

**Selektion, Maturierung und strukturelle Charakterisierung  
von auf einem dimeren Ubiquitin-*scaffold* basierenden anti-  
ED-B Bindeproteinen und deren Fusion mit Interleukin-2**

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

des

Zentrums für Ingenieurwissenschaften

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Dipl.-Ing. Anja Katzschmann

geboren am 09.02.1986 in Geithain

Gutachter: 1. Prof. Dr. Markus Pietzsch  
2. Prof. Dr. Milton Stubbs  
3. Prof. Dr. Christoph Syldatk

Tag der öffentlichen Verteidigung: 17.02.2015

# Verzeichnis und Abkürzungen

## Inhaltsverzeichnis

<b>Verzeichnis und Abkürzungen .....</b>	<b>II</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungen und Formelzeichen .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung und Zielsetzung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Antikörper.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Künstliche Bindeproteine.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Erzeugung künstlicher Bindeproteine.....	6
1.2.2 Ubiquitin als <i>scaffold</i> .....	10
<b>1.3 Extradomäne B des Fibronektins als relevante Zielstruktur .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Interleukin 2.....</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Zielsetzung .....</b>	<b>16</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>17</b>
2.1.1 Chemikalien .....	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	19
2.1.3 Chromatographiematerialien .....	20
2.1.4 Puffer und Lösungen .....	21
2.1.5 Standards und Kits .....	24
2.1.6 Rekombinante Proteine, Enzyme und Antikörper .....	26
2.1.7 Mikroorganismen, Bakteriophagen und Zelllinien.....	29
2.1.8 Primer und Plasmide.....	30
2.1.9 Antibiotika und Nährmedien .....	31
2.1.10 Geräte .....	33
2.1.11 Software.....	34
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>35</b>
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	35
2.2.1.1 Herstellung kompetenter Zellen.....	35
2.2.1.2 Transformation von <i>E. coli</i> .....	35
2.2.1.3 DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	36
2.2.1.4 PCR.....	36
2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	37
2.2.1.6 Isolation von DNA aus Agarose-Gelelektrophorese .....	38
2.2.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA .....	38
2.2.1.8 DNA-Verdau.....	38
2.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten .....	38
2.2.1.10 DNA-Sequenzierung .....	38

2.2.2	Selektion mittels <i>phage display</i> .....	39
2.2.2.1	Anzucht und Präparation der Phagen .....	39
2.2.2.2	Panning.....	40
2.2.2.3	Bestimmung des Phagentiters.....	41
2.2.3	Selektion mittels <i>ribosome display</i> .....	42
2.2.3.1	Konstruktion der RD-Konstrukte .....	43
2.2.3.2	Transkription und Translation <i>in vitro</i> .....	43
2.2.3.3	Targetinkubation und Immobilisierung ternärer Komplexe .....	44
2.2.3.4	Elution und Isolierung der mRNA .....	44
2.2.3.5	Reverse Transkription der mRNA .....	45
2.2.4	Kultivierung von <i>E. coli</i> und Herstellung rekombinanter Proteine .....	45
2.2.4.1	Proteinherstellung in 96- <i>deep-well</i> -Platten .....	45
2.2.4.2	Proteinherstellung im Schüttelkolben .....	46
2.2.5	Proteinchemische Methoden .....	46
2.2.5.1	Zellaufschluss.....	46
2.2.5.2	Nachweis hergestellter Proteine .....	46
2.2.5.3	Protein-Präparation aus <i>inclusion bodies</i> und Faltung .....	47
2.2.5.4	Reinigung der Targetproteine 67B89 und 6789 .....	48
2.2.5.5	Reinigung von Affilin®-eGFP-Fusionen mit Hexahistidin- <i>tag</i> .....	48
2.2.5.6	Reinigung von Affilin®-Varianten mit Strep- <i>tag</i> II .....	49
2.2.5.7	Reinigung von Affilin®-Molekülen ohne Affinitäts- <i>tag</i> .....	49
2.2.5.8	Reinigung von Affilin®-Interleukin-2-Fusionen .....	50
2.2.5.9	Konzentrierung und Umpufferung .....	50
2.2.5.10	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	50
2.2.5.11	Analytik mit Reversed-Phase-HPLC .....	51
2.2.5.12	Analytik mit SE-HPLC .....	51
2.2.5.13	SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese .....	51
2.2.5.14	IEF-Gelelektrophorese .....	52
2.2.5.15	Biotinylierung von Proteinen.....	52
2.2.5.16	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	53
2.2.6	Biophysikalische Methoden .....	54
2.2.6.1	Bindungsnachweis mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR) .....	54
2.2.6.2	CD-Spektroskopie .....	54
2.2.6.3	Messung von Temperatur-induzierten Denaturierungsübergängen .....	55
2.2.7	Methoden der Säugetier-Zellkultur .....	56
2.2.7.1	Bindungsnachweis auf ED-B-exprimierenden Zellen.....	56
2.2.7.2	Bioaktivitätsassay von hIL2-fusionierten Affilin®-Molekülen .....	56
2.2.8	Strukturanalyse mittels Röntgenkristallographie .....	57
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
<b>3.1</b>	<b>Herstellung der ED-B Targetproteine .....</b>	<b>58</b>
3.1.1	Rekombinante Herstellung und Reinigung der Targetproteine .....	58
<b>3.2</b>	<b>Selektion künstlicher Bindeproteine gegen Extradomäne-B .....</b>	<b>60</b>
3.2.1	Selektion mittels <i>phage display</i> .....	61
3.2.2	Identifizierung und Charakterisierung ED-B-bindender Affilin®-Moleküle.....	61
<b>3.3</b>	<b>Maturierung ED-B bindender Affilin®-Moleküle .....</b>	<b>65</b>
3.3.1	Konstruktion eGFP-kodierender Vektoren .....	65

---

3.3.2	Mutagenese mittels <i>error-prone</i> PCR .....	66
3.3.3	Selektion mittels <i>ribosome display</i> aus maturierter Bibliothek.....	66
3.3.4	Identifizierung und Charakterisierung von eGFP-fusionierten maturierten Affilin®-Molekülen	68
3.3.5	Charakterisierung von maturierten Affilin®-Molekülen .....	73
3.3.6	Einfluss einzelner Mutationen auf die Elternvariante 102472 .....	81
<b>3.4</b>	<b>Fusion von Affilin®-Molekülen mit Interleukin-2 .....</b>	<b>82</b>
<b>3.5</b>	<b>Strukturaufklärung von Affilin®-Molekülen .....</b>	<b>88</b>
3.5.1	Voruntersuchung zur Komplexbildung von Affilin® und ED-B .....	88
3.5.2	Kristallisation und Strukturlösung.....	89
3.5.3	Strukturbeschreibung .....	92
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>96</b>
4.1	Generierung von ED-B-bindenden Affilin®-Molekülen.....	96
4.2	Erzeugung von maturierten Affilin®-Molekülen .....	99
4.3	Fusion von Affilin®-Molekülen mit Interleukin-2.....	103
4.4	Strukturaufklärung von Affilin®-Molekülen .....	105
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>113</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>127</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>131</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>132</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>133</b>

## Abkürzungen und Formelzeichen

A	Optische Absorption
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzonsulfonylfluorid
AT	Ausgangstiter
AU	Absorptionseinheit
BFM	Biofeuchtmasse
BisTris	2,2-Bis-(hydroxyethyl)-(iminotris)-(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Serumalbumin des Rindes)
BWB	<i>bead wash buffer</i> (Waschpuffer für magnetische Kügelchen)
CD	Zirkulardichroismus
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CIP	<i>calf-intestinal alkaline phosphatase</i>
CV	<i>column volume</i> (Säulenvolumen)
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure - DNS)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSF	<i>differential scanning fluorimetry</i> (dynamische Differenzfluorimetrie)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	Elutionspuffer
ED-B	Extradomäne B des Fibronektins
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (verbessertes grün-fluoreszierendes Protein)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fetales Kälberserum)
GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GSH	Gluthation (reduziert)
GSSG	Gluthation-Dimer (oxidiert)
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)benzolsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IB	<i>inclusion bodies</i> (Einschlusskörperchen)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G

---

IL2	Interleukin-2
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i> (Metallchelate-Chromatographie)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
iTT	<i>in vitro</i> Transkription und Translation
kb	Kilobasen
Konz.	Konzentration
LB	<i>Lysogeny broth</i>
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht) [kDa oder $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]
MWCO	<i>molecular weight cut off</i> (Ausschlussgrenze Molekulargewicht) [kDa]
Nb	N-terminal biotinyliert
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PhD	<i>phage display</i>
POD	Peroxidase
RD	<i>ribosome display</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	Umdrehung pro Minute
rp-HPLC	<i>reversed phase</i> HPLC
RT	Reverse Transkriptase
sc-PCR	<i>single colony</i> PCR (Einzelkolonie-PCR)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> (Gelfiltration)
SE-HPLC	<i>size exclusion</i> HPLC
SIS	<i>selection in solution</i> (Selektion in Lösung)
SPR	<i>surface plasmon resonance</i> (Oberflächenplasmonresonanz)
TO	Protein ohne Affinitäts-Tag
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
Th	Protein mit Hexahistidin-Tag
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i>
U	Unit ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )
UV	ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
YT	<i>yeast extract and tryptone</i>
-	keine Angabe



Unter Verwendung der Proteasen Papain und Pepsin können Antikörper in zwei Fragmente geschnitten werden. Der Fc-Teil (*fragment crystallizable*) weist nur eine geringe Variabilität der Aminosäuresequenz zwischen verschiedenen Antikörperklassen auf. Das sogenannte Fab-Fragment (*fragment antigen binding*) hingegen besteht aus je einer variablen und einer konstanten Domäne der leichten und der schweren Kette. Das kleinste Antigen-bindende Fragment stellt das Fv-Fragment dar, das mittels limitierter Proteolyse oder rekombinant hergestellt werden kann. Es enthält nur die variablen Domänen der leichten und schweren Kette, die beide für eine Bindung an das Antigen zuständig sind. Die konservierten Bereiche der variablen Domänen werden von  $\beta$ -Faltblattsträngen gebildet, die durch je drei hypervariable *loops*, den so genannten *complementarity determining regions* (CDRs), verbunden sind. Pro Bindestelle sind somit die Aminosäuren von insgesamt sechs CDRs (das sogenannte Paratop) für die Wechselwirkung mit dem Antigen verantwortlich. Die Vielfältigkeit der Bindestelle beruht zum einen auf somatischer Rekombination der Gensegmente der variablen Domänen im Verlauf der B-Zellreifung (Tonegawa 1983). Zum anderen findet eine weitere Affinitätsmaturierung durch somatische Hypermutation während der adaptiven Immunantwort statt (Papavasiliou 2002). Durch die vielfältigen Bindungseigenschaften kommen Antikörper in vielen analytischen (Voshol 2009), diagnostischen (Brennan 2010) und therapeutischen (Reichert 2014) Anwendungen zum Einsatz. Des Weiteren gibt es die sogenannten Abzyme, die chemische Reaktionen katalysieren (Hanson 2005).

Die Herstellung von polyklonalen Antikörpern erfolgt durch die Immunisierung von Versuchstieren. Dadurch entsteht ein Gemisch aus Antikörpern mit verschiedener Affinität bzw. Spezifität, um verschiedene Bereiche der Antigene (Epitope) zu adressieren. Die Hybridoma-Technologie (Kohler 1975) ermöglichte es monoklonale Antikörper herzustellen. Diese Antikörper besitzen identische funktionelle und strukturelle Eigenschaften und sind somit für die Immuno-Affinitätschromatographie und Tumorthherapie sehr gut geeignet. Zur Vermeidung von unerwünschten Immunreaktionen bei therapeutischen Anwendungen wurden die z.B. aus Mäusen gewonnenen monoklonalen Antikörper humanisiert. Dazu wurden die CDRs der Mausantikörper in humane Gerüststrukturen eingesetzt.

Heute besteht allerdings auch die Möglichkeit durch den Einsatz von *phage display* Bibliotheken und transgenen Tieren vollständig humane, monoklonale Antikörper herzustellen (Weiner 2006). Das erste weltweit auf einem monoklonalen Antikörper basierenden Arzneimittel (Orthoclone OKT3<sup>®</sup>) wurde 1986 in den USA zugelassen. Mittlerweile sind mehr als 30 monoklonale Antikörper als Biopharmazeutika zugelassen und über 30 weitere befinden sich in der klinischen Phase III (Reichert 2014). Gerade in der Onkologie können Antikörper bzw. Antikörper-Drug-Konjugate eine wirksame und schonende Ergänzung zu Chemotherapeutika darstellen. Zu diesen Antikörper-Drug-Konjugaten gehört das 2013 zugelassene Präparat Kadcyca<sup>®</sup>, welches zur Behandlung von fortgeschrittenem oder metastasierendem Brustkrebs eingesetzt wird. Das Fusionsprotein besteht zum einen aus dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab<sup>®</sup>, der HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) auf der Oberfläche bestimmter Krebszellen erkennt, und aus dem zelltötenden Toxin DM1.

Zur Erhöhung der Wirkortspezifität oder Aktivierung von Effektorfunktionen können Antikörper mit mehreren Paratopen erzeugt werden (Byrne 2013). Der erste hergestellte trispezifische Antikörper (Triomab<sup>®</sup>) war Catumaxomab (Removab<sup>®</sup>). Dieser Antikörper bindet neben CD3 (*cluster of differentiation*) ebenso EpCAM (epithaliales Zelladhäsionsmolekül), das in allen humanen Adenokarzinomen vorkommt, und stimuliert zusätzlich die Tumorzellphagozytose (Chames 2009).



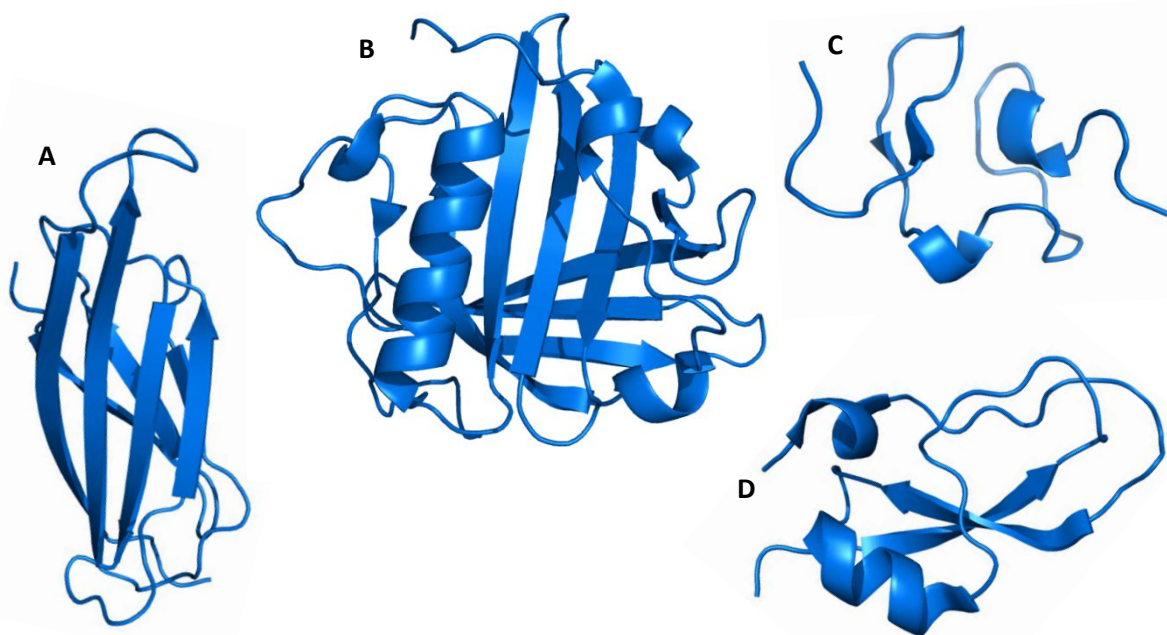
Trotz der Vorteile, die Antikörper vor allem hinsichtlich ihrer Spezifität und Affinität bieten, besitzen sie durch ihren komplexen Aufbau einige Nachteile. Bei der rekombinanten Herstellung werden dadurch aufwendige Klonierungsschritte und die Expression von zwei Strukturgenen notwendig (Skerra 2003). Da die Produktion im reduzierenden Zytoplasma von Bakterien auf Grund der fehlenden Ausbildung von Disulfidbrücken meist nicht möglich ist und auch die Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation fehlt, werden Antikörper häufig in eukaryotischen Zelllinien gewonnen. Jedoch ist die Gewinnung z.B. in *chinese hamster ovary* (CHO)-Zellen kostenintensiv.

Eine weitere Schwierigkeit entsteht bei der Manipulation der Antigen-Bindestellen, da diese aus je sechs verschiedenen Segmenten bestehen, die auf zwei verschiedenen Genen kodiert sind (Skerra 2003). Die Antigen-Bindestelle ist meist planar, wodurch eine Bindung in Vertiefungen oder aktive Zentren von Enzymen erschwert wird (Abbas 2010). Auch die Bivalenz von Antikörpern kann teilweise nachteilig sein und zu agonistischen Effekten durch eine Dimerisierung von Antigenen oder Rezeptoren führen. Antikörper sind zudem vergleichsweise große Moleküle, was die Gewebepenetration begrenzt (Christiansen 2004). Kleinere, von Antikörpern abgeleitete Fab- oder Fv-Fragmente können zwar in *E. coli* hergestellt werden (Skerra 1991), beinhalten jedoch für die Faltung essentielle Disulfidbrücken und neigen oft zur Aggregation (Worn 2001). Ein Beispiel für ein zugelassenes Fab-Fragment stellt Cimzia® (Certolizumab pegol) dar. Dieses rekombinante, humanisierte Antikörperfragment wurde zur Halbwertszeitverlängerung mit Polyethylenglykol konjugiert und wird zur Behandlung Rheumatoider Arthritis eingesetzt (Keystone 2008). Das scFv-Fragment Blinatumomab ist hingegen bispezifisch gegen den CD3-Rezeptor der T-Zellen und das Oberflächenprotein CD19 von B-Zellen gerichtet (Bauerle 2009).

## 1.2 Künstliche Bindeproteine

Auf Grund der nachteiligen Eigenschaften von Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten, die vorwiegend auf deren komplexen Aufbau und der damit verbundenen Kosten der Herstellung zurückzuführen sind, wurde mit der Suche nach alternativen Bindeproteinen begonnen. Potentielle Kandidaten für Gerüstproteine (*scaffolds*) sollten eine stabile Struktur besitzen und Bereiche aufweisen, die sich für die Generierung einer Bindestelle eignen, ohne die Proteinfaltung und Stabilität negativ zu beeinflussen. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass durch die Anwesenheit von *loops* mit unterschiedlichen Längen und Sequenzen mit exponierten hydrophoben Resten kein signifikanter Einfluss auf die Struktur des Gerüsts basierend auf dem Cytochrom  $b_{562}$  zu beobachten war (Ku 1995). Des Weiteren sollten diese *scaffolds* auf monomeren Polypeptiden beruhen, welche robust, einfach zu verändern und zudem in prokaryotischen Expressionssystemen hergestellbar sind (Skerra 2000). Andere gewünschte Eigenschaften lassen sich vom jeweiligen Anwendungsbereich ableiten. Für bestimmte Therapieanwendungen sollten künstliche Bindeproteine beispielsweise ein möglichst geringes Molekulargewicht aufweisen, um eine gute Gewebepenetration zu erzielen. Zusätzlich sollten die *scaffolds* nicht immunogen sein, was durch die Verwendung von Proteinen humanen Ursprungs erreicht werden kann. Für eine Anwendung in der Diagnostik sind zudem Moleküle geeignet, welche genetisch oder chemisch so modifiziert werden können, dass Fusionen mit Markermolekülen ermöglicht werden.

In den letzten 20 Jahren wurde eine Vielzahl an Gerüstproteinen untersucht, die zum einen sehr stabil sind und dennoch Bereiche zur Generierung einer hoch affinen Bindestelle besitzen. Im Folgenden werden einige *scaffold*-Konzepte vorgestellt (Weidle 2013). Generell kann man diese künstlichen Bindeproteine in zwei Kategorien einteilen: *scaffolds*, die auf Grund von exponierten *loops* eine Bindung zum Liganden ermöglichen und *scaffolds*, die Bindestellen in  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblättern tragen. Unter die erst genannten fallen Adnectine<sup>®</sup>, Anticaline<sup>®</sup>, Kunitz-Domänen-basierte Binder und Avimere<sup>®</sup>, während in der zweite Kategorie Darpins<sup>®</sup>, Affibodies<sup>®</sup> und Affiline<sup>®</sup>-Moleküle zu finden sind. Eine Übersicht ist in Abbildung 1-2 und Abbildung 1-3 gegeben.



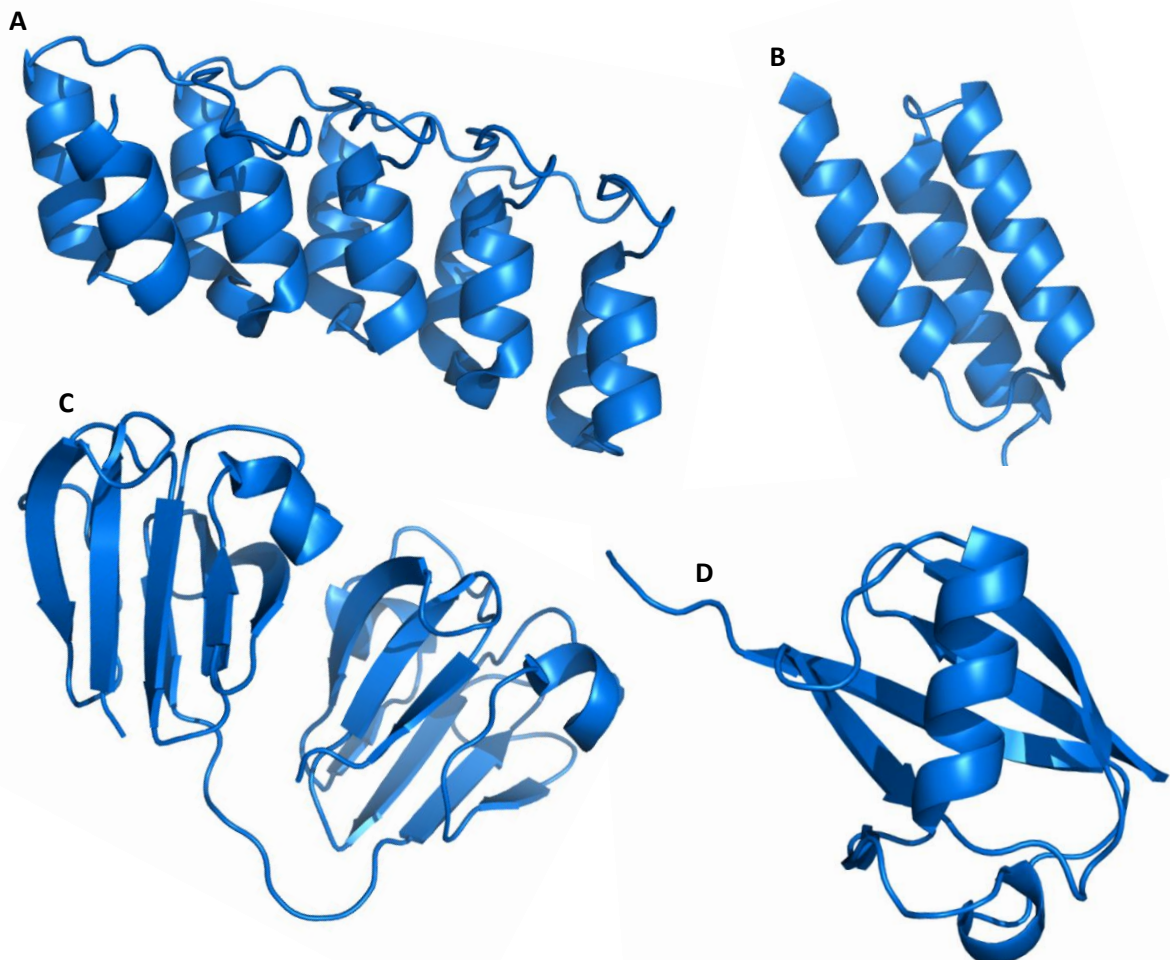
**Abbildung 1-2: Loop-basierte Gerüstproteine.** Diese Strukturen wurden aus der Protein DataBank (PDB, Stand Juni 2014) entnommen und mit dem Programm Pymol dargestellt. A: Adnectin<sup>®</sup> (PDB-Code: 3QWQ). B: Anticalin<sup>®</sup> (PDB-Code: 4GH7). C: *light-density lipoprotein receptor* als *scaffold* für Avimere<sup>®</sup> (PDB-Code: 1AJJ). D: Kunitz-Domäne (PDB-Code: 1KTH).

Adnectine<sup>®</sup> wurden von humanen Fibronectin abgeleitet und basieren auf der zehnten Domäne des Fibronectins Typ 3 (10Fn3) (Lipovsek 2011). Das Monomer besteht aus 94 Aminosäuren mit einer Immunglobulin-ähnlichen  $\beta$ -Faltblattstruktur und sechs *loops* (Abbildung 1-2A). Durch diese kompakte Struktur wird eine hohe Thermostabilität erzeugt, der Punkt der thermischen Entfaltung liegt über 80 °C. CT-322 ist ein PEGyliertes Adnectin<sup>®</sup>, das an den humanen *vascular endothelial growth factor* Rezeptor-2 (VEGFR2) mit einer Affinität von 11 nM bindet und bereits in einer klinischen Phase II zur Behandlung von Glioblastomen untersucht wurde (Bloom 2009).

Anticaline<sup>®</sup> (Abbildung 1-2B) hingegen basieren auf Lipocalinen und bestehen aus acht antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, die sich um eine zentrale Achse winden (Skerra 2008). Diese  $\beta$ -Stränge sind mit insgesamt vier flexiblen *loops* verbunden und bilden eine Bindungstasche (Beste 1999). Durch ihre geringe Größe von ca. 20 kDa ist zudem eine gute Gewebepenetration im Vergleich zu Antikörpern gegeben. PRS-050, ein *vascular endothelial growth factor* A-bindendes Anticalin<sup>®</sup>, durchlief bereits die klinische Phase I zur Behandlung von soliden Tumoren (Mross 2013).

Das Grundgerüst der Avimere® bilden die A-Domänen von humanen Zelloberflächenrezeptoren. Diese bestehen aus 35 Aminosäuren, welche mit drei Disulfidbrücken stabilisiert sind und eine Calciumbindestelle aufweisen (Abbildung 1-2C). Da nur 12 der 35 Aminosäuren für eine stabile Struktur essentiell sind, können die anderen Positionen zur Generierung einer Bindestelle genutzt werden. Durch eine Multimerisierung einzelner Avimere® kann zusätzlich die Bindung durch den Aviditätseffekt verstärkt werden. Somit konnten Proteine erzeugt werden, die z.B. Interleukin-6 oder den B-Zellaktivierenden Faktor (BAFF) im pikomolaren Bereich binden (Silverman 2005).

Ein weiteres *scaffold* mit modifizierbaren *loop*-Strukturen stellen Kunitz-Domänen dar (Abbildung 1-2D). Diese gehören zur Klasse der Proteaseinhibitoren und bestehen aus ca. 60 Aminosäuren mit drei Disulfidbrücken und drei variablen *loops* (Nixon 2006). Das erste, 2009 in den USA zugelassene Therapeutikum Ecallantid® (DX-88®) wird zu Behandlung von hereditären Angioödemem eingesetzt (Lehmann 2008).



**Abbildung 1-3: Helix und  $\beta$ -Faltblatt-basierte Gerüstproteine.** Diese Strukturen wurden aus der RCSB Protein Data Bank (PDB, Stand Juni 2014) entnommen und mit dem Programm Pymol dargestellt. A: Darpin® (PDB-Code: 4DX5). B: Affibody® (PDB-Code: 1LP1). C:  $\gamma$ -B-Crystallin als *scaffold* für Affilin®-Moleküle (PDB-Code: 2DJG). D: Ubiquitin als *scaffold* für Affilin®-Moleküle (PDB-Code: 1UBQ).

Zu den Antikörpermimetika mit Bindungsstellen auf  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblättern gehören die Darpins<sup>®</sup> (DARP – *designed ankyrin repeat proteins*). Ankyrine sind intrazelluläre Moleküle, die für verschiedene Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sind. Eine *repeat*-Domäne besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices und einem  $\beta$ -Faltblatt, die zusammen aus je 33 Aminosäuren gebildet werden (Abbildung 1-3A). Durch eine Multimerisierung können große Bindungsflächen erzeugt werden (Binz 2004). Auch die Erzeugung von multifunktionalen Proteinen ist möglich. Das erste therapeutische Darpin<sup>®</sup> ist ein VEGF-Inhibitor und befindet sich momentan in der klinischen Phase zur Behandlung von Makuladegeneration (Souied 2014).

Weitere alternative Bindeproteine stellen die Affibodies<sup>®</sup> dar (Abbildung 1-3B). Diese sind von der Immunglobulin-bindenden Domäne des Proteins A aus *Staphylococcus aureus* abgeleitet und bestehen aus drei gebündelten Helices (Nygren 2008). Durch eine einzelne Mutation in Helix 2 konnte die chemische Stabilität erhöht werden, während die Fab-Bindung verloren ging. Mit einer Randomisierung von zwei  $\alpha$ -Helices wurde eine Oberflächeninteraktion mit einem Antigen erzeugt. Auf diese Weise konnten gegen HER2 (humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2) gerichtete Bindemoleküle generiert werden (Tolmachev 2007). Eine diagnostische Anwendung konnte durch eine Kopplung des Bindeproteins mit dem Radiolabel <sup>125</sup>I erzielt werden, wodurch eine Tumordetektion *in vivo* möglich wurde (Orlova 2006).

Als weiteres Beispiel der *scaffold*-basierenden Proteine sind Affilin<sup>®</sup>-Moleküle zu erwähnen (Abbildung 1-3C und D). Diese können auf humanen  $\gamma$ -B-Crystallin (20 kDa, 176 Aminosäuren) basieren und aus zwei mit einem Linker verbundenen Domänen bestehen. Die in dieser Arbeit untersuchten Affilin<sup>®</sup>-Moleküle basieren hingegen auf einem Ubiquitin-Gerüst. Auf diesem konnten acht Oberflächenreste manipuliert werden ohne die Stabilität zu verlieren (Hey 2005). Eine genauere Beschreibung der Affilin<sup>®</sup>-Technologie ist im folgenden Kapitel 1.2.2 zu finden.

Eine zusätzliche Klasse von Bindemolekülen stellen Aptamere dar. Dabei handelt es sich nicht um Proteine, sondern um einzelsträngige DNA bzw. RNA oder Peptide. Diese werden aus sehr großen Bibliotheken mit Hilfe des SELEX-Verfahrens (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) selektiert (Daniels 2003). Das Aptamer Pegaptanib bindet hochspezifisch an VEGF und wurde 2004 in den USA zur Behandlung von Makuladegeneration zugelassen.

### 1.2.1 Erzeugung künstlicher Bindeproteine

Die Grundlage für künstliche Bindeproteine bilden kombinatorische cDNA-Bibliotheken. In diesen wurden auf DNA-Ebene bestimmte Aminosäurepositionen für eine Randomisierung freigegeben. Die Bibliotheken sollten weder *frameshifts*, Insertionen noch Deletion in den *scaffold*-Genen beinhalten, um eine funktionelle Expression in der jeweils verwendeten Selektionsmethode (z.B. *phage display* oder *ribosome display*) zu erzielen. Ebenso sollten keine zusätzlichen als die vorher definierten Mutationen vorliegen und alle Nukleotide der randomisierten Positionen statistisch gleich verteilt sein.

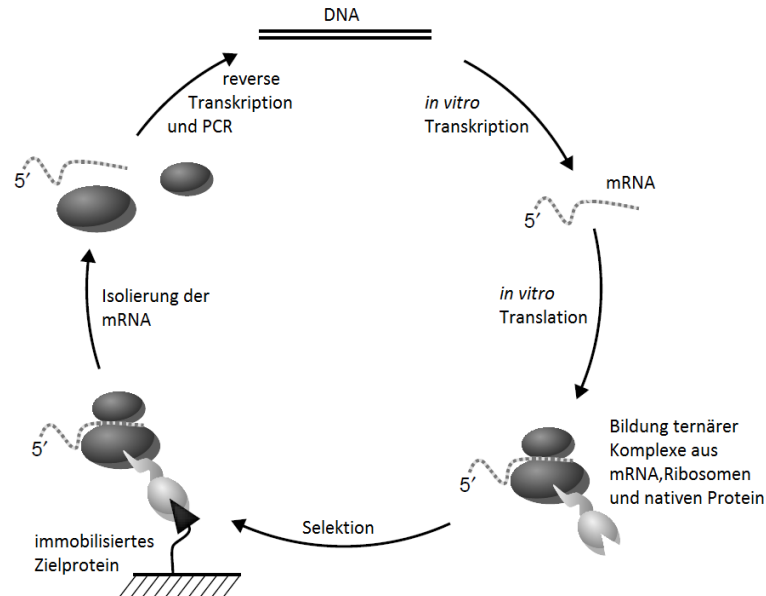
Da einige Aminosäuren durch mehrere Codons repräsentiert werden, gäbe es eine Anhäufung bestimmter Aminosäuren bei Gleichverteilung der Nukleotide. Die statistische Verteilung kann jedoch durch die Mutationsstrategie bzw. Bibliothekssynthese verändert werden. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von Syntheseprimern mit NNK-Motiv. Das N repräsentiert eine gleiche Mischung der Basen A, C, G und T, während K nur für die Basen G und T steht. In diesen Primern sind demzufolge an der ersten und zweiten Codonposition alle Basen vorhanden und an der dritten Position nur G und T zulässig. In einer derartigen Bibliothek ist somit die Anzahl der redundanten Codons reduziert und es treten nur ein Stopp- und ein Cystein-Codon auf. Eine andere Möglichkeit bietet die sloning®-Technologie (Van den Brulle 2008). Dabei werden nur definierte Triplets für eine Bibliothek verwendet, wodurch die Verteilung direkt eingestellt werden kann oder bestimmte Aminosäuren ausgeschlossen werden können.

Für die Auswahl der zur Randomisierung freigegebenen Aminosäuren werden häufig Reste benutzt, die bereits in natürlich vorkommenden Proteinen an Interaktionen beteiligt sind. Beispielsweise binden die *loops* der Lipocaline Haptene (Schlehuber 2002) und Affibodies® sind von einer Immunglobulin-bindenden Domäne des Protein A abgeleitet (Nygren 2008). Die Einführung einer *de novo* Bindestelle ist ebenso möglich, wie anhand von Affilin®-Molekülen (Ebersbach 2007) gezeigt wurde. Sind alle 20 Aminosäuren für eine Mutation zugelassen, ergibt sich für ein *scaffold* mit sieben randomisierten Positionen eine Bibliotheksgröße von  $1,28 \cdot 10^9$  Varianten auf Proteinebene. Somit ist die Auswahl eines geeigneten Selektionsverfahrens wichtigste Voraussetzung für die erfolgreiche Generierung von künstlichen Bindeproteinen. Eine gemeinsame Grundlage dieser Verfahren ist die Kopplung von Genotyp und Phänotyp, um die in der DNA eingeführten Mutationen auf der Proteinebene darzustellen und somit nach Proteinen mit gewünschten Eigenschaften selektieren zu können. Neben der Affinität kann auf Löslichkeit, Stabilität, Faltung und enzymatische Aktivität selektiert werden (Forrer 1999; Pershad 2013).

Die Selektionsmethoden sind rundenbasiert aufgebaut. Zunächst werden die in der DNA-Bibliothek codierten Moleküle in eine Protein-Bibliothek translatiert ohne dabei die genomische Information vom Protein zu trennen. Bei einer Selektion auf Affinität wird anschließend das zu bindende Target präsentiert. Moleküle ohne gewünschte Bindeeigenschaft werden aus dem Ansatz entfernt. Im finalen Schritt wird die genetische Information der bindenden Moleküle isoliert und kann in einer weiteren Runde eingesetzt werden. Durch Veränderung von einigen Parametern wie z.B. Verringerung der Targetkonzentration oder Inkubation bei verschiedenen Temperaturen kann der Genpool der Varianten mit den gewünschten Eigenschaften weiter eingeengt werden.

Häufig werden *ribosome displays* (Hanes 1997; Zahnd 2007; Stahl 2013) und *phage displays* (Smith 1985; Friedman 2007) eingesetzt. Als weitere molekulare *display*-Verfahren sind das mRNA *display* (Roberts 1997; Barendt 2013), DNA *display* (Yonezawa 2003; Bertschinger 2004), *displays* auf Bakterien- (Daugherty 2007; Kenrick 2010) und Hefezellen (Boder 1997) sowie das *display* auf Säugerzellen (Ho 2009; Bowers 2014) zu nennen.

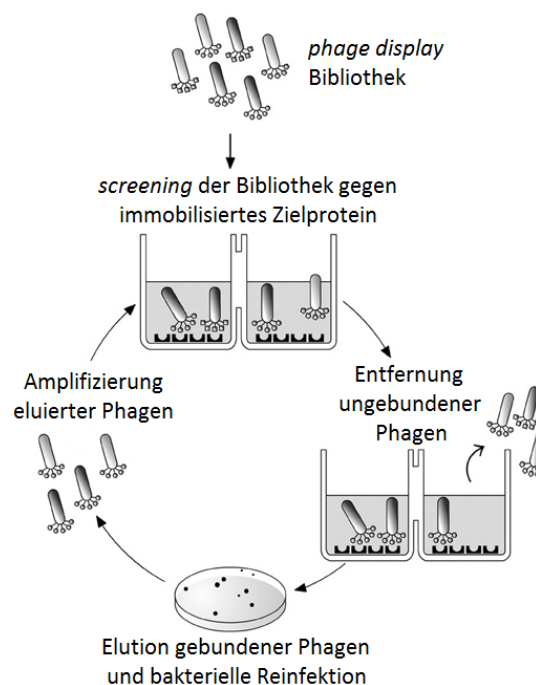
Das *ribosome display* wurde zunächst von Mattheakis beschrieben und von Plückthun weiterentwickelt (Mattheakis 1994; Hanes 1997). Dieses Verfahren findet vollständig *in vitro* statt und ist somit nicht von der Transformationseffizienz lebender Zellen, sondern nur von der Anzahl der verfügbaren Ribosomen abhängig. Dadurch können Bibliotheksgrößen von bis zu  $10^{14}$  Varianten durchsucht werden (Amstutz 2001).



**Abbildung 1-4: Darstellung des *ribosome displays* (Amstutz 2001).** Die DNA-Bibliothek wird zunächst *in vitro* transkribiert und translatiert. Durch das Fehlen eines Stopp-Codons in der Sequenz des Zielproteins kommt es zur Bildung von ternären Komplexen, die sowohl aus der mRNA, den Ribosomen als auch dem nativen Protein bestehen. Diese Einheiten werden in der Selektion gegen das Zielprotein eingesetzt. Nach dem Entfernen von nicht gebundenen Komplexen wird die mRNA aus den gebundenen Komplexen isoliert. Durch reverse Transkription und Amplifikation der cDNA entsteht eine selektierte Bibliothek, die in einem weiteren Zyklus eingesetzt werden kann.

Die DNA-Konstrukte der Bibliothek besitzen einen Promotor, der die mRNA-Synthese ermöglicht, gefolgt von der Ribosomenbindestelle und einer *spacer*-Sequenz. Die *in-vitro*-Transkription- und -Translation kann sowohl nacheinander als auch simultan ablaufen. Durch die Abwesenheit eines Stopp-Codons in der Sequenz des Zielproteins verbleibt die mRNA zusammen mit dem translatierten Protein am Ribosomen fixiert (Abbildung 1-4). Die eingefügte *spacer*-Sequenz ermöglicht dem Protein ein vollständiges Verlassen des Ribosomenkanals, wodurch die native Konformation eingenommen werden kann. Eine weitere Stabilisierung erfolgt durch die Zugabe von  $Mg^{2+}$ -Ionen. Diese sogenannten ternären Komplexe können mit einem immobilisierten Target inkubiert werden. Nach der erfolgten Bindung werden nicht affine Komplexe durch Waschstufen entfernt. Aus den auf diese Weise selektierten Komplexen kann die mRNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt und amplifiziert werden. Dies stellt den Ausgangspunkt für eine weitere Selektionsrunde dar. Diese Methode eignet sich zur Selektion neuer Bindeproteine ebenso wie für Affinitätsmaturierungen. Des Weiteren stellt das *ribosome display* eine Methode dar, bei der zusätzliche Diversität durch eine *error-prone-PCR* oder *gene shuffling* zwischen zwei Selektionsrunden eingebracht werden kann (Hanes 2000). Die nicht kovalente Kopplung von Genotyp und Phänotyp und die Instabilität der ternären Komplexe z.B. bei hohen Temperaturen limitieren jedoch auch die Einsatzbereiche des *displays*.

Das am weitesten verbreitete Selektionsverfahren stellt das *phage display* dar. Es wurde erstmals von Smith zur Präsentation eines Peptidsegmentes der Restriktionsendonuklease EcoRI auf filamentösen Phagen vorgestellt (Smith 1985). Beim *phage display* wird eine DNA-Bibliothek so in einen Phagemidvektor kloniert, dass die codierten Proteinvarianten monovalent als Fusion mit dem Hüllprotein pIII des M13-Phagen exprimiert werden. Das Hüllprotein pIII liegt als fünffache Kopie vor und besteht aus den drei Domänen N1, N2 und CT. Die ersten beiden Domänen spielen vor allem für die Infektion eine große Rolle, während die Domäne CT für die Verankerung in der Phagenhülle verantwortlich ist (Clackson 2004). Zunächst werden *E. coli*-Zellen mit dem Bibliothek-beinhaltenen Phagemidvektoren transformiert und anschließend mit Helferphagen infiziert (Abbildung 1-5). Erst dadurch erfolgt eine Verpackung der einzelsträngigen Phagemid-DNA in Phagenhüllproteine. Jedoch werden nur bei 1-10 % der Phagen Hüllproteine mit der gewünschten Proteinfusion präsentiert (Lowman 1991). Die Phagen werden mit dem immobilisierten Zielmolekül inkubiert (*panning*) und mehreren Waschschrritten unterzogen, um nicht-affine Phagenpartikel zu entfernen. Gebundene Phagen werden eluiert und können für eine Reinfektion eingesetzt werden. Dazu eignen sich jedoch nur *E. coli*-Stämme, welche einen Pilus ausbilden. An diesen bindet das Phagenhüllprotein pIII und wird durch Endozytose aufgenommen. Durch drei bis fünf *phage display*-Zyklen können auf diese Weise bindende Phagen angereichert werden. Durch eine Erhöhung der Stringenz der Waschschrritte kann die Affinität weiterhin verbessert werden. Ein Vorteil dieser Methode ist die Stabilität der Phagen. Dadurch können weitere Parameter wie die Temperatur während der Targetbindung variiert werden. Des Weiteren kann der eluierte Phagenpool einer *panning*-Runde direkt in einem ELISA auf die Bindungseigenschaften untersucht werden.



**Abbildung 1-5: Darstellung des *phage displays* (Tonelli 2013).** Die Bibliothek der Phagen mit präsentierten potentiellen Bindeproteinen wird zunächst auf dem immobilisierten Zielprotein inkubiert. In einem zweiten Schritt werden nicht gebundene Phagen durch Waschschrritte entfernt. Die gebundenen Phagen werden eluiert und zur Reinfektion von *E. coli*-Zellen verwendet. Somit sind die resultierenden Bakterienklone mit bindenden Phagenpartikeln angereichert.



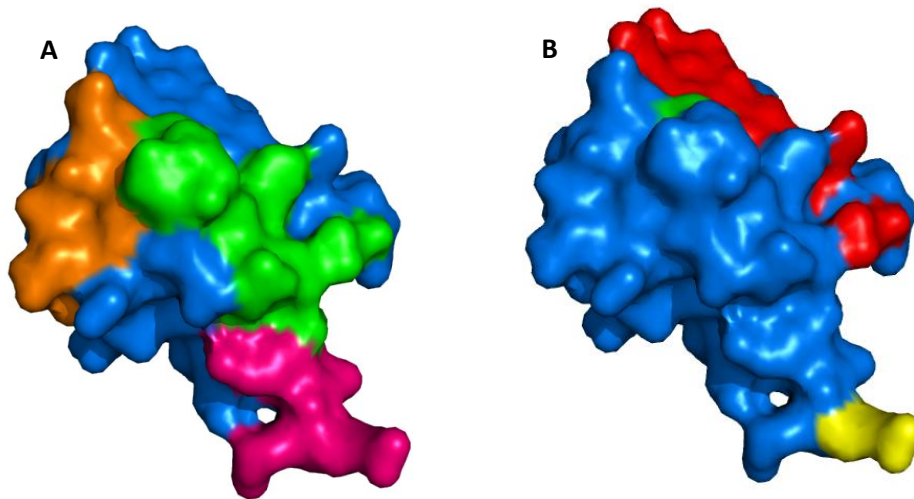
## 1.2.2 Ubiquitin als *scaffold*

Die in dieser Arbeit generierten künstlichen Bindeproteine basieren auf humanem Ubiquitin. Das Protein besitzt eine molekulare Masse von 8,5 kDa und kommt ubiquitär im Zytosol eukaryotischer Zellen vor. Die Sequenz und Funktion sind hochkonserviert in Eukaryoten, was eine Testung von Ubiquitin-basierten Proteinen in verschiedenen Tiermodellen erleichtert. Des Weiteren wird die Immunogenität durch die Verwendung eines Gerüstproteins von humanem Ursprung verringert. Das 76 Aminosäuren große Molekül besitzt einen sehr kompakten hydrophoben Kern und besteht aus einem fünfsträngigen, antiparallelen Falblatt und einer  $\alpha$ -Helix (Vijay-Kumar 1987; Piana 2013). Zusätzlich stellen die proteinchemischen Eigenschaften des Ubiquitins einen guten Ausgangspunkt zur Generierung von künstlichen Bindeproteinen dar. Ubiquitin entfaltet sich unter physiologischen Bedingungen erst bei über 100 °C und ist ebenso bei Anwesenheit von denaturierenden Reagenzien und bei extremen pH-Werten stabil (Vijay-Kumar 1987; Ibarra-Molero 1999; Jackson 2006).

Ubiquitin wurde von Goldstein zum ersten Mal isoliert (Goldstein 1975). Damals bestand die Annahme, dass dieses Protein in der B- und T-Zelldifferenzierung involviert ist. Diese rein immunologische Funktion wurde allerdings wiederlegt. Auf Grund der hohen phylogenetischen Konservierung des Proteins wurde bereits frühzeitig auf eine wichtige Funktion innerhalb der Zelle geschlossen (Schlesinger 1975; Ozkaynak 1984). Tatsächlich ist Ubiquitin eine der wichtigsten Komponenten im regulierten Abbau von Proteinen (Ciechanover 1984). Die Synthese dieses Proteins findet immer als Proprotein statt, das entweder an eine ribosomale Untereinheit fusioniert ist oder multimerisiert als Polyubiquitin vorliegt (Ozkaynak 1984; Wiborg 1985; Baker 1987). Zur Aktivierung spalten Deubiquinasen (DUBs) diese Ubiquitinketten in einzelne Monomere (Reyes-Turcu 2009). Die C-terminalen Glycin-Reste der Monomere können durch Enzym-Kaskaden mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lysin-Reste anderer Proteine verknüpft werden, um diese für einen Abbau zu markieren (Hershko 1998). Dieser Prozess ist ATP-abhängig und reversibel. Die gleiche Verknüpfung besteht auch innerhalb von Polyubiquitinketten. Ubiquitin besitzt sieben Lysin-Reste, wodurch über eine verschiedenartige Verknüpfung die Funktion gesteuert wird. Beispielsweise sind Proteine, die Ketten mit über Lys48 verbundenen Ubiquitinen verknüpft sind für einen Proteasom-Abbau markiert (Chau 1989). Eine Kette aus Lys63 verbundenen Ubiquitinen ist bei der DNA-Reparatur (Panier 2009) involviert oder markiert für einen lysosomalen Abbau (Barriere 2007).

Des Weiteren konnten auch extrazelluläre Funktionen als Immunmodulator nachgewiesen werden. Ubiquitin stellt einen CXCR4-Antagonisten dar und beeinflusst somit die Regulation von Leukozytenfunktionen. CXCR4 ist ein Protein der Chemokinrezeptorfamilie und wird sowohl von Stammzellen als auch von Tumorzellen exprimiert (Majetschak 2010).





**Abbildung 1-6: Struktur des Ubiquitins (PBD-Code 1UBQ).** (A) Hauptsächliche Interaktionsfläche mit *ubiquitin binding domains* (UBDs). Pink: C-terminale Region mit Arg72, Arg74, Gly75 und Gly76. Grün: Hydrophober Bereich inkl. Leu8, Ile44 und Val70. Orange: polare Oberfläche um Asp58. (B) Mutationen eines Affilin®-Moleküls dargestellt auf der Ubiquitin-Struktur. Rot: *de novo*-Bindestelle Reste 6, 8 und 62-66. Grün: F45W-Austausch. Gelb: Austausch G75A, G76A. Die Darstellung erfolgte mit Pymol.

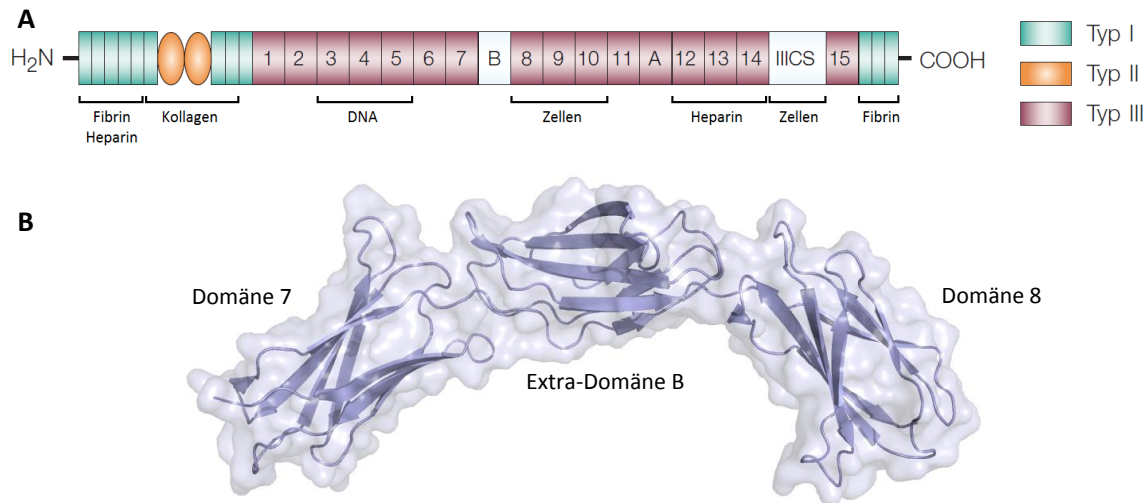
Die Interaktion des Ubiquitins an *ubiquitin binding domains* (UBDs) erfolgt vorwiegend über drei Oberflächenstrukturen (Hurley 2006; Winget 2010). Am häufigsten ist der hydrophobe Bereich um das Ile44 an einer Interaktion beteiligt (Dikic 2009). Eine zweite Region stellt der polare Bereich um Asp58 dar (Lee 2006). Eine dritte häufig vorkommende Interaktionsfläche befindet sich zudem am C-Terminus und wird aus zwei Arginin- und zwei Glycinen gebildet (Sloper-Mould 2001).

Zur Generierung von künstlichen Bindeproteinen auf Ubiquitin-Basis wurde eine *de novo*-Bindestelle im  $\beta$ -Faltblatt und im *loop* eingeführt, ohne den hydrophoben Kern zu verändern. Es wurden die Position 6 auf dem N-terminalen Faltblattstrang, die *loop*-Position 8 und die C-terminalen Faltblattpositionen 62 bis 66 randomisiert (Abbildung 1-6B). Zur Verbesserung der spektroskopischen Eigenschaften wurde das Phenylalanin an Position 45 durch ein Tryptophan ersetzt (Fiedler 2004). Am C-Terminus des Ubiquitins befinden sich zwei Glycin-Reste (Position 75 und 76), die von Ubiquitin-bindenden Domänen erkannt werden und bei der Bildung von Multimeren eine wichtige Rolle spielen (Dikic 2009; Tokunaga 2009). Des Weiteren werden diese beiden Aminosäuren von Deubiquitinasen erkannt. Daher wurden diese Glycin-Reste durch zwei Alanin-Reste ersetzt. Auf Basis dieses *scaffolds* konnten bereits erfolgreich Proteine (Affilin®-Moleküle) mit spezifischer Bindung an Zielproteine wie z.B. Wachstumsfaktoren erzeugt werden (Fiedler 2004). Die theoretische Bindungsfläche dieser Varianten liegt bei ca. 400 Å<sup>2</sup>. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Affilin®-Moleküle benutzt, die durch eine genetische Fusion von zwei verschiedenen Ubiquitin-Bibliotheken, verbunden durch einen kurzen Peptid-Linker, entstanden sind. Die resultierenden Proteine wiesen ein Molekulargewicht von ca. 17 kDa auf. Die theoretische Bindestelle konnte somit auf ca. 800 Å<sup>2</sup> erweitert werden. Dieser Wert liegt im Bereich der Fläche von Antikörper-Paratopen mit 750-850 Å<sup>2</sup> (Davies 1996). Durch eine Fusion von verschiedenen Affilin®-Molekülen können zusätzlich bi- oder trispezifische Bindemoleküle erzeugt werden.

### 1.3 Extradomäne B des Fibronektins als relevante Zielstruktur

Bei einem Wachstum von Tumoren kommt es ab einer Größe von ca. 2 mm<sup>3</sup> zur Angiogenese, um den Tumor mit Nährstoffen zu versorgen (Eatock 2000). Unter diesem Prozess wird die Neubildung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen durch Sprossung- oder Spaltungsvorgänge verstanden (Cohen 2006). Kleinere Tumore werden durch Diffusion aus dem angrenzenden Gewebe mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Angiogenese findet physiologisch während der fötalen Entwicklung statt, in ausgereiften und gesunden Geweben tritt diese hingegen nicht auf. Eine Neubildung von Gefäßen kann jedoch durch pathologische Veränderungen, die mit Entzündungen oder gesteigerten Sauerstoffbedarf verbunden sind, induziert werden. Dies ist z.B. der Fall bei der Wundheilung, aber auch bei Arteriosklerose und rheumatischer Arthritis (Folkman 1995). In Tumorgewebe kommt es zu einer deutlich gesteigerten Angiogenese (Folkman 2002) als im gesundem Gewebe. Durch diesen Zusammenhang ist es möglich, bestimmte Angiogenese-Marker wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Shih 2002) oder die Extradomäne B des Fibronektins als Zielstrukturen für Tumor-therapeutische oder -diagnostische Ansätze zu verwenden (Menrad 2005). Bereits jetzt gibt es einige durch die FDA zugelassene Medikamente, die vorwiegend gegen VEGF gerichtet sind, wie z.B. den humanisierten monoklonalen Antikörper Bevacizumab (Avastin®) (De Falco 2014).

Fibronectin ist neben der Wundheilung und Blutgerinnung ebenso in der Zelladhäsion, Zelldifferenzierung sowie Metastasierung von Tumoren und Migration von Zellen involviert (Magnusson 1998). Es kommt sowohl in der extrazellulären Matrix gebunden als auch im Blutplasma zirkulierend vor. Dieses Glykoprotein besitzt eine Größe von ca. 500 kDa und setzt sich aus zwei nahezu identischen Polypeptidketten zusammen. Es besteht aus insgesamt 30 bis 32 Domänen, die insgesamt aus drei verschiedenen Faltungstypen aufgebaut sind (Abbildung 1-7). Die zwölf Domänen des Faltungstyp I sind vorwiegend im C- und N-terminalen Bereich zu finden, während die beiden Domänen des Typs II nur am N-Terminus vorkommen. Der dritte Typ umfasst, je nach Variante, insgesamt 15 bis 17 Domänen und wird im zentralen Bereich präsentiert. Zusätzlich gibt es noch eine variable Sequenzregion (IIICS, *type III connectin segment*), die keine Homologie zu anderen Fibronectin-Ketten aufweist (Magnusson 1998). Durch alternatives Spleißen der prä-mRNA des Typs III können verschiedene Fibronectin-Isoformen entstehen (White 2008), darunter die Extradomäne A und Extradomäne B (ED-B). Interaktionen zwischen Fibronectin und verschiedenen Makromolekülen des Zytoskeletts, der extrazellulären Matrix oder auch Oberflächenrezeptoren diverser Zellen konnten nachgewiesen werden. Zudem wurden Bindungsstellen für Fibrin, Heparin, Kollagen, DNA und weitere Proteine identifiziert (Pankov 2002). Die meisten der Glykosylierungsstellen sind an Typ III-Domänen und der Kollagen-Bindestelle zu finden. Diese stabilisieren das Molekül gegen Proteolyse (Bernard 1982). Die physiologische Funktion der Glykosylierungen wurde jedoch noch nicht vollständig geklärt.



**Abbildung 1-7: Struktur des humanen Fibronektins. (A)** Modularer Aufbau des Fibronektins aus Domänen der Faltungstypen I, II und III. Es konnten u.a. Interaktionsstellen für Heparin, Fibrin und andere Proteine, aber auch DNA identifiziert werden. Die Extradomänen A und B, sowie die variable Region IIICS (*type III connectin segment*) können durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen und sind nur in bestimmten Geweben anzutreffen. (Neri 2005) **(B)** Struktur der Extradomäne B mit den flankierenden Domänen 7 und 8 (PDB-Code 4GH7, Darstellung mit Pymol).

Plasmafibronektin, welches in den Hepatozyten der Leber gebildet wird, beinhaltet keine Extradomäne B. Dahingegen konnte bei einer Vielzahl von malignen Tumoren wie z.B. Kolorektalkarzinomen (Santimaria 2003), Mammakarzinomen (D'Ovidio 1998) und Pankreaskarzinomen (Wagner 2008) ein gesteigerter Gehalt an Fibronektin-Isoformen mit ED-B nachgewiesen werden. Diese 91 Aminosäuren große Domäne gehört zum Typ III und wird aus sieben  $\beta$ -Faltblättern gebildet. Die Aminosäuresequenz ist in Ratte, Kaninchen und Mensch identisch.

Eine vollständige Funktionsklärung der Extradomänen A und B liegt noch nicht vor. Tiermodelle mit *knock-out* Mäusen weisen jedoch auf eine überlappende Funktion der zwei Extradomänen hin. Ist nur eine Extradomäne vorhanden, entwickeln sich die Mäuse phänotypisch normal, nur das Wachstum von Fibroblasten ist verlangsamt (Fukuda 2002). Ein gleichzeitiges Ausschalten der beiden Exons ist jedoch lethal für die Mäuse (Astrof 2007).

Zum Nachweis der Extradomäne B wurden mehrere Antikörper beschrieben. Der murine monoklonale Antikörper BC-1 bindet jedoch nicht direkt an diese Domäne, sondern an ein kryptisches Neopepitop, welches zwischen Domäne 7 und B gebildet wird (Carnemolla 1992). Der Antikörper L19 wurde aus einer halb-synthetischen Bibliothek von einzelkettigen Antikörperfragmenten (scFv) generiert und bindet mit einem  $K_D$ -Wert von 54 pM spezifisch an ED-B (Pini 1998). Der Nachweis der ED-B spezifischen Bindung wurde ebenso im Tiermodell erbracht (Borsi 2002).

## 1.4 Interleukin 2

Zytokine sind immunmodulatorische Moleküle und werden hauptsächlich von Lymphozyten und Monozyten produziert. Diese hormonähnlichen Biomoleküle spielen eine wichtige Rolle bei der Kommunikation und Koordination verschiedener Systeme zur Immunabwehr. Neben der Aktivierung von verschiedenen Zelltypen und Beeinflussung von Zelldifferenzierung können Zytokine Immun- und Entzündungsreaktionen auslösen, aber auch hemmen (Janeway 2001). In Unterschied zu Hormonen können Zytokine des gleichen Typs von verschiedenen Zellen produziert werden. Des Weiteren werden sie transient hergestellt und entfalten ihre Wirkung eher lokal (Loppnow 2001).

Die Familie der Zytokine umfasst fünf Hauptgruppen. Die Gruppe der Interferone weist immunstimulierende und vor allem antiviral bzw. antitumoral wirkende Moleküle auf. Eine PEGylierte Form des Interferon  $\alpha$ -2a (Pegasys®) wird bereits zur Behandlung von Hepatitis C eingesetzt. Kolonie-stimulierende Faktoren (CSFs) sind hingegen Wachstumsfaktoren und beeinflussen hämatopoetische Zellen. Eine weitere Gruppe stellen die Tumornekrosefaktoren dar. Diese werden hauptsächlich von Makrophagen gebildet und sind an lokalen sowie systematischen Entzündungen beteiligt. Die Chemokine sind kleinere Signalproteine, die eine Chemotaxis von Zellen auslösen können. Interleukine sind zum einen für die Kommunikation der Leukozyten zuständig, wirken aber auch auf andere, an der Immunantwort beteiligte Zellen (Brocker 2010). Die Aktivität der Zytokine wurde bezüglich Krebs- und Entzündungserkrankungen in Tiermodellen eingehend untersucht. Daraus resultierend wurden jedoch nur einige Zytokine als Anti-Krebs-Therapeutikum zugelassen, darunter Interleukin-2, Interferon- $\alpha$  2a und b sowie TNF (*tumor necrosis factor*) und GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*).

Die Erstbeschreibung von Interleukin-2 erfolgte 1976 als T-Zell-Wachstumsfaktor (*T-cell growth factor*) (Morgan 1976). Dieses monomere Glykoprotein besitzt eine molekulare Masse von 15,4 kDa (Taniguchi 1983). Nach Abspaltung des Signalpeptides besteht das funktionelle Zytokin aus 133 Aminosäuren mit einer Disulfidbrücke sowie einem freien Cystein. Dieses Cystein ist nicht für die biologische Aktivität essentiell (Doyle 1985; Boone 1988). Die Produktion erfolgt vorwiegend in aktivierten T-Zellen, jedoch konnte auch eine Expression in B-Lymphozyten und dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Granucci 2003). Neben der Wirkung auf T-Zellen, wie z.B. die Induktion von Apoptose, wirkt IL-2 auf das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen, natürlichen Killerzellen sowie Monozyten und Makrophagen (Malek 2008). Die Bindung von IL-2 erfolgt hochaffin an den IL-2-Rezeptor (Taniguchi 1993) mit anschließender Internalisierung des IL-2. Des Weiteren konnte Interleukin-2 auch im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden, wo es möglicherweise als Neuromodulator wirkt (Mott 2013). Durch die Fähigkeit natürliche Killerzellen zu aktivieren, wurde bereits frühzeitig die These aufgestellt, dass Interleukin-2 für eine Tumorthherapie relevant sein könnte (Taniguchi 1983). Normale Blutlymphozyten entwickeln sich unter Einfluss von IL-2 zu „lymphokin-aktivierten Killerzellen“ (LAK-Zellen) und konnten *in vitro* Tumore lysieren ohne gesunde Zellen zu schädigen (Lotze 1986).

---

Eine Zulassung von IL-2 gegen metastasierende Melanome wurde in den USA 1998 erreicht. Das verwendete Protein (Aldesleukin®) wird rekombinant in *E. coli* hergestellt und ist dementsprechend nicht glykolysiert, was sich nicht auf die biologische Aktivität auswirkt (Rosenberg 1984). Allerdings waren auch Nebeneffekte einer Behandlung wie Hypotonie, erhöhte Gefäßpermeabilität und damit verbundene periphere Ödeme zu beobachten. Im Extremfall kann dadurch ein Organversagen hervorgerufen werden (Ponce 2008).

Ein Ansatz zur Erhöhung der Selektivität einer Interleukin-2-Therapie besteht in der Fusion des Zytokins mit einem Bindeprotein oder Antikörper (Kontermann 2012; Pasche 2012). Neben dem Einsatz von IgG-Abkömmlingen (Davis 2003), ist ebenso eine Fusion mit Antikörper-Fragmenten oder künstlichen Bindeproteinen möglich.

Ein Beispiel dafür ist das Immunzytokin EMD273066 (huKS-IL2). Diese Fusion besteht aus einem gegen EpCAM gerichteten Antikörper verbunden mit zwei Interleukin-2-Molekülen. EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) wurde unter anderem auf Colon-, Mamma- und Prostatakarzinomen nachgewiesen (Balzar 1999). In einer klinischen Studie wurde die biologische Aktivität des huKS-IL2 untersucht, wobei die spezifische Aktivität und eine Erhöhung der Lymphozyten und natürlichen Killerzellen festgestellt wurde (Ko 2004). Eine weitere Fusion stellt das Konstrukt F8-IL2 dar. Der verwendete F8-Antikörper erkennt spezifisch die Extradomäne A des Fibronektins, welche ebenso wie die Extradomäne B einen Tumormarker darstellt (Villa 2008). In einem präklinischen Modell von renalen Zellkarzinomen konnte eine Akkumulation von F8-IL2 im Tumorgewebe erzielt werden. In weiteren Untersuchungen konnte zudem eine Infiltrierung von Makrophagen, natürlichen Killerzellen und Leukozyten im Tumor beobachtet werden (Frey 2010). Für das Darleukin® wurde das einzelkettige Fv-Antikörperfragment L19 über einen Linker mit dem Interleukin-2 verbunden. Das Fragment L19 bindet spezifisch an die Extradomäne B (ED-B) des Fibronektins (Borsi 2002). Es konnte sowohl in murinen als auch in humanen Lymphoma-Modellen eine Inhibierung des Tumorwachstums in Kombinationstherapie mit Rituximab festgestellt werden (Schliemann 2009).

## 1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Bindeproteine selektiert werden, die spezifisch die Extradomäne B des zellulären Fibronectins erkennen. Diese Domäne tritt sowohl bei der Embryogenese als auch bei der Neoangiogenese in Tumoren auf und stellt somit ein sehr interessantes Target dar. Als Ausgangspunkt wurde eine DNA-Bibliothek aus Di-Ubiquitinsequenzen verwendet. In dieser wurden für jedes Ubiquitin-Monomer die Positionen 6, 8 und 62-66 zur Randomisierung freigegeben.

In einem ersten Schritt sollten aus dieser Affilin<sup>®</sup>-Bibliothek Proteine, die spezifisch ED-B binden, mittels *phage display* selektiert werden. Nach einem ELISA-basierten *screening* hinsichtlich der Bindung sollten die potentiellen Kandidaten in einem größeren Maßstab hergestellt und charakterisiert werden.

Die angestrebte Affinität der Affilin<sup>®</sup>-Moleküle wurde dabei im niedrigen einstelligen  $K_D$ -Bereich festgelegt. Zur Erreichung dieser Affinitäten sollte ausgehend von den Ergebnissen der *phage display* Selektion eine Affinitätsmaturierung mittels *error-prone* PCR durchgeführt werden. Als Selektionsmethode wurde dabei das *ribosome display* ausgewählt. Für das sich anschließende *screening* sollte der Einsatz von C-terminalen eGFP-Fusionen untersucht werden, um ausschließlich funktionelle Proteine mit einem ausreichenden Expressionsniveau zu selektieren. Nach der Auswahl der besten Kandidaten sollte eine Charakterisierung sowohl der eGFP-Fusionen als auch der Affilin<sup>®</sup>-Moleküle ohne Fusionspartner auf Affinität, aber auch Thermostabilität durchgeführt werden. Des Weiteren sollte der Einfluss einzelner, mittels *error-prone* PCR erzeugter, Mutationen ermittelt werden. Final sollten die geeignetsten Affilin<sup>®</sup>-Moleküle ausgewählt werden und die Machbarkeit einer IL-2-Fusion hinsichtlich Herstellung und Funktion untersucht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte eine Strukturaufklärung von freien Affilin<sup>®</sup>-Molekülen und Affilin<sup>®</sup>-ED-B-Komplexen mittels Röntgenkristallographie durchgeführt werden. Daraus sollten weitere Erkenntnisse über die Bindung von Affilin<sup>®</sup> und Target gewonnen werden, um Aminosäurepositionen für eine mögliche Verbesserung der Affinität zu identifizieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2-1: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Lieferant	Reinheit
Aceton	Carl Roth (Karlsruhe, D)	≥ 99,8 %
AEBSF	Carl Roth (Karlsruhe, D)	-
Agar-Agar	Merck (Darmstadt, D)	-
Agarose (Seakem GTG)	Lonza (Basel, CH)	-
Ammoniumchlorid	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	-
Ammoniumsulfat	Carl Roth (Karlsruhe, D)	≥ 99,5 %
Ampicillin	Duchefa (Haarlem, NL)	> 91 %
Argininmonohydrochlorid	Merck (Darmstadt, D)	98,5-101,0 %
Avidin	IBA (Göttingen, D)	-
Bis-Tris	Merck (Darmstadt, D)	≥ 99 %
Blocker BSA in TBS (10 %)	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)	-
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, D)	-
BSA	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	≥ 96 %
Carbenicillin	AppliChem (Darmstadt, D)	-
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt, D)	≥ 98 %
Chloramphenicol	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	-
Cobalt(II)chlorid-hexahydrat	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	≥ 98 %
Coomassie Brilliantblau R 250	Merck (Darmstadt, D)	-
DABCO	Carl Roth (Karlsruhe, D)	≥ 97 %
DAPI	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	≥ 98 %
D-Desthiobiotin	IBA (Göttingen, D)	-
DMSO	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	99,9 %
DTT	Merck (Darmstadt, D)	-
EDTA	Merck (Darmstadt, D)	99,0-101,0 %
Eisen(III)chlorid-hexahydrat	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	> 99 %
Essigsäure	Merck (Darmstadt, D)	99,8-100,5 %
Ethanol	Merck (Darmstadt, D)	≥ 99,9 %
Ethylenglykol	Riedel-de-Haën	≥ 99,5 %
Ficoll® Solution (20 % in H <sub>2</sub> O)	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	-
Formaldehyd	Merck (Darmstadt, D)	≥ 37 %
Fötales bovines Serum	Lonza (Basel, CH)	-
Guanidiniumhydrochlorid	NIGU (Waldkraibing, D)	-
Glukose	Merck (Darmstadt, D)	-
L-Glutamin	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	-

Fortsetzung Tabelle 2-1: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Lieferant	Reinheit
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe, D)	≥ 99,5 %
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, D)	≥ 99 %
GSH	Merck (Darmstadt, D)	98,0-101,0 %
GSSG	Merck (Darmstadt, D)	-
HABA	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	≥ 99,5 %
Harnstoff	Merck Darmstadt, D)	99,0-100,5 %
Hefeextrakt	Merck (Darmstadt, D)	-
HEPES	Merck (Darmstadt, D)	≥ 99 %
Imidazol	Merck (Darmstadt, D)	> 99 %
IPTG	Carl Roth (Karlsruhe, D)	≥ 99 %
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, D)	≥ 99,8 %
Kaliumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, D)	> 99 %
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth (Karlsruhe, D)	> 99 %
Kanamycin	Duchefa (Haarlem, NL)	-
Kupfer(II)sulfat-pentahydrat	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	≥ 99 %
α-Laktose-monohydrat	Carl Roth (Karlsruhe, D)	-
Lithiumsulfat-monohydrat	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	≥ 99 %
Magnesiumacetat-tetrahydrat	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	≥ 99 %
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt, D)	≥ 98 %
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt, D)	99-100,5%
Mangan(II)sulfat-monohydrat	Carl Roth (Karlsruhe, D)	≥ 99 %
MES-Monohydrat	Merck (Darmstadt, D)	≥ 99 %
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe, D)	≥ 99,9 %
Mowiol 4-88	Carl Roth (Karlsruhe, D)	-
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth (Karlsruhe, D)	≥ 98 %
Natriumacetat	Carl Roth (Karlsruhe, D)	99,0-101,0 %
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt, D)	-
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, D)	99,5-100,5 %
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, D)	≥ 99,5 %
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt, D)	≥ 98 %
Natriumpyruvat	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)	-
Natriumthiocyanat	Merck (Darmstadt, D)	>99,9 %
Natriumthiosulfat-pentahydrat	Merck (Darmstadt, D)	-
Nickelsulfat	Merck (Darmstadt, D)	≥ 99 %
PCR Nucleotide Mix	Roche Diagnostics (Mannheim, D)	-
PEG 6000	Merck (Darmstadt, D)	-
PEG 8000	Merck (Darmstadt, D)	-
Pepton aus Casein	Carl Roth (Karlsruhe, D)	-
Pferde-Serum	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	-
Plaque Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf, D)	-
RNA (16S- and 23S-ribosomal from <i>E. coli</i> MRE600)	Roche Diagnostics (Mannheim, D)	-
RNasin® Plus RNase Inhibitor	Promega (Madison, WI, USA)	-



Fortsetzung Tabelle 2-1: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Lieferant	Reinheit
Salzsäure	Merck (Darmstadt, D)	37-38 %
Schwefelsäure	Carl Roth (Karlsruhe, D)	96 %
SDS	Merck (Darmstadt, D)	99,6 %
Silbernitrat	Carl Roth (Karlsruhe, D)	≥ 99,9 %
Sigma Blocking Buffer (10x)	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	-
TCA	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	≥ 99 %
Tetracyclin-Hydrochlorid	AppliChem (Darmstadt, D)	≥ 95 %
TFA	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	-
TMB	Kem-En-Tec Diagnostics (Taastrup, DK)	-
Tris	Angus Chemie (Ibbenbueren, D)	-
Triton X-100	Merck (Darmstadt, D)	≥ 99,5 %
tRNA <i>from brewer's yeast</i>	Roche Diagnostics (Mannheim, D)	-
Trypanblau	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	-
Tween 20®	Merck (Darmstadt, D)	-
Wasser (Nuklease frei)	Fermentas (St. Leon-Rot, D)	-
Wasser (HiPerSolv Chromanorm® für HPLC)	VWR (Darmstadt, D)	-
Zinksulfat-heptahydrat	Sigma Aldrich (Steinheim, D)	> 99 %

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-2: Verbrauchsmaterialien und Sonstiges

Material	Typ	Hersteller
96 <i>deep-well</i> -Platten	U96 DeepWell® Plates 2.0 mL	Nunc (Roskilde,DK)
96 <i>deep-well</i> -Platten	KingFisher Flex Microtiter Deepwell 96 plate, V-bottom	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
96 <i>well</i> -Flachbodenplatten	F96 MicroWell® Plates Medisorp®	Nunc (Roskilde,DK)
96 <i>well</i> -Flachbodenplatten	Microlon 200 (Medium Binding)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, A)
96 <i>well</i> -Platten für DSF	Light Cycler 480 Multiwell Plates 96	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
96 <i>well</i> -Rundbodenplatten	U96 MicroWell Plates PP 0.5 mL	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Amicon Ultra-4-Zentrifugalfilter	MWCO 3000 Da	Millipore (Billerica, MA, USA)
Biacore-Chip <i>chamber slides</i>	Sensor Chip SA Lab-Tek 4- <i>well chamber slides</i>	GE Healthcare (München, D) Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Dialyseschlauch	Spectra/Por MWCO 3500 Da	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Folien für Mikrotiterplatten	Air Pore (luftdurchlässig)	Qiagen (Hilden, D)
Folien für Mikrotiterplatten	Tape Pads (luftundurchlässig)	Qiagen (Hilden, D)

Fortsetzung Tabelle 2-2: Verbrauchsmaterialien und Sonstiges

Material	Typ	Hersteller
Gene Pulser® Küvette	0,1 cm Elektrodenspalt	Bio Rad (Hercules, CA, USA)
IEF Gel	Novex pH 3-10 IEF Protein Gels, 1,0 mm, 10 well	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Kamm für KingFisher	KingFisher Duo 12 Tip Comb	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Kristallisationsplatten	EasyXtal 15-Well Tool	Qiagen (Hilden, D)
Kristallisationsplatten	MRC 2-Well-Plate	Swissci (Neuheim, CH)
Küvetten	Für UV, micro PLASTIBRAND®	Brand (Wertheim, D)
Magnetische <i>beads</i>	Dynabeads® M-270 Streptavidin	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Magnetische <i>beads</i>	Dynabeads® M-280 Streptavidin	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Präzisionsküvetten	Suprasil 105-QS, 106-QS, 110-QS	Hellma (Mühlheim, D)
SDS-PAGE Gele	NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris Gels, 1,0 mm, 10-17 wells	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Spritzenfilter	0,22 µm; 0,45 µm (PES-Membran)	TPP (Trasadingen, CH)
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer <i>improved</i>	Hartenstein (Würzburg, D)
Zellkulturflasche	T-75 (75 cm <sup>2</sup> )	BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA)

### 2.1.3 Chromatographiematerialien

Tabelle 2-3: Verwendete Säulen für Chromatographie

Säulen	Größe	Hersteller
HiLoad 16/60 Superdex 75 <i>prep grade</i>	120 mL	GE Healthcare (München, D)
HiLoad 26/60 Superdex 75 <i>prep grade</i>	320 mL	GE Healthcare (München, D)
HiLoad 26/60 Superdex 200 <i>prep grade</i>	320 mL	GE Healthcare (München, D)
HiLoad 26/20 Q Sepharose FF	61 mL	GE Healthcare (München, D)
HiPrep 16/10 Phenyl HP	20 mL	GE Healthcare (München, D)
HiTrap Desalting	5 mL	GE Healthcare (München, D)
HiTrap Phenyl-Sepharose HP	5 mL	GE Healthcare (München, D)
HiTrap Q Sepharose FF	5 mL	GE Healthcare (München, D)
HiTrap HP	5 mL	GE Healthcare (München, D)
PLRP-S (5 µm, 300 Å)	4,6 x 250 mm	Agilent (Santa Clara, CA, USA)
Strep-Tactin Superflow <i>high capacity</i>	5 mL	IBA (Göttingen, D)
Superdex 75 5/150 GL	3 mL	GE Healthcare (München, D)
Superdex 200 5/150 GL	3 mL	GE Healthcare (München, D)

## 2.1.4 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders in den entsprechenden Kapiteln beschrieben, wurde in den Puffern nach dem vollständigen Lösen der festen Substanzen der pH-Wert mittels NaOH bzw. HCl bei Raumtemperatur eingestellt. Die Abweichung betrug dabei maximal +/- 0,1 pH-Einheiten.

**Tabelle 2-4: Stammlösungen für *ribosome display* und *phage display***

Lösung	Zusammensetzung
5 x <i>bead</i> -Waschpuffer (BWB)	0,5 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8,0
10 x Elutionspuffer (EB)	0,5 M Tris pH 7,5 1,5 M NaCl 200 mM EDTA
10 mL 0,3 M Magnesiumacetat-Lsg.	0,64 g Mg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O
10 mL 2 M Magnesiumacetat-Lsg.	4,2 g Mg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O
10 mL 10 % Tween® 20-Lsg.	1 mL 100 % Tween®20 9 mL H <sub>2</sub> O

**Tabelle 2-5: Lösungen und Puffer für *ribosome display* und *phage display***

Lösung	Zusammensetzung
BWB+T	1 x BWB 0,1 % Tween 20
EB-A	1 x PBS 30 mM MgAcetat 0,05 % BSA (Roche) 5000 <i>units</i> rRNA 25 µg/mL tRNA x µg Protein für komp. Elution
EB-komplett	1 x EB 50 mM EDTA 0,05 % BSA (Roche) 5000 <i>units</i> rRNA 25 µg/mL tRNA
PBSMT+	30 mM MgAcetat 1 x PBS 1 x Blocker BSA 0,05 % Tween®20 4 mM GSSG
PEG-Lösung	20 % PEG6000 2,5 M NaCl

Tabelle 2-6: Puffer für Chromatographie

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>pH-Wert</b>
HEPES-Puffer	10 mM HEPES 100 mM NaCl	7,3
rpHPLC Puffer A	10 % Isopropanol 0,1 % Trifluoressigsäure	
rpHPLC Puffer B	80 % Isopropanol 0,1 % Trifluoressigsäure	
NPI-20	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 20 mM Imidazol	8,0
NPI-500	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 500 mM Imidazol	8,0
Phenyl HP Puffer A	20 mM Bis-Tris 1 mM EDTA	6,0
Phenyl HP Puffer B	20 mM Bis-Tris 1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 mM EDTA	6,0
QFF Puffer A	20 mM Bis-Tris 1 mM EDTA	6,0
QFF Puffer B	20 mM Bis-Tris 1 M NaCl 1 mM EDTA	6,0
Strep-Tactin Puffer A	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA	8,0
Strep-Tactin Puffer B	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 2,5 mM Desthiobiotin	8,0
Strep-Tactin Puffer D	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1mM HABA	8,0

Alle zur Chromatographie verwendeten Puffer und Lösungen wurden vor Verwendung filtriert (Porengröße 0,20 µm) und bei Raumtemperatur gelagert.

**Tabelle 2-7: Puffer für *in-vitro*-Renaturierung**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>pH-Wert</b>
Aufschlusspuffer Faltung	100 mM Tris/HCl 1 mM EDTA	7,0
Dialysepuffer Faltung	100 mM Natriumacetat 6 M GdmHCl 1 mM EDTA	4,0
IB-Extraktionspuffer Faltung	60 mM EDTA 6 % Triton X-100 1,5 M NaCl	7,0
Solubilisierungspuffer Faltung	100 mM Tris/HCl 1 mM EDTA 6 M GdmHCl	8,5
Waschpuffer Faltung	100 mM Tris/HCl 20 mM EDTA	7,0

**Tabelle 2-8: Puffer für SDS-PAGE**

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
SDS-PAGE-Auftragspuffer (5 x) pH 8,0	40 % Glycerin 250 mM Tris 0,5 % (w/v) SDS 0,6 % (w/v) Bromphenolblau
Coomassie-Färbelösung	40 % Ethanol 10 % Essigsäure 0,1 % (w/v) Coomassie R 250
Entfärber-Lösung	10 % Ethanol 10 % Essigsäure
Lösung A Silberfärbung (60 mL)	30 mL Aceton 28,5 mL Wasser 25 µL 37 % Formaldehyd 1,5 mL 50 % TCA
Lösung B Silberfärbung (60 mL)	30 mL Aceton 30 mL Wasser
Lösung C Silberfärbung (60 mL)	60 mL Wasser 100 µL 10 % Natriumthiosulfat-Lösung
Lösung D Silberfärbung (60 mL)	60 mL Wasser 800 µL 20 % Silbernitrat-Lösung 600 µL 37 % Formaldehyd
Lösung E Silberfärbung (60 mL)	60 mL 2 % Natriumcarbonat-Lösung 25 µL 37 % Formaldehyd 25 µL 10 % Natriumthiosulfat-Lösung
Lösung F Silberfärbung (60 mL)	30 mL Wasser 30 mL 100 % Essigsäure

Tabelle 2-9: Sonstige Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung	pH-Wert
Biacore-Laufpuffer	1 x PBS 0,005 % Tween 20®	7,4
BSA-Blockierlösung (ELISA)	1 x PBS 3 % BSA 0,5 % Tween 20®	
DNA-Auftragspuffer 6 x Ficoll	15 % Ficoll 30 mM EDTA 0,06 % Bromphenolblau 1 % SDS	
Fällungspuffer	20 mM Bis-Tris 1 mM EDTA 3 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,0
Lysepuffer (in entsprechenden Aufschlusspuffer)	250 µg/mL Lysozym 1 mM AEBF 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> /MgSO <sub>4</sub> 20 U/µL Benzonase	
1 M Magnesium-Stocklösung	1 M MgSO <sub>4</sub> 1 M MgCl <sub>2</sub>	
10 x PBS	1,37 M NaCl 27 mM KCl 80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,7
1 x PBS	1:10 Verdünnung von 10 x PBS	7,4
1 x PBST 0,1 %	1 x PBS 0,1 % Tween 20®	7,4
Stopplösung für ELISA	0,2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
50 x TAE-Puffer	2 M Tris pH 8,5 einstellen 1 M Essigsäure 125 mM Na-EDTA	

## 2.1.5 Standards und Kits

Tabelle 2-10: Standards und Marker

Material	Hersteller
Albumin-Standard (2 mg/mL)	Pierce (Rockford, IL, USA)
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot, D)
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot, D)
HPLC-Standard Gel Filtration	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
IEF Marker 3-10, Liquid Mix	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
PageRuler Unstained Broad Range Protein	Fermentas (St. Leon-Rot, D)
QuickLoad® 2-Log DNA Ladder (0,1-10 kbp)	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)

**Tabelle 2-11: Kits und Fertiglösungen**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Ambion Turbo DNA Free Kit	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Bug Buster® 10x Protein Extraction Reagent	Novagen (Darmstadt, D)
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit	Pierce (Rockford, IL, USA)
EMEM-Medium	ATCC (Teddington, UK)
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
FBS	Lonza (Basel, CH)
Fibroblasts Growth Medium 2	Promocell (Heidelberg, D)
Gel Red	Biotium (Hayward, CA, USA)
GeneMorphII Random Mutagenesis Kit	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare (München, D)
MinElute Reaction Cleanup Kit	Qiagen (Hilden, D)
Novex IEF Anode Buffer (50x)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Novex IEF pH 3-10 Cathode Buffer (10x)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Novex IEF Sample Buffer pH 3-10 (2x)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20 x)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
PURExpress® <i>In Vitro</i> Protein Synthesis Kit	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden, D)
Quick Ligation Kit	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)
RNeasy MinElute Cleanup Kit	Qiagen (Hilden, D)
RPMI1640	Lonza (Basel, CH)
Supplement Mix	Promocell (Heidelberg, D)
Sypro® Orange Protein Gel Stain 5000x	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
T-STIM	BD (Heidelberg, D)

**Tabelle 2-12: Kits für Kristallisation**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Additive Screening Kit 78374	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Additive Screening Kit HR2-428	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
Screening Kit Hampton Research 1 und 2	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
Screening Kit JBS 1-4 und 5-8 classic	Jena Bioscience (Jena, D)
Screening Kit JBS JCSG ++ 1-4	Jena Bioscience (Jena, D)
Screening Kit Morpheus	Molecular Dimensions (Suffolk, UK)
Screening Kit Sigma basic und extension	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Screening Kit Sigma cryo	Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Screening Kit Sigma low ionic	Sigma Aldrich (Steinheim, D)

## 2.1.6 Rekombinante Proteine, Enzyme und Antikörper

**Tabelle 2-13: Rekombinante Proteine**

Protein	Beschreibung	Hersteller
67B_Th	Domänen 6, 7 und B des humanes Fibronektins, C-terminaler Hexahistidin- <i>tag</i>	Scil Proteins (Halle, D)
B89_Th	Domänen B, 8 und 9 des humanes Fibronektins, C-terminaler Hexahistidin- <i>tag</i>	Scil Proteins (Halle, D)
67B89_T0/Th	Domänen 6, 7, B, 8 und 9 des humanes Fibronektins ohne Affinitäts- <i>tag</i> /mit C-terminalen Hexahistidin- <i>tag</i>	Eigene Herstellung
Nb67B89_T0	Domänen 6, 7, B, 8 und 9 des humanes Fibronektins ohne Affinitäts- <i>tag</i> mit N-terminaler Biotinylierung	Scil Proteins (Halle, D)
7B8_T0	Domänen 7, B und 8 des humanes Fibronektins ohne Affinitäts- <i>tag</i>	Scil Proteins (Halle, D)
6789_T0/Th	Domänen 6, 7, 8 und 9 des humanes Fibronektins ohne Affinitäts- <i>tag</i> /mit C-terminalen Hexahistidin- <i>tag</i>	Eigene Herstellung
IL-2	Rekombinantes, humanes Interleukin-2 mit drei Cysteinresten	Peptotech (Rocky Hill, NJ, USA)

**Tabelle 2-14: Enzyme**

Protein	Hersteller	Konz.
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)	10 U/ $\mu$ L
Benzonase	Merck (Darmstadt, D)	250 U/ $\mu$ L
Bsal-HF	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)	20 U/ $\mu$ L
DNaseI	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)	2 U/ $\mu$ L
DpnI	Fermentas (St. Leon-Rot, D)	10 U/ $\mu$ L
EcoRI-HF	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)	20 U/ $\mu$ L
GoTaq Polymerase	Promega (Madison, WI, USA)	5 U/ $\mu$ L
Lysozym	Merck (Darmstadt, D)	50000 U/mg
MfeI-HF	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)	20 U/ $\mu$ L
NdeI	Roche Diagnostics (Mannheim, D)	10 U/ $\mu$ L
OneTaq™ Quick-Load 2xMaster Mix	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)	-
PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)	-
Phusion-HF	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)	-
T4 DNA Ligase	Roche Diagnostics (Mannheim, D)	5 U/ $\mu$ L
Transcriptor Reverse Transcriptase	Roche Diagnostics (Mannheim, D)	20 U/ $\mu$ L
Trypsin (rekombinant)	Roche Diagnostics (Mannheim, D)	-
XbaI	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)	20 U/ $\mu$ L
XhoI	Roche Diagnostics (Mannheim, D)	10 U/ $\mu$ L



Tabelle 2-15: Verwendete ED-B-bindende Affilin®-Moleküle

Proteine	Codierung
Affilin® mit Strep-tag II, zur Kontrolle der Targetproteine	3887
Affilin® mit Strep-tag II, zur Kontrolle des <i>ribosome displays</i> und der Fluoreszenzmikroskopie	46877
Dimeres Ubiquitin mit GIG-Linker (Wildtyp-Affilin®) mit den Austausch F45W,G75A, G76A, F128W, G163A, G164A ohne Affinitäts-tag	64161 (WubiHubi_T0)
Dimeres Ubiquitin mit GIG-Linker (Wildtyp-Affilin®) mit den Austausch F45W,G75A, G76A, F128W, G163A, G164A mit Strep-tag	64161 (WubiHubi_Ts)
Maturiertes Affilin® zur Kristallisation verwendet	77405
Affilin® aus <i>phage display</i> bei Raumtemperatur selektiert, für Affinitätsmaturierung verwendet	102472
Aus <i>phage display</i> 10 (37 °C) selektierte Affilin®-Moleküle mit Strep-tag II (siehe Kapitel 3.2.2)	128939 128973 128901 129035 128909 129015
Aus <i>phage display</i> 11 (37 °C) selektierte Affilin®-Moleküle mit Strep-tag II (siehe Kapitel 3.2.2)	129091 129259 129261 129237 129097 129119 129157 129129 129221 129225
Maturierte Abkömmlinge der Variante 102472 mittels <i>error-prone</i> PCR erzeugt, Herstellung als eGFP-Fusion mit C-terminalen His-tag (siehe Kapitel 3.3.4)	CP3-A5 CP2-F12 CP3-G9 CP1-E7 CP2-H3 CP3-H1 CP2-F11 CP1-A8 CP2-D6 CP3-E8 CP2-E12 CP1-H8 CP2-A11 CP2-F7

Fortsetzung Tabelle 2-15: Verwendete ED-B-bindende Affilin<sup>®</sup>-Moleküle

Proteine	Codierung
Maturierte Abkömmlinge der Variante 129091 mittels <i>error-prone</i> PCR erzeugt, Herstellung als eGFP-Fusion mit C-terminalen His-tag (siehe Kapitel 3.3.4)	CP1-H8
	CP1-E1
	CP1-A12
	CP2-H1
	CP1-E2
	CP1-A4
	CP1-B1
	CP1-G12
	CP1-F12
CP1-B2	
Wildtyp-Affilin <sup>®</sup> fusioniert mit eGFP und C-terminalen His-tag	136677
Affilin <sup>®</sup> 102472 fusioniert mit eGFP und C-terminalen His-tag	136679
Affilin <sup>®</sup> 129091 fusioniert mit eGFP und C-terminalen His-tag	136681
Ausgewählte maturierte Affilin <sup>®</sup> -Moleküle mit C-terminalen Strep-tag II ohne eGFP, Elternvariante 102472	CP3-A5_Ts
	CP1-E7_Ts
	CP2-F12_Ts
	CP3-G9_Ts
Ausgewählte maturierte Affilin <sup>®</sup> -Moleküle mit C-terminalen Strep-tag II ohne eGFP, Elternvariante 129091	CP1-H8_Ts
	CP1-E1_Ts
	CP1-A12_Ts
	CP2-H1_Ts
Affilin <sup>®</sup> -Variante CP2-F12 ohne Affinitäts-tag, ohne eGFP-Fusion	138809
Affilin <sup>®</sup> -Variante CP3-A5 ohne Affinitäts-tag, ohne eGFP-Fusion	138810
Affilin <sup>®</sup> 102472 mit der Punktmutation P38Q	140355
Affilin <sup>®</sup> 102472 mit der Punktmutation Y144F	140356
Affilin <sup>®</sup> 102472 mit der Punktmutation Del78I	140357
Affilin <sup>®</sup> 102472 mit den Punktmutationen M80I, I82T	140358
Wildtyp-Affilin <sup>®</sup> in Fusion mit Interleukin-2 C125S	118687
Affilin <sup>®</sup> -Variante 102472 CP2-F12 in Fusion mit Interleukin-2 C125S	138812
Affilin <sup>®</sup> -Variante 102472 CP3-A5 in Fusion mit Interleukin-2 C125S	138813
Affilin <sup>®</sup> -Variante 102472 CP2-F12 in Fusion mit Interleukin-2	139260
Affilin <sup>®</sup> -Variante 102472 CP3-A5 in Fusion mit Interleukin-2	139261

Tabelle 2-16: Antikörper

Antikörper	Hersteller	Konzentration
Anti-M13 <i>monoclonal antibody</i> -HRP	GE Healthcare (München, D)	1,25 mg/mL
Anti-Ubi-Fab-POD	AbD Serotec (Puchheim, D)	0,65 mg/mL
Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)	2 mg/mL
IL-2 rat anti-human mAb Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)	Keine Angabe
rabbit anti-Strep-tag IgG	GenScript (Piscataway, NJ, USA)	0,5 mg/mL

## 2.1.7 Mikroorganismen, Bakteriophagen und Zelllinien

### Mikroorganismen

In dieser Arbeit wurden nur *Escherichia coli*-Bakterien verwendet. Ein Überblick über die Genotypen der verwendeten Stämme ist in der nachfolgenden Tabelle gegeben.

**Tabelle 2-17: Verwendete *E. coli*-Stämme**

Stamm	Derivat Stamm	Genotyp	Referenz
BL21(DE3)	B	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	(Studier 1986; Grodberg 1988)
ER2738	K12	[F' <i>proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>f</sup> Δ(lacZ)M15 zff::Tn10(tet<sup>r</sup>)</i> ] <i>fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5</i>	Lucigen (Middleton, WI, USA)
HMS174(DE3)	K12	F <sup>-</sup> <i>recA1 hsdR(r<sub>K12</sub><sup>-</sup> m<sub>K12</sub><sup>+</sup>)</i> (DE3) (Rif <sup>R</sup> )	Novagen (Darmstadt, D)
JM108	K12	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi-1 relA1 glnV44 Δ(lac-proAB) hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)</i>	(Mairhofer 2010)
NovaBlue(DE3)	K12	<i>endA1 hsdR17(r<sub>K12</sub><sup>-</sup> m<sub>K12</sub><sup>+</sup>) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> (DE3) F'[ <i>proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>f</sup>Z M15::Tn10</i> ] (Tet <sup>R</sup> )	Novagen (Darmstadt, D)
XL1Blue	K12	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>f</sup> ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>R</sup> )]	Stratagene (La Jolla, CA,USA); (Bullock 1987)

### Bakteriophagen

Mit Hilfe von M13K07 Helferphagen (Invitrogen) wurden F'-positive *E. coli*-Zellen infiziert, um filamentöse, Affilin®-tragende Phagen zu gewinnen (Vieira 1987). Die Phagen präsentieren das Affilin® als Fusionsprotein des Phagenhüllproteins pIII.

### Zelllinien

**Tabelle 2-18: Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Typ	
CTLL-2	Zytotoxische T-Zelllinie aus Maus, exprimiert IL-2-Rezeptor, Wachstum abhängig von IL-2-Präsenz	(Gillis 1978) ATCC® TIB-214™ (Teddington, UK)
NHDF	Neonatale humane dermale Fibroblasten, adherent	Promocell (Heidelberg, D)
Wi-38	Embryonale humane Lungenfibroblasten, Expression der Extradomäne B, adherent	(Hayflick 1965) ATCC® CCL-75™(Teddington, UK)

## 2.1.8 Primer und Plasmide

Tabelle 2-19: Primer

Primer	Sequenz
F1	GGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGAT ATACATATG
F1A	CATACGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCC
Hubi-AA-rev-Bsa3	ATATATGGTCTCGGCACTGGCCGCACGTAAACGAAGAACTAAATG
I-del-fw	CTGCGTGCCGCGGGAGGCATGCAAATTTTGG
I-del-rv	CAAAAATTTGCATGCCTCCCGCGGCACGCAG
M80I_I82T-fw	GCCGCGGGAATTGGCATTCAAACTTTTGTTACCACGCAAAC
M80I_I82T-rv	GTTTGCCTGGTAACAAAAGTTTGAATGCCAATTTCCGCGGC
P38Qmut-fw	AAAGAAGGCATTCCGCAGGATCAGCAGCGTCTG
P38Qmut-rv	CAGACGCTGCTGATCCTGCGGAATGCCTTCTTT
pCD-pUCori-fw	CAGCAACGCGGCCTTTTT
pET20b-backbone	GGATCTAGGTGAAGATCC
pET28a-fw1	GTGCGCGGAACCCCTATTTG
pET28a-fw2	GTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGC
pET-GFP-Strep-fw	GTAGCTCGAGTGGAGCCACCCGAGTTTCGAAAAATCTGGTGGTGGCGGTAGTGG AGGTGG
pET-GFP-Strep-rev	GTATCTCGAGTGGCGCCGAGTCGACG
pET-GFP-StrepStop-fw	GTAGCTCGAGTGGAGCCACCCGAGTTTCGAAAAATAGTCTGGTGGTGGCGGTAG TGGAGGTG
pJET-for	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET-rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
QC-IL2-S125C-fw	GATTACCTTTTGCCAGAGCATTATTAG
QC-IL2-S125C-rev	CTAATAATGCTCTGGCAAAGGTAATC
RTtrunc	GCCACCACCACTTCGGCGTAGTCCGGTACGTCG
Spacer-fw-Mun	CGGAGGTAGTCAATTGGCTGGCTCTGGAGCTGGTGC
SPF-AA-rev-Eco	CCAGAGCCAGCGAATTCCTACCTCCGGCCGCGCGTAAACGAAGAACTA
SPF-AA-rev-Xho	TGCAGCCATCTCGAGGGCCGCACGTAAACGAAGAACTAAATGT
SPV-fw-Bsa	AGGAGGGTCTTAATGCAGATCTTCGTG
SPV-fw-Nde	AGGAGATATACATATGCAGATCTTCGTG
T7 Promoter	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
WH-IL2-C125S-fw	GGATTACCTTTAGCCAGAGCATTATTAGC
WH-IL2-C125S-rev	GCTAATAATGCTCTGGCTAAAGGTAATCC
Y144Fmut-fw	CAATATTGACTACCGTTTCTTACATTTAGTTCTTC
Y144Fmut-rv	GAAGAACTAAATGTAAAGAAACGGTAGTCAATATTG

Tabelle 2-20: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pCD12	Bibliothek-beinhaltenes Phagemid für Tat-PhD basierend auf pCD87SA (N-terminal: TorA, C-terminal: MyCut und Fos-C), Chloramphenicol-Resistenz	Scil Proteins (Halle), (Paschke 2005)
pET-20b(+)	Expressionsvektor mit C-terminalen His <sub>6</sub> -tag, <i>cloning sites</i> : Nde, XhoI, Amp-Resistenz	(Studier 1986)
pET-20b(+) DoSto	Modifizierter pET20b(+): zusätzliches Stopp-Codon TAA direkt hinter His-tag, höhere Terminalstringenz, Amp-Resistenz	Scil Proteins (Halle)
pET-28a	His <sub>6</sub> -tag N-terminal und optional C-terminal, Kan-Resistenz	Novagen (Darmstadt, D)
pET-28aS	Modifizierter pET-28a mit optionalen C-terminalen Strep-tag II, Kan-Resistenz	Novagen (Darmstadt, D)
pET-GFP-K1	Modifizierter pET20b DoSto mit eGFP vor His-tag	Scil Proteins (Halle)
pET-Strep-GFP	Modifizierter pET-GFP-K1 mit Strep-tag II vor eGFP	Scil Proteins (Halle)
pET-StrepStop-GFP	Modifizierter pET-Strep-GFP mit Amber-Stopp zwischen Strep-tag II und eGFP	Scil Proteins (Halle)
pIVEX2.4b Nde	Klonierungsvektor mit N-terminalen His-tag mit einer <i>multiple cloning site</i> und zusätzlicher NdeI-Schnittstelle	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
pPR-IBA1	Expressionsvektor mit C-terminalen Strep-tag II, Amp-Resistenz	IBA (Göttingen, D)
pPR-IBA1b	Modifizierter pPR-IBA1 ohne palindromische Bsal <i>site</i>	IBA (Göttingen, D)

## 2.1.9 Antibiotika und Nährmedien

Vor Einsatz der Medien wurden diese bzw. deren Komponenten autoklaviert (121 °C, 20 min). Nicht hitzestabile Bestandteile wurden steril filtriert (0,20 µm) und anschließend dem abgekühlten Medium zugefügt. Die mit \* versehenen Komponenten wurden dem autoklavierten Medium nach Abkühlung auf ca. 60 °C steril hinzugefügt.

Tabelle 2-21: Antibiotika

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	100 mg/mL	100 µg/mL
Carbenicillin	100 mg/mL	100 µg/mL
Chloramphenicol	30 mg/mL (in EtOH)	30 µg/mL
Kanamycin	50 mg/mL	50 µg/mL
Tetracyclin	12,5 mg/mL (in EtOH)	12,5 µg/mL

Tabelle 2-22: Diverse Nährmedien

Medium	Zusammensetzung
LB-Agar	10 g/L Pepton 5 g/L Hefeextrakt 5 g/L NaCl
SOBAG-Medium (bzw. SOBAG-Agar)	20 g/L Pepton 5 g/L Hefeextrakt 0,5 g/L NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> * 20 g/L Glukose* 30 µg/mL Chloramphenicol* (15 g/L Agar-Agar)
SOC-Medium	20 g/L Pepton (Casein) 5 g/L Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> /MgSO <sub>4</sub> 0,4 % (v/v) Glukose
TBY-Medium	5 g/L Hefeextrakt 10 g/L Pepton aus Casein 5 g/L NaCl 5 g/L MgSO <sub>4</sub>
2x YT-Medium	5 g/L NaCl 10 g/L Hefeextrakt 17 g/L Pepton aus Casein

Tabelle 2-23: Autoinduktionsmedium ZYM-5052 (1 Liter) (Studier 2005)

Stammlösung	Zusammensetzung
958 mL Grundmedium	1 % Pepton aus Casein 0,5 % Hefeextrakt (autoklavieren)
20 mL Salz-Stocklösung (50 x)	1,25 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,5 M NH <sub>4</sub> Cl 0,25 M NaCl (steril filtrieren)
20 mL Zucker-Stocklösung (50 x)	25 % Glycerin 10 % α-Laktose 2,5 % D-Glukose (autoklavieren)
2 mL Mg-Stocklösung (1000 x)	1 M MgSO <sub>4</sub> (autoklavieren)
200 µL Spurenelementlösung (1000 x)	0,63 mM ZnSO <sub>4</sub> 3,4 mM CaCl <sub>2</sub> 0,6 mM MnSO <sub>4</sub> 54 mM Na-EDTA 62 mM FeCl <sub>3</sub> 0,8 mM CuSO <sub>4</sub> /CoCl <sub>2</sub>

## 2.1.10 Geräte

**Tabelle 2-24: Geräte**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank	Kelvitron®t	Heraeus (Hanau, D)
CCD-Detektor	Saturn 944+	Rigaku Europe (Berlin, D)
CD-Spektrometer	J-810	Jasco (Gross-Umstadt, D)
Chromatographieanlage	Äkta Explorer	GE Healthcare (München, D)
Chromatographieanlage	ÄKTExpress	GE Healthcare (München, D)
Elektrophorese-Kammer	NuPAGE Xcell SureLock Mini Cell	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Elektroporationsgerät	Genepulser II	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Flowbox	HERA Safe	Heraeus (Hanau, D)
Fluorimeter	FluoroMax-3	Horiba Jobin Yvon (Unterhaching, D)
FPLC		Pharmacia Biotech (Uppsala, S)
Heizblock	SBH 130D/3	Stuart (Staffordshire, UK)
HPLC	Summit	Dionex (Sunnyvale, CA, USA)
Kolonie-Picker	K3-XL	KBiosystems (Basildon, UK)
Kolonie-Picker	QPix	Genetix (Biberach, D)
Kryostrom	XStream 2000	Rigaku Europe (Berlin, D)
Kühlelement	WKL26	Thermo Haake (Karlsruhe, D)
Lichtquelle Mikroskop	KL 1500 LCD	Leica Mikrosysteme (Wetzlar, D)
Mikroskop	Axio Scope A1	Carl Zeiss (Oberkochen, D)
Mikroskop (Kristallisation)	M80	Leica Mikrosysteme (Wetzlar, D)
Mikrotiterplatten-Reader	Sunrise	Tecan (Männedorf, CH)
Mikrotiterplatten-Washer	Columbus Pro	Tecan (Männedorf, CH)
Multipipette	Multipipette® plus	Eppendorf (Hamburg, D)
Multipipette (elektronisch)	VIAFLO 300	INTEGRA Biosciences (Zizers, CH)
Peltier-Element	LFI-3751	Wavelength Electronics (Bozeman, MT, USA)
pH-Messsonde	SenTix 81	WTW (Weilheim, D)
pH-Wert-Messgerät	inoLab Level 1	WTW (Weilheim, D)
<i>Real-time PCR</i> -Gerät	Light Cycler 480	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
Roboter (Kristallisation)	CrystalMation Minstrel UV	Rigaku Europe (Berlin, D)
Rollenschüttler	SRT9	Stuart (Staffordshire, UK)
Röntgengenerator	Mircomax 007	Rigaku Europe (Berlin, D)
Rotationsmischer	PTR-30	Grant Instruments (Hillsborough, NJ, USA)
Rotor	JA-25.50	Beckman Coulter (Krefeld, D)
Rotor	75006445	Heraeus (Hanau, D)
Schüttler	HT Ectron	Infors (Bottmingen, CH)
Schüttler	Innova 4330	New Brunswick Scientific (Enfield, USA)

Fortsetzung Tabelle 2-23: Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Selektionsroboter	KingFisher DUO	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Spannungsquelle	Power Pac 1000	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Spektrophotometer	Cary 300 Bio	Varian (Palo Alto, CA, USA)
Spektrophotometer	Nanodrop ND-1000	Peqlab (Erlangen, D)
Spektrophotometer	Ultrospec 10	Amersham Biosciences (Amersham, UK)
SPR-Messgerät	Biacore 3000	GE Healthcare (München, D)
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg, D)
Thermocycler	T3	Biometra (Göttingen, D)
Thermomixer	comfort	Eppendorf (Hamburg, D)
UHPLC	Ultimate 3000	Dionex (Sunnyvale, CA, USA)
Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls HD 2200	Bandelin electronic (Berlin, D)
Ultraturrax	T25 basic	IKA Labortechnik (Staufen, D)
Zentrifuge	Avanti J-30I	Beckman Coulter (Krefeld, D)
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus (Hanau, D)
Zentrifuge	Biofuge Stratos	Heraeus (Hanau, D)
Zentrifuge	Multifuge 3 L-R	Heraeus (Hanau, D)

## 2.1.11 Software

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde folgende Software verwendet.

Tabelle 2-25: Verwendete Software

Programm	Quelle
Biacore 3000 3.2 Control	GE Healthcare (München, D)
BiaEvaluation 4.1	GE Healthcare (München, D)
Cartesian AxSys	Cartesian Technologies Europe (Huntingdon, UK)
Chromleon 6.80	Dionex (Sunnyvale, CA, USA)
Crystal Trak Web 2.2.1	Rigaku Europe (Berlin, D)
FluorEssence 3.5.1.90	Horiba Jobin Yvon (Unterhaching, D)
Magellan 6.0	Tecan (Männedorf, CH)
PLA 2.0	Stegmann Systems (Rodgau, D)
PyMOL 0.99	DeLano Scientific (South San Francisco, CA, USA)
Sigma Plot 12.0	Systat Software (San Jose, CA, USA)
Unicorn 6.1	GE Healthcare (München, D)



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

##### *Chemisch kompetente Zellen*

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte angelehnt an Cohen (Cohen 1972). Dazu wurden die Zellen zunächst auf einer Agar-Platte bei 37 °C ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Ausgehend von einer einzelnen Kolonie wurde eine Übernachtskultur bei 37 °C in 5 mL 2x YT-Medium angesetzt. Die damit inokulierte Hauptkultur (500 mL mit entsprechenden Antibiotika) wurde bei 37 °C und 220 rpm inkubiert bis die optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) zwischen 0,5 und 0,8 lag. Danach wurde die Suspension für 30 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Biomasse durch Zentrifugation sedimentiert (2700 x g, 4 °C, 10 Minuten), mit 75 mL 100 mM  $CaCl_2$ -Lösung gewaschen und eine Stunde auf Eis gelagert. Als nächster Schritt schloss sich eine weitere Zentrifugation (2700 x g, 4 °C, 10 Minuten) an. Das entstandene Zellpellet wurde in 15 mL 100 mM  $CaCl_2$  aufgenommen und mit 525  $\mu$ L DMSO versetzt. Nachdem die präparierten Zellen zehn Minuten auf Eis gekühlt wurden, erfolgte eine Aliquotierung und anschließende Lagerung bei -80 °C.

##### *Elektrokompetente Zellen*

Zur Präparation von elektrokompetenten Zellen wurde ebenfalls eine Übernachtskultur, allerdings mit 1000 mL 2 x TBY, angesetzt. Das Wachstum erfolgte bei 37 °C bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,4-0,5. Die Zellsuspension wurde 60 Minuten auf Eis gehalten, bevor die Biomasse zentrifugiert (3000 x g, 4 °C, 10 Minuten) wurde. Das entstandene Pellet wurde dreimal mit kalten 10%igen Glycerin gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 1,3 mL kalten 10 %igem Glycerin aufgenommen, in je 40  $\mu$ L auf Eis aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.1.2 Transformation von *E. coli*

Die Aufnahme von Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen erfolgte durch Elektroporation oder Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen. Bei der Elektroporation wurden 40  $\mu$ L elektrokompetente Zellen mit 1-10 ng Plasmid-DNA vermischt und anschließend in einer gekühlten Transformationsküvette (Elektrodenabstand: 1 mm) einem Puls von 1,8 kV, 50  $\mu$ F und 100 Ohm ausgesetzt. Die transformierten Zellen wurden in 37 °C temperiertes SOC-Medium überführt und für 45-60 Minuten bei 37 °C und 220 rpm im Schüttler inkubiert (Dower 1988; Lin Tung 1995).

Für eine Transformation chemisch kompetenter Zellen wurden 40  $\mu$ L Zellen mit 5-10 ng Plasmid-DNA fünf Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für zwei Minuten in einem auf 42 °C temperierten Wasserbad erwärmt. Nach einer erneuten Abkühlung auf Eis wurden die Zellen in vorgewärmtes SOC-Medium gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C und 220 rpm schüttelnd inkubiert (Pope 1996). Durch Ausplattieren von 100  $\mu$ L auf eine LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden Einzelkolonien gewonnen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 16 Stunden im Brutschrank.

### 2.2.1.3 DNA-Isolierung aus *E. coli*-Zellen

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden *E. coli*-Zellen in 5 mL 2x YT-Medium über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Das durch Zentrifugation geerntete Zellpellet wurde mit einem QIAprep® Spin Miniprep Kit nach Herstellerangaben behandelt. Die erhaltene DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.2.1.4 PCR

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden für präparative PCR-Ansätze die PfuUltra II Fusion DNA-Polymerase und für analytische Ansätze die GoTaq-DNA-Polymerase eingesetzt. Für die Konstruktion der eGFP-Vektoren wurde jedoch die Phusion-HF-Polymerase und für die *error-prone* PCR die entsprechende Mutazyme-II-Polymerase eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden nach den Angaben des Herstellers vorbereitet und in einem Thermocycler inkubiert. Die Reaktionsbedingungen wurden den verschiedenen Primern, DNA-*templates* und an die Polymerase angepasst. Zusätzlich wurden Positivkontrollen sowie ein Leervektor als Negativkontrolle amplifiziert.

**Tabelle 2-26: Verwendete Primer und Hybridisierungstemperaturen**

PCR	Primer	Temp.
Umklonierung PhD	SPV-fw-Bsa, Hubi-AA-rev-Bsa3	52 °C
1./2. PCR im RD	F1/F1A, RTtrunc	65 °C
eGFP-Vektor mit Stopp	pET-GFP-Strep-Stop-fw, pET-GFP-Strep-rev	65 °C
eGFP-Vektor ohne Stopp	pET-GFP-Strep-fw, pET-GFP-Strep-rev	63 °C
Einzelmutanten von 102472	I-del-fw, I-del-rv, M80I_I82T-fw, M80I_I82T-rv, P38Q-fw, P38Q-rv, Y144F-fw, Y144F-rv	55 °C
<i>error-prone</i> PCR	T7 Promotor, SPF-AA-rev-Eco	50 °C
Amplifizierung <i>spacer</i> für RD	Spacer-fw-Mun, RTtrunc	57 °C
Klonierung in eGFP-Vektoren	SPV-fw-Nde, SPF-AA-rev-Xho	54 °C
Klonierung Hits mit Strep- <i>tag</i> II	SPV-fw-Bsa, Hubi-AA-rev-Bsa7	50 °C
Klonierung Hits mit <i>tag</i> -frei	SPV-fw-Nde, SPF-AA-StopXho	57 °C
qcPCR Interleukin-2 C125S	WH-IL2-C125S-fw, WH-IL2-C125S-rev	55 °C
qcPCR Interleukin-2 S125C	QC-IL2-S125C-fw, QC-IL2-S125C-rev	55 °C

**Tabelle 2-27: Zusammensetzung der Reaktionsansätze**

Substanz	Ansatz mit PfuUltra II	Ansatz mit Phusion	Ansatz mit GoTaq
Wasser	add 50 µL	add 50 µL	add 20 µL
Polymerase-Puffer	5 µL	10 µL	4 µL
10 mM dNTPs	1 µL	1 µL	0,4 µL
100 µM Primer 1	0,25 µL	0,25 µL	0,1 µL
100 µM Primer 2	0,25 µL	0,25 µL	0,1 µL
DNA- <i>template</i>	bis zu 10 µL	bis zu 10 µL	bis zu 5 µL
Polymerase	1 µL	0,5 µL	0,1 µL

Auf eine initiale Denaturierung folgten 18-24 Zyklen bestehend aus der Denaturierung, Hybridisierung und Synthese der DNA. Die Elongationsdauer wurde an die *template*-Länge und die verwendete DNA-Polymerase angepasst. Im Folgenden ist ein Protokoll einer PCR mit PfuUltra II-Polymerase als Beispiel gegeben. Im Anschluss wurden die Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.1.5) untersucht.

Initiale Denaturierung:	60 s	bei 95 °C
Denaturierung:	20 s	bei 95 °C
Hybridisierung:	20 s	bei 55 °C bis 72 °C
DNA-Synthese:	30 s/1kb	Bei 72 °C

#### *Einzelkolonie-PCR (sc-PCR)*

Um die DNA einzelner Bakterienklone hinsichtlich der Sequenz zu untersuchen, wurde zunächst eine Einzelkolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurde pro Klon ein 20 µL-Ansatz mit GoTaq-Polymerase (siehe Tabelle 2-27) angesetzt. Statt DNA-*template* wurde ein Kolonie mit einem Zahnstocher zunächst auf eine neue Agarplatte überimpft und anschließend direkt in den Ansatz gegeben. Somit konnte im späteren Verlauf eindeutig die Kolonie zugeordnet werden. Positive Klone, die im Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.2.1.5) eine Bande auf der erwarteten Höhe zeigen, wurden auf eine 96-*well*-Platte mit LB-Agar und entsprechenden Antibiotikum überführt. Die Sequenzierung dieser Klone erfolgte durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D).

#### *Error-prone-PCR (ep-PCR)*

Zur Konstruktion einer maturierten DNA-Bibliothek für das *ribosome display* wurden mittels *error-prone* PCR ungerichtete Mutationen in das Gen zweier ausgewählter Affilin®-Varianten eingebracht. Für die epPCR, durchgeführt nach Anleitung des GeneMorph® II Random Mutagenesis Kits (Agilent), wurden insgesamt zwei DNA-Mengen (0,5 ng und 5 ng *template*) verwendet, um verschiedene Mutationsraten zu erzielen. Zur Reinigung der mutierten DNA-Pools wurde eine Gelextraktion (siehe Kapitel 2.2.1.5) durchgeführt. Für die Überprüfung der Mutationsraten wurden die DNA-Pools in den Expressionsvektor pPR-IBA1b kloniert. Dazu wurde sowohl PCR-Produkt als auch Vektor mit XbaI und EcoRI verdaut, im Verhältnis 1:3 ligiert und in *E. coli* transformiert.

### **2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Analyse bzw. Präparation von DNA-Fragmenten, resultierend aus der PCR, wurde sich der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese bedient (Meyers 1976). Für DNA-Fragmente mit weniger als 1000 Basenpaaren wurden 1,6 %-ige (w/v) Agarose-Gele (Plaque Agarose, Biozym) verwendet, die in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer überführt wurden. Größere Fragmente oder Vektoren wurden in 1 %-iger Seakem-Agarose (Lonza) aufgetrennt. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 6 x Ficoll-Auftragspuffer versetzt und bei einer konstanten Spannung von 9 V/cm für 50 Minuten getrennt. Als Standard diente der „GeneRuler™ 100 bp ladder“ von Fermentas oder der QuickLoad® 2-Log DNA Ladder (0,1-10 kbp) von NEB. Zur Auswertung wurden die Gele für 20 Minuten in einer GelRed®-Lösung (5 µL/100 mL) inkubiert und anschließend mit dem Geldokumentationssystem analysiert.

### 2.2.1.6 Isolation von DNA aus Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Bande mit der erwarteten Größe wurde mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und durch ein Kit (*illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die Elution erfolgte durch DNA-freies Wasser. Eine Bestimmung der Konzentration des Eluates wurde, wie im folgenden Kapitel erläutert, an einem UV/VIS-Spektrophotometer durchgeführt.

### 2.2.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Quantifizierung der DNA-Probe wurde diese in einem Nanodrop-Spektrophotometer gegen den entsprechenden Puffer vermessen. Das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Eine Absorptionseinheit bei dieser Wellenlänge entspricht einer Konzentration von 50 µg/mL bei doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/mL bei einer einzelsträngigen DNA (Sambrook 2001).

### 2.2.1.8 DNA-Verdau

Zum Verdau von 2 µg DNA wurden 30 *Units* des entsprechenden Restriktionsenzym in einen 100 µL Ansatz eingesetzt. Der zum Enzym mitgelieferte Puffer bzw. die BSA-Lösung, sowie die Reaktionszeit und -temperatur wurden entsprechend der Herstellerangaben (NEB) verwendet. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 37 °C für 90 Minuten. Der auf diese Weise linearisierte Vektor wurde zusätzlich mit 1 µL Alkalischer Phosphatase (CIP, NEB) pro 100 µL Restriktionsansatz versetzt und für weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch diese Dephosphorylierung sollte eine Religation von Insert-freiem Plasmid verhindert werden. Die Isolierung der geschnittenen DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Eine Ausnahme bilden Restriktionsansätze, die für das *phage display* verwendet wurden. Diese wurden direkt mittels *illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) gereinigt und zur Transformation verwendet.

### 2.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von Insert und Vektor wurde das Rapid DNA Ligation Kit von Roche verwendet. Das Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA, bezogen auf die Molaritäten, wurde auf 1:3 eingestellt. Die Gesamtmenge an DNA betrug 100 ng. Der Ansatz wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über das MinElute Reaction Cleanup Kit von Qiagen gereinigt.

### 2.2.1.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte durch die Fa. Sequiserve (Vaterstetten, D) oder Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) basierend auf der Methode nach Sanger (Sanger 1977).

## 2.2.2 Selektion mittels *phage display*

Zur Selektion von ED-B-bindenden Affilin®-Molekülen wurde ein *phage display* (Smith 1985) mit dem filamentösen Bakteriophagen M13 verwendet. Das Genom des Phagen umfasst ca. 6500 bp und ist von ca. 2700 Hauptcapsidproteinen pVIII umgeben. Zusätzlich gibt es weitere Capsidproteine wie z.B. pIII, die in geringerer Kopienzahl vorliegen und mit Fremdproteinen fusioniert werden können. Es wurde ein Phagemid verwendet, das nur die Sequenzen der Hüllproteine inklusive der Fremdproteinsequenz kodierte, um die Replikation weniger zu beeinträchtigen als es bei der Replikation des gesamten Genoms der Fall wäre. Erst bei der Anwesenheit von Helferphagen, welche alle anderen Funktionen des M13-Phagen kodierten, konnte die Phagemid-DNA in Phagenpartikel eingebaut werden. Die Fremdsequenz wurde als N-terminale Fusion des pIII-Hüllproteins auf der Oberfläche präsentiert. Auf diesem Wege lag eine direkte Kopplung von Genotyp und Phänotyp vor.

### 2.2.2.1 Anzucht und Präparation der Phagen

Vor dem Beginn der ersten Selektionsrunde musste der *E. coli*-Stamm ER2738 mit der ausgewählten Affilin®-Bibliothek SPVF(7) im Vektor pCD12 transformiert werden. Im Vorfeld konnte gezeigt werden, dass durch einen Restriktionsverdau der Bibliotheks-DNA mit BsaI (New England Biolabs) und anschließender Desphosphorylierung mit CIP (New England Biolabs) der Anteil an Leerplasmiden deutlich reduziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Näheres ist in Kapitel 2.2.1.8 beschrieben. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde auf 85 ng/μL eingestellt. Für die Transformation wurden 26 Aliquots von je 25 μL kompetenten ER2738-Zellen verwendet. Diesen wurde je 1 μL der zuvor verdauten DNA hinzugefügt und mittels Elektroporation in den *E. coli*-Stamm eingebracht (Parameter: 1,8 kv; 600 Ω; 10 μF). Anschließend wurden diese Zellen in je 975 μL Recovery Medium (zu ER2738 mitgeliefert, Lucigen) gegeben und bei 37 °C schüttelnd bei 220 rpm inkubiert. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz bzw. der Überpräsentation der Bibliothek wurden Proben mit 10 μL entnommen und in einer 10<sup>7</sup>-, 10<sup>8</sup>- und 10<sup>9</sup>-Verdünnung auf SOBAG-Platten ausgestrichen. Alle Transformationsansätze wurden in einer Vorkultur mit 500 mL 2x YT-Medium vereinigt und für zwei Stunden bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Aus der Vorkultur wurden 1000 mL 2x YT mit 30 μg/mL Chloramphenicol angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert. Anschließend wurden 400 mL dieser Kultur mit 2 mL M13K07-Helferphagen infiziert, was einer moi (multiplicity of infection) von ca. 1 entspricht. Nach einer Stunde Inkubation wurden nicht infizierende Phagen durch einen Medienwechsel entfernt. Dazu wurde die Kultur für 10 min bei 4°C und 4500 rpm zentrifugiert und das Pellet in neuem Medium inkl. Antibiotikum resuspendiert. Die weitere Inkubation erfolgte über Nacht bei 26 °C und 220 rpm.

Zur Ernte wurden die freigesetzten Phagen durch Zentrifugation (20 min, 4 °C, 17000 g) getrennt und durch Zugabe von einem Viertel Volumen eiskalter Fällungslösung (20 % PEG6000, 2,5 M NaCl) für eine Stunde auf Eis gefällt. Nach einen Zentrifugationsschritt (20 min, 4 °C, 12000 g) wurde das Phagenpellet in 10 mL kaltem PBS resuspendiert, anschließend ein zweites Mal gefällt und in 4 mL PBS aufgenommen. Anschließend wurde die Phagenlösung über einen Spritzenfilter mit 0,45 μm Porengröße filtriert. Zur Konzentrations- und Titerbestimmung wurden insgesamt 50 μL abgenommen, die restliche Lösung wurde mit 0,5x Sigma Blocker versetzt und bis zur weiteren

Verwendung bei 4 °C gelagert. Für die Bestimmung der Konzentration der Gesamtphagen wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen und die folgende Gleichung 2-1 angewendet. Die Bestimmung des Anteils an funktionellen Phagen ist in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben.

$$\text{Phagen/ml} = \frac{(A_{269} - A_{320}) \cdot 10^{16}}{N} \quad \text{Gleichung 2-1}$$

$A_{269/320}$  Absorption bei 269 nm bzw. 320 nm

N Basenzahl Plasmid [bp]

Für weitere Selektionsrunden erfolgte die Anzucht und Ernte der Phagen analog zu dem oben beschriebenen Schema. Allerdings wurde der Maßstab verkleinert, so dass nur noch 30 mL als Hauptkultur eingesetzt wurden. Alle anderen Schritte wurden im Verhältnis des Volumens angepasst.

### 2.2.2.2 Panning

Die mit Sigma Blocker versetzten Phagen (siehe Kapitel 2.2.2.1) wurden direkt für die nachfolgende Selektionsrunde eingesetzt. Für die Inkubation mit dem Targetprotein sowie für die Elution wurde ein halbautomatischer Roboter (KingFisher, Thermo Scientific) in Verbindung mit magnetischen *beads* verwendet. Die *beads* (Dynabeads® M-280 Streptavidin) wurden am Tag vor der Selektion mit PBS gewaschen und anschließend mit 10x Sigma Blocker über Nacht bei 4 °C inkubiert und vor dem Einsatz erneut mit PBS gewaschen. In einem ersten Schritt wurde das N-terminal biotinylierte *target*-Protein 67B89 an die mit Streptavidin versehenen *beads* bei 37 °C für zwei Stunden gekoppelt. Parallel erfolgte eine Vorinkubation der Phagenlösung mit *beads*, um unspezifisch bindende Phagen aus der Lösung zu entfernen. Durch einen magnetischen Arm des Roboters konnten die *beads* gesammelt, gewaschen und in andere *wells* der Mikrotiterplatten überführt werden. Die mit *target* beladenen Partikel wurden anschließend für 30 Minuten bei 37 °C mit der Phagenlösung inkubiert. Zusätzlich wurde dieser Lösung das *off-target* 6789 (unbiotinyliert) hinzugefügt. Dadurch sollten Proteine, die an die umliegenden Domänen 6, 7, 8 und 9 binden, vom *bead*-gekoppelten *target* entfernt werden. Durch Waschen mit PBST 0,1 % bzw. PBS wurden ungebundene und schwach gebundene Phagen entfernt. In den folgenden Selektionsschritten wurden weitere bzw. längere Waschschrte durchgeführt, um schwächer bindende Varianten zu entfernen. Die Elution erfolgte mit 30 µg/mL Trypsin ebenfalls bei 37 °C für 30 Minuten. Von diesem Eluat wurden 10 µL für die Bestimmung des Eluattiters abgenommen, der Rest wurde mit je 20 mL einer exponentiell wachsenden ER2738-Vorkultur ( $OD_{600} = 0,5-0,6$ ) angeimpft und für 30 Minuten bei 37 °C stehend inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz auf einer SOBAG Q-Tray-Platte mit Chloramphenicol ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die von den Platten abgeschwemmte Zellsuspension wurde direkt für die folgende Selektionsrunde eingesetzt. Nachfolgend sind die Selektionsschemata mit den jeweiligen Parametern dargestellt (Tabelle 2-28 und Tabelle 2-29).

**Tabelle 2-28: Selektionsschema *phage display* PhD10**

Zyklus	Inkubation und Targetmengen	Bead-Mengen	Waschen	Elution
1	2 h bei 37 °C 7 µg Nb67B89_T0 + 58 µg 6789_T0	50 µL M-280 SA-beads	5 x PBST0,1 5 x PBS	30 min bei 37 °C, 200 µL 30 µg/µL Trypsin
2	2 h bei 37 °C 3,5 µg Nb67B89_T0 + 29 µg 6789_T0	25 µL M-280 SA-beads	5 x PBST0,1 5 x PBS	30 min bei 37 °C, 200 µL 30 µg/µL Trypsin
3	2 h bei 37 °C 0,9 µg Nb67B89_T0 + 7 µg 6789_T0	10 µL M-280 SA-beads	13 x PBST0,1 3 x PBS	30 min bei 37 °C, 200 µL 30 µg/µL Trypsin
4	2 h bei 37 °C 0,175 µg Nb67B89_T0 + 1,4 µg 6789_T0	10 µL M-280 SA-beads	17 x PBST0,1 3 x PBS	30 min bei 37 °C, 200 µL 30 µg/µL Trypsin

**Tabelle 2-29: Selektionsschema *phage display* PhD11**

Zyklus	Inkubation und Targetmengen	Bead-Mengen	Waschen	Elution
1	2 h bei 37 °C 7 µg Nb67B89_T0 + 58 µg 6789_T0	50 µL M-280 SA-beads	5 x PBST0,1 5 x PBS	30 min bei 37 °C, 200 µL 30 µg/µL Trypsin
2	2 h bei 37 °C 1,8 µg Nb67B89_T0 + 14 µg 6789_T0	25 µL M-280 SA-beads	5 x PBST0,1 5 x PBS	30 min bei 37 °C, 200 µL 30 µg/µL Trypsin
3	2 h bei 37 °C 0,175 µg Nb67B89_T0 + 1,4 µg 6789_T0	10 µL M-280 SA-beads	13 x PBST0,1 3 x PBS	30 min bei 37 °C, 200 µL 30 µg/µL Trypsin
4	2 h bei 37 °C 0,017 µg Nb67B89_T0 + 0,14 µg 6789_T0	10 µL M-280 SA-beads	17 x PBST0,1 3 x PBS	30 min bei 37 °C, 200 µL 30 µg/µL Trypsin

### 2.2.2.3 Bestimmung des Phagentiters

Zur Ermittlung der Menge funktioneller Phagen wurden Verdünnungsreihen der Ausgangs- und Eluatlösungen hergestellt. Dazu wurden die Phagenlösungen mit PBS in 1:10-Schritten verdünnt und mit einer in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen *E. coli* ER2738-Kultur versetzt. Alle Ansätze wurden danach bei 37 °C für 30 Minuten stehend inkubiert und anschließend 100 µL Suspension auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 30 °C im Brutschrank inkubiert und der Phagentiter durch Auszählen der erhaltenen Kolonien bestimmt. Der Quotient aus Eluattiter und Ausgangstiter beschreibt den Faktor der Anreicherung pro Selektionsrunde.

### 2.2.3 Selektion mittels *ribosome display*

Zur Selektion von Affilin®-Varianten mit gewünschten Eigenschaften aus mittels *error-prone* PCR generierten Bibliotheken wurde das *ribosome display* genutzt. Bei dieser *in-vitro*-Selektionsmethode entsteht eine Kopplung von Phänotyp und Genotyp durch Bildung ternärer Komplexe, bestehend aus der gebildeten Peptidkette (Phänotyp), den Einheiten der Ribosomen und der mRNA (Genotyp). Diese können durch die unterschiedliche Affinität zum Targetprotein selektiert werden (Zahnd 2007). Durch eine anschließende Auflösung der Komplexe, verbunden mit der Elution der mRNA, reversen Transkription und der Amplifizierung der DNA, wird eine neue DNA-Bibliothek generiert, welche in einem neuen Zyklus die Prozedur des RDs durchläuft. Nach Durchlauf mehrerer Zyklen erfolgt eine Klonierung in einen Expressionsvektor und die Analyse von einzelnen Klonen. Für die Durchführung des *ribosome displays* wurde das PURExpress® *In Vitro Protein Synthesis* Kit (New England BioLabs) verwendet (Shimizu 2001). Dieses ermöglicht *in vitro* Translation und Transkription in einem Schritt. Im folgenden Kapitel wird das Verfahren näher erläutert. Nachfolgend sind die Selektionsschemata dargestellt (Tabelle 2-30 und Tabelle 2-31).

**Tabelle 2-30: Selektionsschema *ribosome display* Affilin-Variante 102472**

Zyklus	Inkubation und Targetmengen	bead-Mengen	Waschen	Elution
1	2 h SIS 1107 ng Nb67B89_TO + 10x 6789_TO in PBSMT+	100 µL M-270 SA-beads, 30 min 4 °C	3 x 20 s PBSMT+	2 x 100 µL EB
2	2 h SIS 554 ng Nb67B89_TO + 10x 6789_TO in PBSMT+	50 µL M-270 SA-beads, 30 min 4 °C	3 x 10 min PBSMT+	2 x 100 µL EB
3a	2 h SIS 554 ng Nb67B89_TO + 10x 6789_TO in PBSMT+	50 µL M-270 SA-beads, 30 min 4 °C	6 x 10 min PBSMT+	a) 509 µg 67B89_Th b) 2 x 100 µL EB
4aa	1 h SIS 110,7 ng Nb67B89_TO + 10x 6789_TO in PBSMT+	10 µL M-270 SA-beads, 30 min 4 °C	6 x 10 min PBSMT+	a) 204 µg 67B89_Th b) 2 x 100 µL EB

**Tabelle 2-31: Selektionsschema *ribosome display* Affilin-Variante 129091**

Zyklus	Targetimmobilisierung	Targetinkubation	Waschen	Elution
1	5480 ng Nb67B89_TO + 164 µL M-270 SA-beads 1h bei 4°C	Ternärkomplexe und Target an beads + 10x 6789_TO, 2h bei 4 °C	3 x 20 s PBSMT+	2 x 100 µL EB
2	2740 ng Nb67B89_TO + 82 µL M-270 SA-beads 1h bei 4°C	Ternärkomplexe und Target an beads + 10x 6789_TO, 2h bei 4 °C	3 x 10 min PBSMT+	2 x 100 µL EB
3a	1370 ng Nb67B89_TO + 41 µL M-270 SA-beads 1h bei 4°C	Ternärkomplexe und Target an beads + 10x 6789_TO, 2h bei 4 °C	6 x 10 min PBSMT+	a) 816 µg 67B89_Th b) 2 x 100 µL EB
4aa	686 ng Nb67B89_TO + 20 µL M-270 SA-beads 1h bei 4°C	Ternärkomplexe und Target an beads + 10x 6789_TO, 2h bei 4 °C	6 x 10 min PBSMT+	a) 694 µg 67B89_Th b) 2 x 100 µL EB



### 2.2.3.1 Konstruktion der RD-Konstrukte

Ausgangspunkt für das *ribosome display* war eine Maturierung mittels *error-prone* PCR (Kapitel 2.2.1.4) zur Generierung ungerichteter Mutationen in den Affilin<sup>®</sup>-Molekülen 102472 und 129091 mit anschließendem EcoRI-Verdau der Konstrukte. Vor der weiteren Verwendung mussten die für ein *ribosome display* nötige Regionen wie der T7-Promotor, der *stem loop*, die Ribosomenbindestelle und ein *spacer* angefügt werden. Am C-terminalen Ende des *spacers* befand sich ein Stopp-Codon, durch welches das Protein aus dem Ribosomenkanal exponiert vorlag, jedoch der ternäre Komplex nicht auseinander fiel. Diese *spacer*-Region wurde aus dem Vektor pIVEX2.4 amplifiziert und einer Restriktions-Ligations-Reaktion unterzogen. Die Reinigung erfolgte über ein präparatives Agarosegel.

**Tabelle 2-32: Reaktionsansatz Konstruktion RD-Konstrukte**

Substanz	Eingesetzte Menge
T4-Ligase-Puffer	5 µL
T4-Ligase (5 U/µL)	2,5 µL
Mfel-HF (20 U/µL)	0,5 µL
EcoRI-HF (20 U/µL)	0,5 µL
Affilin <sup>®</sup> -epPCR EcoRI verdaut	730 ng
<i>spacer</i> Mfel verdaut	270 ng
H <sub>2</sub> O	add 50 µL

### 2.2.3.2 Transkription und Translation *in vitro*

Die Grundlage des verwendeten „PURE“-Systems besteht in der Bildung von ternären Komplexen durch parallel erfolgende Transkription und Translation. Somit konnten in einem *in vitro*-Ansatz Proteine erzeugt werden, die mit ihrer entsprechenden genetischen Information gekoppelt sind. Die im Kit enthaltenen Translationsfaktoren sind mit einem His-Tag versehen und weisen dementsprechend eine hohe Reinheit und geringe RNase-Kontamination auf, was einen großen Vorteil gegenüber Zellextrakt-basierten Systemen darstellt. Des Weiteren sind Ribosomen (mehr als 10<sup>10</sup>) und tRNA aus *E. coli*, sowie NTPs, Aminosäuren und T7-RNA-Polymerase enthalten. Der 50 µL *in vitro* Transkriptions- und Translationsansatz (ITT) wurde entsprechend der Empfehlung des Herstellers gemischt und 500 ng der DNA-Bibliothek bzw. DNA-Pool aus einem vorangegangenen RD-Zyklus hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 500 µL eiskaltem RD-Puffer (PBSMT+) abgestoppt. Aus diesem Ansatz wurden 5 µL als Positivkontrolle entnommen, die im weiteren Verlauf nicht mit dem Target inkubiert wurde. Das abgestoppte Reaktionsgemisch wurde für zehn Minuten bei 4 °C und 14800 rpm zentrifugiert und der Überstand für die folgende Targetinkubation verwendet.

### 2.2.3.3 Targetinkubation und Immobilisierung ternärer Komplexe

Nach der Bildung der ternären Komplexe wurden diese mit dem biotinylierten Targetprotein 67B89 für zwei Stunden inkubiert. Zur Stabilisierung der Komplexe wurden alle weiteren Arbeitsschritte bei 4 °C durchgeführt. Die eingesetzte Targetmenge wurde in den einzelnen Zyklen reduziert, um einen höheren Selektionsdruck zu erzeugen. Zusätzlich wurde ein zehnfacher Überschuss des *off*-Targetproteins 6789 hinzugefügt, um unspezifisch bindende Proteine durch Waschschrte aus dem Ansatz zu entfernen. Zur Isolierung der Komplexe, welche an das biotinylierte Target gebunden hatten, wurden 25 µL magnetische *beads* (Dynabeads M-270 Streptavidin) in den Ansatz gegeben und für weitere 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die *beads* wurden zuvor nach den Herstellerangaben gewaschen und mit BSA blockiert. Im Anschluss wurden die *beads* gesammelt und dreimal 20 Sekunden mit dem entsprechenden Puffer PBSMT+ gewaschen.

### 2.2.3.4 Elution und Isolierung der mRNA

Die Elution im ersten RD-Zyklus erfolgte über EDTA-haltigen EB-Puffer. Durch das EDTA erfolgte eine Destabilisierung der Ribosomen und somit eine Freisetzung der mRNA. Ab dem zweiten Zyklus wurde zunächst eine kompetitive Elution durchgeführt. Dazu wurde nicht-biotinyliertes Targetprotein in einem 1000-fachen molaren Überschuss (verglichen mit der Targetkonzentration der vorherigen Inkubation) auf die gewaschenen *beads* gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das resultierende Eluat wurde als Pool „a“ bezeichnet. Anschließend wurde diesem Pool ebenfalls EDTA (Endkonzentration 50 mM) zugesetzt, um die Dissoziation der Ribosomen zu erzielen. Danach wurden die *beads* einer normalen Elution mit EB-Puffer unterzogen (Pool „b“). Beide entstandenen Eluate wurden für die mRNA-Reinigung verwendet. Unter Verwendung des QIAGEN RNeasy® MinElute Reaction Cleanup Kit wurde die mRNA nach der Anleitung des Herstellers aus den Eluaten isoliert. Bei diesem Verfahren wurden die Eluate mit einem Guanidiumthiocyanat-haltigen Puffer und Ethanol versetzt, um Bedingungen zu erzeugen, unter welchen die RNA selektiv an die Silikagel-Membran der im Kit enthaltenen Säulen bindet. Diese Säulen besitzen eine Kapazität von 45 µg RNA und einen *cutoff* von ca. 200 Nukleotiden. Nachdem durch mehrere Waschschrte Kontaminationen entfernt wurden, erfolgte die Elution der RNA durch 21 µL RNase-freies Wasser. Um DNA-Kontaminationen zu eliminieren, wurden direkt mit dem RNA-Eluat ein DNaseI-Verdau mit dem Ambion® TURBO DNA-free™ Kit durchgeführt. Dazu wurde die gereinigte mRNA mit 2,2 µL 10x DNaseI-Puffer und 1 µL DNaseI gemischt und für 30 Minuten bei 37 °C und 550 rpm im Thermomixer inkubiert. Der Abbau wurde durch ein im Kit enthaltenes Inaktivierungsreagenz (2,5 µL, Inkubation fünf Minuten bei Raumtemperatur) abgestoppt. Nach Zentrifugation bei 10000 rpm wurden jeweils 18 µL Überstand abgenommen, wovon 16 µL für die reverse Transkription und 2 µL für eine analytische PCR zur Überprüfung der DNase-Effizienz verwendet wurden.

### 2.2.3.5 Reverse Transkription der mRNA

Zur Erzeugung von komplementärer DNA (cDNA), die im Gegensatz zu RNA in einer PCR eingesetzt werden kann, wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Dazu wurde die Transkriptase Reverse Transkriptase (Roche) in Verbindung mit einem RTtrunc-Primer verwendet.

**Tabelle 2-33: 20 µL Reaktionsansatz der reversen Transkription**

Substanz	Eingesetzte Menge
DNA-freie mRNA	4 µL
RNase-freies Wasser	8,6 µL
5x RT-Puffer	4 µL
10 mM dNTP	2 µL
100 µM RTtrunc-Primer	0,2 µL
1 mg/mL tRNA	0,2 µL
RNasin	0,5 µL
Reverse Transkriptase	0,5 µL

Zur Erhöhung der Ausbeute wurde stabilisierende tRNA hinzugefügt. Zusätzlich wurde neben der eluierten mRNA auch die Positivkontrolle aus dem iTT-Ansatz und eine Negativkontrolle mit Wasser statt mRNA der RT-Reaktion unterzogen. Alle Ansätze wurden bei 65 °C für 45 Minuten im Thermocycler inkubiert. Um die entstandene cDNA erneut in eine neue RD-Runde einsetzen zu können, musste diese durch zwei PCRs in ein entsprechendes Format umgewandelt werden. Im der ersten PCR wurden die Primer F1 und RTtrunc (24 PCR-Zyklen), in der zweiten PCR F1A und RTtrunc (20 PCR-Zyklen) verwendet. Die Hybridisierungstemperatur betrug in beiden Fällen 65 °C.

## 2.2.4 Kultivierung von *E. coli* und Herstellung rekombinanter Proteine

### 2.2.4.1 Proteinherstellung in 96-*deep-well*-Platten

Zur Untersuchung von Affilin®-Molekülen im Screeningverfahren wurden die entsprechenden Kulturen in 96-*well*-Mikrotiterplatten kultiviert. Für die Vorkulturen wurden pro *well* 200 µL SOBAG „komplett“ Medium mit Antibiotikum gegeben und anschließend mit dem Kolonie-Picker (QPix) angeimpft. Diese Platten wurden bei 37 °C über Nacht bei 220 rpm inkubiert, bevor daraus mit je 10 µL die Hauptkultur inokuliert wurde. Die 96-*well*-Platten der Hauptkulturen beinhalteten jeweils 200 µL selbstinduzierendes ZYM-5052 „komplett“ Medium inkl. Antibiotikum pro *well* und wurden für 16-18 Stunden bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Biofeuchtmasse wurde durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 4000 rpm vom Überstand getrennt und die Zellpellets bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben.

## 2.2.4.2 Proteinherstellung im Schüttelkolben

Für die Vorkultur wurden 100 mL 2x YT-Medium mit 2,5 mL 40%-iger Glukose und dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und ausgehend von einer Kolonie angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 220 rpm über Nacht. Anschließend wurde die Hauptkultur in einem 5L-Kolben (1000 mL 2x YT-Medium inkl. Antibiotikum) angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Beim Erreichen einer optischen Dichte  $OD_{600}$  von 0,6-0,8 wurde die Proteinsynthese durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. In einigen Fällen erfolgte zum Induktionszeitpunkt eine Absenkung der Temperatur auf 30 °C, um der vermehrten Bildung von unlöslichen Fraktionen des Zielproteins entgegen zu wirken. Nach vier Stunden schloss sich die Zellernte durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 5000x g an. Das erhaltene Pellet konnte bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

## 2.2.5 Proteinchemische Methoden

### 2.2.5.1 Zellaufschluss

#### *Biomasse aus 96-well-Platten*

Aus 96-well-Platten angezogene Biomasse wurde mit 150  $\mu$ L/well Lysepuffer resuspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Rundbodenplatten in flüssigen Stickstoff eingefroren und in einem Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut. Dieser Gefrier-Tau-Zyklus wurde zweimal wiederholt. Nach einem Zentrifugationsschritt (30 Minuten, 4000 rpm, 4°C) wurden die Überstände in eine neue Platte überführt und die Pellets verworfen.

#### *Biomasse aus Schüttelkolbenkultur*

Das nach der Ernte erhaltene Zellpellet wurde in 10 mL des Aufschlusspuffers pro Gramm Biofeuchtmasse resuspendiert und mit 2,5 mM Magnesiumchlorid/Magnesiumsulfat-Lösung, 250  $\mu$ g/mL Lysozym, 1 mM AEBSF und 20 U/mL Benzonase versetzt. Es erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Anschließend wurde der Ansatz unter Verwendung von Ultraschall bei ständiger Kühlung aufgeschlossen. Dazu wurde die Suspension in drei, jeweils 20 Sekunden langen, Zyklen mit 30 % der Maximalleistung des Ultraschallgerätes lysiert. Nach dem Aufschluss wurde der Ansatz bei 4 °C und 50.000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Das im Überstand enthaltene lösliche Protein konnte anschließend in der weiteren Reinigung eingesetzt werden. Der Zellaufschluss bei unlöslichen Zielproteinen erfolgte leicht abgewandelt und ist in Kapitel 2.2.5.3 beschrieben.

### 2.2.5.2 Nachweis hergestellter Proteine

Zur Kontrolle, ob die Proteine löslich oder als unlösliche Einschlusskörper (*inclusion bodies*) vorlagen, wurden SDS-PAGE-Gele angefertigt. Dafür wurden 20  $\mu$ L Zellysate zentrifugiert und der Überstand mit 10  $\mu$ L SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt. Das entstandene Zellpellet wurde zweimal mit PBS gewaschen, anschließend in 20  $\mu$ L 8 M Harnstoff resuspendiert und mit 10  $\mu$ L Probenpuffer versetzt. Der weitere Ablauf der SDS-PAGE ist in Kapitel 2.2.5.13 beschrieben.

### 2.2.5.3 Protein-Präparation aus *inclusion bodies* und Faltung

Zur Isolierung von unlöslichen Zielproteinen aus der Zellmasse wurden zu je einem Gramm Biofeuchtmasse 5 mL Aufschlusspuffer und 1,5 mg Lysozym hinzugefügt und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Suspension wurde für 20 Sekunden mit einer Ultraschallsonotrode (Amplitude 30 %) behandelt, anschließend wurde für 15 Sekunden pausiert. Dieser Zyklus wurde sechs Mal durchgeführt. Danach erfolgten zwei weitere Inkubationen bei 4 °C für 30 Minuten, zunächst nach Zugabe von 3 mM MgCl<sub>2</sub>/MgSO<sub>4</sub>-Lösung sowie 250 U/μL Benzonase für den DNA-Verdau und anschließend nach dem Zugeben von 0,5 Volumen (v/v) des IB-Extraktionspuffers. Als weiterer Schritt schloss sich eine 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 48384 x g an. Anschließend wurde das Pellet mit jeweils 40 mL Waschpuffer gewaschen. Zwischen diesen Schritten wurde die Suspension jeweils mit den o.g. Parametern zentrifugiert. Nach der Isolierung der *inclusion bodies* schloss sich die IB-Solubilisierung und Faltung an. Dem gewaschenen IB-Pellet wurden pro Gramm 20 mL Solubilisierungspuffer mit 100 mM DTT zugesetzt. Anschließend wurde die Lösung für 30 Sekunden mit einem Ultraturrax mit 11.000 rpm behandelt. Nach einer Inkubation von zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Rollenschüttler wurde die Suspension für 10 Minuten bei 4°C und 48384 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde verworfen, während der Überstand bei 4°C in Dialysepuffer pH 4,0 umgepuffert wurde. Bevor das Protein in die Faltung überführt werden konnte, musste zunächst die Proteinkonzentration bestimmt werden. Da die Lösung noch DNA enthalten konnte, wurde dies mittels Bradford-Test gemessen (siehe Kapitel 2.2.5.10). Das dialysierte Protein wurde anschließend langsam in die Faltungsansätze gegeben. Dabei sollte die Proteinkonzentration pro Ansatz im Bereich von 50-150 μg/mL liegen. Die Faltung erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Rollenschüttler oder Taumler, bei größeren Ansätzen in einer mit Rührer versehenen Flasche.

Zur Ermittlung einer optimierten Pufferzusammensetzung des Faltungsansatzes wurde zunächst ein *screening* durchgeführt. Dabei wurden sowohl die pH-Werte als auch die Bestandteile der Puffer variiert. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Screeningmatrix.

**Tabelle 2-34: Faltungsmatrix**

	50 mM PBS pH 7,4 2,5 mM GSH 0,25 mM GSSG	50 mM Tris/HCl pH 9,0 2,5 mM GSH 0,25 mM GSSG	50 mM Glycin pH 10,5 2,5 mM GSH 0,25 mM GSSG
<b>1 mM EDTA</b>	-	-	G0
<b>0,7 M Arginin</b>	P1	T1	G1
<b>1 M Harnstoff</b>	P2	T2	G2
<b>3 M Harnstoff</b>	P3	T3	G3
<b>20% Glycerin</b>	P4	T4	G4
<b>500 mM NaCl</b>	P5	T5	G5

### 2.2.5.4 Reinigung der Targetproteine 67B89 und 6789

Da die beiden Zielproteine 67B89 und 6789 keinen Affinitäts-*tag* besaßen, wurde eine mehrstufige Reinigung notwendig. Als erster Reinigungsschritt wurde eine Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Dazu wurde eine XK26/20 Q Sepharose FF bei einer Flussrate von 10 mL/min benutzt, die verwendeten Puffer sind der Tabelle 2-6 zu entnehmen. Nach der Äquilibration von 10 CV erfolgten die Probenbeladung und ein Waschschrift mit 3 CV. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-40 % Puffer B über 20 CV und anschließend 3 CV 100 % Puffer B. Danach wurden die Fraktionen auf das Vorhandensein des Zielproteins überprüft und vereinigt. Im Anschluss wurde eine Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt. Die Proteinlösung wurde unter Rühren bei 4 °C langsam auf eine Salzkonzentration von 1,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gebracht. Nach 30-minütiger Inkubation wurde das ausgefällte Protein zentrifugiert (20 min, 10000 rpm, 4 °C) und das Pellet in 1 M Ammoniumsulfat-Lösung pH 6,0 resuspendiert. Das Kontrolltarget 6789 wurde unter diesen Bedingungen nicht ausgefällt und der Überstand direkt verwendet. Die sich im Hochsalzpuffer befindenden Proteine wurden anschließend mittels hydrophober Interaktionschromatographie gereinigt. Dazu wurden zwei miteinander verbundene HiTrap Phenyl HP-Säulen mit je 5 mL Volumen mit einem Fluss von 5 mL/min verwendet. Die Puffer sind in der Tabelle 2-6 angeführt. Nach einer Waschphase von 3 CV mit 100 % Puffer B wurde ein Gradient über 20 CV von 100 % B auf 0 % B verwendet und anschließend für 3 CV mit Puffer A gespült. Die aufgefangenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE untersucht. Als finaler Chromatographieschritt erfolgte eine Gelfiltration (XK 26/60 Superdex 200) in PBS mit einer Flussrate von 3,5 mL/min. Die mittels SDS-PAGE untersuchten Fraktionen wurden vereinigt, filtriert und bei -20 °C gelagert. Das für Kristallisationsversuche verwendete, verkürzte Targetprotein 7B8 wurde analog zum Targetprotein 67B89 gereinigt. Zusätzlich wurde das Targetprotein 67B89 mit einem C-terminalen Hexahistidin-*tag* hergestellt und gereinigt. Diese Reinigung erfolgte an einem ÄKTExpress System und wurde analog zur beschriebenen Reinigungsstrategie von Affilin®-Varianten mit Hexahistidin-*tag* (Kapitel 2.2.5.5) durchgeführt.

### 2.2.5.5 Reinigung von Affilin®-eGFP-Fusionen mit Hexahistidin-*tag*

Die Reinigung der Affilin®-eGFP-Fusionen erfolgte an einem ÄKTExpress System. Zunächst wurde eine IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*) durchgeführt (Porath 1975; Porath 1992). Die Zielproteine mit einem Hexahistidin-*tag* bilden dabei Metallchelatekomplexe mit den immobilisierten  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen der HisTrap HP-Säulen (GE Healthcare). Die Säulen wurden zunächst mit dem Laufpuffer NPI-20 äquilibriert. Nach dem Probenauftrag des filtrierten Zelllysates erfolgte ein Waschschrift mit NPI-20, um schwach unspezifisch gebundenen Proteinen zu entfernen. Die anschließende Elution erfolgte in zwei Stufen mit einem Imidazol-haltigen Puffer. Zunächst wurden 5 CV 70 % NPI-500 über die Säule geleitet, danach wurde die Konzentration auf 100% NPI-500 für 5 CV erhöht. Die Flussrate betrug für die gesamte Reinigung 5 mL/min. Da Imidazol Kristallisationsversuche beeinflussen und zu Proteinaggregaten führen kann (Hefti 2001), wurde die gesammelte Peakfraktion in einer Probenschleife im Gerät aufgefangen und anschließend direkt über eine Gelfiltrationssäule (XK16/600 Superdex 75 *prep grade*) geleitet. Zum Äquilibrieren sowie zur Elution wurde PBS mit 1 mL/min verwendet. Das Eluat wurde Fraktionen von 2 mL gesammelt.

### 2.2.5.6 Reinigung von Affilin®-Varianten mit Strep-tag II

Mit einem Strep-tag II (Schmidt 1996; Skerra 2000) versehene Affilin®-Moleküle wurden mit Hilfe der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt. Dieses Verfahren basiert auf der stark selektiven Bindung einer Streptavidin-Mutante (Strep-Tactin) an einen Strep-tag II (Voss 1997). Vor dem Probenauftrag wurde das Zellysate mit 20 µg/mL Avidin versetzt und 30 Minuten inkubiert. Die verwendeten Strep-Tactin-Superflow-Säulen wurden mit jeweils 10 CV des Strep-Tactin Puffers A äquilibriert, bevor die Probe aufgetragen wurde. Um Fremdproteine und Verunreinigungen von der Säule zu entfernen, wurde zunächst mit 20 CV Puffer A gespült. Die Elution erfolgte mit 10 CV 100 % Puffer B, der gegenüber Puffer A 2,5 mM Desthiobiotin enthielt. Für alle Spül- bzw. Regenerationsläufe wurde eine Flussrate von 2 mL/min verwendet. Im Regenerationsschritt wurde das Desthiobiotin durch den HABA-haltigen Strep-Tactin Puffer D von der Säule entfernt. Diese wurde anschließend in Puffer A bei 4 °C gelagert. Da diese Reinigung an einem ÄKTExpress System durchgeführt wurde, erfolgte die Elution der Strep-Tactin-Säule in eine geräteinterne Probenschleife. Direkt im Anschluss wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Die verwendete Säule HiLoad XK16/600 Superdex 75 *prep grade* wurde zunächst mit 2 CV Puffer äquilibriert und anschließend mit der Probe beladen. Sowohl für die Äquilibration als auch die Elution wurde PBS und eine Flussrate von 1 mL/min verwendet. Das Eluat wurde Fraktionen von 2 mL gesammelt.

### 2.2.5.7 Reinigung von Affilin®-Molekülen ohne Affinitäts-tag

In einem ersten Schritt wurde eine Anionenaustausch-Chromatographie zur Reinigung von Affilin®-Varianten ohne Affinitäts-tag verwendet. Bei dieser Methode binden Proteine auf Grund der elektrostatischen Wechselwirkungen an die geladene Oberfläche des Ionenaustauschermaterials. Durch eine Veränderung der Ionenstärke des Eluenten werden diese Wechselwirkungen geschwächt und das Protein eluiert von der Säule. Im vorliegenden Fall wurde eine HiTrap Q FF bei einer Flussrate von 4 mL/min benutzt, die zunächst mit 10 CV Puffer A äquilibriert und nach Probenbeladung mit 3 CV Puffer A gespült wurde. Als Puffer A wurde 20 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0 verwendet. Puffer B beinhaltete zusätzlich 500 mM NaCl. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-100 % Puffer B über 40 CV. Die Fraktionen (je 2 mL) wurden mittels SDS-PAGE untersucht und vereinigt. Anschließend wurde die Proteinlösung auf eine Salzkonzentration von 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gebracht, um diese mit einer hydrophoben Interaktionschromatographie zu reinigen. Da Proteine hydrophobe Oberflächenstrukturen besitzen, sind diese in der Lage bei entsprechend hoher Ionenstärke an eine hydrophobe Säulenmatrix zu binden. Die Elution erfolgte durch einen absteigenden Salzgradienten. Zur Reinigung der Affilin®-Moleküle wurden zwei hintereinander geschaltete HiTrap Phenyl HP-Säulen mit jeweils 5 mL Säulenvolumen mit einem Fluss von 5 mL/min verwendet. Die Puffer sind in der Tabelle 2-6 angeführt. Nach einer Waschphase von 3 CV mit 100 % Puffer B wurde ein Gradient über 20 CV von 100 % B auf 0 % B verwendet und anschließend für 3 CV mit Puffer A gespült. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE untersucht und vereinigt. Als finaler Schritt wurden die vereinigten Fraktionen mittels Amicon-Röhrchen eingeeengt und gegen den Lagerpuffer 1x PBS pH 7,4 in mehreren Schritten bei 4°C dialysiert (Kapitel 2.2.5.9).

### 2.2.5.8 Reinigung von Affilin®-Interleukin-2-Fusionen

Die mit Interleukin-2 fusionierten Affilin®-Moleküle wurden nicht löslich exprimiert, wodurch eine Reinigung aus *inclusion bodies* erfolgte. Nach der Faltung (2.2.5.3) wurden die Faltungsansätze auf eine Salzkonzentration von 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gebracht und auf eine HiPrep Phenyl HP 16/10 mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Die entsprechenden Puffer sind der Tabelle 2-6 zu entnehmen. Jedoch wurde jeweils ein pH-Wert von 8,0 eingestellt. Mit einem linearen Gradienten von 100 %  $\rightarrow$  0 % Puffer B in 10 CV erfolgte die Elution. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und vereinigt. Nach einer Konzentrierung mittels Amicon-Röhrchen (Kapitel 2.2.5.9) wurde die Proteinlösung in einem finalen Schritt mittels Gelfiltration gereinigt. Nach der Äquilibrierung der Säule XK26/600 Superdex 75 erfolgte der Probenauftrag mit anschließender Elution in 2 mL-Faktionen. Als Puffer wurde jeweils PBS pH 7,4 mit einer Flussrate von 3,5 mL/min verwendet.

### 2.2.5.9 Konzentrierung und Umpufferung

Die Art der Konzentrierung bzw. der Umpufferung war vom Volumen der Probe abhängig. Für die Konzentrierung eines Volumens unter 150 mL wurden Zentrifugal-Filtereinheiten (Amicon Ultra-Röhrchen von Millipore, MWCO 3 kDa) bei 4 °C und 4500 x g verwendet.

Eine Umpufferung von kleinen Probenvolumina bis ca. 2 mL erfolgte über HiTrap Desalting-Säulen. Für eine Dialyse von Proteinlösungen bei 4 °C wurde ein Dialyseschlauch mit entsprechender Ausschlussgrenze (MWCO 3 kDa) verwendet und anschließend mehrmals die Pufferlösung (Volumenverhältnis 1:100) gewechselt, um einen möglichst vollständigen Austausch zu erzielen.

### 2.2.5.10 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von gereinigten Proteinen wurde mittels UV/VIS-Spektrophotometer bei 280 nm ermittelt. Zur Berechnung wurde auf das Lambert-Beersche-Gesetz (Gleichung 2-2) zurückgegriffen.

$$A_{280} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

**Gleichung 2-2**

$A_{280}$	Absorption bei 280 nm
$\epsilon$	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient [ $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]
$c$	Proteinkonzentration [M]
$d$	Schichtdicke der Küvette [cm]

Im Falle einer nicht gereinigten, DNA-haltigen Probe konnte diese Methode nicht angewendet werden. Daher wurde die Konzentrationsbestimmung in einer 96-well-Flachbodenplatte mit Doppelbestimmung und Kalibrierung (Albumin-Standard) nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) durchgeführt. In jedem well wurden je 5  $\mu\text{L}$  Probe vorgelegt und 250  $\mu\text{L}$  Bradford-Reagenz (Coomassie Protein Assay Kit) hinzugefügt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Anhand der über ein Polynom zweiten Grades angepassten Kalibrierung konnte die Proteinkonzentration der Probe berechnet werden.



### 2.2.5.11 Analytik mit Reversed-Phase-HPLC

Die Reinheit der Proteine wurde mittels rp-HPLC (*reversed-phase*-HPLC) untersucht. Die Trennsäule (PLRP-S, Agilent) wurde mit Puffer A (10 % Isopropanol, 0,1 % TFA; 0,7 mL/min) äquilibriert und auf 55 °C temperiert. Nach Auftrag von 10 µg Protein erfolgte die Trennung über einen Gradienten (Puffer B: 80 % Isopropanol, 0,1 % TFA), der je nach Proteintyp angepasst wurde (siehe Tabelle 2-35). Danach erfolgte ein Spülschritt mit 100 % Puffer B. Als Flussrate wurde 0,7 mL/min eingesetzt. Die Detektion des UV-Signals erfolgte bei 280 nm bzw. 220 nm gegen eine Referenz bei 590 nm. Zu Beginn und nach jeder Messreihe wurde eine Regeneration mit 1% SDS in Wasser durchgeführt. Die Lagerung der verwendeten Säule entsprach den Herstellerangaben.

**Tabelle 2-35: Verlauf von Gradienten der rp-HPLC**

Proteintyp	Affilin®-Moleküle inkl. eGFP-Fusionen	Affilin®-IL-2-Fusionen
Gradient	0 %B → 25,8 %B (5,7 min)	0 %B → 70 %B (6,5 min)
	25,8 %B → 54,3 %B (17,1 min)	70 %B → 100 %B (19,5 min)
	54,3 %B → 100 %B (2,9 min)	

### 2.2.5.12 Analytik mit SE-HPLC

Um den Anteil von Aggregaten oder Fragmenten feststellen zu können, wurde eine SE-HPLC mit einer Superdex 75 bzw. 200 5/150 GL durchgeführt. Als Laufmittel wurde PBS pH 7,4 mit einer Flussrate von 0,3 mL/min verwendet. Nach entsprechender Äquilibrierung wurden jeweils 10 µg Probe in 50 µL Volumen auf die Säule aufgetragen. Die Detektion der Peaks erfolgte photometrisch bei 280 nm gegenüber der Referenzwellenlänge von 550 nm. Zur Auswertung wurde die Software Chromeleon genutzt. Zu Beginn und nach Beendigung einer Messreihe wurde die Säule jeweils mit 6 M GdmHCl gereinigt. Außerdem wurde ein Proteinstandard bei jeder Messung mitgeführt, der eine Berechnung der Molekulargewichte der einzelnen Peaks ermöglichte.

### 2.2.5.13 SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese

Die Analytik der Proteine hinsichtlich des Molekulargewichtes wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, orientiert an der Arbeit von Laemmli (Laemmli 1970), durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte in einer NuPAGE XCell SureLock™ Mini-Cell-Elektrophoresekammer (Invitrogen) mit NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gelen (Stärke 1.0 mm). Dem Laufpuffer (1x MES) wurden 500 µL NuPAGE Antioxidant hinzugefügt. Die Proben wurden mit einem Fünftel ihres Volumens mit 5-fachem SDS-Auftragspuffer versehen und bei 95 °C für fünf Minuten denaturiert und anschließend 5-10 µL auf ein Gel aufgetragen. Für Proteine mit Cystein-Resten wurde dem Auftragspuffer 50 mM DTT zugegeben. Zur Identifizierung des Molekulargewichts wurde pro Gel ein Marker (PageRuler Unstained Broad Range Protein) aufgetragen. Durch eine angelegte Spannung von

200 V wurden die Proteine im Gel innerhalb von 35 Minuten aufgetrennt. Anschließend wurde das entnommene Gel in Coomassie-Färbelösung für 30 Minuten bei 150 rpm inkubiert. Als weiterer Schritt wurde das Gel mit Entfärbelösung behandelt. Um die gewünschte Farbintensität zu erreichen, musste die Entfärbelösung mehrfach getauscht werden. Eine weitere Färbemethode basiert auf der Silberfärbung von Nesterenko (Nesterenko 1994) wurde ebenfalls durchgeführt, wenn geringer konzentrierte Proteinlösungen untersucht wurden.

#### 2.2.5.14 IEF-Gelelektrophorese

Für die Untersuchung des isoelektrischen Punktes (pI) wurden die gereinigten Proteine in einem Polyacrylamidgel (Novex® pH 3-10 IEF Protein Gel) mit einem pH-Gradienten nach Angaben des Herstellers aufgetrennt. Des Weiteren war es mit dieser Methode möglich verschiedene Spezies an Proteinen in einer Probe zu detektieren, die beispielsweise eine Modifikation aufwiesen. Nach Beladen des Gels wurde zunächst eine Spannung von 100 V für 60 Minuten angelegt. In den darauffolgenden 60 Minuten wurde die Spannung auf 200 V erhöht, um in einem finalen Schritt für 30 Minuten 500 V anzulegen. Anschließend wurde das Gel mit 12 % TCA fixiert und mittels Coomassie gefärbt. Als Marker wurde der IEF Marker 3-10 *liquid mix* (Serva, Heidelberg) verwendet.

#### 2.2.5.15 Biotinylierung von Proteinen

Die Biotinylierung stellt eine Möglichkeit dar, um Proteine chemisch zu modifizieren und anschließend spezifisch zu immobilisieren oder zu detektieren. In der vorliegenden Arbeit sollte das Targetkonstrukt 67B89 biotinyliert werden, um eine Bindung an mit Streptavidin gekoppelte *beads* (Dynabeads® M-270 Streptavidin) für die Selektion zu ermöglichen. Die Modifikation wurde mit EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin von Thermo Scientific durchgeführt. In der Biotinylierungsreagenz enthaltene N-Hydroxysuccinimide (NHS)-Ester des Biotins reagieren mit primären Aminogruppen. Diese reaktionsfähigen Gruppen befinden sich sowohl in Lysin-Seitenketten als auch am N-Terminus. Jedoch unterscheidet sich die Reaktivität der Gruppen nach ihrem pKa-Wert. Dieser liegt für freie  $\alpha$ -Aminogruppen im Bereich von 9-10 (Selo 1996). Um eine Bevorzugung des N-Terminus des Proteins zu erreichen, wurde die Reaktion in 50 mM Natriumphosphat pH 6,5 durchgeführt und die gewünschte Targetmenge über Nacht bei 4 °C gegen diesen Puffer dialysiert. Das verwendete Reagenz wurde nach den Herstellerangaben gelöst und in einem 30-fach molaren Überschuss zum Targetprotein hinzugefügt. Danach schloss sich eine Inkubation bei 4°C für 24 Stunden an. Nicht-gekoppeltes Sulfo-NHS-LC-Biotin wurde mit einer Dialyse bei 4 °C gegen 1x PBS pH 7,4 entfernt.

Der Nachweis einer erfolgreichen Biotinylierung wurde mit einem *pull-down*-Experiment erbracht. Dazu wurden 40  $\mu$ L der biotinylierten Proteinlösung auf 20  $\mu$ L *beads* (Dynabeads® M-270 Streptavidin) gegeben und für eine Stunde bei 4 °C auf einem Rollenschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die *beads* dreimal mit 200  $\mu$ L PBS gewaschen. Sowohl die zu Beginn verwendete Proteinlösung, als auch der Überstand der Immobilisierung und die *beads* an sich, wurden mittels silbergefärbter SDS-PAGE (Kapitel 2.2.5.13) analysiert.

### 2.2.5.16 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

#### Konzentrationsabhängiger ELISA

Der Bindungsnachweis der Affilin®-Moleküle an das Targetprotein wurde mittels ELISA durchgeführt. Das Target 67B89 (5 µg/mL) und das Kontrollprotein 6789 (4 µg/mL) in je 50 µL auf Nunc Medisorp oder Greiner medium binding 96-well-Platten über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Die Platten wurden anschließend dreimal mit PBST (PBS mit 0,1 % Tween® 20) gewaschen. Alle nachfolgenden Schritte fanden bei Raumtemperatur statt. Um eine unspezifische Bindung zu verhindern, wurden die Kavitäten mit jeweils 300 µL Blockierlösung (PBS mit 0,5 % Tween® 20 und 3 % BSA) für zwei Stunden inkubiert. Danach erfolgte erneut ein dreimaliger Waschschrift mit PBST. Ausgehend von einer Startkonzentration des Affilin®-Moleküls von 500 nM bzw. 100 nM wurde eine Verdünnungsreihe bis 0,48 nM bzw. 0,10 nM in PBST angesetzt. Pro Verdünnungsstufe wurden je 50 µL in die einzelnen wells pipettiert und für eine Stunde inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit PBST wurde ungebundenes Protein von der Mikrotiterplatte entfernt. Der Nachweis der Bindung erfolgte über den Antikörper Anti-Ubi-Fab-POD (1:6500 in PBST verdünnt), der ebenfalls für eine Stunde inkubiert wurde. Der folgende Waschschrift wurde wie zuvor mit dreimal mit PBST durchgeführt, allerdings schloss sich danach ein weiteres Waschen mit PBS an, da die an die Antikörper gekoppelte Peroxidase durch Tenside wie Tween® 20 inhibiert werden kann. Danach wurden 50 µL des Peroxidasesubstrats TMB Plus zugegeben (Josephy 1982). Durch diese Reaktion wurde eine Färbung hervorgerufen, die nach 10 Minuten durch Zugabe von 50 µL 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt wurde. Die Detektion erfolgte in einem Photometer bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm. Die Berechnung der Dissoziationskonstante K<sub>D</sub> erfolgte durch Gleichung 2-3.

$$A_{450} = \frac{E_{450\max} \cdot c}{K_D + c}$$

**Gleichung 2-3**

A <sub>450</sub>	Absorption bei 450 nm
E <sub>450max</sub>	maximale Absorption bei 450 nm
c	Proteinkonzentration [µM]
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante [µM]

#### Phagen-Pool-ELISA

Ein abgewandeltes Format stellt der Phagen-Pool-ELISA dar. Dabei wurde biotinyliertes Target Nb67B89 (5µg/mL) und Kontrollprotein 6789 (4 µg/mL) auf Nunc Medisorp 96-well-Platten über Nacht immobilisiert und anschließend mit 0,5x Sigma Blocker inkubiert. Die Ausgangstitel der *phage display* Runden wurden auf 3,5·10<sup>10</sup> Phagen normiert und auf die Platten gegeben. Der weitere Ablauf erfolgte wie oben beschrieben. Der Nachweis erfolgte mittels Anti-M13-Antikörper (1:5000).

#### Hit-ELISA

Dieses *screening*-Verfahren erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie der oben beschriebene konzentrationsabhängige ELISA. Jedoch wurden direkt Zelllysate aus 96-well-Platten eingesetzt. Zusätzlich wurde ein Teil der Lysate vorher eine Stunde bei 50 °C inkubiert, um die Thermostabilität der einzelnen Varianten abzubilden. Dieser Parameter ist ein wichtiges Kriterium für die Auswahl der „Hits“, welche für eine Präparation im größeren Maßstab und Reinigung ausgewählt werden.

## 2.2.6 Biophysikalische Methoden

### 2.2.6.1 Bindungsnachweis mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Die Interaktion zwischen Affilin®-Molekülen und dem Target 67B89 wurde mittels Oberflächenplasmonresonanz an einem Biacore 3000 System untersucht. An die Oberfläche des Sensorchips SA wurden jeweils 300 RU des biotinylierten Targets 67B89 und der biotinylierten Negativkontrolle 6789 gerichtet gekoppelt. Für die Affilin®-Varianten wurden bis zu zehn Konzentrationen im entsprechenden Laufpuffer (PBS mit 0,005 % Tween® 20) analysiert. Die Proben wurden mit einer Flussrate von 30 µL/min bei 25 °C über das immobilisierte Target geleitet. Durch die Echtzeitbestimmung der Interaktion konnten neben der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) ebenso die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation  $k_{on}$  und Dissoziation  $k_{off}$  bestimmt werden. Mit der Software BIAevaluation wurden die ermittelten Daten unter Annahme einer 1:1 Stöchiometrie ausgewertet. Zur Regeneration des gebundenen Targets auf dem Chip wurden nach jeder Messung 10 mM HCl-Lösung mit einer Kontaktzeit von einer Minute verwendet.

### 2.2.6.2 CD-Spektroskopie

Mittels CD-Spektroskopie wird die unterschiedliche Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht durch optisch aktive Moleküle vermessen. Dadurch können Untersuchungen zur Struktur und Stabilität von Proteinen durchgeführt werden (Holtzhauer 1996). Im fernen UV-Bereich des Spektrums (170-250 nm) wird die Peptidbindung detektiert, wodurch Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur erzielt werden können. Mit Spektren im Nah-UV-Bereich (250-300 nm) kann hingegen die Umgebung von aromatischen Seitenketten untersucht werden, um Erkenntnisse über die Tertiärstruktur von Proteinen zu erhalten.

Die Fern-UV-CD-Messungen wurden an einem Jasco J-810 Spektropolarimeter durchgeführt. Dazu wurden die Proteine in einer Konzentration zwischen 0,5-1 mg/mL in eine Quarzküvette (0,1 mm Suprasil 106-QS) überführt. Die Messungen wurden bei 20 °C innerhalb der Wellenlängen von 190-250 nm durchgeführt. Dabei wurde eine Geschwindigkeit von 50 nm/min bei einer Bandbreite von 1 nm eingestellt. Anschließend wurde der Mittelwert aus 30 gemessenen Spektren ermittelt und gegen den Messpuffer korrigiert. Zusätzlich wurde das Spektrum mittels Savitzky-Golay-Filter (Savitzky 1964) geglättet. Die mittlere residuelle Elliptizität wurde mit Gleichung 2-4 und die Sekundärstrukturanteile nach der Referenz von Yang (Yang 1986) mit der Gerätesoftware berechnet.

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{100 \cdot [\Theta] \cdot MW}{c \cdot l \cdot n_A}$$

**Gleichung 2-4**

$[\Theta]_{MRW}$	mittlere residuelle Elliptizität [ $\text{grad} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]
$[\Theta]$	Elliptizität [grad]
MW	Molekulargewicht [ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]
c	Proteinkonzentration [ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]
l	Schichtdicke [cm]
$n_A$	Anzahl Aminosäurereste im Protein

### 2.2.6.3 Messung von Temperatur-induzierten Denaturierungsübergängen

#### Fluoreszenzspektroskopie

Faltungs- und Entfaltungsvorgänge in Proteinen können mittels Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden. Dazu kann die Fluoreszenz von Tryptophan genutzt werden (Cantor 1980; Eftink 1994). Tryptophanreste, die sich im nativen Zustand des Proteins in dessen hydrophoben Kern befinden, werden bei einer Entfaltung für das Lösungsmittel zugänglich. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums. Die Untersuchung der Temperaturübergänge wurde an einem Fluoreszenzspektrometer FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon) durchgeführt. Dazu wurden 3 mL einer 1  $\mu$ M Proteinlösung der zu testenden Affilin<sup>®</sup>-Variante in eine verschließbare SUPRASIL<sup>®</sup>-Präzisionsküvette mit Rührer überführt. Das Affilin<sup>®</sup> lag dabei in PBS pH 7,4 vor. In der Tabelle 2-36 sind die verwendeten Parameter aufgeführt. Die Emissionsspektren wurden im Temperaturbereich von 20 °C bis 90 °C (Heizrata 60 K/h, Äquilibriumierung 0,7 min pro Temperaturschritt) aufgezeichnet. Alle Spektren wurden einer Pufferkorrektur unterzogen. Zur Auswertung wurden die relativen Fluoreszenzeinheiten bei einer Emissionswellenlänge von 352 nm (Emission von freien Tryptophan) gegenüber der Temperatur aufgetragen. Mit steigender Temperatur nimmt die Fluoreszenz von Proteinlösungen grundsätzlich ab. Während der Entfaltung tritt jedoch eine Erhöhung der Fluoreszenz auf. Der dadurch entstandene Wendepunkt stellt somit den Entfaltungspunkt ( $T_m$ ) dar.

**Tabelle 2-36: Parameter zur Durchführung der Fluoreszenzspektroskopie**

Parameter	
Wellenlänge Anregung	280 nm
Wellenlänge Emission	290-400 nm
Bandbreite Anregung und Emission	5 nm
Integrationszeit	0,5 s

#### Denaturierungsübergänge mittels DSF

Die Temperatur-induzierten Übergänge wurden mittels DSF (*differential scanning fluorimetry*) analysiert. Das zu untersuchende Protein wurde mit dem Farbstoff Sypro<sup>®</sup> Orange (Bio-Rad) versetzt und in verschiedenen Konzentrationen in entsprechende 96-well-Platten pipettiert. Der Farbstoff bindet an hydrophobe Bereiche des Proteins, die während der Entfaltungsprozesses zugänglich werden (Niesen 2007). Je stabiler ein Protein ist, desto später beginnt die Auffaltung im Heizprozess und die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) liegt höher (Ericsson 2006). Die Reaktion wurde in einem Endvolumen von 50  $\mu$ L durchgeführt. Dabei musste vorher der optimale Bereich der Proteinmenge und Farbstoffkonzentration ermittelt werden. In dieser Arbeit wurden je 10  $\mu$ g Protein und 10x Sypro<sup>®</sup> Orange eingesetzt. Die Messung erfolgte in einem *real-time*-PCR-Gerät (Light Cycler 480, Roche) mit Light Cycler 480 *Multiwell Plates*. Zur Auswertung wurde der Wendepunkt ( $T_m$ ) der Kurven bestimmt.

## 2.2.7 Methoden der Säugetier-Zellkultur

### 2.2.7.1 Bindungsnachweis auf ED-B-exprimierenden Zellen

#### *Fluoreszenzmikroskopie von eGFP-fusionierten Affilin®-Molekülen*

Der Nachweis der Targetbindung der Affilin®-Varianten wurde mit Wi-38-Zellen durchgeführt. Diese humanen fötalen Lungenfibroblasten präsentieren die Extradomäne B des Fibronektins (Hayflick 1965). Als Kontrollzellen wurden humane dermale Fibroblasten verwendet. Bei der Untersuchung von Affilin®-eGFP-Fusionen konnte ein Nachweis direkt über die grüne Fluoreszenz (488 nm) erfolgen. Zunächst erfolgte eine Aussaat von 30.000 Zellen pro 0,5 ml in *4-well-chamberslides* mit einer Fläche von 1,8 cm<sup>2</sup>. Die Kultivierung erfolgte über 96 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in T75-Flaschen. Als Medium wurde für Wi-38-Zellen 90 % EMEM (ATCC) mit 10 % FBS (Lonza) und für NHDF-Zellen 98 % Fibroblast Growth Medium 2 (Promocell) mit 2 % Supplement Mix (Promocell) verwendet. Nach einem dreifachen Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol für fünf Minuten bei -20 °C fixiert. Nach einem erneuten dreifachen Waschen mit PBS wurde eine Blockierlösung aus 5 % Pferdeserum in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Als nächster Schritt wurde die Blockierlösung entfernt und jeweils 50 nM der Affilin®-eGFP-Fusion auf die Zellen gegeben. Der Nachweis konnte direkt über die grüne Fluoreszenz des eGFPs erfolgen. Für die Färbung der Zellkerne wurden die Zellen für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (0,4 µg/mL) inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte die Einbettung in Mowiol-Lösung (2,4 g Mowiol, 6 mL Glycerin, 6 mL Wasser, 25 mg/mL DABCO, 12 ml 0,2 M Tris pH 8,5). Die Bindung wurde mit einem inversen Mikroskop (Axio Scope A1) untersucht.

#### *Nachweis mittels Antikörper*

Wurden Affilin®-Moleküle ohne eGFP-Fusion untersucht, kamen für den Nachweis einer Bindung an Wi-38-Zellen zwei Antikörper zum Einsatz. Als Primärantikörper wurde *rabbit anti-Strep-tag* IgG mit einer Konzentration von 1 µg/mL in PBS verwendet. Anschließend wurde der Sekundärantikörper *goat anti-rabbit* IgG Alexa Fluor® 488 (2 µg/mL in PBS) auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur. Die sich anschließende DAPI-Färbung und Mowiol-Einbettung erfolgte wie im oberen Absatz beschrieben.

Für die Affilin®-IL2-Fusionen erfolgte der Nachweis mit dem Antikörper IL2 *rat anti-human* mAb Alexa Fluor® 488. Da für diesen Antikörper keine Konzentration vom Hersteller angegeben war, wurden zwei verschiedene Verdünnungen getestet (1:20 und 1:100).

### 2.2.7.2 Bioaktivitätsassay von hIL2-fusionierten Affilin®-Molekülen

Die Überprüfung der Interleukin-2-Aktivität fand auf murinen zytotoxischen T-Zellen (CTLL-2) statt, die nur in Anwesenheit von IL-2 proliferieren. Dieser Nachweis der biologischen Aktivität des IL-2 wurde von Gillis (Gillis 1978) entwickelt. Die Kultivierung der Zellen fand in Vollmedium (78 % RPMI1640, 10 % FBS, 10 % T-STIM, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte statt. Für den Test wurden die Zellen anschließend zentrifugiert, zweimal mit

Vollmedium ohne T-STIM gewaschen und resuspendiert. Nach der Zellzahlbestimmung mit einer Neubauer-Zählkammer (Zellen mit Trypanblau gefärbt) wurde eine Zelldichte von  $8 \cdot 10^5$  eingestellt. Im nächsten Schritt wurden je 50  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension in eine 96-well-Platte ausgesät ( $4 \cdot 10^4$  Zellen pro Kavität). In einer weiteren 96-well-Platte wurden der Standard (rekombinantes humanes IL-2, Peprotech) und die zu vermessenden Proben (Affilin®-IL-2-Fusionen) verdünnt. Dabei wurde eine Konzentrationsreihe von 1000 pM bis 0,076 pM vorgelegt. Je 50  $\mu\text{L}$  dieser Verdünnungen wurden auf die CTLL-2-Zellen überführt und für 20 Stunden bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Vollmedium, sowie nur Vollmedium mitgeführt. Nach Zugabe von je 10  $\mu\text{L}$  WST-1-Reagenz (Nachweis von viablen Zellen) pro Kavität erfolgte erneut eine Inkubation für vier Stunden bei den oben genannten Bedingungen. Anschließend wurde eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm vorgenommen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm PLA 2.0.

## 2.2.8 Strukturanalyse mittels Röntgenkristallographie

Mittels Röntgenkristallographie sollte die Struktur von Affilin®-Molekülen in Verbindung mit deren Target 67B89 aufgeklärt werden. Neben dem in dieser Arbeit generierten Affilin®-Varianten 138809 und 138810 (ohne Affinitäts-tag) wurde ein weiteres Affilin®-Moleküle 77405 (ebenfalls ohne tag) verwendet. Das Protein 77405 war ebenfalls ein Heterodimer aus zwei Ubiquitin-Monomeren, jedoch mit anderen Substitutionen. Zunächst erfolgte eine Komplexbildung von Bindeprotein und Target. Dafür wurden beide Bindungspartner äquimolar für eine Stunde bei Raumtemperatur in PBS inkubiert. Anschließend wurde der Komplex mittels Gelfiltration (XK26/600 Superdex 75) in 10 mM HEPES, 100 mM NaCl pH 7,3 gereinigt und auf über 20 mg/mL konzentriert. Für die Kristallisation wurde die Dampfdiffusion mit sitzenden Tropfen in 96-well-Platten bzw. hängenden Tropfen in 15-well-Platten verwendet. Bei dieser Methode wurde die Proteinlösung mit einem Kristallisationspuffer verdünnt und zusammen mit dem reinen Kristallisationspuffer in räumlich getrennte Abschnitte in ein geschlossenes System gegeben. Über die Gasphase diffundiert der Wasserdampf aus der Proteinprobe, wobei die Proteinkonzentration kontinuierlich zunimmt. In einem primären *screening* wurden pro Kavität 200 nL Proteinlösung sowie 200 nL Reservoirflüssigkeit aus kommerziellen Kristallisations-kits (768 verschiedene Lösungen, siehe Tabelle 2-12) mit einem Cartesian Microsys 4000 Roboter pipettiert und luftdicht verschlossen. Anschließend wurden die Platten bei 15 °C inkubiert und das Kristallwachstum automatisch mit einem DTUV Minstrel *crystal imaging system* (Rigaku, Japan) kontrolliert. Zur Reproduktion und Verbesserung der Kristalle wurden weitere *screenings* hinsichtlich pH-Wert, sowie Protein- und Präzipitantenkonzentration bzw. Additiven in 15-well-Platten durchgeführt. In diesen Versuchen wurden hängende Tropfen über einem Reservoir von Hand pipettiert. Die Tropfengröße betrug dabei 4  $\mu\text{L}$ . Geeignete Kristalle wurden aus der Pufferlösung entnommen, in flüssigen Stickstoff eingefroren und am Synchrotron vermessen. Die Datensammlung erfolgte an der *beamline* 14.2 mit CCD-Detektor (MX-225, Payonics, USA) bzw. 14.1 mit Hybrid-Pixel-Detektor (Pilatus 6M, Dectris, Schweiz) des BESSY II Synchrotrons (Helmholtz-Zentrum, Berlin). Die Diffraktionsmuster wurden mittels XDS-Software ausgewertet. Zur Modellierung wurde das Programm COOT benutzt, für die Verfeinerung PHENIX. Sowohl die Datenaufnahme als auch die Auswertung wurde von Dr. Christoph Parthier (Institut für Biotechnologie, AG Stubbs, Universität Halle) durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollten Affilin®-Moleküle gegen das Targetprotein 67B89 mittels *phage display* aus einer DNA-Bibliothek selektiert werden. In dieser Bibliothek lagen insgesamt 14 Aminosäureposition pro Affilin®-Molekül randomisiert vor. Diese befanden sich vorwiegend auf den strukturell stabilen  $\beta$ -Faltblättern. Aufbauend auf den Resultaten wurde eine Affinitätsmaturierung mittels *error-prone* PCR vorgenommen, um die Bindungseigenschaften zu verbessern. Ziel war es, mit den generierten Affilin®-Molekülen die Herstellbarkeit einer Fusion mit Interleukin-2 zu zeigen und neben der Charakterisierung der Proteine eine Strukturaufklärung in Verbindung mit dem Targetprotein durchzuführen.

### 3.1 Herstellung der ED-B Targetproteine

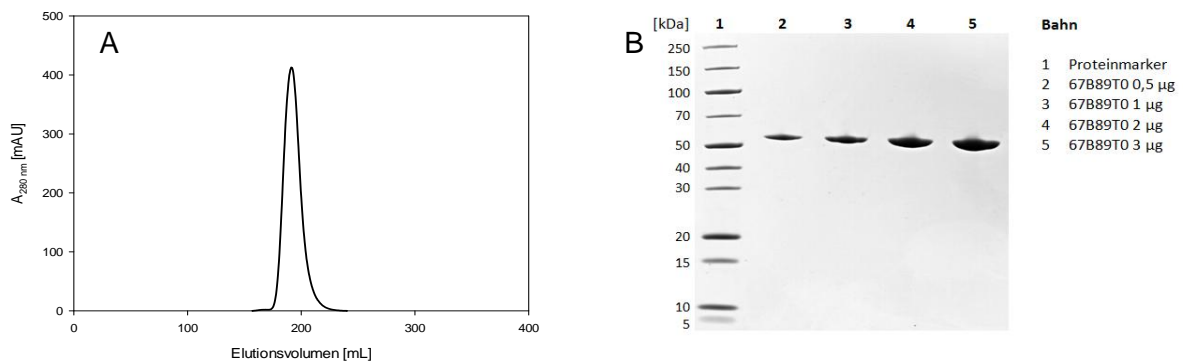
#### 3.1.1 Rekombinante Herstellung und Reinigung der Targetproteine

##### *Reinigung und Analytik der Targetproteine*

Für die Selektion künstlicher Bindeproteine basierend auf einer dimeren Ubiquitin-Bibliothek wurde ein rekombinantes Konstrukt der Extradomäne B des humanen Fibronektins verwendet. Das in dieser Arbeit benutzte Targetprotein 67B89 bestand neben der Extradomäne B zusätzlich aus den vier flankierenden Domänen 6, 7, 8 und 9. Um zu kontrollieren, dass die Affilin®-Moleküle nicht die umliegenden Domänen binden, wurde ebenso das Kontrollprotein 6789 hergestellt. Das Konstrukt 67B89 wurde in *E. coli* HMS174(DE3) hergestellt, für das Kontrolltarget 6789 wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen verwendet. Die Auswahl des *E. coli*-Stammes wurde nach Expressionstests bezüglich der Löslichkeit getroffen (Daten nicht gezeigt). Für beide Konstrukte wurde der Vektor pET28a verwendet. Die Herstellung erfolgte im Schüttelkolben (siehe Kapitel 2.2.4.2). Zur Begünstigung der löslichen Proteinsynthese wurde die Temperatur zum Induktionszeitpunkt von 37 °C auf 30 °C gesenkt und die Kultivierung für vier Stunden fortgeführt. Als Resultat wurden 5-6 g Biomasse pro Liter Medium gewonnen. Der Aufschluss erfolgte mittels Ultraschall kombiniert mit enzymatischer Lyse. Da die Zielproteine keinen Affinitäts-*tag* (T0) besaßen, wurde eine mehrstufige Reinigung mittels Anionenaustausch-Chromatographie, Fällung, hydrophober Interaktionschromatographie und Gelfiltration nötig (Kapitel 2.2.5.4). Mit dieser Reinigung wurden Ausbeuten von 1,7 mg/g BFM für 67B89\_T0 und 5,9 mg/g BFM für 6789\_T0 erzielt. Die Proteinkonzentration wurde dabei mittels UV/VIS-Spektrophotometer ermittelt. Um die Reinigung zu vereinfachen, wurde das Targetprotein 67B89 mit einem C-terminalen Hexahistidin-*tag* (Th) versehen. Die Proteinproduktion in *E. coli* BL21(DE3) und der Zellaufschluss wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Der erste Abschnitt der zweistufigen Reinigung erfolgte mittels Immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (siehe Kapitel 2.2.5.5), gefolgt von einer Gelfiltration. Die Ausbeute konnte dabei auf 4,9 mg/g BFM für 67B89\_Th gesteigert werden. Für Kristallisationsversuche wurde das verkürzte Targetprotein 7B8 ohne Affinitäts-*tag* für die Komplexbildung mit Affilin®-Molekülen verwendet. Dieses bestand neben der Extradomäne-B nur aus den flankierenden Domänen 7 und 8. Die Herstellung erfolgte analog zu 67B89 ohne Affinitäts-*tag* (siehe Kapitel 2.2.5.4). Die resultierende Ausbeute betrug 4,9 mg/g BFM.

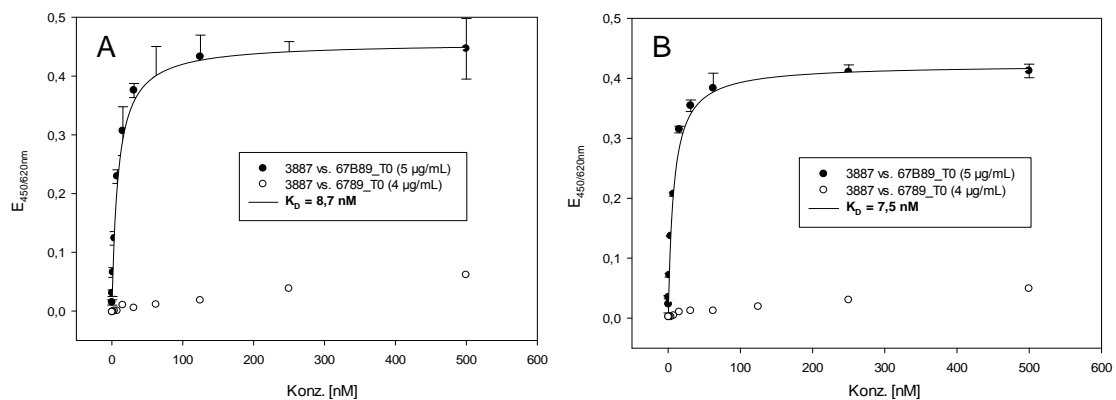


Exemplarisch ist im Folgenden die Gelfiltration als letzter Reinigungsschritt des Konstrukts 67B89\_TO gezeigt (Abbildung 3-1). Im Chromatogramm war nur ein *peak* erkennbar. Mittels SDS-PAGE konnten keine Nebenbanden auf Coomassie-gefärbten Gelen detektiert werden.



**Abbildung 3-1: Gelfiltration des Targetproteins 67B89\_TO und SDS-PAGE.** (A) Nach Reinigung des Rohextraktes mittels Anionenaustausch- und hydrophober Interaktionschromatographie schloss sich als letzter Schritt eine Gelfiltration auf einer HiLoad XK26/60 Superdex 200 an. Als Laufpuffer diente PBS pH 7,4. (B) Das gereinigte Zielprotein 67B89\_TO in verschiedenen Mengen (Konzentration spektroskopisch bestimmt) auf ein NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris-Gradientengel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt.

Für den Nachweis der Aktivität und damit der nativen Konformation der Proteine wurde ein ELISA verwendet. Zum Vergleich mit früheren Chargen wurde auf das Kontrollprotein (Affilin® 3887) zurückgegriffen. Die ermittelten Affinitäten gegenüber den verschiedenen Target-Chargen waren miteinander vergleichbar.

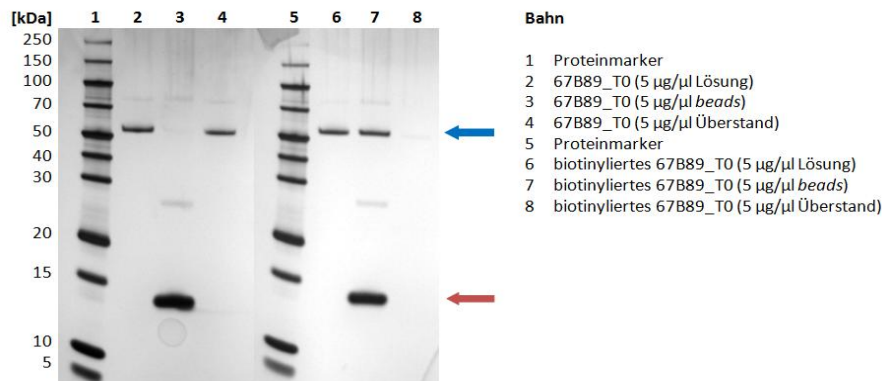


**Abbildung 3-2: Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  der Affilin®-Variante 3887 gegenüber den Targetproteinen 67B89\_TO und 6789\_TO mittels ELISA.** (A) Das gereinigte Targetprotein 67B89\_TO sowie das Kontrolltarget 6789\_TO wurden auf eine Nunc Medisorp-Mikrotiterplatte immobilisiert und mit einer Verdünnungsreihe der Affilin®-Variante 3887 inkubiert. Gebundene Affilin®-Moleküle konnten über einen mit HRP-gekoppelten Antikörper Anti-Ubi-Fab-POD nachgewiesen werden. Die TMB-Reaktion wurde nach 10 Minuten abgestoppt. Durch eine hyperbole Regression (durchgezogene Kurve) wurde der  $K_D$ -Wert berechnet. (B) Zum Vergleich wurden bereits charakterisierte Chargen der Targetproteine verwendet.

Die Proteinproben wurden auf das Vorhandensein von Oligomeren bzw. Aggregaten mittels SE-HPLC (Superdex 200 5/150 GL, Kapitel 2.2.5.12) überprüft. Bei einer Wellenlänge von 280 nm wurde für alle Konstrukte jeweils nur ein einzelner *peak* ermittelt. Aggregate oder Oligomere wurden in den Proben nicht detektiert. Das durch den mitgeführten Standard (Gelfiltration Standard, Bio-Rad) berechnete Molekulargewicht lag im erwarteten Bereich. Die gesamte Analytik wurde ebenso für das Targetprotein 67B89\_Th (mit His<sub>6</sub>-tag) bzw. für das verkürzte Target 7B8\_TO (ohne Affinitäts-tag) durchgeführt. Dabei wurden vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Affinität bzw. Reinheit erzielt.

### Charakterisierung von biotinylierten Targetprotein 67B89\_T0

Für die Selektionen mittels *ribosome* bzw. *phage display* wurde das Targetprotein 67B89\_T0 mittels EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin biotinyliert (Kapitel 2.2.5.15). Durch ein *pull-down*-Experiment des biotinylierten Targets in Verbindung mit den Streptavidin-beschichteten *beads* konnte der Biotinylierungsgrad bestimmt werden. Nach der Biotinylierung band das modifizierte Target fast vollständig an die Streptavidin-Oberfläche (Bahn 7). Lediglich eine sehr schwache Bande war im Überstand (Bahn 8) erkennbar (Abbildung 3-3). Aus dem Verhältnis der Banden wurde ein Biotinylierungsgrad von 95 % berechnet. Nicht-biotinyliertes 67B89 war hingegen vollständig im Überstand (Bahn 4) und nicht an den *beads* (Bahn 3) vorhanden.



**Abbildung 3-3: Pull-down-Experiment des biotinylierten Targets.** Je 40 µL biotinyliertes bzw. nicht-biotinyliertes Targetprotein 67B89\_T0 (blauer Pfeil) wurden zu 20 µl Streptavidin-*beads* (roter Pfeil) gegeben und für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 20 µl der eingesetzten Proteinlösung, der gewaschenen *beads* und des resultierenden Überstandes für eine SDS-PAGE verwendet. Für die Entwicklung des Gels wurde eine Silberfärbung angewendet.

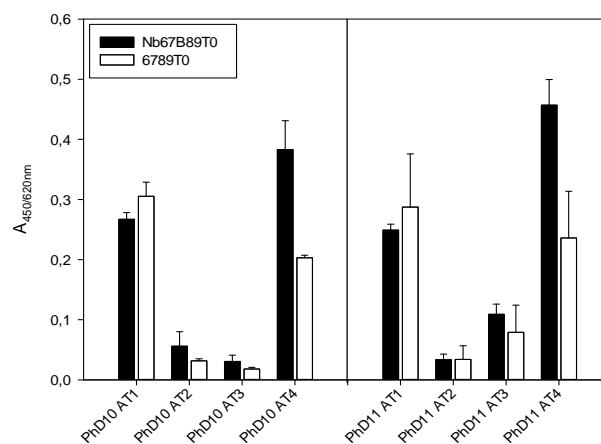
Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass das Targetprotein trotz Biotinylierung erkannt wird. In einem konzentrationsabhängigen ELISA (Kapitel 2.2.5.16) wurde sowohl biotinyliertes als auch nicht-biotinyliertes 67B89 auf eine Medisorp®-Platte immobilisiert und mit Hilfe eines Referenz-Affilin®-Moleküls eine Bindungskurve ermittelt. Der  $K_D$ -Wert der Referenz war in beiden Fällen vergleichbar (Daten nicht gezeigt), so dass kein Aktivitätsverlust durch das Biotin erzielt wurde.

## 3.2 Selektion künstlicher Bindeproteine gegen Extradomäne-B

Um Affilin®-Moleküle mit bestimmten Bindungseigenschaften aus einer großen Bibliothek zu isolieren, wurde auf das Selektionsprinzip des *phage displays* zurückgegriffen. Die in dieser Arbeit verwendete Affilin®-Bibliothek enthielt zwei mit einem Linker, bestehend aus Glycin-Isoleucin-Glycin (GIG), verbundene Ubiquitin-Moleküle. Bei jedem Monomer waren die zwei C-terminalen Glycine G75 und G76 gegen zwei Alanine zur Vermeidung von Spaltung durch Deubiquitinasen ausgetauscht. Zusätzlich war das Phenylalanin an Position 45 durch ein Tryptophan ersetzt, um spektroskopische Messungen zu erleichtern. Zur Randomisierung wurden die Positionen 6, 8 und 62-66 auf jedem Monomer freigegeben. Die Gewichtung der Aminosäuren war äquimolar – mit Ausnahme der Aminosäure Cystein, welche nicht eingesetzt wurde, um Disulfidbrücken zu vermeiden. Die von der Firma Sloning BioTechnology (Puchheim, D) synthetisierte Affilin®-Bibliothek wurde anschließend über BsaI-Schnittstellen in das Phagemid pCD12 (Scil Proteins) kloniert.

### 3.2.1 Selektion mittels *phage display*

Zur Selektion ED-B-bindender Affilin®-Moleküle wurden zwei *phage displays* mit unterschiedlichen Targetmengen (Kapitel 2.2.2) bei 37 °C durchgeführt. Durch eine Verringerung der angebotenen Targetmengen sowie einer Erhöhung der Anzahl der Waschschritte sollte der Selektionsdruck mit jeder der vier durchgeführten Runden vergrößert werden. Eine Übersicht der Selektionsschemata befindet sich in Tabelle 2-28 bzw. Tabelle 2-29. Die Transformationseffizienz nach der präparativen Transformation der ER2738-Zellen mit der Phagemidbibliothek betrug  $3,09 \cdot 10^{10}$ . Nach jeder *panning*-Runde sank die Anzahl der eluierten Phagen. Eine Anreicherung von Eluattiter zu Ausgangstiter war nicht zu verzeichnen. Eine Sequenzierung von je 48 Klonen aus der jeweils vierten Runde zeigte keine Sequenzanreicherung. Zur Kontrolle der einzelnen Runden wurde ein Phagen-Pool-ELISA (Kapitel 2.2.5.16) durchgeführt. Die verwendeten Ausgangstiter wurden dazu auf eine Phagenmenge von  $3,5 \cdot 10^{10}$  eingestellt und auf eine mit N-terminal biotinylierten (Nb) Target Nb67B89\_T0 und *off*Target Nb6789\_T0 beschichtete 96-*well*-Medisorp-Platte gegeben. Zur Negativkontrolle wurde kein Target eingesetzt, um die Phagen auf unspezifische Bindung an die Oberfläche der Mikrotiterplatte zu untersuchen. Der Nachweis der gebundenen Phagen erfolgte mittels HRP-konjugierten Anti-M13-Antikörper mit einer Verdünnung von 1:5000 (Abbildung 3-4). Im Vergleich der einzelnen Runden konnte keine signifikante Anreicherung von 67B89-bindenden Proteinen gezeigt werden. Allerdings trat jeweils in der vierten Runde eine Zunahme der Spezifität zum Target auf (Abbildung 3-4).

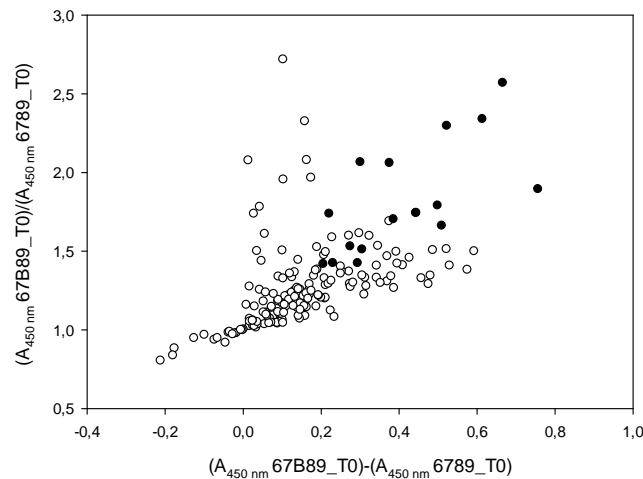


**Abbildung 3-4: Phagen-Pool-ELISA der zwei *phage displays* (PhD10 und PhD11) zur Untersuchung der Bindungseigenschaften.** Der Ausgangstiter (AT) der einzelnen *panning*-Runden wurde auf  $3,5 \cdot 10^{10}$  normiert und auf eine mit Nb67B89\_T0 und 6789\_T0 beschichteten 96-*well*-Medisorp-Platte gegeben. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des HRP-konjugierten Anti-M13-Antikörpers in einer Verdünnung von 1:5000.

### 3.2.2 Identifizierung und Charakterisierung ED-B-bindender Affilin®-Moleküle

Nach der Selektion wurde die resultierende Bibliothek der jeweils vierten *panning*-Runde in den Vektor pPR-IBA1b kloniert und anschließend in *E. coli* BL21(DE3) als Affilin®-Moleküle mit Strep-tag II hergestellt. Zur Identifizierung von Affilin®-Varianten, die das Target 67B89 spezifisch binden, wurde ein ELISA-basiertes *screening* durchgeführt. Dafür wurden pro *phage display* 360 Kolonien in 96-*well*-Platten überführt und sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle in Form des Leervektors eingebracht. Die Kultivierung fand in ZYM5052-Autoinduktionsmedium statt. Nach Aufschluss der

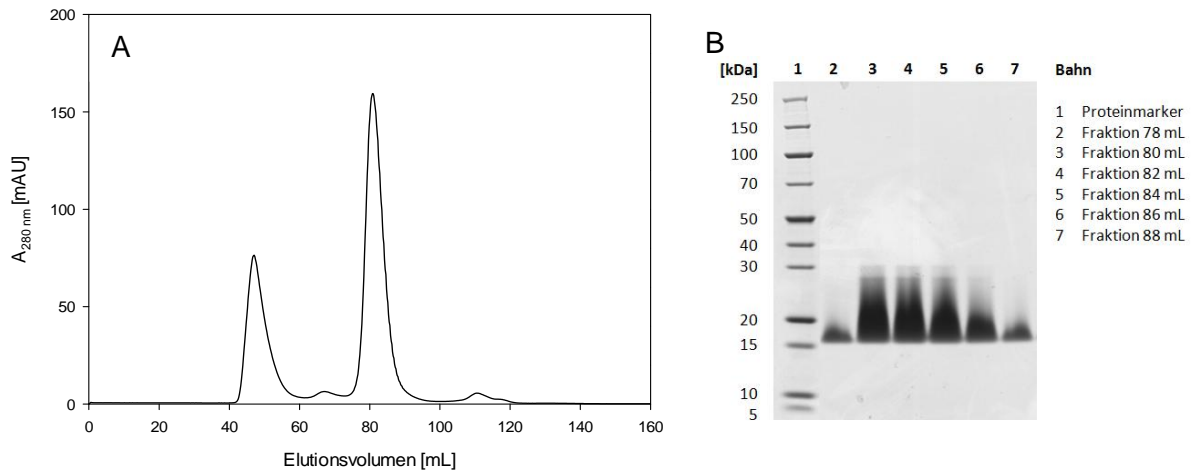
durch Zentrifugation geernteten Zellpellets wurde das Lysat für eine Stunde bei 50 °C inkubiert. Dadurch sollten hitzelabile Affilin®-Moleküle eliminiert werden. Anschließend wurde das Zelllysate erneut zentrifugiert und auf mit 67B89 beschichtete 96-well-Medisorp-Platten gegeben. Der Nachweis erfolgte mittels Anti-Ubi-Fab-Antikörper (HRP-Konjugat). Als Resultat wurden 76 Varianten aus dem PhD10 und 103 Varianten aus dem PhD11 (sogenannte Hits) hinsichtlich ihrer Bindung und Spezifität zum Target für weitere Untersuchungen ausgewählt, was einer Hitrate von 25 % entsprach. Zur Reproduktion der Ergebnisse wurden die 179 Hits auf zwei 96-well-Platten überführt. Im Anschluss erfolgte eine erneute Anzucht in Autoinduktionsmedium sowie die Zelllyse analog zum primären *screening*. Im sich anschließenden ELISA wurde neben dem Target 67B89\_T0 auch das Kontrolltarget 6789\_T0 eingesetzt. Als Auswahlkriterium wurde neben dem relativen Signalverhältnis der Bindung an Target bzw. *off*Target und der absoluten Signaldifferenz der Bindung an Target und *off*Target ebenso eine Löslichkeitsuntersuchung mittels SDS-PAGE berücksichtigt. Aus diesem zweiten *screening* wurden somit 16 Affilin®-Varianten für eine genauere Charakterisierung ausgewählt.



**Abbildung 3-5: Identifizierung ED-B-bindender Affilin®-Moleküle im *screening*.** Nach Anzucht in Autoinduktionsmedium wurde das gewonnene Zelllysate in einem ELISA-basierten Hitscreening verwendet. Auf 96-well-Medisorp-Platten wurde dazu Target (67B89\_T0) und Kontrolltarget (6789\_T0) immobilisiert. Die Detektion erfolgte mit HRP-konjugierten Anti-Ubi-Fab-Antikörper. Für die Auswertung wurde die Signaldifferenz gegen das Signalverhältnis zwischen 67B89\_T0 und 6789\_T0 abgebildet. Die schwarz markierten Datenpunkte zeigen die 16 für eine weitere Charakterisierung ausgewählten Affilin®-Varianten.

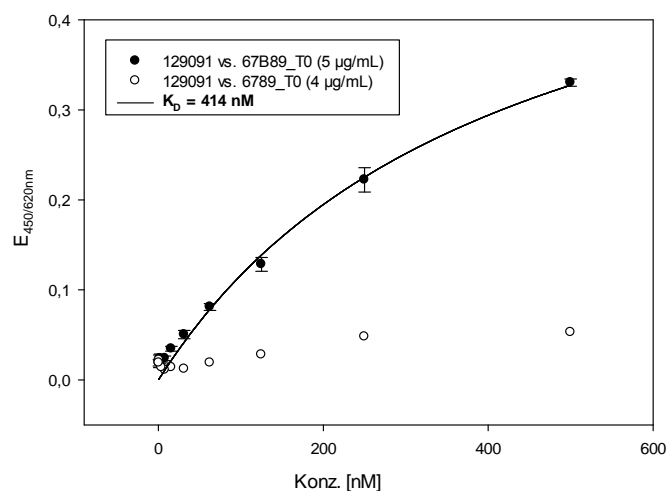
Für eine genauere Untersuchung der ausgewählten Varianten wurden diese in *E. coli* BL21(DE3) in je einem Liter 2xYT-Medium angezogen. Dabei konnten Biofeuchtmassen von 1,5 bis 3,7 g/L Medium erzielt werden. Die Identität der Varianten wurde durch Sequenzierung der aus der Biomasse isolierten Plasmide bestätigt. Durch den C-terminalen Strep-tag II konnten die Proteine mit einer Strep-Tactin Superflow-Säule an einem ÄKTexpress-System (siehe Kapitel 2.2.5.6) gereinigt werden. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex 75) aufgetragen. In den Chromatogrammen der Gelfiltration waren bei fast allen Proben zwei Hauptpeaks erkennbar. Das apparente Molekulargewicht der Peaks wurde anschließend per SE-HPLC (Superdex 75, Kapitel 2.2.5.12) untersucht. Der Peak bei einem Elutionsvolumen von ca. 80 ml konnte dadurch als monomeres Zielprotein identifiziert werden ( $MW_{\text{apparent}} \text{ SE-HPLC: } 12\text{-}18 \text{ kDa}$ ;  $MW_{\text{theoretisch}} \sim 17,5 \text{ kDa}$ ). Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigte ebenso keine Nebenbanden. Bei dem Peak bei ca. 50 ml Elutionsvolumen handelte es sich um Aggregate. Für die weiteren Betrachtungen wurden nur

monomere Proben verwendet. Insgesamt konnten Ausbeuten der gereinigten Proteine von 0,1-9,4 mg/g Biofeuchtmasse erzielt werden (siehe Tabelle 3-1). Die Unterschiede waren dabei vorwiegend auf die unterschiedliche Löslichkeit der Proteine zurückzuführen. Exemplarisch ist in der folgenden Abbildung die Gelfiltration der Variante 129091 dargestellt. Bei den übrigen Affilin®-Molekülen konnten bis auf die Variante 128939 (nur Aggregat) ähnliche Resultate gewonnen werden.



**Abbildung 3-6: Reinigung der Variante 129091.** Die Reinigung erfolgte über den C-terminalen Strep-tag II an einer Strep-Tactin Superflow-Säule. Die intern im ÄKTAexpress-System gesammelten Elutionsfraktionen wurden anschließend direkt auf eine SEC (HiLoad XK16/60 Superdex 75 *prep grade*, in PBS pH 7,4) aufgetragen. **(A)** Chromatogramm der SEC, **(B)** SDS-PAGE der Fraktionen des Hauptpeaks (Elutionsvolumen 76-88 mL, je 2 mL Fraktionen).

Die Bindung der selektierten Affilin®-Moleküle an 67B89\_T0 wurde in einem konzentrationsabhängigen ELISA (Kapitel 2.2.5.16) ermittelt. Für acht Varianten konnten Affinitäten ermittelt und  $K_D$ -Werte von 414 nM bis 1770 nM bestimmt werden. Ein Beispiel ist in Abbildung 3-7 dargestellt. Zusätzlich wurde das Kontrolltarget 6789 verwendet, um die Spezifität der Proteine zu untersuchen.



**Abbildung 3-7: Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  der Affilin®-Variante 129091 gegenüber 67B89\_T0 und 6789\_T0 mittels konzentrationsabhängigen ELISA.** Das Targetprotein 67B89\_T0 sowie das Kontrolltarget 6789\_T0 wurden auf eine Nunc Medisorp-Mikrotiterplatte immobilisiert und mit einer Verdünnungsreihe der Affilin®-Variante 129091 inkubiert. Gebundene Affilin®-Moleküle konnten über einen mit HRP-gekoppelten Antikörper Anti-Ubi-Fab-POD nachgewiesen werden. Die TMB-Reaktion wurde nach 10 Minuten abgestoppt. Durch eine hyperbole Regression (durchgezogene Kurve) wurde der  $K_D$ -Wert berechnet.

Bei der Sequenzanalyse (Abbildung 3-8) der acht spezifisch an 67B89\_T0 bindenden Varianten gab es mehrere Übereinstimmungen. An Position 8 und 144 waren zu je 50 % hydrophobe Aminosäuren vorhanden, während sich an Position 87 bzw. 143 zu je 62,5 % aromatische bzw. positiv geladene Aminosäuren befanden. Bei den nicht-bindenden Affilin®-Molekülen gab es lediglich an Position 65 eine 57 %ige Anreicherung von polaren Aminosäuren.

```

129237 1 mqifvntfTgkttilevpsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtIsdyNiEwrpeLhlvrlraagig
129259 1 mqifvitiTgkttilevpsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtIsdyNiplqagLhlvrlraagig
129261 1 mqifvwhTgkttilevpsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtIsdyNiIqpfplhlvrlraagig
128901 1 mqifvigtTgkttilevpsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtIsdyNirgppqLhlvrlraagig
128973 1 mqifvdtmTgkttilevpsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtIsdyNiWamhwLhlvrlraagig
129035 1 mqifvrtvTgkttilevpsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtIsdyNigrndmLhlvrlraagig
129091 1 mqifvhtwTgkttilevpsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtIsdyNigtnnhLhlvrlraagig
129097 1 mqifvitaTgkttilevpsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtIsdyNigavgtLhlvrlraagig

129237 80 mqifvgtyTgkttilevpsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtIsdyNiakgmqLhlvrlraasawshppqfek
129259 80 mqifvdytTgkttilevpsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtIsdyNiddnwLhlvrlraasawshppqfek
129261 80 mqifvwtptgkttilevpsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtIsdyNiAmrasLhlvrlraasawshppqfek
128901 80 mqifvytwTgkttilevpsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtIsdyNihrtvrLhlvrlraasawshppqfek
128973 80 mqifvrtntTgkttilevpsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtIsdyNirvrahLhlvrlraasawshppqfek
129035 80 mqifvvtvTgkttilevpsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtIsdyNiltrwpLhlvrlraasawshppqfek
129091 80 mqifvftlTgkttilevpsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtIsdyNirkhgyLhlvrlraasawshppqfek
129097 80 mqifvvtwTgkttilevpsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtIsdyNigrwpLhlvrlraasawshppqfek
    
```

**Abbildung 3-8: Alignments der spezifisch an 67B89\_T0 bindenden Affilin®-Varianten.**

Die fünf Varianten mit den besten Affinitäten im ELISA wurden zusätzlich auf thermische Stabilität mittels DSF untersucht. Der eingesetzte Farbstoff Sypro® Orange bindet dabei an die hydrophoben Bereiche, die während einer thermischen Denaturierung aus dem inneren Bereich des Proteins nach außen treten. Bis auf eine Affilin®-Varianten mit einem Schmelzpunkt von 46 °C lagen bei den übrigen Varianten die ermittelten Temperaturen im Bereich von 51°C- 59 °C.

**Tabelle 3-1: Eigenschaften ausgewählter Binder, die mittels *phage display* 10 und 11 selektiert wurden.** Das für eine Affinitätsmaturierung final ausgewählte Affilin® 129091 wurde farbig markiert.

Variante	Monomer- anteil in Reinigung [%]	Reinheit SE-HPLC [%]	DSF [°C]	ELISA 67B89 [nM]	Ausbeute		
					[mg/L Kultur]	[mg/g BFM]	
PhD10	128939	0	-	-	0,2	0,1	
	128973	65	100	46	475	0,7	0,3
	128901	77	100	59	499	1,0	0,5
	129035	82	100	-	1142	2,3	0,8
	128909	93	100	-	Keine Bindung	16,7	5,2
	129015	78	100	-	Keine Bindung	3,1	0,8
PhD11	129091	66	100	59	414	3,2	1,3
	129259	95	100	51	596	2,6	1,2
	129261	58	100	-	611	2,8	1,9
	129237	85	100	55	627	0,3	0,2
	129097	70	100	-	1770	11,5	3,6
	129119	62	100	-	Keine Bindung	1,9	0,6
	129157	89	100	-	Keine Bindung	20,9	7,0
	129129	83	100	-	Keine Bindung	3,9	1,1
	129221	94	100	-	Keine Bindung	26,2	8,7
	129225	95	100	-	Keine Bindung	22,5	9,4

In der Tabelle 3-1 sind die Ergebnisse der Herstellung und Analytik zusammengefasst. Im Verlauf des *phage display* 11 wurde mit jeder Runde die Menge des Targetproteins 67B89 stärker verringert als im *phage display* 10. Mit dieser Strategie sollten affinere Binder selektiert werden. Dieser Effekt konnte durch die ermittelten Affinitäten im ELISA nicht bestätigt werden. Da die erhaltenen Bindeproteine noch nicht die gewünschte Affinität ( $K_D$  im niedrigen zweistelligen nanomolaren Bereich) aufwiesen, sollte nachfolgend eine Maturierung hinsichtlich der Affinität gegenüber 67B89 durchgeführt werden. Das dafür ausgewählte Affilin® 129091 (Tabelle 3-1 rot markiert) besaß einen  $K_D$ -Wert von 414 nM, einen Schmelzpunkt von 59 °C sowie eine Ausbeute von 1,3 mg/g Biomasse.

### 3.3 Maturierung ED-B bindender Affilin®-Moleküle

Mit dem in Kapitel 3.2.1 beschriebenen *phage display* bei 37°C konnten erfolgreich Bindeproteine identifiziert und charakterisiert werden. Da die final ausgewählte Affilin®-Variante 129091 nicht die gewünschte Affinität ( $K_D$  im niedrigen zweistelligen nanomolaren Bereich) besaß, sollte diese durch eine Maturierung erhöht werden. Daher sollten mittels *error-prone* PCR zufällige Punktmutationen in das Gen einbracht werden, um eine neue DNA-Bibliothek für ein anschließendes *ribosome display* zu erzeugen. Neben der ausgewählten Variante 129091 mit einem  $K_D$ -Wert von 414 nM (ELISA) sollte eine weitere Affilin®-Variante mit einer besseren Ausgangsaffinität untersucht werden. Die Wahl fiel auf das Affilin® 102472, das durch ein *phage display* aus der gleichen Bibliothek und mit identischen Parametern bis auf die Temperatur (PhD bei Raumtemperatur und nicht 37 °C) selektiert worden war. Für diese Variante konnte ein  $K_D$ -Wert von 16 nM (Biacore) bzw. 8 nM (ELISA) gegenüber 67B89 ermittelt werden. Die Ausbeute nach der Reinigung betrug 0,7 mg/g Biofeuchtmasse.

#### 3.3.1 Konstruktion eGFP-kodierender Vektoren

Während der *error-prone* PCR können neben den erwünschten Punktmutationen auch Deletionen oder Insertionen auftreten (laut Hersteller des Mutagenese-Kits 5,5 %), die zu *frameshifts* führen können. Allerdings zeigten Vorversuche, dass die *frameshift*-Rate weit höher liegen konnte (bis über 25 %). Da in einem *screening* vorzugsweise funktionelle Proteine ohne Leserahmenverschiebung untersucht werden sollten, kam eine Fusion mit eGFP zum Einsatz. Das verwendete *enhanced* GFP (eGFP) wurde C-terminal mit dem Affilin® fusioniert, so dass bei einem *frameshift* auch die Funktionalität des grün fluoreszierenden Proteins verloren ging. Dies ermöglichte eine weitere Selektion im *screening*, da nur *E. coli*-Kolonien mit richtigen Leserahmen und einer ausreichenden Expressionsrate ausgewählt wurden. Eine schematische Darstellung des Vektors ist in Abbildung 3-9 gegeben. Vorversuche zeigten, dass eine Reinigung nicht über den zwischen Affilin® und eGFP liegenden Strep-tag II möglich war. Somit wurde auf den C-terminalen His<sub>6</sub>-tag zurückgegriffen.



**Abbildung 3-9: Schematische Darstellung des pET-Strep-GFP-Vektors.** Der Vektor basierte auf dem Vektor pET-20b, in dem die Affilin®-Sequenz mit Strep-tag II und die Sequenz des eGFP mit C-terminalen Hexahistidin-tag eingebracht wurde.

### 3.3.2 Mutagenese mittels *error-prone* PCR

Für eine Affinitätsmaturierung wurden mit Hilfe der *error-prone* PCR Punktmutationen in die zwei ausgewählten Affilin®-Varianten eingebracht. Diese Mutagenese wurde mit dem Mutazyme II Random Mutagenesis Kit von Agilent (Kapitel 2.2.1.4) durchgeführt. Zunächst wurden verschiedene DNA-Mengen (0,5 ng und 5 ng) des *templates* untersucht, um eine größtmögliche Zahl an Mutationen bei einer moderaten *frameshift*-Rate zu erzielen. Nach der gerichteten Klonierung der mutierten DNA-Pools (mit EcoRI und XbaI verdaut) in den Vektor pPR-IBA1b wurden jeweils 96 Varianten zufällig ausgewählt und sequenziert. Dabei waren nicht alle Sequenzen auswertbar, viele enthielten Stopp-Codons in den Genen oder Leervektoren. Das Ergebnis dieser Untersuchung und die daraus berechneten Mutationsraten sind in der folgenden Tabelle 3-2 aufgeführt.

**Tabelle 3-2: Sequenzbewertung *error-prone* PCR**

Eingesetztes Plasmid	ausgewertete Sequenzen	Basen-austausche	Aminosäure-austausche	<i>frameshift</i> -Rate [%]	Mutationsrate [Mutationen/kb]
102472 (0,5 ng)	47	309	236	24	14,2
102472 (5 ng)	52	233	184	15	9,7
129091 (0,5 ng)	42	225	168	27	11,5
129091 (5 ng)	49	236	168	24	10,4

Die Mutationsraten lagen im Bereich der Herstellerangaben (9-16 Mutationen/kb bei 0,1-100 ng DNA-*template*). Mit der Verringerung der eingesetzten DNA-Menge konnte eine leichte Erhöhung der Mutations- und *frameshift*-Rate erzielt werden. Hinsichtlich der Nukleotidaustausche wurden folgende Anteile ermittelt: A/T → N mit 70,8 % und G/C → N mit 29,2 %. Der Hersteller gibt für die Mutazyme II Polymerase ein ausgeglicheneres Verhältnis der Austausch an (A/T → N mit 50,7 % und G/C → N mit 43,8 %). Auf Grund der höheren Mutationsrate wurde für die präparative *error-prone* PCR eine *template*-Menge von 0,5 ng ausgewählt. Die aus diesen Mutationsraten berechnete theoretische Bibliotheksgröße betrug  $6,0 \cdot 10^{10}$  für die Variante 102472 bzw.  $4,9 \cdot 10^{10}$  für 129091.

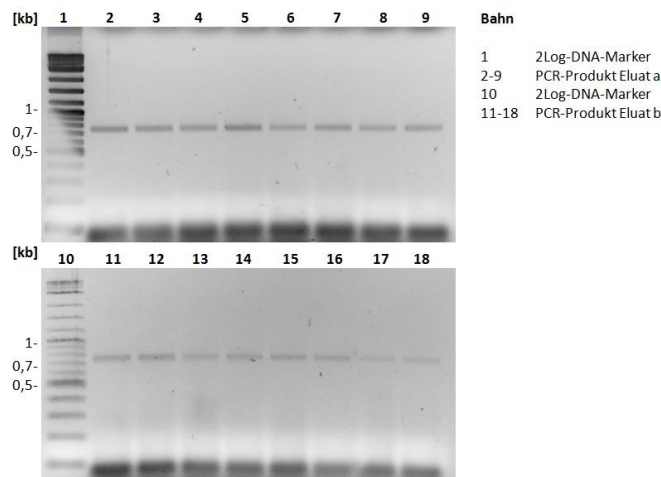
### 3.3.3 Selektion mittels *ribosome display* aus maturierter Bibliothek

Die mit Hilfe der *error-prone* PCR generierten Bibliothek wurde wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben mit einer *spacer*-Region ausgestattet und mittels *ribosome display* (RD, Kapitel 2.2.3) gegen 67B89 selektiert. Für jede Ausgangsversion wurden vier RD-Runden durchgeführt. Die Bedingungen variierten auf Grund der unterschiedlichen Ausgangsaffinitäten und sind Tabelle 2-30 bzw. Tabelle 2-31 zu finden. Zur internen Kontrolle der RD-Parameter wurde die Sequenz des hochaffinen Affilin®-Moleküls 46877 ( $K_D$ -Wert 40 pM) in einer 1:500 Verdünnung mit dem Wildtyp-Ubiquitin-Dimer (keine Targetbindung) eingesetzt. Nach jeder RD-Runde wurde eine Poolsequenzierung durchgeführt, bei der ausschließlich die Sequenz der Variante 46877 nachgewiesen wurde.

Im RD der Variante 102472 wurde eine *selection in solution* (SIS) durchgeführt. Dazu wurden die ternären Komplexe mit biotinyliertem Target Nb67B89 inkubiert und anschließend an M-270 SA-*beads* immobilisiert. Für die Variante 129091 war dies durch die geringe Affinität nicht möglich, da eine entsprechend hohe Targetmenge nicht an die *beads* gekoppelt werden konnte. Daher wurde



das Target zunächst an den SA-beads gekoppelt und erst danach mit den ternären Komplexen inkubiert. Pro Selektionsrunde wurden jeweils 318 ng DNA eingesetzt. In den ersten beiden Runden erfolgte die Dissoziation der ternären Komplexe mit einem EDTA-haltigen Puffer, während bei den Runden 3 und 4 zunächst mit nicht-biotinylierten Target 67B89\_TO kompetitiv eluiert (Eluat a) wurde. Komplexe, die dadurch nicht abgelöst werden konnten, wurden anschließend ebenfalls mit EDTA-haltigen Puffer (Eluat b) eluiert. Zur weiteren Verwendung wurde jeweils nur Eluat a genommen. Die Abbildung 3-10 zeigt die präparativen Agarosegele der ersten PCR nach der vierten Runde des *ribosome displays* (102472). Da auf dem analytischen Kontrollgel (Daten nicht gezeigt) keine Kontaminationen erkennbar waren und die DNA-Banden auf der zu erwartenden Höhe liefen, konnten die PCR-Produkte aus dem Gel eluiert und weiterverwendet werden. Ein analoges Resultat gab es im *ribosome display* der Variante 129091. Im Anschluss erfolgte eine Umklonierung der ersten PCR vom Eluat a der vierten Runde in den Expressionsvektor. Dazu wurden die DNA-Pools mit einer PCR amplifiziert (Kapitel 2.2.1.4) und über NdeI/XhoI in den Vektor pET-Strep-GFP ligiert.



**Abbildung 3-10: Präparatives Agarosegel der ersten PCR der vierten RD-Runde (102472).** Auftrennung der PCR-Produkte der Eluatfraktionen a und b in einem 1,6 %-igen Agarosegel. Die Proben wurden mit Ficoll versetzt und mit 6 V/cm im Gel aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Färbung mittels GelRed.

Zur Überprüfung wurde nach jeder Runde die Qualität des DNA-Pools durch eine Sequenzierung untersucht. Dazu wurden Proben der zweiten PCR verwendet und die erhaltene Sequenzinformation mit der jeweiligen Referenzsequenz verglichen. In der vierten Runde des 102472-Pools konnten bereits Anreicherungen von mutierten Bereichen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3-11). Drei deutliche Bereiche finden sich an den Positionen 16/17 und 37/38 sowie an den Positionen 80 und 82. Im DNA-Pool der Ausgangsvariante 129091 wurde keine Anreicherung beobachtet.

```

102472          1  mqifvhtdtgkttitlevepsdtienvkakiqkqkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidpqlkhlvlrlraagig
102472_Runde 4  1  mqifvhtdtgkttitlxxepsdtienvkakiqkqkegixxdqqrliwagkqledgrtlsdynidpqlkhlvlrlraagig

102472          80  mqifvttqtgkttitlevepsdtienvkakiqkqkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidryrhlvlrlraa
102472_Runde 4  80  xqxfvttqtgkttitlevepsdtienvkakiqkqkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidryrhlvlrlraa

129091          1  mqifvhtwtgkttitlevepsdtienvkakiqkqkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynigtnnhlhlvlrlraagig
129091_Runde4  1  mqifvhtwtgkttitlevepsdtienvkakiqkqkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynigtnnhlhlvlrlraagig

129091          80  mqifvftltgkttitlevepsdtienvkakiqkqkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynirkhqylhlvlrlraa
129091_Runde4  80  mqifvftltgkttitlevepsdtienvkakiqkqkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynirkhqylhlvlrlraa
    
```

**Abbildung 3-11: Alignments der Proteinsequenzen aus der vierten RD-Runde.** Die Sequenzinformationen aus der jeweils vierten RD-Runde im direkten Vergleich mit der dazugehörigen Ausgangsvariante. Ein „x“ steht für mutierte Aminosäurepositionen.

### 3.3.4 Identifizierung und Charakterisierung von eGFP-fusionierten maturierten Affilin®-Molekülen

Nach Klonierung der Eluate a der vierten RD-Runde in den Vektor pET-Strep-GFP wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert und selektiv mit Hilfe des Pickers K3XL (KBiosystems) nur grün-fluoreszierende Kolonien in 96-well-Platten transferiert. Das folgende *screening* wurde analog zum *phage display screening* (Kapitel 3.2.2) durchgeführt. Aus dem maturierten Pool der Varianten 102472 und 129091 wurden 630 bzw. 720 Klone in einem primären ELISA bezüglich der Bindung zum Target 67B89 untersucht. Dabei wurden 260 bzw. 179 Klone als 67B89-bindende Varianten identifiziert und in einem sekundären ELISA eingesetzt. Neben dem Targetprotein wurde das Kontrollprotein 6789 immobilisiert, um die Spezifität der Affilin®-Moleküle zu untersuchen. Zusätzlich wurde das Zelllysate eine Stunde bei 50 °C inkubiert, um Temperatur-labile Varianten zu eliminieren. Im Vergleich wiesen die Abkömmlinge der 129091 deutlich geringere und teilweise unspezifische Signale im ELISA auf als die 102472-Abkömmlinge. Von den Abkömmlingen der Varianten 102472 und 129091 wurden 30 bzw. 66 Klone zur Sequenzierung ausgewählt. Für weitere Untersuchungen wurden 14 (Elternvariante: 102472) bzw. 10 (Elternvariante: 129091) Affilin®-Moleküle ausgewählt. Neben den Ergebnissen des *screenings* wurde dabei auf eine Sequenzvielfalt geachtet.

```

102472      1  mqifvhtdtgkttilevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidpqlkhlvlrlraagig
CP1-A8     1  mqifvhtdtgkttilekaepsdtienvkakiqkqegilpdqqrliwagkqledgrtlsdynidpqlkhlvlrlraagig
CP2-E12    1  mqifvhtdtgkttilevepsdtienvkakiqkqegipsdqqrliwagkqledgrtlsdynidpqlkhlvlrlraagig
CP2-F7     1  mqifvhtdtgkttilevepsdtienvkakiqkqegilpdqqrliwagkqledgrtlsdynidpqlkhlvlrlraagig
CP2-F11    1  mqifvhtdtgkttilevepsdtienvkakiqkqegipsdqqrliwagkqledgrtlsdynidpqlkhlvlrlraagng
CP2-F12    1  mqifvhtdtgkttilevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidpqlkhlvlrlraag-g
CP1-E7     1  mqifvhtdtgkttilekaepsdtienvkakiqkqegilpdqqrliwagkqledgrtlsdynidpqlkhlvlrlraagig
CP2-H3     1  mqifvhtdtgkttilekaepsdtienvkakiqkqegilpdqqrliwagkqledgrtlsdynidpqlkhlvlrlraagig
CP3-A5     1  mqifvhtdtgkttilevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidpqlkhlvlrlraagig
CP1-H8     1  mqifvhtdtgkttilevepsdtienvkakiqkqegipsdqqrliwagkqledgrtlsdynidpqlkhlvlrlraagng
CP3-G9     1  mqifvhtdtgkttilevepsdtienvkakiqkqegilpdqqrliwagkqledgrtlsdynidpqlkhlvlrlraagng
CP3-H1     1  mqifvhtdtgkttilevepsdtienvkakiqkqegipsdqqrliwagkqledgrtlsdynidpqlkhlvlrlraagng
CP2-A11    1  mqifvhtdtgkttilevepsdtienvkaeiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidpqlkhlvlrlraagig
CP3-E8     1  mqifvhtdtgkttilekaepsdtienvkakiqkqegilpdqqrliwageqledgrtlsdynidpqlkhlvlrlraagig
CP2-D6     1  mqifvhtdtgkttilevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidpqlkhlvlrlraagig

102472     80  mqifvttgtgkttilevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidyrylhlvlrlraa
CP1-A8     80  iqtfvttgtgkttilevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidyrylhlvlrlraa
CP2-E12    80  iqtfvttgtgkttilevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidyrylhlvlrlraa
CP2-F7     80  iqtfvittgtgkttilevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidyrylhlvlrlraa
CP2-F11    80  iqtfvttgtgkttilevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidyrylhlvlrlraa
CP2-F12    80  mqifvttgtgkttilevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidyrylhlvlrlraa
CP1-E7     80  iqtfvttgtgkttilevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidyrylhlvlrlraa
CP2-H3     80  iqtfvttgtgkttilevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidyrylhlvlrlraa
CP3-A5     80  iqtfvttgtgetitlevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidyrylhlvlrlraa
CP1-H8     80  iqtfvttgtgkttilevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidyrylhlvlrlraa
CP3-G9     80  iqtfvttgtgkttilevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidyrylhlvlrlraa
CP3-H1     80  iqtfvttgtgkttilevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidyrylhlvlrlraa
CP2-A11    80  iqtfvttgtgkttilevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidyrylhlvlrlraa
CP3-E8     80  iqtfvttgtgetitlevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidyrylhlvlrlraa
CP2-D6     80  iqtfvttgtgkttilevepsdtienvkakiqkqegippdqqrliwagkqledgrtlsdynidyrylhlvlrlraa

```

**Abbildung 3-12: Proteinsequenzen der selektierten Affilin®-Varianten (Ausgangsvariante 102472).**

In Abbildung 3-12 und Abbildung 3-13 sind die Sequenzen der selektierten Affilin®-Moleküle, welche zusätzlich mit eGFP fusioniert waren, jeweils im Vergleich zur Elternvariante dargestellt. Die Ergebnisse sind mit der Sequenzierung der vierten RD-Runde vergleichbar (siehe Abbildung 3-11). Bereits dort waren für den DNA-Pool der Variante 102472 einige mutierte Regionen erkennbar. Ein sehr prominenter Austausch befand sich an Position 80 und 82, aber auch an die Positionen 16/17 und 37/38 des Affilin®-Moleküls. Ein weiterer häufiger Austausch befand sich im GIG-Linker zwischen beiden Modulen. In einem Fall erfolgte eine Deletion eines Isoleucins im Linker. Bei den Abkömmlingen der Variante 129091 konnten keine derartige Regionen identifiziert werden.

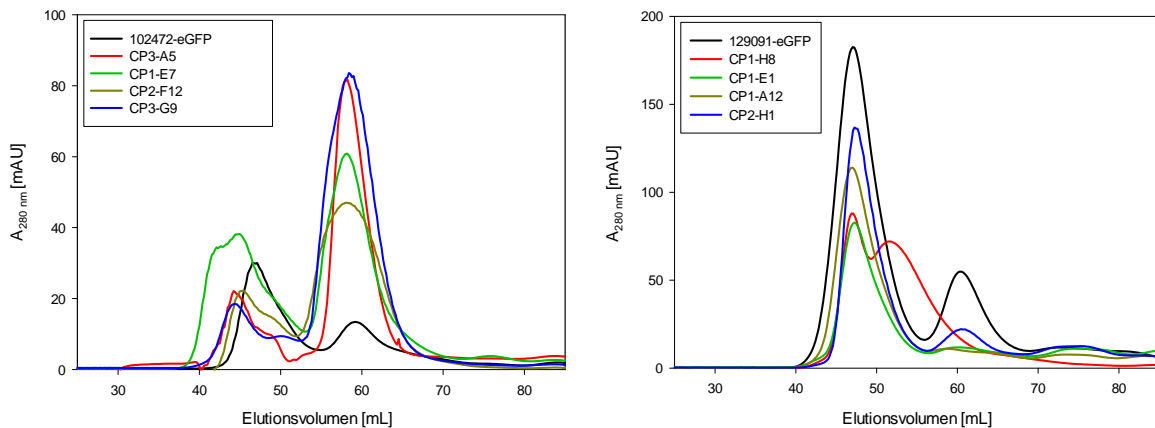
```

129091      1  mqifvhtwtgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynigtnnhhlvlrlraagig
CP2-H1     1  mqifvhtwtgkttilevepsdtienvkakiqdkiegippdqqrliwagkqledgrtlsdynigtknhlhlvlrlraagig
CP1-A4     1  mqifvhtwtgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynigtynhlhlvlrlraagig
CP1-A12    1  mqifvhtwtgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynigtnnhhlvlrlraagig
CP1-H8     1  mqifvhtwtgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynigtnnhhlvlrlraagig
CP1-G12    1  mqifvhtwtgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynigtnnhhlvlrlraagig
CP1-F12    1  mqifvhtwtgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynigtnnhhlvlrlraagig
CP1-E2     1  mqifvhtwtgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynigtnnhhlvlrlraagig
CP1-E1     1  mqifvhtwtgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynigtnnhhlvlrlraagig
CP1-B2     1  mqifvhtwtgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynigtnnhhlvlrlraagig
CP1-B1     1  mqifvhtwtgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynigtnnhhlvlrlraagig

129091     80  mqifvftltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynirkhqylhlvlrlraa
CP2-H1     80  mqifvftltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynirkhqylhlvlrlraa
CP1-A4     80  mqifvftltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynirkhqylhlvlrlraa
CP1-A12    80  mqifvftltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynirkhqylhlvlrlraa
CP1-H8     80  mqifvftltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynirkhqylhlvlrlraa
CP1-G12    80  mqifvftltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynirkhqylhlvlrlraa
CP1-F12    80  mqifvftltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynirkhqylhlvlrlraa
CP1-E2     80  mqifvftltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynirkhqylhlvlrlraa
CP1-E1     80  mqifvftltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynirkhqylhlvlrlraa
CP1-B2     80  mqifvftltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynirkhqylhlvlrlraa
CP1-B1     80  mqifvftltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtlsdynirkhqylhlvlrlraa
    
```

**Abbildung 3-13: Alignments der Proteinsequenzen der selektierten Affilin®-Varianten (Ausgangsvariante 129091).**

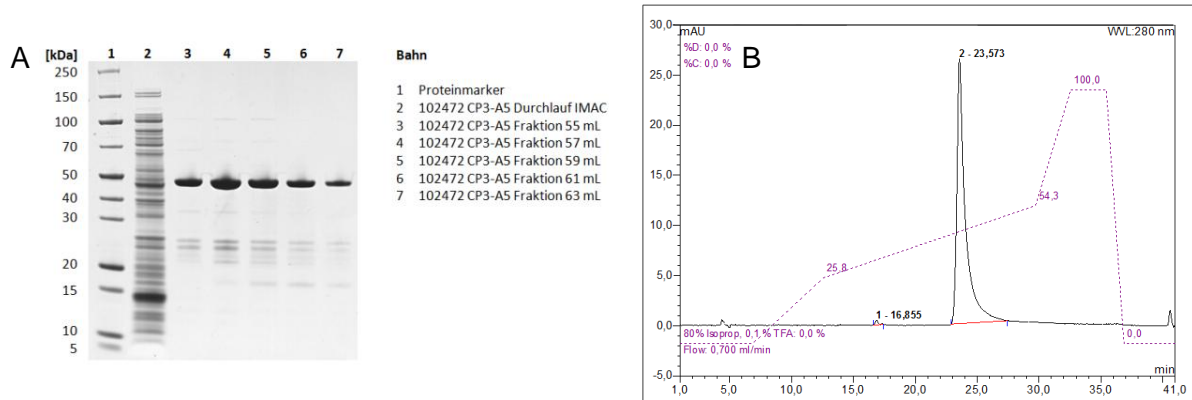
Alle selektierten eGFP-Fusionen wurden in *E. coli* BL21(DE3) im 1L-Maßstab hergestellt. Während des Zellaufschlusses wurden Proben zur Löslichkeitsanalyse mittels SDS-PAGE entnommen. Dabei zeigte sich eine vorwiegend unlösliche Proteinsynthese in Form von *inclusion bodies*. Um den Einfluss des C-terminal fusionierten eGFP untersuchen zu können, wurden zusätzlich die Elternvarianten und ein Ubiquitin-Dimer als eGFP-Fusion hergestellt. Auch bei diesen eGFP-Fusionen konnte eine stark unlösliche Proteinsynthese (80-90 %) beobachtet werden (Abbildung 8-1, Seite 127). Lediglich beim Ubiquitin-Dimer konnte eine Fusion mit etwa 50 % löslichen Protein-Anteil verzeichnet werden. Die Reinigung erfolgte über den C-terminalen His<sub>6</sub>-tag der Fusionen mittels IMAC (HisTrap HP) mit gekoppelter Gelfiltration (Abbildung 3-14, XK16/60 Superdex 75 *prep grade*) am ÄKTExpress System.



**Abbildung 3-14: Reinigung einiger selektierter Affilin®-eGFP-Fusionen mittels Gelfiltration.** Die Reinigung erfolgte nach dem Zellaufschluss über eine HisTrap HP-Säule. Die intern im ÄKTExpress-System gesammelten Elutionsfraktionen wurden anschließend direkt auf eine SEC (HiLoad XK16/60 Superdex 75 *prep grade*, Laufpuffer PBS pH 7,4) aufgetragen. Die Größe der Fraktionen betrug 2 mL. Im Vergleich ist jeweils die Elternvariante als Fusion dargestellt. Monomere Affilin®-eGFP-Fusionen wurden bei ca. 60 mL eluiert.

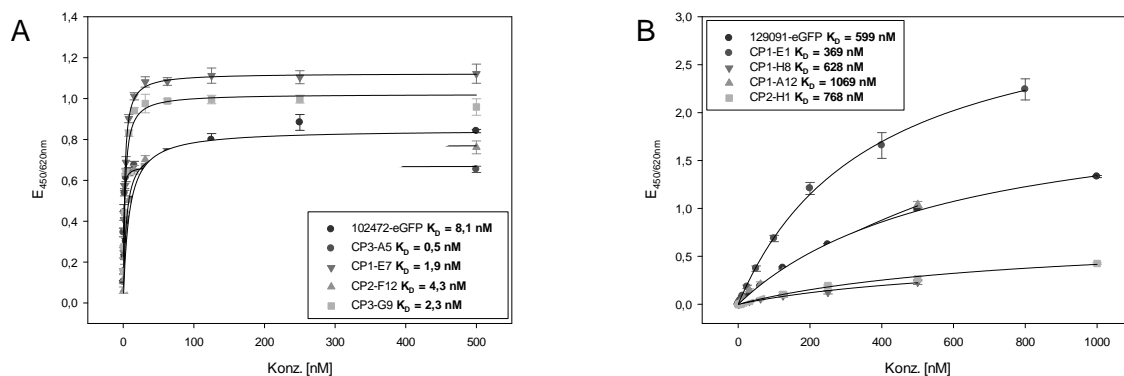
Bei allen Varianten waren deutlich Aggregate (Elutionsvolumen 40-55 mL) während der Reinigung zu erkennen. Die Abkömmlinge der Variante 102472 wiesen einen größeren Monomeranteil (bis auf zwei Ausnahmen 30 % bis 82 %, Tabelle 3-3) als das ursprüngliche Affilin® auf, bei den Abkömmlingen der Variante 129091 war das Gegenteil (0-22 %) zu beobachten (Auswahl siehe Abbildung 3-14).

Bei sechs Varianten konnten ausschließlich Aggregate festgestellt werden. Die Unterscheidung zwischen monomerer oder aggregathaltiger Probe wurde mittels SE-HPLC (Superdex 75 5/150 GL) durchgeführt. Die Reinheit wurde mittels rp-HPLC (PRLP-S, Kapitel 2.2.5.11) und SDS-PAGE untersucht (Abbildung 3-15). Im SDS-Gel der SEC-Fraktion waren schwache Nebenbanden erkennbar. In der rp-HPLC konnten Reinheiten von über 80 %, bis auf zwei Ausnahmen, ermittelt werden (Tabelle 3-3). Für die weitere Untersuchung hinsichtlich der Affinität waren die vorhandenen Reinheiten ausreichend.



**Abbildung 3-15: Analyse auf Verunreinigungen mittels SDS-PAGE bzw. Reinheit mittels rp-HPLC der Variante 102472 CP3-A5. (A)** Analytik der Gelfiltrationen mittels SDS-PAGE. Es wurden 4-12 % NuPage-Gradientengele verwendet und mit Coomassie-Färbung untersucht. Auf das Gel wurden jeweils 5 µL Probe bzw. Marker (PageRuler Unstained Broad Range Protein, Fermentas) aufgetragen. **(B)** rp-HPLC mit einer PLRP-S-Säule. Die Reinheit betrug über 99 %.

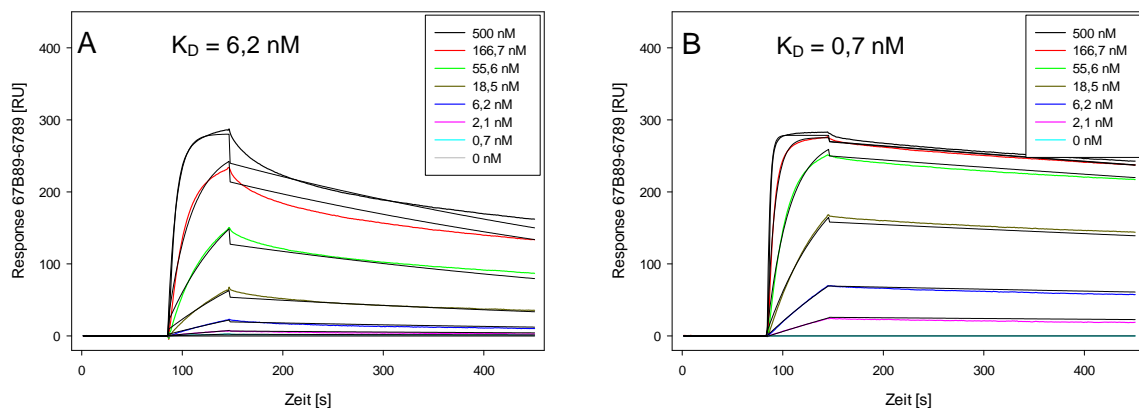
Insgesamt wurden Ausbeuten von unter 2,4 mg/L Kulturmedium bzw. 0,1-0,7 mg/g BFM verzeichnet (siehe Tabelle 3-3). Diese relativ geringen Werte korrelieren mit der Löslichkeitsanalyse, da vorwiegend Protein in *inclusion bodies* produziert wurde. Eine derartige Verschlechterung, auch in Hinblick auf die Aggregation, war ebenfalls bei den eGFP-fusionierten Elternvarianten und dem Wildtyp-Diubiquitin (WT) zu erkennen (Abbildung 8-1). Zum Vergleich dazu konnten aus einem Gramm Biofeuchtmasse 1,3 mg 129091 ohne eGFP-Fusion gereinigt werden.



**Abbildung 3-16: Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  der Affilin®-eGFP-Fusionen gegenüber dem Targetprotein 67B89\_T0 mittels konzentrationsabhängigen ELISA.** Das Target 67B89\_T0 wurde mit einer Konzentration von 5µg/mL auf eine Medisorp-Platte immobilisiert und mit einer Verdünnungsreihe der gereinigten Affilin®-Moleküle inkubiert. Der Nachweis erfolgte über den mit HRP-gekoppelten Antikörper Anti-Ubi-Fab-POD. Die TMB-Reaktion wurde nach 10 Minuten abgestoppt. Durch eine hyperbole Regression (durchgezogene Kurve) wurde der  $K_D$ -Wert berechnet. **(A)** 102472 als eGFP-Fusion bzw. **(B)** 129091 als eGFP-Fusion und einige ausgewählte Abkömmlinge.

Zur Untersuchung der Affinität gegenüber dem Targetprotein 67B89 wurde zunächst ein konzentrationsabhängiger ELISA (Abbildung 3-16) durchgeführt. Dazu wurde das Target mit einer Konzentration von 5 µg/mL auf Medisorp-Platten immobilisiert und anschließend mit einer Verdünnungsreihe der gereinigten Affilin®-eGFP-Fusionen inkubiert. Zur Kontrolle der Spezifität wurde zusätzlich das Kontrolltarget 6789 immobilisiert. Bei den Abkömmlingen der affineren Variante waren alle Bindeproteine sehr spezifisch, während die 129091-Abkömmlinge eine schwache Bindung an 6789 aufwiesen.

Zur genaueren Analyse der Targetbindung wurde eine SPR-Messung mittels Biacore 3000 (Kapitel 2.2.6.1) durchgeführt. Die Targetproteine 67B89 und 6789 wurden dazu auf einen SA-Chip immobilisiert und anschließend die eGFP-fusionierten Bindeproteine in verschiedenen Konzentrationen vermessen. Für die 102472-verwandten Proteine konnten die Ergebnisse des konzentrationsabhängigen ELISAs bestätigt werden. Auch mittels SPR war eine deutliche Steigerung der Affinität gegenüber der Elternvarianten zu erkennen. Vor allem die *off-rate* konnte um bis zu einer Zehnerpotenz verbessert werden (Abbildung 3-17). Für die eGFP-Fusion der Variante 129091 und deren verwandten Proteine konnte eine schwache Bindung festgestellt werden, die allerdings nicht zuverlässig ausgewertet werden konnte. Exemplarische Sensogramme sind im Anhang (Abbildung 8-2) zu finden. Als Kontrolle wurde bei jeder Analytik der eGFP-fusionierte Wildtyp (Diubiquitin) verwendet. Dabei konnte keine Bindung nachgewiesen werden (Anhang Abbildung 8-3). Eine vollständige Übersicht der Ergebnisse befindet sich im Anhang (Tabelle 8-1).

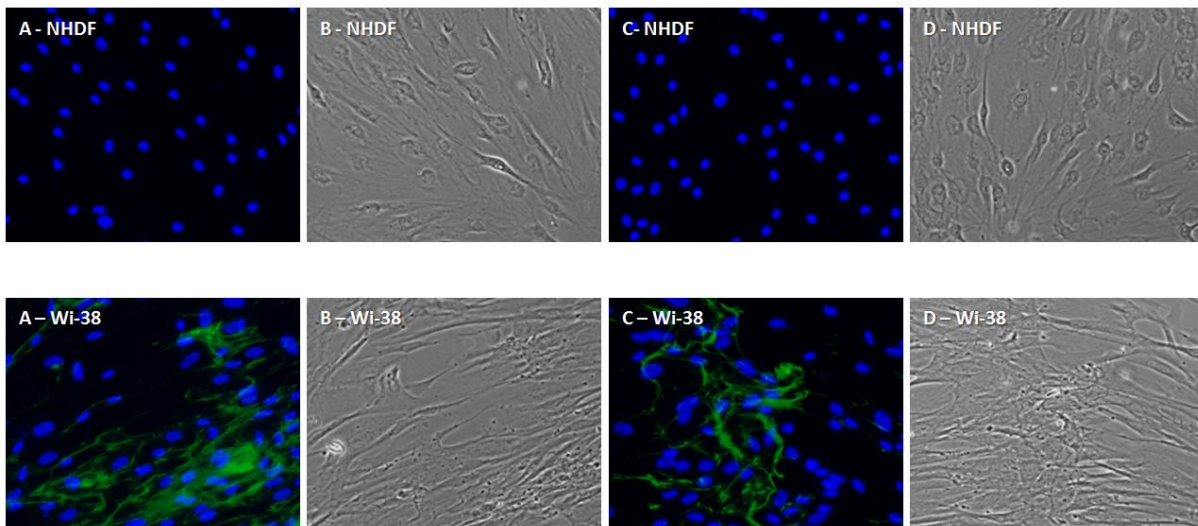


**Abbildung 3-17: SPR-Sensogramme der eGFP-fusionierten Variante 102472 (A) und dem Abkömmling CP3-A5 (B).** Auf einen SA-Chip wurden jeweils ca. 300 RU Targetproteine 67B89 bzw. 6789 immobilisiert und anschließend die zu untersuchenden Varianten in verschiedenen Konzentrationen vermessen. Die Assoziationsphase betrug 60 Sekunden, die Dissoziation wurde 300 Sekunden durchgeführt, bevor eine Regeneration mit 10 mM HCl erfolgte. Als Laufpuffer wurde PBS pH 7,4 mit 0,005% Tween 20 mit einem Fluss von 30 µL/min verwendet. Farbige Linien zeigen die Messdaten bei verschiedenen Affilin®-Konzentrationen. Schwarze Linien geben eine mittels Langmuir-Modell berechneten Fit wieder.

Eine Untersuchung der Bindung an ED-B-exprimierenden Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde freundlicherweise von A. Gräbe (Scil Proteins GmbH) durchgeführt. Dazu wurden zwei Affilin®-eGFP-Fusionen (CP3-A5 und CP2-F12) der Elternvariante 102472 verwendet. Der Nachweis der Bindung wurde auf Wi38-Zellen (ED-B-exprimierende humane Lungenfibroblasten (Borsi 1987)) durchgeführt, als Kontrollzelllinie kamen humane dermale Fibroblasten (NHDF- Zellen), die keine ED-B-Expression aufweisen, zum Einsatz. Die Zellen wurden nach Anleitung (siehe Kapitel 2.2.7.1) kultiviert, mit Methanol fixiert und anschließend mit den ausgewählten Affilin®-Molekülen inkubiert.



Auf Grund der C-terminalen eGFP-Fusion konnten die Proteine bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm visualisiert werden, ohne dass ein Einsatz von Antikörpern notwendig war. Eine Färbung der Zellkerne wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI durchgeführt. Die Kontrolle erfolgte mit der Diubiquitin-eGFP-Fusion und dem Affilin® 46877 ( $K_D=40$  pM). Da die Positivkontrolle 46877 nur einen Strep-tag II aufwies, musste der Nachweis mittels Antikörper erfolgen (primär: *rabbit anti-Strep-tag* IgG, sekundär: *goat anti-rabbit* IgG Alexa Fluor 488). Die Untersuchung der Kontrollen lieferte die erwarteten Ergebnisse (Anhang Abbildung 8-4). Beim Diubiquitin wurde keine Bindung detektiert, die Variante 46877 zeigte hingegen eine starke Bindung auf Wi-38-Zellen, jedoch nicht auf NHDF-Zellen. Die untersuchten 102472-Mutanten zeigten eine deutliche Bindung an Wi-38-Zellen (Abbildung 3-18). In den überlagerten Bildern der eGFP-Fluoreszenz und der blau gefärbten Zellkerne ist die typische Färbung der extrazellulären Matrix erkennbar, die bei der Präsentation von ED-B auf Wi-38-Zellen zu erwarten war. Eine unspezifische Bindung an NHDF-Zellen trat nicht auf. Im Vergleich mit der Referenz 46877 (Anhang, Abbildung 8-4) war bei den 102472-Abkömmlingen eine etwas schwächere Bindung erkennbar, was mit den  $K_D$ -Werten korrelierte. In den auflichtmikroskopischen Aufnahmen sind zudem die intakten Zellen deutlich sichtbar (Abbildung 3-18B bzw. D).



**Abbildung 3-18: Fluoreszenzmikroskopie der 102472-Abkömmlinge CP3-A5 (A, B) und CP2-F12 (C, D) als eGFP-Fusion.** ED-B-exprimierende Wi-38-Zellen und Kontrollzellen des Typs NHDF wurden kultiviert und mittels Methanol fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Affilin®-Konzentration von 50 nM für eine Stunde inkubiert. Der Nachweis erfolgte direkt über die Fluoreszenz der eGFP-Fusionen, die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff DAPI blau gefärbt. Zusätzlich wurden auflichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen angefertigt. Die Positiv- und Negativkontrolle ist in Abbildung 8-4 im Anhang dargestellt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass durch die Maturierung mittels *error-prone* PCR und anschließender Selektion im *ribosome display* für das Affilin® 102472 Varianten mit bis um Faktor 10 verbesserter Affinität gewonnen werden konnten. Der Nachweis einer Bindung wurde zusätzlich auf ED-B-präsentierenden Zellen erbracht. Bei den Abkömmlingen der Variante 129091 wurde die Affinität nicht deutlich gesteigert. Zudem trat eine höhere Aggregationstendenz auf (Abbildung 3-14), wodurch die Ausbeuten reduziert wurden. Alle untersuchten eGFP-Fusionen, einschließlich die der Elternvarianten und des Ubiquitin-Dimers, zeigten eine deutliche Tendenz zur Aggregation. Daher sollten nun jeweils vier Fusionen für eine Umklonierung ausgewählt werden, um Affilin®-Moleküle mit Strep-tag II ohne eGFP zu erzeugen (Tabelle 3-3).

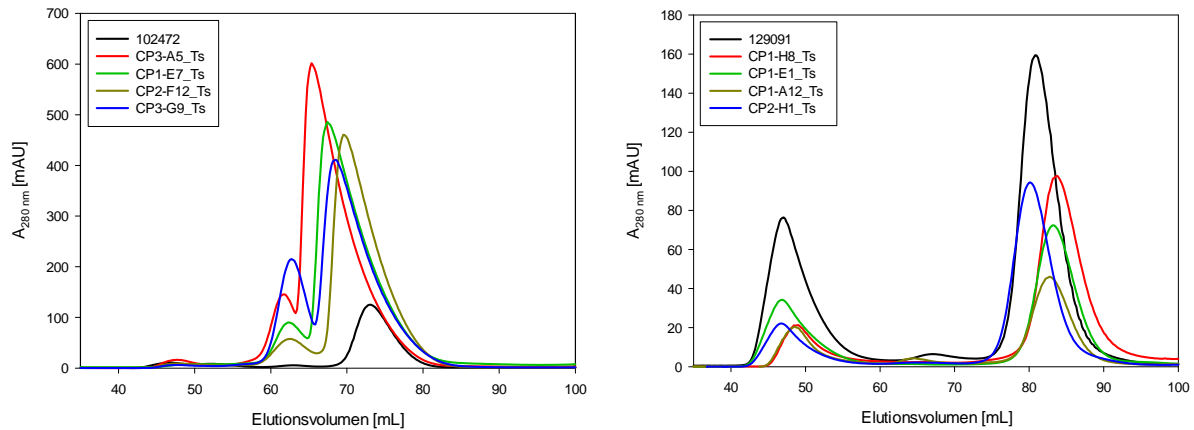
Tabelle 3-3: Ermittelte Eigenschaften von Affilin®-eGFP-Fusionen (vollständige Tabelle 8-1, Anhang)

Variante	Reinigung Monomer- anteil in Gelfiltration [%]	Analytik				Ausbeute	
		Reinheit SE- HPLC [%]	rp- HPLC [%]	K <sub>D</sub> -Wert SPR [nM]	K <sub>D</sub> -Wert ELISA [nM]	mg/L Kultur	mg/g BFM
136677 (Diubiquitin-eGFP)	66	100	98	Keine Bindung	Keine Bindung	8,8	1,8
102472-eGFP	20	100	86	6,2	8,1	0,3	0,1
CP3-A5	81	100	99	0,7	0,5	1,4	0,3
CP2-F12	75	100	95	1,2	4,3	2,2	0,6
CP3-G9	82	98	100	0,4	2,3	1,5	0,4
CP1-E7	56	100	80	0,2	1,9	1,3	0,3
129091-eGFP	20	100	83	n.a.	599	1,5	0,3
CP1-H8	22	90	-	-	682	0,2	0,1
CP1-E1	17	100	-	-	369	0,6	0,3
CP1-A12	7	100	-	-	1069	0,5	0,2
CP2-H1	17	98	-	-	768	0,8	0,2

### 3.3.5 Charakterisierung von maturierten Affilin®-Molekülen

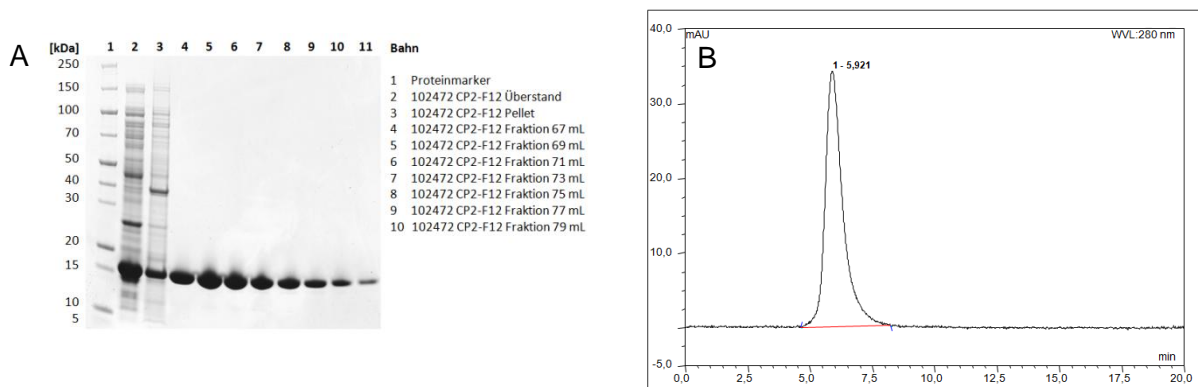
#### Herstellung maturierter Affilin®-Molekülen mit C-terminalen Strep-tag II ohne eGFP

Resultierend aus den Ergebnissen der Maturierung der eGFP-fusionierten Affilin®-Moleküle wurden je vier Varianten für eine Umklonierung ausgewählt (Tabelle 8-1). Das Ziel waren Affilin®-Varianten mit einem C-terminalen Strep-tag II ohne eGFP-Fusion. Die entsprechenden *inserts* der Plasmide wurden in einer PCR mittels Phusion HP Polymerase (Primer: Hubi-AA-rev-Bsa7, SPV-fw-Bsa) amplifiziert (siehe Kapitel 2.2.1.4) und anschließend mit BsaI verdaut. Der Vektor pPR-IBA1b wurde ebenfalls mit diesem Enzym verdaut. Anschließend erfolgte eine Ligation, deren Produkt mit dem MinElute Reaction Cleanup-Kit gereinigt wurde. Nach erfolgreicher Sequenzierung wurde die Herstellung in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Ebenso wie bei den eGFP-Fusionen wurden während des Zellaufschlusses Proben für eine Löslichkeitsanalyse mittels SDS-PAGE entnommen. Im Gegensatz zu den Fusionen erfolgte die Synthese vorwiegend als lösliche Proteine und nicht als *inclusion bodies* (Abbildung 3-20). Die Reinigung erfolgte über den C-terminalen Strep-tag II der Proteine an einem ÄKTexpress-System. Für die Affinitätschromatographie wurden Strep-Tactin Superflow Säulen verwendet, während für die gekoppelte Gelfiltration eine HiLoad XK16/60 Superdex 75 zum Einsatz kam. In der folgenden Abbildung 3-19 sind die Chromatogramme der Gelfiltration dargestellt. Bei allen Proteinen war der Anteil der Aggregate gegenüber der entsprechenden eGFP-Fusionen deutlich vermindert. Die Abkömmlinge der Variante 102472 zeigen jedoch eine leichte Tendenz zur Dimerbildung (Elutionsvolumen 60-65 mL). Das Elutionsverhalten der monomeren Proteine unterschied sich je nach Elternvariante recht stark. Während Abkömmlinge der 102472 bei einem Elutionsvolumen von ca. 65-80 mL eluiert wurden, verzögerte sich das Retentionsvolumen bei den 129091-Mutanten auf 75-90 mL. Diese Verzögerung trat ebenso in der SE-HPLC-Analytik (Säule: Superdex 75 5/150 GL) auf und beruht möglicherweise auf eine Interaktion mit der Säulenmatrix.



**Abbildung 3-19: Reinigung einiger selektierter Affilin®-Moleküle mittels Gelfiltration.** Die Reinigung erfolgte nach dem Zellaufschluss über eine Strep-Tactin Superflow-Säule. Die intern im ÄKTExpress-System gesammelten Elutionsfraktionen wurden anschließend direkt auf eine SEC (HiLoad XK16/60 Superdex 75 *prep grade*, PBS pH 7,4) aufgetragen. Die Größe der Fraktionen betrug 2 mL. Im Vergleich ist jeweils die Elternvariante mit Strep-tag II dargestellt.

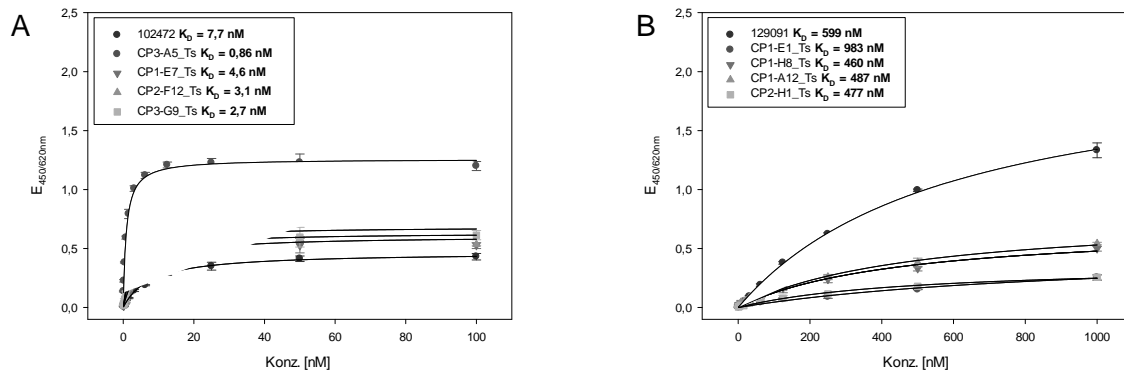
Zur Überprüfung auf Vorhandensein von Verunreinigungen wurden die Fraktionen der Gelfiltration mittels SDS-PAGE untersucht (Abbildung 3-20A). Zusätzlich wurden die Proben der Löslichkeitsanalyse aufgetragen. In Abbildung 3-20B ist exemplarisch ein Chromatogramm der SE-HPLC dargestellt. Bei allen Varianten wurde ein Monomerpeak von 100 % detektiert. Somit war keine Tendenz zur Aggregation oder Dimerisierung der monomeren Proteine erkennbar.



**Abbildung 3-20: Analyse der Gelfiltration mittels SDS-PAGE und SE-HPLC der Variante 102472 CP2-F12\_Ts. (A)** Analytik der Gelfiltrationen mittels SDS-PAGE. Auf das Gel wurden jeweils 5  $\mu$ L Probe bzw. Marker (PageRuler Unstained Broad Range Protein, Fermentas) aufgetragen. **(B)** SE-HPLC der vereinigten Fraktionen (Säule: Superdex 75 5/150 GL). Chromatogramm bei 280 nm. Die Wiederfindung betrug 84 %.

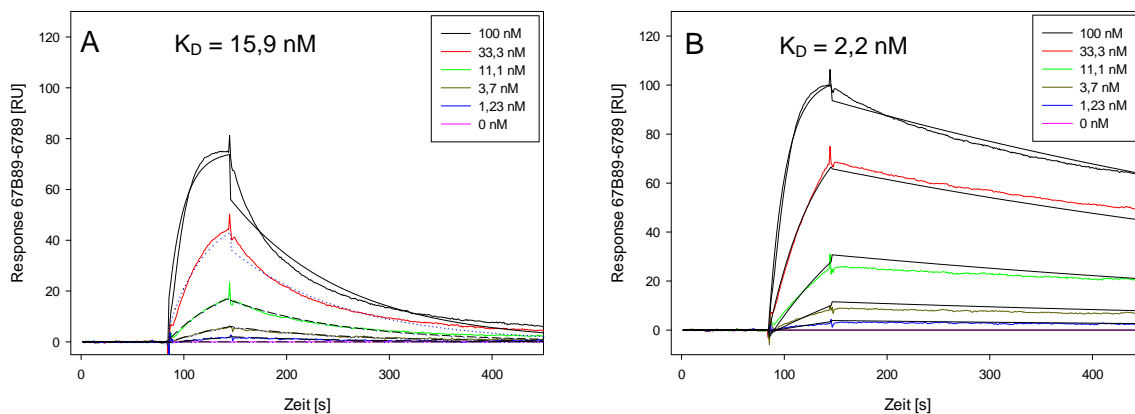
Gegenüber den eGFP-Fusionen konnten deutlich höhere Ausbeuten von bis zu 7,4 mg/g BFM bei den 102472-Abkömmlingen erzielt werden. 129091-verwandte Proteine erreichten jedoch nur bis zu 1,1 mg/g BFM (Tabelle 3-4). Diese Erhöhung war vorwiegend auf die verminderte Aggregationstendenz gegenüber den eGFP-Fusionen zurückzuführen.





**Abbildung 3-21: Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  der Affilin<sup>®</sup>-Moleküle mit Strep-tag II gegenüber dem Targetprotein 67B89\_T0 mittels konzentrationsabhängigen ELISA.** Das Target 67B89\_T0 wurde mit einer Konzentration von 5  $\mu$ g/mL auf eine Medisorp-Platte immobilisiert und mit einer Verdünnungsreihe der gereinigten Affilin<sup>®</sup>-Moleküle in Dreifachbestimmung inkubiert. Der Nachweis erfolgte über den mit HRP-gekoppelten Antikörper Anti-Ubi-Fab-POD. Die TMB-Reaktion wurde nach 10 Minuten abgestoppt. Durch eine hyperbole Regression (durchgezogene Kurve) wurde der  $K_D$ -Wert berechnet. **(A)** 102472 bzw. **(B)** 129091 und einige ausgewählte Abkömmlinge.

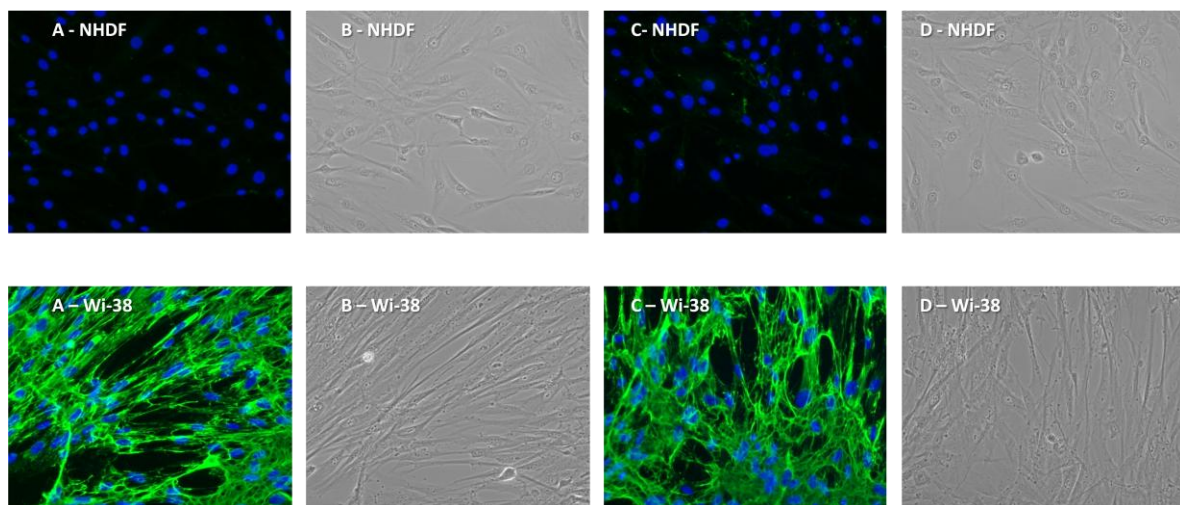
Zur Untersuchung der Affinität zum Targetprotein 67B89 wurde neben einem konzentrationsabhängigen ELISA (Abbildung 3-21) ebenso eine Messung mittels SPR durchgeführt. Für den ELISA wurde das Target 67B89 mit 5  $\mu$ g/mL bzw. das Kontrolltarget 6789 mit 4  $\mu$ g/mL auf einer Greiner medium binding 96-well-Platte immobilisiert und mit einer Verdünnungsreihe des gereinigten Affilin<sup>®</sup>-Moleküls inkubiert. Der Nachweis erfolgte mittels HRP-konjugierten Anti-Ubi-Fab-Antikörper. Hinsichtlich der Spezifität verhielten sich die Proteine analog zu den eGFP-Fusionen. Die 129091-verwandten Affilin<sup>®</sup>-Moleküle wiesen eine schwache Bindung an 6789 auf, während die Abkömmlinge der Variante 102472 keine Bindung an das Kontrollprotein zeigten. Auch die  $K_D$ -Werte waren mit denen der eGFP-Fusionen vergleichbar.



**Abbildung 3-22: SPR-Sensogramme der Variante 102472 (A) und des Abkömmlings CP2-F12\_Ts (B).** Auf einen SA-Chip wurden jeweils ca. 300 RU vom Targetprotein 67B89 bzw. der Kontrolle 6789 immobilisiert und anschließend die zu untersuchenden Varianten in verschiedenen Konzentrationen vermessen. Die Assoziationsphase betrug 60 Sekunden, eine Dissoziationsphase wurde 300 Sekunden durchgeführt, bevor eine Regeneration mit 10 mM HCl erfolgte. Als Laufpuffer wurde PBS pH 7,4 mit 0,005% Tween 20 mit einem Fluss von 30  $\mu$ L/min verwendet. Farbige Linien zeigen die Messdaten bei verschiedenen Affilin<sup>®</sup>-Konzentrationen. Schwarze Linien geben eine mittels Langmuir-Modell berechneten Fit wieder.

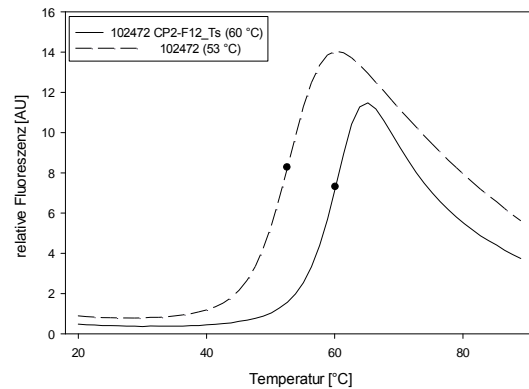
Zusätzlich wurde die Affinität mittels SPR-Messung (Biacore 3000) untersucht. An einen SA-Chip wurden die Targetproteine 67B89 und 6789 immobilisiert und anschließend die Affilin®-Varianten analysiert. Ebenso wie die Ergebnisse des ELISAs korrelierten die Daten der SPR-Messung mit denen der eGFP-Fusionen. Für das Affilin® 129091 und deren Abkömmlinge konnte nur eine sehr schwache Bindung ermittelt, jedoch nicht ausgewertet werden. In Abbildung 3-22 sind exemplarisch Sensogramme der Variante 102472 und der Tochtervariante CP2-F12\_Ts dargestellt. Bei diesen Abkömmlingen wurde eine deutliche Verbesserung des  $K_D$ -Wertes und eine Verringerung der Dissoziationsrate  $k_{off}$  festgestellt. Eine vollständige Zusammenfassung befindet sich in Tabelle 3-4.

Eine weitere Untersuchung hinsichtlich der Bindung wurde auf ED-B-exprimierenden Wi-38-Zellen (Kontrollzellen: NHDF) mittels Fluoreszenzmikroskopie von Dr. M. Gloser (Scil Proteins) durchgeführt. Für diese Analyse wurden die Abkömmlinge 102472 CP2-F12\_Ts und 102472 CP3-A5\_Ts ausgewählt. Die Kultivierung der Zellen wurde wie in Kapitel 2.2.7.1 beschrieben durchgeführt. Der Nachweis erfolgte über den C-terminalen Strep-tag II der Varianten mit zwei Antikörpern (primär: *rabbit* anti-Strep-tag IgG, sekundär: *goat* anti-*rabbit* IgG Alexa Fluor 488). Die Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. Die zwei ausgewählten Varianten zeigten eine starke Bindung an Wi-38-Zellen. Auch die typische Färbung der extrazellulären Matrix war deutlich zu erkennen. Im Vergleich mit den eGFP-Fusionen (Abbildung 3-18) trat eine stärkere Färbung auf. Dies kann in der höheren Sensitivität der Antikörper gegenüber der Eigenfluoreszenz des eGFPs bedingt sein.



**Abbildung 3-23: Fluoreszenzmikroskopie ausgewählter 102472-Mutanten CP3-A5\_Ts (A, B) und CP2-F12\_Ts (C, D).** ED-B-exprimierende Wi-38-Zellen und die Kontrollzellen NHDF wurden kultiviert und mittels Methanol fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit den Varianten (50 nM) für eine Stunde inkubiert. Der Nachweis erfolgte über zwei Antikörper (*rabbit* anti-Strep-tag IgG, *goat* anti-*rabbit* IgG Alexa Fluor 488). Die Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt. Zusätzlich wurden auflichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen angefertigt.

Zur Untersuchung der Thermostabilität der maturierten Affilin®-Moleküle wurde eine DSF-Messung (Kapitel 2.2.6.3) mit dem Farbstoff Sypro® Orange durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde Lysozym verwendet. Bei den 129091-Abkömmlingen wurde keine höhere Thermostabilität gegenüber der Elternvariante ermittelt. In der Abbildung 3-24 sind exemplarisch die Übergangskurven der Affilin®-Varianten 102472 und 102472 CP2-F12\_Ts dargestellt. Der Wendepunkt der Kurve stellt den Schmelzpunkt der Proteine dar. Für die 102472-Abkömmlinge trat eine Erhöhung des Schmelzpunktes bis auf 60 °C auf (Elternvariante 53 °C).



**Abbildung 3-24: DSF-Messung der Elternvariante 102472 (durchbrochene Linie) und der Variante 102472 CP2-F12\_Ts (durchgezogene Linie).** 5 µg Protein wurde mit 10x Sypro® Orange (Stammlösung 5000x, keine genauere Herstellerangabe) versetzt. Der Temperaturübergang wurde bei einer Heizrate von 1 K/min in einem LightCycler® 480 ermittelt. Die Anregung des Farbstoffes fand bei 465 nm statt, die Emission bei 580 nm.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 3-4 dargestellt. Im Vergleich zu den eGFP-Fusionen wurden deutlich höhere Ausbeuten erzielt. Daraus kann geschlossen werden, dass die Aggregationstendenz während der Reinigung nicht vom Affilin®, sondern von der eGFP-Fusion hervorgerufen wurde. Für die Variante 102472 ( $K_D = 15,9$  nM;  $T_m = 53$  °C; 0,7 mg/g BFM) konnten Abkömmlinge mit stark verbesserten  $K_D$ -Werten bis in den subnanomolaren Bereich gewonnen werden. Auch hinsichtlich der Thermostabilität (bis 60 °C) und der Ausbeute (bis 7,4 mg/g BFM) zeigten sich gute Verbesserungen. In Bezug auf die Elternvariante 129091 wurde keine deutliche Steigerung der Affinität, der Herstellbarkeit oder der Thermostabilität erzielt.

**Tabelle 3-4: Zusammenfassung der Eigenschaften von maturierten Affilin®-Molekülen und Elternvarianten mit Strep-tag II**

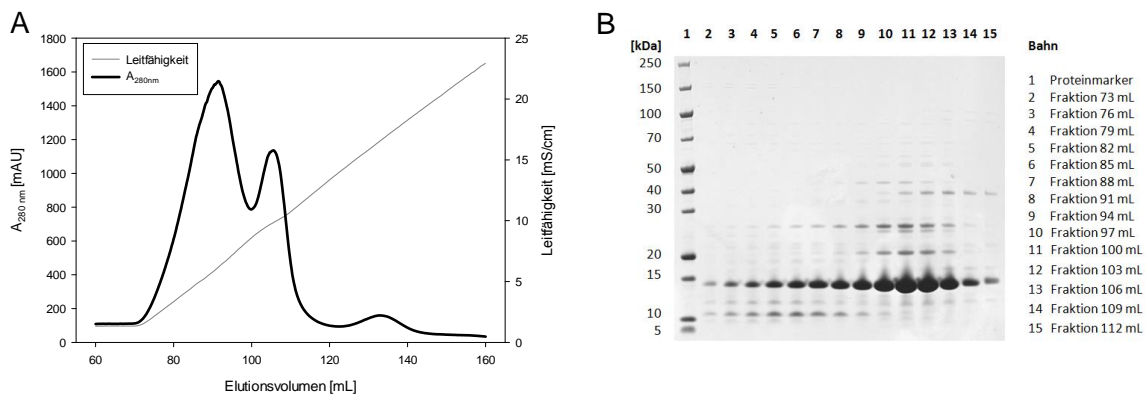
Variante	Reinigung Monomer- anteil in SEC [%]	Reinheit SE-HPLC [%]	Analytik			Ausbeute	
			$T_m$ DSF [°C]	$K_D$ SPR [nM]	$K_D$ ELISA [nM]	mg/L Kultur	mg/g BFM
102472	84	100	53	15,9	7,7	4,2	0,7
CP3-A5_Ts	87	100	60	0,9	0,86	17,4	5,0
CP1-E7_Ts	90	100	56	0,34	4,6	13,8	2,3
CP2-F12_Ts	91	100	60	2,2	3,1	14,7	7,4
CP3-G9_Ts	77	100	58	1,1	2,7	11,9	3,2
129091_Ts	66	100	59	n.a.	414	3,2	1,3
CP1-H8_Ts	88	100	55	n.a.	460	2,3	1,1
CP1-E1_Ts	68	100	58	n.a.	983	2,0	1,1
CP1-A12_Ts	61	100	56	n.a.	487	0,9	0,3
CP2-H1_Ts	85	100	58	n.a.	477	2,2	0,8

Somit ist festzuhalten, dass die Maturierungsstrategie für das Affilin® 102472 erfolgreich war, jedoch nicht für die Variante 129091. Auf Grund der Daten wurden für das weitere Vorgehen zwei 102472-  
verwandte Proteine (CP2-F12\_Ts und CP3-A5\_Ts) ausgewählt. Als nächsten Schritt wurden diese beiden Affilin®-Moleküle ohne Affinitäts-tag für Kristallisationsversuche hergestellt.

### Herstellung maturierter Affilin®-Molekülen ohne Affinitäts-tag

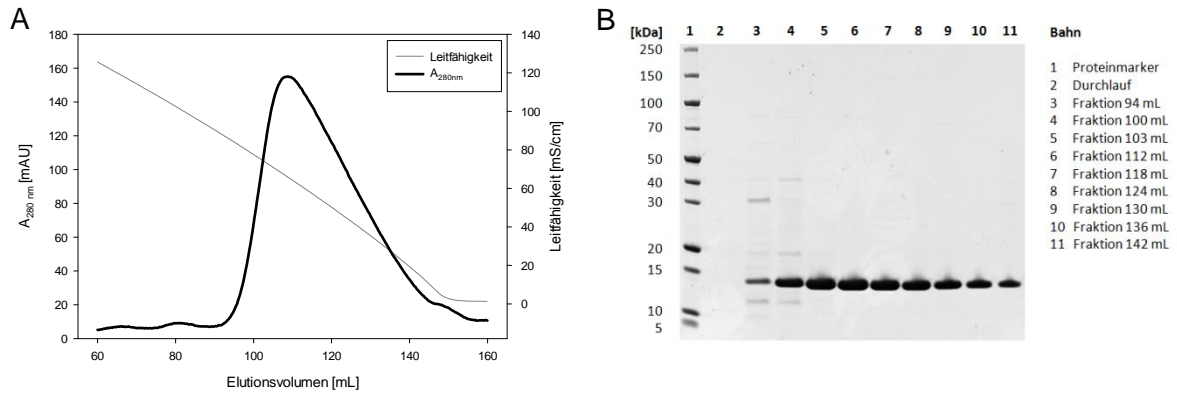
Für die Klonierung der zwei ausgewählten Affilin®-Varianten zur Herstellung ohne Affinitäts-tag wurden die Plasmide der eGFP-Fusionen in einer PCR (Primer: SPV-fw-Nde, SPF-AA-StopXho) amplifiziert. Anschließend wurden sowohl die PCR-Produkte als auch der Zielvektor pET-20bDoSto mit den Enzymen NdeI und XhoI geschnitten und anschließend mit dem QuickLigation Kit ligiert. Zunächst wurden *E. coli* XL1Blue(DE3) mit den Plasmiden transformiert und die entstandenen Kolonien einer *single colony* PCR unterzogen bevor eine Auswahl sequenziert wurde. Mit positiven Plasmiden wurde anschließend der Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Für die Konstrukte wurden neue Bezeichnungen eingeführt. Die Variante 102472 CP2-F12 ohne tag bekam die Identifikationsnummer 138809, während die Variante 102472 CP3-A5 ohne tag im Folgenden als 138810 bezeichnet wird.

Nach der Proteinsynthese erfolgte der Zellaufschluss mittels Ultraschall. Anschließend wurde das Lysat über einen Anionenaustauscher gereinigt. Dabei wurde eine HiTrap Q-FF 5 mL Säule mit einem Fluss von 4 mL/min verwendet. Die ausführliche Reinigung ist in Kapitel 2.2.5.7 beschrieben. In Abbildung 3-25 ist ein Ausschnitt des Chromatogramms sowie die SDS-PAGE-Analytik der Fraktionen exemplarisch für das Affilin® 138809 dargestellt. Die Variante 138810 zeigte ein sehr ähnliches Bild. Das Zielprotein wurde in zwei Peaks eluiert. Da Vorversuche jedoch zeigten, dass sich in der anschließenden Reinigung und Analytik die Proteine gleich verhielten, wurden beide Peaks vereinigt.



**Abbildung 3-25: Reinigung der Variante 138809 mittels Anionenaustauscher.** Die Reinigung erfolgte nach dem Zellaufschluss über eine HiTrap Q-FF mit folgenden Parametern: Puffer A: 20 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0; Puffer B: 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl pH 8,0; 4 mL/min, Gradient 0 auf 100 %B in 40 CV. **(A)** Ausschnitt des Chromatogramms. **(B)** SDS-PAGE der Fraktionen. Der Pool entsprach dem Elutionsvolumen 76-112 mL.

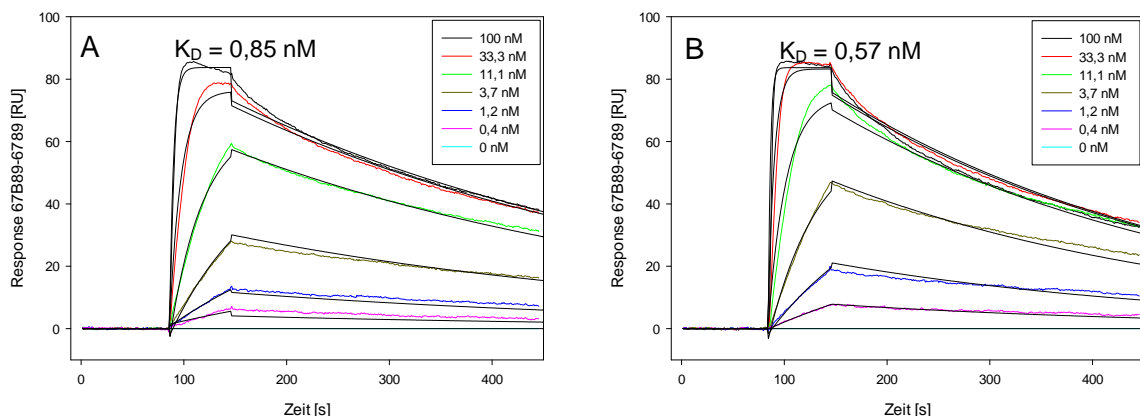
Anschließend wurde das Eluat auf eine Salzkonzentration von 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gebracht, um diese direkt auf eine hydrophobe Interaktionschromatographie-Säule (Phenyl HP) zu geben. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 100 %B (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 8,0) auf 0 %B (20 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0) innerhalb von 20 CV. Das Chromatogramm sowie die SDS-PAGE ist in Abbildung 3-26 dargestellt. Die vereinigten Fraktionen (103-142 mL) wiesen keine deutlichen Nebenbanden in der SDS-PAGE auf, so dass auf einen finalen Gelfiltrationsschritt verzichtet wurde. Die Proteinlösung wurde mittels Amicon Röhrcchen eingengt und gegen PBS pH 7,4 dialysiert. Mit dieser Reinigungsstrategie wurde für die Variante 138809 eine Ausbeute von 8,5 mg/g BFM (48,5 mg/L Kultur) und für die Variante 138810 von 5,9 mg/g BFM (28 mg/L Kultur) gewonnen.



**Abbildung 3-26: Reinigung der Variante 138809 mittels HIC.** Die Reinigung erfolgte nach dem Aufsätzen der Probe (Endkonzentration 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) über eine HiTrap Phenyl HP 5 mL-Säule mit folgenden Parametern: Puffer A: 20 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0; Puffer B: 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 8,0; 4 mL/min, Gradient 100 %  $\rightarrow$  0 % B in 20 CV. **(A)** Ausschnitt des Chromatogramms. **(B)** SDS-PAGE der Fraktionen, der Pool entsprach dem Elutionsvolumen 103-142 mL.

Die gereinigten Proteine wurden zunächst mittels SE-HPLC (Superdex 75) untersucht. Es war weder eine Aggregationstendenz noch das Vorhandensein von Oligomeren zu verzeichnen (Tabelle 3-5). Um die Lagerstabilität zu untersuchen, wurde je eine Probe einem Gefrier-Tau-Zyklus unterzogen. Die resultierenden Chromatogramme waren deckungsgleich mit denen der nicht eingefrorenen Proben. Zur weiteren Charakterisierung wurde die Thermostabilität untersucht. Wie bereits bei den Affilin®-Molekülen mit Strep-tag II wurde eine DSF-Messung mit dem Farbstoff Sypro® Orange durchgeführt. Für beide Proteine konnte ein Wert von 62 °C ermittelt werden. Zusätzlich wurde eine Farbstoff-freie Messung am Fluorimeter durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.6.3). Dabei wurde für die Affilin®-Varianten 138809 bzw. 138810 eine Temperatur von 70 °C bzw. 71 °C ermittelt (Abbildung 3-32).

Des Weiteren wurde die Affinität gegenüber dem Targetprotein 67B89 mittels SPR (Biacore 3000, Sensorchip SA) analysiert. Dabei wurden  $K_D$ -Werte von 0,57 nM (138810) bzw. 0,85 nM (138809) ermittelt (siehe Abbildung 3-27). Auch bei dieser Untersuchung wurden Proben bei -20 °C eingefroren und anschließend erneut analysiert ohne eine Verringerung der Aktivität zu erhalten.



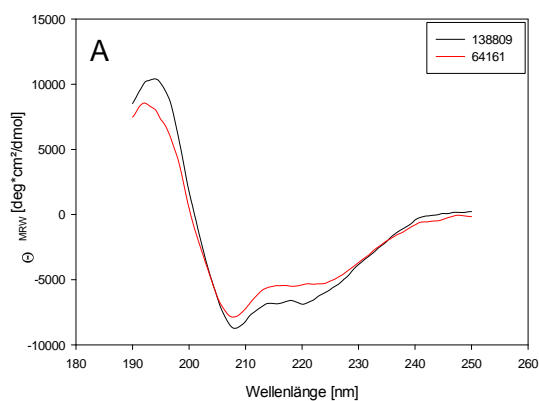
**Abbildung 3-27: SPR-Sensogramme der Varianten 138809 (A) und 138810 (B).** Auf einen SA-Chip wurden jeweils ca. 300 RU vom Targetprotein 67B89 bzw. der Kontrolle 6789 immobilisiert und anschließend die zu untersuchenden Varianten in verschiedenen Konzentrationen vermessen. Die Assoziationsphase betrug 60 Sekunden, die Dissoziation wurde 300 Sekunden durchgeführt, bevor eine Regeneration mit 10 mM HCl erfolgte. Als Laufpuffer wurde PBS pH 7,4 mit 0,005% Tween 20 mit einem Fluss von 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  verwendet. Farbige Linien zeigen die Messdaten bei verschiedenen Affilin®-Konzentrationen. Schwarze Linien geben eine mittels Langmuir-Modell berechneten Fit wieder.

**Tabelle 3-5: Zusammenfassung der Eigenschaften maturierter Affilin®-Moleküle mit und ohne Strep-tag II und die Elternvariante 102472**

Variante	Reinheit SE-HPLC [%]	T <sub>m</sub> DSF [°C]	SPR (Biacore)			Ausbeute	
			K <sub>D</sub> [nM]	k <sub>on</sub> [1/Ms]	k <sub>off</sub> [1/s]	mg/L Kultur	mg/g BFM
102472	100	53	15,9	5,69·10 <sup>5</sup>	9,02·10 <sup>-3</sup>	4,2	0,7
CP3-A5_Ts	100	60	0,9	1,63·10 <sup>6</sup>	1,51·10 <sup>-3</sup>	17,4	5,0
CP2-F12_Ts	100	60	2,2	5,85·10 <sup>5</sup>	1,27·10 <sup>-3</sup>	14,7	7,4
CP3-A5_T0 (138810)	92	62	0,57	4,8·10 <sup>6</sup>	2,8·10 <sup>-3</sup>	28,0	5,9
CP2-F12_T0 (138809)	100	62	0,85	2,6·10 <sup>6</sup>	2,2·10 <sup>-3</sup>	48,5	8,5

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 3-5 gegeben. Insgesamt ist eine deutliche Steigerung der Affinität ( $K_D < 1$  nM) zum Targetprotein 67B89 gegenüber der Elternvariante (15,9 nM) zu verzeichnen. Auch hinsichtlich der Thermostabilität (53 °C auf 62 °C) und der Ausbeuten (0,7 mg/g BFM auf über 5 mg/g BFM) wurden Verbesserungen erzielt. Somit kann die durchgeführte Maturierung als erfolgreich betrachtet werden.

Auf Grund der eingebrachten Mutationen durch die *error-prone* PCR bestand die Möglichkeit, dass die Struktur des Affilin®-Moleküls verändert wurde und nicht mehr die typische Ubiquitin-Faltung aufwies. Um dies zu untersuchen wurde eine CD-spektroskopische Messung (siehe Kapitel 2.2.6.2) durchgeführt. Im Vorfeld wurde die Variante 138809 und ein Di-Ubiquitin mit GIG-Linker (64161) mit eine PD10-Säule umgepuffert (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7). Die Messung erfolgte in einer Küvette mit 0,01 cm Schichtdicke in einem Jasco J810-Spektrometer. Die ermittelten Daten wurden mit der *smoothing* Methode von Savitzky Golay (Savitzky 1964) geglättet und nach Blankabzug mit Formel 2-4 umgerechnet und graphisch dargestellt (Abbildung 3-28). Die Berechnung der Sekundärstrukturanteile wurde gegenüber der Referenz von J. T. Yang (Yang 1986) mit der zum Gerät zugehörigen Software durchgeführt. Daraus ist ersichtlich, dass das Affilin® trotz der eingeführten Mutationen und zwei Deletionen weiterhin eine Ubiquitin-ähnliche Struktur aufweist.



Sekundärstruktur	138809	64161
Helix	26 %	26 %
β-sheet	43 %	35 %
turn	6 %	9 %
random	25 %	30 %

**Abbildung 3-28: (A) Fern-UV-CD-Spektrum der Affilin®-Variante 138809 (schwarz) und des Di-Ubiquitins 64161 (rot) sowie (B) die Sekundärstrukturanteile.** Die Spektren wurden in einer 0,01 cm-Küvette bei 20 °C aufgenommen und Puffer-korrigiert (10 mM Natriumphosphat pH 7,0). Es wurden jeweils 30 Spektren akkumuliert und mittels Savitzky-Golay-Filter geglättet.



### 3.3.6 Einfluss einzelner Mutationen auf die Elternvariante 102472

Im Folgenden sollte der Einfluss der zusätzlichen Mutationen, welche die in Kapitel 3.3.5 untersuchten Affilin®-Moleküle 138809 und 138810 aufwiesen, auf die Affinität untersucht werden. Die Variante 138809 hatte zwei Mutationen P38Q und Y144F, sowie eine Deletion Del78I im Linker. Alle anderen Varianten, die im *screening* ausgewählt wurden (Abbildung 3-12), wiesen den Doppelaustausch M80I, I82T. Da diese Varianten sehr ähnliche Bindungseigenschaften aufwiesen und die einzige Sequenzübereinstimmung in dem genannten Doppelaustausch lag, wurde vermutet, dass dieser einen großen Einfluss hat. Daher wurde neben den drei Mutationen der Variante 138809 noch der Doppelaustausch in die Elternvariante eingeführt. Dazu wurde eine PCR auf dem Plasmid der Variante 102472 mit den entsprechenden *quickchange*-Primern (Tabelle 2-19) durchgeführt. Nach der Sequenzierung wurde neue Bezeichnungen für die entstandenen Varianten vergeben.

**Tabelle 3-6: Bezeichnung der Affilin®-Varianten entstanden durch Punktmutationen in 102472**

Bezeichnung	Mutation
140355	P38Q
140356	Y144F
140357	Del78I
140358	M80I, I82T

Die erzeugten Varianten wurden in *E. coli* BL21(DE3) hergestellt. Nach der Ernte der Biomasse und dem Zellaufschluss mittels Ultraschall (Kapitel 2.2.5.1), erfolgte die Reinigung über den C-terminalen Strep-tag II (Kapitel 2.2.5.6) mit anschließender Gelfiltration (XK16/600 Superdex 75). Alle Proteine konnten in ausreichenden Mengen hergestellt und analysiert werden. Zunächst wurden SE-HPLC-Messungen durchgeführt, um die Anteile an Monomer bzw. die Reinheit mittels rp-HPLC zu analysieren. Danach schloss sich die Untersuchung der Affinität mittels ELISA (Kapitel 2.2.5.16) und SPR (Kapitel 2.2.6.1) an. Die zusammengefassten Ergebnisse sind der Tabelle 3-7 zu entnehmen. Aus den vorliegenden Daten kann geschlossen werden, dass ein großer Einfluss von der Linkerdeletion der Variante CP2-F12 (ohne tag: 138809) ausgeht und die anderen zwei Mutationen nur einen geringeren Einfluss hinsichtlich der Affinität ausüben. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Doppelaustausch M80I, I82T die Affinität sehr stark verbesserte.

**Tabelle 3-7: Zusammenfassung der Eigenschaften der Affilin®-Moleküle mit Einzelmutationen im Vergleich mit den Varianten 102472, CP2-F12\_Ts und CP3-A5\_Ts**

Variante	Reinheit HPLC		K <sub>D</sub> ELISA [nM]	SPR (Biacore)			Ausbeute	
	SE [%]	rp [%]		K <sub>D</sub> [nM]	k <sub>on</sub> [1/Ms]	k <sub>off</sub> [1/s]	mg/L Kultur	mg/g BFM
102472	100	-	7,7	15,9	5,69·10 <sup>5</sup>	9,02·10 <sup>-3</sup>	4,2	0,7
CP3-A5_Ts	100	-	0,9	0,9	1,63·10 <sup>6</sup>	1,51·10 <sup>-3</sup>	17,4	5,0
CP2-F12_Ts	100	-	3,1	2,2	5,85·10 <sup>5</sup>	1,27·10 <sup>-3</sup>	14,7	7,4
140355 (P38Q)	100	100	4,7	7,9	1,77·10 <sup>6</sup>	1,40·10 <sup>-2</sup>	6,2	2,6
140356 (Y144F)	100	100	2,7	5,4	2,00·10 <sup>6</sup>	1,09·10 <sup>-2</sup>	7,5	2,8
140357 (Del78I)	100	100	2,9	2,4	2,23·10 <sup>6</sup>	5,38·10 <sup>-3</sup>	13,3	5,8
140358 (M80I, I82T)	98	100	2,3	0,49	5,04·10 <sup>6</sup>	2,50·10 <sup>-3</sup>	6,8	3,0

### 3.4 Fusion von Affilin®-Molekülen mit Interleukin-2

Nach der Charakterisierung der zwei final ausgewählten Affilin®-Moleküle 138809 und 138810 sollten diese mit Interleukin-2 C-terminal über einen dreifachen SSSSG-Linker (S<sub>4</sub>G) fusioniert und bezüglich der Herstellbarkeit und Aktivität der Fusionen untersucht werden. Als Kontrollprotein wurde ein Ubiquitin-Dimer als Fusion mit Interleukin-2 hergestellt. Das verwendete Interleukin-2 besaß die Punktmutation C125S und somit nur zwei Cysteine für die Ausbildung der Disulfidbrücke. Die Entfernung des dritten freien Cysteins ist in der Literatur beschrieben und beeinflusst die Aktivität des Interleukins nicht (Doyle 1985; Boone 1988). Da freie Cystein-Reste die Proteinfaltung negativ beeinflussen können, wurde das dritte Cystein im Interleukin durch ein Serin ersetzt.

Die Gene wurden bei der Firma GeneArt (Regensburg, D) als *strings*, bestehend aus der Affilin®-Variante mit C-terminalen dreifachen S<sub>4</sub>G-Linker und Interleukin-2 (C125S-Mutante), bestellt. Nach Verdau mit dem Enzym BsaI-HF wurden die DNA-Fragmente mit dem ebenso geschnittenen Vektor pET28aS ligiert. Der im Vektor enthaltene Strep-tag II entfiel bei dieser Klonierungsstrategie, so dass das Endprodukt keinen Affinitäts-tag aufwies.

Das Kontrollprotein lag bereits firmenintern als Wildtyp-Affilin®-Fusion mit dreifachen S<sub>4</sub>G-Linker und Interleukin-2 im Vektor pET20b(DoSto) vor. Auf diesem Plasmid wurde eine *quickchange*-PCR (Primer WH-IL2-C125S-fw, WH-IL2-C125S-rev, *annealing*-Temperatur 55 °C, Pfu-Polymerase) durchgeführt, um die C125S-Punktmutation in das Interleukin-2 einzuführen. Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden neue Bezeichnung für die Konstrukte vergeben (Tabelle 3-8).

Um die Literaturangaben bezüglich der Punktmutation zu überprüfen, wurden die Affilin®-Fusionen zusätzlich mit dem dritten Cystein durch eine *quickchange*-PCR (Primer QC-IL2-S125C-fw, QC-IL2-S125C-rev, *annealing*-Temperatur, Phusion-Polymerase) erzeugt.

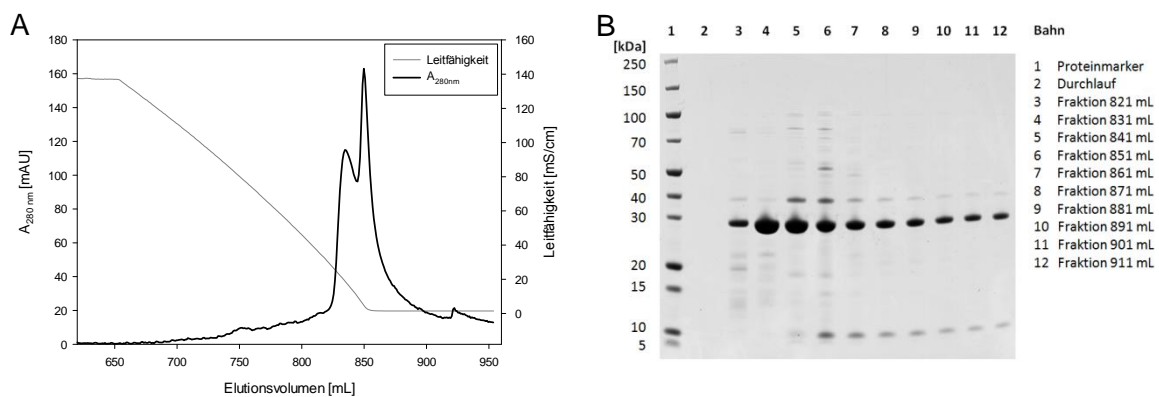
**Tabelle 3-8: Bezeichnung der Affilin®-Varianten entstanden durch Punktmutationen in 102472**

Bezeichnung	Konstrukt
118687	Ubiquitin-Dimer-(S <sub>4</sub> G)x3-IL2 C125S
138812	CP2-F12-(S <sub>4</sub> G)x3-IL2 C125S
138813	CP3-A5-(S <sub>4</sub> G)x3-IL2 C125S
139260	CP2-F12-(S <sub>4</sub> G)x3-IL2
139261	CP3-A5-(S <sub>4</sub> G)x3-IL2

Zunächst wurde ein Expressionstest mit der Diubiquitin-IL-2-Fusion 118687 in 100 mL 2x YT-Medium durchgeführt. Dazu wurden verschiedene *E. coli*-Stämme (BL21(DE3), NovaBlue(DE3), JM108 und HMS174(DE3)) und Temperaturabsenkungen zum Induktionszeitpunkt auf 30 °C, 34 °C bzw. 37 °C verwendet. Die Induktionszeit betrug fünf Stunden. Aus der Wachstumskurve war allerdings ersichtlich, dass bereits nach vier Stunden nur noch eine sehr geringe Zunahme stattfand. Die vor Induktion und nach vier Stunden (Gesampellet, sowieso Überstand und Pellet nach Zellaufschluss mit Lysozym) entnommenen Proben wurden auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Dabei konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Bakterienstämmen und den verschiedenen Temperaturen festgestellt werden. Daher wurden als finale Parameter eine Induktionszeit von vier Stunden bei 37 °C und *E. coli* BL21(DE3), auf Grund der höheren Biomasseausbeute, festgelegt.



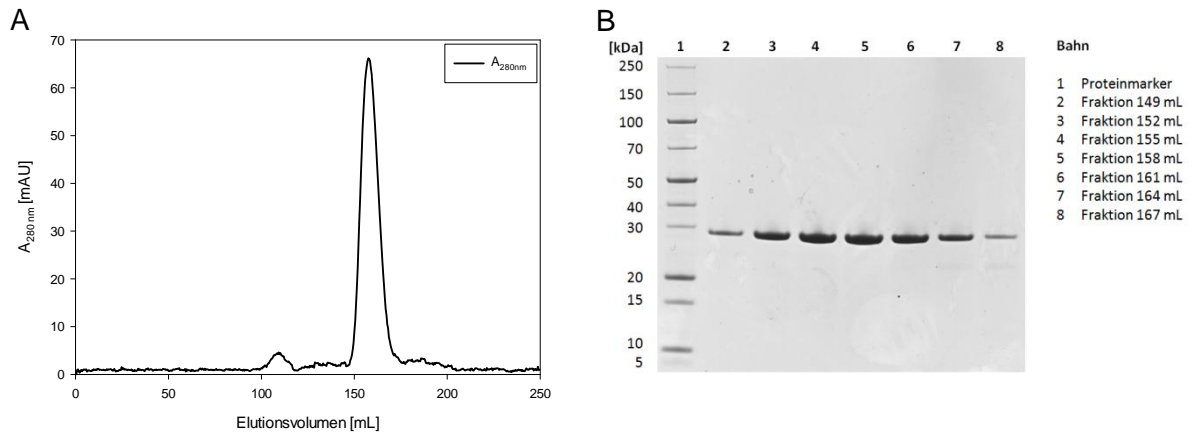
Da die Zielproteine vorwiegend in unlöslicher Form in den *E. coli*-Zellen vorlagen, wurde die Reinigung der drei Fusionen aus *inclusion bodies* untersucht. Nach dem Zellaufschluss wurde, wie in Kapitel 2.2.5.3 beschrieben, eine Isolierung der *inclusion bodies* vorgenommen. Das gewonnene IB-Pellet wurde anschließend mit Solubilisierungspuffer und 100 mM DTT versetzt, um eventuelle Disulfidbrücken aufzubrechen. Nach der Inkubation wurde die Proteinlösung gegen einen Lagerpuffer pH 4,0 dialysiert. Durch diesen niedrigen pH-Wert sollte eine Neuausbildung von Disulfidbrücken verhindert werden. Zur Bestimmung der optimalen Faltungsbedingung wurde ein *screening* bezüglich Pufferzusammensetzung und pH-Wert im 50 mL-Maßstab durchgeführt (Faltungsmatrix siehe Tabelle 2-34). Nach Inkubation der Faltungsansätze über Nacht bei 4 °C wurden diese mit einer HiTrap Desalting an einer FPLC-Anlage in PBS pH 7,4 umgepuffert und anschließend mittels Amicon-Röhrchen eingeeengt. Zur Identifizierung der besten Faltungsbedingung wurden die so behandelten Proben hinsichtlich der Aggregat- und Monomeranteile mittels SE-HPLC (Superdex 200 5/150 GL) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Bedingung T3 (50 mM Tris pH 9,0; 3 M Harnstoff; 2,5 mM GSH; 0,25 mM GSSG) für die Wildtyp-Fusion und T1 (50 mM Tris pH 9,0; 0,7 M Arginin; 2,5 mM GSH; 0,25 mM GSSG) für die anderen beiden Proteine die größten Monomeranteile enthielten. Des Weiteren gab es eine zusätzliche Verbesserung, wenn das Solubilisat mit einzelnen Pulsen von 10 µg/mL Faltungsansatz (Endkonzentration 100 µg/mL) zugegeben wurden. Für eine Faltung im größeren Maßstab zur späteren Charakterisierung der Fusionsproteine wurde erneut Biomasse hergestellt und die isolierten *inclusion bodies* solubilisiert. Die Faltung fand in 500 mL für das Wildtyp-Konstrukt 118687 und in je 1000 mL für die Konstrukte 138812 und 138813 in den oben genannten Puffern statt. Die Zuführung des Solubilisates erfolgte gepulst (10x je 10 µg/mL Ansatz). Zur Reinigung der Proteine wurden die Ansätze auf eine Endkonzentration von 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gebracht und filtriert, bevor sie direkt auf eine HiPrep Phenyl-Säule aufgetragen wurden. Auf Grund der großen Volumina wurden jeweils zwei Läufe durchgeführt. Exemplarisch ist das Chromatogramm in Abbildung 3-29 dargestellt.



**Abbildung 3-29: Reinigung der IL2-Fusion 138812 mittels HIC.** Die Reinigung erfolgte nach dem Aufsalzen der Probe (Endkonzentration 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) über eine HiPrep Phenyl HP 20 mL-Säule mit folgenden Parametern: Puffer A: 20 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0; Puffer B: 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 8,0; 1ml/min; Gradient 100 % auf 0 % B in 10 CV. **(A)** Ausschnitt des Chromatogramms. **(B)** SDS-PAGE der Fraktionen, Pool 1 Elutionsvolumen 821-840 mL; Pool 2 Elutionsvolumen 841-921 mL.

Mittels SE-HPLC-Analytik (Superdex 75 5/150 GL) konnte gezeigt werden, dass der vordere *peak* nur einen geringen Anteil an Aggregaten (< 5 %) und der hintere *peak* deutlich mehr Aggregate (30 – 50 %, je nach Proteinvariante) enthielt. Für eine weitere Reinigung wurde deshalb nur der vordere Teil des Eluates (Pool1 821-840 mL Elutionsvolumen) verwendet.

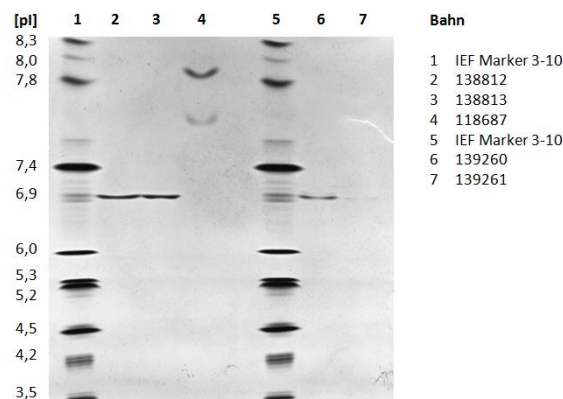
Als finaler Reinigungsschritt wurde eine Gelfiltration verwendet, um vorhandene Aggregate abzutrennen und die Probe in den Endpuffer PBS pH 7,4 umzupuffern. Dazu wurden die Eluate der HIC mittels Amicon-Röhrchen eingengt und auf mehrere Gelfiltrationsläufe (XK26/600 Superdex 75 *prep grade*) verteilt. Das jeweilige Auftragsvolumen betrug dabei ca. 2,5 % des Säulenvolumens. Die Eluate der SEC-Läufe wurden anschließend vereinigt.



**Abbildung 3-30: Reinigung der IL2-Fusion 138812 mittels SEC.** (A) Das Eluat der HIC wurde mittels Amicon-Röhrchen eingengt und auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Als Puffer wurde 1x PBS pH 7,4 mit einem Fluss von 3,5 mL/min verwendet. (B) SDS-PAGE der Fraktionen, Pool: Elutionsvolumen 149-167 mL.

Die Faltung und Reinigung der Affilin®-IL-2-Fusionen mit drittem Cystein (139260 und 139261) erfolgten analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise. Jedoch wurde ein kleinerer Faltungsansatz von 100 mL verwendet, da es vorrangig um die biochemische Charakterisierung dieser Konstrukte ging und nicht um die Vergleichbarkeit der Herstellung. Als einziger Unterschied wurde dem Gelfiltrationspuffer 0,5 mM DTT zugesetzt, um das freie Cystein reduziert zu halten.

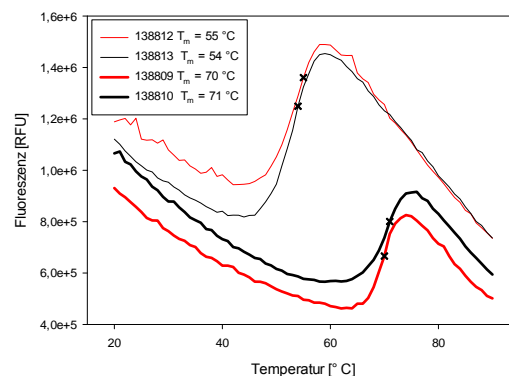
Nach der Reinigung der Fusionen wurde eine umfangreiche Analytik durchgeführt. Zunächst wurden die Proben mittels SE-HPLC und rp-HPLC untersucht. Als Ergebnis konnten die Proteine eindeutig als Monomer zugeordnet werden. Des Weiteren konnten keine weitere Verunreinigungen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3-9).



**Abbildung 3-31: IEF-Gel der IL2-Fusionen mit (138812, 138813, 118687) und ohne (139260, 139261) drittes Cystein.** Es wurden jeweils 2  $\mu$ g Protein mit dem Probenpuffer (IEF Sample Buffer pH 3-10) versetzt und aufgetragen. Die Spannungsquelle wurde wie folgt eingestellt: 100V für 60 min, 200 C für 60 min und 500 V für 30 min. Nach der Fixierung mit 12 % TCA wurde das Gel mit Coomassie gefärbt.

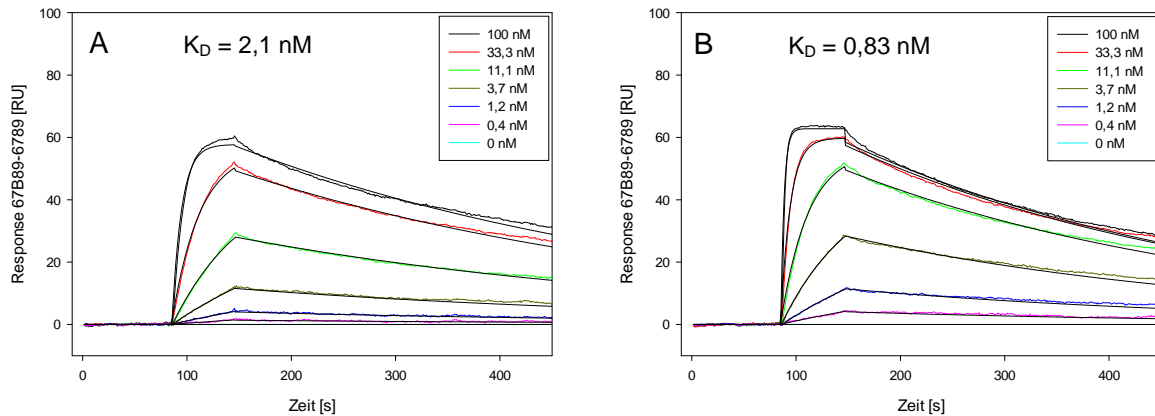
Neben der SDS-PAGE wurde ebenso ein IEF-Gel (Kapitel 2.2.5.14) mit den Proben beladen. Dieses wurde nach dem Lauf mit 12 % TCA fixiert und anschließend Coomassie-gefärbt. Für die Proteine 138812 und 138813 wurden klare Einzelbanden auf Höhe eines entsprechenden pI-Wertes von 6,9 (theoretischer pI aller vier Affilin®-Fusionen 6,12) erzielt. Die Fusionen 139260 und 139261 mit dritten Cystein ergaben eine Bande auf gleicher Höhe, jedoch war eine leichte Doppelbande sichtbar, was auf eine Inhomogenität hinwies. Der Wildtyp als IL-2-Fusion besaß einen theoretischen pI-Wert von 6,9. Bei dieser Probe waren allerdings zwei Banden erkennbar, die sich bei einem deutlich höheren pI im Gel befanden. Diese Inhomogenität kann beispielsweise von einer Deamidierung oder anderen Modifikation kommen.

Des Weiteren wurde die thermische Stabilität der Fusionen gegenüber der entsprechenden Affilin®-Moleküle mittels Fluoreszenzmessung untersucht. Dazu wurde eine 1 µM Lösung des Proteins in PBS hergestellt und über einen Temperaturverlauf von 20 °C bis 90 °C (Heizrate 1 °C/min) gemessen. Die Anregung fand bei 280 nm statt, die Emission wurde im Bereich von 300-370 nm detektiert. Das Resultat ist in Abbildung 3-32 dargestellt. Der Schmelzpunkt  $T_m$  wurde durch die Berechnung des Wendepunktes ermittelt und betrug für die Fusionen 55 °C (138812) bzw. 54 °C (138813). Diese Werte liegen deutlich unter denen der nicht-fusionierten Affilin®-Moleküle. Für beide Fusionen mit dritten Cystein (139260 ,139261) wurde jeweils der Schmelzpunkt bei 59 °C ermittelt.



**Abbildung 3-32: Messung der Temperaturabhängigkeit der Tryptophan-Fluoreszenz der Affilin®-Varianten 138809 bzw. 138810 und der abgeleiteten IL2-Fusionen 138812 und 138813.** Für die Messung wurde eine 1 µM Proteinlösung hergestellt und in 1x PBS pH 7,4 vermessen. Folgende Parameter wurden verwendet: Anregung 280 nm, Emission 300-370 nm, Integrationszeit 0,1 s; Heizrate 1 °C/Minute. Die Wendepunkte der Kurven (mit x markiert) stellen den Schmelzpunkt der Proteine dar.

Die Affinität der fusionierten Affilin®-Moleküle zum Target 67B89 wurde mittels ELISA (Kapitel 2.2.5.16) und SPR-Messung (Kapitel 2.2.6.1) ermittelt. Für den konzentrationsabhängigen ELISA wurden Targetmengen von 0,1 µg/mL (Kontrolltarget 6789 4 µg/mL) immobilisiert und die IL2-Fusionen mit einer Startkonzentration von 100 nM eingesetzt. Die SPR-Analyse erfolgte auf einem SA-Chip mit ca. 300 RU immobilisierten Target 67B89 und 6789 (Abbildung 3-33). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 3-9 dargestellt. Durch die Fusion mit Interleukin-2 erfolgte kein Affinitätsverlust des Affilin®-Moleküls gegenüber dem Target 67B89.



**Abbildung 3-33: SPR-Sensogramme der Affilin®-Interleukin-2-Fusionen 138812 (A) und 138813 (B).** Auf einen SA-Chip wurden jeweils ca. 300 RU Targetproteine 67B89 bzw. 6789 immobilisiert und anschließend die zu untersuchenden Varianten in verschiedenen Konzentrationen vermessen. Die Assoziationsphase betrug 60 Sekunden, die Dissoziation wurde 300 Sekunden durchgeführt, bevor eine Regeneration mit 10 mM HCl erfolgte. Als Laufpuffer wurde PBS pH 7,4 mit 0,005% Tween 20 mit einem Fluss von 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  verwendet. Farbige Linien zeigen die Messdaten bei verschiedenen Affilin®-Konzentrationen. Schwarze Linien geben eine mittels Langmuir-Modell berechneten Fit wieder.

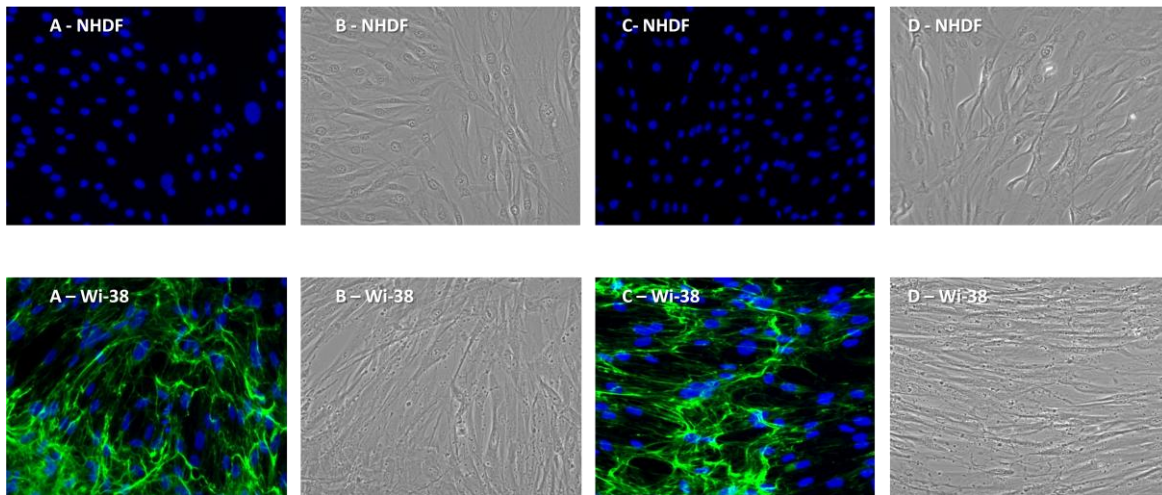
**Tabelle 3-9: Zusammenfassung der Ergebnisse der Affilin®-IL2-Fusionen und der Ausgangsvarianten**

Fusion	Herstellung			Reinheit HPLC		ELISA [nM]	SPR (Biacore)			Ausbeute Faltungs- ansatz [mg]
	BFM [g]	Pellet [g]	Solubilisat [mg]	SE [%]	rp [%]		$K_D$ [nM]	$k_{on}$ [1/Ms]	$k_{off}$ [1/s]	
118687	4,9	1,2	60*	100	100	-	-	-	-	14,1
138812	4,9	1,5	182*	100	100	1,46	2,12	$1,06 \cdot 10^6$	$2,25 \cdot 10^{-3}$	5,2
138813	4,9	1,3	173*	100	100	0,48	0,83	$3,21 \cdot 10^6$	$2,65 \cdot 10^{-3}$	17,4
139260	4,6	1,0	108 <sup>#</sup>	100	-	2,8	4,83	$5,57 \cdot 10^5$	$2,69 \cdot 10^{-3}$	1,0 <sup>#</sup>
139261	3,9	1,2	152 <sup>#</sup>	79	-	0,84	1,14	$2,86 \cdot 10^6$	$3,27 \cdot 10^{-3}$	0,8 <sup>#</sup>
138809	-	-	-	100	-	-	0,85	$2,6 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^{-3}$	-
138810	-	-	-	92	-	-	0,57	$4,8 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^{-3}$	-

\* nur 50 mg für Wildtyp bzw. 100 mg für Affilin®-Fusionen eingesetzt

# nur 10 mg für Affilin®-Fusionen eingesetzt

Nach der erfolgreichen Testung der Affinität der Affilin®-IL-2-Fusionen gegenüber dem biochemischen Target 67B89 sollte in einem weiteren Schritt die Bindung an ED-B-exprimierende Wi-38-Zellen nachgewiesen werden. Diese Untersuchung wurde mittels immunocytochemischer Fluoreszenzmarkierung von Dr. M. Gloser (Scil Proteins GmbH) durchgeführt (Kapitel 2.2.7.1). Der Nachweis erfolgte bei diesem Aufbau über das fusionierte Interleukin-2 mit dem Antikörper IL-2 *rat anti-human* mAb Alexa Fluor® 488. Zur Kontrolle wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Auch bei diesem Versuch war eine deutliche Bindung an Wi-38-Zellen nachweisbar. Die typische Anfärbung der extrazellulären Matrix war ebenfalls gut erkennbar.



**Abbildung 3-34: Fluoreszenzmikroskopie der Affilin®-Interleukin-2-Fusionen 138812 (A, B) und 138813 (C, D).** ED-B-exprimierende Wi-38-Zellen und die Kontrollzellen NHDF wurden kultiviert und mittels Methanol fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit den Varianten (50 nM) für eine Stunde inkubiert. Der Nachweis erfolgte über den Antikörper IL2 *rat anti-human* mAb Alexa Fluor® 488 (grün). Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff DAPI blau gefärbt. Zusätzlich wurden auflichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen angefertigt.

In einem weiteren Zellkulturversuch sollte die biologische Aktivität des fusionierten Interleukin-2 auf CTLL-2-Zellen untersucht werden, die nur bei Anwesenheit von IL-2 proliferieren. Die Kultivierung und Inkubation mit den Proben wurde wie in Kapitel 2.2.7.2 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden Zellen mit den Interleukin-2-Fusionen in einer Verdünnungsreihe beginnend mit 1000 pM inkubiert, anschließend mittels WST-1-Reagenz gefärbt und bei 450 nm vermessen. Auf jeder 96-well-Platte wurde neben der Probe zusätzlich rekombinantes humanes IL-2 als Standard vermessen. Insgesamt wurden pro Variante drei Versuche durchgeführt und der ED<sub>50</sub>-Wert von Probe und IL-2-Standard mit dem Programm PLA 2.0 berechnet, sowie gemittelt (Tabelle 3-10). Aus dem Mittelwert des EC<sub>50</sub> wurde die relative Aktivität der Probe gegenüber dem Standard (rhIL-2) berechnet. Die Diubiquitin-IL-2-Fusion zeigt eine relative Aktivität von 164 %, während die beiden Affilin®-Fusionen 199 % bzw. 241 % aufwiesen. Die Varianten mit dem dritten Cystein wiesen hingegen eine geringere relative Aktivität gegenüber dem Standard auf. Dabei konnten lediglich 87 % bzw. 66 % ermittelt werden. Das als Standard verwendete rekombinante humane Interleukin-2 besaß ein drittes freies Cystein. In der Literatur ist beschrieben, dass der Austausch C125S beim Interleukin-2 zu einer leicht erhöhten biologischen Aktivität im Zellkulturassay führte (Boone 1988).

**Tabelle 3-10: Ergebnisse Nachweis IL-2-Aktivität der Fusionsproteine auf CTLL-2-Zellen**

Fusion	Mittelwert EC <sub>50</sub>		Relative Aktivität gegenüber rhIL-2 [%]
	Vermessene Probe [pM]	IL-2-Standard* [pM]	
118687	24,9	41,5	164
138812	32,8	63,7	199
138813	31,6	66,9	241
139260	51,5	41,4	87
139261	70,1	45,6	66

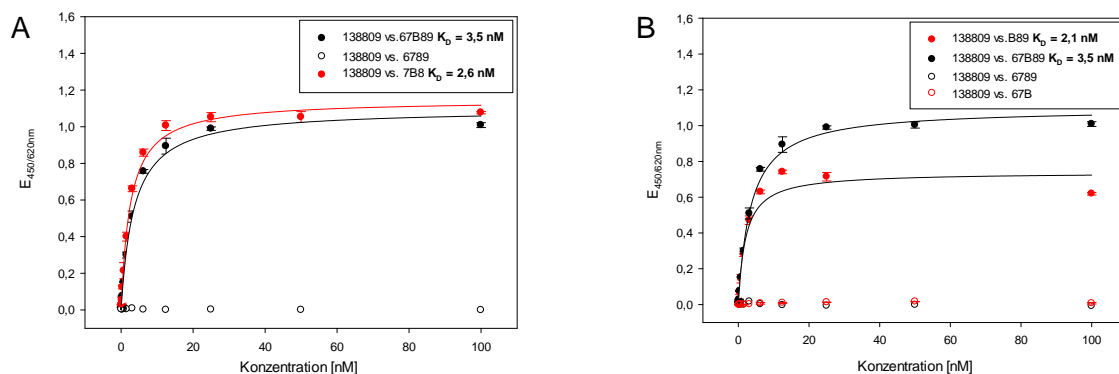
\* rhIL-2 als Standard auf jeder Platte vermessen

## 3.5 Strukturaufklärung von Affilin®-Molekülen

### 3.5.1 Voruntersuchung zur Komplexbildung von Affilin® und ED-B

In Kristallisationsversuchen von Affilin®-Molekülen als Komplex mit dem Targetprotein 67B89 konnten keine geeigneten Kristalle für die Röntgenanalyse gewonnen werden (Daten nicht gezeigt). Ein Grund dafür könnte das Target 67B89, bestehend aus fünf Domänen mit je ca. 10 kDa, sein. Daher wurde auf das verkürzte Target 7B8 zurückgegriffen, welches bereits in der Literatur (Gebauer 2013) in Verbindung mit Kristallisation von einem Anticalin®-Molekül beschrieben wurde.

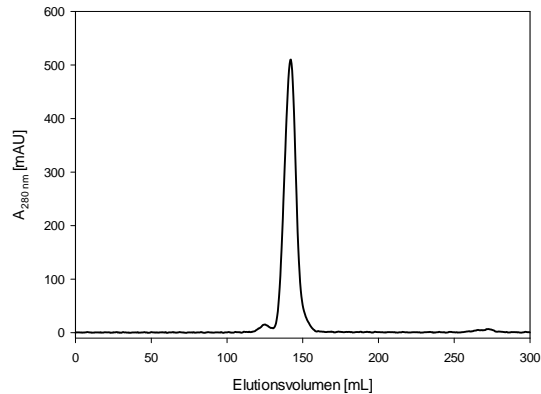
Zunächst wurde die Affinität der ausgewählten Affilin®-Moleküle gegenüber 7B8 in einem ELISA getestet. In der Abbildung 3-35 sind die Ergebnisse für die Variante 138809 dargestellt. Neben dem verkürzten Target 7B8 wurden weitere Formate wie 67B und B89 untersucht. In diesem Versuch konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Affinität zum verkürzten Targetprotein nahezu identisch mit der des gesamten Targets 67B89 war. Auch mittels SE-HPLC konnte gezeigt werden, dass ein stabiler Komplex aus 138809 und 7B8 gebildet wurde. Daher wurde für alle nachfolgenden Kristallisationsversuche das Target 7B8 verwendet. Eine weitere Aussage konnte im ELISA bezüglich der Targetpräferenz getroffen werden. Es wurde keine Bindung an dem Targetprotein 67B nachgewiesen, jedoch an B89 und 67B89. Dies ließ vermuten, dass das Affilin® 138809 zwischen den Domänen B und 8 bindet, während die Domäne 7 für eine Bindung nicht nötig war. Als Targetkontrolle wurde die Variante 3887 verwendet, die alle verkürzten Targets gleich stark bindet.



**Abbildung 3-35: Untersuchung der Affinität von 138809 zu verschiedenen Targetformaten mittels konzentrationsabhängigen ELISA.** Die Targetproteine (5  $\mu$ g/mL 67B89\_T0, 4  $\mu$ g/mL 67B89\_T0, 3  $\mu$ g/mL 67B\_Th, 3  $\mu$ g/mL 7B8\_T0 und 3  $\mu$ g/mL B89\_Th) wurden an eine Medisorp-Platte immobilisiert und mit einer Verdünnungsreihe der Variante 138809 inkubiert. Der Nachweis erfolgte mittels Anti-Ubi-Fab-POD. Die TMB-Reaktion wurde nach 10 Minuten abgestoppt. Durch eine hyperbole Regression (Kurve) wurde der  $K_D$ -Wert berechnet. **(A)** Vergleich der Targets 67B89 und 7B8. **(B)** Vergleich der Targets 67B89, 67B89, 67B und B89.

Zur Komplexbildung wurde neben den Bindeproteinen 138809 und 138810 ein weiteres Affilin®-Molekül verwendet. Diese Variante 77405 basiert ebenso auf einem Di-Ubiquitin mit einem GIG-Linker und wurde firmenintern bereitgestellt (Lorey 2014). Die drei Affilin®-Moleküle wurden äquimolar mit dem Target 7B8 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Mittels Gelfiltration (Superdex 75) wurden die Proben gereinigt und in den Kristallisationspuffer 10 mM HEPES, 100 mM NaCl pH 7,3 überführt. Exemplarisch ist ein Chromatogramm in Abbildung 3-36 dargestellt. Des Weiteren konnte mit der Gelfiltration nachgewiesen werden, dass tatsächlich eine äquimolare Bindung erfolgte, da keine separaten Bindungspartner eluiert wurden.





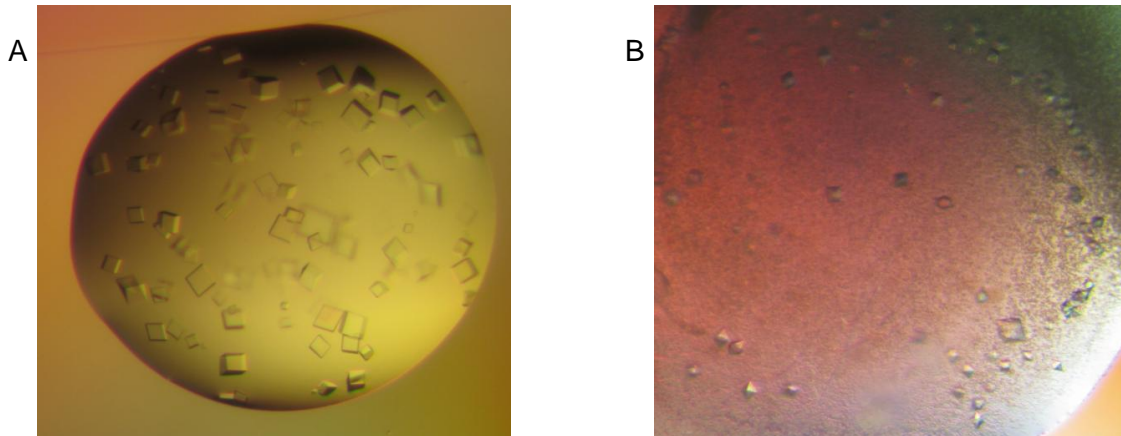
**Abbildung 3-36: Reinigung des Komplexes 138809-7B8.** Nach äquimolarer Inkubation der beiden Bindungspartner wurde die Proteinlösung mittels Gelfiltration gereinigt. Dabei kam eine XK26/600 Superdex 75 Säule (Puffer: 10 mM HEPES, 100 mM NaCl pH 7,3) mit einem Fluss von 3 mL/min zum Einsatz.

### 3.5.2 Kristallisation und Strukturlösung

#### *Kristallisation der Affilin®-Variante 77405*

Das verwendete Affilin® 77405 bestand wie die anderen Varianten aus zwei Ubiquitin-Monomeren, die mit einem GIG-Linker verbunden waren (Alignment siehe Abbildung 3-39). Dieses tag-freie Affilin® wurde über eine SUMO-Fusion und Spaltung mittels SUMO-Hydrolase hergestellt (Lorey 2014) und besaß eine Affinität von 189 pM gegenüber 67B89 (SPR:  $k_{on} = 3,14 \cdot 10^6$ ,  $k_{off} = 5,95 \cdot 10^{-4}$ ).

Das Affilin® 77405 wurde mit dem Target 7B8 inkubiert und der Komplex mittels Gelfiltration gereinigt. Anschließend wurde der Komplex auf eine Proteinkonzentration von 21,8 mg/mL in 10 mM HEPES, 100 mM NaCl pH 7,3 konzentriert. Mit diesem Komplex wurde ein primäres *screening* der Kristallisationsbedingungen in 96-well-Platten durchgeführt. Dazu wurden je 200 nL Proteinlösung und 200 nL Kristallisationspuffer mit dem Roboter Cartesian Microsys 4000 als sitzende Tropfen pipettiert und bei 15 °C inkubiert. Die verwendeten *screening kits* sind in der Tabelle 2-12 aufgeführt. Insgesamt wurden 768 verschiedene Bedingungen untersucht. Bei einigen Pufferbedingungen wurden Einkristalle erzeugt und in einem größeren Maßstab (hängender Tropfen 4 µL) reproduziert. Zusätzlich wurden die Proteinkonzentration (13 mg/mL, 18 mg/mL und 21,8 mg/mL) und der pH-Wert der Puffer um 0,5 Einheiten variiert, um die Kristallform zu verbessern. Final wurde der Puffer A2 des Morpheus *kits* (100 mM Imidazol/MES, 60 mM CaCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub>, 30 % PEG8000/Ethylenglykol) mit einem angepassten pH-Wert von 6,0 ausgewählt. Die erhaltenen Kristalle wurden am Röntgengenerator (Drehanode, Micromax007 Generator, Rigaku, Japan) im Institut für Biochemie, AG Stubbs, Universität Halle bei -180 °C vermessen. Diese Kristalle wiesen nur eine geringe Auflösung von 10 Å auf. Eine weitere Verbesserung wurde durch das *additiv-screening* von Hampton Research erzielt, wobei 10 mM Kupfer(II)chlorid-dihydrat die vielversprechendsten Kristalle ergab. Diese wurden mittels *macro-seeding* erfolgreich reproduziert. Das Resultat nach drei Wochen Kristallwachstum waren bipyramidale Kristalle. In der Abbildung 3-37 sind die Ausgangskristalle des primären Ansatzes und die finalen Kristalle für die Röntgenanalyse dargestellt. Mittels SDS-PAGE wurde jedoch ermittelt, dass es sich bei den Kristallen nicht um den Komplex, sondern nur um die Affilin®-Variante 77405 handelte.



**Abbildung 3-37: Kristalle der Variante 77405.** Proteinkonzentration 21,8 mg/mL, Inkubation bei 15 °C. **(A)** Primäres *screening* (sitzender Tropfen, 400 nL), Puffer: 30 % PEG8000/Ethylenglykol, 60 mM CaCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Imidazol/MES pH 6,5. **(B)** *macro-seeding* (hängender Tropfen, 4 µL), Puffer: 30 % PEG8000/Ethylenglykol, 60 mM CaCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Kupfer(II)chlorid-dihydrat, 100 mM Imidazol/MES pH 6,0.

#### *Datensammlung und Strukturlösung der Affilin®-Variante 77405*

Sowohl die Messung als auch die Strukturlösung wurde von Dr. Christoph Parthier (Institut für Biochemie, Universität Halle) durchgeführt. Die Datensammlung der eingefrorenen Kristalle wurden an der *beamline* 14.2 des BESSYII Synchrotrons (Helmholtz-Zentrum, Berlin) durchgeführt. Ein Datensatz mit 2,2 Å wurde bei einer Wellenlänge von 0,9184 Å mit einem CCD-Detektor (MX-225, Rayonics, USA) aufgenommen und mit dem XDS-Softwarepaket ausgewertet. Die Zellparameter der tetragonalen Kristalle wiesen auf ein bis zwei Affilin®-Moleküle pro asymmetrischer Einheitszelle hin. Das Phasenproblem wurde durch *single wavelength anomalous dispersion* (SAD) gelöst und erlaubte die Lokalisierung von vier Kupferionen in der Raumgruppe P4<sub>1</sub>. Durch Verfeinerung mit den Programmen AUTOSHARP und BUCANEER der CCP4-Suite konnte die Struktur gelöst werden. Pro asymmetrische Einheitszelle war ein Affilin®-Molekül enthalten. Das Proteinmodell wurde mit den Programmen COOT und PHENIX erstellt, für die Strukturvalidierung wurde MOLPROBITY verwendet. In der Tabelle 3-11 sind die Parameter der Datenaufnahme und Strukturauflösung dargestellt.

#### *Kristallisation der Affilin®-Varianten 138809 bzw. 138810 im Komplex mit 7B8*

Nach der Bindung der Varianten 138809 und 138810 an das Target 7B8 wurde der Komplex mittels Gelfiltration (Puffer: 10 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,3) gereinigt und auf 21,8 mg/mL (138809) bzw. 25,2 mg/mL (138810) konzentriert. Das primäre *screening* mit 768 verschiedenen Bedingungen erfolgte unter gleichen Parametern wie oben für Variante 77405 beschrieben. Für den Komplex mit der Affilin®-Variante 138810 wurden keine für eine Messung geeigneten Kristalle erzielt. Im Folgenden wird daher nur auf die Variante 138809 eingegangen. Nach der Inkubation bei 15 °C wurden die Kristalle aus verschiedenen Bedingungen am oben genannten Röntgengenerator der AG Stubbs bei -180 °C vermessen. Dabei konnte nur eine Auflösung von maximal 6 Å erzielt werden. Eine deutliche Verbesserung der Diffraktionseigenschaften wurde durch eine Erhöhung der Temperatur der Kristallisationsansätze von 15 °C auf 25 °C nach ein bis zwei Wochen erreicht. Bei der besten Pufferbedingung (0,5 M Lithiumsulfat, 15 % PEG8000 aus Jena Bioscience *classic screen 5 well A4*) konnte eine Auflösung von ca. 3 Å ermittelt werden. Die Kristalle wurden direkt aus der 96-*well*-Platte entnommen und für eine Datensammlung am Synchrotron eingefroren.



*Datensammlung und Strukturlösung der Affilin®-Variante 138809 im Komplex mit 7B8*

Die Komplekristalle aus dem Affilin® 138809 und dem Targetprotein 7B8 wurden von Dr. Christoph Parthier (Institut für Biochemie, Universität Halle) an der *beamline* 14.1 des BESSYII Synchrotrons (Helmholtz-Zentrum, Berlin) vermessen und ausgewertet. Der Datensatz hatte eine Auflösung von 2,3 Å und wurde bei einer Wellenlänge von 0,9184 Å an einem Hybrid-Pixel-Detektor (Pilatus 6M, Dectris, Schweiz) aufgenommen. Die Zellparameter der monoklinen Kristalle (Raumgruppe C2) deuteten auf drei nicht-identische Komplexe pro asymmetrische Zelle hin. Mittels *molecular replacement* (Programm PHASER) wurde das Phasenproblem gelöst. Dabei wurden die drei einzelnen Fibronectin-Domänen des Targets 7B8 (PBD-Eintrag 4GH7) und die zwei Domänen der Variante 77405 als Suchmodelle verwendet. Damit wurden drei nicht-kristallographisch symmetrische Komplexe aus Affilin® und 7B8 pro Einheitszelle identifiziert. Das Modell wurde mit den Programmen COOT und PHENIX berechnet. Zur Validierung der Struktur wurde erneut MOLPROBITY verwendet. In der Tabelle 3-11 sind die Parameter der Datensammlung und Auflösung der Struktur dargestellt.

**Tabelle 3-11: Parameter der Datensammlung und Strukturlösung der Affilin®-Moleküle**

		<b>Affilin® 77405</b>	<b>Komplex 138809- 7B8</b>
<i>Datensammlung</i>	<i>beamline</i>	BESSY <i>beamline</i> 14.2	BESSY <i>beamline</i> 14.1
	Wellenlänge	0,9184 Å	0,9184 Å
	Raumgruppe	P4 <sub>1</sub>	C2
<i>Zellparameter</i>	Längen a, b, c [Å]	62,77 62,77 67,84	168,67 105,86 78,99
	Winkel α, β, γ [°]	90; 90; 90	90; 93,52; 90
	Auflösungsbereich [Å]	30,0-2,2 (2,3-2,2)	30,0-2,3 (2,4-2,3)
	Anzahl der einzigartigen Reflexe	26176 (3189)	59628 (5777)
	Vollständigkeit [%]	99,5 (97,6)	96,8 (78,7)
	R <sub>merge</sub>	3,1 (38,7)	5,8 (39,8)
	I/σ(I)	22,8 (3,9)	16,5 (3,1)
<i>Strukturverfeinerung</i>	Pro asymmetrischer Einheitszelle	ein Affilin® 77405	drei Affilin®-Moleküle 138809 und drei 7B8
	R <sub>crystal</sub> [%]	19,3	19,9
	R <sub>free</sub> [%]	22,6	25,4
	Mittlere B-Faktoren [Å <sup>2</sup> ]	55,6	31,2
<i>Anzahl der Atome</i>	Protein	1223	9948
	Kupfer <sup>2+</sup> -Ionen	4	-
	Puffermoleküle	10	10
	Lösungsmittel	78	575
<i>Mittlere Abweichung</i>	Bindungslänge [Å]	0,007	0,009
	Bindungswinkel [°]	1,1	1,3
<i>Ramachandran plot</i>	Bevorzugt [%]	98,0	97,2
	Erlaubt [%]	2,0	2,3
	Nicht erlaubt [%]	0,0	0,5

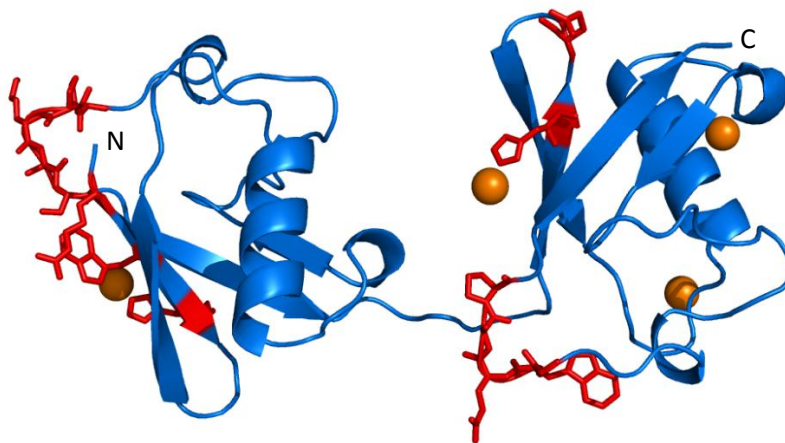
Werte in Klammern beziehen sich auf den höchsten Auflösungsbereich

### 3.5.3 Strukturbeschreibung

#### Struktur der Affilin®-Variante 77405

Die Kristallstruktur des freien Affilin®-Moleküls 77405 bestätigte die Ubiquitinfaltung der beiden Proteindomänen. Fast alle Reste der Domänen konnten gut in der Elektronendichtekarte abgebildet werden. Lediglich in der flexiblen Linkerregion traten relativ hohe B-Faktoren auf und es konnte keine Elektronendichte ermittelt werden. In der Struktur konnten vier Kupfer-Ionen lokalisiert werden, welche durch die Histidin- und Aspartat-Seitenketten des Affilin®-Moleküls koordiniert wurden. Da diese Ionen erst mit dem *Additiv-screening* in die Proteinlösung gelangten, geht keine funktionelle Bedeutung für das aktive Protein von ihnen aus.

In der Abbildung 3-38 ist die gelöste Affilin®-Struktur dargestellt. Für die Visualisierung wurde das Programm Pymol genutzt. Die gegenüber dem Di-Ubiquitin randomisierten Aminosäurereste sind rot eingefärbt. Da es sich um die Struktur eines nicht-gebundenen Affilin®-Moleküls handelte und zwischen den beiden Domänen ein flexibler Linker vorlag, konnten keine Rückschlüsse auf die Anordnung im gebundenen Zustand geschlossen werden.



**Abbildung 3-38: Kristallstruktur der Affilin®-Variante 77405.** Die dem Wildtyp gegenüber randomisierten Aminosäurereste sind rot eingefärbt. Orange sind die Kupfer-Ionen dargestellt.

In der Abbildung 3-40 ist ein Vergleich der C- bzw. N-terminalen Domänen des Affilin®-Moleküls 77405 und eines Ubiquitins dargestellt. Die Abweichung der beiden Affilin®-Module ist trotz verschiedener Substitutionen nur sehr gering (RMSD = 0,08). Auch im Vergleich mit einem Ubiquitin-Monomer konnte lediglich eine Abweichung in der *loop*-Region beobachtet werden. Dies bestätigte das Konzept der Affilin®-Technologie, dass trotz verschiedener Mutationen eine stabile Ubiquitin-typische Faltung vorherrschte. Das Alignment ist in Abbildung 3-39 dargestellt.

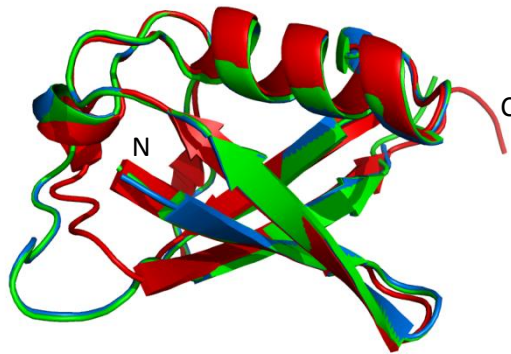
```

Ubiquitin-Dimer      1  mqifvktltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtldsyniqkestlhlvlrlraagig
77405                1  mriwvhtltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtldsyninpklslhlvlrlraagig

Ubiquitin-Dimer      80  mqifvktltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtldsyniqkestlhlvlrlraa
77405                80  mqifvhtltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrliwagkqledgrtldsynigwqaplhvlrlraa

```

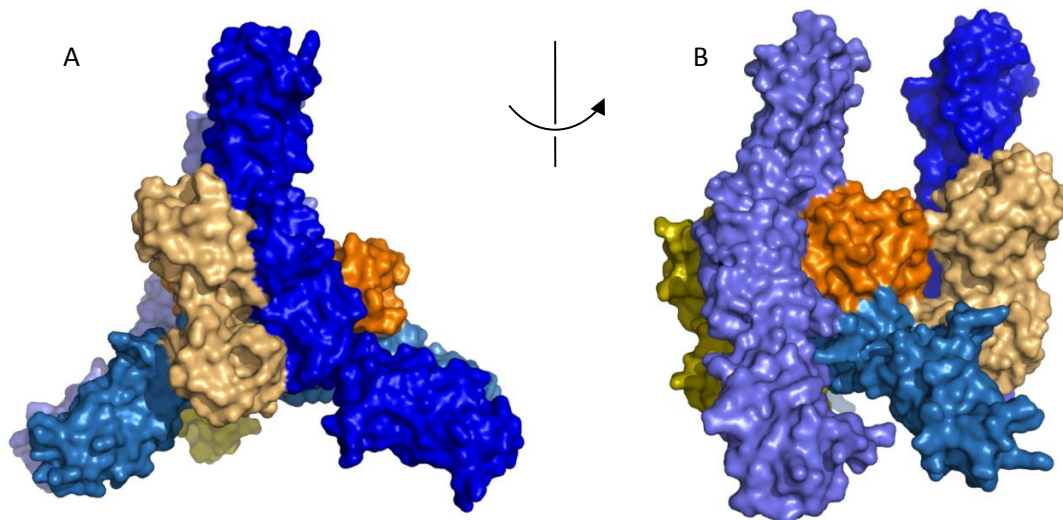
**Abbildung 3-39: Alignment der Variante 77405 gegenüber dem Ubiquitin-Dimer.**



**Abbildung 3-40: Vergleich der beiden Domänen der Variante 77405 (blau, grün) und eines Ubiquitin-Monomers (rot).** Quadratisches Mittel der Abweichung der Ca-Atome (RMSD): 0,080 zwischen den Affilin®-Domänen 0,080 und 0,69 zwischen einer Affilin®-Domäne und dem Di-Ubiquitin.

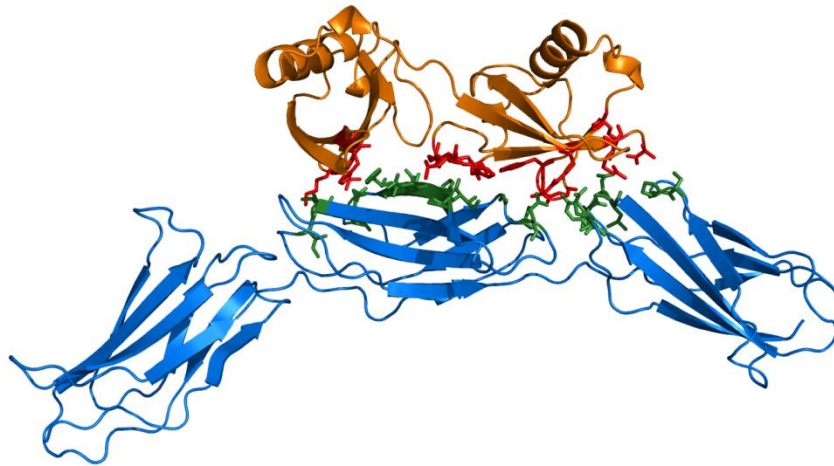
#### *Komplexstruktur der Affilin®-Variante 138809 mit dem Targetprotein 7B8*

Bei der Strukturlösung des Komplexes wurden pro Einheitszelle drei Komplexe aus je einem Affilin® und einem Targetmolekül ermittelt (Abbildung 3-41). Die strukturelle Übereinstimmung der drei Komplexe war vor allem in den Affilin®-bindenden Regionen des Targetprotein (Domänen B und 8) sehr hoch. Leichte Unterschiede konnten lediglich bei der N-terminalen Domäne 7 festgestellt werden (Anhang, Abbildung 8-5), was wahrscheinlich auf Kristallkontakte zurückzuführen war.



**Abbildung 3-41: Asymmetrische Einheit der Kristallstruktur des Komplexes aus 138809 und 7B8.** In Blautönen sind die Targetproteine 7B8 dargestellt, die ocker- bis orangefarbenen Strukturen stellen die Affilin®-Moleküle dar. **(A)** Die drei Komplexmoleküle sind jeweils um 120° versetzt. **(B)** Darstellung um 90° gedreht.

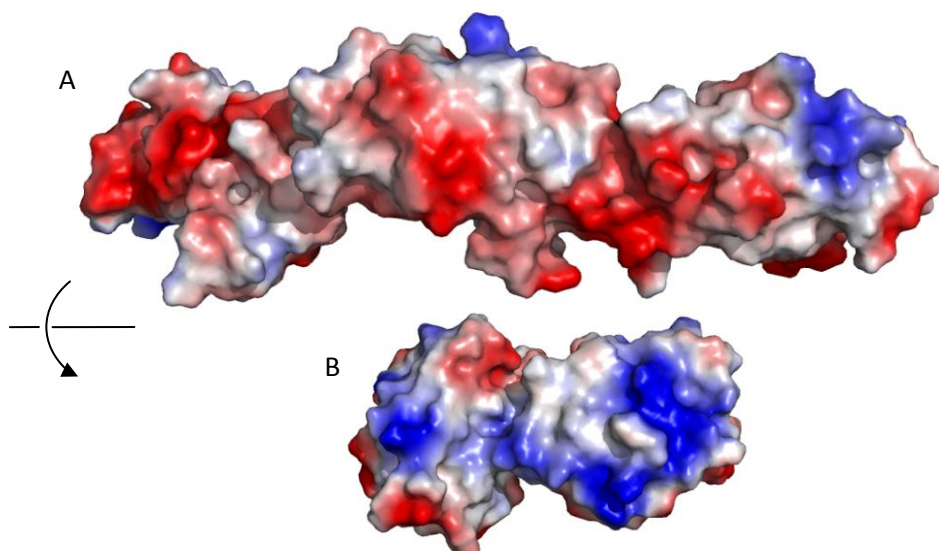
Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit wurde für die weitere Betrachtung nur der mittlere Komplex ausgewählt (Abbildung 3-42). Es war erkennbar, dass das Affilin®-Molekül an der konvexen Seite des 7B8, vorwiegend an der B-Domäne, bindet. Jedoch wurde auch die Region zwischen den Domänen B und 8 einbezogen. Die Kontaktfläche wurde mit dem Programm PISA berechnet und betrug 1100 Å<sup>2</sup>. Die sekundäre Kontaktfläche zwischen einem Affilin®-Molekül und einem benachbarten Targetprotein wurden mit 400-500 Å<sup>2</sup> berechnet. Da in der Komplexbildung eine äquimolare Bindung gezeigt werden konnte, ist davon auszugehen, dass diese intermolekularen Kontakte durch die Packung im Kristall auftraten.



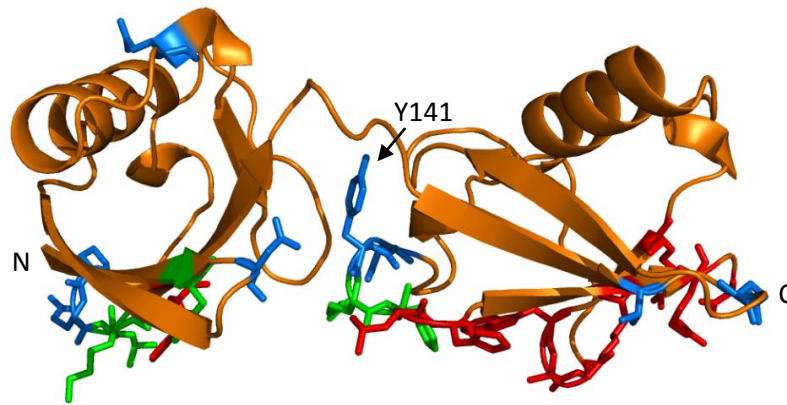
**Abbildung 3-42: Struktur des Komplexes aus 138809 (orange) und 7B8 (blau).** Rot bzw. grün sind die an der Bindung beteiligten Aminosäurereste als Stickmodell dargestellt.

Die Abbildung 3-42 zeigt die an einer Bindung beteiligten Reste. Mit dem Programm Pymol (DeLano) konnten insgesamt 15 Reste des Affilin®-Moleküls und 20 Reste auf den Fibronectin-Domänen B und 8 identifiziert werden, die an einer Bindung beteiligt sind. Die Domäne 7 trat nicht direkt in Wechselwirkung mit dem Affilin® 138809. Insgesamt wurden 45 Möglichkeiten einer Wasserstoffbrückenbindung (2,6 Å - 3,5 Å; (Stryer 1995)) und vier Salzbrücken (< 4 Å; (Kumar 2002)) berechnet werden.

Der berechnete isoelektrische Punkt der Fibronectin-Domäne 7B8 lag bei 4,1. Die daraus bedingte negativ geladene Oberfläche (Kristallisationspuffer pH 6,0) ist in Abbildung 3-43 deutlich erkennbar. Die Kontaktfläche des Affilin®-Moleküls besteht vorwiegend aus positiv geladenen Resten, wodurch die Bindung begünstigt wurde.



**Abbildung 3-43: Ladungsverteilung auf der Oberfläche.** Draufsicht der jeweiligen Kontaktflächen. Negative Oberflächenladungen sind rot dargestellt, positive blau. **(A)** Fibronectin-Domänen 7B8 **(B)** Affilin® 138809.



**Abbildung 3-44: Struktur der Affilin®-Variante 138809 (orange) und an der Bindung beteiligte Reste.** Rot dargestellte Reste sind mit der Sequenz des Ubiquitin-Dimers identisch. Grüne Reste wurden durch Randomisierung ausgetauscht und sind an der Bindung beteiligt, während blau Reste durch Randomisierung entstanden sind, aber nicht an der Bindung direkt beteiligt sind (siehe Abbildung 3-45).

Bei der Untersuchung der an der Bindung beteiligten Reste wurden einige Aminosäuren ermittelt, die ebenso in der Sequenz des Ubiquitin-Dimers (Abbildung 3-45) vorhanden sind. Diese traten vorwiegend im C-terminalen Affilin®-Modul auf. Insgesamt konnten fünf der 14 veränderten Reste identifiziert werden, die direkt an der Bindung beteiligt waren. Einige Aminosäuren befanden sich jedoch in unmittelbarer Nähe zu beteiligten Aminosäuren, was ebenfalls einen Einfluss auf die Bindung haben kann.

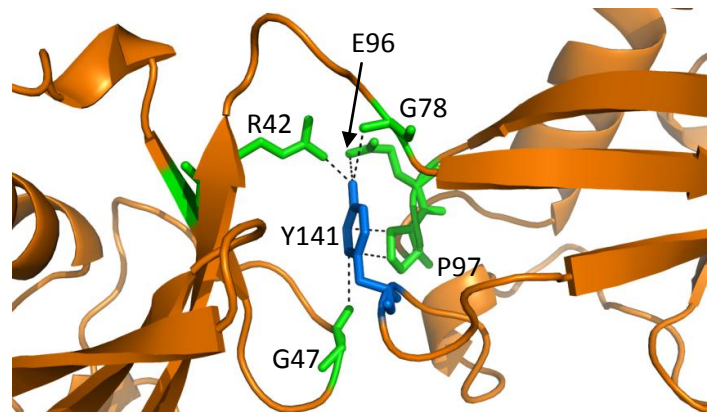
```

Diubiquitin 1 mqifvktltgkttilevpsdtienvkakiqdkqipdqqrliwagkqledgrtllsdyniqkestlhlvlrlraagig
138809      1 mqifvtttgkttilevpsdtienvkakiqdkqipqqqrliwagkqledgrtllsdynidylhlvlrlraag-g

Diubiquitin 80 mqifvktltgkttilevpsdtienvkakiqdkqipdqqrliwagkqledgrtllsdyniqkestlhlvlrlraag
138809      79 mqifvtttgkttilevpsdtienvkakiqdkqipdqqrliwagkqledgrtllsdynidylhlvlrlraag
    
```

**Abbildung 3-45: Alignment der Variante 138809 gegenüber dem Wildtyp-Affilin®.** An der Bindung beteiligte Aminosäuren wurden farbig markiert. Rot: Reste die bereits in der Wildtyp-Sequenz vorhanden waren. Grün: Substituierte Reste der Variante 138809. Blau: Substituierte Reste, die nicht an der Bindung beteiligt sind.

Die Aminosäure Y141 wurde ebenfalls durch Randomisierung der Position in das Affilin®-Molekül eingebracht. Dieser Tyrosin-Rest tritt mit den intermolekularen Resten R42, G47, G78, E96 und P97 in Kontakt. Damit könnte eine Stabilisierung des N- und C-terminalen Affilin®-Modules zueinander erfolgen.



**Abbildung 3-46: Nahaufnahme der Aminosäure Y141 und benachbarte Reste.** Die gemessenen Distanzen (gestrichelte Linie) des Tyrosins an Position 141 mit den benachbarten Aminosäuren R42, G47, G78, E96 und P97 betragen zwischen 3,4 und 3,5 Å.



## 4 Diskussion

Antikörper finden seit über zwanzig Jahren eine breite Anwendung in Forschung und Diagnostik. Durch ihre Fähigkeit Zielstrukturen mit hoher Affinität und Spezifität zu binden, gewinnen sie ebenso immer mehr an Bedeutung in der Therapie (Reichert 2014). Diverse monoklonale Antikörper oder Präparate basierend auf Immunglobulinen sind mittlerweile in der EU und den USA zugelassen worden. Jedoch ist die Nutzbarkeit von Antikörpern durch deren Größe und die dadurch verminderte Fähigkeit zur Gewebepenetration für einige Anwendungen beschränkt. Der komplexe Aufbau der Moleküle führt des Weiteren zu einer kostenintensiven Herstellung. Diese Nachteile führten zur Entwicklung von Antikörperfragmenten (Dumoulin 2002; Borrás 2010), die jedoch eine verringerte Stabilität *in vivo* zeigten (Holliger 2005).

Als möglicher Lösungsansatz wurde eine Vielzahl von natürlichen und artifiziellen Gerüstproteinen (*scaffolds*) zur Generierung alternativer Bindeproteine untersucht. Die prinzipielle Machbarkeit wurde für verschiedene Anwendungen in Therapie und Diagnostik demonstriert (Fiedler 2007; Lipovsek 2011; Lorey 2014). Neben der ähnlich hohen Affinität und Spezifität wie Antikörper besitzen diese alternativen Bindeproteine nur eine geringe Größe und bestehen zudem oft nur aus einer Polypeptidkette. Viele dieser Bindeproteine weisen zudem eine hohe Thermostabilität auf und benötigen meist keine Disulfidbrücken oder posttranslationale Modifikationen.

In dieser Arbeit wurde als alternatives *scaffold* ein Ubiquitin-Dimer verwendet. Auf diesem Molekül war durch die Substitution von insgesamt 14 oberflächenexponierten Aminosäureresten eine *de novo*-Bindestelle erzeugt worden (Fiedler 2004). Zur Identifizierung von Bindeproteinen (Affilin®-Molekülen) wurde eine Selektion auf der Extradomäne B des Fibronektins durchgeführt. Diese Domäne wird bei der Angiogenese und damit in unmittelbarer Umgebung von wachsenden Tumoren gebildet und stellt somit einen relevanten Tumormarker dar (Santimaria 2003).

### 4.1 Generierung von ED-B-bindenden Affilin®-Molekülen

Bei der Generierung von künstlichen Bindeproteinen können verschiedene Ansätze verfolgt werden. Neben der Erzeugung von artifiziellen *scaffolds* (Dallüge 2007; Stordeur 2013) wurden bevorzugt natürlich vorkommende Gerüstproteine genutzt. Am Beispiel der auf Lipocalinen basierenden Anticaline® konnte demonstriert werden, dass die gezielte Einführung von Aminosäuresubstitutionen in der bereits vorhandenen Bindestelle zur Änderung von gewünschten Bindeeigenschaften führte (Gebauer 2013). Dabei wurde durch die Verwendung von kombinatorischem Protein-Design und gerichteter Evolution eine Affinität gegenüber der Extradomäne B des Fibronektins erzeugt.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Ansatz beruht auf der Erzeugung einer *de-novo*-Bindestelle auf einem Ubiquitin-Molekül. Ubiquitin ist durch seine kompakte Struktur aus fünf antiparallelen Faltschichten und einer Helix sowie durch die hohe Stabilität gegenüber Temperatur und pH-Werten sehr gut als alternatives *scaffold* geeignet. Mit diesem Ansatz sollten Ubiquitin-basierte Affilin®-Moleküle selektiert werden, die die Extradomäne B (ED-B) des Fibronektins spezifisch binden. Die Isoform des Fibronektins mit der Extradomäne B stellt einen relevanten

Tumormarker dar und ist als Bestandteil der extrazellulären Matrix leicht über die Blutbahn für therapeutische Proteine erreichbar. Mehrere klinische Studien konnten erfolgreich die Relevanz von ED-B-spezifischen Antikörpern für eine therapeutische Anwendung in Verbindung mit Radionukliden oder Zytokinen belegen (Sauer 2009). Um eine native Darstellung der Extradomäne B zu erzielen, wurden die flankierenden Domänen 6, 7, 8 und 9 in das Targetkonstrukt einbezogen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Konstrukt 67B89 erfolgreich in ausreichenden Mengen als rekombinantes Protein aus *E. coli* gewonnen werden konnte.

Die *de-novo*-Bindestelle wurde durch eine Randomisierung von ausgewählten Aminosäurepositionen generiert. Durch eine rechnergestützte Analyse waren sowohl oberflächenexponierte Reste, die an einer Bindung beteiligt sein könnten, als auch Reste identifiziert worden, die durch Substitutionen nur einen geringen oder keinen Einfluss auf die Stabilität des Ubiquitins ausüben sollten. Die daraus ausgewählten Aminosäurereste befanden sich auf dem N-terminalen Faltblattstrang (Position 6), auf einer *loop* (Position 8) sowie auf dem C-terminalen Faltblatt (Positionen 62-66) und bildeten eine zusammenhängende Kontaktfläche. Eine cDNA-Bibliothek mit diesen Mutationen wurde durch die Triplet-Technologie erzeugt. Bei dieser Bibliothekssynthese wird jeweils nur ein definiertes Codon pro Aminosäure benutzt, um eine Überrepräsentation mehrfach kodierter Aminosäuren wie z.B. Serin oder Leucin zu vermeiden. Des Weiteren wurde die thiolreaktive Aminosäure Cystein bei der Synthese ausgeschlossen, um die Ausbildung von Disulfidbrücken zu vermeiden. Anschließend wurden zwei cDNA-Bibliotheken genetisch mit einem Linker bestehend aus den Aminosäuren Glycin-Isoleucin-Glycin fusioniert. Als Resultat wurde eine Sequenzfunktionalität von 65 % ermittelt. Dabei traten die Aminosäuren Prolin, Glycin, Arginin, Threonin und Alanin leicht überrepräsentiert (7-11 %) auf, während Phenylalanin, Tyrosin, Lysin und Isoleucin unterrepräsentiert (<3 %) vorlagen. Diese Abweichungen befanden sich in einem tolerierbaren Rahmen. Eine Auswirkung auf die Sequenzen der selektierten Affilin<sup>®</sup>-Moleküle (Tabelle 4-1) konnte nicht beobachtet werden.

Die Selektion von ED-B-bindenden Affilin<sup>®</sup>-Molekülen wurde mittels *phage display* durchgeführt. Mit dieser Methode können theoretisch Diversitäten von ca.  $10^{11}$  bis  $10^{12}$  abgebildet werden. Die Bibliotheksgröße bedingt direkt die Affinität der selektierten Proteine, wodurch mit höherer Komplexität ebenso die Wahrscheinlichkeit auf affinere Bindeproteine erhöht wird (Skerra 2003). Die Größe einer Phagemidbibliothek ist jedoch durch die Transformationseffizienz des jeweiligen Bakterienstammes limitiert. Neben der Komplexität spielt die Diversität an funktionellen Proteinen eine bedeutende Rolle. In einer Voruntersuchung wurde die funktionelle Größe der eingesetzten Phagemid-Bibliothek mit  $2,52 \cdot 10^9$  ermittelt. Bei einer Randomisierung von 14 Resten auf einem Di-Ubiquitin, jeweils sieben pro Monomer, wäre bei der Verwendung von 19 Aminosäureresten eine Komplexität von etwa  $8 \cdot 10^{17}$  Variante zu erwarten. Somit wurde nur ein Teil der möglichen Sequenzen untersucht. Um einen größeren Teil einer solchen Bibliothek untersuchen zu können, müsste z.B. auf ein *ribosome display* mit möglichen Bibliotheksgrößen von  $10^{14}$  zurückgegriffen werden (Amstutz 2001). Eine weitere Möglichkeit wäre die Verringerung der Komplexität der Bibliothek an sich. Beispielsweise könnten die Anzahl der randomisierten Positionen verringert oder einige Aminosäuren wie z.B. Prolin oder Methionin ausgeschlossen werden. Diese beiden Aminosäuren können sich negativ auf die Proteinstabilität auswirken. Prolin kommt sowohl in der *cis*- als auch in der *trans*-Konformation vor. Da die Isomerisierung ein recht langsamer Prozess ist, kann dies die Proteinfaltung benachteiligen (Wedemeyer 2002). Die Aminosäure Methionin kann zu Methionin-sulfoxid oxidiert werden. Da die oxidierte Form hydrophiler ist, kann es zu einer Störung der Faltung kommen (Levine 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden parallel zwei verschiedene *phage displays* mit unterschiedlichen Targetmengen durchgeführt (siehe Anhang Tabelle 2-28 und Tabelle 2-29). Des Weiteren wurden die Phasen der Phagenvorinkubation, der Targetbindung und der Elution jeweils bei 37 °C durchgeführt, um thermostabile Affilin®-Varianten zu selektieren. Mit dem *phage display*-Verfahren konnten innerhalb von vier Zyklen Affilin®-Moleküle gegen das Targetprotein 67B89 selektiert werden (siehe Kapitel 3.2.1). Allerdings erfolgte keine Anreicherung einzelner Sequenzen. Bei anderen firmenintern durchgeführten *phage displays* mit identischer Durchführung, jedoch bei Raumtemperatur, konnten nach dem vierten Zyklus Proteinsequenzen mit 15 % - 40 % Anreicherung beobachtet werden. Da die Inkubation bei 37 °C nicht nur die Affilin®-Moleküle an sich, sondern auch deren Bindung beeinflussen kann, müssten weitere Untersuchungen zur Temperatur durchgeführt werden. Beispielsweise könnte eine Vorinkubation der Phagen bei erhöhter Temperatur z.B. 50 °C erfolgen (Jung 1999), jedoch die Targetbindung bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Somit würden thermolabile Proteine aus der Selektion eliminiert werden ohne die Bindung bzw. die Elution der Phagen durch eine erhöhte Temperatur zu beeinflussen.

Aus insgesamt ca. 700 zufällig ausgewählten Klonen aus beiden *phage displays* wurden 16 Proteinvarianten durch ein ELISA-basiertes *screening* für eine genauere Charakterisierung ausgewählt. Hinsichtlich Affinität gegen das Target 67B89 waren keine Unterschiede resultierend aus den verschiedenen präsentierten Targetmengen der zwei *phage displays* erkennbar. Des Weiteren konnte lediglich bei acht der ausgewählten Affilin®-Moleküle die gewünschte Affinität nachgewiesen werden. Bei diesen acht Bindeproteinen konnten einige Übereinstimmungen bezüglich der randomisierten Positionen ermittelt werden (siehe Kapitel 3.2.2). Auf Grund der geringen Anzahl ist keine relevante statistische Auswertung möglich. Auffällig war eine Anhäufung von hydrophoben und aromatischen Resten, die eine Affinität zum Targetprotein begünstigen könnten. Einen weiteren positiven Effekt kann das Einbringen von positiv geladenen Aminosäuren (Position 64 im C-terminalen Monomer) im exponierten  $\beta$ -Faltblatt bewirken. Im N-terminalen Modul konnte lediglich an der *loop*-Position 8 eine Anhäufung hydrophober Aminosäuren beobachtet werden.

**Tabelle 4-1: Anreicherungen von Aminosäuren in den mittels *phage display* selektierten Varianten**

Aminosäure-Position	Anreicherung	Aminosäure-Typ	Aminosäuren
8	4/8	hydrophob	V, M, A, I
87 (8)*	5/8	aromatisch	Y (3x), W
143 (64)*	5/8	positiv geladen	R (4x), H
144 (65)*	4/8	hydrophob	A (2x), V, M

\* entsprechende Position in C-terminalen Modul des Affilin®-Moleküls

Die letztlich aus dem *phage display* ausgewählte Affilin®-Variante 129091 wies eine spezifische Affinität von 414 nM auf. Andere Affilin®-Moleküle, die aus *phage displays* mit gleichen oder ähnlichen Bedingungen bei Raumtemperatur selektiert wurden, besaßen im Vergleich dazu eine 10- bis 25-fach bessere Affinität. Die Ausbeute der Variante 129091 war mit 3,2 mg/L Kultur etwas höher als bei der Herstellung von Antikörper oder Antikörperfragmenten in *E. coli* (Chan 2010).



## 4.2 Erzeugung von maturierten Affilin®-Molekülen

Da das Affilin®-Molekül im späteren Verlauf mit Interleukin-2 fusioniert werden sollte, war eine Affinität von  $K_D = 414$  nM für ein therapeutisches Konstrukt zu schwach. Im Vergleich dazu wiesen die Antikörper-IL-2-Fusionen chTNT-3/IL-2 und L19-IL2 einen subnanomolaren  $K_D$ -Wert auf (Pini 1998; Hornick 1999). Aus diesem Grund wurde eine Affinitätsmaturierung durchgeführt. Eine Mutagenese kann mit verschiedenen Methoden wie z.B. dem Einsatz von Chemikalien wie Ethylmethylsulfonat (Grzesiuk 1993) oder mit Hilfe von Mutatorstämmen (Muteeb 2010) durchgeführt werden. Für eine Maturierung von Antikörpern oder deren Fragmenten hat sich neben dem *chain shuffling* (Christensen 2009) die Methode der *error-prone* PCR (Boder 2000) als erfolgreich erwiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde bewusst die *error-prone* Maturierung eingesetzt, um zufällige Mutationen einzufügen und somit weitere Aminosäurepositionen zu identifizieren, die einen positiven Einfluss auf die Affinität bewirken. Um den Effekt der *error-prone* PCR an einem affineren Bindeprotein zu untersuchen, wurde zusätzlich die Variante 102472 ( $K_D$ -Wert 16 nM) in die Maturierung eingebunden. Das Affilin® 102472 war aus der gleichen Bibliothek und unter vergleichbaren Bedingungen wie im selbst durchgeführten *phage display* selektiert worden, jedoch mit dem Unterschied, dass die Selektion bei Raumtemperatur und nicht bei 37 °C stattfand.

Mit Hilfe der *error-prone* PCR konnten Mutationen zufällig über das Gen verteilt werden und somit auch Aminosäurepositionen beeinflussen, welche nicht in die ursprüngliche Randomisierungsstrategie einbezogen worden waren. Zunächst wurde die Mutationsrate in Abhängigkeit der eingesetzten DNA-Menge untersucht. Dabei konnte eine leichte Erhöhung der Mutationsrate durch eine 10-fach geringere DNA-Menge erzielt werden (siehe Kapitel 3.3.2). Eine zusätzliche Steigerung könnte in weiteren Versuchen durch das Einbringen von  $Mn^{2+}$ -Ionen (El-Deiry 1984) oder Nukleotidanaloga (Zaccolo 1996) erfolgen. Da jedoch bei einer zu hohen Mutationsrate der Anteil der funktionellen Sequenzen stark abnimmt (Drummond 2005), wurde eine Rate von 5-6 Mutationen pro Gen durch den Einsatz von 0,5 ng DNA-*template* eingestellt. Ein Nachteil der *error-prone* PCR ist jedoch die Insertion oder Deletion von Basen, wodurch der Anteil an funktionellen Varianten durch *frameshifts* reduziert wird (Wong 2007). Im vorliegenden Fall waren es bis zu 27 % *frameshifts*. Da nach der *error-prone* PCR die Bibliothek eine theoretische Diversität von über  $10^{10}$  Varianten aufwies, musste eine erneute Selektion durchgeführt werden. Dabei wurde auf die Methode des *ribosome displays* zurückgegriffen, da die Klonierung der Bibliothek in einem RD-fähigen Format erheblich schneller geht und keine Inkubation bei erhöhter Temperatur wie beim ersten *phage display* vorgenommen werden sollte. Alternativ wäre auch eine gekoppelte Maturierung und Selektion möglich, in dem zwischen zwei *ribosome display*-Zyklen eine *error-prone* PCR durchgeführt wird. Da als Ausgangspunkt der Maturierung zwei konkrete Varianten und keine Bibliothek vorlag, wurde zunächst die *error-prone* PCR durchgeführt und anschließend selektiert. Nach vier Zyklen im *ribosome display* konnte bereits in der Sequenzierung des DNA-Pools der Variante 102472 eine Anreicherung von Aminosäuren an sechs Positionen festgestellt werden. Für den von der Variante 129091 abstammenden Sequenzpool wurde keine Anhäufung erzielt.

Durch die hohen *frameshift*-Raten, die während der *error-prone* PCR auftraten, müsste die Anzahl der zu untersuchenden Klone in einem *screening* stark erhöht werden, um möglichst viele funktionelle Proteine zu analysieren. Um dies zu umgehen, wurde ein Expressionsvektor erzeugt, der das Affilin® mit einer C-terminalen *enhanced* GFP-Fusion kodierte. Durch diese Fusion sollte eine

selektive Auswahl von Klonen möglich werden, welche nur funktionelle Zielproteine produzierten und ein ausreichendes Expressionslevel besitzen. Tatsächlich spiegelte die Anzahl der nicht fluoreszierenden Klone in etwa die *frameshift*-Rate wieder. Insgesamt wurden 630 bzw. 720 stark fluoreszierende Kolonien der jeweils vierten *ribosome display*-Runde zufällig für ein *screening* ausgewählt. Ausgehend von den Resultaten des *screenings* wurden insgesamt 14 Affilin®-Moleküle abstammend von der Variante 102472 bzw. 10 Abkömmlinge der Elternvariante 129091 auf Grund ihrer Affinität und Spezifität ausgewählt. Aus der Sequenzanalyse konnte das Ergebnis der Poolsequenzierung nach dem *ribosome display* bestätigt werden. Dabei traten bei den Abkömmlingen der Variante 102472 an einigen Aminosäurepositionen Anreicherungen auf. Sehr dominant war der Doppelaustausch M80I und I82T in 13 von 14 Sequenzen vertreten (siehe Kapitel 3.3.4). Bei den Abkömmlingen der Variante 129091 waren keine Mutation mehrfach vorhanden.

Anschließend wurden die 24 ausgewählten Affilin®-eGFP-Fusionen in einem größeren Maßstab gereinigt, um eine genauere Charakterisierung vornehmen zu können. Bereits bei der Herstellung fiel eine starke Tendenz zur Bildung von *inclusion bodies* auf. Selbst der eGFP-fusionierte Di-Ubiquitin-Wildtyp erzielte nur eine Löslichkeit von ca. 50 %. Im Vergleich dazu wurde das Di-Ubiquitin ohne eGFP-Fusion fast vollständig in löslicher Form exprimiert. Die erhaltenen *inclusion bodies* zeigten jedoch eine deutliche Fluoreszenz, was auf eine intakte Faltung des eGFP schließen lässt. Das N-terminale Affilin®-Molekül der Fusion verlässt zuerst den Ribosomenkanal und sollte durch eine schnelle Faltung die richtige Konformation einnehmen. Das eGFP sollte dabei das Affilin®-Molekül durch den dazwischen liegenden Strep-tag II nicht stark behindern. Zur Überprüfung dieser Theorie müssten weitere Konstrukte mit einem längeren bzw. kürzeren Linker zwischen den Fusionspartnern durchgeführt werden. Des Weiteren wird Ubiquitin natürlicherweise als Multimer-Kette hergestellt und sollte somit grundsätzlich für eine Fusion geeignet sein (Wiborg 1985). In der Literatur ist beschrieben, dass GFP bei Überexpression ebenfalls zur Aggregation neigt (Tsumoto 2003). Es wurde jedoch auch gezeigt, dass ein großer Anteil des GFPs in *inclusion bodies* eine korrekte Faltung aufweist und unter nicht-denaturierenden Bedingungen extrahiert werden konnte (Peternel 2008; Peternel 2011). Dieses Verhalten konnte ebenso auf GFP-Fusionen übertragen werden. Ein wichtiger Einflussfaktor stellte dabei der Linker dar (Huang 2013). Da in dieser Arbeit lediglich das lösliche Protein untersucht wurde, könnte in einem weiteren Schritt die Untersuchung der *inclusion bodies* auf aktives Protein vorgenommen werden. Neben der verringerten löslichen Synthese der eGFP-Fusionen wurde während der Reinigung ein großer Anteil an Aggregaten beobachtet, wodurch nur sehr geringe Ausbeuten von maximal 0,7 mg/g Biofeuchtmasse (entsprach 2,4 mg/L Kultur) erzielt wurden.

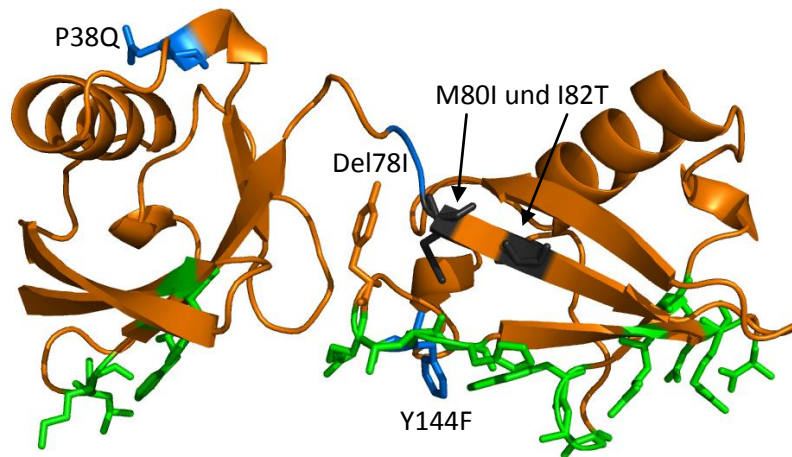
Aus der Maturierung der Affilin®-Variante 129091 konnten keine Bindeproteine mit deutlich gesteigerter Affinität erzeugt werden. Um den Einfluss des eGFPs auf die biochemischen Eigenschaften der Bindeproteine genauer zu untersuchen, wurden die Affilin®-Moleküle umklontiert und ohne Fusionspartner hergestellt. Dabei konnte der Anteil an Aggregaten während der Reinigung deutlich verringert werden. Die Affinität gegenüber dem Targetprotein 67B89 war mit den eGFP-Fusionen vergleichbar und lag im dreistelligen nanomolaren Bereich. Somit konnte ein negativer Einfluss des eGFPs auf die Bindung ausgeschlossen werden. Da ein Affilin®-Molekül mit einer Affinität von über 400 nM nicht für eine weitere Verwendung zur Herstellung einer therapeutischen Interleukin-2-Fusion geeignet wäre, wurden in den nachfolgenden Untersuchungen nur noch Abkömmlinge des Affilin®-Moleküls 102472 betrachtet.

Im Gegensatz zum Affilin® 129091 konnten von der Variante 102472 erfolgreich affinitätsmaturierte Bindeproteine als eGFP-Fusion gewonnen werden. Zwölf von 14 ausgewählten Proteinen aus dem ELISA-basierten *screening* wurden in einem größeren Maßstab hergestellt und analysiert. Dabei konnten mittels SPR Affinitäten gegenüber dem Targetprotein 67B89 von 0,2-1,4 nM nachgewiesen werden. Ein spezifischer Bindungsnachweis konnte zudem auf ED-B-exprimierenden Wi-38-Zellen erbracht werden. Anschließend wurden vier ausgewählte Bindeproteine ohne eGFP-Fusion hergestellt und mittels C-terminalem Strep-tag II gereinigt. Ein deutlicher Unterschied war in der Herstellbarkeit zu verzeichnen. Die Affilin®-Moleküle mit Strep-tag II wiesen eine gesteigerte Ausbeute von 2,3-7,4 mg/g Biofeuchtmasse (11,9-17,4 mg/L Kultur) auf. Wie bereits für die Abkömmlinge der Variante 129091 konnte dabei mittels ELISA, SPR und im zellbasierten Assay eine vergleichbare Affinität wie bei den eGFP-Fusionen ermittelt werden. Final wurden zwei Abkömmlinge mit einer SPR-ermittelten Affinität zum Targetprotein 67B89 von 0,9 nM bzw. 2,2 nM für weitere Untersuchungen ausgewählt. Somit konnte durch die eingesetzte Maturierungsstrategie eine 7-bis 17-fache Verbesserung des  $K_D$ -Wertes erzielt werden. In der Affinitätsuntersuchung mittels SPR konnte gezeigt werden, dass die Bindeproteine eine stärkere Erniedrigung der Dissoziationsrate als Erhöhung Assoziationsrate besaßen. Dieser Effekt ist auf die stringente Waschprozedur im *ribosome display* zurückzuführen.

Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass durch die Auswahl fluoreszierender Kolonien im *screening* funktionelle Klone selektiert werden konnten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein C-terminale Fusion mit eGFP keinen negativen Einfluss auf die Bindungseigenschaften der Affilin®-Moleküle hatte. Auf Grund der Bildung von *inclusion bodies* und starker Aggregation der Proteine während der Reinigung wurde die Ausbeute der Fusionsproteine im Vergleich zu den nicht fusionierten Affilin®-Molekülen deutlich herabgesetzt.

Ein Vorteil von Fusionen mit Fluoreszenzproteinen wie eGFP ist der mögliche Einsatz in einem ELISA-basierten *screening* ohne zusätzlich nötigen Antikörper zum Nachweis. Erste Untersuchungen dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Auf Grund von sehr schwacher Signalintensität konnten diese Daten jedoch nicht ausgewertet werden. Eine mögliche Verbesserung der Signalintensität könnte der Einsatz von anderen oder verbesserten Fluoreszenzproteinen wie GFPy erzielen (Zhang 2010).

Wie bereits erwähnt, besaßen 13 der ausgewählten 14 Abkömmlinge der Affilin®-Variante 102472 den Doppelaustausch M80I und I82T, alle anderen Mutationen traten jedoch nur vereinzelt auf. Da alle Proteine Affinitäten in einem ähnlichen Bereich aufwiesen, lag die Vermutung nahe, dass der Doppelaustausch ausschlaggebend für die Affinitätsverbesserung war. Die übrige Variante CP2-F12 (138809) besaß hingegen drei andere Mutationen (P38Q, Y144F und Del78I), aber dennoch eine ähnlich stark verbesserte Bindung im Vergleich zur Ausgangsvariante. Daher wurden diese drei Mutationen und der Doppelaustausch einzeln in die Elternvariante 102472 eingeführt, um die Auswirkungen untersuchen zu können. Erwartungsgemäß führte der Doppelaustausch zu einer sehr starken Affinitätsverbesserung, die mit denen der Abkömmlinge vergleichbar war. Bei den drei anderen Mutationen konnte bei den zwei Punktaustauschen P38Q und Y144F nur eine leichte Verbesserung im  $K_D$ -Wert auf 7,9 nM bzw. 5,4 nM festgestellt werden. Die Deletion im Linker wies jedoch einen sehr starken Effekt, vor allem auf die Dissoziationsrate, auf.



**Abbildung 4-1: Kristallstruktur der Variante 138809 (CP2-F12 ohne Affinitäts-tag).** Auf der Kristallstruktur sind verschiedene Aminosäurereste farbig hervorgehoben. Grün: An der Targetbindung beteiligte Aminosäurereste. Blau: Mutationen P38Q, Y144F und die Deletion im Linker Dell78. Schwarz: Doppelmutation M80I und I82T.

Zur besseren Erklärung ist in der Abbildung 4-1 die Kristallstruktur der Variante 138809 (Kapitel 3.5.3) gezeigt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt wurde. Die grün hervorgehobenen Reste stellen die Kontaktfläche des Affilin<sup>®</sup>-Moleküls mit dem Targetprotein 67B89 dar. Zusätzlich sind die Mutationen P38Q, Y144F und die Deletion im Linker blau markiert. Aus der Kristallstruktur ist deutlich zu erkennen, dass die Mutation Y144F in der Interaktionsfläche des Affilin<sup>®</sup>-Moleküls mit dem Target 67B89 enthalten ist und somit die Affinität beeinflussen kann. Das eingesetzte Phenylalanin besitzt im Vergleich zum substituierten Tyrosin keine polare OH-Gruppe. Dadurch besitzt das Phenylalanin einen hydrophoberen Charakter und kann somit die Bindung des Targets begünstigen. Die zweite Mutation P38Q liegt räumlich auf der Kontaktflächen-abgewandten Seite des Affilin<sup>®</sup>-Moleküls. Somit liegt die Vermutung nahe, dass diese Substitution nur einen geringen Einfluss auf die Bindefläche des Proteins ausübt. Dies konnte in Kapitel 3.3.6 mit der Untersuchung der einzelnen Mutationen hinsichtlich der Affinität bestätigt werden. Da sich diese Aminosäure an der Oberfläche des Proteins und nicht an der Bindestelle befindet, kann ein hydrophiler Rest (Glutamin) im Vergleich zu einer hydrophoben Aminosäure (Prolin) die Löslichkeit begünstigen. Des Weiteren kann die Aminosäure Prolin in *cis*- oder *trans*-Konformation vorliegen und dadurch die Faltung bzw. Stabilität des Proteins beeinflussen. Der größte Einfluss auf die Affinität trat bei der Deletion des Isoleucins im Linker zwischen den beiden Affilin<sup>®</sup>-Modulen auf. Wie bereits in Abbildung 3-46 gezeigt, befand sich zwischen den beiden Modulen ein Tyrosinrest (Y141), welcher in Kontakt zu mehreren Aminosäureresten beider Module trat. Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen konnte möglicherweise die Ausrichtung der zwei Monomere zueinander begünstigt werden. Auch der verkürzte Linker könnte in diesem Zusammenhang eine positive Auswirkung auf die räumliche Ausrichtung besitzen und somit eine Bindung begünstigen. Die Doppelsubstitution M80I und I82T ist ebenfalls in Abbildung 4-1 dargestellt. Dabei ist ersichtlich, dass die zwei Mutationen seitlich und entfernt von der Bindefläche der Variante 138809 liegen. Dieser Austausch trat bei fast allen mittels *error-prone* PCR generierten Abkömmlingen der 102472 auf und übte einen erheblichen Einfluss auf die Affinität aus. Möglicherweise besitzen die Affilin<sup>®</sup>-Moleküle mit diesem Austausch eine andere Orientierung zum Targetprotein als die Variante 138809. Zur Bestätigung dieser Hypothese müsste eine Strukturaufklärung in Komplex mit dem Targetprotein erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es jedoch nicht auswertbare Kristalle mit der Variante 138810 zu erzeugen. Beispielsweise könnten aber auch andere Abkömmlinge mit diesem Doppelaustausch verwendet werden, um eine weitere Strukturaufklärung vorzunehmen.

### 4.3 Fusion von Affilin®-Molekülen mit Interleukin-2

Die in Kapitel 3.3.5 charakterisierten Affilin®-Moleküle 138809 und 138810 wurden über einen dreifachen S<sub>4</sub>G-Linker C-terminal mit humanen Interleukin-2 fusioniert. Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein Ubiquitin-Dimer als Fusion hergestellt. Interleukin-2 besitzt drei Cysteinreste, von denen die Reste C58 und C105 eine stabile Disulfidbrücke ausbilden und C125 als freies Cystein vorliegt (Robb 1984). Da freie Cysteinreste bei der rekombinanten Herstellung zu Multimeren oder Aggregation führen können, wurde die Punktmutation C125S eingeführt. Dieser Austausch ist in der Literatur beschrieben und sollte weder die Stabilität noch die biologische Aktivität beeinträchtigen (Doyle 1985; Boone 1988). In der vorliegenden Arbeit konnten alle Fusionskonstrukte, sowohl mit Interleukin-2 als auch mit der abgewandelten Interleukin-2 Variante C125S, erfolgreich in *E. coli* hergestellt werden. Aus einem vorangegangenen Expressionstest mit der Diubiquitin-Interleukin-2-Fusion war bekannt, dass das Fusionsprotein bei allen getesteten Bedingungen hinsichtlich Expressionsstamm und Temperatur vorwiegend unlöslich in Form von *inclusion bodies* vorlag. Dies war wahrscheinlich auf die Nichtausbildung der Disulfidbrücke im Interleukin-2 zurückzuführen. Um dennoch eine lösliche Proteinproduktion in *E. coli* durchzuführen zu können, wäre eine Untersuchung der Sekretion ins Periplasma durch N-terminales Signalpeptid wie pelB möglich (Yoon 2010). Der periplasmatische Raum stellt ein oxidierendes Kompartiment dar, in dem eine Ausbildung von Disulfidbrücken möglich ist. Als Nachteile dieser Methode ist das niedrige Expressionsniveau zu nennen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von Stämmen mit veränderten Redoxbedingungen im Cytosol. Diese *E. coli*-Stämme wie z.B. AD494 oder Origami™ erlauben die Ausbildung von Disulfidbrücken durch Inaktivierung der Thioredoxin-Reduktase (Stewart 1998). Die unlösliche Proteinproduktion in Form von *inclusion bodies* bietet jedoch auch Vorteile wie das sehr hohe Expressionsniveau und den Schutz vor proteolytischen Abbau. Zudem liegen die denaturierten Zielproteine meist mit relativ hoher Reinheit in den *inclusion bodies* vor (Lilie 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine präparative Faltung aus *inclusion bodies* vorgenommen (Middelberg 2002). Nach der Solubilisierung der Einschlusskörper mussten zunächst günstige Faltungsbedingungen in einem *screening* ermittelt werden. Dabei wurden neben dem pH-Wert verschiedene Pufferzusätze untersucht. Die vollständige Faltungsmatrix ist der Tabelle 2-7 zu entnehmen. Die finalen Bedingungen enthielten 3 M Harnstoff für die Diubiquitin-Fusion und 0,7 M Arginin für die Affilin®-Fusionen in 50 mM Tris pH 9,0. Harnstoff ist eine chaotrope Verbindung und kann zu einer Reduktion von Aggregationseffekten führen. Arginin unterdrückt ebenfalls die Aggregation von Proteinen und erhöht die Löslichkeit von Faltungsintermediaten (Tsumoto 2004; Arakawa 2007). Zusätzlich wurde Gluthation in oxidiert und reduzierter Form hinzugegeben, um die Ausbildung von Disulfidbrücken zu erleichtern (Okumura 2011). In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass eine gepulste Zugabe des solubilisierten Proteins - wie in der Literatur beschrieben (Lilie 1998) - zu weniger unlöslichen Aggregaten führte. Eine weitere Optimierung des Prozesses ist möglich. Beispielsweise könnte der Einfluss der Zeitintervalle zwischen zwei Pulsen untersucht werden. Auch die eingesetzten Konzentrationen von 10 µg/ml pro Puls mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml Faltungsansatz und die Faltungsdauer könnten optimiert werden. Neben der Verdünnung in den jeweiligen Faltungspuffer kann eine *in vitro* Faltung von Proteinen ebenfalls mittels Dialyse (Tsumoto 2003) oder Chromatographie (Li 2004), dem so genannten *on-column refolding*, erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch keine weitere Optimierung durchgeführt, da die resultierenden Ausbeuten für die geplanten Untersuchungen ausreichend waren.

Nach der Faltung der Affilin®-Interleukin-2-Fusionen erfolgte die chromatographische Reinigung. In einem ersten Schritt wurde der jeweilige Faltungsansatz nach der Filtration über eine hydrophobe Interaktionschromatographie gereinigt. Anschließend wurden die vereinigten Elutionsfraktionen eingengt und mittels Gelfiltration gereinigt. Insgesamt konnten aus einer Schüttelkolbenkultur von 1 L berechnete Ausbeuten von 9,5 bis 30 mg gereinigtes Protein gewonnen werden. In der Literatur sind einige Strategien zur Herstellung von Interleukin-2 in *E. coli* mit anschließender *in vitro* Faltung und Reinigung beschrieben. Die Ausbeuten aus einer 1 L-Kultur betragen dabei 0,4 mg (Weir 1987), 2,9 mg (Sengupta 2008) bzw. 4,5 mg von bovinen Interleukin-2 (Kashima 1999).

Nach der Reinigung der Affilin®-Interleukin-2-Fusionen erfolgte eine ausführliche Charakterisierung hinsichtlich Reinheit, Stabilität und Affinität. Dabei konnte mittels SPR und auf ED-B-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden, dass die Affinität und Spezifität der Affilin®-Moleküle trotz C-terminaler Fusion unverändert blieb. Die biologische Aktivität des Interleukin-2 wurde in einem Proliferationsassay mit CTLL-2-Zellen analysiert. Dabei wurden mehrere Messreihen pro Fusionsprotein durchgeführt und die relative Aktivität gegenüber dem mitgeführten Standard (rekombinantes humanes Interleukin-2 mit dritten Cystein) berechnet. Dabei konnten für die Fusionskonstrukte, bei denen das Interleukin-2 das dritte Cystein beinhaltet eine relative Aktivität gegenüber rekombinanten Interleukin von 66-87 % ermittelt werden. Die Fusionen mit der Punktmutation C125S im IL-2 zeigten hingegen eine relative Aktivität von 164-241 %. Dieses Ergebnis ist ebenso in der Literatur für IL-2 und der C125S-Variante beschrieben (Boone 1988).

Allerdings wurde die Affinität des Affilin®-Moleküls und die Aktivität des Interleukins-2 in den Fusionsproteinen in unabhängigen Tests untersucht. Interleukin-2 bindet an den entsprechenden IL-2-Rezeptor und wird anschließend internalisiert. Somit müsste in einer weiteren Untersuchung gezeigt werden, ob auch die Affilin®-IL-2-Fusion im an Fibronectindomänen gebundenen Zustand internalisiert werden kann. Für diesen Versuch müsste das Fusionsprotein zunächst an das Targetprotein 67B89 oder ED-B-beinhaltenes Fibronectin gebunden werden, anschließend könnte die Internalisierung untersucht werden. Jedoch wurde auch bei Versuchen mit IL-2, das kovalent an eine unlösliche Matrix durch Glutaraldehyd-Quervernetzung gekoppelt wurde eine geringe Proliferation von CTLL-2-Zellen beobachtet, obwohl die laterale Diffusion des IL-2 und die Internalisierung des IL-2-Rezeptors verhindert wurde (Horwitz 1993). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass ein Teil der Interleukin-2 vermittelten Effekte auch ohne Internalisierung erhalten bleiben kann.

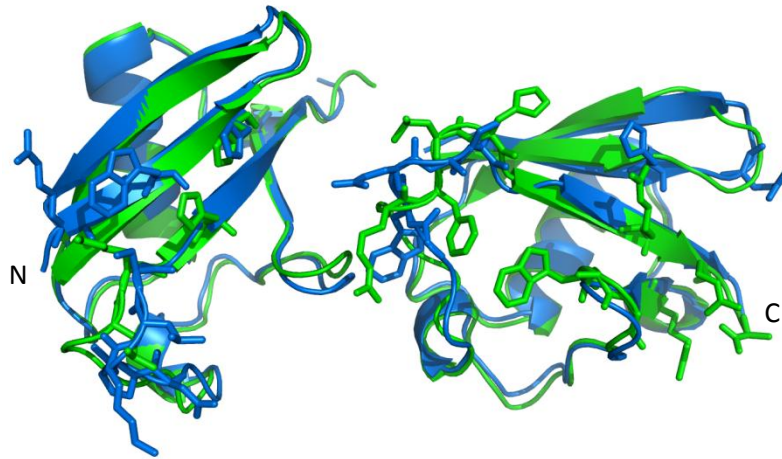
Auf aktivierten T-Zellen werden verschiedene Klassen von Interleukin-2-Rezeptoren exprimiert. Schwach bindende IL-2-Rezeptoren sind 10-30-fach häufiger auf der Zelloberfläche präsentiert als die stark bindenden Rezeptoren (Robb 1984). Der Unterschied zwischen diesen Rezeptoren liegt in der Dissoziationskonstante des IL-2. Während die stark bindenden Rezeptoren einen  $K_D$ -Wert von ca. 10 pM besitzen, liegt dieser Wert bei den schwach bindenden Rezeptoren etwa 1000-fach höher bei ca. 10 nM. Rezeptor-gebundenes Interleukin-2 wird entweder internalisiert oder dissoziiert vom Rezeptor. Somit könnte eine Affilin®-IL-2-Fusion trotz vorhandener IL-2-Rezeptoren außerhalb des Tumorgewebes über die Blutzirkulation zur Extradomäne B transportiert werden, um diese spezifisch zu binden und eine Anreicherung von IL-2 in der unmittelbaren Umgebung von Tumoren zu erzielen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine Generierung von Affilin®-Molekülen gegen ein therapeutisch relevantes Target und anschließende Herstellung als Fusion mit Interleukin-2 möglich ist. Die Affinität der Affilin®-Interleukin-2-Fusionen mit ca. 800 pM liegt über den Affinitäten der in der Literatur beschriebenen Antikörper- bzw. Antikörperfragmentfusionen chTNT-3/IL-2 und scfvL19-IL2 mit 54-625 pM. In dieser Arbeit sollte zunächst die Machbarkeit einer IL-2-Fusion demonstriert werden. Es besteht zudem die Möglichkeit andere Affilin®-Moleküle, die eine höhere Affinität zum Targetprotein 67B89 von 30 – 200 pM (Lorey 2014) mit IL-2 zu fusionieren.

#### 4.4 Strukturaufklärung von Affilin®-Molekülen

Eine wichtige Voraussetzung für die Generierung von künstlichen Bindeproteinen liegt in der Anzahl und Position von Aminosäureresten, durch deren Substitution eine potentielle Bindefläche erzeugt wird, ohne die Stabilität des Proteins zu stark zu beeinflussen. Mit der Struktur der Affilin®-Variante 77405 (Kapitel 3.5.3) konnte gezeigt werden, dass trotz der insgesamt 15 substituierten Aminosäurereste eine Ubiquitin-typische Faltung erhalten blieb. Auch bei einer Überlagerung der N- und C-terminalen Modulen der Varianten 77405, 138809 und mit Ubiquitin konnte nur eine sehr geringfügige Abweichung (RMSD=0,08-0,99) beobachtet werden (siehe Abbildung 3-40). Eine weitere Bestätigung der strukturellen Ähnlichkeit erfolgte durch eine Fern-UV-CD-Spektroskopie für das Affilin® 138809 und einem Diubiquitin (Abbildung 3-28).

Für das Affilin® 77405 konnte nur die Struktur des Bindeproteins und nicht die des Komplexes gelöst werden. In der Struktur befanden sich zusätzlich vier Kupfer-Ionen, die an den Histidinresten H6 und H8 bzw. an den Asparaginsäureresten D100 und D111 koordiniert waren. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Kupfer-Ionen durch das eingesetzte Additiv (Kupfer(II)chlorid-dihydrat) im Kristallisations-*screening* in das Affilin®-Molekül gelangten und somit keine funktionelle Rolle spielten. Auffällig war, dass die substituierten Aminosäurereste keine zusammenhängende potentielle Bindefläche auf dem N- und C-terminalen Modul bildeten. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die Anordnung der zwei Module zueinander durch die Kristallpackung beeinflusst wurde. Der Linker erlaubte zudem wahrscheinlich eine hohe Flexibilität in der Orientierung der beiden Module. In Abbildung 4-2 sind die zwei Module losgelöst voneinander dargestellt und wurden mit der Struktur der komplexgebundenen Variante 138809 verglichen. Dabei entspricht die Anordnung der Module von Variante 138809 der Orientierung im Komplex mit dem Targetprotein 67B89. Die grün hervorgehobenen Reste entsprechen dabei den mit dem Targetprotein interagierenden Aminosäuren und bilden somit die Bindestelle. Die blau markierten Substitutionen der Varianten 77405 waren in dieser Darstellung in räumlicher Nähe zu der benannten Bindestelle. Diese Darstellung soll jedoch nur zeigen, dass durch die Rotation in der Linkerregion eine ähnliche Anordnung wie bei der Affilin®-Variante 138809 möglich ist. Um den genauen Bindungsmodus des Affilin®-Moleküls 77405 zu untersuchen, müsste von dieser Variante ebenso eine Komplexstruktur gelöst werden.



**Abbildung 4-2: Vergleich der Affilin®-Varianten 77405 und 138809.** Grün: N- und C-terminales Modul der Variante 138809 mit den an der Bindung des Targetproteins 67B89 beteiligten Aminosäureresten. Die Anordnung der Module zueinander entspricht der Orientierung im Komplex. Blau: N- und C-terminales Modul der Variante 77405 ohne Linker, räumlich orientiert an den Modulen der Variante 138809. Die blauen hervorgehobenen Reste stellen die randomisierten Positionen dar.

Nach der äquimolaren Komplexbildung des Affilin®-Moleküls 138809 mit dem Targetprotein 7B8 wurde bei der Reinigung mittels Gelfiltration lediglich ein Peak eluiert. Mittels SE-HPLC und SDS-PAGE konnte der stabile Komplex nachgewiesen werden. Somit lag eine 1:1 Bindungsstöchiometrie vor. Durch die Kristallstruktur konnte eine Interaktionsfläche zwischen Bindeprotein und Target von ca.  $1100 \text{ \AA}^2$  berechnet werden. Durch die kristallbedingte Packung der sechs Moleküle in der Einheitszelle traten weitere Kontaktstellen zwischen Affilin® und Targetprotein auf. Diese besaßen jeweils nur eine Fläche von  $400\text{-}500 \text{ \AA}^2$ . Bei der Analyse von verschiedenen Antikörper-Antigen- bzw. Protein-Protein-Komplexen wurden typische Epitopkontaktflächen von  $600\text{-}1000 \text{ \AA}^2$  in den Proteinkristallen beobachtet (Janin 2007). Es wird davon ausgegangen, dass Kontaktflächen mit einer Größe von ca.  $500 \text{ \AA}^2$  nur zu kurz anhaltenden Interaktionen führen, während größere Flächen zur Bildung stabiler Komplexe beitragen können. Eine Bindung zwischen zwei Interaktionspartnern kann entweder über rigide Oberflächen, die gut zueinander passen oder über flexible Oberflächen verbunden mit Konformationsänderungen erfolgen. Bei der Komplexbildung von Affilin® und Target kommt es mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht zu einer flexiblen Veränderung der Oberfläche, da eine starke Übereinstimmung der Struktur des Affilin®-Moleküls 77405 und der im Komplex gebundenen Affilin®-Variante 138809 vorlag.

Für die Komplexbildung von Affilin® und Target wurde eine hohe Assoziationsrate von  $2,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  mittels SPR bestimmt. Diese Geschwindigkeit resultiert sehr wahrscheinlich aus den elektrostatischen Wechselwirkungen der Bindungspartner. In Abbildung 3-43 ist die Oberflächenladung dargestellt. Dabei ist ersichtlich, dass das Targetprotein 7B8 vorwiegend negative Ladungen aufweist. Die Interaktionsfläche des Affilin®-Moleküls besteht hingegen aus vielen positiv geladenen Aminosäureresten. Werden nur die an der Bindung involvierten Aminosäurereste betrachtet, weist die Bindestelle des Targetproteins 7B8 einen pI-Wert von 3,29 auf, während die Reste des Affilin®-Moleküls einen pI-Wert von 12,48 ergeben. Das gesamte Affilin®-Molekül besaß hingegen einen pI-Wert von 5,6. Dadurch kann eine günstige Präorientierung der Kontaktstellen erfolgen.



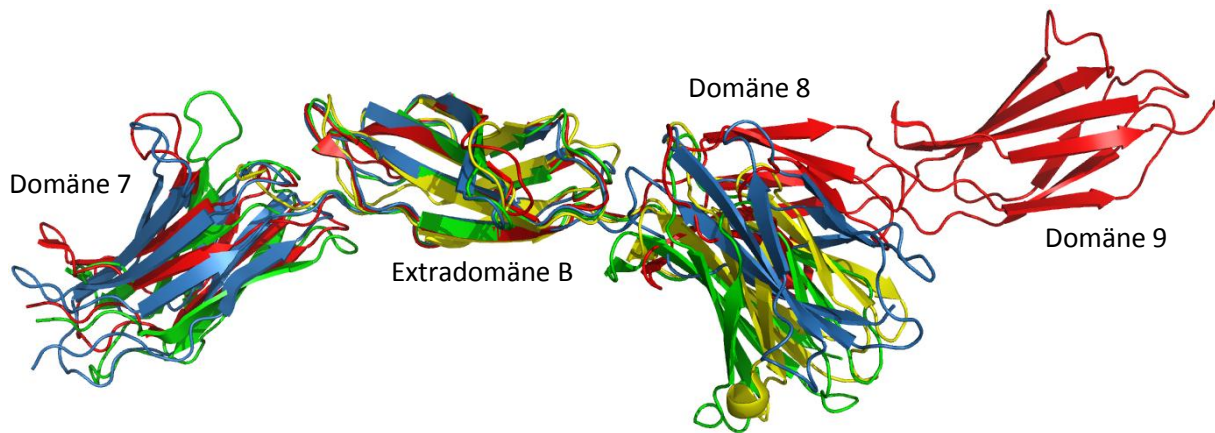
Neben den ausgetauschten Aminosäuren des Affilin®-Moleküls waren auch zehn Reste an der Kontaktfläche beteiligt, welche ebenso im Ubiquitin-Dimer enthalten waren. Darunter waren die zwei Reste R120 und R149, welche eine Salzbrücke zum Target ausbilden. Am N-terminalen Modul des Affilin®-Moleküls waren vier Reste und am C-terminalen Modul elf Reste an der Bindung beteiligt. Ein interessanter Versuch wäre die einzelne Herstellung der Module, um feststellen zu können, ob die Bindung eines Monomers möglich ist. Da sich die Mehrzahl der an der Kontaktfläche involvierten Aminosäurereste auf dem C-terminalen Modul befindet, liegt die Vermutung nahe, dass dieses Modul als Monomer eine Bindung mit dem Targetprotein eingehen kann. Die geringere Größe der Bindestelle kann jedoch zu einer schwächeren Bindung führen. Fünf Aminosäurereste, welche in der Bibliothek randomisiert vorlagen, waren nicht direkt in der Kontaktfläche enthalten. Auf Grund der räumlichen Nähe können diese dennoch einen Einfluss auf die Bindung ausüben.

Die größte Interaktionsfläche der Bindungspartner befindet sich auf dem C-terminalen Modul des Affilin®-Moleküls und einer stark sauren Region zwischen den Fibronectin-Domänen B und 8. Die einzelnen Fibronectin-Domänen des Typs III besitzen zwar eine geringe Sequenzübereinstimmung, jedoch eine hoch konservierte Sekundärstruktur. Sowohl mittels SPR als auch im ELISA konnte gezeigt werden, dass die Affilin®-Moleküle spezifisch das Target 67B89 erkennen, jedoch keine Bindung an das Kontrolltarget bestehend aus den Domänen 6, 7, 8 und 9 zeigen.

Ist die Extradomäne B im Fibronectin enthalten, so ändert sich neben dem Biege- und dem Rotationswinkel innerhalb der Fibronectinkette auch die Ausrichtung der *loops* der Domäne B gegenüber der Domäne 7 (Bencharit 2007). Dadurch entsteht eine saure Grubenregion zwischen Domäne B und 8, welche als Bindungsstelle vom Affilin® 138809 genutzt wird.

In der folgenden Abbildung 4-3 ist eine Überlagerung der Kristallstrukturen der freien Fibronectinkonstrukte 7B89 (rot) bzw. B8 (gelb) und der Konstrukte 7B8 im Komplex mit dem Affilin® 138809 (blau) bzw. mit dem Anticalin® N7A (grün) dargestellt. Dieser Vergleich zeigte, dass die relative Orientierung der N-terminalen Domäne 7 gegenüber der Extradomäne B nur eine geringfügige Abweichung zwischen allen gelösten Kristallstrukturen aufweist. Diese Abweichungen sind wahrscheinlich auf Interaktionen in der jeweiligen Kristallpackung zurückzuführen. Der Vergleich der freien Konstrukte B8 und 7B89 zeigt dagegen einen erheblichen Unterschied in der relativen Ausrichtung der Domänen B und 8. Ob dieser Unterschied in den Strukturen von B8 und 7B89 unterschiedlich bevorzugte Konformationen der beiden Konstrukte in Lösung widerspiegelt oder auf Kristallpackungseffekte zurückzuführen ist, ist gegenwärtig unklar. Im Komplex von 7B8 mit dem Affilin® bzw. Anticalin® wird durch die Bindung in der sauren Grubenregion zwischen der Extradomäne B und der Domäne 8 an dieser Stelle eine Konformation stabilisiert bzw. induziert, die der für das freie Konstrukt B8 ähnelt.

Für eine weitere Betrachtung könnte eine Strukturaufklärung von Fibronectinkonstrukten in freier Form und als Affilin®-Komplex mittels NMR vorgenommen werden, um die konformationelle Dynamik des Systems in Lösung zu untersuchen.



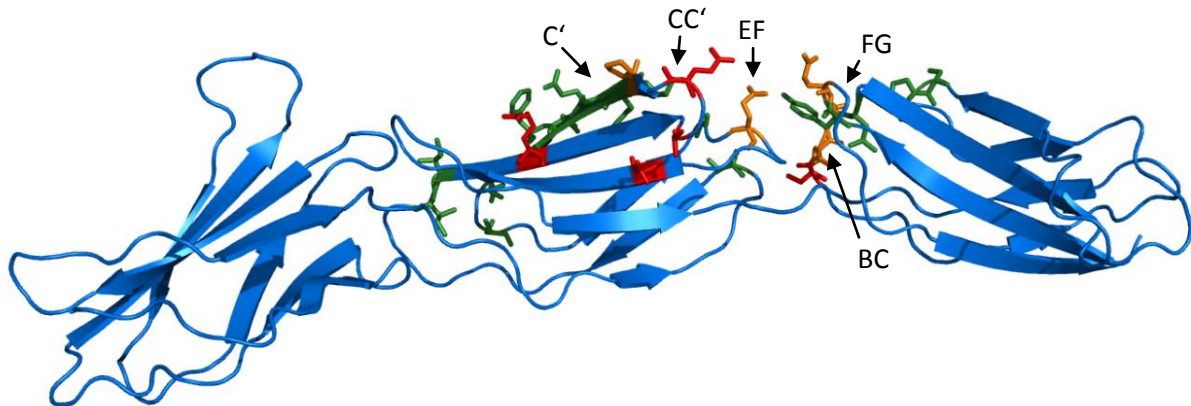
**Abbildung 4-3: Vergleich von Fibronektindomänen im gebundenen und freien Zustand(Kristallstrukturen).** Blau: Konstrukt 7B8 von Affilin®-Molekül 138809 gebunden. Grün: Konstrukt 7B8 von Anticalin®-Molekül N7A gebunden (PDB-Code: 4GH7). Rot: Konstrukt 7B89 im ungebundenen Zustand (PDB-Code: 3T1W). Gelb: Konstrukt B8 im ungebundenen Zustand (PDB-Code: 2GEE). Die Darstellung der Kristallstrukturen wurde mittels Pymol erstellt.

Die Fibronektin-Domänen des Typs III besitzen in verschiedenen Spezies z.B. Maus, Ratte, Rhesusaffe und Mensch eine große Sequenzübereinstimmung. In der Abbildung 4-4 sind die humane und murine Sequenz der Fibronektin-Domänen 7, B und 8 dargestellt. Dabei ist ersichtlich, dass die Extradomäne B zu 100 % konserviert vorliegt. Somit ist eine gute Voraussetzung für die Untersuchung von ED-B-bindenden Affilin®-Molekülen im Tiermodell gegeben. Die Bindung des Affilin®-Moleküls 138809 erfolgt ausschließlich über die Domänen B und 8. Die Sequenz der humanen und murinen Domäne 8 weicht in vier Aminosäuren voneinander ab. Bis auf die Aminosäure D1385 der humanen Domäne 8 waren alle anderen an der Bindung beteiligten Reste analog zur murinen Sequenz. Bevor ein Versuch im Mausmodell mit diesem Affilin® durchgeführt werden könnte, müsste zunächst eine Charakterisierung der Bindungseigenschaften gegenüber dem murinen Fibronektin erfolgen. Der Asparaginsäurerest D1385 kann Wasserstoffbrücken und eine Salzbrücke mit der Aminosäure R120 des Affilin®-Moleküls ausbilden. Auf Grund der Ähnlichkeit der sauren Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure (in muriner Sequenz) besteht die Vermutung, dass dieser Austausch die Bindung nicht sehr stark beeinträchtigt. Firmenintern wurde bereits eine Vielzahl von ED-B-bindenden Affilin®-Molekülen sowohl auf humanen als auch auf murinen Targetproteinen untersucht. Dabei wurden mittels SPR keine Unterschiede in der Affinität ermittelt.

Humane Fn-Domänen 7B8	1174	lsptnlhleanpdtgvlvtvswersttpditgyritttptngqqgnsleevvhadqssc
Murine Fn-Domänen 7B8	1173	lsptnlhleanpdtgvlvtvswersttpditgyritttptngqqgtsleevvhadqssc
Humane Fn-Domänen 7B8	1234	fdnlspgleynvsvytkddkesvpisdttiievpqqltdlsfvditdssiglrwtplnss
Murine Fn-Domänen 7B8	1233	fenlnpgleynvsvytkddkesapisdtvvpvqqltdlsfvditdssiglrwtplnss
Humane Fn-Domänen 7B8	1294	tiiigyritvvaagegipifedfvassvgyyvtvgilepgidydisvitlinggesapttlt
Murine Fn-Domänen 7B8	1293	tiigyritvvaagegipifedfvdssvgyyvtvgilepgidydisvitlinggesapttlt
Humane Fn-Domänen 7B8	1354	qqtavppptdlrftnigpdmrvtwapppsidltfnlvryspvkneedvaelsispdna
Murine Fn-Domänen 7B8	1353	qqtavppptdlrftnigpdmrvtwapppsieltnllvryspvkneedvaelsispdna
Humane Fn-Domänen 7B8	1414	vvltnllpgteyvsvsvveqhestplrgrqkt
Murine Fn-Domänen 7B8	1413	vvltnllpgteylsvsvsvyeqhesiplrgrqkt

**Abbildung 4-4: Sequenzvergleich der humanen (Uniprot-Code: P02751-7) und murinen (Uniprot-Code: P11276) Fibronektindomänen 7, B und 8.** Blau: Domäne 7. Grün: Vollständig konservierte Domäne B. Rot: Domäne 8. Farblich hervorgehoben sind die an der Bindung der Variante 138809 beteiligten Aminosäurereste. Nicht konservierte Aminosäurereste sind schwarz markiert.

Durch die Kristallstruktur des Komplexes war es möglich, weitere Aminosäurereste auf der Affilin®-Oberfläche zu identifizieren, welche eventuell einen positiven Effekt auf die Affinität ausüben könnten. Ein Einbringen von zusätzlichen Ionenbindungen durch die Mutationen A46R und V147R unter Ausbildung von Salzbrücken zu dem Fibronectinresten D1313 und E1328 könnten den Komplex stabilisieren und somit die Dissoziationsrate verbessern. Eine weitere Verbesserung könnte eventuell durch die Mutation N138Q erfolgen. Glutamin ist im Vergleich zu Asparagin größer und könnte somit eine Wasserstoffbrücke zum gegenüberliegenden Fibronectinrest T1325 ausbilden. Eine Überprüfung dieser Hypothese könnte durch das Einbringen von Punktmutationen und anschließender Affinitätsmessung mittels SPR erfolgen.



**Abbildung 4-5: An der Bindung beteiligte Reste der Fibronectindomänen B und 8.** Grün: Beteiligte Reste der Variante 138809. Rot: Beteiligte Reste des Anticalin® N7A. Orange: Reste, die an der Bindung des Anticalins® N7A und der Variante 138809 beteiligt sind. Beteiligte Strukturen der Fibronectindomänen: Faltblatt-Strang C', sowie die *loops* CC', EF, FG und BC (Bencharit 2007).

In der Literatur ist ein ED-B-bindendes künstliches Bindeprotein, das Anticalin® N7A beschrieben (Gebauer 2013). In der folgenden Abbildung 4-5 sind die an einer Bindung zum Affilin® 138809 bzw. Anticalin® N7A (PDB-Code: 4GH7) beteiligten Aminosäurereste des Fibronectinkonstrukts 7B8 dargestellt. Das von beiden Bindeproteinen erkannte Epitop befindet sich an der gleichen Stelle zwischen der Extradomäne B und der benachbarten Domäne 8. Zwischen diesen Domänen befindet sich eine saure grubenartige Region, welche durch die *loops* EF, BC und FG gebildet wird (Bencharit 2007). Vier der fünf gemeinsam gebundenen Aminosäuren E1329, I1384, D1385 und E1434 befinden sich auf diesen *loop*-Strukturen. Die weiteren an der Bindung beteiligten Reste unterscheiden sich jedoch stark. Beispielsweise bindet das Affilin® 138809 fast vollständig das Faltblatt C' der Extradomäne B, während das Anticalin® N7A den kurzen exponierten *loop* CC' bindet.

## 5 Zusammenfassung

Antikörper und Antikörperfragmente finden als Bindemoleküle mit sehr hoher Spezifität in den Bereichen der Diagnostik und Therapie eine weitverbreitete Anwendung. Die Herstellung von Antikörpern wird jedoch durch deren komplexen Aufbau erschwert. Auch weitere nachteilige Eigenschaften wie z.B. die geringe Gewebepenetration durch das große Molekulargewicht oder die geringere Stabilität von Antikörperfragmenten limitieren die Anwendbarkeit. Um diese Nachteile zu umgehen und eine kostengünstigere Herstellung zu erreichen, wird die Generierung von künstlichen Bindeproteine auf Basis alternativer Gerüstproteine untersucht. In vorangegangenen Arbeiten der Firma Scil Proteins (Halle/Saale) wurden 14 Aminosäurereste auf einem Ubiquitin-Dimer (Affilin®) für eine *de-novo*-Bindestelle ausgewählt und die entsprechenden Positionen für die Konstruktion einer cDNA-Bibliothek randomisiert. In der vorliegenden Arbeit wurden aus dieser Bibliothek Affilin®-Moleküle selektiert, die eine spezifische Bindung an das Targetprotein, bestehend aus der Extradomäne B des Fibronektins und den flankierenden Domänen 6 und 7 bzw. 8 und 9, zeigten. Die Extradomäne B (ED-B) stellt einen Angiogenese- und Tumor-Marker dar und ist somit relevant für therapeutische und diagnostische Ansätze.

Mittels *phage display* wurden ED-B-bindende Affilin®-Moleküle aus der cDNA-Bibliothek selektiert und anschließend analysiert. Da im Verlauf der Arbeit eine Fusion mit Interleukin-2 angestrebt war, wurde die Affinität der selektierten Affilin®-Moleküle im dreistelligen nanomolaren Bereich als unzureichend für ein therapeutisches Konstrukt eingestuft. Deswegen wurde eine Affinitätsmaturierung mittels *error-prone* PCR des selektierten Bindeproteins 129091 ( $K_D = 414$  nM) und einer weiteren Affilin®-Variante 102472 ( $K_D = 16$  nM) durchgeführt und anschließend mittels *ribosome display* erneut selektiert. Die resultierenden Affilin®-Varianten wurde als Fusion mit *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) kloniert, um nur funktionelle Varianten ohne Leserahmenverschiebung (*frameshifts*) für ein ELISA-basiertes *screening* zu verwenden. Nach der Identifizierung von spezifisch an das Targetprotein 67B89 bindenden Affilin®-Molekülen wurde diese ohne Fusion mit eGFP hergestellt und charakterisiert. Da bei den Abkömmlingen der Variante 129091 keine deutliche Affinitätssteigerung erzielt werden konnte, wurden weitere Untersuchungen ausschließlich mit den Abkömmlingen des Affilin®-Moleküls 102472 durchgeführt. Die final ausgewählten Varianten 138809 und 138810 wiesen eine Affinität von 0,85 nM bzw. 0,57 nM (Elternvariante  $K_D = 16$  nM) gegenüber dem Targetprotein 67B89 auf. Das Affilin® 138809 besaß gegenüber der Elternvariante zwei Punktmutationen und eine Deletion im GIG-Linker zwischen den beiden Modulen. Die Mehrzahl der maturierten Bindeproteine besaß eine identische Doppelmutation auf dem C-terminalen Modul. Der Einfluss dieser Aminosäureaustausche auf die Affinität wurde anschließend untersucht. Sowohl die Doppelmutation ( $K_D = 0,49$  nM) als auch die Deletion im Linker ( $K_D = 2,4$  nM) zeigten einen signifikanten Einfluss auf die Affinität im Vergleich zur Elternvariante 102472 ( $K_D = 16$  nM).

Im nachfolgenden Teil der Arbeit wurden die zwei ausgewählten Affilin®-Moleküle 138809 und 138810 mit dem Zytokin Interleukin-2 fusioniert. Die Konstrukte konnten erfolgreich in *E. coli* exprimiert und mittels Renaturierung aus *inclusion bodies* gereinigt werden. Die Affinität der fusionierten Affilin®-Moleküle blieb erhalten und konnte auf ED-B-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Die biologische Aktivität des fusionierten Interleukins-2 konnte ebenso in

einem Proliferationsassay mit CTLL-2-Zellen nachgewiesen werden. Somit konnte demonstriert werden, dass in einer Fusion des Affilin<sup>®</sup>-Moleküls mit Effektormolekülen wie dem Interleukin-2 beide Fusionspartner ihre biologische Aktivität beibehalten, wodurch vielfältige Anwendungen im Bereich der Therapie oder Diagnostik denkbar sind.

In einem weiteren Teil der Arbeit konnte mittels Röntgenstrukturanalyse erstmals die Struktur eines Affilin<sup>®</sup>-Moleküls einzeln und in Komplex mit dem Targetprotein ED-B aufgeklärt werden. Die Stöchiometrie der Interaktion der beiden Bindungspartner beruhte auf einem 1:1-Verhältnis. Es zeigte sich, dass neben den ausgetauschten Aminosäureresten ebenso Oberflächen-exponierte Reste, die im Wildtyp-Ubiquitin enthalten sind, an einer Bindung beteiligt waren. Die generierte Bindestelle des Affilin<sup>®</sup>-Moleküls bestand vorwiegend aus positiv geladenen Resten. Diese Reste interagierten mit einer sauren Grubenregion zwischen den Fibronektindomänen B und 8. Trotz der Vielzahl an ausgetauschten Aminosäureresten auf der Oberfläche des Affilin<sup>®</sup>-Moleküls besaß dieses weiterhin eine Ubiquitin-typische Struktur.

## 6 Summary

Antibodies and antibody fragments represent well characterized biopharmaceuticals with high specificity and widespread applications in diagnostics and therapy. Caused by their complex structure the production of antibodies is expensive. In addition, their applicability is also limited by other characteristics like the low tissue penetration due to their large molecular weight. In order to achieve a more efficient alternative, the generation of artificial binding molecules has been examined for more than 20 years. In earlier investigations at the company Scil Proteins 14 amino acid residues on a dimeric ubiquitin (Affilin®) were selected and randomized to create a *de novo* binding site. In the present work molecules with specific binding to the target protein consisting of the extra-domain B of human fibronectin and the flanking domains 6, 7, 8 and 9 were obtained from an Affilin® library using phage display selection. The extra-domain B (ED-B) represents an angiogenesis and tumor marker and is relevant for both therapeutic and diagnostic approaches.

The affinity of the selected Affilin® molecule 129091 ( $K_D = 414$  nM) was matured by error-prone PCR. An additional Affilin® variant 102472 ( $K_D = 16$  nM) was included in this process. Subsequently a selection by ribosome display was carried out. The resulting Affilin® molecules were produced as fusion with enhanced green fluorescent protein (eGFP) in order to select only functional clones without reading frame shifts for an ELISA based screening. After the identification of specific, target-binding Affilin® molecules the variants were produced and characterized without eGFP fusion. Since no distinct affinity increase of the 129091 derivatives could be obtained, further investigations were performed exclusively with the derivatives of the Affilin® molecule 102472. The final selected variants 138809 and 138810 possessed an affinity against the target protein 67B89 of 0.85 nM and 0.57 nM. The Affilin® 138809 contained two point mutations and a deletion within the linker region between both ubiquitin modules. The majority of the screened variants possessed an identical double mutation on the C-terminal module. Therefore, the influence of these amino acid exchanges was examined. Both the double mutation ( $K_D = 0.49$  nM) and the deletion in the linker region ( $K_D = 2.4$  nM) showed a significant increase on the affinity compared to the parent Affilin® 102472.

Furthermore, the two Affilin® 138809 and 138810 were successfully produced in *E. coli* as fusion with the cytokine interleukin-2 by in vitro refolding. The biological activity of the fused IL2 was verified by a proliferation assay on CTLL-2 cells. It could be demonstrated that in fusions of Affilin® molecules and effector molecules like IL2 both fusion partners maintained their activity facilitating potential applications in therapy and diagnostic.

In the following part of this work, the first structure of an Affilin® molecule was determined by x-ray crystallography individually and as complex with a target protein. Despite numerous amino acid exchanges, the typical ubiquitin fold was preserved. It was shown that besides the exchanged amino acids some surface-exposed residues contained in the wildtype dimeric ubiquitin were also involved in the binding interaction towards the target 67B89. The generated binding site of the Affilin® molecules predominantly consisted of positively charged residues. These residues interacted with an acidic groove between the fibronectin domains B and 8.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K. L., Andrew H; Pillai, Shiv (2010). Cellular and molecular immunology. Philadelphia, Saunders/Elsevier.
- Amstutz, P. F., P.; Zahnd, C.; Plückthun, A. (2001). "In vitro display technologies: novel developments and applications." Curr Opin Biotechnol **12**(4): 400-405.
- Arakawa, T. E., D.; Tsumoto, K.; Obeyama, N.; Tanaka, Y.; Kita, Y.; Timasheff, S. N. (2007). "Suppression of protein interactions by arginine: a proposed mechanism of the arginine effects." Biophys Chem **127**(1-2): 1-8.
- Astrof, S. C., D.; Hynes, R. O. (2007). "Multiple cardiovascular defects caused by the absence of alternatively spliced segments of fibronectin." Dev Biol **311**(1): 11-24.
- Baeuerle, P. A. R., Carsten (2009). "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies for Cancer Therapy." Cancer Research **69**(12): 4941-4944.
- Bajoghli, B. G., Peng; Aghaallaei, Narges; Hirano, Masayuki; Strohmeier, Christine; McCurley, Nathanael; Bockman, Dale E.; Schorpp, Michael; Cooper, Max D.; Boehm, Thomas (2011). "A thymus candidate in lampreys." Nature **470**(7332): 90-94.
- Baker, R. T. B., P. G. (1987). "The human ubiquitin gene family: structure of a gene and pseudogenes from the Ub B subfamily." Nucleic Acids Res **15**(2): 443-463.
- Balzar, M. W., M. J.; de Boer, C. J.; Litvinov, S. V. (1999). "The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM)." J Mol Med **77**(10): 699-712.
- Barendt, P. A. N., D. T.; McQuade, C. N.; Sarkar, C. A. (2013). "Streamlined protocol for mRNA display." ACS Comb Sci **15**(2): 77-81.
- Barriere, H. N., C.; Du, K.; Lukacs, G. L. (2007). "Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery." Mol Biol Cell **18**(10): 3952-3965.
- Bencharit, S. C., C. B.; Siddiqui, A.; Howard-Williams, E. L.; Sondek, J.; Zuobi-Hasona, K.; Aukhil, I. (2007). "Structural insights into fibronectin type III domain-mediated signaling." J Mol Biol **367**(2): 303-309.
- Bernard, B. A. Y., K. M.; Olden, K. (1982). "Carbohydrates selectively protect a specific domain of fibronectin against proteases." J Biol Chem **257**(14): 8549-8554.
- Bertschinger, J. N., Dario (2004). "Covalent DNA display as a novel tool for directed evolution of proteins in vitro." Protein Engineering Design and Selection **17**(9): 699-707.
- Beste, G. S., F. S.; Stibora, T.; Skerra, A. (1999). "Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 1898-1903.
- Binz, H. K. A., P.; Kohl, A.; Stumpp, M. T.; Briand, C.; Forrer, P.; Grutter, M. G.; Pluckthun, A. (2004). "High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries." Nat Biotechnol **22**(5): 575-582.

- Bloom, L. C., Valerie (2009). "FN3: a new protein scaffold reaches the clinic." Drug Discovery Today **14**(19–20): 949-955.
- Boder, E. T. M., K. S.; Wittrup, K. D. (2000). "Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 10701-10705.
- Boder, E. T. W., K. D. (1997). "Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries." Nat Biotechnol **15**(6): 553-557.
- Boone, T. C., V.; Kenney, W.; Swanson, E.; Altroch, B. (1988). "Construction, purification and biological activities of recombinant human interleukin-2 analogs." Dev Biol Stand **69**: 157-168.
- Borras, L. G., T.; Tietz, J.; Bauer, U.; Hulmann-Cottier, V.; Grimshaw, J. P.; Urech, D. M. (2010). "Generic approach for the generation of stable humanized single-chain Fv fragments from rabbit monoclonal antibodies." J Biol Chem **285**(12): 9054-9066.
- Borsi, L. B., E.; Bestagno, M.; Castellani, P.; Carnemolla, B.; Biro, A.; Leprini, A.; Sepulveda, J.; Burrone, O.; Neri, D.; Zardi, L. (2002). "Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin." Int J Cancer **102**(1): 75-85.
- Borsi, L. C., B.; Castellani, P.; Rosellini, C.; Vecchio, D. Allemanni, G.; Chang, S. E.; Taylor-Papadimitriou, J.; Pande, H.; Zardi, L. (1987). "Monoclonal antibodies in the analysis of fibronectin isoforms generated by alternative splicing of mRNA precursors in normal and transformed human cells." J Cell Biol **104**(3): 595-600.
- Bowers, P. M. H., R. A.; Kehry, M. R.; Neben, T. Y.; Tomlinson, G. L.; Altobell, L.; Zhang, X. (2014). "Mammalian cell display for the discovery and optimization of antibody therapeutics." Methods **65**(1): 44-56.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brennan, D. J. O. C., Darran P.; Rexhepaj, Elton; Ponten, Fredrik; Gallagher, William M. (2010). "Antibody-based proteomics: fast-tracking molecular diagnostics in oncology." Nat Rev Cancer **10**(9): 605-617.
- Brocker, C. T., D.; Matsumoto, A.; Nebert, D. W.; Vasiliou, V. (2010). "Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family." Hum Genomics **5**(1): 30-55.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., and Short, J. M. (1987). "XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection." BioTechniques **5**: 376-379.
- Byrne, H. C., Paul J.; Whisstock, James C.; O Kennedy, Richard J. (2013). "A tale of two specificities: bispecific antibodies for therapeutic and diagnostic applications." Trends in biotechnology **31**(11): 621-632.
- Cantor, C. R. S., P.R. (1980). Biophysical Chemistry: Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function, W. H. Freeman.



- Carnemolla, B. L., A.; Allemanni, G.; Saginati, M.; Zardi, L. (1992). "The inclusion of the type III repeat ED-B in the fibronectin molecule generates conformational modifications that unmask a cryptic sequence." J Biol Chem **267**(34): 24689-24692.
- Chames, P. B., D. (2009). "Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel?" MAbs **1**(6): 539-547.
- Chan, C. E. Z. L., Angeline Pei Chiew; Chan, Annie Hoi Yi; MacAry, Paul A.; Hanson, Brendon John (2010). "Optimized Expression of Full-Length IgG1 Antibody in a Common *E. coli* Strain." PLoS One **5**(4): e10261.
- Chau, V. T., J. W.; Bachmair, A.; Marriott, D.; Ecker, D. J.; Gonda, D. K.; Varshavsky, A. (1989). "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein." Science **243**(4898): 1576-1583.
- Christensen, P. A. D., A.; Ravn, P.; Larsen, M.; Stahn, R.; Karsten, U.; Goletz, S. (2009). "Modifying antibody specificity by chain shuffling of V / V between antibodies with related specificities." Scand J Immunol **69**(1): 1-10.
- Christiansen, J. R., A. K. (2004). "Biological impediments to monoclonal antibody-based cancer immunotherapy." Mol Cancer Ther **3**(11): 1493-1501.
- Ciechanover, A. F., D.; Varshavsky, A. (1984). "The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation." J Cell Biochem **24**(1): 27-53.
- Clackson, T. L., H.B. (2004). Phage Display: A Practical Approach, OUP Oxford.
- Cohen, M. M., Jr. (2006). "Vascular update: morphogenesis, tumors, malformations, and molecular dimensions." Am J Med Genet A **140**(19): 2013-2038.
- Cohen, S. N. C., Annie C. Y.; Hsu, Leslie (1972). "Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA." Proceedings of the National Academy of Sciences **69**(8): 2110-2114.
- D'Ovidio, M. C. M., A.; Marzullo, A.; Ciabatta, M.; Pini, B.; Uccini, S.; Zardi, L.; Ruco, L. P. (1998). "Intratumoral microvessel density and expression of ED-A/ED-B sequences of fibronectin in breast carcinoma." Eur J Cancer **34**(7): 1081-1085.
- Dallüge, R. O., J.; Birkenmeier, O.; Lucke, C.; Lilie, H.; Rudolph, R.; Lange, C. (2007). "A tetrapeptide fragment-based design method results in highly stable artificial proteins." Proteins **68**(4): 839-849.
- Daniels, D. A. C., H.; Hicke, B. J.; Swiderek, K. M.; Gold, L. (2003). "A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15416-15421.
- Daugherty, P. S. (2007). "Protein engineering with bacterial display." Curr Opin Struct Biol **17**(4): 474-480.
- Davies, D. R. C., G. H. (1996). "Interactions of protein antigens with antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 7-12.

- Davis, C. B. G., S. D. (2003). "Immunocytokines: amplification of anti-cancer immunity." Cancer Immunol Immunother **52**(5): 297-308.
- De Falco, S. (2014). "Antiangiogenesis therapy: an update after the first decade." Korean J Intern Med **29**(1): 1-11.
- Dikic, I. W., S.; Walters, K. J. (2009). "Ubiquitin-binding domains - from structures to functions." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(10): 659-671.
- Dower, W. J. M., Jeff F.; Ragsdale, Charles W. (1988). "High efficiency transformation of E.coli by high voltage electroporation." Nucleic Acids Research **16**(13): 6127-6145.
- Doyle, M. V. L., M. T.; Fong, S. (1985). "Comparison of the biological activities of human recombinant interleukin-2(125) and native interleukin-2." J Biol Response Mod **4**(1): 96-109.
- Drummond, D. A. I., B. L.; Georgiou, G.; Arnold, F. H. (2005). "Why high-error-rate random mutagenesis libraries are enriched in functional and improved proteins." J Mol Biol **350**(4): 806-816.
- Dumoulin, M. C., K.; Van Meirhaeghe, A.; Meersman, F.; Heremans, K.; Frenken, L. G.; Muyldermans, S.; Wyns, L.; Matagne, A. (2002). "Single-domain antibody fragments with high conformational stability." Protein Sci **11**(3): 500-515.
- Eatock, M. M. S., A.; Kaye, S. B. (2000). "Tumour vasculature as a target for anticancer therapy." Cancer Treat Rev **26**(3): 191-204.
- Ebersbach, H. F., E.; Scheuermann, T.; Fiedler, M.; Stubbs, M. T.; Reimann, C.; Proetzel, G.; Rudolph, R.; Fiedler, U. (2007). "Affilin-novel binding molecules based on human gamma-B-crystallin, an all beta-sheet protein." J Mol Biol **372**(1): 172-185.
- Eftink, M. R. (1994). "The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins." Biophysical Journal **66**(2, Part 1): 482-501.
- El-Deiry, W. S. D., K. M.; So, A. G. (1984). "Molecular mechanisms of manganese mutagenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(23): 7378-7382.
- Elgert, K. D. (2009). Immunology: Understanding The Immune System, Wiley.
- Ericsson, U. B. H., B. Martin; DeTitta, George T.; Dekker, Niek; Nordlund, Pär (2006). "Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies." Analytical Biochemistry **357**(2): 289-298.
- Fiedler, M. D. F., U.D.; Rudolph, R.P.D. (2004). Generation of artificial binding proteins on the basis of ubiquitin-proteins, Google Patents.
- Fiedler, M. F., U; Rudolph, R (2004). Generation of artificial binding proteins based on ubiquitin proteins.
- Fiedler, M. S., A. (2007). Non-antibody scaffolds. Handbook of therapeutic antibodies. S. Dübel: 467-499.
- Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." Nat Med **1**(1): 27-31.

- Folkman, J. (2002). "Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis." Semin Oncol **29**(6 Suppl 16): 15-18.
- Forrer, P. J., S.; Pluckthun, A. (1999). "Beyond binding: using phage display to select for structure, folding and enzymatic activity in proteins." Curr Opin Struct Biol **9**(4): 514-520.
- Frey, K. S., C.; Schwager, K.; Giavazzi, R.; Johannsen, M.; Neri, D. (2010). "The immunocytokine F8-IL2 improves the therapeutic performance of sunitinib in a mouse model of renal cell carcinoma." J Urol **184**(6): 2540-2548.
- Friedman, M. N., E.; Hoiden-Guthenberg, I.; Brismar, H.; Adams, G. P.; Nilsson, F. Y.; Carlsson, J.; Stahl, S. (2007). "Phage display selection of Affibody molecules with specific binding to the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor." Protein Eng Des Sel **20**(4): 189-199.
- Fukuda, T. Y., N.; Kataoka, Y.; Manabe, R.; Mizuno-Horikawa, Y.; Sato, M.; Kuriyama, K.; Yasui, N.; Sekiguchi, K. (2002). "Mice lacking the EDB segment of fibronectin develop normally but exhibit reduced cell growth and fibronectin matrix assembly in vitro." Cancer Res **62**(19): 5603-5610.
- Gebauer, M. S., A.; Matschiner, G.; Skerra, A. (2013). "Combinatorial Design of an Anticalin Directed against the Extra-Domain B for the Specific Targeting of Oncofetal Fibronectin." J Mol Biol **425**(4): 780-802.
- Gillis, S. F., Mary M.; Ou, Winny; Smith, Kendall A. (1978). "T Cell Growth Factor: Parameters of Production and a Quantitative Microassay for Activity." The Journal of Immunology **120**(6): 2027-2032.
- Goldstein, G. S., M.; Hammerling, U.; Schlesinger, D. H.; Niall, H. D.; Boyse, E. A. (1975). "Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(1): 11-15.
- Granucci, F. F., S.; Angeli, V.; Trottein, F.; Ricciardi-Castagnoli, P. (2003). "Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming." J Immunol **170**(10): 5075-5081.
- Grodberg, J., Dunn, J.J. (1988). "OmpT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification." J. Bacteriol. **170**: 1245-1253.
- Grzesiuk, E. J., C. (1993). "Some aspects of EMS-induced mutagenesis in Escherichia coli." Mutat Res **297**(3): 313-321.
- Hanes, J. P., A. (1997). "In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 4937-4942.
- Hanes, J. S., C.; Knappik, A.; Pluckthun, A. (2000). "Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display." Nat Biotechnol **18**(12): 1287-1292.
- Hanson, C. V. N., Y.; Paul, S. (2005). "Catalytic antibodies and their applications." Curr Opin Biotechnol **16**(6): 631-636.
- Hayflick, L. (1965). "THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS." Exp Cell Res **37**: 614-636.

- Hefti, M. H., Van Vugt-Van der Toorn, Caroline J. G., Dixon, Ray, Vervoort, Jacques (2001). "A Novel Purification Method for Histidine-Tagged Proteins Containing a Thrombin Cleavage Site." Analytical Biochemistry **295**(2): 180-185.
- Hershko, A. C., A. (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-479.
- Hey, T. F., E.; Rudolph, R.; Fiedler, M. (2005). "Artificial, non-antibody binding proteins for pharmaceutical and industrial applications." Trends Biotechnol **23**(10): 514-522.
- Ho, M. P., I. (2009). "Mammalian cell display for antibody engineering." Methods Mol Biol **525**: 337-352, xiv.
- Holliger, P. H., P. J. (2005). "Engineered antibody fragments and the rise of single domains." Nat Biotechnol **23**(9): 1126-1136.
- Holtzhauer, M. B., J. (1996). Methoden in Der Proteinanalytik, Springer.
- Hornick, J. L. K., Leslie A.; Hu, Peisheng; Sharifi, Jahangir; Khanna, Chand; Epstein, Alan L. (1999). "Pretreatment with a Monoclonal Antibody/Interleukin-2 Fusion Protein Directed against DNA Enhances the Delivery of Therapeutic Molecules to Solid Tumors." Clinical Cancer Research **5**(1): 51-60.
- Horwitz, J. I. T., M.; Tompkins, R. G.; Yarmush, M. L. (1993). "Immobilized IL-2 preserves the viability of an IL-2 dependent cell line." Mol Immunol **30**(11): 1041-1048.
- Huang, Z. Z., C.; Chen, S.; Ye, F.; Xing, X. H. (2013). "Active inclusion bodies of acid phosphatase PhoC: aggregation induced by GFP fusion and activities modulated by linker flexibility." Microb Cell Fact **12**: 25.
- Hurley, J. H. L., S.; Prag, G. (2006). "Ubiquitin-binding domains." Biochem J **399**(3): 361-372.
- Ibarra-Molero, B. L., V. V.; Makhatadze, G. I.; Sanchez-Ruiz, J. M. (1999). "Thermal versus guanidine-induced unfolding of ubiquitin. An analysis in terms of the contributions from charge-charge interactions to protein stability." Biochemistry **38**(25): 8138-8149.
- Jackson, S. E. (2006). "Ubiquitin: a small protein folding paradigm." Org Biomol Chem **4**(10): 1845-1853.
- Janeway, C. A. J., Travers P., Walport M (2001). Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. New York, Garland Science.
- Janin, J. R., F.; Chakrabarti, P.; Bahadur, R. P. (2007). "Macromolecular recognition in the Protein Data Bank." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **63**(Pt 1): 1-8.
- Josephy, P. D., Eling, T., Mason, R. P. (1982). "The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates." Journal of Biological Chemistry **257**(7): 3669-3675.
- Jung, S. H., A.; Pluckthun, A. (1999). "Selection for improved protein stability by phage display." J Mol Biol **294**(1): 163-180.
- Kashima, T. M., A.; Iwata, H.; Maeda, K.; Inoue, T. (1999). "Expression of bovine cytokines in Escherichia coli." J Vet Med Sci **61**(2): 171-173.

- Kenrick, S. A. D., Patrick S. (2010). "Bacterial display enables efficient and quantitative peptide affinity maturation." Protein Engineering Design and Selection **23**(1): 9-17.
- Keystone, E. H., Dv; Mason, D., Jr.; Landewe, R.; Vollenhoven, R. V.; Combe, B.; Emery, P.; Strand, V.; Mease, P.; Desai, C.; Pavelka, K. (2008). "Certolizumab pegol plus methotrexate is significantly more effective than placebo plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: findings of a fifty-two-week, phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study." Arthritis Rheum **58**(11): 3319-3329.
- Ko, Y. J. B., G. J.; Weber, R.; Redfern, C.; Gold, D. P.; Finke, L.; Kovar, A.; Dahl, T.; Gillies, S. D. (2004). "Safety, pharmacokinetics, and biological pharmacodynamics of the immunocytokine EMD 273066 (huKS-IL2): results of a phase I trial in patients with prostate cancer." J Immunother **27**(3): 232-239.
- Kohler, G. M., C. (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**(5517): 495-497.
- Kontermann, R. E. (2012). "Antibody-cytokine fusion proteins." Arch Biochem Biophys.
- Ku, J. S., P. G. (1995). "Alternate protein frameworks for molecular recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(14): 6552-6556.
- Kumar, S. N., R. (2002). "Close-range electrostatic interactions in proteins." ChemBiochem **3**(7): 604-617.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-685.
- Lee, S. T., Y. C.; Mattera, R.; Smith, W. J.; Kostelansky, M. S.; Weissman, A. M.; Bonifacino, J. S.; Hurley, J. H. (2006). "Structural basis for ubiquitin recognition and autoubiquitination by Rabex-5." Nat Struct Mol Biol **13**(3): 264-271.
- Lehmann, A. (2008). "Ecallantide (DX-88), a plasma kallikrein inhibitor for the treatment of hereditary angioedema and the prevention of blood loss in on-pump cardiothoracic surgery." Expert Opin Biol Ther **8**(8): 1187-1199.
- Levine, R. L. M., L.; Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. (1996). "Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15036-15040.
- Li, M. S., Z. G.; Janson, J. C. (2004). "In vitro protein refolding by chromatographic procedures." Protein Expr Purif **33**(1): 1-10.
- Lilie, H. S., E.; Rudolph, R. (1998). "Advances in refolding of proteins produced in E. coli." Curr Opin Biotechnol **9**(5): 497-501.
- Lin Tung, W., Chow, King- C. (1995). "A modified medium for efficient electrotransformation of E. coli." Trends in Genetics **11**(4): 128-129.
- Lipovsek, D. (2011). "Adnectins: engineered target-binding protein therapeutics." Protein Eng Des Sel **24**(1-2): 3-9.
- Loppnow, H. (2001). "[Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action]." Internist (Berl) **42**(1): 13-14, 17-27.

- Lorey, S. F., E.; Kunert, A.; Nerkamp, J.; Lange, C.; Fiedler, M.; Bosse-Doenecke, E.; Meysing, M.; Gloser, M.; Rundfeldt, C.; Rauchhaus, U.; Hanssgen, I.; Gottler, T.; Steuernagel, A.; Fiedler, U.; Haupts, U. (2014). "Novel ubiquitin-derived high affinity binding proteins with tumor targeting properties." *J Biol Chem* **289**(12): 8493-8507.
- Lotze, M. T. C., A. E.; Seipp, C. A.; Simpson, C.; Vetto, J. T.; Rosenberg, S. A. (1986). "High-dose recombinant interleukin 2 in the treatment of patients with disseminated cancer. Responses, treatment-related morbidity, and histologic findings." *JAMA* **256**(22): 3117-3124.
- Lowman, H. B. B., Steven H.; Simpson, Nancy; Wells, James A. (1991). "Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display." *Biochemistry* **30**(45): 10832-10838.
- Magnusson, M. K. M., D. F. (1998). "Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**(9): 1363-1370.
- Mairhofer, J. C.-P., Monika; Striedner, Gerald; Nöbauer, Katharina; Razzazi-Fazeli, Ebrahim; Grabherr, Reingard (2010). "Marker-free plasmids for gene therapeutic applications—Lack of antibiotic resistance gene substantially improves the manufacturing process." *Journal of Biotechnology* **146**(3): 130-137.
- Majetschak, M. (2010). "Extracellular ubiquitin: immune modulator and endogenous opponent of damage-associated molecular pattern molecules." *J Leukoc Biol*.
- Malek, T. R. (2008). "The biology of interleukin-2." *Annu Rev Immunol* **26**: 453-479.
- Mattheakis, L. C. B., R. R.; Dower, W. J. (1994). "An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(19): 9022-9026.
- Menrad, A. M., H. D. (2005). "ED-B fibronectin as a target for antibody-based cancer treatments." *Expert Opin Ther Targets* **9**(3): 491-500.
- Meyers, J. A. S., D.; Elwell, L. P.; Falkow, S. (1976). "Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid." *J Bacteriol* **127**(3): 1529-1537.
- Middelberg, A. P. (2002). "Preparative protein refolding." *Trends Biotechnol* **20**(10): 437-443.
- Morgan, D. A. R., F. W.; Gallo, R. (1976). "Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows." *Science* **193**(4257): 1007-1008.
- Mott, K. R. Z., Mandana; Allen, Sariah J.; Ghiasi, Homayon (2013). "Role of Interleukin-2 and Herpes Simplex Virus 1 in Central Nervous System Demyelination in Mice." *Journal of Virology* **87**(22): 12102-12109.
- Mross, K. R., H.; Fischer, R.; Scharr, D.; Buchert, M.; Stern, A.; Gille, H.; Audoly, L. P.; Scheulen, M. E. (2013). "First-in-human phase I study of PRS-050 (Angiocal), an Anticalin targeting and antagonizing VEGF-A, in patients with advanced solid tumors." *PLoS One* **8**(12): e83232.
- Muteeb, G. S., R. (2010). "Random mutagenesis using a mutator strain." *Methods Mol Biol* **634**: 411-419.
- Neri, D. B., R. (2005). "Tumour vascular targeting." *Nat Rev Cancer* **5**(6): 436-446.

- Nesterenko, M. V. T., Michael; Upton, Steve J. (1994). "A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels." Journal of Biochemical and Biophysical Methods **28**(3): 239-242.
- Niesen, F. H. B., Helena; Vedadi, Masoud (2007). "The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability." Nat. Protocols **2**(9): 2212-2221.
- Nixon, A. E. W., C. R. (2006). "Engineered protein inhibitors of proteases." Curr Opin Drug Discov Devel **9**(2): 261-268.
- Nygren, P. A. (2008). "Alternative binding proteins: Affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold." Febs J **275**(11): 2668-2676.
- Okumura, M. S., M.; Yamaguchi, H.; Hidaka, Y. (2011). "Acceleration of disulfide-coupled protein folding using glutathione derivatives." FEBS J **278**(7): 1137-1144.
- Orlova, A. M., M.; Eriksson, T. L.; Nilsson, M.; Larsson, B.; Hoiden-Guthenberg, I; Widstrom, C.; Carlsson, J.; Tolmachev, V.; Stahl, S.; Nilsson, F. Y. (2006). "Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding affibody molecule." Cancer Res **66**(8): 4339-4348.
- Ozkaynak, E. F., D.; Varshavsky, A. (1984). "The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein." Nature **312**(5995): 663-666.
- Padlan, E. A. (1994). "Anatomy of the antibody molecule." Molecular Immunology **31**(3): 169-217.
- Panier, S. D., D. (2009). "Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks." DNA Repair (Amst) **8**(4): 436-443.
- Pankov, R. Y., K. M. (2002). "Fibronectin at a glance." J Cell Sci **115**(Pt 20): 3861-3863.
- Papavasiliou, F. N. S., David G. (2002). "Somatic Hypermutation of Immunoglobulin Genes: Merging Mechanisms for Genetic Diversity." Cell **109**(2, Supplement 1): S35-S44.
- Pasche, N. N., D. (2012). "Immunocytokines: a novel class of potent armed antibodies." Drug Discov Today **17**(11-12): 583-590.
- Paschke, M. H., W. (2005). "A twin-arginine translocation (Tat)-mediated phage display system." Gene **350**(1): 79-88.
- Pershad, K. K., B. K. (2013). "Generating thermal stable variants of protein domains through phage display." Methods **60**(1): 38-45.
- Peternel, S. G., J.; Gaberc-Porekar, V.; Komel, R. (2008). "Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins." Microb Cell Fact **7**: 34.
- Peternel, S. K., R. (2011). "Active Protein Aggregates Produced in Escherichia coli." Int J Mol Sci **12**(11): 8275-8287.
- Piana, S. L.-L., K.; Shaw, D. E. (2013). "Atomic-level description of ubiquitin folding." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(15): 5915-5920.
- Pini, A. V., F.; Santucci, A.; Carnemolla, B.; Zardi, L.; Neri, P.; Neri, D. (1998). "Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel." J Biol Chem **273**(34): 21769-21776.

- 
- Ponce, R. (2008). "Adverse consequences of immunostimulation." J Immunotoxicol **5**(1): 33-41.
- Pope, B. K., H. M. (1996). "High Efficiency 5 Min Transformation of Escherichia Coli." Nucleic Acids Research **24**(3): 536-537.
- Porath, J. (1992). "Immobilized metal ion affinity chromatography." Protein Expression and Purification **3**(4): 263-281.
- Porath, J. C., J.; Olsson, I.; Belfrage, G. (1975). "Metal Chelate Affinity Chromatography: A New Approach to Protein Fractionation." Nature **258**.
- Reichert, J. M. (2014). "Antibodies to watch in 2014." MAbs **6**(1): 5-14.
- Reyes-Turcu, F. E. V., K. H.; Wilkinson, K. D. (2009). "Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes." Annu Rev Biochem **78**: 363-397.
- Robb, R. J. K., R. M.; Panico, M.; Morris, H. R.; Chowdhry, V. (1984). "Amino acid sequence and post-translational modification of human interleukin 2." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(20): 6486-6490.
- Roberts, R. W. S., Jack W. (1997). "RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(23): 12297-12302.
- Rosenberg, S. A. G., E. A.; McGrogan, M.; Doyle, M.; Kawasaki, E.; Kothe, K.; Mark, D. F. (1984). "Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in Escherichia coli." Science **223**(4643): 1412-1414.
- Sambrook, J. R., D.W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F. N., S.; Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proceedings of the National Academy of Sciences **74**(12): 5463-5467.
- Santimaria, M. M., G.; Viale, G. L.; Giovannoni, L.; Neri, G.; Viti, F.; Leprini, A.; Borsi, L.; Castellani, P.; Zardi, L.; Neri, D.; Riva, P. (2003). "Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer." Clin Cancer Res **9**(2): 571-579.
- Sauer, S. E., P. A.; Petrini, M.; Menrad, A.; Giovannoni, L.; Grana, C.; Hirsch, B.; Zardi, L.; Paganelli, G.; Mariani, G.; Neri, D.; Durkop, H.; Menssen, H. D. (2009). "Expression of the oncofetal ED-B-containing fibronectin isoform in hematologic tumors enables ED-B-targeted 131I-L19SIP radioimmunotherapy in Hodgkin lymphoma patients." Blood **113**(10): 2265-2274.
- Savitzky, A. G., M. J. E. (1964). "Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures." Analytical Chemistry **36**(8): 1627-1639.
- Schlehuber, S. S., A. (2002). "Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant -- a so-called 'anticalin' -- using a molecular random approach." Biophys Chem **96**(2-3): 213-228.
- Schlesinger, D. H. G., Gideon (1975). "Molecular conservation of 74 amino acid sequence of ubiquitin between cattle and man." Nature **255**(5507): 423-424.



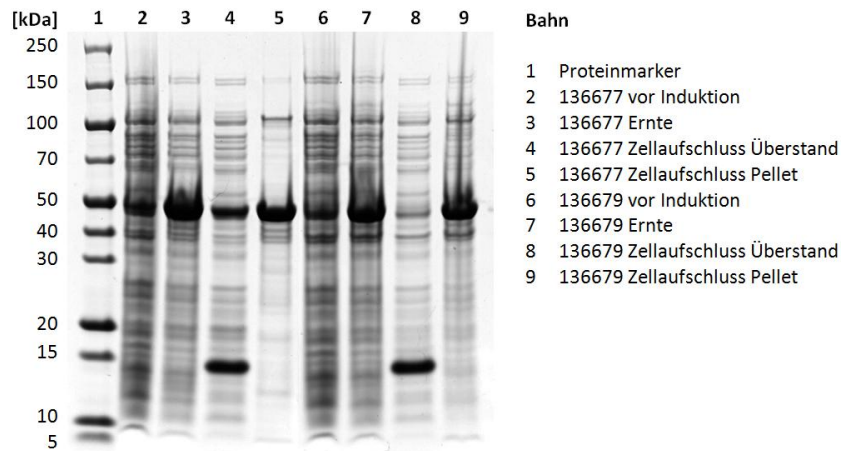
- Schliemann, C. P., A.; Zuberbuhler, K.; Villa, A.; Kaspar, M.; Trachsel, E.; Klapper, W.; Menssen, H. D.; Neri, D. (2009). "Complete eradication of human B-cell lymphoma xenografts using rituximab in combination with the immunocytokine L19-IL2." Blood **113**(10): 2275-2283.
- Schmidt, G. M. K., J.; Frank, R.; Skerra, A. (1996). "Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin." J. Mol. Biol. **255**: 753-766.
- Selo, I. N., L.; Creminon, C.; Grassi, J.; Wal, J. M. (1996). "Preferential labeling of alpha-amino N-terminal groups in peptides by biotin: application to the detection of specific anti-peptide antibodies by enzyme immunoassays." J Immunol Methods **199**(2): 127-138.
- Sengupta, P. M., K.; Mukherjee, R.; Jain, S. K.; Maithal, K. (2008). "Optimized conditions for high-level expression and purification of recombinant human interleukin-2 in E. coli." Indian J Biochem Biophys **45**(2): 91-97.
- Shih, S. C. R., G. S.; Perruzzi, C. A.; Calvo, A.; Desai, K.; Green, J. E.; Ali, I. U.; Smith, L. E.; Senger, D. R. (2002). "Molecular profiling of angiogenesis markers." Am J Pathol **161**(1): 35-41.
- Shimizu, Y. I., Akio; Tomari, Yukihide; Suzuki, Tsutomu; Yokogawa, Takashi; Nishikawa, Kazuya; Ueda, Takuya (2001). "Cell-free translation reconstituted with purified components." Nat Biotech **19**(8): 751-755.
- Silverman, J. L., Q.; Bakker, A.; To, W.; Duguay, A.; Alba, B. M.; Smith, R.; Rivas, A.; Li, P.; Le, H.; Whitehorn, E.; Moore, K. W.; Swimmer, C.; Perloth, V.; Vogt, M.; Kolkman, J.; Stemmer, W. P. (2005). "Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains." Nat Biotechnol **23**(12): 1556-1561.
- Skerra, A. (2000). "Engineered protein scaffolds for molecular recognition." J Mol Recognit **13**(4): 167-187.
- Skerra, A. (2003). "Imitating the humoral immune response." Curr Opin Chem Biol **7**(6): 683-693.
- Skerra, A. (2008). "Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities." FEBS J **275**(11): 2677-2683.
- Skerra, A. P., A. (1991). "Secretion and in vivo folding of the Fab fragment of the antibody McPC603 in Escherichia coli: influence of disulphides and cis-prolines." Protein Eng **4**(8): 971-979.
- Skerra, A. S., T. G. (2000). "Use of the Strep-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins." Methods Enzymol. **326**: 271-304.
- Sloper-Mould, K. E. J., J. C.; Pickart, C. M.; Hicke, L. (2001). "Distinct functional surface regions on ubiquitin." J Biol Chem **276**(32): 30483-30489.
- Smith, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." Science **228**(4705): 1315-1317.
- Souied, E. H. D., F.; Mauget-Faysse, M.; Kolar, P.; Wolf-Schnurrbusch, U.; Framme, C.; Gaucher, D.; Querques, G.; Stumpp, M. T.; Wolf, S. (2014). "Treatment of Exudative Age-Related Macular Degeneration with a Designed Ankyrin Repeat Protein that Binds Vascular Endothelial Growth Factor: A Phase I/II Study." Am J Ophthalmol.
- Stahl, A. S., M. T.; Schlegel, A.; Ekawardhani, S.; Lehrling, C.; Martin, G.; Gulotti-Georgieva, M.; Villemagne, D.; Forrer, P.; Agostini, H. T.; Binz, H. K. (2013). "Highly potent VEGF-A-

- antagonistic DARPins as anti-angiogenic agents for topical and intravitreal applications." Angiogenesis **16**(1): 101-111.
- Stewart, E. J. A., F.; Beckwith, J. (1998). "Disulfide bond formation in the Escherichia coli cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins." EMBO J **17**(19): 5543-5550.
- Stordeur, C. (2013). Artifizielle Bindeproteine auf der Basis des ultrastabilen scaffold Proteins M7. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Stryer, L. (1995). Biochemistry, W.H. Freeman.
- 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. M., Barbara 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.
- Taniguchi, T. M., Hiroshi; Fujita, Takashi; Takaoka, Chikako; Kashima, Nobukazu; Yoshimoto, Ryota; Hamuro, Junji (1983). "Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2." Nature **302**(5906): 305-310.
- Taniguchi, T. M., Y. (1993). "The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview." Cell **73**(1): 5-8.
- Tokunaga, F. S., S.; Saeki, Y.; Satomi, Y.; Kirisako, T.; Kamei, K.; Nakagawa, T.; Kato, M.; Murata, S.; Yamaoka, S.; Yamamoto, M.; Akira, S.; Takao, T.; Tanaka, K.; Iwai, K. (2009). "Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation." Nat Cell Biol **11**(2): 123-132.
- Tolmachev, V. O., A.; Pehrson, R.; Galli, J.; Bastrup, B.; Andersson, K.; Sandstrom, M.; Rosik, D.; Carlsson, J.; Lundqvist, H.; Wennborg, A.; Nilsson, F. Y. (2007). "Radionuclide therapy of HER2-positive microxenografts using a <sup>177</sup>Lu-labeled HER2-specific Affibody molecule." Cancer Res **67**(6): 2773-2782.
- Tonegawa, S. (1983). "Somatic generation of antibody diversity." Nature **302**(5909): 575-581.
- Tonelli, R. R. C., Walter; Alves, Maria Júlia Manso (2013). "Selection of binding targets in parasites using phage-display and aptamer libraries in vivo and in vitro." Frontiers in Immunology **3**.
- Tsumoto, K. E., D.; Kumagai, I.; Arakawa, T. (2003). "Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies." Protein Expr Purif **28**(1): 1-8.
- Tsumoto, K. U., M.; Kumagai, I.; Ejima, D.; Arakawa, T. (2003). "Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine." Biochem Biophys Res Commun **312**(4): 1383-1386.
- Tsumoto, K. U., M.; Kumagai, I.; Ejima, D.; Philo, J. S.; Arakawa, T. (2004). "Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification." Biotechnol Prog **20**(5): 1301-1308.
- Van den Brulle, J. F., M.; Langmann, T.; Horn, G.; Waldmann, T.; Arnold, S.; Fuhrmann, M.; Schatz, O.; O'Connell, T.; O'Connell, D.; Auckenthaler, A.; Schwer, H. (2008). "A novel solid phase technology for high-throughput gene synthesis." Biotechniques **45**(3): 340-343.
- Vieira, J. M., Joachim (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. Methods in Enzymology. L. G. Ray Wu, Academic Press. **Volume 153**: 3-11.

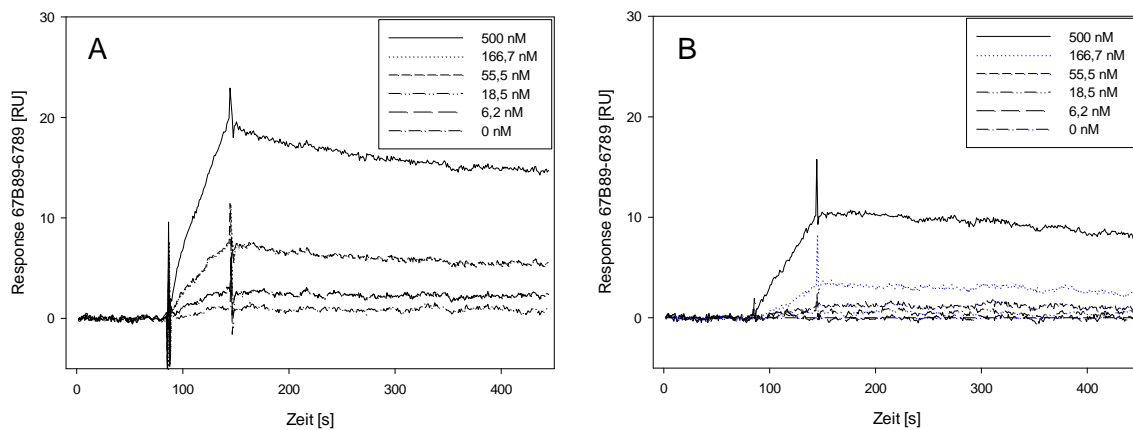
- Vijay-Kumar, S. B., C. E.; Cook, W. J. (1987). "Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution." J Mol Biol **194**(3): 531-544.
- Villa, A. T., E.; Kaspar, M.; Schliemann, C.; Sommovilla, R.; Rybak, J. N.; Rosli, C.; Borsi, L.; Neri, D. (2008). "A high-affinity human monoclonal antibody specific to the alternatively spliced EDA domain of fibronectin efficiently targets tumor neo-vasculature in vivo." Int J Cancer **122**(11): 2405-2413.
- Voshol, H. E., Markus; Traenkle, Jens; Bertrand, Eric; van Oostrum, Jan (2009). "Antibody-based proteomics." FEBS Journal **276**(23): 6871-6879.
- Voss, S. S., 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 Eng **10**: 975-982.
- Wagner, K. S., P.; Scholz, A.; Wiedenmann, B.; Menrad, A. (2008). "The targeted immunocytokine L19-IL2 efficiently inhibits the growth of orthotopic pancreatic cancer." Clin Cancer Res **14**(15): 4951-4960.
- Wedemeyer, W. J. W., Ervin; Scheraga, Harold A. (2002). "Proline Cis-Trans Isomerization and Protein Folding." Biochemistry **41**(50): 14637-14644.
- Weidle, U. H. A., J.; Brinkmann, U.; Georges, G.; Tiefenthaler, G. (2013). "The emerging role of new protein scaffold-based agents for treatment of cancer." Cancer Genomics Proteomics **10**(4): 155-168.
- Weiner, L. M. (2006). "Fully human therapeutic monoclonal antibodies." J Immunother **29**(1): 1-9.
- Weir, M. P. S., J. (1987). "Purification and renaturation of recombinant human interleukin-2." Biochem J **245**(1): 85-91.
- White, E. S. B., F. E.; Muro, A. F. (2008). "New insights into form and function of fibronectin splice variants." J Pathol **216**(1): 1-14.
- Wiborg, O. P., M. S.; Wind, A.; Berglund, L. E.; Marcker, K. A.; Vuust, J. (1985). "The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences." EMBO J **4**(3): 755-759.
- Winget, J. M. M., Thibault (2010). "The Diversity of Ubiquitin Recognition: Hot Spots and Varied Specificity." Molecular Cell **38**(5): 627-635.
- Wong, T. S. R., D.; Schwaneberg, U. (2007). "Steering directed protein evolution: strategies to manage combinatorial complexity of mutant libraries." Environ Microbiol **9**(11): 2645-2659.
- Worn, A. P., A. (2001). "Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments." J Mol Biol **305**(5): 989-1010.
- Yang, J. T. W., Chuen-Shang C.; Martinez, Hugo M. (1986). Calculation of protein conformation from circular dichroism. Methods in Enzymology. S. N. T. C. H. W. Hirs, Academic Press. **Volume 130**: 208-269.
- Yonezawa, M. D., Nobuhide; Kawahashi, Yuko; Higashinakagawa, Toru; Yanagawa, Hiroshi (2003). "DNA display for in vitro selection of diverse peptide libraries." Nucleic Acids Research **31**(19): e118.

- 
- Yoon, S. H. K., S. K.; Kim, J. F. (2010). "Secretory production of recombinant proteins in Escherichia coli." Recent Pat Biotechnol **4**(1): 23-29.
- Zaccolo, M. W., D. M.; Brown, D. M.; Gherardi, E. (1996). "An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues." J Mol Biol **255**(4): 589-603.
- Zahnd, C. A., P.; Plückthun, A. (2007). "Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target." Nat Methods **4**(3): 269-279.
- Zhang, C. K., James B. (2010). "A Photostable Green Fluorescent Protein Variant for Analysis of Protein Localization in Candida albicans." Eukaryotic Cell **9**(1): 224-226.

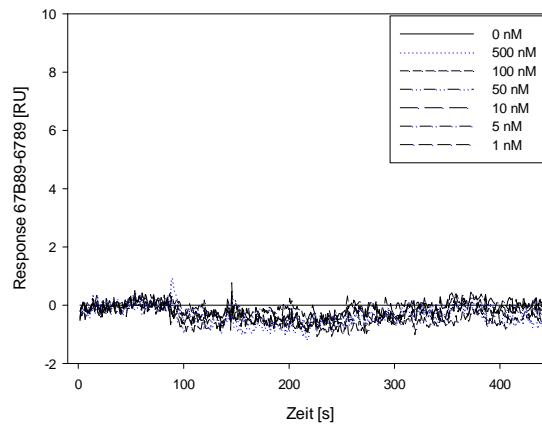
## 8 Anhang



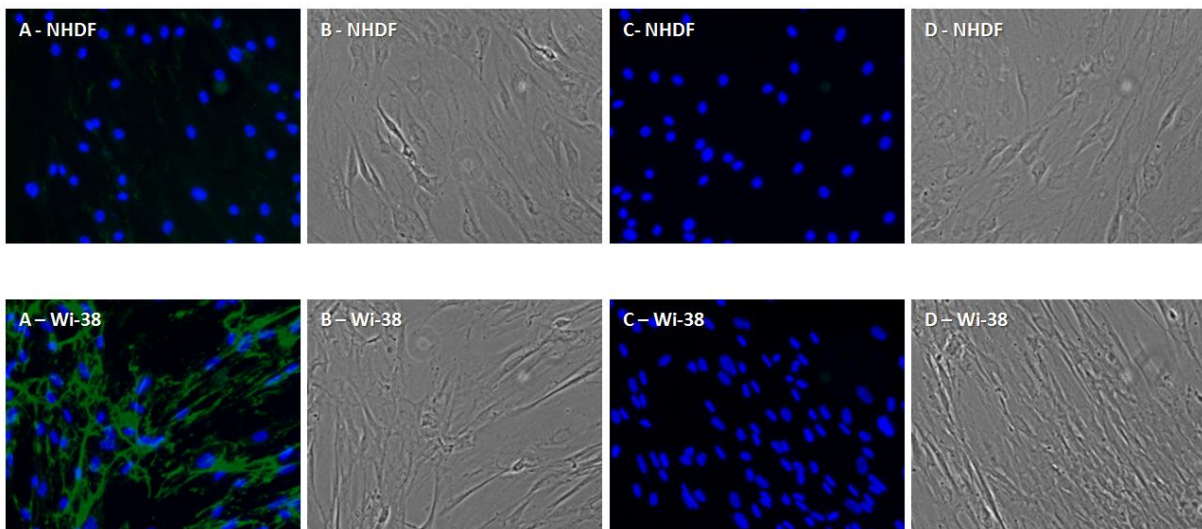
**Abbildung 8-1: Expressionstest und Löslichkeitsanalyse zweier eGFP-Fusionen.** Während der Expression und des Zellaufschlusses wurden jeweils Proben von der Ubiquitin-Dimer-eGFP-Fusion (136677) und der 102472-eGFP-Fusion (136679) mittels SDS-PAGE untersucht. Die Proben wurden mit einem Fünftel ihres Volumens mit 5-fachem SDS-Auftragspuffer versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die so behandelten Proben auf NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris-Gradientengele aufgetragen und mit Coomassie gefärbt.



**Abbildung 8-2: SPR-Sensogramme der eGFP-fusionierten Variante 129091 (A) und dem Abkömmling CP1-E1 (B).** Auf einen SA-Chip wurden jeweils ca. 300 RU Targetproteine 67B89 bzw. 6789 immobilisiert und anschließend die zu untersuchenden Varianten in verschiedenen Konzentrationen vermessen. Die Assoziationsphase betrug 60 Sekunden, die Dissoziation wurde 300 Sekunden durchgeführt, bevor eine Regeneration mit 10 mM HCl erfolgte. Als Laufpuffer wurde PBS pH 7,4 mit 0,005% Tween 20 mit einem Fluss von 30 µL/min verwendet.



**Abbildung 8-3: SPR-Sensogramme des eGFP-fusionierten Ubiquitin-Dimers.** Auf einen SA-Chip wurden jeweils ca. 300 RU Targetproteine 67B89 bzw. 6789 immobilisiert und anschließend die zu untersuchenden Varianten in verschiedenen Konzentrationen vermessen. Die Assoziationsphase betrug 60 Sekunden, die Dissoziation wurde 300 Sekunden durchgeführt, bevor eine Regeneration mit 10 mM HCl erfolgte. Als Laufpuffer wurde PBS pH 7,4 mit 0,005% Tween 20 mit einem Fluss von 30  $\mu$ L/min verwendet.



**Abbildung 8-4: Fluoreszenzmikroskopie des Kontrollproteins 46877 (A, B) und der Ubiquitin-Dimer-eGFP-Fusion (C, D).** ED-B-exprimierende Wi-38-Zellen und Kontrollzellen des Typs NHDF wurden kultiviert und mittels Methanol fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Affilin<sup>®</sup>-Konzentration von 50 nM für eine Stunde inkubiert. Der Nachweis erfolgte bei der Diubiquitin-Fusion direkt über die Fluoreszenz des eGFP und bei der Kontrollvariante indirekt über die Antikörper rabbit anti-Strep-tag IgG und goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor<sup>®</sup> 488. Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff DAPI blau gefärbt. Zusätzlich wurden auflichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen angefertigt.

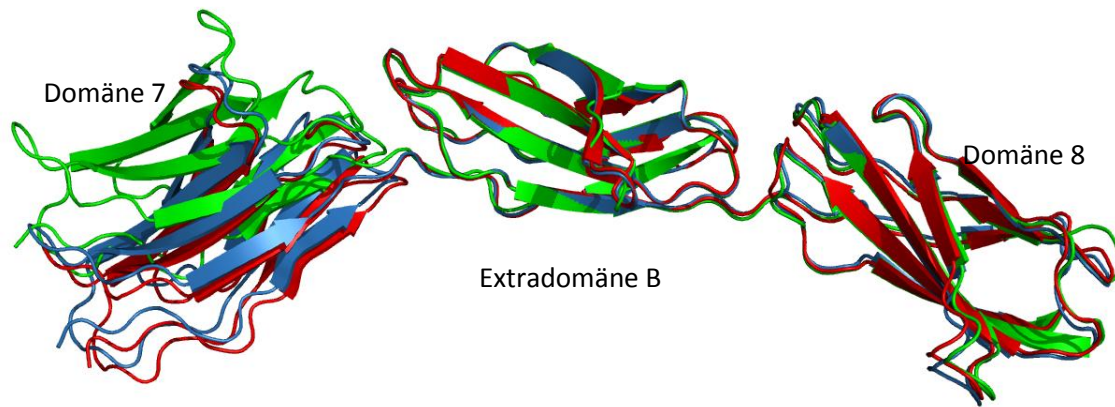
Tabelle 8-1: Zusammenfassung Reinigung und Analytik maturierter Affilin®-eGFP-Fusionen

Variante	Herstellung		Analytik					Endprodukt	
	BFM [g]	Monomeranteil [%]	Reinheit HPLC SE [%]	rp [%]	SPR [nM]	ELISA 67B89 [nM]	ELISA 6789 [nM]	mg/L Kultur	mg/g BFM
102472- Abkömmlinge									
CP3-A5	4,4	81	100	99	0,7	0,5	k. Bindung	1,4	0,3
CP2-F12	3,7	75	100	95	1,2	4,3	k. Bindung	2,2	0,6
CP3-G9	3,8	82	98	100	0,4	2,3	k. Bindung	1,5	0,4
CP1-E7	3,9	56	100	80	0,2	1,9	k. Bindung	1,3	0,3
CP2-H3	3,5	69	97	100	0,7	2	k. Bindung	0,4	0,1
CP3-H1	2,9	46	98	100	0,7	2,3	k. Bindung	1,4	0,5
CP2-F11	3,2	74	99	100	0,7	1,3	k. Bindung	2,1	0,6
CP1-A8	3,1	51	100	89	0,4	4,5	k. Bindung	1,7	0,6
CP2-D6	3,9	64	100	97	1	2,9	k. Bindung	2,0	0,5
CP3-E8	4	58	100	95	1,4	1,4	k. Bindung	2,4	0,6
CP2-E12	4,2	70	76	95	1,1	1,7	k. Bindung	2,0	0,5
CP1-H8	3,5	30	53	92	0,5	3,5	k. Bindung	1,8	0,5
CP2-A11	4,3	12	44	-	-	-	-	-	-
CP2-F7	4	0	-	-	-	-	-	-	-
129091- Abkömmlinge									
CP1-H8	3,8	22	90	n.a.	n.a.	682	#	0,2	0,1
CP1-E1	2,3	17	100	n.a.	n.a.	369	#	0,6	0,3
CP1-A12	2,9	7	100	n.a.	n.a.	1069	k. Bindung	0,5	0,2
CP2-H1	3,6	17	98	n.a.	n.a.	768	#	0,8	0,2
CP1-E2	6,8	18	86	n.a.	n.a.	577	k. Bindung	0,7	0,1
CP1-A4	3,1	0	*	-	-	-	-	0,3	0,1
CP1-B1	2,4	0	*	-	-	-	-	1,2	0,5
CP1-G12	2,2	0	*	-	-	-	-	1,4	0,7
CP1-F12	3,4	0	*	-	-	-	-	1,4	0,4
CP1-B2	3	0	*	-	-	-	-	-	-
136677 (WT-eGFP)	5	66	100	98	k. Bindung	k. Bindung	k. Bindung	8,76	1,8
102472-eGFP	4,9	20	100	97	6,2	94,5	k. Bindung	0,26	0,1
129091-eGFP	5,7	14	100	82	n.d.	927	k. Bindung	0,7	0,1

\* nur Aggregat

# leicht unspezifische Bindung

Farbig markierte Mutanten wurden für eine weitere Umklonierung genutzt, um Affilin®-Moleküle mit Strep-tag II ohne eGFP zu erzeugen.



**Abbildung 8-5: Vergleich des Targetkonstrukts 7B8 aus der Komplexstruktur mit dem Affilin® 138809.** In der asymmetrischen Einheitszelle waren drei Komplexe aus dem Target 7B8 und dem Affilin® 138809 enthalten. Die Darstellung zeigt eine leichte strukturelle Abweichung der Domäne 7 bei der Überlagerung der Targetproteine.



## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Anja Katzschmann  
Geburtsdatum: 09.02.1986  
Geburtsort: Rochlitz  
Geschlecht: weiblich  
Nationalität: deutsch  
Akademischer Grad: Diplom-Ingenieur Bioprozesstechnik

Wohnsitz: Humboldtstraße 25  
06114 Halle (Saale)

### Schulischer und Beruflicher Werdegang:

seit 10/2010 Mitarbeiter der Scil Proteins GmbH, Abteilung Affilin® Discovery and Protein Analytics  
Anfertigung der Promotionsarbeit unter Prof. Dr. Markus Pietzsch

04/2010 – 09/2010 Technische Assistentin Scil Proteins GmbH Halle, Abteilung Protein Analytics

10/2004 – 01/2010 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Studium: Bioingenieurwesen (Vertiefung: Bioprozesstechnik)  
Diplomarbeit „Untersuchungen zur Produktion, Reinigung und Charakterisierung einer Variante einer rekombinanten mikrobiellen Transglutaminase sowie einer humanen Transglutaminase“  
(AG Aufarbeitung biotechnologischer Produkte)

09/1996 – 07/2004 Conrad-Felixmueller-Gymnasium Geithain

09/1992 – 08/1996 Paul-Guenther-Schule Grundschule Geithain

---

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation sowie alle praktischen Arbeiten wurden während meiner Tätigkeit im Unternehmen Scil Proteins GmbH angefertigt. In diesem Zeitraum haben mich viele Menschen unterstützt, denen ich im Folgenden danken möchte.

An erster Stelle möchte ich Herrn Dr. Erik Fiedler für die sehr gute Betreuung in der gesamten Promotionszeit danken. Seine positiven Impulse halfen mir, die Arbeit voranzubringen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Pietzsch, dem Leiter der Arbeitsgruppe „Aufarbeitung biotechnologischer Produkte“ des Instituts für Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die universitäre Betreuung des Themas.

Bei der Geschäftsführung der Scil Proteins GmbH, Frau Dr. Ulrike Fiedler, Herrn Dr. Ulrich Haupts und Herrn Dr. Henning Afflerbach, bedanke ich mich für die Ermöglichung dieser Arbeit im Unternehmen.

Für die Röntgenstrukturauflösung und einen Einblick in die interessante Welt der Kristalle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Milton Stubbs und Herrn Dr. Christoph Parthier bedanken.

Ich bedanke mich herzlich bei allen Mitarbeitern der Scil Proteins GmbH für die gute Zusammenarbeit. Frau Dr. Maren Meysing, Frau Dr. Madlen Zwarg, Herrn Dr. Markus Liebscher, Frau Silvana Smigielski sowie Herrn Daniel Koscheinz danke ich für die Unterstützung in der Molekularbiologie und für die Einführung in die molekularen Displaymethoden. Einen herzlichen Dank für die Ausführung der Zellkulturuntersuchungen gilt Herrn Dr. Florian Settele, Frau Dr. Manja Gloser, sowie Frau Anja Gräbe. Herrn Paul Knick, Frau Anett Swoboda, Frau Anja Hallensleben, Frau Cora Fröhling und Herrn Tobias Radtke danke ich für freundliche Atmosphäre im Labor und für die Unterstützung in der Proteinreinigung und Analytik.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Praktikanten und Studenten bedanken, die ich während meiner Promotion betreut habe. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Anja Reimann für die Durchführung der Maturierung der Bindeproteine.

Von ganzen Herzen möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern bedanken, die mich stets unterstützt und aufgemuntert haben. Einen ganz besonderen Dank möchte ich Christian Lange aussprechen, der immer ein offenes Ohr für alle großen und kleinen Probleme hatte und mich mit viel Geduld während der Promotion unterstützt hat.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Anja Katzschmann, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass ich nicht anderweitig versucht habe, diese Dissertation einzureichen oder einer Prüfungsbehörde einer anderen Hochschule vorzulegen.

---

Halle (Saale), den 27. 10. 2014