunological Methods* 77(2): 305-319.
- Fritz, H., Gebhardt, M., Meister, R. und Schult, H.** (1970). "[Preparation of modified protease inhibitors using water-insoluble trypsin resins]." *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie* 351(9): 1119-1122.
- Garcia-Ibáñez, D., Bokov, M., Cherkasov, V., Sveshnikov, P. und Hanson, S.F.** (2008). "Simple method for production of randomized human tenth fibronectin domain III libraries for use in combinatorial screening procedures." *BioTechniques* 44(4): 559-562.
- GE-Healthcare** (2007). *Recombinant Protein Purification Handbook: Principles and Methods*. Uppsala, GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- Gebauer, M. und Skerra, A.** (2009). "Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics." *Current Opinion in Chemical Biology* 13(3): 245-255.
- Gerth, M.L., Patrick, W.M. und Lutz, S.** (2004). "A second-generation system for unbiased reading frame selection." *Protein Engineering Design and Selection* 17(7): 595-602.
- Giancola, C., Pizzo, E., Di Maro, A., Cubellis, M.V. und D'Alessio, G.** (2005). "Preparation and characterization of geodin. A betagamma-crystallin-type protein from a sponge." *FEBS Journal* 272(4): 1023-1035.
- Gilbreth, R.N. und Koide, S.** (2012). "Structural insights for engineering binding proteins based on non-antibody scaffolds." *Current Opinion in Structural Biology* 22(4): 413-420.
- Gill, S.C. und von Hippel, P.H.** (1989). "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." *Analytical Biochemistry* 182(2): 319-326.
- Goding, J.W.** (1978). "Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent." *Journal of Immunological Methods* 20: 241-253.
- Good, N.E. und Izawa, S.** (1972). "Hydrogen ion buffers." *Methods in Enzymology* 24: 53-68.
- Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S. und Singh, R.M.** (1966). "Hydrogen ion buffers for biological research." *Biochemistry* 5(2): 467-477.
- Grabski, A.C.** (2009). "Advances in preparation of biological extracts for protein purification." *Methods in Enzymology* 463: 285-303.
- Graves, D.J. und Wu, Y.T.** (1974). "On predicting the results of affinity procedures." *Methods in Enzymology* 34: 140-163.
- Grönwall, C. und Stahl, S.** (2009). "Engineered affinity proteins--generation and applications." *Journal of Biotechnology* 140(3-4): 254-269.
- Gumbart, J., Schreiner, E., Wilson, D.N., Beckmann, R. und Schulten, K.** (2012). "Mechanisms of SecM-mediated stalling in the ribosome." *Biophysical Journal* 103(2): 331-341.
- Hage, D.S. und Cazes, J.** (2005). *Handbook of affinity chromatography*, CRC Press.
- Hammarström, M., Hellgren, N., van Den Berg, S., Berglund, H. und Hard, T.** (2002). "Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*." *Protein Science* 11(2): 313-321.
- Hanes, J. und Plückthun, A.** (1997). "In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(10): 4937-4942.
- Haouz, A., Glandier, J.M. und Alpert, B.** (2001). "Involvement of protein dynamics in enzyme stability. The case of glucose oxidase." *FEBS Letters* 506(3): 216-220.
- Hardy, E., Martinez, E., Diago, D., Diaz, R., Gonzalez, D. und Herrera, L.** (2000). "Large-scale production of recombinant hepatitis B surface antigen from *Pichia pastoris*." *Journal of Biotechnology* 77(2-3): 157-167.
- Head, J.F.** (1992). "A better grip on calmodulin." *Current Biology* 2(11): 609-611.
- Henriksen, M.L., Madsen, K.L., Skjoedt, K. und Hansen, S.** (2014). "Calcium-sensitive immunoaffinity chromatography: Gentle and highly specific retrieval of a scarce plasma antigen, collectin-LK (CL-LK)." *Journal of Immunological Methods* 413: 25-31.
- Hey, T., Fiedler, E., Rudolph, R. und Fiedler, M.** (2005). "Artificial, non-antibody binding proteins for pharmaceutical and industrial applications." *Trends in Biotechnology* 23(10): 514-522.
- Hochuli, E., Dobeli, H. und Schacher, A.** (1987). "New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues." *Journal of Chromatography A* 411: 177-184.
- Hoffmann, A.** (2011). *Erzeugung und Charakterisierung Ubiquitin-basierter Bindeproteine*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Hoffmann, A., Kovermann, M., Lilie, H., Fiedler, M., Balbach, J., Rudolph, R. und Pfeifer, S.** (2012). "New binding mode to TNF-alpha revealed by ubiquitin-based artificial binding protein." *PLoS One* 7(2): e31298.
- Holdgate, G.A. und Ward, W.H.** (2005). "Measurements of binding thermodynamics in drug discovery." *Drug Discovery Today* 10(22): 1543-1550.
- Holliger, P. und Hudson, P.J.** (2005). "Engineered antibody fragments and the rise of single domains." *Nature Biotechnology* 23(9): 1126-1136.
- Hopp, T.P., Prickett, K.S., Price, V.L., Libby, R.T., March, C.J., Cerretti, D.P., Urdal, D.L. und Conlon, P.J.** (1988). "A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification." *Biotechnology* 6(10): 1204-1210.
- Horstmann, B.J., Kenney, C.N. und Chase, H.A.** (1986). "Adsorption of proteins on Sepharose affinity adsorbents of varying particle size." *Journal of Chromatography A* 361: 179-190.
- Huang, J., Koide, A., Nettle, K.W., Greene, G.L. und Koide, S.** (2006). "Conformation-specific affinity purification of proteins using engineered binding proteins: Application to the estrogen receptor." *Protein Expression and Purification* 47(2): 348-354.
- Huet, S., Gorre, H., Perrocheau, A., Picot, J. und Cinier, M.** (2015). "Use of the Nanofitin Alternative Scaffold as a GFP-Ready Fusion Tag." *PLoS One* 10(11): e0142304.
- Huth, J.R., Bewley, C.A., Jackson, B.M., Hinnebusch, A.G., Clore, G.M. und Gronenborn, A.M.** (1997). "Design of an expression system for detecting folded protein domains and mapping macromolecular interactions by NMR." *Protein Science* 6(11): 2359-2364.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H.** (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* 96(1): 23-28.
- Inouye, M., Inouye, S. und Zusman, D.R.** (1979). "Biosynthesis and self-assembly of protein S, a development-specific protein of *Myxococcus xanthus*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(1): 209-213.
- Inouye, S., Harada, W., Zusman, D. und Inouye, M.** (1981). "Development-specific protein S of *Myxococcus xanthus*: purification and characterization." *Journal of Bacteriology* 148(2): 678-683.
- Jaenicke, R. und Slingsby, C.** (2001). "Lens crystallins and their microbial homologs: structure, stability, and function." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 36(5): 435-499.
- Janeway, C.A. und Traves, P.** (1995). *Immunologie*, Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Janson, J.-C.** (2012). *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications*, John Wiley & Sons.
- Jermutus, L., Honegger, A., Schwesinger, F., Hanes, J. und Pluckthun, A.** (2001). "Tailoring in vitro evolution for protein affinity or stability." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(1): 75-80.
- Johnsson, B., Lofas, S. und Lindquist, G.** (1991). "Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors." *Analytical Biochemistry* 198(2): 268-277.
- Joose, S.A., Gorges, T.M. und Pantel, K.** (2014). "Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells." *EMBO Mol Med* 7(1): 1-11.
- Kaiser, D.** (1979). "Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76(11): 5952-5956.
- Kellogg, D.R. und Moazed, D.** (2002). "Protein- and immunoaffinity purification of multiprotein complexes." *Methods in Enzymology* 351: 172-183.
- Kim, H.J., Eichinger, A. und Skerra, A.** (2009). "High-affinity recognition of lanthanide(III) chelate complexes by a reprogrammed human lipocalin 2." *Journal of the American Chemical Society* 131(10): 3565-3576.
- Kim, K.M., Yi, E.C., Baker, D. und Zhang, K.Y.** (2001). "Post-translational modification of the N-terminal His tag interferes with the crystallization of the wild-type and mutant SH3 domains from chicken src tyrosine kinase." *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 57(Pt 5): 759-762.
- Kimple, M.E., Brill, A.L. und Pasker, R.L.** (2013). "Overview of affinity tags for protein purification." *Current protocols in protein science* 73: Unit 9 9.
- Knappik, A. und Plückthun, A.** (1994). "An improved affinity tag based on the FLAG peptide for the detection and purification of recombinant antibody fragments." *BioTechniques* 17(4): 754-761.

- Kobayashi, H., Yoshida, T. und Inouye, M.** (2009). "Significant enhanced expression and solubility of human proteins in *Escherichia coli* by fusion with protein S from *Myxococcus xanthus*." *Applied and Environmental Microbiology* 75(16): 5356-5362.
- Kohler, G. und Milstein, C.** (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* 256(5517): 495-497.
- Koide, A., Bailey, C.W., Huang, X. und Koide, S.** (1998). "The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins." *Journal of Molecular Biology* 284(4): 1141-1151.
- Kotadia Bhargav, V., Khanvilkar Vineeta, V. und Kadam Vilasrao, J.** (2012). "Immunoaffinity chromatography." *International journal of research in pharmacy and chemistry* 2(2).
- Kretsinger, R.H.** (1976). "Calcium-binding proteins." *Annual Review of Biochemistry* 45: 239-266.
- Kronqvist, N., Lofblom, J., Jonsson, A., Wernerus, H. und Stahl, S.** (2008). "A novel affinity protein selection system based on staphylococcal cell surface display and flow cytometry." *Protein Engineering Design and Selection* 21(4): 247-255.
- Krumpe, L.R., Schumacher, K.M., McMahon, J.B., Makowski, L. und Mori, T.** (2007). "Trinucleotide cassettes increase diversity of T7 phage-displayed peptide library." *BMC Biotechnology* 7: 65.
- Ku, J. und Schultz, P.G.** (1995). "Alternate protein frameworks for molecular recognition." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(14): 6552-6556.
- Kubala, M.H., Kovtun, O., Alexandrov, K. und Collins, B.M.** (2010). "Structural and thermodynamic analysis of the GFP:GFP-nanobody complex." *Protein Science* 19(12): 2389-2401.
- Kumaraswamy, V., Lindley, P., Slingsby, C. und Glover, I.D.** (1996). "An eye lens protein-water structure: 1.2 Å resolution structure of γ B-crystallin at 150 K." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 52(4): 611-622.
- Labrou, N. und Clonis, Y.D.** (1994). "The affinity technology in downstream processing." *Journal of Biotechnology* 36(2): 95-119.
- Laemmli, U.K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Larsson, L. und Ohman, S.** (1978). "Serum ionized calcium and corrected total calcium in borderline hyperparathyroidism." *Clinical Chemistry* 24(11): 1962-1965.
- Lewit-Bentley, A. und Rety, S.** (2000). "EF-hand calcium-binding proteins." *Current Opinion in Structural Biology* 10(6): 637-643.
- Liedberg, B., Nylander, C. und Lunström, I.** (1983). "Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing." *Sensors and Actuators* 4: 299-304.
- Lipovsek, D., Lippow, S.M., Hackel, B.J., Gregson, M.W., Cheng, P., Kapila, A. und Wittrup, K.D.** (2007). "Evolution of an interloop disulfide bond in high-affinity antibody mimics based on fibronectin type III domain and selected by yeast surface display: molecular convergence with single-domain camelid and shark antibodies." *Journal of Molecular Biology* 368(4): 1024-1041.
- Lottspeich, F.** (2006). *Bioanalytik*, Elsevier, Spektrum Akad. Verlag.
- Martell, A.E. und Smith, R.M.** (1974). *Critical stability constants*. New York, Springer.
- Moser, A.C. und Hage, D.S.** (2010). "Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments." *Bioanalysis* 2(4): 769-790.
- Mouratou, B., Behar, G. und Pecorari, F.** (2015). "Artificial Affinity Proteins as Ligands of Immunoglobulins." *Biomolecules* 5(1): 60-75.
- Muchow, A.** (2013). *Herstellung und Charakterisierung von Varianten des Protein S aus Myxococcus xanthus* Masterarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A.** (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- Mulhaupt, H.A., Leitinger, B., Gullberg, D. und Couchman, J.R.** (2015). "Extracellular matrix component signaling in cancer." *Advanced Drug Delivery Reviews* 97: 28-40.
- Nallamsetty, S. und Waugh, D.S.** (2006). "Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners." *Protein Expression and Purification* 45(1): 175-182.
- Narhi, L.O., Caughey, D.J., Horan, T., Kita, Y., Chang, D. und Arakawa, T.** (1997). "Effect of three elution buffers on the recovery and structure of monoclonal antibodies." *Analytical Biochemistry* 253(2): 236-245.

- Nett, J.H., Hunte, C. und Trumpower, B.L.** (2000). "Changes to the length of the flexible linker region of the Rieske protein impair the interaction of ubiquinol with the cytochrome bc₁ complex." *European Journal of Biochemistry* 267(18): 5777-5782.
- Nic, M., Jirat, J., Kosata, B. und Chemistry, D.o.C.N.S.R.I.U.o.P.A.** (2006). IUPAC goldbook, IUPAC.
- Nienhaus, K. und Nienhaus, G.U.** (2014). "Fluorescent proteins for live-cell imaging with super-resolution." *Chemical Society Reviews* 43(4): 1088-1106.
- Niesen, F.H., Berglund, H. und Vedadi, M.** (2007). "The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability." *Nature protocols* 2(9): 2212-2221.
- Nilsson, J., Stahl, S., Lundberg, J., Uhlen, M. und Nygren, P.A.** (1997). "Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins." *Protein Expression and Purification* 11(1): 1-16.
- Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M. und Nygren, P.A.** (1997). "Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain." *Nature Biotechnology* 15(8): 772-777.
- Nord, K., Gunneriusson, E., Uhlen, M. und Nygren, P.A.** (2000). "Ligands selected from combinatorial libraries of protein A for use in affinity capture of apolipoprotein A-1M and taq DNA polymerase." *Journal of Biotechnology* 80(1): 45-54.
- Nord, K., Nord, O., Uhlén, M., Kelley, B., Ljungqvist, C. und Nygren, P.-Å.** (2001). "Recombinant human factor VIII-specific affinity ligands selected from phage-displayed combinatorial libraries of protein A." *Eur. J. Biochem.* 268: 4269-4277.
- Nov, Y.** (2014). "Probabilistic methods in directed evolution: library size, mutation rate, and diversity." *Methods in Molecular Biology* 1179: 261-278.
- Odegrip, R., Coomber, D., Eldridge, B., Hederer, R., Kuhlman, P.A., Ullman, C., FitzGerald, K. und McGregor, D.** (2004). "CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(9): 2806-2810.
- Oeffinger, M.** (2012). "Two steps forward--one step back: advances in affinity purification mass spectrometry of macromolecular complexes." *Proteomics* 12(10): 1591-1608.
- Pantoliano, M.W., Petrella, E.C., Kwasnoski, J.D., Lobanov, V.S., Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., Springer, B.A., Lane, P. und Salemme, F.R.** (2001). "High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery." *Journal of Biomolecular Screening* 6(6): 429-440.
- Paschke, M.** (2006). "Phage display systems and their applications." *Applied Microbiology and Biotechnology* 70(1): 2-11.
- Patrick, W.M., Firth, A.E. und Blackburn, J.M.** (2003). "User-friendly algorithms for estimating completeness and diversity in randomized protein-encoding libraries." *Protein Engineering* 16(6): 451-457.
- Pedelacq, J.D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T.C. und Waldo, G.S.** (2006). "Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein." *Nature Biotechnology* 24(1): 79-88.
- Perozzo, R., Folkers, G. und Scapozza, L.** (2004). "Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects." *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* 24(1-2): 1-52.
- Pina, A.S., Lowe, C.R. und Roque, A.C.** (2014). "Challenges and opportunities in the purification of recombinant tagged proteins." *Biotechnology Advances* 32(2): 366-381.
- Plückthun, A.** (2012). "Ribosome display: a perspective." *Methods in Molecular Biology* 805: 3-28.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. und Belfrage, G.** (1975). "Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation." *Nature* 258(5536): 598-599.
- Prabhu, N.V. und Sharp, K.A.** (2005). "Heat capacity in proteins." *Annual Review of Physical Chemistry* 56: 521-548.
- Prickett, K.S., Amberg, D.C. und Hopp, T.P.** (1989). "A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins." *BioTechniques* 7(6): 580-589.
- Ransohoff, T., Murphy, M. und Levine, H.** (1990). "Automation of biopharmaceutical purification processes." *BioPharm* 3(3): 20-26.
- Reina, J., Lacroix, E., Hobson, S.D., Fernandez-Ballester, G., Rybin, V., Schwab, M.S., Serrano, L. und Gonzalez, C.** (2002). "Computer-aided design of a PDZ domain to recognize new target sequences." *Nature Structural Biology* 9(8): 621-627.

- Rizo, J. und Sudhof, T.C.** (1998). "C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain." *Journal of Biological Chemistry* 273(26): 15879-15882.
- Roberts, R.W. und Szostak, J.W.** (1997). "RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(23): 12297-12302.
- Roque, A.C. und Lowe, C.R.** (2008). "Affinity chromatography: history, perspectives, limitations and prospects." *Methods in Molecular Biology* 421: 1-21.
- Rosenbluh, A. und Rosenberg, E.** (1989). "Sporulation of *Myxococcus xanthus* in liquid shake flask cultures." *Journal of Bacteriology* 171(8): 4521-4524.
- Rothbauer, U., Zolghadr, K., Muyldermans, S., Schepers, A., Cardoso, M.C. und Leonhardt, H.** (2008). "A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins." *Molecular and Cellular Proteomics* 7(2): 282-289.
- Rothbauer, U., Zolghadr, K., Tillib, S., Nowak, D., Schermelleh, L., Gahl, A., Backmann, N., Conrath, K., Muyldermans, S., Cardoso, M.C. und Leonhardt, H.** (2006). "Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies." *Nature Methods* 3(11): 887-889.
- Rudolph, R., Siebendritt, R., Nessler, G., Sharma, A. und Jaenicke, R.** (1990). "Folding of an all-beta protein: Independent domain folding in γ II-crystallin from calf eye lens." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(12): 4625-4629.
- Ruigrok, V.J., Levisson, M., Eppink, M.H., Smidt, H. und van der Oost, J.** (2011). "Alternative affinity tools: more attractive than antibodies?" *Biochemical Journal* 436(1): 1-13.
- Saraswat, M., Musante, L., Ravid, A., Shortt, B., Byrne, B. und Holthofer, H.** (2013). "Preparative purification of recombinant proteins: current status and future trends." *BioMed research international* 2013: 312709.
- Schilling, J., Schoppe, J. und Pluckthun, A.** (2014). "From DARPins to LoopDARPins: novel LoopDARPin design allows the selection of low picomolar binders in a single round of ribosome display." *Journal of Molecular Biology* 426(3): 691-721.
- Schlapschy, M., Binder, U., Borger, C., Theobald, I., Wachinger, K., Kisling, S., Haller, D. und Skerra, A.** (2013). "PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins." *Protein Engineering Design and Selection* 26(8): 489-501.
- Schmidt, T.G. und Skerra, A.** (2007). "The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins." *Nature protocols* 2(6): 1528-1535.
- Schneider, M.** (2010). Die N-terminale Domäne des humanen γ B-Kristallins als *scaffold* für artifizielle Bindeproteine Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Secher, D.S. und Burke, D.C.** (1980). "A monoclonal antibody for large-scale purification of human leukocyte interferon." *Nature* 285(5765): 446-450.
- Shimeld, S.M., Purkiss, A.G., Dirks, R.P., Bateman, O.A., Slingsby, C. und Lubsen, N.H.** (2005). "Urochordate betagamma-crystallin and the evolutionary origin of the vertebrate eye lens." *Current Biology* 15(18): 1684-1689.
- Shukla, A.A., Hubbard, B., Tressel, T., Guhan, S. und Low, D.** (2007). "Downstream processing of monoclonal antibodies--application of platform approaches." *Journal of chromatography. B* 848(1): 28-39.
- Singh, K.V., Kaur, J., Raje, M., Varshney, G.C. und Suri, C.R.** (2003). "An ELISA-based approach to optimize elution conditions for obtaining hapten-specific antibodies." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377(1): 220-224.
- Singh, R.K., Tiwari, M.K., Singh, R. und Lee, J.K.** (2013). "From protein engineering to immobilization: promising strategies for the upgrade of industrial enzymes." *International journal of molecular sciences* 14(1): 1232-1277.
- Skerra, A.** (2000). "Engineered protein scaffolds for molecular recognition." *Journal of Molecular Recognition* 13(4): 167-187.
- Smith, D.B. und Johnson, K.S.** (1988). "Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase." *Gene* 67(1): 31-40.
- Smith, G.P.** (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science* 228(4705): 1315-1317.
- Smith, M.C., Furman, T.C., Ingolia, T.D. und Pidgeon, C.** (1988). "Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography. A new concept in affinity chromatography for recombinant proteins." *Journal of Biological Chemistry* 263(15): 7211-7215.
- Soskine, M. und Tawfik, D.S.** (2010). "Mutational effects and the evolution of new protein functions." *Nature Reviews: Genetics* 11(8): 572-582.

- Souriau, C., Chiche, L., Irving, R. und Hudson, P.** (2005). "New binding specificities derived from Min-23, a small cysteine-stabilized peptidic scaffold." *Biochemistry* 44(19): 7143-7155.
- Srivastava, S.S., Mishra, A., Krishnan, B. und Sharma, Y.** (2014). "Ca²⁺-binding motif of betagamma-crystallins." *Journal of Biological Chemistry* 289(16): 10958-10966.
- Starkenstein, E.** (1910). "Ferment action and the influence upon it of neutral salts." *Biochem. Z* 24: 210-218.
- Stenberg, E., Persson, B., Roos, H. und Urbaniczky, C.** (1991). "Quantitative Determination of Surface Concentration of Protein with Surface Plasmon Resonance Using Radiolabeled Proteins." *Journal of Colloid and Interface Science* 143(2): 513.
- Stofko-Hahn, R.E., Carr, D.W. und Scott, J.D.** (1992). "A single step purification for recombinant proteins. Characterization of a microtubule associated protein (MAP 2) fragment which associates with the type II cAMP-dependent protein kinase." *FEBS Letters* 302(3): 274-278.
- Stordeur, C.** (2013). *Artifizielle Bindeproteine auf der Basis des ultrastabilen scaffold Proteins M7* Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Studier, F.W.** (2005). "Protein production by auto-induction in high density shaking cultures." *Protein Expression and Purification* 41(1): 207-234.
- Studier, F.W. und Moffatt, B.A.** (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *Journal of Molecular Biology* 189(1): 113-130.
- Teintze, M., Inouye, M. und Inouye, S.** (1988). "Characterization of calcium-binding sites in development-specific protein S of *Myxococcus xanthus* using site-specific mutagenesis." *Journal of Biological Chemistry* 263(3): 1199-1203.
- Terpe, K.** (2003). "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(5): 523-533.
- Thompson, N.E., Arthur, T.M. und Burgess, R.R.** (2003). "Development of an epitope tag for the gentle purification of proteins by immunoaffinity chromatography: application to epitope-tagged green fluorescent protein." *Analytical Biochemistry* 323(2): 171-179.
- Tudos, A.J. und Schasfoort, R.B.** (2008). *Introduction to Surface Plasmon Resonance*, In: *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Cambridge, UK, RSC Publishing.
- Turbadar, T.** (1959). "Complete absorption of light by thin metal films." *Proceedings of the Physical Society* 73(1): 40.
- Twair, A., Al-Okla, S., Zarkawi, M. und Abbady, A.Q.** (2014). "Characterization of camel nanobodies specific for superfolder GFP fusion proteins." *Molecular Biology Reports* 41(10): 6887-6898.
- Ueda, T., Kanamori, T. und Ohashi, H.** (2010). "Ribosome display with the PURE technology." *Methods in Molecular Biology* 607: 219-225.
- Ukkonen, K., Veijola, J., Vasala, A. und Neubauer, P.** (2013). "Effect of culture medium, host strain and oxygen transfer on recombinant Fab antibody fragment yield and leakage to medium in shaken *E. coli* cultures." *Microbial cell factories* 12: 73.
- Urh, M., Simpson, D. und Zhao, K.** (2009). "Affinity chromatography: general methods." *Methods in Enzymology* 463: 417-438.
- Vazquez-Rey, M. und Lang, D.A.** (2011). "Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes." *Biotechnology and Bioengineering* 108(7): 1494-1508.
- Vergara, A., Grassi, M., Sica, F., Pizzo, E., D'Alessio, G., Mazzarella, L. und Merlino, A.** (2013). "A novel interdomain interface in crystallins: structural characterization of the betagamma-crystallin from *Geodia cydonium* at 0.99 Å resolution." *Acta crystallographica. Section D* 69(Pt 6): 960-967.
- Virnekas, B., Ge, L., Plückthun, A., Schneider, K.C., Wellenhofer, G. und Moroney, S.E.** (1994). "Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis." *Nucleic Acids Res* 22(25): 5600-5607.
- von Hagen, J.** (2011). *Proteomics Sample Preparation*, Wiley.
- Voss, S. und Skerra, A.** (1997). "Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification." *Protein Engineering* 10(8): 975-982.
- Weber, K. und Osborn, M.** (1969). "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *Journal of Biological Chemistry* 244(16): 4406-4412.
- Wehbe, M., Labib, M., Muharemagic, D., Zamay, A.S. und Berezovski, M.V.** (2015). "Switchable aptamers for biosensing and bioseparation of viruses (SwAps-V)." *Biosensors and Bioelectronics* 67: 280-286.

- Wenk, M., Baumgartner, R., Holak, T.A., Huber, R., Jaenicke, R. und Mayr, E.M.** (1999). "The domains of protein S from *Myxococcus xanthus*: structure, stability and interactions." *Journal of Molecular Biology* 286(5): 1533-1545.
- Wenk, M. und Jaenicke, R.** (1999). "Calorimetric analysis of the Ca(2+)-binding betagamma-crystallin homolog protein S from *Myxococcus xanthus*: intrinsic stability and mutual stabilization of domains." *Journal of Molecular Biology* 293(1): 117-124.
- Wenk, M. und Mayr, E.M.** (1998). "Myxococcus xanthus spore coat protein S, a stress-induced member of the betagamma-crystallin superfamily, gains stability from binding of calcium ions." *European Journal of Biochemistry* 255(3): 604-610.
- White, D.** (1975). *Myxospores of Myxococcus xanthus*. Spores VI. H. L. S. Gerhardt, and R. N. Costilow (ed.). Washington, D.C., American Society for Microbiology: 44-51.
- Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.C., Williams, K.L., Appel, R.D. und Hochstrasser, D.F.** (1999). "Protein identification and analysis tools in the ExPASy server." *Methods in Molecular Biology* 112: 531-552.
- Williams, D.H., Stephens, E., O'Brien, D.P. und Zhou, M.** (2004). "Understanding noncovalent interactions: ligand binding energy and catalytic efficiency from ligand-induced reductions in motion within receptors and enzymes." *Angewandte Chemie* 43(48): 6596-6616.
- Wistow, G.J. und Piatigorsky, J.** (1988). "Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue " *Annual Review of Biochemistry* 57: 479-504
- Wouters, M.A., Rigoutsos, I., Chu, C.K., Feng, L.L., Sparrow, D.B. und Dunwoodie, S.L.** (2005). "Evolution of distinct EGF domains with specific functions." *Protein Science* 14(4): 1091-1103.
- Yin, C.C., Ren, L.L., Zhu, L.L., Wang, X.B., Zhang, Z., Huang, H.L. und Yan, X.Y.** (2008). "Construction of a fully synthetic human scFv antibody library with CDR3 regions randomized by a split-mix-split method and its application." *Journal of biochemistry* 144(5): 591-598.
- Zahnd, C., Amstutz, P. und Pluckthun, A.** (2007a). "Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target." *Nature Methods* 4(3): 269-279.
- Zahnd, C., Wyler, E., Schwenk, J.M., Steiner, D., Lawrence, M.C., McKern, N.M., Pecorari, F., Ward, C.W., Joos, T.O. und Pluckthun, A.** (2007b). "A designed ankyrin repeat protein evolved to picomolar affinity to Her2." *Journal of Molecular Biology* 369(4): 1015-1028.
- Zhang, J.H., Chung, T.D. und Oldenburg, K.R.** (1999). "A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays." *Journal of Biomolecular Screening* 4(2): 67-73.

Anhang

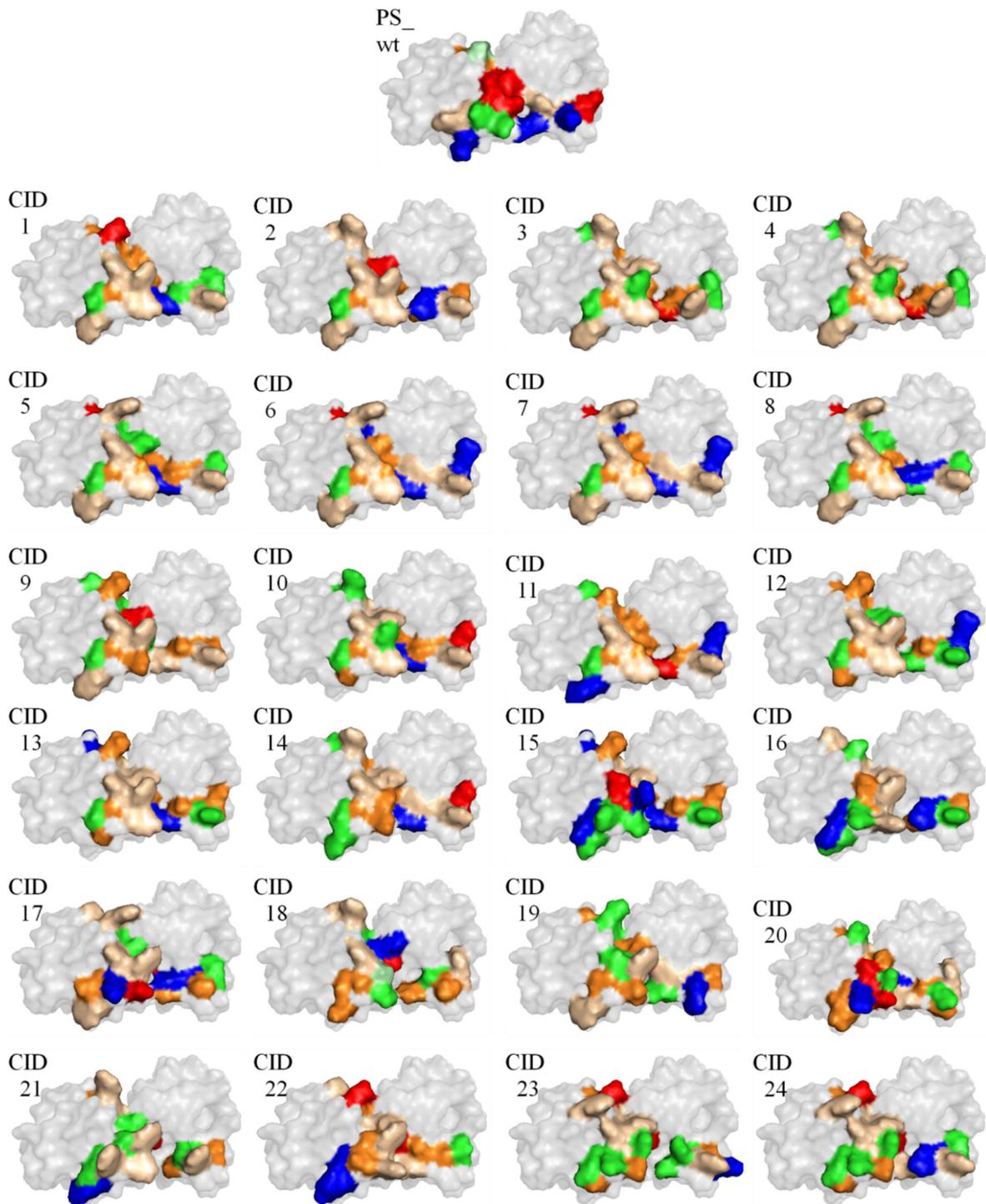


Abbildung A1: Modelle calciumschaltbarer Protein S-Varianten CID 1–24

Als Referenz wurde die PDB-Struktur 1PRR des verwendeten Gerüstproteins Protein S dargestellt. Die Darstellungen wurden mit der Software PyMol erstellt. Die randomisierten Bereiche als auch zusätzliche Aminosäureaustausche der Varianten wurden entsprechend der Art der Aminosäuren eingefärbt. Hydrophob (AGILMPV): weizen, semipolar (C): gelb, polar (HNQST): Cyan, positiv (KR): blau, negativ (DE): rot, aromatisch (FWY): magenta. Die dargestellten Rotamere der Mutagenesen wurden einzeln entsprechend ihrer Wahrscheinlichkeit automatisch durch die Software ermittelt, den Modellen liegen keine strukturellen Berechnungen zugrunde.

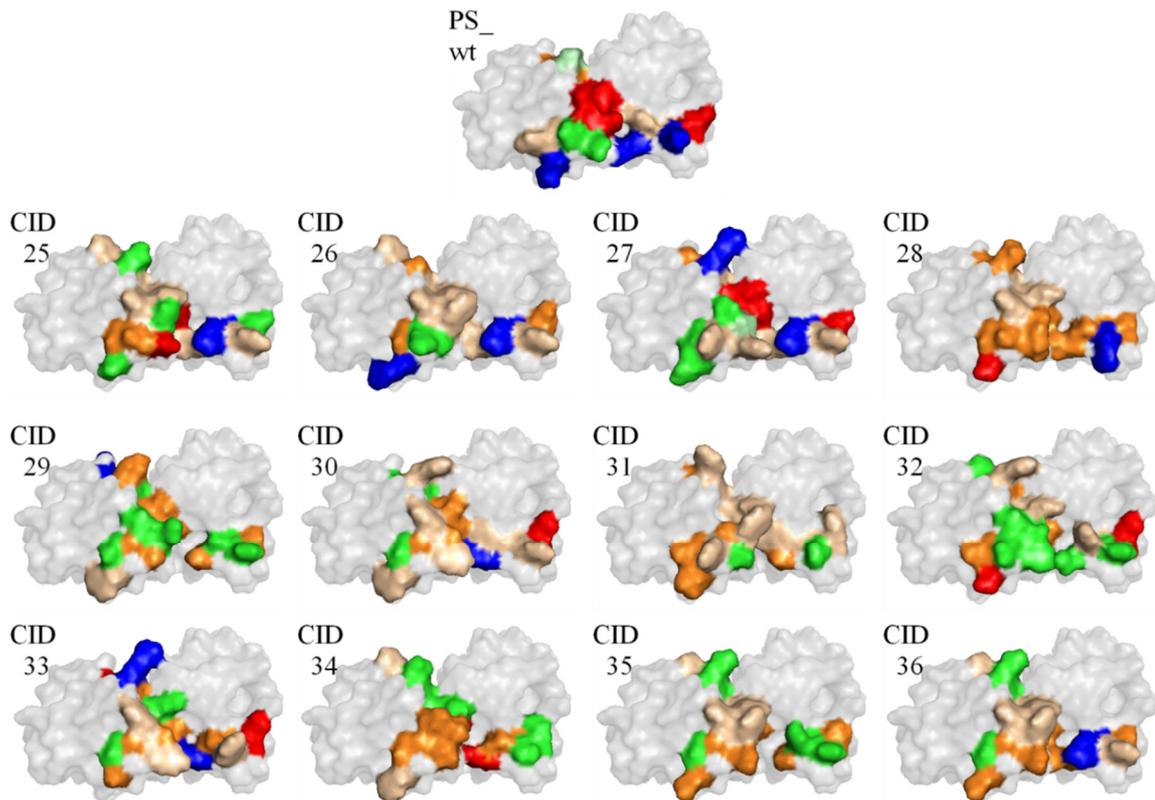


Abbildung A2: Modelle calciumschaltbarer Protein S-Varianten CID 25–36

Als Referenz wurde die pdb-Struktur 1PRR des verwendeten Gerüstproteins Protein S dargestellt. Die Darstellungen wurden mit der Software PyMol erstellt. Die randomisierten Bereiche als auch zusätzliche Aminosäureaustausche der Varianten wurden entsprechend der Art der Aminosäuren eingefärbt. Hydrophob (AGILMPV): weizen, semipolar (C): gelb, polar (HNQST): Cyan, positiv (KR): blau, negativ (DE): rot, aromatisch (FWY): magenta. Die dargestellten Rotamere der Mutagenesen wurden einzeln entsprechend ihrer Wahrscheinlichkeit automatisch durch die Software ermittelt, den Modellen liegen keine strukturellen Berechnungen zugrunde.

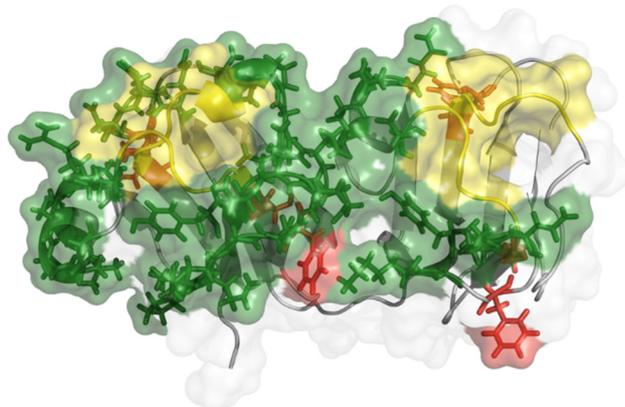


Abbildung A 3: Oberflächendarstellung des Protein S (PDB: 1PRR)

Zur Vorbereitung des Bibliotheksdesigns wurden definierte Aminosäuresubstitution an 41 lösungsmittlexponierten Positionen (grün) in örtlicher Nähe der Ca^{2+} -bindenden Motive (gelb) des Protein S erstellt und entsprechende Proteinvarianten charakterisiert. Konservierte Motive (rot) der Proteinfamilie wurden nicht verwendet. Es wurden folgende Positionen Protein S untersucht: Y8, N9, E10, D11, Q13, G14, K15, Q16, V17, P20, T25, R26, A27, Q28, A30, A31, L32, G33, E35, Q54, N55, D56, G57, A59, D61, E70, E71, L72, G73, P74, L75, Y97, K98, E99, G103, K104, Q115, A116, R120 und D124. Die Darstellung wurde mit der Software PyMol generiert.

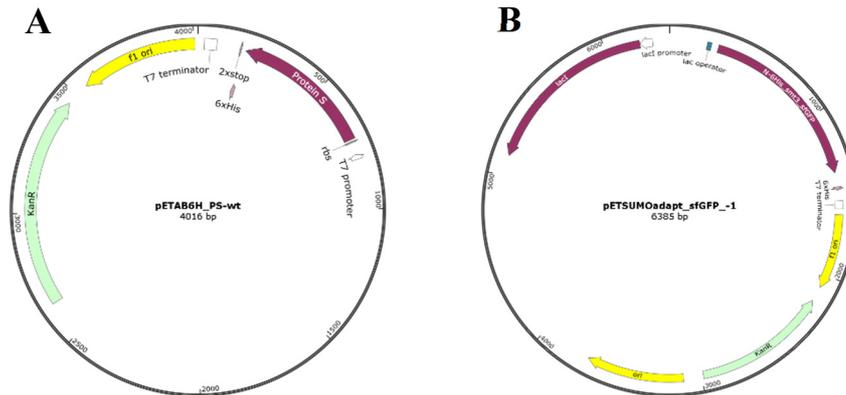


Abbildung A4: Expressionsplasmide zur rekombinanten Produktion von Proteinen in *E. coli*

(A) pETAB6H zur Herstellung von C-terminal hexahistidin-fusionierten Varianten des Protein S. Die codierenden Sequenzen der Protein S-Varianten wurden mittels der Restriktionsenzyme *AgeI* und *BamHI* in den Vektor kloniert. Zur Kontrolle der Genexpression verfügt das Plasmid über einen T7-Promotor. Weiterhin verfügt das Plasmid über einen pBR322-Replikationsursprung zur Replikation und ein Kanamycin-Resistenzgen (Kan^R).

(B) pETSUMO-Vektor zur Produktion anhangfreien superfolder GFP. Die codierende Sequenz für sfGFP wurde über flankierende *Eco31I* und *NotI*-Schnittstellen direkt an das 3'-Ende des SUMO-Gens eingefügt. Nach erfolgter Spaltung über die SUMO-Protease verfügte das sfGFP über keine zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus. Zur Kontrolle der Genexpression verfügt das Plasmid über einen T7lac-Promotor. Weiterhin verfügt das Plasmid über einen pBR322-Replikationsursprung zur Replikation und ein Kanamycin-Resistenzgen (Kan^R).

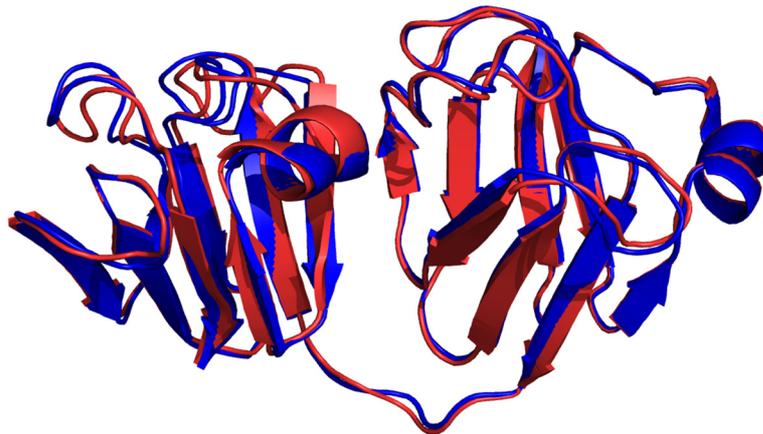


Abbildung A5: Darstellung von Sekundärstrukturelementen der Faltungszustände des Protein S in calciumfreier (PDB: 1PRR; blau) und calciumkomplexierter Form (PDB: 1PRS; rot). Die Darstellungen wurden mit der Software PyMol generiert.



Abbildung A 6: SecM-stalling Sequenz für Ribosomen-*display* Konstrukte



Abbildung A 7: Sequenzübersicht Protein S RD-Konstrukt

Für die Darstellung wurde Protein S-Wildtyp im Format des RD dargestellt. Im Vergleich zu der Sequenz des Wildtyp-Proteins enthalten die Varianten in diesem Format am Aminoterminus einen zusätzlich „GTG“-Linker.

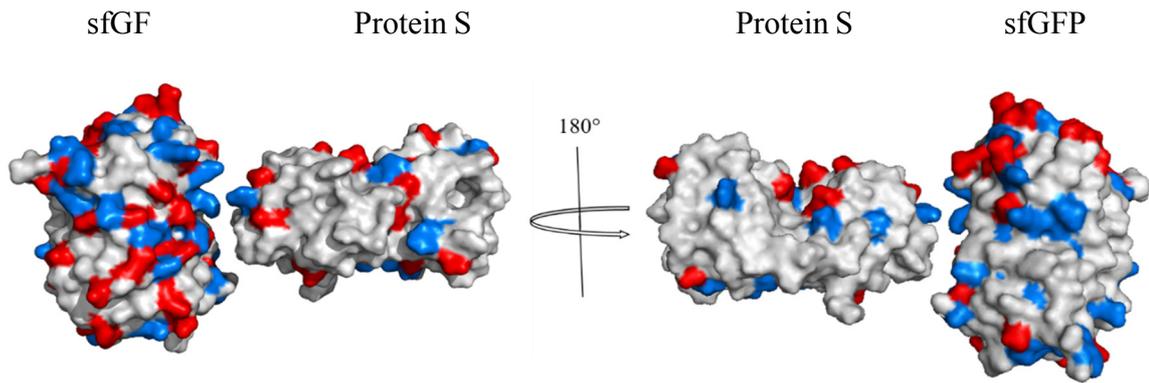


Abbildung A 8: Oberflächendarstellung der Kristallstruktur von sfGFP (PDB: 2B3P) und eines Modelles von Protein S-Variante 24 (basierend auf PDB: 1PRR).

Die Seitenketten positiv geladener Seitenketten wurden rot eingefärbt, die Seitenketten negativ geladener Aminosäuren in blau.

```

Protein S wt      1  mgtganitvfynedfqqkqvdlppgnytraqlaalgiennntissvkvpqgvkailyqndgfagdqievvanaeelgplnnvssirvisvpvqprarfyy
Protein S CID 24 1  .....qqwq-m-a.....w-wdv-y.....x

Protein S wt      101 keqfdgkevdlppgqytqaelerygidnntissvkpqqglavvlfkndnfsqdtlpvnsdaptlgamnntssirisgsgghhhhh
Protein S CID 24 101 vq.....f.....

```

Abbildung A 9: Sequenz-Alignment Protein S-wt gegen Protein S CID 24

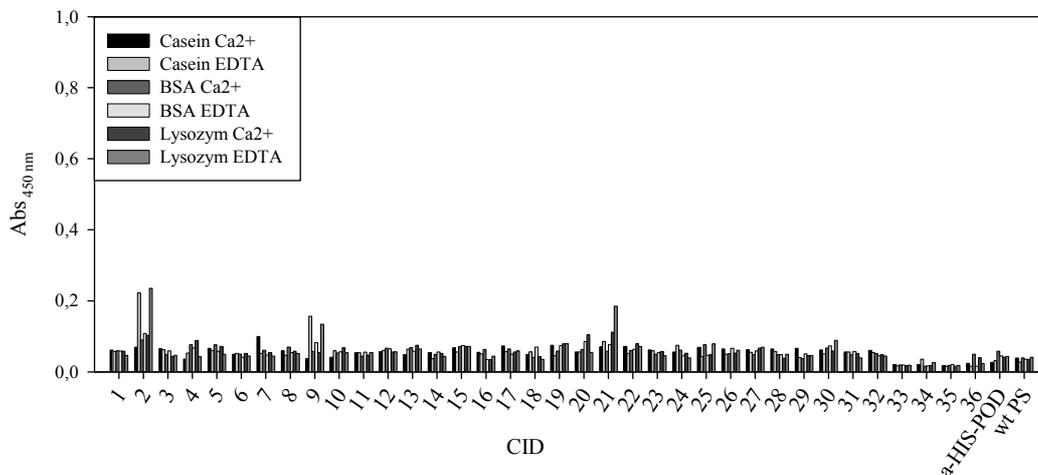


Abbildung A 10: Spezifitäts-ELISA mit gereinigten Protein S-Varianten aus Durchmusterung

Die in der Durchmusterung detektierten sfGFP bindenden Protein S-Varianten wurden nach erfolgter Reinigung über IMAC mittels ELISA hinsichtlich ihrer Ca^{2+} -abhängigen Bindung an sfGFP analysiert. Für jede Variante wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Messung erfolgte in permanenter Anwesenheit von Ca^{2+} , für eine der Doppelbestimmungen wurde ein zusätzlicher EDTA-Waschschritt durchgeführt, um die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Bindung zu bestätigen. Als Negativkontrollen wurde das Wildtyp Protein S als auch das zur Detektion verwendete Immunkonjugat (BMG-His-1) mitgeführt.

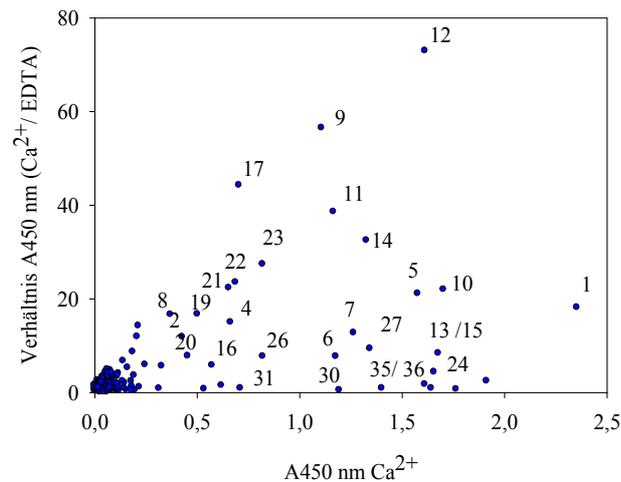


Abbildung A 11: Automatisierte Identifikation von Ca^{2+} -sensitiv sfGFP-bindender Protein S-Varianten über ELISA mit Darstellung der vergebenen Klonidentifikationsnummern

Die Darstellung entspricht Abbildung 16 auf Seite 70. Details zur Versuchsdurchführung können dort entnommen werden.

Tabelle A 1: Sequenzen der verwendeten Kristallin-Homologe

Spherulin 3a_Cys4Ser MSVSKGVSGNPAKGEVFLYKHAVNFQGDSWKVTGNVYDFRSVSGLNDDVSS VKVGPNTKAFIFKDDRFGNFRIRLEESSQVTDLTTRNLNDAISSIIVATFESAG
Protein S MANITVFYNEFDQGGKQVDLPPGNYTRAQLAALGIENNTISSVKVPPGVKAILYQNDGFAGD QIEVVANAEEELGPLNNNVSSIRVISPVPQPRARFFYKEQFDGKEVDLPPGQYTQAELEERYGI DNNTISSVKPQGLAVVLFKNDNFSGDTLPVNSDAPTLGAMNNNTSSIRISG
Ciona-$\beta\gamma$-crystallin MGKILFEDVEFGGKKLELETSSVDLNVHGFNDIVSSIIIVESGTWFWFDDEGFGSPSYKLTPG KYPNPGSWGNDDELSSVKQQG
M-crystallin MAEVIVYEHVNFQGGKSFSDATSDQPGAGDNLNDKISSIKVKSQTWRWFYIYNYGGRYWDLGP GEYSSVESAGIPDNSISSFRQIG
Geodin MSTAKVTLVTSGSSQDFTSEQTNITDFARVRVTKGMWIFYQQANYNDASGGGSLWIKLD ESSHMDLPFTPRSFVPKTFQVGATLYKHAVNFQGGKELDLPNSNPRIDIGGVSSALISQGWWR LYEQDYAGPSTRRPGVYVNAGALGVANDALKSMERFEG
Clostrillin MKAFTFYEDINYGGASVSLQPGNYTSLQLNTAKIPNDWMTSLKVPSGWTVDVYENDNFT GTKWYTSPTPWVGNDDANDKMTSVKIYSTG
Protein-S-Homolog MANITVFYNEFDQGGKQVDLKPDEYKRDKLEALGIENNTISSVKVPPGVKAILYKNDDFTGDQ IEVVANAEEELGPLNNNVSSIKVMSVPVPQPRARFFYKEQFDGKEVDLPPGQYTQAELEERYGIDN NTISSVKPEGLKVVLKNDNFSGDTLSVTSNAPSLGAMNNNTSSIRITPG

Anhang

Tabelle A 2: Zusammenfassung erhaltener Ergebnisse bei Durchmusterung und Charakterisierung sfGFP-bindender und schaltbarer Protein S-Varianten sowie deren Abkömmlingen. Die Ergebnisse wurden mit Proben unterschiedlicher Reinigungsstufen erhalten und in Anwesenheit von Ca²⁺ oder in EDTA-vermittelter Abwesenheit freier Ionen durchgeführt. Vier der dargestellten Sequenzen wurden aus der Trennung gemischter Klone erhalten (grau hinterlegt). Die dargestellten Werte der Primäranalysen wurden mit gemischten Klonen erhalten, alle weiteren Werte mit vereinzelt Varianten.

CID	Löslichkeits-analyse [%]	DSF		Automatisierte Durchmusterung A450 nm			Sekundär-ELISA (max. Hintergrund bei Messung in Anwesenheit von Ca ²⁺ oder EDTA) A450 nm					Konzentrationsabhängiger ELISA A450 nm		Biacore			
		Ca ²⁺	EDTA	Ca ²⁺	EDTA	$\frac{Ca^{2+}}{EDTA}$	sfGFP Ca ²⁺	sfGFP EDTA	Casein	BSA	Lysozym	K _D Ca ²⁺ [nM]	K _D EDTA [nM]	K _D Biacore Ca ²⁺ [nM]	K _D EDTA [nM]	K _a Ca ²⁺ [M-1s-1]	K _d Ca ²⁺ [s-1]
1	77	49,0	46,6	2,35	0,13	18,1	0,89	0,59	0,22	0,11	0,24	520 ± 100	3000 ± 1300	76,6	n.m.	1,1×10 ⁵	8,6×10 ⁻³
2	9	n.a.	n.a.	0,43	0,04	11,9	0,13	0,08	0,07	0,06	0,05						
3	14	n.a.	n.a.	0,21	0,02	11,9	0,10	0,08	0,05	0,08	0,09						
4	8	n.a.	n.a.	0,18	0,02	8,7	0,14	0,05	0,07	0,08	0,07						
5	20	43,2	42,0	1,58	0,07	21,1	1,66	0,06	0,05	0,05	0,05	73,3 ± 9,1	3400 ± 1200	15,33	42300	1,1×10 ⁵	1,7×10 ⁻³
6	7	n.a.	n.a.	1,18	0,15	7,7	1,36	0,06	0,10	0,06	0,05	unspezifisch					
7	6	42	n.d.	1,26	0,10	12,7	1,17	0,07	0,06	0,07	0,06						
8	55	45,8	43,8	0,37	0,02	16,6	0,46	0,12	0,16	0,08	0,13	1300 ± 270	10900 ± 3100	78,61	n.m.	9,1×10 ⁴	7,1×10 ⁻³
9	10	n.a.	n.a.	1,11	0,02	56,5	0,07	0,08	0,06	0,06	0,07						
10	6	n.a.	n.a.	1,70	0,08	22	1,00	0,06	0,05	0,06	0,05			8,84	n.m.	1,3×10 ⁵	1,1×10 ⁻³
11	5	41,8	39,0	1,17	0,03	38,6	2,01	0,06	0,06	0,07	0,06	47 ± 14	47600 ± 9500	6,6	224400	1,6×10 ⁵	1,1×10 ⁻³
12	10	n.a.	n.a.	1,61	0,02	72,9	0,16	0,06	0,06	0,07	0,07						
13	5	n.a.	n.a.	0,69	0,03	23,5	1,04	0,07	0,05	0,06	0,05			4,85	1770	1,1×10 ⁵	5,1×10 ⁻⁴
14	9	n.a.	n.a.	1,33	0,04	32,5	0,17	0,08	0,07	0,07	0,07						
15	56	46,2	45,4	0,69	0,03	23,5	0,09	0,11	0,06	0,06	0,04	n.m.	n.m.				
16	15	n.a.	n.a.	0,57	0,10	5,8	0,08	0,06	0,07	0,06	0,06						
17	5	n.a.	n.a.	0,70	0,02	44,3	0,19	0,06	0,06	0,07	0,04						
18	2	n.a.	n.a.	0,19	0,05	3,6	0,08	0,07	0,07	0,07	0,08						
19	8	42,9	n.d.	0,50	0,03	16,7	0,14	0,06	0,06	0,08	0,10						
20	17	44,7	47	0,45	0,06	7,8	0,52	1,08	0,09	0,08	0,19						
21	19	42,9	41,7	0,65	0,03	22,3	0,08	0,05	0,07	0,06	0,08						
22	11	45	n.d.	0,66	0,04	15	0,39	0,07	0,06	0,05	0,06						
23	10	n.a.	n.a.	0,82	0,03	27,4	0,08	0,05	0,07	0,06	0,05						
24	9	44,9	43,2	1,66	0,38	4,4	2,63	0,11	0,07	0,08	0,08	16,9 ± 2,2	n.m.	0,65	n.m.	5,2×10 ⁵	3,4×10 ⁻⁴
25	5,6	n.a.	n.a.	0,21	0,01	14,2	0,14	0,06	0,06	0,07	0,06						
26	40	47,6	41,3	0,82	0,11	7,7	0,27	0,13	0,06	0,06	0,07						
27	9	44,3	40,3	1,34	0,14	9,4	1,25	0,05	0,06	0,05	0,05			71,24	n.m.	4,7×10 ⁵	3,3×10 ⁻²
28	3	n.a.	n.a.	0,33	0,06	5,7	0,07	0,06	0,07	0,05	0,05						
29	77	48,6	46,8	0,25	0,04	5,9	0,05	0,05	0,06	0,07	0,09						
30	21	47,8	45,0	1,19	2,36	0,5	2,05	0,07	0,05	0,05	0,04	520 ± 60	1580 ± 430	19,94	64820	1,4×10 ⁵	2,7×10 ⁻³
31	4,16	n.a.	n.a.	0,71	0,78	0,9	0,12	0,06	0,06	0,05	0,05						
32	31	49,3	47	0,02	0,01	1,5	0,08	0,05	0,06	0,08	0,08						
33	n.d.	n.d.	n.d.	1,4	1,5	0,9	0,12	0,04	0,02	0,02	0,02						
34	n.d.	n.d.	n.d.	1,4	1,4	0,9	0,03	0,02	0,04	0,02	0,03						
35	n.d.	n.d.	n.d.	1,6	0,9	1,7	0,95	0,16	0,02	0,02	0,02						
36	n.d.	n.d.	n.d.	1,6	0,9	1,7	0,06	0,02	0,02	0,05	0,04						

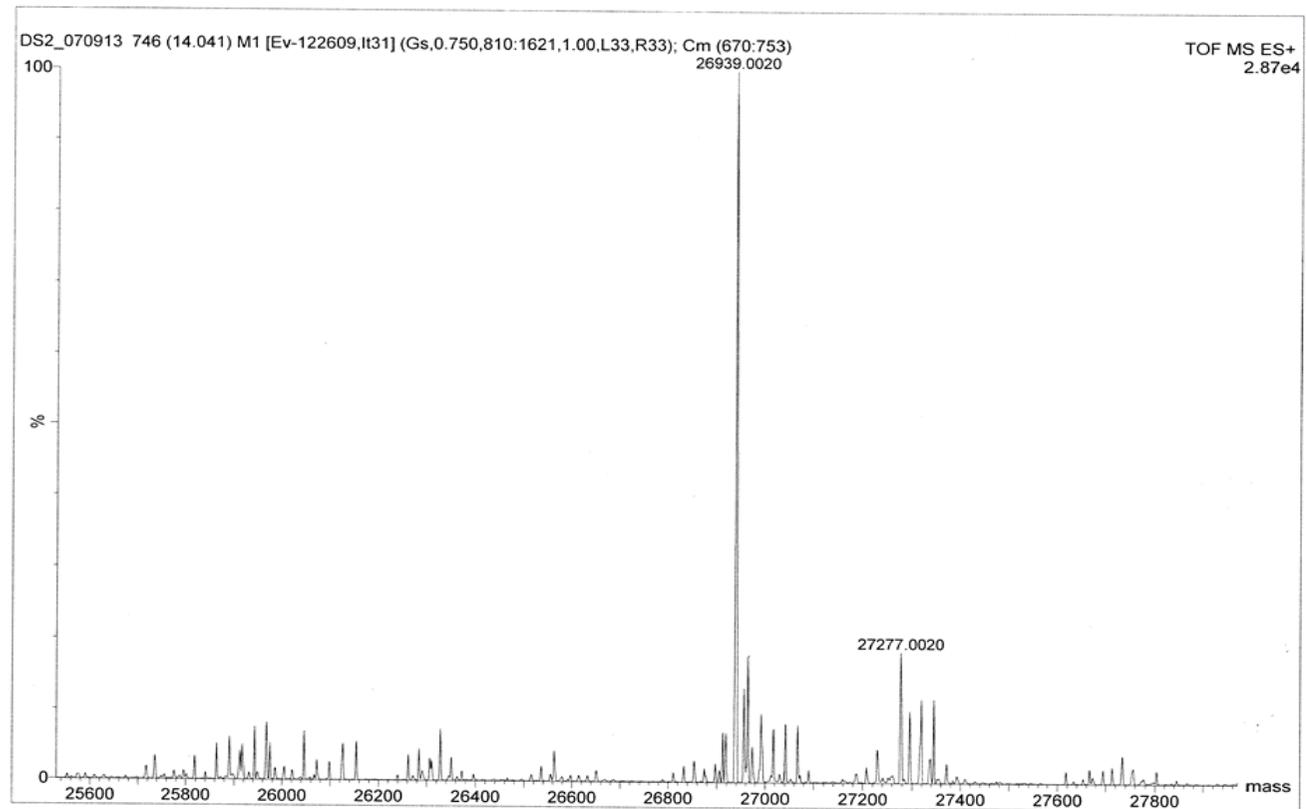


Abbildung A 12: Massenspektrum (MALDI-TOF) des biotinylierten sfGFP.

Theoretische Masse des sfGFP ohne Biotin: 26.621,6 Da. Masse des einfach biotinylierten sfGFP: 26.961 Da. Masse des doppelt biotinylierten sfGFP: 27.300 Da.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Hauke Lilie, der die Betreuung meiner Arbeit nach dem unerwarteten Tod von Prof. Dr. Rainer Rudolph übernahm. Sein Interesse, sein kritischer Blick und die stets konstruktive Kritik haben entscheidende Anstöße zum Gelingen dieser Arbeit gegeben.

Dr. Sven Pfeifer danke ich ganz besonders für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die er durch seinen unermüdlichen Eifer ermöglicht hat, und für seine immer bereitwillige Hilfe in allen Fragestellungen.

Dr. Penelope Higgs danke ich nicht nur für ihre umfangreiche Hilfe und viele Hinweise zur Produktion von MX-Sporen, sondern auch für die Gastfreundschaft in ihrem Labor.

All den Studenten, mit denen ich zusammenarbeiten durfte, möchte ich ebenfalls herzlich danken und für ihren weiteren Weg alles Gute wünschen; Christian Arlt und Anne Muchow für ihre Diplom- bzw. Masterarbeit, die beide Herausragendes geleistet und mit großer Selbstständigkeit das Projekt vorangetrieben haben. „Meinen“ Hiwis Michael Kauk und Holger Hermann danke ich natürlich für ihre Zuarbeit, jedoch auch für neue Ideen und anregende Diskussionen.

Großer Dank gilt natürlich auch meinen Kollegen der Nachwuchsforschungsgruppe „Künstliche Bindeproteine“ für das amüsante Klima im und auch außerhalb des Labors, sowie für tolle Diskussionen, Ideen und Anregungen! Im Speziellen danke ich Andreas Hoffman für seine Hilfe an der ITC (wenngleich die Daten es nicht bis in diese Arbeit geschafft haben) wie auch viele hilfreiche Anmerkungen. Danke an Patrick Studte, ohne den dieses Labor nicht denkbar gewesen wäre, und an Claudius Stordeur für seine Unterstützung in jeder Situation. Auch Marian Schneider und Florian Job, meinen Leidensgenossen während unseres Laborumzuges, sei gedankt.

Nicht zuletzt gilt mein Dank auch an allen Korrekturlesern dieser Arbeit, ohne die sie mit noch mehr Fehler in den Druck gegangen wäre. Danke also an Melanie Zimmermann, Peter Mletzko sowie an Marcus Böhme & Markus Liebscher!

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, deren Maß an Geduld und Verständnis rückblickend überraschend groß erscheint.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich bisher weder mit dieser noch einer anderen Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe. Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Halle (Saale), den 25.05.2016

Ort, Datum

Dominik Schneider

Angaben zur Person

Familiennamen: Schneider
Vorname: Dominik
vorhandener akademischer Grad: Diplom-Ingenieur
Geburtsdatum: 03. November 1981
Geburtsort: Gießen
Geschlecht: männlich
Wohnsitz und Korrespondenzanschrift: Harz 5a, 06108 Halle (Saale)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Fachgebiet der Promotion: Biochemie

Bildungsgang:

1992 – 1996 Grundschule Usingen
1996 – 2001 Christian-Wirth-Schule in Usingen
Abschluss Allgemeine Hochschulreife
07/2001–03/2002 Grundwehrdienst
3. Stabs- und Fernmeldebataillon 5, Koblenz
04/2002–03/2009 Studium Bioingenieurwesen (Note 2,1)
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
04/2009 – 10/2009 Diplomarbeit unter Prof. Rainer Rudolph
Abschluss: Diplom-Ingenieur (Note 1,0)
Thema der Arbeit: „Automatisierte Herstellung und Stabilitäts-
charakterisierung von γ -B-Kristallin-basierten, artifiziellen
Bindeproteinen im Mikrotiterplattenformat“
01/2010 – 12/2013 Wissenschaftlicher Mitarbeiter ProNet-T³ Initiative
Anfertigung der Promotionsarbeit unter PD Dr. Hauke Lilie in der
Arbeitsgruppe „Künstliche Bindeproteine“ von Dr. Sven Pfeifer
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
12/2013 – 12/2015 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Scil Proteins GmbH