TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Biologische Chemie

# Rationales und kombinatorisches Protein-Engineering mit Lipocalinen

Jan-Peter Andreas Mayer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Küster
Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Arne Skerra
2. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Liebl

Die Dissertation wurde am 10.12.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München am 15.03.2013 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

**1 Einleitung 1**

1.1 Lipocaline als Gerüstproteine für das *Protein-Engineering* 1

1.1.1 Varianten des Bilin-Bindungsproteins (BBP) 3

1.1.2 Das Bakterielle Lipocalin (Blc) aus *E. coli* 6

1.2 Das Anticalin DigA16(H86N) als Fusionspartner mit Reporter-Enzymen 8

1.3 Strategien für das *De-Novo*-Design von Enzymen 16

1.3.1 Theorie des Übergangszustandes enzymatisch katalysierter Reaktionen 16

1.3.2 Übergangszustandsanaloga als *Targets* für Bindungsproteine 18

1.3.3 *In-Silico*-Design neuartiger Enzyme 20

1.3.4 Genetische *In-Vivo*-Selektion 22

1.4 Aufgabenstellung 25

**2 Material und Methoden 26**

2.1 Material 26

2.1.1 *E. coli* Stämme und Bakteriophagen 26

2.1.2 Plasmide 27

2.1.3 Oligodesoxynukleotide 27

2.1.4 Enzyme und andere Proteine 29

2.1.5 Chemikalien 30

2.1.6 Standards und Kits 34

2.1.7 Geräte 35

2.1.8 Verbrauchsmaterial 40

2.1.9 Medien 42

2.1.10 Puffer und Lösungen 44

2.2 Molekularbiologische Methoden 48

2.2.1 Kultivierung von *E. coli* Stämmen 48

2.2.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA 48

2.2.2.1 Transformation nach der $CaCl_2$-Methode 49

2.2.2.2 Transformation durch Elektroporation 50

2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* 51

2.2.3.1 Plasmid-Minipräparationen 51

2.2.3.2 Plasmid-Midipräparationen 51

2.2.3.3 Isolierung von einzelsträngiger Plasmid-DNA aus *E. coli* 52
2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA 53
2.2.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese 53
2.2.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese 54
2.2.4.3 Denaturierende Harnstoff/Polyacrylamid-Gelelektrophorese 55
2.2.4.4 Reinigung von DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion 56
2.2.5 Enzymatische Reaktionen mit DNA 57
2.2.5.1 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen 57
2.2.5.2 Ligierung von DNA-Fragmenten 58
2.2.5.3 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten 58
2.2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 59
2.2.6 Ortsgerichtete Mutagenese nach Kunkel 60
2.2.7 Sequenzierung doppelsträngiger DNA 61
2.3 Gentechnische Methoden 62
2.3.1 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli* 62
2.3.1.1 Protein-Produktion im 2 L-Maßstab 63
2.3.1.2 Protein-Produktion im Laborfermenter 63
2.3.2 *In-Vivo*-Selektion mit Lipocalin-Bibliotheken in *E. coli* 65
2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 66
2.3.4 Chromatographische Verfahren 67
2.3.4.1 Immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC) 67
2.3.4.2 Streptavidin-Affinitätschromatographie 68
2.3.4.3 Größenausschluss-Chromatographie 68
2.3.5 Bestimmung von Proteinkonzentration 69
2.3.6 Konzentrierung von Proteinen 69
2.3.7 Digoxigenin-Markierung von Trägerproteinen 70
2.3.8 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 70
2.3.8.1 Direkter ELISA 70
2.3.8.2 Kompetitiver ELISA 72
2.3.9 Enzymkinetik 73
2.4 Biophysikalische Methoden 74
2.4.1 Fluoreszenztitration 74
2.4.2 CD-Spektroskopie 76
2.4.3 Oberflächen-Plasmonresonanz (Biacore) 79

2.4.4 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) 81
2.5 Software und Datenbanken 82

**3 Ergebnisse 83**
3.1 Konstruktion einer Zufallsbibliothek auf der Basis des Bakteriellen Lipocalins 83
3.1.1 Auswahl von Aminosäurepositionen für die Zufallsmutagenese 83
3.1.2 Vorbereitung eines Expressionsvektors 86
3.1.3 Konzertierte Mutagenese der ausgewählten Aminosäurepositionen 94
3.1.4 Optimierung enzymatischer Schritte zur Erzeugung der Plasmid-Bibliothek 98
3.1.5 Optimierung der Transformation von *E. coli* durch Elektroporation 101
3.1.6 Konstruktion eines Expressionsvektors für *In-Vivo*-Selektionsexperimente 104
3.1.7 Verbesserung des Expressionssystems in Hinblick auf verringerte Cytotoxizität 106
3.1.8 Herstellung der Expressionsbibliothek für Blc-Varianten 111
3.2 Herstellung einer Zufallsbibliothek auf der Basis des Bilin-Bindungsproteins 116
3.3 Strategien zur *In-Vivo*-Selektion von Proteinen mit enzymatischer Aktivität 119
3.3.1 Geeignete Enzym-Modellsubstrate für *In-Vivo*-Selektionsexperimente 119
3.3.2 Auswahl geeigneter *E. coli* Stämme für die *In-Vivo*-Selektion 126
3.3.3 Optimierung geeigneter Minimalmedien 130
3.3.4 Selektionsexperimente aus naiven Lipocalin-Bibliotheken 132
3.3.5 Versuche zur Evolution durch wiederholte Zyklen von Selektion und Zufallsmutagenese 138
3.4 Biochemische Charakterisierung des Anticalins DigA16(H86N) mit Bindungsaktivität für Digoxigenin 143
3.4.1 Bakterielle Produktion und Reinigung von DigA16(H86N) 143
3.4.2 Untersuchung der Liganden-Bindungseigenschaften von DigA16(H86N) 144
3.5 Fusionsproteine aus dem Anticalin DigA16(H86N) und der β-Lactamase AmpC aus *Enterobacter cloacae* 147
3.5.1 Entwicklung des Expressionsvektors 148
3.5.2 Heterologe Produktion und Reinigung des Fusionsproteins DigA16(H86N)-AmpC2 150
3.5.3 Biochemische und funktionelle Charakterisierung des Fusionsproteins DigA16(H86N)-AmpC2 152

3.6 Fusionsproteine aus dem Anticalin DigA16(H86N) und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase 157
3.6.1 Bakterielle Produktion und Reinigung der Fusionsproteine 158
3.6.2 Biochemische und funktionelle Charakterisierung 159

**4 Diskussion 165**
4.1 Strategien zum evolutiven *De-Novo*-Design katalytischer Proteine 165
4.1.1 Konstruktion hochkomplexer Lipocalin-Zufallsbibliotheken 165
4.1.2 Etablierung potentiell geeigneter *In-Vivo*-Selektionsbedingungen 167
4.2 Das Anticalin DigA16(H86N) 171
4.3 Fusionsproteine des DigA16(H86N) mit bakteriellen β-Lactamasen 173
4.4 Fusionsproteine des DigA16(H86N) mit der Alkalischen Phosphatase aus *E. coli* 177
4.5 Ausblick 180

**5 Zusammenfassung 181**

**6 Literaturverzeichnis 183**

**7 Abkürzungen 202**

# 1 Einleitung

## 1.1 Lipocaline als Gerüstproteine für das *Protein-Engineering*

Als Lipocaline bezeichnet man eine Familie kleiner sekretorischer Proteine, die in Vertebraten, Insekten, Pflanzen sowie Bakterien vorkommen. In diesen Organismen übernehmen sie diverse physiologische Funktionen, die meistens mit dem Transport oder der Speicherung hydrophober und häufig auch chemisch empfindlicher, organischer Verbindungen zusammenhängen. Zu diesen natürlichen Liganden zählen Fettsäuren und Lipide, Steroid-Hormone, Biline, Siderophore sowie Retinoide (Finn *et al.*, 2008).

Das zentrale Faltungsmotiv der Lipocaline ist ein kelchförmiges β-Fass (*β-Barrel*), bestehend aus acht antiparallelen β-Faltblättern, die sich um eine zentrale Achse winden (Abbildung 1). Ein Ende dieser Struktur wird durch Peptidschleifen und eine dichte Packung der Aminosäureseitenketten verschlossen, während die auf der anderen Seite durch vier Peptidschleifen paarweise verbundenen Faltblättstränge den Rand einer Kavität formen. Diese ist zum Lösungsmittel offen und hat die Funktion einer Bindungstasche zur Aufnahme natürlicher Liganden. Weitere konservierte Strukturmerkmale der Lipocaline sind eine kurze α-Helix in der Nähe des C-Terminus, gefolgt von einem gestreckten Peptid-Segment, sowie oftmals eine kurze $3_{10}$-Helix nahe dem N-Terminus.

Obwohl die Lipocaline nur eine sehr geringe Sequenzhomologie von typischerweise 10-20 % aufweisen, ist ihr charakteristisches Faltungsmotiv, das *β-Barrel*, hoch konserviert. Im Gegensatz dazu zeigen die Peptidschleifen am Eingang zur Bindungstasche eine erstaunlich hohe strukturelle Variabilität (siehe z. B. Skerra, 2000). Diese Vielfalt ist sehr wahrscheinlich als strukturelle Adaption dieses Faltungsgerüstes an unterschiedliche Liganden zu verstehen. In dieser Hinsicht haben Lipocaline deutliche Gemeinsamkeit mit Immunglobulinen, bei denen die Antigen-Erkennung durch Variation von sechs hypervariablen Peptidschleifen, den sogenannten *Complementarity-Determining Regions* (CDRs), moduliert wird (Skerra, 2003). Die CDRs werden dabei von einem rigiden β-Sandwich Strukturmotiv getragen, das sich jeweils aus der variablen Domäne der leichten und der schweren Kette des Antikörpers zusammensetzt. Diese Antigen-Bindungsstellen kommen paarweise an den Spitzen der typisch Y-förmigen Tertiärstruktur der Immunglobuline vor.

Diese Zusammenhänge ließen vermuten, dass Lipocaline grundsätzlich ähnliche Möglichkeiten als universelle Bindeproteine eröffnen, wie sie von Antikörpern bekannt sind. Da

Lipocaline allerdings keinem natürlichen Mutationsprozess durch Gen-Rekombination und somatische Hypermutation mit anschließender Selektion durch das Immunsystem unterliegen, können neue Bindungsspezifitäten ausschließlich auf künstlichem Wege generiert werden.

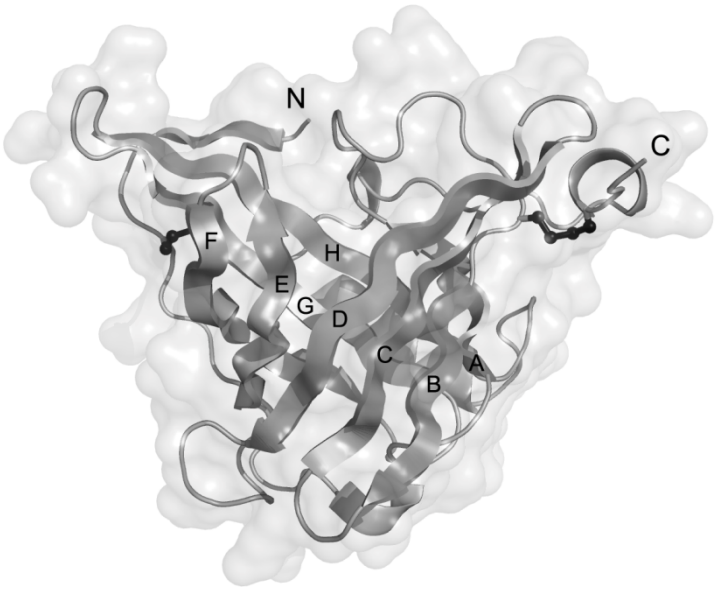



**Abbildung 1:** Räumliche Darstellung des Bilin-Bindungsproteins (BBP) aus *Pieris bassicae* mit angedeuteter Oberflächenstruktur (PDB ID: 1BBP). Man beachte die acht antiparallelen β-Faltblattstränge (A-H), die ein nach oben hin geöffnetes β-Fass bilden und jeweils paarweise über Peptidschleifen miteinander verbunden sind. Die beiden Disulfidbrücken des BBP sind als Kugel-Stab-Modell schwarz dargestellt. N- und C-Terminus des Proteins sind gekennzeichnet.

Dieses Konzept maßgeschneiderter Bindeproteine auf der Basis von Lipocalinen wurde in der sogenannten Anticalin-Technologie verwirklicht (siehe z. B. Skerra, 2008). Erste Studien konzentrierten sich dabei auf das biochemisch sowie strukturell gut charakterisierte Bilin-Bindungsprotein (BBP) aus dem Tagfalter *Pieris bassicae* (Suter *et al.*, 1988), dessen Bindungstasche für den natürlichen Liganden Biliverdin IXγ gut zugänglich und im Vergleich zu anderen Lipocalinen relativ ausgedehnt ist. Auf der Basis struktureller Überlegungen wurden insgesamt 16 Aminosäuren in den vier Peptidschleifen des BBP einer gerichteten Zufallsmutagenese unterworfen (Abschnitt 1.1.1). Durch Einsatz dieser Proteinbibliothek gelang ein erster Selektionserfolg mit Fluorescein als Modell-Hapten. In einem *Phage-Display* Experiment konnten BBP-Varianten isoliert werden, die Fluorescein mit hoher Spezifität und einer Affinität von bis zu 35 nM binden (Beste *et al.*, 1999). Die Röntgenstrukturanalyse dieses neuartigen „Anticalins“ (Korndörfer *et al.*, 2003a) erlaubte es, die Affinität zu Fluorescein durch zwei gezielte Aminosäuresubstitutionen in der Bindungstasche weiter auf etwa 1 nM zu

verbessern (Vopel *et al.*, 2005). Einen weiteren Erfolg stellte ein Anticalin mit Spezifität für Digoxigenin dar (Schlehuber *et al.*, 2000), einer sowohl therapeutisch als auch diagnostisch bedeutsamen pflanzlichen Steroid-Verbindung. Dieses Anticalin wird ausführlich in Abschnitt 1.1.1 behandelt.

Im wirtschaftlich zunehmend an Bedeutung gewinnenden Bereich der Biopharmazeutika spielen Antikörper als universelle Bindeproteine eine übergeordnete Rolle als Grundlage für neue Arzneimittel. So basieren etwa 30 % aller derzeit in der klinischen Prüfung befindlichen Biopharmazeutika auf dieser Proteinklasse, wobei fast ausschließlich extrazellulare Zelloberflächenrezeptoren oder lösliche Signalfaktoren die relevanten Zielstrukturen (*Targets*) darstellen. Nicht zuletzt deswegen ist man schon seit geraumer Zeit bemüht, Anticaline gegen biopharmazeutisch interessante Proteine zu entwickeln (Review siehe Skerra, 2007). Um eine potentielle Immunogenität solcher Therapeutika von Anfang an möglichst zu verhindern, wurden entsprechende Versuche auf der Basis humaner Lipocaline wie z. B. dem Apolipoprotein D (ApoD; Vogt & Skerra, 2004; Eichinger *et al.*, 2007), dem Tränenlipocalin (Tlc; Schönfeld *et al.*, 2009) sowie dem *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin* (NGAL; Goetz *et al.*, 2002) durchgeführt. Dazu wurden 16-24 Aminosäuren an exponierten Positionen, hauptsächlich an den Spitzen der vier variablen Peptidschleifen randomisiert. Auf der Grundlage dieser humanen Gerüstproteine konnten so bereits Anticaline mit sehr hoher Affinität gegenüber therapeutisch relevanten *Targets* isoliert werden, wie z. B. dem *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4* (CTLA-4; Schlehuber & Skerra, 2005) und dem *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF; Hohlbaum & Skerra, 2007). Unlängst konnte sogar die Röntgen-Kristallstruktur des Komplexes aus einem Anticalin und CTLA-4 gelöst werden (Schönfeld *et al.*, 2009). Dabei zeigte sich sehr eindrucksvoll, dass alle vier randomisierten Peptidschleifen an der molekularen Erkennung des Bindungspartners teilnehmen und dem Anticalin so eine sehr hohe Affinität und Spezifität verleihen. Dieses Ergebnis bestätigte, dass sich Anticaline auch ausgezeichnet zur Erkennung von Proteinen im Vergleich zu niedermolekularen Liganden eignen und sich dabei sehr ähnlich zu Antikörpern mit ihren CDRs verhalten.

### 1.1.1 Varianten des Bilin-Bindungsproteins (BBP)

Das Bilin-Bindungsprotein aus *Pieris brassicae* hatte sich als geignetes Gerüstprotein für die Erzeugung maßgeschneiderter Varianten mit neuartigen Bindungseigenschaften bewährt (Abschnitt 1). Die erfolgreiche Selektion von Anticalinen setzte dabei voraus, eine passende

Auswahl an Zufallspositionen im Protein zu treffen, mit dem Ziel, eine Bibliothek an Varianten mit funktionell vielfältigen molekularen Oberflächen zu generieren. Um die kombinatorische Komplexität dabei einzugrenzen, wurden auf der Basis struktureller Überlegungen insgesamt 16 Aminosäuren identifiziert, die in direktem Kontakt zum natürlichen Liganden stehen (Abbildung 2). Diese Positionen erstrecken sich über die vier Peptidschleifen am offenen Ende des *β-Barrels* und beziehen auch benachbarte Segemente in den Fatblattsträngen mit ein. Die Mutationen sollten einen möglichst großen Bereich der Bindungstasche abdecken, ohne dabei die dichte Packung der Seitenketten im hydrophoben Kern des Proteins im unteren Bereich des *β-Barrels* zu beeinträchtigen (Beste *et al.*, 1999).

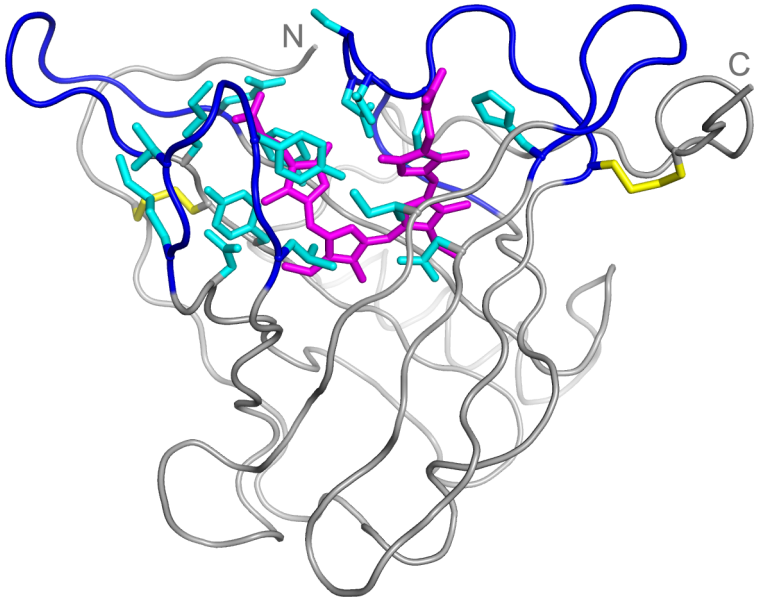



**Abbildung 2:** Mutagenese-Strategie zur Erzeugung einer BBP-Zufallsbibliothek nach Beste (1998). Man sieht das Röntgenstrukturmodell des Bilin-Bindungsproteins aus *Pieris brassicae* (PDB ID: 1BBP). Der natürliche Ligand Biliverdin IXγ ist in Magenta dargestellt. Die vier Peptidschleifen am Eingang der Bindungstasche sind dunkelblau und die zur Mutagenese ausgewählten Aminosäuren hellblau gefärbt. Die beiden Disulfidbrücken des BBP sind gelb gekennzeichnet. N- und C-Terminus des Proteins sind markiert.

Bis auf die Reste Ser35 und Lys95 wurden an den zu randomisierenden Positionen der Zufallsbibliothek alle 20 Aminosäuren zugelassen (Codon: NNS bzw. NNK; Tabelle 1). Die beiden erstgenannten Aminosäurepositionen sind dem Lösungsmittel ausgesetzt und sollten deswegen nicht gegen apolare Aminosäuren substituiert werden (Codon NMS bzw. VVS; Tabelle 1). Die BBP-Varianten der Zufallsbibliothek wiesen zusätzlich die Aminosäure-Substitution N1D auf und entsprechen damit der Isoform II des BBP, welches in der Natur als monomeres lösliches holo-Protein auftritt (Suter *et al.*, 1988). Um eine für Klonierungszwe-

cke geeignete Genkassette zu generieren, wurden zwei *Bst*XI-Restriktionsschnittstellen eingeführt, die weitere Mutationen auf Aminosäure-Ebene zur Folge hatten (N21Q, K135M). Weiterhin wurde die Mutation K87S vorgenommen, mit der eine Protease-Erkennungssequenz im maturen BBP eliminiert wurde (Beste, 1998).

**Tabelle 1:** Randomisierte Aminosäurepositionen in der BBP-Zufallsbibliothek nach Beste (1998). Nomenklatur der Zufallstripletts nach NC-IUB (1985); Xaa steht für alle 20 proteinogenen Aminosäuren.

| Position | Zufallstriplett | mögliche Aminosäuresubstitutionen |
|---|---|---|
| Asn34 | NNK | Xaa |
| Ser35 | NMS | Xaa ohne Arg, Cys, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Val |
| Val36 | NNS | Xaa |
| Glu37 | NNK | Xaa |
| Asn58 | NNS | Xaa |
| His60 | NNK | Xaa |
| Ile69 | NNS | Xaa |
| Leu88 | NNS | Xaa |
| Tyr90 | NNK | Xaa |
| Val93 | NNS | Xaa |
| Lys95 | VVS | Xaa ohne Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val |
| Asn97 | NNK | Xaa |
| Tyr114 | NNK | Xaa |
| Lys116 | NNS | Xaa |
| Gln125 | NNS | Xaa |
| Phe127 | NNK | Xaa |

Die konzertierte Mutagenese aller sechzehn Aminosäurepositionen wurde von Beste (1999) durch eine zweistufige PCR-Strategie realisiert (siehe auch Schmidt, 1995). Als zentrale Bausteine dienten dabei vier degenerierte Oligodesoxynukleotide, die jeweils eine der zu mutierenden Peptidschleifen überspannten und an den entsprechenden Aminosäurepositionen Mischungen der Basentripletts aufwiesen. Je zwei benachbarte Oligodesoxynukleotide dienten in einem ersten Amplifizierungssschritt als *Primer*-Paar in parallel durchgeführten PCRs. Die beiden so erzeugten DNA-Fragmente wurden anschließend in einem zweiten PCR-Schritt als Matrizen eingesetzt, zusammen mit einem Paar flankierender *Primer* und einem weiteren Oligodesoxynukleotid, das die randomisierten Fragmente verbindet. Das resulierende PCR-

Produkt deckt den wesentlichen Teil des BBP-Gens ab und kombiniert die Variabilität der beiden randomisierten Gen-Fragmente für je zwei der variablen Schleifen. Es trägt weiterhin am 5'- bzw. 3'-Ende jeweils eine unterschiedliche Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Bst*XI, wodurch die Genkassette in eindeutiger Orientierung in kompatible Vektoren inseriert werden kann.

Durch die konzertierte Mutagenese aller sechzehn Aminosäurepositionen nach der beschriebenen Strategie ließen sich theoretisch ca. $32^{16} \approx 1{,}2 \cdot 10^{24}$ verschiedene Mutanten des BBP erzeugen. In der Praxis ist die tatsächlich realisierbare Komplexität allerdings sehr durch technische Limitationen bei der Transformation von *E. coli* eingeschränkt, so dass nur selten Bibliotheken von mehr als $10^{10}$ Varianten erzeugt und für Sektionsexperimente engesetzt werden (Skerra, 2003).

### 1.1.2 Das Bakterielle Lipocalin (Blc) aus *E. coli*

Blc aus *E. coli* ist das erste bekannte Lipocalin bakteriellen Ursprungs (Bishop *et al.*, 1995). Es wird vor allem während der stationären Wachstumsphase und unter Bedingungen hohen osmotischen Druckes exprimiert, d.h. wenn die Zellwand unter hoher Belastung steht und offenbar spezielle physiologische Anpassungen notwendig sind, um die Zellintegrität zu gewährleisten (Bishop *et al.*, 1995; Bishop, 2000). Die Hypothese, Blc fungiere in der Zelle als Trägerprotein für Fettsäuren und Phospholipide bzw. Lysophospholipide konnte unlängst durch Bindungsstudien untermauert werden (Campanacci *et al.*, 2006). Dabei zeigte sich, dass Fettsäuren der Kettenlängen C14-C20 im einstelligen mikromolaren Bereich gebunden werden, während die Affinität zu Lysophospholipiden sogar um etwa zwei Größenordnungen höher ist.

Als typische Eigenschaft bakterieller Lipoproteine trägt das Blc ein N-terminales Typ-2 Signalpeptid (Wu, 1996), welches für den Export des Proteins in das Periplasma des Bakteriums verantwortlich ist. Dort wird die Signalsequenz durch die Signalpeptidase II abgespalten. Nach dieser Prozessierung trägt das mature Blc an seinem N-Terminus einen freien Cystein-Rest und wird über diese Seitenkette kovalent mit einem Lipidanker verknüpft, der in die äußere Plasmamembran inseriert und das Protein dort, dem periplasmatischen Raum zugewandt, verankert. Neben diesem funktionellen Cystein-Rest trägt das Blc ein weiteres freies Cystein (Cys131).

Die erste Kristallstruktur des Blc wurde von Campanacci *et al.* (2004) mit einer Auflösung von 1,8 Å veröffentlicht und identifizierte dieses Protein als typisches Lipocalin, mit enger struktureller Verwandtschaft zum BBP. Die Bindungstasche des Blc ist mit etwa 18 Å Tiefe und 12 × 7 Å Durchmesser deutlich tiefer und enger als die des BBP und damit offenbar besser geeignet, um lange gestreckte Liganden wie z. B. Fettsäuren zu binden (Campanacci *et al.*, 2004). Der native Multimerisierungszustand des Blc war Gegenstand kontroverser Diskussion. Obwohl man ursprünglich davon ausging, das Monomer sei die biologische Einheit des Lipocalins (Campanacci *et al.*, 2004), lieferten weitere kristallographische Studien derselben Arbeitsgruppe Hinweise, dass es sich bei der biologischen Einheit um ein Homodimer handelt (Campanacci *et al.*, 2006). Demnach soll es zu einer asymmetrischen Assoziation zweier Blc-Moleküle kommen, unterstützt durch eine Konformationsänderung der Faltblattstränge 5 und 6 sowie der dazwischen liegenden Peptidschleife in einem der beiden Monomere. Einzelne $C_\alpha$-Atome werden dabei um bis zu 5 Å verschoben (z. B. in Pro111). Durch diese strukturelle Anpassung wird die Kontaktfläche der beiden Monomere auf 10 % der dem Wasser zugänglichen Gesamtoberfläche erhöht, was als Indiz gewertet wurde, dass es sich bei der Dimerisierung um einen biochemisch relevanten Effekt handelt.

Diese Daten wurden unlängst in einer anderen Arbeit wiederlegt (Schiefner *et al.*, 2010). Durch Gelfiltrationsexperimente und Ultrazentrifugation konnte gezeigt werden, dass Blc in Lösung als Monomer vorliegt. Offenbar wird die von Campanacci *et al.* (2006) beobachtete Dimerisierung durch ein zusätzliches N-terminales Peptidsegment verursacht, das im Rahmen der Genklonierung künstlich eingeführt worden ist.

Blc war zu Beginn dieser Arbeit bereits aus genomischer DNA von *E. coli* JM83 kloniert worden, und sein Gen stand mit dem Vektor pBlc2 zur Verfügung, der auf dem universellen Expressionsvektor pASK75-strepII basiert (Skerra, 1994b; Voss & Skerra, 1997). Bei der Klonierung des Blc wurde die native Signalsequenz bis einschließlich Cys19 des maturen Proteins deletiert. Da dieser Cystein-Rest für die Verankerung des natürlichen Proteins in der äußeren Plasmamembran des Bakteriums verantwortlich ist (siehe oben), war insbesondere diese Aminosäure für die Produktion als lösliches Protein in *E. coli* unerwünscht. Weiterhin wurde die Mutation C131S eingeführt, um insgesamt eine Cys-freie Proteinsequenz zu erhalten und unerwünschte Effekte, wie z. B. Disulfidisomere, zu vermeiden. Weiterhin wurde das Blc-Gen N-terminal mit der OmpA-Signalsequenz (Typ I) fusioniert, um den Export des Proteins in das Periplasma zu gewährleisten. C-terminal wurde das Protein mit dem *Strep*-tag II (Skerra & Schmidt, 2000) fusioniert, um die Einschritt-Reinigung mittels Streptavidin-

Affinitätschromatographie zu ermöglichen (Abschnitt 2.3.4.2). Das so modifizierte Blc wird im Verlauf dieser Arbeit auch als Blc2 oder Wildtyp-Blc bezeichnet, da es die Grundlage für einige abgeleitete Varianten bildet. Das Blc-Gen steht auf pBlc2 unter der stringenten Kontrolle des Tet-Promotor-Operator Systems (Skerra, 1994b). pBlc2 trägt außerdem die intergene Region des filamentösen Phagen f1 für die Herstellung einzelsträngiger DNA sowie ein Ampicillin-Resistenzgen als Selektionsmarker (Abbildung 3).

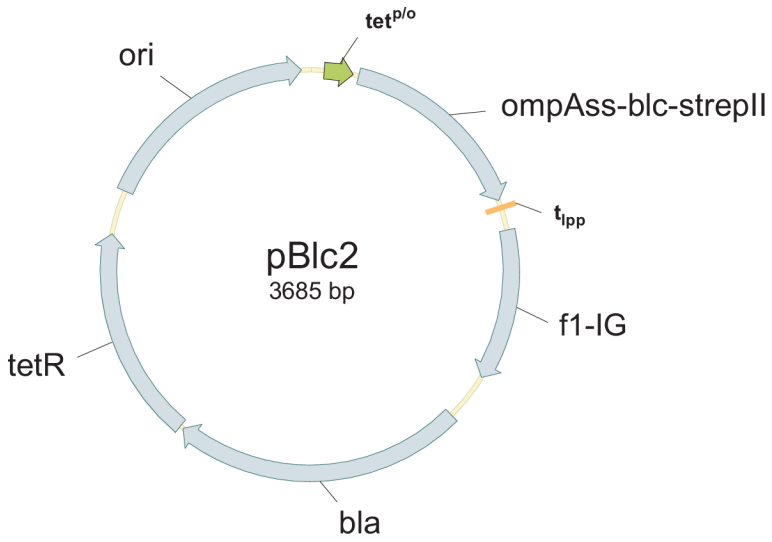



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Vektors pBlc2 zur Expression des Bakteriellen Lipocalins (Blc2) in *E. coli*. Auf diesem Vektor ist das Blc-Strukturgen N-terminal mit der OmpA-Sigalsequenz und C-terminal mit dem *Strep*-tag II fusioniert. Die Transkription des Gens wird durch den Tetracyclin-Promotor/Operator (tet$^{p/o}$) reguliert und endet am Lipoprotein-Terminator ($t_{lpp}$). Der Vektor trägt außerdem die intergene Region des filamentösen Phagen f1 (f1-IG), das β-Lactamase-Gen als Resistenzmarker (bla), das Tet-Repressor-Gen (tetR) sowie den ColEI-Replikationsursprung (ori).

## 1.2 Das Anticalin DigA16(H86N) als Fusionspartner mit Reporter-Enzymen

Die Konstruktion des Anticalins DigA16 war einer der ersten Erfolge dieser Technologie (Abschnitt 1.1). Es wurde durch *Phage Display*-Selektion gegen den Liganden Digoxigenin (DIG) und anschließende Affinitätsmaturierung aus einer Phagemid-Bibliothek randomisierter BBP Varianten isoliert (Abschnitt 1.1.1). DigA16 bindet DIG mit einer Affinität von etwa 30 nM und zeigt hohe Spezifität für Digitalis-Steroide. Darüber hinaus zeigt die nahe verwandte Verbindunng Digitoxigenin (DTX) eine noch höhere Affinität zu DigA16 und unterscheidet sich von DIG dabei nur durch eine fehlende OH-Gruppe an Position C12 des Steroidgerüstes (Abbildung 4).

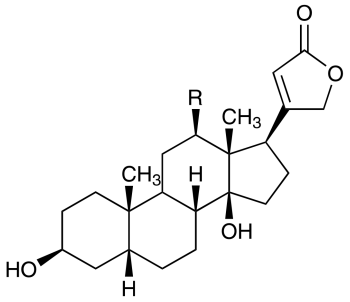



**Abbildung 4:** Konstitutionsformel der Digitalis-Steroide Digoxigenin (R = OH) und Digitoxigenin (R = H).

Die Röntgen-Strukturanalyse des apo-DigA16 (PDB ID: 1KXO) sowie seiner Komplexe mit den beiden Liganden Digoxigenin und Digitoxigenin (PDB ID: 1LKE bzw. 1LNM) zeigt, dass die Liganden bei annähernd identischer Positionierung tief in die Bindungstasche des Lipocalins eintauchen, wobei die mutierten Reste der Peptidschleifen dicht gegen den Steroid-Liganden packen und nur etwa 3 % der Ligandenoberfläche – insbesondere die OH-Gruppe – am Eingang der Bindungstasche dem Lösungsmittel zugänglich sind. Erstaunlicherweise stehen etwa 50 % des Liganden in Kontakt mit nicht mutierten Aminosäuren am Boden der Bindungstasche, was mit Konformationsänderungen (*Induced Fit*) einhergeht.

Auf der Basis dieser Erkenntnisse wurden weitere Untersuchungen an Mutanten des DigA16 durchgeführt mit dem Ziel, die Affinität des Anticalins gegenüber Digoxigenin weiter zu erhöhen. Besonders vielversprechend erschienenen in diesem Zusammenhang die Aminosäurepositionen His86, sowie Val56, Tyr39, Ile62 und Gly97. Die Bindungsaffinität von insgesamt neun Lipocalin-Varianten gegenüber Digoxigenin und Digitoxigenin wurde mittels Fluoreszenztitration quantifiziert (Tabelle 2). Es zeigte sich, dass die Mutatuionen an den Aminosäureposition His86 und Val56 zu einer erhöhten Affinität gegenüber beiden Liganden führten, während bei anderen Mutationen ein gegenteiliger Effekt beobachtet wurde.

**Tabelle 2:** Bindungsaffinitäten verschiedener DigA16 Varianten gegenüber den Liganden Digoxigenin bzw. Digitoxigenin (Peim, 2003).

| DigA16-Variante | Digoxigenin $K_d$ [nM] | Digitoxigenin $K_d$ [pM] |
|---|---|---|
| Wildtyp | 22,0 | 562 |
| H86S | 3,7 | 382 |
| H86N | 4,1 | 354 |
| H86Q | 10,7 | 94 |
| V56L | 14,2 | 858 |
| V56M | 8,0 | 1200 |
| V56L/H86Q | 14,9 | 423 |
| Y39W | 185,0 | – |
| I62Q | 58,6 | – |
| G97S | 154,0 | – |

Die Mutation H86N erwies sich bei diesen Studien als besonders vorteilhaft, da sie die Affinität des Vorgängers, DigA16, um mindestens den Faktor 5 auf eine Bindungskonstante von etwa 4 nM verbesserte. Der günstige Einfluss einer kleinen Seitenkette an der Position von His86 war bereits anhand der Kristallstrucktur vorhergesagt worden (Korndörfer *et al.*, 2003b). Die Konstruktion einer Doppelmutante V56L/H86Q verbesserte die Affinität nicht weiter und zeigte, dass der Austausch der beiden wirksamsten Einzelmutationen keinen additiven Effekt auf die Affinität hat. Aufgrund ihrer ausgezeichneten Affinität gegenüber Digoxigenin (DIG) und ihrer guten Ausbeute stellte die verbesserte Variante DigA16(H86N) eine vielversprechende Alternative zu den kommerziell erhältlichen Anti-DIG Antikörpern (Holtke *et al.*, 1995) dar und regte daher die Konstruktion von Fusionsproteinen mit verschieden Reporterenzymen an.

Digoxigenin ist heutzutage eine der wichtigsten Gruppen für die nichtradioaktive Markierung von Proteinen und Nukleinsäuren. In Kombination mit entsprechenden Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten und deren chemischen Konjugaten mit Reporterenzymen stellt dieses sogenannte DIG-System (Holtke *et al.*, 1995) eine der bedeutendsten Methoden für die Markierung und den spezifischen Nachweis biologischer Makromoleküle dar. Aufgrund seiner ausgezeichneten Spezifität und hohen Empfindlichkeit hat es radioaktive Methoden weitgehend verdrängt. Insbesondere vor diesem Hintergrund stellt das hochaffine

DigA16(H86N) einen äußerst interessanten Kandidaten zur Erzeugung von Fusionsproteinen mit Reporterenzymen dar.

Die Möglichkeit einer genetischen Fusionierung der beiden funktionellen Einheiten, Bindeprotein und Reporter-Enzym, bieten dabei eine signifikante Erleichterung gegenüber der chemischen Kopplung, die in der Regel zu unerwünschten Nebenprodukten führt, welche durch zusätzliche und oftmals aufwendige Reinigungsschritte abgetrennt werden müssen (Siemers *et al.*, 1997). Fusionsproteine können dagegen relativ kostengünstig im Labormaßstab hergestellt werden und stellen deswegen eine attraktive Alternative für den Einsatz in der Forschung dar.

Unter den kommerziell erhältlichen diagnostischen Reagenzien hat sich die Alkalische Phosphatase als eines der meistverwendeten Reporterenzyme durchgesetzt. Es handelt sich bei dieser Enzym-Familie um ortho-Phosphorsäuremonoester-Phosphohydrolasen mit alkalischem pH-Optimum. Aufgrund ihrer hohen spezifischen Aktivität wird für kommerzielle Reagenzien meist die Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) eingesetzt (Coleman, 1992). Ein Grund für die Verbreitung dieses Enzyms liegt sicherlich in der Verfügbarkeit eines großen Substratspektrums. Für kein anderes Reporterenzym sind so viele analytisch relevante Substrate erhältlich (Schenborn & Groskreutz, 1999). Dies machte die Alkalische Phosphatase – neben den klassischen Konjugaten – schon früh zu einem attraktiven Reporterenzym für genetische Fusionsproteine, die typischerweise die Bindeeigenschaften eines spezifischen Antikörperfragmentes (Ducancel *et al.*, 1993; Carrier *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1997; Griep *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999) oder eines anderen Bindeproteins (Lindbladh *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1994; Butera *et al.*, 2003) mit der enzymatischen Aktivität kombinieren, um maßgeschneiderte Reagenzien für spezielle analytische Fragestellungen zu liefern.

Traditionell wurde für diesen Zweck die *E. coli* eigene bakterielle Alkalische Phosphatase (BAP) eingesetzt. Bei der biologisch aktiven Einheit dieses Enzyms handelt es sich um ein Homodimer, bestehend aus zwei identischen Monomeren mit je 449 Aminosäuren (Kim & Wyckoff, 1991). Die aktiven Zentren liegen etwa 30 Å voneinander entfernt und enthalten jeweils Bindungsstellen für zwei Zink- und ein Magnesium-Ion. Die $Zn^{2+}$-Ionen sind essentielle Kofaktoren der AP und spielen sowohl bei der Stabilisierung des Proteins als auch im enzymatischen Reaktionsmechanismus eine wichtige Rolle. Das $Mg^{2+}$-Ion fungiert als allosterischer Aktivator und kann unter Umständen durch andere Metallionen ($Co^{2+}$, $Mn^{2+}$)

ersetzt werden (Coleman, 1992). Das Aktivitätsoptimum der enzymatischen Reaktion liegt bei einem pH-Wert zwischen 8 und 10, abhängig von den sonstigen Reaktionsparametern.

Die AP gilt im Allgeimenen als hoch aktives Enzym, da die katalysierte Reaktion unter optimalen Bedingungen annähernd diffusionskontrolliert ist (Holtz & Kantrowitz, 1999). Der Reaktionsmechanismus ist relativ komplex und verläuft über ein Phosphoseryl-Intermediat, wobei die anschließende Entfernung des Phosphat-Restes aus dem aktiven Zentrum als geschwindigkeitsbestimmender Schritt diskutiert wird (Coleman, 1992). Da die AP im Allgemeinen ebenfalls eine Phosphotransferase-Aktivität aufweist (Muller *et al.*, 2001), kann diese Aktivität ausgenutzt werden, um durch Zugabe von Phosphat-Akzeptoren wie Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) oder Diethanolamin (DEA) den geschwidigkeitsbestimmenden Schritt erheblich zu beschleunigen.

Trotz einer Aminosäure-Identität von 25-30 % und hoher struktureller Ähnlichkeit mit der AP aus Säugern ist die enzymatische Aktivität der BAP um den Faktor 20-30 geringer (Murphy & Kantrowitz, 1994) und deshalb für analytische Anwendungen weniger geeignet. Dieser Umstand war Anlass für zahlreiche Studien, in denen einige Enzym-Varianten mit verbesserter enzymatischer Aktivität identifiziert wurden. So wurde z. B. von Mandecki (1991) die Einfachmutante D101S beschrieben, die ein bis zu 35-fach erhöhtes $k_{cat}$ aufweist. Diese Mutation führt offenbar zu einer beschleunigten Entlassung des Phosphats aus dem Reaktionszentrum nach erfolgter Hydrolyse. Eine weitere interessante Variante mit deutlich verbesserten katalytischen Eigenschaften wurde von Muller *et al.* (2001) publiziert. Diese Autoren konnten zeigen, dass die katalytische Aktivität der PhoA-Doppelmutante D153G/D330N nahezu ebenbürtig ist ($k_{cat}$ = 1400 $s^{-1}$) mit der für kommerziell hergestellte Reagenzien verwendeten Alkalischen Phosphatase aus Rinderdarm ($k_{cat}$ = 3202 $s^{-1}$).

Diese beiden BAP-Varianten waren daher interessante Kandidaten für entsprechende Fusionsproteine mit dem Anticalin DigA16(H86N). Erste Fusionsproteine wurden bereits im Rahmen einer Bachelor-Arbeit am Lehrstuhl für Biologische Chemie konstruiert (Smejkal, 2005). Dabei wurden die PhoA-Varianten jeweils C-terminal über einen kurzen Peptid-Linker mit dem Anticalin DigA16(H86N) fusioniert (siehe Abbildung 5). Die fusionierten Gene wurden dabei auf Varianten des generischen Expressionsvektors pASK75-strepII (Skerra, 1994b; Vogt & Skerra, 2001) kloniert.

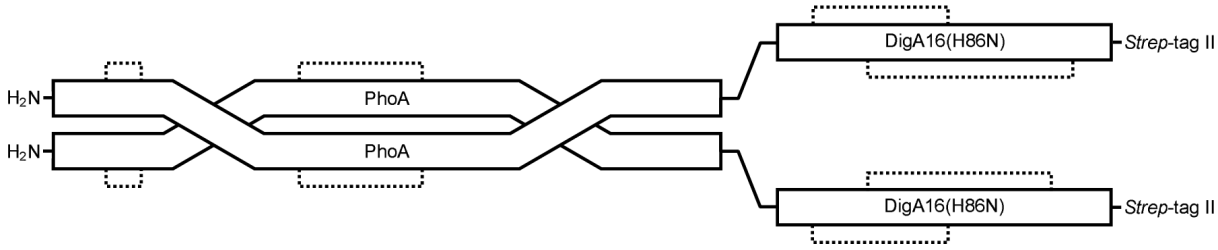


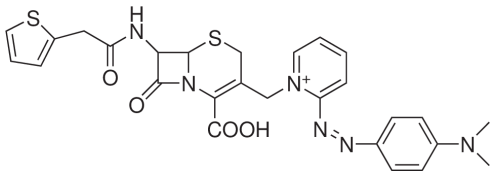

**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der in dieser Arbeit charakterisierten Fusionsproteine aus Varianten der Alkalische Phosphatase (PhoA) aus *E. coli* und dem Anticalin DigA16(H86N). Die PhoA-Variante ist über eine kurze Peptidsequenz mit dem Anticalin fusioniert, welches am C-Terminus das *Strep*-tag II trägt. Die Dimerisierung der PhoA-Domänen ist durch eine Verschränkung der Genabschnitte symbolisiert. Disulfidbrücken sind durch gepunktete Linien gekennzeichnet.

β-Lactamasen (bL) stellen eine Alternative zur Alkalischen Phosphatase als Reporterenzym dar. Diese Enzyme haben insbesondere durch ihre Bedeutung im klinischen Bereich große Aufmerksamkeit erlangt, da sie von zahlreichen, zum Teil humanpathogenen Bakterien gebildet werden. Durch die effiziente katalytische Hydrolyse des β-Lactam-Rings von Verbindungen aus der Gruppe der Penizilline, Cephalosporine und anderer Antibiotika verleihen diese Enzyme ihren Wirtsorganismen Resistenz gegenüber diesen Wirstoffen. Nicht zuletzt deswegen sind β-Lactamasen sowohl strukturell als auch biochemisch intensiv untersucht worden und haben sich außerdem als Selektionsmarker in der Molekularbiologie etabliert. So ist z. B. die TEM-1 β-Lactamase von Transposon Tn3 aus *E. coli* (Matthew & Hedges, 1976; Sutcliffe, 1978) eine Klasse A bL (siehe unten) und wird auf vielen der heutzutage gängigen Klonierungs- und Expressionsvektoren genutzt.

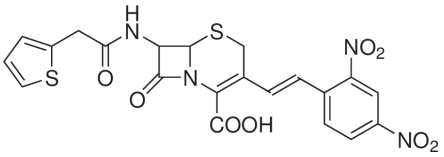
Die Einteilung der β-Lactamasen in unterschiedliche Klassen basiert im Wesentlich en auf Ähnlichkeiten der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen sowie funktionellen Eigenschaften. Es werden insgesamt vier Klassen (A-D) unterschieden, von denen die Klassen A, C und D einen Serin-basierten Hydrolysemechanismus zeigen, während die Klasse B die sogenannten Metallo-β-Lactamasen zusammenfasst, bei deren Reaktionsmechanismus $Zn^{2+}$ eine zentrale Rolle spielt (Ambler, 1980).

β-Lactamasen sind in der Regel monomere Proteine mit einer Größe zwischen 25-40 kDa. Es sind sehr effiziente Enzyme mit hohen Umsatzraten; tatsächlich werden viele Vertreter – ähnlich wie die Alkalischen Phosphatasen – als „perfekte Enzyme“ betrachtet, da ihr enzymatischer Umsatz bestimmter Substrate, wie z. B. Penicillin, annähernd diffusionskontrolliert erfolgt (Christensen *et al.*, 1990). Diese Eigenschaften sowie die Verfügbarkeit verschiedener chromogener bzw. fluorogener Substrate (siehe Tabelle 3) führten dazu, dass

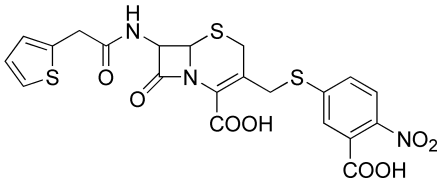
β-Lactamasen als nahezu ideale Reporterenzyme eingestuft wurden (Khatkhatay & Desai, 1999).



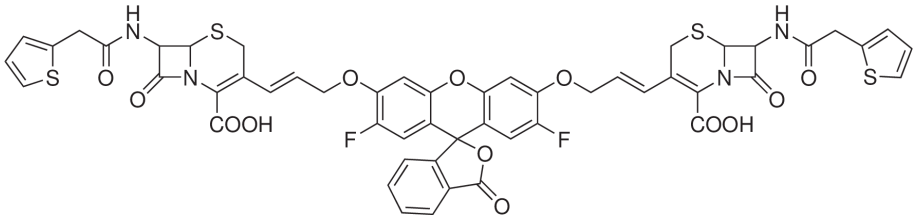

PADAC (Molmasse: 563,7)



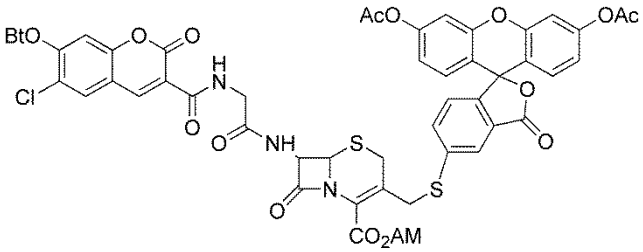

Nitrocefin (Molmasse: 516,5)




CENTA (Molmasse: 535,6)




Fluorocillin (Molmasse: 1092,1)




CCF2-AM (Molmasse: 1082,0)

**Abbildung 6:** Strukturformeln verschiedener β-Lactamase Substrate mit spektroskopisch erfassbaren Reaktionsprodukten (Ac = acetyl; Bt = butyryl; AM = acetoxymethyl).

**Tabelle 3:** Substrate für β-Lacatamasen mit spektroskopisch erfassbaren Reaktionsprodukten.

| Substrat | Signal | Referenz |
|---|---|---|
| PADAC | Farbänderung | (Jones *et al.*, 1982a) |
| Nitrocefin | Farbänderung | (O'Callaghan *et al.*, 1972b) |
| CENTA | Farbänderung | (Jones *et al.*, 1982b) |
| Fluorocillin | Fluoreszenz | (Rukavishnikov *et al.*) |
| CCF2-AM | FRET | (Zlokarnik *et al.*, 1998) |

Erstaunlicherweise blieb ihr Einsatz als Reporterenzyme für immunchemische Untersuchungen bislag rar, während einzelne Vertreter im therapeutischen Bereich bei der sogenannten *Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy* (ADEPT: Review siehe Melton & Sherwood, 1996) Einsatz erlangten. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Fusionsproteine beschrieben, die ein Tumor-spezifisches Antikörperfragment auf genetischer Ebene mit einer β-Lactamase koppeln (Siemers *et al.*, 1997; Kerr *et al.*, 1999; Hakimelahi *et al.*, 2002; McDonagh *et al.*, 2003). Diese bifunktionellen Therapeutika sind für einen kombinierten Einsatz mit einem unwirksamen Arzneimittel-Derivat (*Prodrug*) vorgesehen. Nach Verabreichung binden die Fusionsproteine mit ihrem Antikörper-Teil spezifisch maligne Zielzellen, wohingegen die fusionierte β-Lactamase dort anschließend für einen örtlich fokussierten Umsatz der *Prodrug* zum pharmakologisch wirksamen cytotyxischen Produkt führt. Die bL ist dabei vorteilhaft, weil eine vergleichbare biokatalytische Aktivität in menschlichem Gewebe nicht vorkommt. Bei derlei Studien kam wiederholt die AmpC β-Lactamase aus dem Gram-negativen Bakterium *Enterobacter cloacae* (Joris *et al.*, 1985) zum Einsatz, da sie sich für den Einsatz in Fusionsproteinen als gut geeignet erwies und ein breites Substratspektrum akzeptiert, was einen großen Spielraum für das Design geeigneter *Prodrugs* bietet.

Diese Eigenschaften machten die AmpC β-Lactamase aus *Enterobacter cloacae* zu einem interessanten Kandidaten für ein genetisches Fusionsprotein mit dem Anticalin DigA16(H86N). Demgegenüber erwies sich bei früheren Untersuchungen für ein Fusionsprotein mit DigA16(H86N) die TEM-1 β-Lacatmase aus *E. coli* als weniger geeignet. So fiel die Ausbeute in *E. coli* sehr niedrig aus, und die enzymatische Aktivität dieser β-Lactamase mit gängigen chromogenen Substraten ist zudem häufig deutlich geringer als die der AmpC β-Lactamase (Jones *et al.*, 1982a; Jones *et al.*, 1982b; Bebrone *et al.*, 2001).

## 1.3 Strategien für das *De-Novo*-Design von Enzymen

Enzyme sind effektive Biokatalysatoren, die heutzutage aus vielen industriellen Prozessen und auch aus dem Alltag nicht mehr wegzudenken sind. So sind z. B. verschiedene Vertreter der Subtilisine, und insbesondere engineerte Varianten davon, ein unverzichtbarer Bestandteil vieler moderner Waschmittel. Von jeher griff man beim Einsatz enzymatischer Reaktionen für technische Zwecke auf natürlich vorkommende Enzyme zurück. Da allerdings ihre natürlichen Eigenschaften, wie z. B. Substratspezifität, thermische und chemische Stabilität sowie andere biochemische Charakteristika, oftmals für die angestrebten Prozesse nicht geeignet sind, war man stets bemüht, diese Eigenschaften auf künstlichem Wege zu verbessern (Review siehe Dalby, 2007).

Darüber hinaus sind viele chemische Reaktionen in der Natur nicht verwirklicht. Es mangelt deshalb für moderne Anwendungen an Enzymen, die als Ausgangspunkt für ein gezieltes *Protein-Engineering* eingesetzt werden können. Dieser Umstand sowie die Möglichkeit, tiefgreifende Einsichten in die Funktionsweise enzymatischer Katalyse zu erlangen, führte zu Forschungsansätzen Enzyme *de novo* zu konstruieren, d.h. eine enzymatische Aktivität in einem Proteingerüst zu erzeugen, das zuvor keine nennenswerte Aktivität zeigte (Bolon *et al.*, 2002; Kaplan & DeGrado, 2004; Jiang *et al.*, 2008; Siegel *et al.*, 2010). Ohne Übertreibung kann man sagen, dass dieses Vorhaben nach wie vor eines der schwierigsten Probleme im Bereich der modernen Proteinchemie darstellt, da bei der enzymatischer Katalyse ein exakt einreguliertes Arrangement aus Substratbindung bzw. -orientierung und günstig positionierten funktionellen Aminosäuren innerhalb einer Proteinstruktur erforderlich ist.

### 1.3.1 Theorie des Übergangszustandes enzymatisch katalysierter Reaktionen

Die Theorie des Überganszustandes beschreibt die Reaktionsgeschwindigkeit chemischer Reaktionen und vermittelt ein quantitatives Verständnis von deren Ablauf. Sie geht im Wesentlichen auf die Arbeiten von Eyring (1935) zurück. Postuliert wird ein Quasi-Equilibrium zwischen den Reaktanden und einem energetisch aktivierten Zwischenzustand, dem sogenannten Übergangszustand (*Transition State*). Angewandt auf eine bimolekulare Reaktion

$$A+B \xrightarrow{k} C \tag{1}$$

verläuft eine chemische Reaktion also über eine Stoßkomplex $AB^{\ddagger}$, den Übergangszustand.

$$A+B \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} AB^{\ddagger} \xrightarrow{k_2} C \tag{2}$$

Energetisch betrachtet liegen die Edukte sowie das Produkt C in Minima, während sich der Übergangszustand definitionsgemäß in einem Energiemaximum befindet (Abbildung 7).

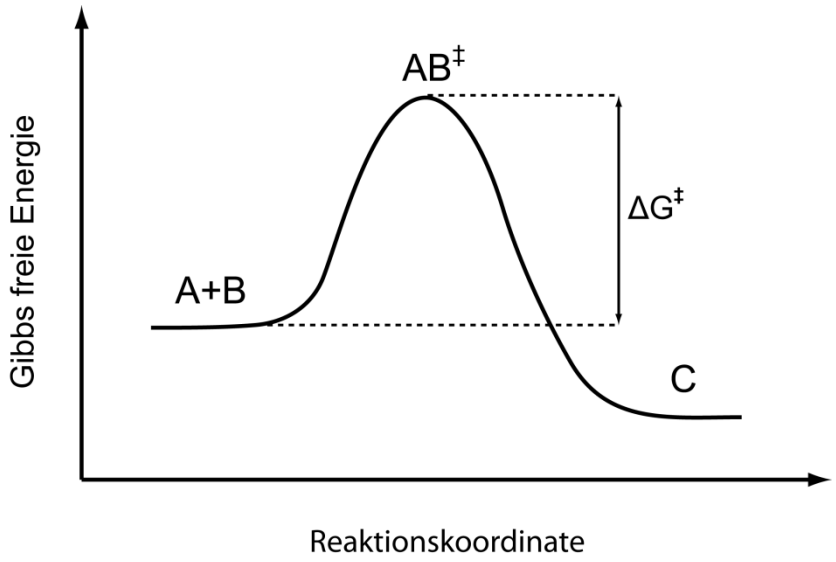



**Abbildung 7:** Reaktionsdiagramm einer bimolekularen Reaktion der Edukte A und B. Die Energie (Gibbs freie Energie) der Moleküle ist gegen die Reaktionskoordinate aufgetragen, die den (geometrischen) Ablauf der Reaktion beschreibt.

Um die Reaktion zu ermöglichen, muss diese Energiebarriere ($\Delta G^{\ddagger}$) überwunden werden, indem die kinetische Energie zweier zusammenstoßender Moleküle in potenzielle Energie umgewandelt wird, was sich z. B. in der Veränderung von Bindungswinkeln oder der Vergrößerung bzw. Verringerung von Bindungsabständen äußert, sodass die Reaktionspartner in einen reaktiven Zustand gebracht werden. Damit lassen sich die beiden wichtigsten Prinzipien der Theorie des Überganszustandes wie folgt formulieren:

1. Der Übergangszustand einer Reaktion steht in einem thermodynamischen Gleichgewicht mit den Reaktanden.
2. Die Geschwindigkeit einer Reaktion ist proportional zur Konzentration des Übergangszustandes.

Grundsätzlich wird angenommen, dass die Lebensdauer eines Übergangszustandes in der Größenordnung einer einzelnen Bindungsschwingung und damit bei etwa $10^{-13}$ Sekunden liegt. Somit ist es experimentell unmöglich, Übergangszustände direkt zu beobachten, und

umso wertvoller sind deduktive Erkenntnisse über die Struktur von Übergangszuständen für ein tieferes Verständnis einer chemischen Reaktion im Allgemeinen und der Wirkungsweise von Katalysatoren, wie z. B. Enzymen, im Besonderen. Tatsächlich ist unsere Vorstellung von der Struktur eines Übergangszustandes oftmals eher von chemischer Intuition geprägt als von wissenschaftlichen Fakten (Hilvert, 2000).

Interessanterweise wurde erst 1948 von Linus Pauling ein Zusammenhang zwischen der Theorie des Übergangszustandes und der Funktionsweise enzymatischer Katalyse erkannt (Pauling, 1948). Er nahm an, dass ein Enzym prinzipiell einem Antikörper ähnelt, allerdings mit dem Unterschied, dass es weniger zum Substrat, sondern vielmehr zum Übergangszustand der katalysierten Reaktion komplementär ist. Diese Überlegung wurde knapp zwei Jahrzehnte später von Jencks (1969) erweitert. Er postulierte, dass ein Antikörper, der gegen ein Hapten gerichtet ist, das dem Übergangszustand einer chemischen Reaktion ähnelt, die entsprechende katalytische Aktivität aufweisen sollte.

Diese Vorstellung wurde erst 1986 von den Arbeitsgruppen um Schultz und Lerner unabhängig voneinander experimentell belegt (Pollack *et al.*, 1986; Tramontano *et al.*, 1986). Durch die Immunisierung von Tieren mit Übergangszustandsanaloga – stabilen Verbindungen, die dem Übergangszustand einer chemischen Reaktion in Struktur und Ladungsverteilung ähneln – gelang es ihnen, Antikörper zu isolieren, welche in der Tat die angestrebten Reaktionen beschleunigten. Aus heutiger Sicht können diese Studien als eine Art *De-Novo*-Design von Enzymen betrachtet werden. Obwohl die katalytische Aktivität dieser Antikörper um Größenordnungen unter denen von natürlichen Enzymen lag und dies auch für die meisten der bis heute charakterisierten katalytischen Antikörper gilt (Charbonnier *et al.*, 1997), eröffnete diese Entdeckung dennoch ein neues und intensiv bearbeitetes Forschungsgebiet, das unter anderem einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis enzymatischer Katalyse beigetragen hat. So gilt inzwischen z. B. als gesichert, dass im aktiven Zentrum eines Enzyms der Übergangszustand einer chemischen Reaktion gegenüber dem Grundzustand der Edukte stabilisiert wird. Dies führt letztendlich zu einer Herabsetzung der Aktivierungsenergie und somit zu einer katalytischen Beschleunigung der Reaktion.

### 1.3.2 Übergangszustandsanaloga als *Targets* für Bindungsproteine

Natürliche Enzyme sind erstaunlich effiziente Katalysatoren. Manche sind in Laufe der Evolution soweit optimiert worden, dass ihre Aktivität direkt vom Diffusionskoeffizienten ihres Substrates abhängt und quasi bei jedem Zusammentreffen von Substrat und aktivem Zentrum

eine Reaktion stattfindet. Selbst Enzyme, die nicht diesen Grad an katalytischer Perfektion erreicht haben, zeigen im Allgemeinen eine hohe katalytische Effizienz ($k_{cat}/K_m$) mit Werten zwischen $10^6$ und $10^8$ $M^{-1}$ $s^{-1}$ (Radzicka & Wolfenden, 1995) und beschleunigen die Reaktion im Vergleich zu nicht katalysierten Bedingungen um einen Faktor von $10^6$ bis $10^{12}$. Sofern die nicht katalysierte Reaktion denselben Mechanismus aufweist und dieser für die Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist, kann man zeigen, dass $k_{cat}/k_{uncat} = K_m/K_{ts,}$ wobei $K_m$ und $K_{ts}$ die apparenten Dissoziationskonstanten des Substrates bzw. des Übergangszustandes (ts) für das Enzym darstellen (Radzicka & Wolfenden, 1995; Wolfenden *et al.*, 1998). Damit ist es möglich, die Affinität ($1/K_{ts}$) eines Enzyms zum Übergangszustand seines Substrates abzuschätzen. Diese liegt typischerweise im Bereich von $10^8$ bis $10^{23}$ $M^{-1}$ (Kurz, 1963; Wolfenden, 1969). Es verwundert also nicht, dass katalytische Antikörper oder andere *de novo* erzeugte Enzyme bislang eine relativ geringe enzymatische Aktivität aufweisen; schließlich ist weder das Immunsystem darauf ausgelegt, Antikörper mit Affinitäten jenseits $10^{10}$ $M^{-1}$ zu selektieren (Foote & Eisen, 1995), noch stehen uns die methodischen Voraussetzungen zur Verfügung, um durch *Protein Engineering* wesentlich höhere Bindungsaktivitäten zu erzielen, auch wenn erste Erfolge in dieser Richtung durchaus absehbar sind (Jiang *et al.*, 2008; Siegel *et al.*, 2010; Karanicolas *et al.*, 2011; Azoitei *et al.*, 2012).

Bis heute sind über 100 katalytische Antikörper beschrieben worden, mit einer fast genauso großen Vielfalt katalysierter Reaktionen (Hilvert, 2005). Einige dieser Antikörper haben ganz bemerkenswerte Eigenschaften. So gelang es zum Beispiel Smiley & Benkovic (1994) durch Immunisierung mit einem strukturell relativ einfachen Übergangszustandsanalogon (Abbildung 8) und anschließender *In-Vivo*-Selektion, einen Antikörper mit Orotat-Decarboxylase-Aktivität zu isolieren. Dieser Antikörper beschleunigte die Decarboxylierung von Orotat immerhin um den Faktor $10^8$, bezogen auf die nicht-katalysierte Reaktion. Das liegt zwar noch um Größenordnungen unter der Aktivität des natürlich Enzyms Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase, welches die Reaktion etwa $10^{17}$-fach beschleunigt (Radzicka & Wolfenden, 1995), zeigt aber, dass von katalytischen Antikörpern durchaus beachtliche katalytische Leistungen erzielt werden können. In Hinblick auf die vorliegende Studie muss betont werden, das die Aktivität des heterolog in *E. coli* exprimierten Antikörperfragments ausreichte, um den Stoffwechseldefekt des für die Selektionsexperimente eingesetzten Stammes zu komplementieren und damit eine Selektion dieses Antikörperfragments *in vivo* möglich war.

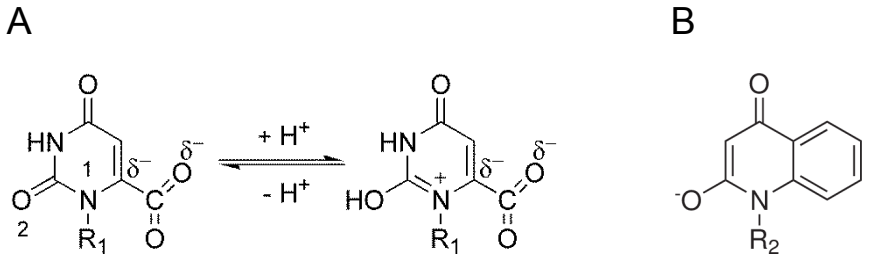



**Abbildung 8:** Design eines Übergangszustandsanalogon der Decarboxylierung von Orotidin-5'-phosphat. A: hypothetischer Übergangszustand der Orotat-Decarboxylierung. Die Protonierung von O-2 führt zu einer positiven Partialladung an Position N-1 und schließlich zur Decarboxylierung. Das Substrat des natürlichen Enzyms ist das Orotidin-5-phosphat ($R_1$ = Ribose-5'-Phosphat). B: N-substituiertes 2,4-Dihydroxychinolin als stabiles Übergangszustandsanalogon; $R_2 = (CH_2)_3COOH$ (verändert nach Smiley & Benkovic, 1994).

Weiterhin ist es möglich, durch den Einsatz von Übergangszustandsanaloga Antikörper zu selektieren, die besondere Reaktionen katalysieren, darunter solche, die auf chemischem Wege nur schwer zugänglich sind (Janda *et al.*, 1993; Wentworth *et al.*, 1997) oder Reaktionen, die *in vivo* nicht katalysiert werden können und so mitunter für therapeutische Anwendungen interessant sind (Wentworth *et al.*, 1996). Trotzdem beschleunigen katalytische Antikörper eine Reaktion nur selten über $10^6$-fach und typischerweise liegt dieser Faktor eher im Bereich von $10^2$-$10^5$ (Tanaka, 2002).

Diese eher moderaten Aktivitäten sind sicherlich ein wesentlicher Grund dafür, dass katalytische Antikörper im industriellen Bereich bisher wenig Beachtung gefunden haben. Zudem ist die Planung und chemische Synthese effektiver Übergangszustandsanaloga oftmals ein schwieriges und aufwendiges Unterfangen, weswegen komplexe Reaktionen mit dieser Technologie oftmals unzugänglich sind (Hilvert, 2000). Weiterhin ist die Herstellung monoklonaler Antikörper mittels Immunisierung und Hybridom-Technik langwierig und kostenintensiv. Allerdings werden diese traditionellen Techniken heute durch moderne molekularbiologische Methoden erweitert oder sogar ganz abgelöst (Abschnitt 1.3.4), um beispielsweise einmal isolierte katalytische Antikörper durch Methoden der *In-Vitro*-Evolution zu verbessern (siehe z. B. Baca *et al.*, 1997; Arkin & Wells, 1998).

### 1.3.3 *In-Silico*-Design neuartiger Enzyme

Eine noch junge Disziplin im Bereich des *Protein-Engineering* setzt auf bioinformatische Methoden, um das Design von Proteinen mit neuartigen Eigenschaften weitestgehend durch den Einsatz geeigneter Computeralgorithmen zu bewerkstelligen. Die Verfügbarkeit

leistungsfähiger Rechner und Rechencluster ermöglichte in den vergangenen Jahren eine Reihe von Studien, die sich mit dem computergestützten *De-Novo*-Design von Enzymen beschäftigte. Erste Erfolge gelangen im Zusammenhang mit der Konstruktion neuer Metallbindungsstellen im Thioredoxin (Trx) (Bryson *et al.*, 1995). Indem dabei eine der primären Koordinationsstellen des Metallions frei gelassen wurde, konnten redoxaktive Varianten des Trx generiert werden, die in ihren biochemischen Eigenschaften Metalloenzymen ähnelten und qualitativ die Aktivität einer $Fe^{3+}$-Superoxid-Dismutase zeigten (Pinto *et al.*, 1997; Benson *et al.*, 2000). Von derselben Arbeitsgruppe wurde einige Jahre später ein computerbasiertes Konzept vorgestellt und experimentell umgesetzt, das durch gezielte Mutation von 18 bis 22 Aminosäureresten im katalytisch inerten Ribose-Bindeprotein zur enzymatischen Aktivität einer Triosephosphat-Isomerase (TIM) führte (Dwyer *et al.*, 2004). Die beschleunigung der Reaktion wurde mit einem beachtichem Faktor von $10^5$-$10^6$ gegenüber der nicht-katalysierten Reaktion angegeben. Diese Arbeit wurde als Durchbruch im Bereich des computerunterstützten *Protein-Engineering* gefeiert. Leider musste diese Arbeit später zurückgezogen werden, da sich die enzymatische Aktivität der publizierten Varianten von einer unabhängigen Forschergruppe nicht reproduzieren ließ. Offenbar handelte es sich um ein Artefakt durch Verunreinigung mit endogener TIM (Dwyer *et al.*, 2008).

Ebenfalls auf der Basis des Trx aus *E. coli* wurden von Bolon & Mayo (2001) Varianten rational geplant, die im Experiment die Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat signifikant beschleunigten. Die Reaktion wird durch den nukleophilen Angriff eines günstig positionierten Histidin-Restes katalysiert. Zumindest eine Variante zeigte bei hohen Substratkonzentrationen eine Kinetik mit typischer Initalphase (*Burst Phase*). Offenbar verläuft die Reaktion über ein Acyl-Enzym-Intermediat, wie es auch bei vielen natürlich vorkommenden Esterasen der Fall ist. Die enzymatischen Eigenschaften dieses künstlichen Enzyms sind für praktische Anwendungen zwar nicht relevant, können aber durchaus mit den Aktivitäten katalytischer Antikörper mithalten. Isofern stellt diese Studie sicherlich einen „Meilenstein“ im Bereich des computerunterstützten Protein-Designs dar. Ein weiterer Erfolg auf diesem Sektor wurde unlängst von Jiang *et al.* (2008) publiziert, denen es durch Einsatz neu entwickelter Algorithmen gelang, auf der Basis verschiedener Proteine aus der Klasse der TIM-*Barrel* (siehe z. B. Wierenga, 2001) und *Jelly-Roll* Proteine, künstliche Retro-Aldosen zu erzeugen, die eine nicht natürliche Verbindung als Substrat akzeptierten. Von den 72 experimentell realisierten Varianten konnte bei 32 eine entsprechende enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings lagen die Umsatzraten dieser Enzyme nur bis zu vier Größenordnungen

über der Hintergrund-Reaktion und blieben damit weit hinter der Effizienz natürlicher Enzyme zurück.

Diese Fortschritte im Bereich des computerunterstützten *De-Novo*-Designs von Enzymen demonstrieren, dass die methodischen und intellektuellen Grundlagen für solche Projekte im Prinzip vorhanden sind und erfolgversprechend eingesetzt werden können. Die noch geringe Anzahl überzeugender Publikationen auf diesem Gebiet zeigt andererseits, dass solche Erfolge derzeit nur von stark spezialisierten Arbeitsgruppen erzielt werden können und die Qualität der erzeugten Enzyme bestenfalls die zugrunde liegenden Konzepte bestätigen kann. Trotzdem ist zu erwarten, dass mit Steigerung der verfügbaren Rechenleistung und Verbesserung der eingesetzten Algorithmen bioinformatische Ansätze im *Protein-Engineering* kontinuierlich an Bedeutung gewinnen werden.

### 1.3.4 Genetische *In-Vivo*-Selektion

Evolutive Selektionsverfahren sind aus der heutigen Proteinforschung nicht mehr wegzudenken, um veränderte oder gar neuartige Eigenschaften in Proteinen zu erzeugen. Gängige Technologien in diesem Bereich sind verschiede *In-Vitro*-Methoden wie z. B. das *Phage-Display* (Smith, 1985; McCafferty *et al.*, 1990; Review siehe Pande *et al.*, 2010) oder das *Bacterial-Surface-Display* (Francisco *et al.*, 1993; Review siehe Löfblom, 2011); aber auch Methoden der genetischen *In-Vivo*-Selektion werden eingesetzt (Fastrez, 1997). Diese Verfahren basieren auf einigen methodischen Konzepten, die von den Prinzipien der natürlichen Evolution abgeleitet sind:

1. In einem ausgewählten Gerüstprotein wird durch DNA-Mutagenese zunächst Variabilität erzeugt und eine sogenannte DNA-Bibliothek hergestellt. Eine solche Bibliothek kodiert eine Vielzahl an Protein-Varianten, unter denen man sich Vertreter mit verbesserten oder gar neuartigen Eigenschaften erhofft. Dieser Schritt ist von ganz zentraler Bedeutung, weil sich hierbei entscheidet ob eine bestimmte Eigenschaft in der Bibliothek grundsätzlich vertreten ist und darauf abzielende Selektionsexperimente überhaupt erfolgreich sein können. Die DNA-Mutagenese wird dabei entweder ortsgerichtet (Review siehe Aiyar *et al.*, 1996) oder als Zufallsmutagenese (Review siehe Labrou, 2010) durchgeführt. Insbesondere wenn es darum geht neuartige Eigenschaften in Proteinen zu erzeugen ist die ortsgerichtete Mutagenese häufig die Methode der Wahl, weil auf der Basis funktioneller oder struktureller Daten Aminosäurepositionen gezielt randomisiert werden können (vgl. Abschnitt 3.1), von deren Mutagenese man sich neuartige Eigenschaften verspricht. Dieses

Konzept ist z. B. bei künstlich erzeugten Antikörperbibliotheken (Rothe *et al.*, 2008) sowie den Lipocalin-Bibliotheken aus dieser Arbeit verwirklicht (siehe Abschnitt 3.2).

2. Ein weiterer fundamentaler Aspekt aller Selektionsverfahren besteht in einer robusten physischen Kopplung einzelner Protein-Varianten (Phänotyp) mit ihrer jeweils codierenden DNA (Genotyp). Varianten die im Verlauf von Selektionsexperimenten aufgrund ihrer phänotypischen Eigenchaften (Bindung, Katalyse etc.) isoliert worden sind, können damit einfach identifiziert werden und stehen somit für weitere Experimente zur Verfügung. Bei den oben erwähnten *Display*-Technologien wird die Phänotyp/Genotyp-Kopplung erreicht, indem eine Protein-Variante auf der Oberfläche von biologischen Partikeln, z. B. Phagen oder Mikroorganismen, präsentiert wird (*Display*). Die zugrundeliegende genetische Information ist dabei üblicherweise als Plasmid-DNA im Inneren des Partikels vorhanden. Dieses Prinzip ist auch bei Methoden der genetischen *In-Vivo*-Selektion verwirklicht, allerdings kommen dann ausschließlich Mikroorganismen mit einem aktiven Stoffwechsel zum Einsatz (Fastrez, 1997), und die Wirkung einer Protein-Variante entfaltet sich dann in der Regel im inneren des Organismus und nicht auf dessen Oberfläche.

3. Steht eine Protein-Bibliothek hoher Komplexität z. B. als Phagen- oder Zellpopulation zur Verfügung, so muss ein effizienter Weg gefunden werden Protein-Varianten mit den gewünschten Eigenschaften zu isolieren. Bei modernen Protein-Bibliotheken mit über $10^{10}$ Varianten (vgl. Abschnitt 3.1.8) ist es in der Regel nicht möglich, diese einzeln auf bestimmte Eigenschaften hin zu analysieren (Screening): meistens werden dazu chromogene oder fluorogene Substrate eingesetzt, was relativ aufwendige photometrische Messungen notwendig macht (Fernandes, 1998). Deswegen liegt die Anzahl untersuchbarer Varianten bei einem Screening meist unter $10^5$ (Emili & Cagney, 2000). Selbst durch den Einsatz leistungsfähiger Methoden wie dem *Fluorescence Activated Cell Sorting* (*FACS*) werden selten mehr als $10^9$ Zellen untersucht (Becker *et al.*, 2004).

   Im Gegensatz dazu wird bei den *In-Vitro*-Selektionsmethoden in der Regel eine vollständige Bibliothek eingesetzt und einem definierten Selektionsdruck ausgesetzt. Dies soll im Verlauf des Experiments zu einer Anreicherung funktioneller Varianten mit begünstigten Eigenschaften führen (z. B. Bindung oder katalytische Aktivität). Häufig wird am Ende eines Selektionsexperiments die erhaltene Zell- oder Phagenpopulation amplifiziert und anschließend einem weiteren Selektionszyklus unterzogen (vgl. Abschnitt 3.3.5). Dieses Vorgehen kann mehrere Male wiederholt werden – ggf. unter stufenweiser Erhöhung des Selektionsdrucks – bis funktionelle Varianten in der Population so stark

angereichert sind, dass durch ein Screening relativ weniger Varianten funktionelle Kandidaten sicher identifiziert werden können. Vor diesem Hintergrund sind auch *In-Vivo*-Selektionsverfahren sehr attraktiv, bei denen problemlos $10^{10}$ Bakterienzellen auf einmal einem Selektionsprozess unterzogen werden können (Taylor *et al.*, 2001a). Im Prinzip ist diese Anzahl nur durch die beschränkte Effizienz der vorhandenen Transformationsmethoden limitiert (siehe Abschnitt 3.1.5).

Häufig zielen *In-Vivo*-Selektionsxperimente darauf ab, Proteine mit neuartigen enzymatischen Eigenschgaften zu selektieren (siehe unten). Dazu wird z. B. ein auxotropher *E. coli* Stamm mit Plasmid-DNA einer Protein-Bibliothek transformiert und auf speziellem Minimalmedium ausplattiert. Dem Medium wird dabei häufig eine spezielle Substanz zugegeben, die einerseits als Substrat für funktionelle Protein-Varianten dienen soll, und außerdem durch ihre katalytische Umsetzung einen fehlenden Wachstumsfaktor freisetzt. Die eigentliche Selektion findet dann während der anschließenden Inkubationsphase statt, wenn Varianten mit der gesuchten Aktivität das Substrat umsetzen. Dadurch wird das Wachstum ihrer Wirtsorganismen wiederhergestellt oder zumindest deutlich beschleunigt und führt zu einer Anreicherung der entsprechenden Zellen in der Kultur.

Im Bereich des *Enzym-Engineering* wurde diese Technik erfolgreich eingesetzt, um die Stabilität (Akanuma *et al.*, 1998; MacBeath *et al.*, 1998; Martineau *et al.*, 1998), die Aktivität (Buchholz *et al.*, 1998) sowie die Spezifität (Bornscheuer *et al.*, 1998; Kumamaru *et al.*, 1998; Reetz *et al.*, 1998; Yano *et al.*, 1998) von natürlichen Enzymen zu verbessern, oft sogar für anwendungsrelevante Fragestellungen in der industriellen Biotechnologie. Trotz der großen Anzahl an Veröffentlichungen in diesem Bereich blieben Erfolge beim *De-novo*-Design von Enzymen durch *In-Vivo*-Selektion bislang jedoch nahezu aus. Von Altamirano *et al.* (2000) wurde die Selektion eines Enzyms mit neuartigen Eigenschaften auf der Basis der Triosephosphat-Isomerase (TIM) beschrieben (Altamirano *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse wurden mangels Reproduzierbarkeit allerdings von den Autoren zurückgezogen (Altamirano *et al.*, 2002). Dass *In-Vivo*-Selektion grundsätzlich ein geeignetes Konzept darstellt, um neuartige Proteine mit enzymatischen Eigenschaften zu Selektieren konnte dennoch eindrucksvoll gezeigt werden. Die Überexpression eines katalytischen Antikörpers mit Orotat-Decarboxylase-Aktivität in *E. coli* führte so zu einer Wiederherstellung des auxotrophen Stammes und zu einem spezifischen Wachstum entsprechender Zellen auf Minimalmedium. Ein ähnliches Konzept wird auch von Lesley *et al.* (1993) propagiert. Sie empfehlen den Einsatz aktivierter Vitamin-Ester wie z. B. den p-Nitrophenylester des Biotins. Allerdings

können die Autoren ihr Konzept mit einem entsprechenden katalytischen Antikörper experimentell nicht verifizieren. Ein alternativer Weg wurde von Taylor *et al.* (2001b) beschritten, indem sie eine Chorismat-Mutase quasi einem *Reverse-Engineering* unterzogen. Sie ersetzten die Sequenz des natürlichen Enzyms durch eine binäre-Abfolge bestimmter Aminosäuren, um diesen Sequenzraum durch *In-Vivo*-Selektion nach Varianten mit enzymatischer Aktivität zu durchsuchen. Dabei zeigte sich, dass Varianten mit enzymatischer Aktivität selektiert werden konnten, obwohl die eingeführten Mutationen mehr als 40 % des Proteins umfassten. Damit wurde auch belegt, dass die enzymatische Aktivität offenbar gleichmäßig über den Sequenzraum verteilt ist.

Obwohl das *De-Novo*-Design durch Erzeugung von Variabilität und anschließende *In-Vivo*-Selektion zumindest im strengen Sinne bisher nicht beschrieben worden ist, so zeigen die bestehenden Erfolge im Bereich des Enzym-*Engineerings* doch, dass diese Methodik ein hohes Potenzial besitzt, vorausgesetzt man kann geeignete Selektionsstrategien entwickeln. Einige der erwähnten Arbeiten lassen erwarten, dass es möglich sein sollte, Proteine mit enzymähnlichen Eigenschaften aus kombinatorischen Bibliotheken ausreichender Größe zu selektieren.

## 1.4 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist, Strategien für die *In-Vivo*-Selektion katalytisch aktiver Anticaline zu entwickeln und sie in Selektionsexperimenten umzusetzen. Dazu sollte sowohl das bereits bestehende Konzept einer Anticalin-Bibliothek auf der Basis des Bilin-Bindungsproteins aus *Pieris brassicae* (BBP; Beste *et al.*, 1999) aufgegriffen werden, als auch eine neuartige Protein-Bibliothek auf der Grundlage des Bakteriellen Lipocalins aus *E. coli* (Blc) realisiert werden. Diese Bibliotheken sollten für *In-Vivo*-Selektionsexperimente unter speziell dafür entwickelten und optimierten Bedingungen eingesetzt werden, um Anticaline mit katalytischer Aktivität zu identifizieren.

Für bioanalytische und diagnostische Einsatzbereiche stellt das hochaffine Anticalin DigA16(H86N) mit Spezifität zu Digitalis-Steroiden eine attraktive Alternative zu vergleichbaren Antikörpern dar. Deshalb sollten DigA16(H86N) und dessen Fusionsproteine mit der Alkalischen Phosphatase aus *Escherichia coli* bzw. der β-Lactamase aus *Enterobacter cloacae* umfassend charakterisiert und optimiert werden, um diese neuartigen rekombinanten Reporterenzym-Konjugate der praktischen Anwendung zugänglich zu machen.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 *E. coli* Stämme und Bakteriophagen

*E. coli* Stämme mit Wildtyp- oder rekombinantem Fertilitätsplasmid (F-Plasmid) sind mit $F^+$ bzw. F' gekennzeichnet. Bei Hfr-Stämmen ist das F-Plasmid in Folge genetischer Rekombination in das bakterielle Genom integriert.

Folgende *E. coli* Stämme und Bakteriophagen stammen aus der Sammlung von Professor Dr. Arne Skerra, TU München:

| | | |
|---|---|---|
| CJ236i: | F' | *dut*, *ung*, *thi*, *relA1*, F' [*proBA*, *lacI*$^q$, *lacZ*ΔM15, *Tn*10(tet$^R$)] (Geisselsoder *et al.*, 1987) |
| DH5α: | $F^-$ | *endA1*, *glnV44*, *thi-1*, Δ*phoA8, recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *deoR*, *nupG*, Φ80 *lacZ*ΔM15, Δ(*lacZYA-argF*)U169, *hsdR17*(rK$^-$, mK$^+$), $\lambda^-$ (Woodcock *et al.*, 1989) |
| JM83: | $F^-$ | *ara*, Δ(*lac-proBA*), *rpsL*, Φ80 *lacZ*ΔM15 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) |
| TG1/F$^-$: | $F^-$ | *supE*, *hsd*Δ5, *thi*, Δ(*lac-proAB*); mit Acridinium Orange vom F'-Plasmid kurierter TG1 (Gibson, 1984; Kim *et al.*, 2009) |
| XL1-Blue: | F' | *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *glnV44*, *relA1*, *lac,* F' [*proAB*$^+$, *lacI*$^q$, *lacZ*ΔM15, Tn*10*(tet$^R$)] (Bullock *et al.*, 1987) |
| VCS-M13 | | Helferphagen, Stratagene GmbH, Heidelberg |

Weitere *E. coli* Stämme wurden vom *E. coli Genetic Stock Center* (Yale Universität, New Haven, CT, USA) bezogen:

| | | |
|---|---|---|
| AB2849: | $F^+$ | *tsx-357*, *glnV42*(AS), $\lambda^-$, *aroC355* (Pittard & Wallace, 1966) |

| | | |
|---|---|---|
| AB347: | Hfr | *thr-1*, *ara-37*, *leuB6*(Am), *lacZ4*, *glnV44*(AS), $\lambda^-$, *aroC4*, *rpsL8*, *thi-1* (Pittard & Wallace, 1966; Huang & Pittard, 1967) |
| DB6656: | $F^-$ | *lacZ624*(Am), $\lambda^-$, *trpA49*(Am), *pyrF79::Mu*, *rpsL179*($str^R$), *hsdR27* (Bach *et al.*, 1979) |
| E15: | Hfr | *garB1*, *fhuA22*, Δ*phoA8*, *ompF627*($T_2R$), *fadL701*($T_2R$), *relA1*, *pit-10*, *spoT1*, *rrnB-2?*, *mcrB1*, *creC510* (Hayashi *et al.*, 1964) |
| R87:1 | $F^+$ | *lac-3350*, *bioB102*, $\lambda^-$, *IN(rrnD-rrnE)1* (Cleary & Campbell, 1972) |
| R875: | $F^+$ | *lac-3350*, *bioB17*, $\lambda^-$, *IN(rrnD-rrnE)1* (Cleary & Campbell, 1972) |
| R879: | $F^+$ | *lac-3350*, *bioA24*, $\lambda^-$, *IN(rrnD-rrnE)1* (Cleary & Campbell, 1972) |
| X82: | $F^-$ | *lacZ53*(Am), $\lambda^-$, *trpC60*, *pyrF287*, *hisG1*(Fs), *rpsL8* |

### 2.1.2 Plasmide

Alle verwendeten Plasmide stammen aus der Sammlung von Prof. Dr. Arne Skerra, TU München:

| | |
|---|---|
| pApoD5 | (Vogt & Skerra, 2001) |
| pASK40 | (Skerra, 1989) |
| pASK75-his | (Skerra, unveröffentlicht) |
| pBlc2 | (Breustedt, 2008) |
| pBBP21 | (Schlehuber *et al.*, 2000) |
| pBBP27-DigA16(H86N) | (Smejkal, 2005) |
| pBBP27(D101S)-DigA16(H86N) | (Smejkal, 2005) |
| pBBP54 | (Pieris AG, Freising; unveröffentlicht) |

### 2.1.3 Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide wurden bei Thermo Fisher Scientific (Ulm), IBA (Göttingen) und Proligo (Paris, Frankreich) bestellt. Als *Primer* für die PCR wurden Oligodesoxynukleotide in HPLC gereinigter Qualität bezogen. Degenerierte Oligodesoxynukleotide für die Konstruktion von Protein-Bibliotheken wurden zusätzlich durch Polyacrylamid-Gelelektophorese gereinigt

(Abschnitt 2.2.4.3). Der *Primer* ampc2 wurde zum Schutz vor 3'→5'-Exonuklease-Aktivität von *proof-reading*-Polymerase mit einer Phosphothioat-Bindung an der 3'-terminalen Phosphodiester-Bindung synthetisiert (Skerra, 1992). Die entsprechende Position ist in der DNA-Sequenz gekennzeichnet (*).

| | |
|---|---|
| ampC2 | 5'- ACT CTG TAG CGC CTC GAG GAT AT*G -3' |
| BLC_H1 | 5'- GAC GCC AAC CAT TAT CTT GGT ACC TGG TAT GAG ATT GCC CGT TTT GAT CAC CGC-3' |
| BLC_H2 | 5'- GCC CGT TTT GAT CAC CGC NNS NNS CGT GGA NNS GAA AAA NNS ACC NNS ACA TAC AGC CTG CGT GAT GAC GG-3' |
| BLC_H3 | 5'- TCC TCT GTC AGG GTT ATA SNN TTT SNN AAT GAC ATT CAG GCC GCC GTC ATC ACG CAG GCT -3' |
| BLC_H4 | 5'- TAT AAC CCT GAC AGA GGA ATG TGG NNS CAG NNS GAA GGG AAA NNS TAC TTT ACC GGC GCA CC -3' |
| BLC_H5 | 5'- TTT CAG CGC AGC ACG CGT TGG TGC GCC GGT AAA GTA -3' |
| BLC_H6 | 5'- ACG CGT GCT GCG CTG AAA NNS TCA NNS TTT GGT CCT TTC TAT GGC GGT NNS AAC GTT ATT GCA CTC GAT C -3' |
| BLC_H7 | 5'- AAT GGT TGG CGT GCG GGA SNN TAT SNN CAG GTA GTC GCG GTC CGG CCC GCT SNN CAG CGC ATG GCG GTA -3' |
| BLC_H8 | 5'- TTT CAC TTC CAC AGA AAT GGT TGG CGT GCG GGA -3' |
| BLC_K2 | 5'- CTC ATA CCA GGT ACC TGG ATA ACG TTT GGC -3' |
| BLC_K3 | 5'- ACC AGG TAC CAA GAT AAT GGT TGG CGT CGA -3' |
| BLC_K4 | 5'- CTC CTG TTT CAC TTC CAC AGA AAT GGT TGG CG -3' |
| BLC_K5 | 5'- CTC ATA CCA GGT AAC CAG ATA ACG TTT GGC -3' |
| BLC_K6 | 5'- CAG AAA TGG TTG GTG ACC GGG AGA GTA T -3' |
| BLC_K7 | 5'- GTT GTT GTG CTA CGC GGT TG -3' |
| BLC_K8 | 5'- CAT CGA CAC TAC CAC GCT G -3' |
| BLC_K9 | 5'- GGC AGC TTC TAC AGC AAT GG -3' |
| D20 | 5'- CCA CTC CCT ATC AGT GAT -3' |
| F83 | 5'- AGA CAG CTA TCG CGA TTG CA -3' |
| GB-1 | 5'- CTT CGA CTG GTC CCA GTA CCA TGG TAA ATG GTG GGA -3' |

| | |
|---|---|
| GB-2 | 5'- CAC CAG TAA GGA CCA TGC TTC TGG AGA GCA CCC AGA C -3' |
| GB-4 | 5'- TCT GGA GAG CAC CCA GAC MNN GTC SNN GTG TCC CTT CTT GTC CTC GTC GTA SNN GCA MNN GTA TCC GAT GAT GTA GTT -3' |
| GB-8 | 5'- GAC TAC TGG GGA GCC GA -3' |
| GB-11 | 5'- CCA AGA TTG GAA AGA TCT ACC ACA GCN NSA CTN NKG GAG GTN NSA CCV VSG AGN NKG TAT TCA ACG TAC TCT CC -3' |
| FS-15 | 5'- GGG TAG GCG GTA CCT TCS NNA AAG TAT TCC TTG CCG TGG ATT ACM NNG TAS NNC GAA ACT TTG ACA CTC TT -3' |
| FS-18 | 5'- ATT ACM NNG TAS NNC GAA ACT TTG ACA CTC TT -3' |
| remove_tetR | 5'- CAC GGA AAA AGG TTA TGC TGC TTT TAC GCC CCG CCC TGC CA -3' |

### 2.1.4 Enzyme und andere Proteine

| | |
|---|---|
| Albumin aus Rinderserum (BSA), Frakt. V | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Alkalische Phosphatase aus arktischen Garnelen (1 U/µl) | USB, Cleveland, OH, USA |
| Anti-Digoxigenin Fab Alkalische Phosphatase Konjugat | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Lysozym aus Hühnereiweiß | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| *Pfu* DNA-Polymerase (2,5 U/µl) | Stratagene, Amsterdam, Niederlande |
| Restriktionsendonukleasen | MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Promega Deutschland GmbH, Mannheim |
| RNase A aus Rinderpankreas (89 U/mg) | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Streptavidin Alkalische Phosphatase Konjugat | Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig |
| T4 DNA-Ligase (1 U/µl) | MBI Fermentas, St. Leon-Roth |
| T4 DNA-Ligase (3 U/µl) | Promega Deutschland GmbH, Mannheim |
| T4 DNA-Polymerase (5 U/µl) | MBI Fermentas, St. Leon-Roth |

| | |
|---|---|
| T4 Polynukleotidkinase (10 U/µl) | New England Biolabs GmbH, Schwalbach; MBI Fermentas, St. Leon-Roth |
| *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl) | MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Promega Deutschland GmbH, Mannheim |

### 2.1.5 Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien des Reinheitsgrades *pro analysi* (p. a.) verwendet.

| | |
|---|---|
| Aceton, p. a. bzw. technisch | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Acrylamid-Stammlösung (30 %ig mit 0,8 % Bisacylamid; Rotiphorese Gel 30) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Adenosin-5'-triphosphat, $Na_2$-Salz (ATP) | Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg |
| Agarose (Low Melting Point) | Invitrogen Ltd., Paisley, Scotland, UK |
| Agarose, GTQ | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| N-(2-(4-aminophenyl)ethyl)-2-hydroxypropanamide (CENTA) | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Ammoniumchlorid | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Ammoniummolybdat Tetrahydrat | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Ampicillin, Natrium-Salz (Amp) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Anhydrotetracyclin (aTc) | Acros Organics direct, Geel, Belgien |
| Antifoam A (Stammlösung) | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| L-Arginin | Bachem AG, Bubendorf, Schweiz |
| Bacto Agar | Difco Laboratories, Detroit, MI, USA |
| Bacto Tryptone | Difco Laboratories, Detroit, MI, USA |
| Bacto Yeast Extract | Difco Laboratories, Detroit, MI, USA |

| | |
|---|---|
| N-Benzyloxycarbonyl-L-Prolin | Bachem AG, Bubendorf, Schweiz |
| D-Biotinoyl-ε-aminocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| D-Biotin-p-Nitrophenylester | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Borsäure | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Bromphenolblau, reinst | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Calciumchlorid Dihydrat | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Casamino Acids | Difco Laboratories, Detroit, MI, USA |
| Chloramphenicol (Cam) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Chloroform | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Coomassie Brilliantblau R-250 | Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg |
| D(+)-Glucose Monohydrat | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| β-Glycerinphospat Dinatriumsalz Pentahydrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| D-Desthiobiotin | IBA GmbH, Göttingen |
| 2'-Desoxy-P-nucleosid-5'-tri-phosphat (dPTP) | TriLink BioTechnologies Inc., San Diego, CA, USA |
| Diethanolamin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Digitoxigenin (DTX), puriss.; 99 % (HPLC) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Digoxigenin (DIG), analytical standard | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocapronsaure-N-hydroxy-succinimidester | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Biacore, Uppsala, Schweden |
| N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid (EDC) | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Dimethylformamid (DMF) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |

| | |
|---|---|
| 1,4-Dithiothreitol (DTT) | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | MBI Fermentas, St. Leon-Roth |
| Dodecylsulfat, Natriumsalz | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Eisen(II)-chlorid Hexahydrat | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Essigsäure 100 %, p. a. und technisch | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Ethanol, ≥ 99,8 %, p. a. | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Ethanolamin | E. Merck KGaA, Darmstadt; Biacore, Uppsala, Schweden |
| Ethidiumbromid (1 % w/v in Wasser) | E. Merck KGaA, Darmstadt; Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Ethylacetat | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-Prolin | Bachem AG, Bubendorf, Schweiz |
| Glycerin, ≥ 99,5 %, p. a. | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| L-Glycin | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| 2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA) | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz; Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| N-Hydroxysuccinimid (NHS) | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Immidazol, Puffersubstanz ACS | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Isoamylalkohol, p. a. | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Isopropanol, p. a. und technisch | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), ≥ 99 %, für die Biochemie | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Kaliumchlorid | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Kanamycin A Monosulfat (Kan) | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Kobaltchlorid Hexahydrat | E. Merck KGaA, Darmstadt |

| | |
|---|---|
| Kupferchlorid Hexahydrat | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Magnesiumchlorid, Hexahydrat | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Magnesiumsulfat Hydrat | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Manganchlorid Tetrahydrat | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| 2-Mercaptoethanol, z. S. | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Methanol, p. a. und technisch | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Natriumacetat | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumchlorid | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumhydrogencarbonat | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Natriumhydroxid | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Nickelsulfat | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| p-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranosid | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| p-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat (pNPP), > 98 % (HPLC) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Orotsäure Hydrat, 98 % | Acros Organics, NJ, USA |
| 8-Oxo-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat (8-oxo-dGTP) | TriLink BioTechnologies Inc., San Diego, CA, USA |
| P-20 Detergenz | Biacore, Uppsala, Schweden |
| Phenol, > 99 %, redestilliert | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| L-Prolin-p-Nitrobenzylester · HBr | Bachem AG, Bubendorf, Schweiz |
| 2-Propanol, p. a. bzw. technisch | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20) | Dr. Th. Schuchardt & Co., Hohenbrunn |

| | |
|---|---|
| Puffer-Standardlösungen, pH 4,0 und 7,0 für pH-Meter | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| D(+)-Saccharose | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Salzsäure, 37 % | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Streptavidin "Mutante 1" gekoppelt an Sepharose | Eigenproduktion (Voss & Skerra, 1997) |
| Tetracyclin Hydrochlorid (Tet) | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Thiaminhydrochlorid | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Trifluoressigsäure (TFA) | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Trinatrium-Citrat | E. Merck KGaA, Darmstadt |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| L-Tryptophan | Bachem AG, Bubendorf, Schweiz |
| Uracil, ≥ 99,0 % | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Xylencyanol FF | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen |
| Zinksulfat | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |

### 2.1.6 Standards und Kits

<u>DNA-Größenstandards</u>

| | |
|---|---|
| λ/*Bst*EII-Digest | New England Biolabs, Schwalbach |
| GeneRuler 100 bp DNA Ladder | MBI Fermentas, St. Leon-Roth |
| GeneRuler 1 kb DNA Ladder | MBI Fermentas, St. Leon-Roth |

<u>Protein-Größenstandards</u>

| | |
|---|---|
| Prestained SDS-Page Standard, Low Range | New England Biolabs, Schwalbach |
| Protein Molecular Weight Standard | MBI Fermentas, St. Leon-Roth |

Kits zur Isolierung und Reinigung von DNA

| | |
|---|---|
| JETquick Plasmid Miniprep Kit | Genomed, Bad Oeynhausen |
| JETsorb Gel Extraction Kit | Genomed, Bad Oeynhausen |
| QIAquick PCR Purification Kit | Qiagen GmbH, Hilden |
| QIAfilter Plasmid Midi Kit | Qiagen GmbH, Hilden |

Sonstige Kits

| | |
|---|---|
| ABI PRISM BigDye Terminator Cycle-Sequencing Ready Reaction Kit | Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg |

### 2.1.7 Geräte

| | |
|---|---|
| ABI-Prism 310 Genetic Analyzer | Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt |
| Autoklav Varioklav Typ 500 | H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim |
| Biacore 2000 | Biacore, Uppsala, Schweden |
| Brutschränke | |
| B 5060 EK | Heraeus Christ GmbH, Osterode |
| BM800 | Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Pelion | Bayer, Frankfurt/Main |
| CD-Spektralpolarimeter JASCO J-810 | Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt |
| Drehtisch zum Ausplattieren | Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg |
| Durchflussphotometer | |
| 2138 Uvicord S | LKB Instrument GmbH, Gräfelfing |
| 2138 Uvicord SII | Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg |

| | |
|---|---|
| UV/VIS Filter Photometer | Knauer, Berlin |
| UV/Vis UV-1 Photometer | Rainin, Woburn, MA, USA |
| Variable Wavelength Monitor | Knauer, Berlin |
| ELISA-Photometer SpectraMax 250 | Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA |
| Elektrophoresekammern | Biometra, Göttingen bzw. Eigenbau |
| <u>Laborfermenter</u> | |
| 5 bzw.10 Liter Fermentersystem mit Umwurfzylinder | Schütt Labortechnik, Göttingen |
| C Flow Durchfluß-Regelmodul | BCC Spezialgeräte, Göttingen |
| C pH Meß- und Regelmodul | BCC Spezialgeräte, Göttingen |
| C $pO_2$ Meß- und Regelmodul | BCC Spezialgeräte, Göttingen |
| C Pump D Schlauchpumpen Modul | BCC Spezialgeräte, Göttingen |
| pH Elektrode (Typ 465) | Ingold Meßtechnik, Steinbach |
| $O_2$-Sensor (12/320 A-Type) | Mettler-Toledo, Steinbach |
| <u>Fluoreszenzphotometer</u> | |
| FluoroMax-3 | Jobin Yvon, Grasbrunn, Germany |
| LS 50 B | Perkin-Elmer GmbH, Langen |
| <u>Fraktionssammler</u> | |
| Redi Frac | Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg |
| Multirac 2111 | LKB Instrument GmbH, Gräfelfing |
| Superrac 2211 | LKB Instrument GmbH, Gräfelfing |
| Ultrorac 7000 | LKB Instrument GmbH, Gräfelfing |
| Geltrockner 2003 Slab Gel Dryer | LKB Instrument GmbH, Gräfelfing |
| Glasspritze 50 µl | Hamilton Company, Reno, NV, USA |

| | |
|---|---|
| Heizrührer | |
| IKA-Combimag | Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau |
| IKAMAG RCT | Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau |
| IKAMAG RET | Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau |
| Variomag Monotherm | H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim |
| HPLC | |
| Äkta Purifier | Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg |
| Äkta Explorer | Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg |
| Dynamax SD-300 (Pumpe) mit Dynamax UV-1 (Detektor) | Rainin, Woburn, MA, USA |
| Kalorimeter VP-ITC | Microcal, Northampton, MA, USA |
| Metallblockthermostate | |
| Techne Dri-Block DB-2A | Thermodux GmbH, Wertheim |
| Metallblockthermostat 2116 | Gebrüder Liebisch, Bielefeld |
| MicroPulser | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Mikroliter Messzelle LabelGuard | Implen GmbH, München |
| Millipore Synergy 185 Reinstwasser Anlage | Millipore GmbH, Eschborn |
| Netzgeräte | |
| LKB 2197 Power Supply | LKB Instrument GmbH, Gräfelfing |
| Power Pack P25 | Biometra, Göttingen |
| Power Pack P30 | Biometra, Göttingen |
| TN 300-120 | Heinzinger, Rosenheim |
| Thermocycler für die PCR | |
| UNO-Thermoblock | Biometra, Göttingen |

| | |
|---|---|
| Mastercycler gradient | Eppendorf Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf |
| Peristaltische Pumpen | |
| Miniplus 2 | Gilson, Villiers le Bel, Frankreich |
| P1 | Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg |
| pH-Meter | |
| E512 | Metrohm, Herisau, Schweiz |
| pH 526 und pH 531 | Wissenschaftlich-Technische Wekstätten GmbH, Weilheim |
| pH27 | Knick, Berlin |
| Pipettierhilfen | |
| Pipetus akku | Hirschman Laborgeräte, Eberstadt |
| accu-jet | Brand GmbH & Co., Wertheim |
| Pipetten | |
| Gilson P10, P20, P200 und P1000 | Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld |
| Multipette 4780 | Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf |
| Rollenmischer IDL TRM-V | Kühn & Bayer, Nidderau-Heldenbergen |
| Schreiber | |
| REC 112 | Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg |
| SE 120 | ABB Goerz AG, Wien, Östereich |
| 2210 | LKB Instrument GmbH, Gräfelfing |
| Knauer | Knauer, Berlin |

| | |
|---|---|
| Schüttelapparate | |
| Wipptisch WT12 | Biometra, Göttingen |
| Typ 3012 und Typ 3017 | Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel |
| Schüttelinkubatoren | |
| Modell G25 | New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ, USA |
| Modell TR-125/ITE-K | Infors AG, Bottmingen, Schweiz |
| Speed-Vac-Konzentrator Univapo UVC 150H | UniEquip, Martinsried |
| UV-Transilluminator TI3 | Biometra, Göttingen |
| UV/VIS-Spektralphotometer | |
| Ultrospec 2000 und 3000 | Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg |
| Lambda 9 | Perkin Elmer, Überlingen |
| Vakuumpumpen | |
| Drehschieberpumpe RD4 und RD15 | Vacuubrand GmbH & Co., Wertheim |
| Membranpumpe MZ2C | Vacuubrand GmbH & Co., Wertheim |
| Vortex-Genie 2 | Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA |
| Waagen | |
| Micro m3p | Satorius GmbH, Göttingen |
| PAG Oerlikon PJ Precisia junjor 2000C | W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt |
| PAG Oerlikon Precisia 125 A | W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt |
| R160P-*D1 | Satorius GmbH, Göttingen |
| U5000D | Satorius GmbH, Göttingen |
| Wasserbäder | |
| Haake F6/C25 | Thermo Haake, Karlsruhe |

| | |
|---|---|
| Julabo PC/8A | Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach |
| Julabo UC/5B | Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach |
| Thermomix 1460 | Braun Melsungen AG, Melsungen |
| Zentrifugen | |
| Biofuge A | Heraeus Christ GmbH, Osterode |
| J-21C und J2-21 mit Rotoren JA-10 und JA-20 | Beckmann Instruments, München |
| Labofuge 6000 | Heraeus Christ GmbH, Osterode |
| Eppendorf 5415C und 5415R | Eppendorf AG, Hamburg |
| Sigma 4K10 und 4K15 | Sigma GmbH, Osterode |
| Sorvall RC 3B Plus mit Rotor H-6000A/HBB-6 | Kendro Laboratory Products GmbH, München |
| Sorvall RC 5B und RC 5C Plus mit Rotoren SS-34, SLA-1500 und SLA-3000 | Kendro Laboratory Products GmbH, München |
| Sorvall RMC 14 | Sorval Instruments, Bad Nauheim |

### 2.1.8 Verbrauchsmaterial

| | |
|---|---|
| Dialyseschläuche | |
| Spectra/Por, Typ 27, MWCO: 6-8 und 12-16 kDa | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| 12-16 kDa | Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg |
| Gelfiltrationssäulen | |
| PD-10 Gelfiltrationssäulen | GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg |
| Superdex 75 HR 10/30 | Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg |
| Superdex 75 HiLoad 16/60 prep grade | Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg |

| | |
|---|---|
| Superdex 200 HR | Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg |
| <u>Konzentratoren</u> | |
| Vivaspin 4, MWCO: 30 kDa | Diagonal GmbH & Co. KG, Münster |
| Vivaspin 15, MWCO: 30 kDa | Diagonal GmbH & Co. KG, Münster |
| Amicon Ultra 15 mL und 50 mL, MWCO: 10 und 30 kDa | Millipore GmbH, Eschborn |
| <u>Kunststoffröhrchen</u> | |
| Kulturröhrchen, 13 mL | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| PP-Röhrchen, 15 mL und 50 mL | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| Cellstar PP-Röhrchen, 15 mL und 50 mL | Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen |
| <u>Pipetten-Spitzen</u> | |
| blau (200-1000 µl) | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| gelb (5-100 µl) | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| kristallklar (0,5-10 µl) | Eppendorf AG, Hamburg |
| Reaktionsgefäße (0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL) | Eppendorf AG, Hamburg |
| <u>Sterilfilter</u> | |
| Filtropur (0,45 und 0,22 µm) | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| Millex HV, 0,45 µm | Millipore GmbH, Eschborn |
| Membransterilfilter (0,22 µm; 50 mm) | Schleicher & Schuell, Dassel |
| <u>Sonstiges Material:</u> | |
| Einweg-Spritzen 1, 5, 10, 20 und 50 mL | Braun Melsungen AG, Melsungen; Dispomed Witt oHG, Gelnhausen; Henke-Sass Wolf, Tuttlingen |
| Petrischalen, Polystyrol, 92/15 mm und 150/20 mm (Durchmesser/Höhe) | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |

| | |
|---|---|
| Schwan-Stabilo Klarsichtfolie aus PP | Müller & Nemecek GmbH, Frankfurt/Main |
| SPR Sensorchip CMD 200 m | XanTec, Münster |
| Quarzküvette, Typ 111-QS | Hellma, Jena |
| Whatman-Filterpapier 3MM | Bender & Hobein AG, München |
| Zentrifugenbecher Sorvall-Rotoren SS-34 und SLA-3000 | Nalgene Company, New York, NY, USA |

### 2.1.9 Medien

Kulturmedien und alle Lösungen für die Arbeit mit Bakterien wurden entweder für 30 min bei 121 °C autoklaviert oder durch Filtration sterilisiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden Kulturmedien mit Wasser aus einer Millipore-Reinstwasseranlage angerührt. Zur Herstellung von Kulturplatten in Petrischalen wurde dem flüssigen Medium vor dem Autoklavieren 15 g/L Bacto Agar zugegeben. Kulturplatten wurden bei 4 °C und Lösungen im Allgemeinen bei RT aufbewahrt. Vor der Zugabe von temperaturempfindlichen Substanzen wie z. B. Vitaminen oder aktivierten Estern wurde das Medium im Wasserbad auf 50 °C temperiert.

<u>LB-Medium</u>

| | |
|---|---|
| Bacto Tryptone | 10 g/L |
| Bacto Yeast Extract | 5 g/L |
| NaCl | 5 g/L |

Die Lösung wurde vor dem Autoklavieren mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt.

<u>M9-Medium</u>

5 × M9-Salze

| | |
|---|---|
| $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ | 42,5 g/L |
| $KH_2PO_4$ | 15 g/L |
| $NH_4Cl$ | 5 g/L |
| NaCl | 2,5 g/L |

Die Salze wurden in *dd*$H_2O$ gelöst und autoklaviert. Zur Herstellung des M9-Mediums wurden dann folgende Lösungen unter Rühren in 775 mL steriles *dd*$H_2O$ gegeben. Um das Ausfallen von Phosphatsalzen zu verhindern, wurde zuerst die $CaCl_2$-Lösung zugegeben:

| | |
|---|---|
| 5 × M9-Salze | 200 mL |
| 20 % Glucose | 20 mL |
| 1 M $MgSO_4$ | 2 mL |
| 1 M $CaCl_2$ | 0,1 mL |
| Thiamin-Hydrochlorid Stammlösung | 1 mL |

SOC-Medium

| | |
|---|---|
| Bacto Tryptone | 20 g/L |
| Bacto Yeast Extract | 5 g/L |
| NaCl | 10 mM |
| KCl | 2,5 mM |

Der pH wurde vor dem Autoklavieren mit NaOH auf 7,5 eingestellt und anschließend je Liter folgende Volumina steriler Lösungen zugegeben:

| | |
|---|---|
| 20 % Glucose | 20 mL |
| 1 M $MgCl_2$ | 10 mL |
| 1 M $MgSO_4$ | 10 mL |

Tris-Minimalmedium

Für *In-Vivo*-Selektionsexperimente mit phosphatfreiem Medium wurde ein geringfügig modifiziertes Tris/HCl gepuffertes Minimalmedium nach Norte *et al.* (2003) verwendet:

| | |
|---|---|
| Tris/HCl, pH 7,5 | 100 mM |
| Glucose | 20 mM |
| $NH_4Cl$ | 10 mM |
| $MgSO_4$ | 2 mM |
| $K_2SO_4$ | 1 mM |
| $CaCl_2$ | 0,1 mM |
| Thiamin | 10 µg/mL |

Zur Herstellung des Mediums wurde ein berechnetes Volumen *dd*$H_2O$, ggf. unter Zugabe von Agar, autoklaviert und anschließend entsprechende Volumina der angegebenen Stammlösungen zugegeben, um schließlich das Endvolumen zu erreichen.

2 × YT-Medium

| | |
|---|---|
| Bacto Tryptone | 16 g/L |
| Bacto Yeast Extract | 10 g/L |
| NaCl | 5 g/L |

Die Lösung wurde vor dem Autoklavieren mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt.

### 2.1.10 Puffer und Lösungen

Antibiotika-Lösungen

| | |
|---|---|
| Ampicillin (Amp) | 100 mg/mL in $H_2O$ (1:1000) |
| Chloramphenicol (Cam) | 30 mg/mL in 70 % Ethanol (1:1000) |
| Kanamycin (Kan) | 35 mg/mL in $H_2O$ (1:500) |
| Tetracyclin (Tc oder Tet) | 10 mg/mL in 70 % (v/v) Ethanol (1:1000) |

Antibiotika-Stammlösungen wurden dem Medium im jeweils angegebenen Volumenverhältnis zugegeben.

Aufbewahrungslösung für Polyacrylamidgele

| | |
|---|---|
| Essigsäure | 7 % (v/v) |
| Glycerin | 2 % (v/v) |

10 × Auftragspuffer für Agarosegele

| | |
|---|---|
| Bromphenolblau | 1 mg/mL |
| Glycerin | 50 % (v/v) |

5 × Auftragspuffer für die SDS-PAGE

| | |
|---|---|
| Tris/HCl, pH 8,0 | 250 mM |
| SDS | 7,5 % (w/v) |
| Glycerin | 25 % (v/v) |
| Bromphenolblau | 0,25 mg/mL |

Chloroform/Isoamylalkohol

Chloroform im Verhältnis 24:1 mit Isoamylalkohol gemischt.

Coomassie Färbelösung für Polyacrylamidgele

| | |
|---|---|
| Coomassie Brilliant Blau R-250 | 0,25 % (w/v) |
| Essigsäure | 10 % (v/v) |
| Methanol | 40 % (v/v) |

EDTA-Stammlösung

0,5 M EDTA, pH 8,0

Entfärbelösung für Coomassie gefärbte Polyacrylamidgele

| | |
|---|---|
| Essigsäure | 10 % (v/v) |

Alternativ dazu wurde auch die folgende stärker entfärbende Lösung verwendet:

| | |
|---|---|
| Essigsäure | 10 % (v/v) |
| 2-Propanol | 12,5 % (v/v) |

Fling & Gregerson Laufpuffer (pH 8,8)

| | |
|---|---|
| Tris | 50 mM |
| Glycin | 190 mM |
| SDS | 1 g/L |

Laufpuffer für die Metallchelat-Chromatographie

| | |
|---|---|
| Na-Phosphat, pH 7,0 | 50 mM |
| NaCl | 500 mM |

4 × Lower-Tris

| | |
|---|---|
| Tris/HCl, pH 8,85 | 3 M |
| SDS | 4 g/L |

Lysozym-Stammlösung

10 mg/mL in PBS frisch hergestellt

Mineralsalzlösung für die Fermentation

| | |
|---|---|
| $Na_2HPO_4$ | 31 mM (5,51 g/L) |
| $KH_2PO_4$ | 19 mM (2,58 g/L) |

| | |
|---|---|
| $NH_4Cl$ | 25 mM (1,33 g/L) |
| $Na_3$-Citrat | 5 mM (0,47 g/L) |

Diese Lösung weist einen pH von 6,9 auf.

Natriumacetat-Lösung

3 M Natriumacetat wurde mit Eisessig auf pH 4,8 eingestellt.

PBS

| | |
|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 4 mM |
| $NaHPO_4$ | 15 mM |
| NaCl | 115 mM |

Der pH dieses Puffers liegt bei 7,4. PBS wurde auch in Kombination mit 0,1 und 0,5 % (v/v) Tween 20 (PBS/T 0,1 bzw. PBS/T 0,5) sowie mit 1 % EDTA (PBS/E) eingesetzt.

Periplasma-Aufschlusspuffer

| | |
|---|---|
| Tris/HCl, pH 8,0 | 100 mM |
| Saccharose | 500 mM |
| EDTA | 1 mM |

Phenol (mit Wasser gesättigt)

Kristallines Phenol (doppelt destilliert) wurde bei 65 °C im Wasserbad geschmolzen, im Verhältnis 2:1 mit *dd*$H_2O$ gemischt und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

Phenol/Chloroform

Mit Wasser gesättigtes Phenol (siehe oben) wurde im Verhältnis 1:1 mit Chloroform/Isoamylalkohol gemischt und bei 4 °C aufbewahrt.

RNase A-Lösung

| | |
|---|---|
| Tris/HCl, pH 7,5 | 10 mM |
| NaCl | 15 mM |
| RNase A (aus Rinderpankreas) | 10 mg/mL |

Um DNasen zu inaktivieren wurde die Lösung für 10 min in siedendem Wasser erhitzt.

Spurenelementlösung für die Fermentation

| | |
|---|---|
| $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ | 3,0 g/L |
| $CuCl_2 \cdot 6\ H_2O$ | 0,3 g/L |
| $H_3BO_3$ | 0,6 g/L |
| $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ | 0,5 g/L |
| $(NH_4)Mo_7O_{24} \cdot 6\ H_2O$ | 1,2 g/L |
| EDTA | 4 mM |

Stammlösungen für die Fermentation

| | |
|---|---|
| Antifoam A (wässrige Lösung) | 30 % |
| $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ | 35,0 g/L |
| Glucose | 20 % (w/v) |
| Glucose | 50 % (w/v) |
| $MgSO_4$ | 1 M |
| $NH_3$-Lösung | 12,5 % (w/v) |
| Thiamin-Hydrochlorid | 10,0 mg/mL |
| Zn-Acetat $\cdot 2\ H_2O$ | 8,0 g/L |

$FeCl_3$-Lösung wurde durch tropfenweise Zugabe von konz. HCl bis zur kräftigen Gelbfärbung angesäuert.

TAE-Puffer

| | |
|---|---|
| Tris | 40 mM |
| Essigsäure | 20 mM |
| EDTA | 1 mM |

TBE-Puffer

| | |
|---|---|
| Tris | 89 mM |
| Borsäure | 89 mM |
| EDTA | 1 mM |

Für reduzierenden Auftragspuffer wurde 12,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol zugegeben.

TE-Puffer

| | |
|---|---|
| Tris/HCl, pH 8,0 | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |

Für TE-Puffer wurde grundsätzlich *dd*$H_2O$ eingesetzt.

TE/10-Puffer

TE-Puffer, 1:10 mit *dd*$H_2O$ verdünnt.

4 × Upper-Tris

| | |
|---|---|
| Tris/HCl, pH 6,8 | 0,5 M |
| SDS | 4 g/L |

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Kultivierung von *E. coli* Stämmen

Einzelkolonien von *E. coli* wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf einer Petrischale mit Agar-Medium und Inkubation über Nacht bei 37 °C erhalten. Plasmidtragende *E. coli* Stämme wurden auf antibiotikumhaltigem Medium kultiviert. Die Stämme JM83 und TG1 wurden auf LB-Medium kultiviert, XL1-Blue (in Abwesenheit eines Plasmids) auf LB/Tet-Medium. Die Agar-Platten mit den Bakterienkolonien wurden bei 4 °C aufbewahrt und bis zu zwei Wochen zum Animpfen von Kulturen verwendet.

Flüssigkulturen wurden in LB-Medium, ggf. unter Zugabe eines entsprechenden Antibiotikums, angesetzt. Für 4 mL-Kulturen wurden 15 mL-Kulturröhrchen mit Plastikkappe eingesetzt. Für größere Kulturen wurden Erlenmeyerkolben mit dem 2,5-fachen Nennvolumen bezogen auf das Kulturvolumen eingesetzt. Die Kolben wurden entweder mit Aluminiumfolie oder durch geeignete Aluminium-Sterilkappen vor Kontamination geschützt.

### 2.2.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA effizient aufnehmen zu können, müssen *E. coli* Zellen in eine transformationskompetente Form gebracht werden. Die $CaCl_2$-Methode (Cohen *et al.*, 1972) wurde für einfache Transformationen mit Plasmid-DNA und DNA aus Ligierungsreaktionen eingesetzt. Für diese Anwendungsbereiche ist die erreichbare Transformationseffizienz von $10^5$ bis $10^6$

transformierten Zellen pro µg Plasmid-DNA meist völlig ausreichend. Für die Erzeugung von möglichst großen Zufallsbibliotheken mit mehr als $10^{10}$ transformierten Zellen wurde das Verfahren der Elektroporation (Dower *et al.*, 1988) eingesetzt. Mit dieser Methode können mehr als $10^9$ transformierte Zellen pro Mikrogramm Plasmid-DNA und Elektroporationsansatz erreicht werden.

#### 2.2.2.1 Transformation nach der $CaCl_2$-Methode

Um *E. coli* Zellen in eine transformationskompetente Form zu bringen, wurde die $CaCl_2$-Methode nach Cohen *et al.* (1972) angewandt. Zunächst wurden 3,5 mL LB-Medium mit einer Kolonie des entsprechenden *E. coli* Stammes beimpft und bei 37 °C, 200 UPM über Nacht inkubiert, so dass sich die Kultur in der stationären Wachstumsphase befand. Am nächsten Morgen wurden 50 mL LB-Medium im Verhältnis 1:100 mit der ü. N.-Kultur angeimpft und unter gleichen Bedingungen bis zu einer $OD_{550} = 0{,}5$ inkubiert. Die Kultur wurde in ein 50 mL Falcon-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (Sigma 4K15, 4000 UPM, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde möglichst vollständig abgezogen und das Zellsediment vorsichtig in 40 mL gekühlter (4 °C) 100 mM $MgCl_2$-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde erneut abzentrifugiert (siehe oben), der Überstand verworfen, das Zellsediment in 20 mL $CaCl_2$-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut abzentrifugiert, der Überstand verworfenund die Zellen in 2 mL 50 mM $CaCl_2$, 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu 200 µl in 1,5 mL Eppendorfgefäße aliquotiert und entweder unmittelbar weiterverwendet oder bei -80 °C eingefroren.

Für die Transformation wurde ein frisch hergestelltes oder auf Eis aufgetautes Aliquot der kompetenten Zellen jeweils mit 1 µl DNA-Lösung aus einer Plasmid-Minipräparation oder mit 5 µl eines Ligierungsansatzes (Abschnitt 2.2.5.2) versetzt, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen 35 s auf 42 °C erwärmt, dann 25 s auf Eis abgekühlt und anschließend in ein Kulturröhrchen mit 2 mL LB-Medium überführt, welches für 45 min bei 37 °C, 200 UPM inkubiert wurde. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µl auf geeigneten LB-Kulturplatten ausgestrichen. Die restliche Suspension wurde abzentrifugiert (Sigma 4K15, 4000 UPM, 15 min, 4 °C), der Überstand fast vollständig abgezogen und das Zellsediment in der zurückbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Diese konzentrierte Suspension wurde ebenfalls auf Kulturplatten ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C ü. N. im Brutschrank inkubiert und dann bei 4 °C bis zu 2 Wochen aufbewahrt.

#### 2.2.2.2 Transformation durch Elektroporation

Die Präparation elektrokompetenter *E. coli* Zellen erfolgte im Wesentlichen gemäß den Vorschriften von Tung & Chow (1995) und Hengen (1996). Dabei wurden einzelne Bedingungen angepasst und die Methode im Hinblick auf hohe Transformationsausbeuten optimiert (siehe Abschnitt 3.1.5).

Für eine Vorkultur wurde 50 mL LB-Medium mit einer Einzelkolonie des entsprechenden *E. coli* Stammes angeimpft und bei 30 °C, 180 UPM über Nacht inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde 1 L LB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 30 °C, 150 UPM bis zu einer $OD_{550}$ = 0,6-0,7 inkubiert. Der Kolben wurde dann für 20 min auf Eis gestellt, wobei in Abständen von 5 min geschüttelt wurde, um eine gleichmäßige Abkühlung der Zellen zu gewährleisten. Die Kultur wurde anschließend auf zwei vorgekühlte SLA-3000 Becher verteilt und abzentrifugiert (4500 UPM, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Zellsediment in jedem der beiden Becher mit 500 mL 10 % (v/v) Glycerin zügig aber dennoch sorgfältig auf Eis resuspendiert. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (4500 UPM, 15 min, 4 °C), der Überstand vollständig abgenommen und das Zellsediment ein zweites Mal mit je 500 mL 10 % (v/v) Glycerin „gewaschen“. Nach einer letzten Zentrifugation (Sigma 4K15, 4500 UPM, 15 min, 4 °C) wurde der Überstand sorgfältig abgezogen und das Zellsediment in 300 µl 10 % Glycerin resuspendiert und à 100 µl aliquotiert. In speziellen Fällen wurde zum Waschen und finalen Resuspendieren der Zellen *dd*$H_2O$ verwendet. Diese Vorgehensweise führte sehr zuverlässig zu insgesamt 1 mL Zellsuspension, die entweder sofort für die Elektroporation eingesetzt wurde oder in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt wurde.

Für die Elektroporation wurden ein MicoPulser (BioRad) und Küvetten des gleichen Herstellers (Elektrodenabstand 0,2 cm) eingesetzt. Die Handhabung der Zellen und die Elektroporation erfolgten im Kühlraum bei 4 °C. Zellen und Plasmid-Lösungen wurden grundsätzlich auf Eis gelagert. Für die Elektroporation wurden 100 µL der Zellsuspension (siehe oben) mit 5-10 µL Plasmid-Lösung in TE/10-Puffer oder entsalztem Ligierungsansatz versetzt, kurz gemischt und für 1 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde anschließend in eine auf 4 °C temperierte Elektroporationsküvette pipettiert und sofort der elektrischen Pulsentladung ausgesetzt (Programm: Ec2). Die Suspension wurde anschließend mit 2 mL LB-Medium aus der Küvette „gewaschen“ und in ein steriles Kulturgefäß überführt. Bei der Transformation von Lipocalin-Bibliotheken für eine anschießende *In-Vivo*-Selektion wurde anstatt LB-Medium auch M9-Medium verwendet, um zu verhindern, dass störende Nährstoffe

(z. B. Aminosäuren) in das Selektionsexperiment eingebracht werden. Nach Beendigung der Transformation wurde der Kulturansatz für 1 h bei 37 °C, 180 UPM inkubiert. Die Kultur wurde dann entweder sofort für Selektionsexperimente eingesetzt oder nach Zugabe von antibiotikumhaltigem LB/Medium weiter kultiviert, um z. B. für Plasmid-Midipräparationen (Abschnitt 2.2.3.2) genügend Bakterienkultur zu erzeugen.

### 2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Lösungen von Plasmid-DNA wurden grundsätzlich in TE-Puffer hergestellt und bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.3.1 Plasmid-Minipräparationen

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab, z. B. für die Analyse konstruierter Vektoren mittels Restriktionsverdau, die DNA-Sequenzanalyse oder für die Konstruktion von Vektoren wurden 4 mL Antibiotikum haltiges LB-Medium in 15 mL Kulturröhrchen mit einer Einzelkolonie des plasmidtragenden Bakterienstammes angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 UPM kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde dann aus der stationären Übernachtkultur unter Verwendung eines „Plasmid-Miniprep-Kits“ (Abschnitt 2.1.6) isoliert. Es wurde dazu nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen und die Plasmid-DNA schließlich mit 50 µl TE-Puffer eluiert. Die Ausbeute lag typischerweise zwischen 10-20 µg.

#### 2.2.3.2 Plasmid-Midipräparationen

Um größere Mengen Plasmid-DNA hoher Reinheit zu gewinnen, z. B. für häufiger eingesetzte Vektoren oder zur Präparation größerer Mengen bestimmter DNA-Fragmente, wurde Plasmid-DNA aus 50 mL Kulturen isoliert. Dazu wurde das „QIAfilter Plasmid Midi Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Das am Ende des Arbeitsprozesses erhaltene DNA-Präzipitat wurde in 100 µl TE-Puffer gelöst. Die Ausbeute an DNA betrug typischerweise um die 100 µg.

Plasmid-DNA für die Herstellung großer Zufallsbibliotheken wurde ebenfalls gemäß dem Standardprotokoll des Herstellers präpariert. Allerdings wurde die präzipitierte Plasmid-DNA einer zusätzlichen Phenol/Chloroform-Extraktion gemäß Abschnitt 2.2.4.4 unterzogen, um DNA höchster Reinheit zu erhalten.

#### 2.2.3.3 Isolierung von einzelsträngiger Plasmid-DNA aus *E. coli*

Einzelstängige zirkuläre DNA (ssDNA) wurde für die Mutagenese nach Kunkel (Kunkel *et al.*, 1987) benötigt. Fast alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren basieren auf dem generischen Expressionsplasmid pASK75 (Skerra, 1994b) und tragen deswegen ebenfalls die intergene Region des Phagen f1. Sie konnten deswegen unmittelbar für die Präparation von ssDNA eingesetzt werden. Als Wirt fungierte dabei der *E. coli* Stamm CJ236i, dessen chromosomale Mutationen *dut*$^-$ und *ung*$^-$ einen partiellen Einbau von Desoxyuridin statt Desoxythymidin in die DNA bewirken (vgl. Abschnitt 2.2.6). CJ236i trägt weiterhin ein Fertilitätsplasmid (F-Plasmid) und kann daher sogenannte Sex-Pili ausbilden, die für eine Infektion mit filamentösen Bakteriophagen des Typs M13 notwendig sind. Nach Infektion der Plasmid tragenden Zellen mit Helferphagen wurde die Plasmid-DNA in einzelsträngiger Form in Phagemid-Partikel verpackt und sezerniert. Anschließend konnte die ssDNA aus den Phagemiden isoliert werden (Geisselsoder *et al.*, 1987; Vieira & Messing, 1987). Die hierbei zu einem geringen Anteil mitisolierte Wildtyp-ssDNA des Helferphagen störte bei der Mutagenese nicht.

Zunächst wurde *E. coli* CJ236i mit dem entsprechenden Plasmid transformiert und 4 mL LB/Amp-Medium mit einer Kolonie dieser Zellen angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 30 °C und 200 UPM wurde mit der stationären Kultur 20 mL antibiotikahaltiges LB im Verhältnis 1:100 angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C und 200 UPM bis zu einer $OD_{550}$ von 0,26 inkubiert (Zelldichte etwa $1{,}6 \cdot 10^8$ Zellen/mL). Von dieser Kultur wurde 1 mL entnommen, mit VCS-M13 Helferphagen entsprechend einer *Multiplicity of Infection* (moi) von 10 infiziert und für 1 h bei 37 °C und 200 UPM inkubiert. Anschließend wurde die infizierte Kultur vollständig in 20 mL antibiotikahaltiges LB-Medium, dem zusätzlich Kanamycin zugesetzt wurde, überführt und über Nacht bei 37 °C und 200 UPM geschüttelt.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (SS-34, 12000 g, 4 °C, 10 min) und der klare Überstand mit den Phagemid-Partikeln in ein neues SS-34-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 10 µl einer 10 mg/mL RNase A-Lösung wurde für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Phagemide durch Zugabe von 1/4 Volumen frischem 3,5 M Ammoniumacetat, 20 % (w/v) PEG 8000 für 30 min auf Eis ausgefällt, durch Zentrifugation sedimentiert (SS-34, 18000 g, 4 °C, 15 min) und schließlich in 200 µl Hochsalzpuffer (300 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen. Nach Überführung in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß wurde für 30 min auf Eis inkubiert und unlösliche Bestandteile anschließend durch Zentrifugation (Eppendorf 5415C) entfernt.

Zur Abtrennung der Phagenhüllproteine wurde die Phagemidlösung zweimal mit 200 µl Phenol und einmal mit 200 µl Phenol/Chloroform extrahiert (Abschnitt 2.2.5.8). Anschließend wurde zwei Mal mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und alle erhaltenen organischen Phasen zur Erhöhung der Ausbeute in der angegebenen Reihenfolge mit 100 µl TE-Puffer rückextrahiert. Die beiden erhaltenen wässrigen Lösungen wurden vereinigt (ca. 300 µl) und die ssDNA durch Zugabe von 1/10 Vol. (30 µl) 7,8 M Ammoniumacetat und 2,5 Vol. Ethanol (750 µl) für mindestens 1 h bei -20 °C ausgefällt. Anschließend wurde zentrifugiert (Eppendorf 5415C), das Präzipitat mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und im Speed-Vac-Konzentrator für 2 min getrocknet. Die ssDNA wurde schließlich in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

Zur Kontrolle der Reinheit und zur Abschätzung der DNA-Konzentration wurde 1 µl einer 1:10 Verdünnung der Lösung durch analytische Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 2.2.4). Die Ausbeute schwankte je nach eingesetztem Plasmid zwischen 10 und 100 µg ssDNA.

### 2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA

Zur größenabhängigen Auftrennung von Fragmenten doppelsträngiger DNA wurde die Agarose-Gelektrophorese (Sambrook & Russell, 2001) verwendet. Dieses Verfahren wurde sowohl im analytischen als auch im präparativen Maßstab zur Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten eingesetzt.

Um kommerzielle Oligodesoxynukleotide zu reinigen, d. h. um sie von unerwünschten Nebenprodukten ihrer Synthese zu befreien, wurde die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt.

#### 2.2.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Für die analytische Agarose-Gelektrophorese wurden im Allgemeinen 1 %ige (w/v) Gele verwendet, die durch Aufkochen einer entsprechenden Menge Agarose in TBE-Puffer hergestellt wurden. Die Lösung wurde auf etwa 50 °C abgekühlt und im Verhältnis 1:10000 mit Ethidiumbromid-Stammlösung versetzt und in eine vorbereitete Gelkammer mit eingesetztem Geltaschenformer gegossen. Die so erhaltenen Gele hatten eine Größe von etwa $10 \times 7{,}5 \times 1$ cm.

Das erstarrte Gel wurde nach dem Entfernen des Geltaschenformers in eine Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer eingesetzt. Die Proben wurden mit 1/10 Vol. Agarose-Auftragspuffer versetzt und je Tasche bis zu 10 µl der Probe aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 90 V und einem Elektrodenabstand von ca. 19 cm für 60-75 min durchgeführt. Die DNA-Fragmente wurden im UV-Durchlicht bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und mit einem digitalen Dokumentationssystem fotografiert.

#### 2.2.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Für die präparative Agarose-Gelelektrophorese wurde ausschließlich LMP-Agarose und TAE-Puffer verwendet und der Puffer wurde stets mit *dd*$H_2O$ angesetzt. Je nach Größe der relevanten DNA-Fragmente wurden 1-1,3 %ige Gele verwendet. Die Herstellung der Gele erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben. Vor dem Auftragen in die Geltaschen wurden die Proben mit 1/10 Vol. Agarose-Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 70 V für 75-100 min durchgeführt. Um Strahlenschäden zu vermeiden, wurden die DNA-Fragmente im UV-Durchlicht verminderter Intensität bei einer Wellenlänge von 312 nm visualisiert und die gewünschten DNA-Fragmente mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten.

Je nach Verwendungszweck der zu isolierenden DNA wurden unterschiedliche Extraktionsverfahren eingesetzt. Für sie Klonierung mit Restriktionsfragmenten kam hauptsächlich das JETsorb-Gel-Extraction-150-Kit der Firma Genomed zum Einsatz. Die Extraktion wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt, wobei die DNA vorübergehend an ein Anionenaustauschermaterial gebunden und nach mehreren Waschschritten mit 20 µL TE/10 eluiert wurde.

Für komplizierte Klonierungen – das betraf insbesondere die Herstellung von DNA-Fragmenten für hochkomplexe Plasmid-Bibliotheken – wurde ein alternatives Protokoll (Skerra, 1989) angewendet. Die ausgeschnittenen Gelstückchen (siehe oben) wurden à 200 mg auf 1,5 mL Eppendorf-Gefäße aufgeteilt. Dann wurde jeweils 200 µL LMP-Puffer (0,1 M Tris-Acetat, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,5) zugegeben und bei exakt 65 °C bis zur vollständigen Auflösung der Gelstückchen erhitzt (ca. 10 min). Die Lösungen wurden auf RT abgekühlt und der Reihe nach mit 400 µL Phenol, Phenol/Chloroform bzw. Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt, wobei nach jedem Schritt für 5 min abzentrifugiert wurde (Eppendorf 5415C, 15000 UPM, 4 °C) um dann die wässrige Lösung (ohne die Interphase) für den nächsten Extraktionsschritt in ein frisches Eppendorf-Gefäß zu überführen. Schließlich

wurde die wässrige DNA-Lösung mit 2,5 Vol. Ethanol (ca. 1 mL) versetzt und bei -20 °C für mindesten 30 min gefällt. Der Ansatz wurde für 30 min abzentrifugiert (Eppendorf 5415C, 15000 UPM, 4 °C) und das erhaltene Präzipitat mit 500 µL 70 % Ethanol gewaschen, bevor es für 30-60 s unter reduziertem Luftdruck in der SpeedVac getrocknet wurde. Das Präzipitat wurde in einem geeigneten Volumen TE/10-Puffer gelöst und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

Die Konzentration von Plasmid-Lösungen wurde entweder durch analytische Gelelektrophorese anhand eines internen Standards abgeschätzt oder durch Messung der Absorption bei 260 nm mit einer LabelGuard Mikroliter Messzelle bestimmt. Pro Basenpaar wurde ein durchschnittlicher molarer Absoptionskoeffizient von 660 $M^{-1}$ $cm^{-1}$ veranschlagt (Sambrook & Russell, 2001).

#### 2.2.4.3 Denaturierende Harnstoff/Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Methodisch bedingt zeigen kommerziell erhältliche Oligodesoxynukleotide trotz HPLC-Reinigung mit zunehmender Länge einen steigenden Prozentsatz unvollständiger Sequenzen. Deswegen wurden Oligodesoxynukleotide mit mehr als 40 bp (zusätzlich) durch denaturierende Harnstoff/Polyacrylamid-Gelelektrophorese gereinigt.

Zunächst wurde die Gelkammer aus den entsprechenden Glasplatten (20 × 40 cm) und Abstandshaltern (1,5 mm) zusammengesetzt, die Stöße mit Paketband abgeklebt und mit Klammern fixiert. Für die Herstellung eines 12 %igen Polyacrylamid/Harnstoff-Gels wurden 48 mL Sequagel (concentrate), 42 mL Sequagel (diluent) und 10 mL TBE gemischt. Die Polymerisationsreaktion wurde durch Zugabe von 40 µl TEMED und 1 mL 10 % (w/v) APS gestartet und die Lösung sofort blasenfrei in die Gelkammer gegossen, der Geltaschenformer eingesetzt, nach dem Aushärten das Klebeband entfernt und der Abstandshalter am Boden der Gelkammer herausgenommen. Die Gelkammer wurde nun vertikal in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt und die beiden Pufferkammern mit TBE-Puffer gefüllt.

Das kommerzielle Oligodesoyxnukleotid-Lyophylisat aus einem 40 nmol Syntheseansatz wurde in 40 µl *dd*$H_2$0 gelöst. 20 µl davon wurden mit 20 µl Formamid-Auftragspuffer (98 % v/v entionisiertes Formamid, 2 % v/v 0,5 M EDTA pH 8,0, 0,2 % w/v Bromphenolblau, 0,2 % w/v Xylencyanol) versetzt, für 5min auf 95 °C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Die so behandelten Proben wurden mit einer Hamilton-Spritze auf je zwei Geltaschen aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde (ohne Vorelektophorese) bei einer konstanten Leistung von

40 W (je Gel) für 3-4 h betrieben. Das Gel wurde dann auf ein Stück Folie für Overheadprojektoren überführt und die DNA durch „UV-Shadowing“ im UV-Auflicht (254 nm) über einer DC-Fluorescein-Indikatorplatte sichtbar gemacht. Die Bande mit dem Hauptprodukt wurde ausgeschnitten und bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung noch am selben Tag aufbewahrt.

Die Gelstücke wurden durch die dünne Öffnung einer zugeschmolzenen und mit einer Kanüle aufgestochenen 1 mL-Kunststoffspritze gepresst. Der Stempel wurde herausgenommen, 0,5 mL TE-Puffer hinzugegeben und die Flüssigkeit mitsamt den im Spritzenkörper verbliebenen Gelstückchen durch die Öffnung gepresst. Dieser Arbeitsschritt wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Die erhaltene Suspension wurde dann ü. N. bei 37 °C geschüttelt und anschließend durch Filtration (Spin-X-Tube, 0,45 µm) von der Gelmasse getrennt. Die so erhaltenen ca. 0,9 mL Lösung wurden dreimal mit je 1 mL 1-Butanol extrahiert, um die wässrige Lösung auf 0,4 mL einzuengen. Diese wurde mit 40 µl 3 M Natriumacetat pH 4,6 (l/10 Vol.), 4 µl 1 M $MgCl_2$ (1/100 Vol.) und 1 mL Ethanol (2,5 Vol.) versetzt und bei -20 °C mindestens 1 h gefällt. Daraufhin wurde für 30 min zentrifugiert (Eppendorf 5415C, 15000 UPM, 4 °C), das DNA-Präzipität mit 0,5 mL 70 % Ethanol kurz gewaschen und für ca. 10 min an der Luft getrocknet. Das gereinigte Oligodesoyxnukleotid wurde in 50 µl *dd*$H_2O$ gelöst.

Um die Konzentration der so erhaltenen DNA-Lösung zu bestimmen, wurden 2 µl davon im Verhältnis 1/200 mit TE-Puffer verdünnt und die Absorption bei 260 nm gemessen. Für die Berechnung wurde der Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{260}$ des Oligodesoxynukleotids als Summe der Absorptionsbeiträge der einzelnen Basen angenommen (A: 15,0 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$; C: 7,4 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$; G: 11,8 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$; T: 8,8 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$).

#### 2.2.4.4 Reinigung von DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Um DNA-Lösungen besonders hoher Reinheit zu erhalten, z. B. für die DNA-Sequenzierung oder für die Herstellung hochkomplexer DNA-Bibliotheken, wurde eine Extraktionsprozedur mit Phenol/Chloroform durchgeführt.

Dazu wurde die DNA-Lösung mit 40 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) versetzt und das Volumen ggf. mit Wasser auf 400 µl eingestellt. Dann wurde die Lösung mit 400 µl Phenol ausgeschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation getrennt (Eppendorf 5415R, 15800 g, 4 °C, 2 min). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß

überführt und nach demselben Schema mit 400 µl Phenol/Chloroform und schließlich ein drittes Mal mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.

Für die anschließende Ethanol-Fällung wurde die wässrige DNA-Lösung mit 2,5 Volumina eiskaltem Ethanol gemischt und für mindestens 1 h bei -20 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation (Eppendorf 5415R, 15800 g, 4 °C, 30 min) wurde das Präzipitat mit 750 µl kaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, im Speed-Vac-Konzentrator für maximal 60 s getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer gelöst.

### 2.2.5 Enzymatische Reaktionen mit DNA

#### 2.2.5.1 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Restriktionsanalyse von Plasmiden und die Präparation von DNA-Fragmenten wurde Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten (Sambrook & Russell, 2001). Dabei wurden hauptsächlich Enzyme der Firma MBI Fermentas verwendet. Für die Herstellung von Fragmenten für hochkomplexe Plasmid-Bibliotheken wurde das Restriktionsenzym *Bst*XI der Firma Promega eingesetzt. Die Wahl des geeigneten Puffers für ein Restriktionsenzym orientierte sich an den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers (10-fach konzentrierte Stämmlösungen).

Die Restriktionsspaltung im analytischen Maßstab wurde mit 1 µL Plasmid-DNA (ca. 200-500 ng) und je 5-10 U einer oder mehrerer Restriktionsendonukleasen in einem Volumen von 10 µl durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug in der Regel 30-60 min bei der empfohlenen Reaktionstemperatur. Standardansätze im präparativen Maßstab wurden in ähnlicher Weise durchgeführt, jedoch in einem Reaktionsvolumen von 50 µL mit 2 bis 5 µg Plasmid-DNA und jeweils 20-30 U jeder Restriktionsendonuklease. Spaltungen mit mehreren Enzymen, die eine Inkubation bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen erforderten, wurden schrittweise durchgeführt. Zunächst wurde mit dem entsprechenden Enzym bei der höheren Temperatur inkubiert, der Ansatz dann kurz auf Eis abgekühlt und nach Zugabe des nächsten Enzyms bei dessen Reaktionstemperatur weiterinkubiert.

Die Präparation großer Mengen an DNA-Fragmenten für die Herstellung von Lipocalin-Bibliotheken wurde nach einem optimierten Protokoll durchgeführt (Abschnitt 3.1.4). Plasmid-DNA wurde für diesen Zweck grundsätzlich einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen (Abschnitt 2.2.4.4), um ggf. störende Verunreinigungen (z. B. Exonukleasen) zu entfernen.

#### 2.2.5.2 Ligierung von DNA-Fragmenten

Gereinigte DNA-Fragmente, die aus Plasmid-DNA durch Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen und anschließende präparative Agarose-Gelelektrophorese erhalten worden waren, wurden zur Konstruktion neuer Plasmide mit Hilfe von T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft.

Für einen Standard-Ligierungsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 2 µl „10 × Puffer“ (MBI Fermentas; 400 mM Tris-HCl, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 5 mM ATP pH 7,8), 0,5 µl T4 DNA-Ligase (Fermentas, 1 U/µl) und jeweils ca. 50 fmol des Vektorrückgrates sowie je 100-150 fmol der weiteren DNA-Fragmente eingesetzt. Der Ansatz wurde für etwa 16 h bei 16 °C im Wasserbad oder für 2 h bei RT inkubiert und 5 µl der Lösung anschließend zur Transformation $CaCl_2$-kompetenter *E. coli* Zellen eingesetzt (Abschnitt 2.2.2.1).

Für die Herstellung der BBP- und Blc-Zufallsbibliotheken wurden in einem Gesamtvolumen von 600 µl auf ähnliche Weise jeweils 60 µl „10 × Puffer“ (Promega, 500 mM Tris/HCl pH 7,8, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 10 mM ATP, 0,5 mg/mL BSA), 20 µl T4 DNA-Ligase (Promega, 6 Weiss U/µl) und je 6 pmol des Vektorfragmentes sowie des PCR-Fragmentes eingesetzt. Der Ansatz wurde für mindestens 18 h bei 16 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch eine Ethanol-Fällung entsalzt. Dazu wurde der Ligierungsansatz auf mehrere 1,5 mL Eppendorf-Gefäße aufgeteilt und jeweils mit dem gleichen Volumen 5 M $NH_4$-Acetat, 1/40 Volumen 10 mg/mL tRNA (Stammlösung in TE-Puffer) und dem 4-fachen Volumen Ethanol (p. a.) versetzt. Die Fällung erfolgte bei RT für 1 h. Danach wurde der Fällungsansatz abzentifugiert (Eppendorf 5415R, 15800 g, 4 °C, 30 min). Das Präzipitat wurde mit 750 µl kaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, für 5 min abzentrifugiert (siehe oben) und anschließend im Speed-Vac-Konzentrator für maximal 90 s getrocknet. Für die Transformation (Abschnitt 2.2.2.2) wurde die DNA in einem geeigneten Volumen *dd*$H_2O$ gelöst.

#### 2.2.5.3 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Wurde für die Konstruktion von Plasmiden ein Vektor-Fragment mit selbstkompatiblen Enden verwendet, so wurde die intramolekulare Rezirkularisierung oder Bildung von Konkatameren durch Dephosphorylierung des DNA-Fragmentes verhindert.

Die enzymatische Reaktion wurde mit Alkalischer Phosphatase aus arktischen Garnelen durchgeführt, welche sich in der Hitze leicht inaktivieren läßt. Hierzu wurde der präparative

Restriktionsansatz (Abschnitt 2.2.5.1) nach 1,5 h mit 5 U Alkalischer Phosphatase versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Restriktionsansatz wurde anschließend für 15 min auf 65 °C erhitzt und dadurch inaktiviert. Das dephosphorylierte Vektorfragment wurde dann mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese isoliert (Abschnitt 2.2.4.2).

Oligodesoxynukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese (Abschnitt 2.2.6) wurden am 5'-Ende phosphoryliert, um die kovalente Verknüpfung durch T4-DNA-Ligase mit dem 3'-Ende des bei der Polymerase-Reaktion neusynthetisierten Strangs zu ermöglichen. Dazu wurden 200 pmol des Oligodesoxynukleotids in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit 3 µl 10 × T4 Polynukleotid-Kinase-Puffer und 5 U der T4-Polynukleotid-Kinase für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch zehnminütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert und die Oligodesoxynukleotide direkt weiterverwendet.

#### 2.2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifizierung von DNA und die Synthese von Genabschnitten wurde die PCR (Saiki *et al.*, 1988) eingesetzt. Die dafür als *Primer* eingesetzten Oligodesoxynukleotide enthielten am 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange, zur Matrizen-DNA komplementäre Sequenz. Das 5'-Ende des Oligonukleotids enthielt ggf. einen zusätzlichen Sequenzabschnitt, um z. B. Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme einzuführen. Für die Assemblierung von Genabschnitten für DNA-Bibliotheken wurde die *Taq* DNA-Polymerase eingesetzt. Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten für die Klonierung neuer Vektorkonstrukte wurde mit der *Pfu* DNA-Polymerase durchgeführt, die sich aufgrund ihrer *Proofreading*-Aktivität durch eine niedrige Fehlerrate auszeichnet (Lundberg *et al.*, 1991). Die eingesetzten *Primer* wurden für diesen Zweck vor der 3'-5' Exonukleaseaktivität dieses Enzyms geschützt, indem anstatt der 3'-terminalen Phosphorsäurediester-Bindung eine Phosphorthioatbindung synthetisiert wurde (Skerra, 1992).

<u>Standard PCR</u>

Der Standard-Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielt folgende Reagenzien: 10-100 ng Matrizen-DNA und je 25 pmol der beiden *Primer*, sowie 5 µl 10-fach konzentrierter Reaktionspuffer ohne $Mg^{2+}$ (750 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% (v/v) Tween 20), 3 µL $MgCl_2$, 4 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und 2,5 U *Taq* DNA-Polymerase (MBI Fermentas).

Die Reagenzien wurden bis auf die Polymerase zusammengemischt und im Thermocycler auf 94 °C temperiert. Dann erst wurde die Reaktion durch Zugabe der Polymerse gestartet (*Hot Start*) und 20-30 aufeinanderfolgende Temperaturzyklen durchgeführt, die aus je drei Schritten bestanden:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C für 1 min
2. Hybridisierung (*Annealing*) der *Primer* an die Matrizen-DNA bei 50 bis 65 °C für 1 min (Dauer abhängig von der Schmelztemperatur des gebildeten Hybrids)
3. Synthese der DNA bei 72 °C für 1 min (Polymerase-Reaktion; Elongation)

Der Ansatz wurde in einem letzten Schritt für 5 min bei 60 °C inkubiert um ggf. die Vervollständigung der DNA-Synthese zu erlauben.

*Error-Prone* PCR

Die Methode der fehlererzeugenden (*Error-Prone*) PCR nach Zaccolo *et al.* (1996) wurde eingesetzt, um in Plasmid-Bibliotheken die als Produkt von *In-Vivo*-Selktionsexperimenten erhalten wurden, das Lipocalin-Gen statistisch zu mutieren. Dazu wurden die Nukleotidanaloga 2'-Desoxy-P-nucleosid-5'-tri-phosphat (dPTP) und 8-Oxo-2'-desoxy-guanosin-5'-triphosphat (8-oxo-dGTP) zusätzlich zu den Standard-Desoxynukleotiden eingesetzt. In einem Ansatz von 100 µL Gesamtvolumen wurden etwa 25-50 fmol Plasmid-DNA als Matrize sowie je 50 pmol der beiden flankierenden *Primer*, 5 µl 10-fach konzentriertem Reaktionspuffer (s. o.), 6 µL 25 mM $MgCl_2$, 4 µL dNTP-Mix sowie die Nukleotidanaloga mit einer Endkonzentration von je 2 µM eingesetzt. Nach Zugabe von 5 U *Taq* DNA-Polymerase (MBI Fermentas) wurden 10 oder 20 Zyklen bei einer Hybridisierungstemperatur von 55 °C durchgeführt (*Hot Start*; siehe Standard PCR). Auf diese Weise wurden durchschnittlich vier Punktmutationen in dem Lipocalin-Gen erzeugt. Das gewünschte Reaktionsprodukt wurde anschließend durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

### 2.2.6 Ortsgerichtete Mutagenese nach Kunkel

Für die ortsgerichtete Mutagenese wurde die Vorschrift von Geisselsoder *et al.* (1987) entsprechend der Methode von Kunkel *et al.* (1992) eingesetzt. Dabei wird ein Oligodesoxynukleotid, das die geplanten Substitutionen trägt, mit der komplementären ssDNA des zu mutierenden Plasmids unter Ausbildung entsprechender Basenfehlpaarungen hybridisiert. Das angelagerte Oligonukleotid dient als *Primer* für die *In-Vitro*-Synthese des

zweiten DNA-Stranges durch DNA-Polymerase. Der neu synthetisierte Strang wird anschließend mit Hilfe einer DNA-Ligase kovalent verknüpft und somit zirkularisiert.

Der parentale Strang dieser chimären Heteroduplex stammt aus dem *E. coli* Stamm CJ236i und ist deswegen durch einen teilweisen Einbau von Desoxyuridin anstelle von Desoxythymidin geprägt (vgl. Abschnit 2.2.3.3). Nach der Transformation eines *ung*$^+$-Stammes mit dem semisynthetischen DNA-Hybrid wird der parentale Strang durch das zelleigene *ung*-System partiell degradiert, wodurch eine Selektion auf die spefizischen Mutationen des neu synthetisierten Strang erzielt wird. Der Selektionsvorteil für den mutierten synthetischen Strang ist dabei groß genug, um diese Methodik im Labor effizient einsetzen zu können.

Für die Hybridisierung wurden ca. 250 ng ssDNA (Abschnitt 2.2.3.3) mit 1 µl 10 × Hybridisierungspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM $MgCl_2$) und 0,5 µl (3,3 pmol) des phosphorylierten Oligodesoxynukleotids (Abschnitt 2.2.5.3) in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt. Die Lösung wurde in einen auf 80 °C vorgeheizten Aluminiumblock überführt, in diesem über Nacht auf RT abgekühlt und danach auf Eis gestellt. Für die Neusynthese und Zirkularisierung des zweiten DNA-Stranges wurden 1,1 µl 10 × Synthesepuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,4, 50 mM $MgCl_2$, 20 mM DTT, 10 mM ATP, je 5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 0,5 µl T4 DNA-Polymerase (1,5 U) und 1 µl T4 DNA-Ligase (3 U) zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und für 5 min auf Eis gestellt, dann für 5 min bei RT und schließlich für 90 min bei 37 °C inkubiert. Von diesem Reaktionsansatz wurden 5 µl mit 45 µL TE-Puffer verdünnt, um 5 µl davon für die Transformation $CaCl_2$-kompetenter *E. coli* Zellen zu verwenden. Die verbleibenden 45 µl der Lösung wurden bei -20 °C gelagert. Das restliche Volumen des unverdünnten Reaktionsansatzes (ca. 8 µl) wurde verwendet, um die *In-Vitro*-Reaktion durch analytische Agarose-Gelelektrophorese zu kontrollieren.

### 2.2.7 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe eines ABI PRISM 310 Genetic Analyzers der Firma PE-Applied Biosystems durchgeführt. Für die Sequenzierungsreaktion wurde der ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit desselben Herstellers verwendet. Diese Technologie basiert auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger *et al.* (1977). Mit der zu sequenzierenden Plasmid-DNA wird dabei unter Verwendung eines geeigneten Primers eine lineare PCR-Reaktion durchgeführt. Im Reaktionsgemisch sind

bereits *Taq* DNA-Polymerase (AmpliTaq) sowie Desoxynukleotide und unterschiedlich fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoyxnukleotide enthalten. Letztere dienen dazu, die DNA-Polymerisation zufällig abzubrechen und die entstandenen Oligo- bzw. Polynukleotide entsprechend der Identität der zuletzt veresterten Base zu markieren. Im Sequenziergerät werden die entstandenen DNA-Fragmente durch Kapillar-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die individuellen Fuoreszenzsignale im Laserlicht des Sequenziergerätes identifizieren jeweils die letzte Base eines jeden Fragmentes. Die so erhaltenen Rohdaten wurden an einem Power Macintosh G3 Computer mit der ABI PRISM DNA Sequencing Analysis 3.3 Software ausgewertet.

Ein Sequenzieransatz hatte folgende Zusammensetzung: 4,0 µL Terminator Ready Reaction Mix, 200-500 ng Plasmid-DNA und 3,2 pmol *Primer*. Das Reaktionsvolumen wurde mit *dd*$H_2O$ auf 10 µL eingestellt. Die Mischung wurde ggf. mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet und einer PCR-Reaktion mit 25 Zyklen unterzogen: 30 s bei 96 °C, 15 s bei 55 °C und 4 min bei 60 °C. Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit 1 µL 3 M Natriumacetat, pH 4,6 und 25 µl Ethanol (p. a.) versetzt und für 30 min bei RT gefällt; anschließend wurde zetrifugiert (Sorvall RMC 14, 14000 UPM, 21 °C, 30 min). Das Präzipitat wurde mit 70 % (v/v) Ethanol (p. a.) versetzt, erneut abzentrifugiert (Eppendorf 5415C, 14000 UPM, RT, 5 min) und für ca. 10 min an der Luft getrocknet, bevor es in 12 µl TSR-Puffer (PE-Applied Biosystems) gelöst und für 1 min bei ca. 95 °C denaturiet wurde. Diese Lösung wurde dann mit dem Sequenziergerät analysiert.

## 2.3 Gentechnische Methoden

### 2.3.1 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Rekombinante Proteine wurden in unterschiedlichen Maßstäben in *E. coli* produziert, in der Regel durch periplasmatische Sekretion. Der für das jeweilige Experiment eingesetzte Stamm – meist ein Vertreter von *E. coli* K12 – wurde dazu mit einem Plasmidkonstrukt transformiert. Zur stringenten Selektion auf Plasmid tragende Zellen während der Protein-Produktion wurde das Kulturmedium stets mit einem geeigneten Antibiotikum versetzt, ggf. auch mit mehreren gleichzeitig.

#### 2.3.1.1 Protein-Produktion im 2 L-Maßstab

Zunächst wurden 50 mL antibiotikahaltiges LB-Medium im 250 mL Kulturkolben mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 30 °C, 200 UPM ü. N. inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 40 mL auf 2 L LB-Medium im 5 L Schüttelkolben überführt und bei 22 °C, 200 UPM im Schüttler inkubiert. Nachdem eine $OD_{550}$ = 0,5 erreicht worden war, wurde die Genexpression durch Zugabe von 200 µg/L Anhydrotetracyclin induziert und je nach Protein für 2-3 h weiter kultiviert. Die Zellen wurden anschließend sofort abzentrifugiert (SLA-3000, 4420 g, 4 °C, 15 min), der Überstand vollständig abgezogen, das Sediment zügig unter Kühlung auf Eis in insgesamt 20 mL Periplasma-Aufschlusspuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Sphäroplasten abzentrifugiert (SigmaK4, 4000 UPM, 4 °C) und der Überstand ein zweites Mal scharf zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, Rotor SS-34, 15000 UPM, 4 °C, 15 min). Der klare Überstand wurde ü. N. bei 4 °C gegen einen Puffer der Wahl dialysiert und daraufhin filtriert (0,45 µm). Bis zum weiteren Gebrauch wurde der Periplasmaextrakt bei 4 °C aufbewahrt

#### 2.3.1.2 Protein-Produktion im Laborfermenter

Für die Vorvorkultur wurden 2 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit einer frisch transformierten *E. coli* Einzelkolonie angeimpft. Anschließend wurde für 6-8 h bei 37 °C und 220 UPM inkubiert. Für die Vorkultur wurden 360 mL Mineralsalzlösung mit 40 mL 20 % (w/v) Glucose, 4 mL 1 M $MgSO_4$, 400 µl Antibiotikum-Stammlösung und 400 µl Thiamin-Hydrochlorid-Stammlösung versetzt und im Verhältnis 1:1000 mit der Vorvorkultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte ca. 26 h bei 30 °C, 180 UPM. Die stationäre Vorkultur hatte dann üblicherweise eine $OD_{550} \approx 2$.

Das 10 L Kulturgefäß des Fermenters wurde mit 7 L Mineralsalzlösung gefüllt, autoklaviert und auf dem Magnetrührer fixiert. Vor dem Animpfen des Fermenters wurde das Medium auf 30 °C temperiert und über einen sterilen Trichter ergänzende Stammlösungen (Abschnitt 2.1.10) zugegeben: 800 mL 20 % (w/v) Glucose, 80 mL $MgSO_4$, 8 mL Antibiotika-Stammlösung, je 4 mL $FeCl_3$- und Zinkacetat-Lösung, 10 mL Spurenelement-Lösung sowie 200 µl 30 %iges Antifoam A. Zu Beginn der Fermentation wurde die Kultur mit Druckluft versorgt. Der sich einstellende Sauerstoffpartialdruck diente dazu, die 100 %-Marke der $O_2$-Versorgung festzulegen. Während des Verlaufs der Fermentation wurde der Sauerstoffpartialdruck durch geregelte Begasung der Kultur mit Druckluft und später zusätzlich mit reinem Sauerstoff auf einem Wert ≥ 30 % gehalten. Der pH-Wert wurde durch

kontinuierliche Titration mit 12,5 % (w/w) Ammoniaklösung auf pH 7,0 gehalten. Die Geschwindigkeit der Rühreinheit betrug etwa 470 UPM (40 % Maximalleisung).

Das Medium wurde mit der 400 mL Vorkultur angeimpft und 2 h bei 30 °C inkubiert. Dann wurde die Temperatur auf 25 °C reduziert und 300 µl Antifoam A zugegeben. Um die Bakterienkultur während der exponentiellen Wachstumsphase ausreichend mit Kohlenstoff zu versorgen, wurde 50 % (w/v) Glucose nach dem Schema in Tabelle 4 kontinuierlich zugeführt. Sobald die Kultur eine $OD_{550}$ = 13 erreichte, wurde nochmals je 2 mL Fe- und Zn-Stammlösung sowie 5 mL der Spurenelement-Lösung zugesetzt. Die Genexpression wurde bei einer Zelldichte von $OD_{550} \approx 20$ durch Zugabe von 500 µg aTc je Liter Kultur induziert. Die Inkubation wurde für 2-3 h fortgesetzt und die Zellen dann zügig durch Abzentrifugieren (Sorvall RC 3B plus, H-6000 A- Rotor, 4 °C, 20 min, 5000 UPM) geerntet.

Die sedimentierten Zellen wurden auf Eis in ein kaltes 600 mL Becherglas überführt und in vorgekühltem Periplasma-Aufschlußpuffer für 10 min auf einem Magnetrührer resuspendiert. Das eingesetzte Puffervolumen $V_P$ (in mL) wurde nach Gleichung (3) berechnet:

$$V_P = 2 \cdot V_K \cdot OD_{550} \tag{3}$$

$V_K$: Kulturvolumen in L

$OD_{550}$: opt. Dichte der Kultur zum Zeitpunkt der Ernte

Die Zellsuspension wurde anschließend auf 15 mM EDTA und 250 µg Lysozym/mL eingestellt und für 20 min auf Eis gerührt, um einen effizienten Periplasmaaufschluß zu erzielen. Der so erhaltene Bakterienextrakt wurde durch Zentrifugieren (Sorvall-Zentrifuge, SLA-1500 Rotor, 4°C, 20 min, 11500 UPM) von den Sphäroplasten grob getrennt und anschließend in einem weiteren Schritt geklärt (SLA-1500 Rotor, 4°C, 40 min, 11500 UPM). Anschließend wurde die Lösung dreimal gegen 5 L eines geeigneten Puffers dialysiert. Die Lösung wurde dann filtriert (0,45 µm) und entweder sofort für die Chromatographie eingesetzt oder bei -20 °C portionsweise eingefroren.

**Tabelle 4:** Kontinuierliche Versorgung von Fermentationsansätzen mit Glucose.

| Zelldichte $OD_{550}$ | Glucose Zugabe [ml/h] |
|---|---|
| 7,5 | 14 |
| 12,5 | 20 |
| 18,5 | 30 |
| 22,5 | 40 |

### 2.3.2 *In-Vivo*-Selektion mit Lipocalin-Bibliotheken in *E. coli*

*In-Vivo*-Selektionsexperimente mit *E. coli* wurden grundsätzlich auf Agar-Platten mit speziellen Kulturmedien (siehe Abschnitte 2.1.9 und 3.3.3) durchgeführt. Im Gegensatz zu den sonst üblichen Laborpraktiken bei gentechnischen Arbeiten mit *E. coli* mussten im Rahmen von Selektionsexperimenten einige spezielle Maßnahmen ergriffen werden, um einen optimalen und vor allem kontaminationsfreien Selektionsverlauf zu gewährleisten.

Für die Herstellung von Selektivmedien wurde zunächst das jeweilige Basismedium, meist M9-Medium oder Tris-Minimalmedium (Abschnitt 2.1.9), vorbereitet und nach dem Autoklavieren in einem vortemperierten Wasserbad auf 50°C abgekühlt. Erst dann wurden alle ergänzenden Substanzen zugegeben, z. B. Vitamine, Aminosäuren, Antibiotika und vor allem auch die Verbindung(en), auf deren enzymatische Umsetztung selektiert werden sollte. Anschließend wurde das noch flüssige Medium in einer Sterilbank in Kulturplatten (19 cm) gegossen und dort für 1-2 Studen in offenem Zustand getrocknet. Erst dann wurde der Deckel aufgesetz und die Platten entweder sofort für Selektionsexperimente eingesetzt oder mit Parafilm verschlossen und für höchstens zwei bis drei Tage bei bei 4°C gelagert.

Nach der Elektoporation von *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA von Lipocalin-Bibliotheken und der anschließenden einstündigen Erholungsphase der Zellen (Abschnitt 2.2.2.2) wurden diese Abzentrifugiert (Eppendorf 5415C, 14000 UPM, RT, 2 min) und dreimal mit mindestens 1 mL M9-Medium gewaschen, um evtl. störende Nähstoffe aus dem Transformationsansatz zu entfernen. Anschließend wurden die abzentrifugierten Zellen in einem berechnetem Volumen M9-Medium resuspendiert, wobei pro durchgeführte Elektroporation ein Volumen von 200 µL kalkuliert wurde. Die Zellsuspension wurde dann in einer Sterilbank auf den vorbereiteten Agar-Selektivplatten gleichmäßig ausgestrichen (ca. 200 µL je Platte) und die geschlossenen Platten sorgfältig mit Parafilm verschlossen, um das Austrocknen der Platten zu verhindern.

Die Inkubationsphase von Selektionsexperimenten konnte unter diesen Voraussetzungen kontaminationsfrei für bis zu zehn Tage bei Temperaturen zwischen 20 °C und 37 °C durchgeführt werden. Während dieser Zeit wurde der Verlauf einer Selektion täglich visuell begutachtet und sogfältig – ggf. unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops – auf die Entstehung von Einzelkolonien untersucht.

### 2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine in Abhängigkeit von ihrer Molekülmasse aufzutrennen, wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde das diskontinuierliche Puffersystem von Fling & Gregerson (1986) angewandt. Die Maße des Trenngels betrugen ca. $55 \times 85 \times 0{,}75$ mm$^3$. Zur Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen wurde ein Satz Glasplatten sowie die dazu gehörige Silikondichtung sorgfältig gereinigt, zusammengebaut und mit Hilfe von Metallklammem zusammengeheftet. Die Trenngelmischung mit einem Gesamtvolumen von 5 mL bestand aus 1,25 mL 4 × Lower-Tris und einem berechneten Volumen einer 30 %igen (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung, wodurch die Prozentigkeit des resultierenden Gels bestimmt wird: Zur Herstellung von 12 %igen Gelen wurden 2 mL und für 15 %ige Gele 2,5 mL Acrylamid-Stammlösung verwendet und mit Wasser auf ein Endvolumen von 5 mL ergänzt.

Nach dem Polymerisationsstart durch Zugabe von 1,3 µl TEMED und 25 µl 10 % (w/v) APS wurden 4 mL der Trenngelmischung zwischen die abgedichteten Glasplatten pipettiert und mit 1 mL Wasser überschichtet, um Luftzutritt zu vermeiden. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser abgegossen und mit Hilfe von 0,5 mL Acrylamid-Stammlösung und 0,75 mL 4 × Upper-Tris eine 5 %ige Sammelgelmischung hergestellt. Die Polymerisation des Sammelgels wurde durch Zugabe von 1,5 µl TEMED und 18 µl 10 % (w/v) APS gestartet. Die Lösung wurde auf das erstarrte Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und ein Taschenformer mit zehn Zinken eingesetzt. Nach Erstarren des Sammelgels wurden die Metallklammern sowie der untere Abstandhalter vorsichtig entfernt und das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt, die abschließend mit Laufpuffer gefüllt wurde.

Zur Probenvorbereitung wurden 10-20 µl der zu untersuchenden Proteinlösungen mit je 1/4 Vol. reduzierendem oder nicht reduzierendem 5 × Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach Entfernen des Taschenformers aus dem erstarrten Sammelgel wurden die Proben mit Hilfe einer 50 µl Hamilton-Glasspritze in die Geltaschen eingebracht.

Die Elektrophorese wurde bei 120-130 V für 1,5-2 h durchgeführt. Anschließend wurde das Trenngel von den Platten gelöst und zur Anfärbung der Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blau R250 für 20-30 min in Färbelösung geschwenkt. Es folgte die Entfärbung des Gels durch Schwenken in Entfärbelösung, die während dieses Vorgangs mehrfach ausgetauscht wurde. Die Gele wurden dann in Aufbewahrungslösung überführt und bei RT bis zu Archivierung durch elektronisches Scannen bzw. Trocknen aufbewahrt.

### 2.3.4 Chromatographische Verfahren

#### 2.3.4.1 Immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC)

In *E. coli* produzierte Proteine, die mit dem $His_6$-tag fusioniert waren, wurden durch Metallchelat-Chromatographie gereinigt (Skerra, 1994a; Fiedler & Skerra, 2001b). Als Säulenmaterial diente dabei *Chelating Sepharose Fast Flow*, eine Chromatographie-Matrix mit Iminodiessigsäure-Gruppen (IDA) als Chelatbildner. Als Übergansmetallion wurde $Zn^{2+}$ verwendet. Bei dieser Art der Chromatographie fungiert das $His_6$-tag des rekombinanten Proteins als Ligand für die freien Koordinationsstellen der vermutlich oktaedrisch koordinierten $Zn^{2+}$-Ionen.

Allgemeine Arbeitsvorschrift

Die Säule wird zunächst mit 20 Säulenvolumina 10 mM $ZnSO_4$ beladen und anschließend mit $H_2O$ gespült. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 20 Säulenvolumina Laufpuffer (Abschnitt 2.1.10) wird die dialysierte und filtrierte periplasmatische Proteinfraktion (Abschnitt 2.3.1) aufgetragen, der Durchlauf aufgefangen und bis zum Erreichen der Basislinie mit Laufpuffer gespült. Die Elution der an die Säule gebundenen Proteine erfolgt mit einem Konzentrationsgradienten von 0 bis 100 mM Imidazol in Chromatographiepuffer bei unveränderter Flussrate. Das Eluat wird ggf. mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Fraktionen von 1-5 mL aufgefangen. Zur Regenerierung der Säule wird nach der Elution mit 10 Säulenvolumina Regenerierungspuffer (50 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8,0) und anschließend mit Wasser gespült.

Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.3.4.3) auf Proteingehalt und Reinheit untersucht. Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an gereinigtem, rekombinantem Protein wurden vereinigt und dreimal gegen PBS/E 0,1 oder einen anderen geeigneten Puffer dialysiert. Gereinigtes Protein wurde anschließend bei 4 °C gelagert.

#### 2.3.4.2 Streptavidin-Affinitätschromatographie

Die meisten der für diese Arbeit heterolog in *E. coli* produzierten Proteine trugen an ihrem C-Terminus das *Strep*-tag (Schmidt & Skerra, 1993) oder das *Strep*-tag II (Schmidt & Skerra, 2007). Die Aminosäuresequenzen dieser beiden Affinitätsanhängsel sind Tabelle 5 zu entnehmen. Diese Affinitätsanhängsel wurden eingesetzt, um rekombinante Proteine mit Hilfe einer immobilisierten Streptavidin-Mutante (Voss & Skerra, 1997) im Einschritt-Verfahren chromatographisch zu reinigen.

**Tabelle 5:** Aminosäuresequenz der verwenteten *Strep*-tag Varianten

| Typ | Aminosäuresequenz |
|---|---|
| *Strep*-tag | …-Ala-Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly-COOH |
| *Strep*-tag II | …-Asn-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-… |

Üblicherweise wurde eine Chromatographiesäule (innerer Durchmesser: 0,7 cm) mit ca. 2 mL Streptavidin-Sepharose (Beladungsgrad: 5 mg/mL) verwendet. Der Verlauf der Chromatographie wurde mit einem Durchflussphotometer bei 280 nm aufgezeichnet. Zunächst wurde die Säule bei einer Flussrate von 20 mL/h mit SA-Puffer (100 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) gespült, bis ein konstantes Absorptionssignal erreicht wurde. Anschließend wurde der gegen SA-Puffer dialysierte und filtrierte (0,45 µm) Periplasmaextrakt aus einer 2 l-Kultur (Abschnitt 2.3.1.1) auf die Säule aufgetragen, wiederum mit SA-Puffer bis zur Konstanz des Absorptionssignals nachgespült und schließlich mit ca. 15 mL 2,5 mM D-Desthiobiotin in SA-Puffer eluiert. Es wurden meist 5 bis 8 Fraktionen à l,5 mL gesammelt, die dann mittels SDS-PAGE analysiert wurden (Abschnitt 2.3.4.3). Um die Säule für die nächste Reinigung zu regenerieren, wurde gebundenes D-Desthiobiotin durch Spülen mit etwa 10 mL 5 mM 2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA) in SA-Puffer eluiert. In diesem Zustand wies das Säulenmaterial eine charakteristische, intensive Orangefärbung auf. Daraufhin wurde die Säule bis zur Konstanz des Absorptionssignals mit SA-Puffer gespült (vollständige Entfärbung des Säulenmaterials).

#### 2.3.4.3 Größenausschluss-Chromatographie

Die Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration) wurde eingesetzt, um heterolog exprimierte und bereits teilweise gereinigte Proteine von Resten an Fremdproteinen oder

Aggregaten zu trennen und um das Molekulargewicht globulärer Proteine bzw. deren Oligomerisierungszustand zu analysieren.

Verwendet wurden für diesen Zweck „Superdex 75 HR 10/30“ bzw. „HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade“ Säulen, die bei Flussraten von 0,5 bzw. 1,0 mL/min an einem Äkta-HPLC-System betrieben wurden. Dabei wurde stets darauf geachtet, den jeweils vom Hersteller spezifizierten maximalen Säulengegendruck bzw. das maximale Probenvolumen von 0,5 mL bzw. 5 mL nicht zu überschreiten. Als Laufpuffer wurde in der Regel PBS verwendet.

### 2.3.5 Bestimmung von Proteinkonzentration

Um die Konzentration von Proteinlösungen zu bestimmen, wurde die Absorption (A) der Lösung bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Dazu wurde entweder eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke $d$ von 1 cm verwendet oder – bei Lösungen höherer Konzentration – eine LabelGuard Mikroliter-Messzelle eingesetzt. Die gemessene Absorption wurde jeweils um den Absorptionsbeitrag der entsprechenden Pufferlösung korrigiert. Die Proteinkonzentration $c$ wurde dann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ($A = \varepsilon \cdot c \cdot d$) berechnet, wobei der Extinktionskoeffizient $\varepsilon$ entsprechend der Methode von Gill & von Hippel (1989) mit dem Programm PEPTIDESORT des GCG-Programmpakets bzw. mit der entsprechenden Funktion der Software Vector NTI berechnet wurde (siehe Abschnitt 2.5).

### 2.3.6 Konzentrierung von Proteinen

Für einige Experimente war es notwendig, die Konzentration von Proteinlösungen auf einen bestimmten Wert zu erhöhen (z. B. für die Fluoreszenztitration) bzw. das Volumen einer Proteinlösung zu verringern (z. B. für eine anschließende Gelfiltration). Zu diesem Zweck wurden Ultrafiltrationseinheiten eingesetzt (Amicon Ultra). Die entsprechenden Einheiten wurden erst für einige Minuten bei 2500 g mit $dd$H$_2$O „gewaschen“ und anschließend mit dem der Proteinlösung entsprechenden Puffer für einige Minuten bei 2500 g äquilibriert. Danach wurde die Proteinlösung eingefüllt und dann eingeengt, indem mehrmals bis zu fünf Minuten bei 2000-3000 g zentrifugiert wurde. Um dabei die Bildung hoher lokaler Konzentrationen während des Aufkonzentrierens zu vermeiden, wurde die Lösung nach jedem Zentrifugieren durch vorsichtiges Schwenken des Konzentrators gemischt.

### 2.3.7 Digoxigenin-Markierung von Trägerproteinen

Um ein Trägerprotein – typischerweise BSA oder RNase A – mit Digoxigenin zu konjugieren, wurde eine 1 mg/mL Lösung des entsprechenden Proteins in 5 % (w/v) $NaHCO_3$, pH 8,6 im stöchiometrischen Verhältnis 2:1 mit DIG-NHS (2 mg/mL in DMF) gemischt und für 1 h bei RT im Rollmischer zur Reaktion gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend über eine PD-10 Säule gelfiltriert, um überschüssige Reagenzien und Nebenprodukte zu entfernen und ggf. das Reaktionsprodukt in einen Puffer der Wahl zu überführen.

### 2.3.8 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

In der vorliegenden Arbeit wurden ELISAs durchgeführt, um die bifunktionellen Eigenschaften, d. h. Bindungsaffinität und -spezifität sowie enzymatische Aktivität, von Fusionsproteinen aus einem Anticalin DigA16(H86N) und verschiedenen Reporter-Enzymen nachzuweisen.

#### 2.3.8.1 Direkter ELISA

Zunächst wurden je 100 µL einer 0,1 mM Lösung von DIG-BSA (Abschnitt 2.3.7) oder BSA (als Kontrolle) in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte (Immuno 96 MicroWell Plates mit MaxiSorp Oberfläche) pipettiert und bei RT für 1 h inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS/T 0,1 gewaschen und die verbliebenen Bindungsstellen der Polystyrol-Vertiefungen für 1 h bei RT mit je 200 µL 3 % BSA in PBS/T 0,5 abgesättigt. Daraufhin wurde wieder dreimal mit PBS/T 0,1 gewaschen und dann eine absteigende 1:2 Verdünnungsreihe des entsprechenden Fusionsproteins angelegt. Dazu wurden zunächst in jede Vertiefung 100 µL PBS vorgelegt und dann der Puffer in der ersten Vertiefung mit 100 µl einer Lösung des Fusionsproteins gemischt. Von dieser Mischung wurden 100 µl in die nächste Vertiefung übertragen, erneut gemischt und wiederum 100 µl davon in die nächste übertragen. Auf diese Weise wurde dann mit den restlichen Vertiefungen der Verdünnungsreihe fortgefahren. Dann wurde für 1 h bei RT inkubiert, zweimal mit PBS/T 0,1 und einmal mit PBS gewaschen, bevor in jede Vertiefung 100 µL einer geeigneten Substrat-Lösung pipettiert wurde: Für Fusionsproteine mit der AmpC β-Lactamase aus *Enterobacter cloacae* wurde eine 0,1 mM Lösung von CENTA (Bebrone *et al.*, 2001) in PBS verwendet und für Fusionsproteine mit der Alkalischen Phosphatase (PhoA) aus *E. coli* eine 0,5 mg/mL Lösung von p-Nitrophenylphosphat in Tris-Puffer (1M Tris/HCl, 1mM $ZnSO_4$, 1 mM $MgSO_4$, mit jeweils

unterschiedlichen pH-Werten). Die Hydrolyse beider Substrate wurde durch Absorptionsmessung mit Hilfe eines SpectraMax 250 ELISA-Photometers bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Temperatur von 25 °C verfolgt. Die Dissoziationskonstante $K_d$ der Bindungsreaktion wurde anschließend auf der Basis folgender Herleitung bestimmt:

Die bimolekulare Bindungsreaktion in einem direkten ELISA kann folgendermaßen formuliert werden:

$$P + L \leftrightarrows PL \tag{4}$$

Dabei bezeichnet $P$ das freie Bindeprotein, $L$ den freien Liganden und $PL$ den Komplex der beiden Moleküle. Entsprechend dem Massenwirkungsgesetz (MWG) ist die Dissoziationskonstante $K_d$ definiert als:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} \tag{5}$$

Hier sind $[P]$, $[L]$ und $[PL]$ die im chemischen Gleichgewicht vorliegenden Konzentrationen der jeweiligen Spezies.

Unter Berücksichtigung der Bilanzgleichungen

$$[P] = [P]_t - [PL] \tag{6}$$

und

$$[L] = [L]_t - [PL] \tag{7}$$

kann Gleichung (5) folgendermaßen umformuliert werden:

$$K_d = \frac{([P]_t - [PL])([L]_t - [PL])}{[PL]} \tag{8}$$

$[P]_t$ entspricht dabei der bekannten Konzentration an Bindungsprotein in jeder Vertiefung einer Mikrotiterplatte.

Unter der vereinfachenden Annahme, dass $[P]_t >> [PL]$, erhält man aus Gleichung (8) durch Auflösen nach $[PL]$:

$$[PL] = [L]_t \frac{[P]_t}{[P]_t + K_D} \tag{9}$$

Die Konzentration [*PL*] an gebundenem Protein wird experimentell anhand der enzymatischen Aktivität eines gekoppelten Reporter-Enzyms quantifiziert. Dabei wird folgender Zusammenhang angenommen:

$$[PL] = C \cdot v_0 \tag{10}$$

$v_0$ bezeichnet die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion in jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte. *C* ist ein Proportionalitätsfaktor.

Übertragen auf die Gegebenheiten eines ELISAs kann Gleichung (30) also präzisiert werden:

$$v_0 = \frac{[L]_t}{C} \frac{[P]_t}{[P]_t + K_d} \tag{11}$$

Damit entspricht $v_0$ der Observablen, $K_d$ sowie die kombinierte Konstante $[L]_t/C$ sind anzupassende Parameter, während $[P]_t$ experimentell variiert wird.

Die gesuchten Parameter wurden durch Auftragen der jeweils gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten der Absorptionsänderung ($\Delta A/\Delta t$ in $10^{-3}$ $min^{-1}$) gegen die jeweilige Proteinkonzentration und Anpassung des mathematischen Modells aus Gleichung (11) durch nichtlineare Regression (KaleidaGraph Software; Abschnitt 2.5) bestimmt. Die kombinierte Konstante wurde dabei als ein Parameter behandelt.

#### 2.3.8.2 Kompetitiver ELISA

Die Bindungseigenschaften des Fusionsproteins DigA16(H86N)-AmpC2 wurden auch in einem kompetitiven ELISA untersucht:

Zuerst wurden 100 µL einer 0,1 mM Lösung von DIG-BSA oder BSA als Kontrolle in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte (Immuno 96 MicroWell Plates mit MaxiSorp Oberfläche) pipettiert und bei RT für 1 h inkubiert. Dann wurde dreimal mit PBS/T 0,1 gewaschen und die noch freien Bindungsstellen der Polystyrol-Vertiefungen für 1 h bei RT mit je 200 µL 3 % BSA in PBS/T 0,5 abgesättigt. Daraufhin wurde wieder dreimal mit PBS/T 0,1 gewaschen und anschließend eine Verdünnungsreihe (siehe oben) des freien Liganden Digoxigenin in PBS mit 0,4 % (v/v) DMF angelegt (50 µl pro Vertiefung). In jede Vertiefung wurden dann zusätzlich 50 µL einer 20 nM Lösung des Fusionsproteins pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Es wurde zweimal mit PBS/T 0,1 und einmal mit PBS gewaschen, bevor in jede Vertiefung 100 µL einer 0,1 mM Lösung von CENTA (Bebrone *et al.*, 2001) in PBS pipettiert wurde.

Die Hydrolyse des Substrates wurde durch Absorptionsmessung mit Hilfe eines SpectraMax 250 ELISA-Photometers bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Temperatur von 25 °C aufgezeichnet. Die Rohdaten wurden anschließend durch nicht-lineare Regression an folgendes empirisches Modell angepasst (siehe z. B. Kim *et al.*, 2009):

$$v_0 = \frac{v_{\max} - v_{\min}}{1 + \left(\frac{[L]_t}{IC_{50}}\right)^p} + v_{\min} \tag{12}$$

| | |
|---|---|
| $[L]_t$ | Konzentration an freiem Liganden (L) |
| $v_{\max}$ | maximales Bindungssignal in Abwesenheit von L |
| $v_{\min}$ | Bindungssignal bei sehr hoher (unendlicher) Konzentration von L |
| $p$ | Hill-Koeffizient als Maß für die Kooperativität der Ligandenbindung |
| $IC_{50}$ | halbmaximale inhibitorische Konzentration von L |

### 2.3.9 Enzymkinetik

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Reporter-Enzymen als Bestandteil von Fusionsproteinen mit dem Anticalin DigA16(H86N) wurden Enzymkinetiken mit chromogenen Substraten photometrisch gemessen. Um dabei die Bedingungen für ein Fließgleichgewicht (*Steady-State*) möglichst gut zu erfüllen, wurde darauf geachtet, dass die Substratkonzentration [*S*] mehrere Größenordnungen über der Enzymkonzentration [*P*] lag.

Enzymatische Reaktionen wurden mit einem Lambda 9 UV/VIS Spektralphotometer (Perkin Elmer) bei 25 °C aufgenommen, wobei Polystyrol Halb-Mikro Küvetten verwendet wurden. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Substrate verwendet, deren Hydrolyseprodukt ein Absorptionsmaximum bei etwa 405 nm zeigte (p-Nitrophenylphosphat, CENTA).

<u>Allgemeine Arbeitsvorschrift</u>

Zunächst wird 1 mL des chromogenen Substrates in geeignetem Reaktionspuffer in unterschiedlichen Konzentrationen vorgelegt. Die Küvetten werden dann zur Temperierung für 10 min in den Küvettenhalter des Photometers gestellt. Um die enzymatische Reaktion zu starten, wird die Lösung anschließend mit einer konstanten Menge des jeweiligen Fusionsproteins versetzt und nach schnellem, manuellem Mischen des Reaktionsansatzes sofort die Absoptionsmessung (405 nm) gestartet.

Zur Auswertung der enzymatischen Daten wurde die jeweilige Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion aus dem annähernd linearen Bereich der Reaktionskurven berechnet. Die so ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten werden gegen die jeweilige Substratkonzentration aufgetragen und durch nicht-lineare Regression dem Michaelis-Menten-Modell angepasst:

$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m} \tag{13}$$

$V_0$ Reaktionsgeschwindigkeit

$V_{\max}$ maximale Reaktionsgeschwindigkeit

$[S]$ Substratkonzentration zu Beginn der Reaktion

$K_m$ Michaelis-Konstante

## 2.4 Biophysikalische Methoden

### 2.4.1 Fluoreszenztitration

Die Bindungseigenschaften des Anticalins DigA16(H86N) und seiner Fusionsproteine wurde u. a. mit der Methode der Fluoreszenztitration untersucht. Dabei wurde die Abnahme der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz des Proteins (*Quenching*) bei Bindung des Liganden gemessen. Lösungen mit einer Proteinkonzentration von 1 µM wurden mit einem Fluoreszenzphotometer des Typs LS 50 B (Perkin Elmer) gemessen. In diesem Fall wurde eine Anregungswellenlänge $\lambda_{ex}$ von 295 nm (Spaltbreite 4 nm) und einer Emissionswellenlänge $\lambda_{em}$ von 345 nm (Spaltbreite: 6 nm) gewählt. Bei der Verwendung geringerer Proteinkonzentrationen (0,1 µM) wurde ein FluoroMax-3 Fluoreszenzphotometer (Jobin Yvon) bei $\lambda_{ex}$ 284 nm (Spaltbreite 4 nm) und $\lambda_{em}$ von 350 nm (Spaltbreite: 6 nm) eingesetzt. Puffer und Proteinlösungen wurden vor der Fluoreszenztitration grundsätzlich filtriert (0,45 nm).

Als Puffersystem diente bei Fluoreszenzmessungen PBS oder PBS/E. Die gereinigte Protein-Lösung lag aufgrund einer vorhergehenden Größenausschluss-Chromatographie (Abschnitt 2.3.4.3) meist in einem dieser Puffer vor. Andernfalls wurde die Probe vorher ausgiebig gegen den entsprechenden Puffer dialysiert und ggf. durch Verdünnen auf die benötigte Konzentration eingestellt. Zur Messung wurde 2 mL der Proteinlosung in einer Quarzküvette (1 × 1 cm Pfadlänge) mit Rührfisch vorgelegt und im Küvettenhalter des Photometers auf 25 °C temperiert. Bei Titrationsexperimenten wurden insgesamt bis zu 40 µl einer 0,1 oder 1 mM Lösung des jeweiligen Liganden in DMF oder PBS mit 3 % DMF in Schritten von 2 µl zupipettiert. Die dadurch erzeugte Verdünnung der vorgelegten Proteinlösung um maximal

2 % blieb bei der nachfolgenden Auswertung der Daten unberücksichtigt. Nach jedem Titrationsschritt wurde bei unterbrochenem Anregungslicht für 1 min unter Rühren inkubiert, um die Gleichgewichtseinstellung der Bindungsreaktion zu gewährleisten. Das Fluoreszenzsignal wurde jeweils als Mittelwert über 5-10 s gemessen.

Die Dissoziationskonstante $K_d$ der beobachteten Bindungsreaktion wurde anschließend durch nicht-lineare Regression bestimmt. Dazu wurde folgende Gesetzmäßigkeit angenommen:

Im thermodynamischen Gleichgewicht lässt sich die Komplexbildung aus Protein $P$ und Ligand $L$ durch das Massenwirkungsgesetz (MWG) beschreiben (vgl. Abschnitt 2.3.8.1). Die Dissoziationskonstante ist gemäß Gleichung (8) definiert. Die exakte Auflösung dieser Beziehung als gemischt quadratische Gleichung nach $[PL]$ ergibt:

$$[PL] = \frac{[P]_t + [L]_t + K_d}{2} - \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_d)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \tag{14}$$

Von den beiden mathematisch möglichen Lösungen hat lediglich diese Gleichung eine physikalisch sinnvolle Bedeutung.

Unter Berücksichtigung der bereits erwähnten Bilanzgleichung (6) ergibt sich für $[P]$:

$$[P] = \frac{[P]_t - [L]_t - K_d}{2} + \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_d)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \tag{15}$$

Die messbare Gesamtfluoreszenz einer Probe bestehend aus Protein, Ligand und deren Komplex $[PL]$ kann angenähert als Summe der Einzelbeiträge betrachtet werden,

$$F = f_p[P] + f_L[L] + f_{PL}[PL] \tag{16}$$

wobei $f_P$, $f_L$ und $f_{PL}$ die molaren Fluoreszenzkoeffizienten der jeweiligen Spezies darstellen. Da die in dieser Arbeit verwendeten Liganden unter den Meßbedingungen für die Proteinfluoreszenz keine nennenswerte Eigenfluoreszenz zeigen, kann Gleichung (16) vereinfacht werden:

$$F = f_p[P] + f_{PL}[PL] \tag{17}$$

Durch Einsetzen von Gleichungen (14) und (15) erhält man schließlich:

$$F = ([P]_t - [L]_t - K_d)\frac{f_P}{2} + ([P]_t + [L]_t + K_d)\frac{f_{PL}}{2} + \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K)^2}{4} - [P]_t[L]_t}\,(f_P - f_{PL}) \tag{18}$$

Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden jeweils um den Nullwert korrigiert, auf einen Anfangswert von 100 % normiert und dann über der Ligandenonzentration aufgetragen. Die Kurvenanpassung der Daten erfolgte gemäß Gleichung (18) durch nicht-lineare Regression mit der Software „KaleidaGraph“. Die Variablen $f_P$, $f_{PL}$ und $K_d$ wurden dabei als anzupassende Parameter behandelt.

### 2.4.2 CD-Spektroskopie

Als Circulardichroismus (CD) bezeichnet man die spektroskopische Erscheinung, dass rechts und links zirkular polarisiertes Licht beim Durchtritt durch ein optisch aktives (chirales) Medium unterschiedlich stark absorbiert wird. Bei der CD-Spektroskopie an Proteinen, bei denen das Phänomen des Circulardichroismus besonders gut zu beobachten ist, kommen dabei einerseits die Absorptionseigenschaften der Peptid-Bindung im Fern-UV (180 bis 270 nm) und andererseits die Absorptionseigenschaften der aromatischen Seitenketten im Nah-UV-Bereich (250 bis 350 nm) zu tragen. Während letztere hauptsächlich eine Beurteilung ihrer molekularen Umgebung erlauben, geben CD-Spektren im Absorptionsbereich der Peptidbindung Aufschluss über den Sekundärstrukturgehalt eines Proteins und ermöglichen somit eine Abschätzung des jeweiligen Anteils der unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente. CD-Messungen im Bereich zwischen 190 und 220 nm eignen sich daher zur Messung von Konformationsänderungen, wie sie z. B. bei der thermischen Denaturierung von Proteinen auftreten. Deswegen wurde die CD-Spektroskopie in der vorliegenden Arbeit sowohl zur qualitativen Abschätzung struktureller Auswirkungen von Aminosäuresubstitutionen in Blc-Varianten sowie zur Untersuchungen der Proteinstabilität einzelner Varianten durch thermische Denaturierung eingesetzt.

Zur Vorbereitung der Proben wurden die zu untersuchenden Blc-Varianten nach der chromatographischen Reinigung zunächst ausgiebig gegen 20 mM Na-Phosphat, pH 7,0 dialysiert. Dann wurden die Proteinproben in eine spezielle Filmküvette aus Quarzglas (Schichtdicke 0,1 mm) gefüllt und in einem Probenhalter des Jasco J-810 Spektralpolarimeters fixiert. CD-Spektren zwischen 190 und 250 nm wurden durch Akkumulation von 10 Einzelspektren (*Response* = 2 s, *Bandwidth* = 2 nm, *Data Pitch* = 0,1 nm, *Scan Speed* = 40 nm/min, *Cell*

*Length* = 0,1 cm) bei RT erhalten. Die in Grad gemessenen Werte für die Elliptizität $\Theta_{obs}$ wurden für jede Blc-Variante gemäß Gleichung (19) auf die molare Elliptizität pro Aminosäure $\Theta_{MRW}$ (*Mean Residue Weight*) umgerechnet.

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta_{obs}\, M_R}{c\, d\, N_A} \tag{19}$$

$M_R$ Molmasse der Blc-Variante

$N_A$ Anzahl der Aminosäuren

$c$ Protein Konzentration in mg/mL

$d$ Schichtdicke in cm

Thermische Entfaltungsübergänge von Blc-Varianten wurden bei einer Wellenlänge von 207 nm gemessen, da bei dieser Wellenlänge das stärkste Differenzsignal zwischen nativem und thermisch vollständig denaturiertem Zustand dieser Proteine zu beobachten war. Für die Messung des Entfaltungsübergangs wurden frische Proteinlösungen verwendet, die ausgiebig gegen Phosphatpuffer (siehe oben) dialysiert worden waren. Die Änderung des CD-Signals wurde in Schritten von 0,2 °C aufgezeichnet und die gemessenen Elliptizität $\Theta$ gegen die Temperatur aufgetragen. Dabei wurde ein Temperaturbereich von 20 °C bis 70 °C bei einem Temperaturgradienten von 40 K/h überstrichen. Die übrigen Geräteeinstellungen entsprachen der Aufnahme von CD-Spektren (siehe oben). Für die Modellierung der Rohdaten wurde ein Zwei-Zustands-Modell der Proteinfaltung zugrunde gelegt (Lumry & Biltonen, 1966). Dabei wird angenommen, dass nur natives ($N$) und vollständig denaturiertes ($U$) Protein in signifikanten Mengen vorliegen und Intermediate vernachlässigt werden können. Entsprechend dem MWG ist die Gleichgewichtskonstante $K_U$ der Gleichgewichstreaktion

$$N \leftrightarrows U \tag{20}$$

definiert als:

$$K_U = \frac{[U]}{[N]} = \frac{f(u)}{1 - f(u)} \tag{21}$$

*f(u)* bezeichnet dabei den relativen Anteil ungefalteten Proteins:

$$f(u) = \frac{K_U}{1 + K_U} \tag{22}$$

Da das gemessene CD-Signal ($y$) eine Unterscheidung zwischen $N$ und $U$ erlaubt, kann der Anteil an ungefaltetem Protein durch

$$f(u) = \frac{y - y_N}{y_U - y_N} \tag{23}$$

bestimmt werden. Die Parameter $y_N$ und $y_U$ bezeichnen die (extrapolierte) Elliptizität des nativen bzw. des denaturierten Zustandes. Die Temperaturabhängigkeit dieser Größen kann unter der Annahme linearer prä- bzw. posttransitioneller Steigung der Denaturierungskurve folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$y_N = m_N T + b_N \tag{24}$$

$$y_U = m_U T + b_U \tag{25}$$

Die Parameter $b_N$ und $b_U$ stellen dabei die y-Abschnitte der Basislinien des nativen und denaturierten Zustandes dar, während $m_N$ und $m_U$ die Steigungen dieser Geraden beschreiben.

Durch Gleichsetzen von (22) und (23) und Auflösen hach $y$ ergibt sich:

$$y = \frac{y_U K_U + y_N}{1 + K_U} \tag{26}$$

Unter der vereinfachenden Annahme, dass die Enthalpie der Denaturierung ($\Delta H_m$) temperaturunabhängig ist, kann mit Hilfe der *van't Hoffschen* Reaktionsisobare aus der definitionsgemäßen Gleichgewichtskonstanten $K_U = 1$ bei der Schmelztemperatur $T_m$ die Gleichgewichtskonstante $K_U$ bei einer anderen Temperatur $T$ berechnet werden:

$$K_U = \exp\left[\frac{\Delta H_m}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right] \tag{27}$$

Nach Einsetzen der Gleichungen (24), (25) und (27) in Gleichung (26) erhält man (Brumano *et al.*, 2000):

$$y = \frac{(m_N T + b_N) + (m_U T + b_U)\left\{\exp\left[\frac{\Delta H_m}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right]\right\}}{1 + \exp\left[\frac{\Delta H_m}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right]} \tag{28}$$

Diese Gleichung wurde zur Anpassung der Rohdaten thermischer Denaturierungskurven herangezogen. Die abhängige Variable $y$ bezeichnet hierbei die gemessene Elliptizität (in mdeg), $T$ die Temperatur (in °K), $T_m$ die Schmelztemperatur des Proteins am Wendepunkt der Übergangskurve (50 % entfaltetes Protein), $R$ die allgemeine Gaskonstante (8,314 K $M^{-1}$ $mol^{-1}$) sowie $\Delta H_m$ die Enthalpie der Entfaltung bei $T_m$ (in J $mol^{-1}$).

Um die Denaturierungsübergänge unterschiedlicher Varianten miteinander vergleichen zu können, wurden die einzelnen Entfaltungskurven nach Gleichung (23) auf den Anteil *f(u)* des ungefalteten Proteins normiert. Die dazu notwendigen Parameter $b_N$, $b_U$, $m_N$ und $m_U$ wurden durch nicht-lineare Regression der Rohdaten unter Verwendung von Gleichung (28) ermittelt. Die so transformierten Daten wurden schließlich nach Gleichung (29) angepasst, die sich durch Einsetzen von Gleichung (27) in (22) ergibt:

$$f(u) = \frac{\exp\left[\frac{\Delta H_m}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right]}{1 + \exp\left[\frac{\Delta H_m}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right]} \tag{29}$$

Die freie Enthalpie der Denaturierung unter Standardbedingungen (25 °C) $\Delta G_U$ kann unter Annahme einer temperaturunabhängigen Entfaltungsenthalpie $\Delta H_m$ durch Verwendung von Gleichung (27) mit der Schmelztemperatur $T_m$ für $T = 298{,}15$ K berechnet werden:

$$\Delta G_U = -RT \ln K_U \tag{30}$$

### 2.4.3 Oberflächen-Plasmonresonanz (Biacore)

Für die Echtzeit-Analyse der Bindung des verbesserten Anticalins DigA16(H86N) an Digoxigenin wurde ein Biacore X Gerät zusammen mit einem SPR Sensorchip CMD 200m (XanTec, Münster) eingesetzt. Bei diesem Sensorchip sind die Goldoberflächen der beiden Flusszellen mit einer Carboxymethyldextran-Schicht funktionalisiert (O'Shannessy *et al.*, 1992). Dadurch wird eine einfache Kopplung von Proteinen durch EDC/NHS-Chemie ermöglicht (Abbildung 9), wobei frei zugängliche primäre Aminogruppen in Proteinen als Reaktionspartner dienen.

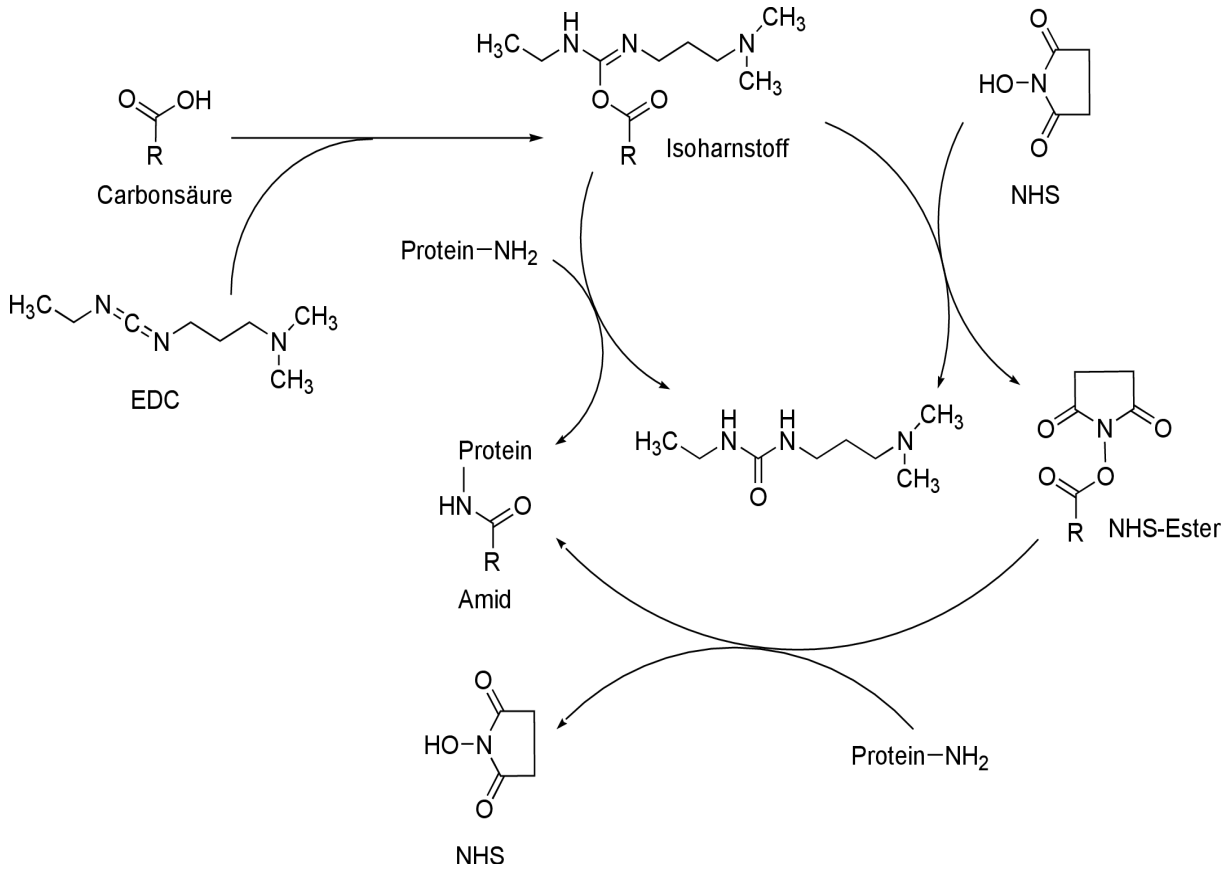



**Abbildung 9:** Kovalente Immobilisierung von Proteinen durch den Einsatz von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS). EDC reagiert mit einer Carbonsäure-Gruppe einer funktionalisieren Trägeroberfläche (R; z. B. auf einem SPR Sensorchip) zu einem reaktiven Isoharnstoff-Intermediat. Dieses Intermediat kann mit primären Amingruppen des zu immobilisierenden Proteins reagieren und durch Bildung einer Amidbindung kovalent immobilisiert werden. Da die Isoharnstoff-Verbindung in wässriger Lösung sehr instabil ist (Hydrolyse), kann die Reaktion durch Zugabe von NHS deutlich effizienter gestaltet werden. Dabei verläuft die Reaktion über einen stabileren NHS-Ester als Zwischenprodukt, der ebenfalls mit primären Amingruppen reagieren kann. Auch bei diesem Reaktionsweg ist das Protein schließlich über eine stabile Amidbindung an die Trägeroberfläche gekoppelt (verändert nach Hermanson, 2008).

Alle verwendeten Pufferlösungen wurden vor Gebrauch filtriert (0,22 µM) und sorgfältig entgast. Auf Flusszelle 2 des Sensorchips wurde DIG-RNase A kovalent immobilisiert. Flußzelle 1 wurde als Referenzzelle verwendet und deswegen mit unbehandelter RNase A gekoppelt. Für die kovalente Kopplung der RNase A wurde das Gerät bei 25 °C und einer Flussrate von 5 µL/min betrieben und jede Flusszelle einzeln behandelt. Zunächst wurde die Carboxymethyldextran-Schicht durch Injektion von 35 µL einer Lösung von 0,5 M NHS und 0,2 M EDC in DMF aktiviert. Dann wurde schrittweise eine Lösung von 100 nM DIG-RNase A bzw. unkonjugierter RNase A in 10 mM Na-Acetat (pH 4,0) injiziert, bis ein Signal-

zuwachs von etwa 350 RU erreicht wurde. Freie Bindungsstellen wurden durch 35 µL 1 M 2-Aminoethanol/HCl (pH 8,5) abgesättigt.

Die Bindungsstudien wurden anschließend bei unveränderter Temperatur und einer Flussrate von 25 µl/min durchgeführt. Als Puffersystem diente PBS/E, versetzt mit 0,005 % P20 als Benetzungsmittel. Lösungen des Anticalins DigA16(H86N) mit unterschiedlichen Konzentrationen wurden nacheinander injiziert, wobei jeweils eine Referenzmessung ohne Protein voranging. Das SPR-Signal wurde stets als Differenz der beiden Flusszellen (Fc2-Fc1) aufgezeichnet und vor der Datenanalyse gegen eine aus allen Referenzmessungen gemittelte Basislinie korrigiert (Myszka, 1999). Die kinetischen Daten wurden anschließend unter Zuhilfenahme der Software BIAevaluation Version 3.0 durch globale Regressionsanalyse gemäß dem 1:1 Langmuir Bindungsmodell ausgewertet (Karlsson *et al.*, 1991).

### 2.4.4 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

ITC-Experimente wurden mit einem Microcal VT-ITC Kalorimeter durchgeführt. In der Messzelle mit einem Nominalvolumen von 1,431 mL wurde eine 8,5 µM Lösung des Anticalins DigA16(H86N) vorgelegt, und die automatische Injektions-Einheit des Gerätes wurde mit einer 100 µM Lösung an Digoxigenin gefüllt. Als Puffer wurde PBS mit 3 % (v/v) DMF verwendet. Das organische Lösungsmittel entstammte der Stammlösung des Liganden in reinem DMF und wurde in der Proteinlösung durch Zugabe des Lösungsmittels ebenfalls auf 3 % eingestellt, um eine Wärmetönung durch Verdünnungseffekte zu minimieren. Das Titrationsexperiment wurde bei 25 °C durchgeführt und die Rotationsgeschwindigkeit der Injektionseinheit auf 300 UPM eingestellt. Insgesamt wurde die Ligandenlösung in 50 aufeinanderfolgenden Injektionsschritten von je 5 µl in die Messzelle titriert. In einem Kontrollexperiment wurde unter identischen Bedingungen Digoxigenin-Lösung (s. o.) in PBS mit 3% (v/v) DMF titriert.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Origin 7 und einem Algorithmus des Kalorimeter-Herstellers. Die Messdaten wurden damit um die separat ermittelten Beiträge der Verdünnungswärmen für jeden Titrationsschritt aus dem Kontrollexperiment korrigiert und anschließend durch nicht-lineare Regression entsprechend einem 1:n Bindungsmodell ausgewertet. Als Regressionsparameter wurden die Bindungsenthalpie $\Delta H^0$, die Assoziationskonstante $K_A$ sowie das stöchiometrische Verhältnis der Bingungsreaktion $n$ erhalten. Die freie

Enthalpie $\Delta G^0$ und die Entropie $\Delta S^0$ der Reaktion wurden dann gemäß den Gleichungen (31) und (32) berechnet.

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_0 \tag{31}$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \tag{32}$$

## 2.5 Software und Datenbanken

Zum Editieren und Darstellen von DNA- und Peptidsequenzen wurde das Wisconsin Package (GCG) Version 10.3 (Devereux *et al.*, 1984), sowie die Software VectorNTI Advance 10.3.0 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Zur Planung von Protein-Bibliotheken auf der Grundlage von Röntgen-Kristallstrukturen wurde das Programm Insight 2005 (Accelrys Limited, Cambridge, UK) eingesetzt. Abbildungen von Proteinstrukturen wurden mit PyMOL (DeLano, 2002) angefertigt.

DNA-Agarosegele wurden auf einem UV-Leuchttisch mit einer PC-gekoppelten CCD-Kamera und der Software BioCaptMW Version 10.04 (Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell) digitalisiert und zur weiteren Dokumentation auf einem Mitsubishi Thermodrucker P91 ausgedruckt. Polyacrylamid-Gele von Proteinen und Oligodesoxynukleodiden wurden zur Dokumentation auf handelsüblichen Flachbettscannern (Epson und Canon) digitalisiert. DNA- und Proteinsequenzen wurden den Online-Datenbanken GenBank (Benson *et al.*, 2008) und UniProtKB/Swiss-Prot (Consortium, 2010) entnommen. Strukturdaten von Proteinen stammten aus der Protein Data Base (Berman *et al.*, 2000).

Zur Auswertung und graphischen Darstellung von Bindungsdaten wurden die Programme Kaleidagraph 3.6 (Synergy Software, Reading, PA, USA) und Origin 7 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) verwendet.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Konstruktion einer Zufallsbibliothek auf der Basis des Bakteriellen Lipocalins

Das Bakterielle Lipocalin (Blc) aus *E. coli* wurde in dieser Arbeit erstmals als Gerüstprotein für das *Protein-Engineering* in Hinblick auf biokatalytische Eigenschaften eingesetzt. Die Entscheidung, dieses Lipocalin als Grundlage für das *De-Novo*-Design künstlicher Varianten mit enzymatischen Eigenschaften auszuwählen, basierte auf mehreren Überlegungen:

1. Die Kristallstruktur des Blc war bekannt (Schiefner *et al.*, 2010) und konnte somit als Grundlage für die Planung einer Protein-Zufallsbibliothek dienen (Abschnitt 1.1.2).
2. Durch seine eher tiefe und enge Bindungstasche im Vergleich zum BBP (Huber *et al.*, 1987) unterscheidet sich die Struktur des Blc in Hinblick auf die hier verfolgte Fragestellung vorteilhaft und erlaubte ein alternatives Konzept bezüglich der Auswahl geeigneter Aminosäurepositionen für die Zufallsmutagenese (Abschnitt 3.1.1).
3. Im Gegensatz zu den meisten Lipocalinen aus Wirbeltieren besitzt das Blc in seiner nativen Struktur keine Disulfidbrücken, eine für das *Protein-Engineering* günstige Eigenschaft, da die Bildung von Dimeren oder unerwünschten Disulfidisomeren während der Überexpression in *E. coli* vermieden wird. Damit sind grundsätzlich auch cytoplasmatische Expressions- bzw. Selektionsstrategien möglich, wohingegen ansonsten das oxidierende Milieu des bakteriellen Periplasmas zu bevorzugen ist (Müller & Skerra, 1993).
4. Aus anderen Studien war bereits bekannt, dass das Blc in *E. coli* ausgezeichnet überexprimiert werden kann (Breustedt, 2008) und in hoher Ausbeute (im Periplasma) akkumuliert, ohne dabei toxisch auf die Zellen zu wirken.

### 3.1.1 Auswahl von Aminosäurepositionen für die Zufallsmutagenese

Ein fundamentaler Aspekt für die Konstruktion einer Protein-Zufallsbibliothek besteht in der Auswahl geeigneter Aminosäurepositionen innerhalb des Gerüstproteins. Ziel ist es dabei, durch eine Sättigungsmutagenese dieser Aminosäuren strukturelle und letztendlich auch funktionelle Variabilität zu erzeugen. Es ist dabei in der Regel sinnvoll, die Randomisierungsstrategie insbesondere auf der Grundlage struktureller Überlegungen auf eine möglichst kleine Auswahl an Aminosäuren zu begrenzen. Aus methodischen Gründen ist die Größe von

Protein-Zufallsbibliotheken nämlich beschränkt und übersteigt nur selten eine Größenordnung von $10^{10}$ Varianten (Hoogenboom, 2005).

Man konzentriert sich deshalb bei der Mutagenese im Wesentlichen auf Aminosäurepositionen, von deren konzertierter Veränderung man sich vor allem eine verbesserte oder sogar neue Funktion verspricht: zum Beispiel die Bindung eines neuen Liganden oder die Beschleunigung einer chemischen Reaktion (Katalyse). Dazu kommen prinzipiell solche Aminosäuren in Betracht, die in der Nähe eines (hypothetischen) funktionellen Zentrums liegen und so möglicherweise direkt mit einem neuen Liganden oder Substrat interagieren können. Es ist bei diesem erheblichen Eingiff in die natürliche Primärstruktur des Gerüstproteins von besonderer Bedeutung, dass durch die Mutagenese der ausgewählten Positionen die Faltung unbeeinträchtigt bleibt und möglichst wenig von seiner thermodynamischen Stabilität einbüßt.

Übertragen auf die Aufgabenstellung dieser Arbeit erschien beim Blc eine andere Mutagenese-Strategie angezeigt, als sie zuvor bei der BBP-Bibliothek verwirklicht wurde (vgl. Abschnitt 1.1.1). Während beim BBP hauptsächlich die Peptidschleifen im oberen Bereich der Bindungstasche randomisiert wurden, um eine Anpassung der relativ breiten Kavität an einen neuen Liganden zu gewährleisten, musste im Blc ein anderer Effekt erzielt werden. Beim Blc mit seiner relativ engen und tiefen Bindungstasche erschien es notwendig, für einen neuen Liganden in erster Linie genügend „Platz“ zu schaffen, um ein potenzielles Substrat tief in der Bindungstasche einzubetten und dabei eine möglichst gute Abschirmung vom Lösungsmittel zu gewährleisten. Schließlich ist gerade diese Eigenschaft eine wesentliche Voraussetzung effizienter enzymatischer Katalyse (Fersht, 1998). Weiterhin sollte die Mutagenese so konzipiert sein, dass in diesem neu geschaffenen „Reaktionsraum“ eine Positionierung funktioneller Aminosäureseitenketten möglich ist, die zur Stabilisierung eines chemischen Übergangszustandes beitragen können.

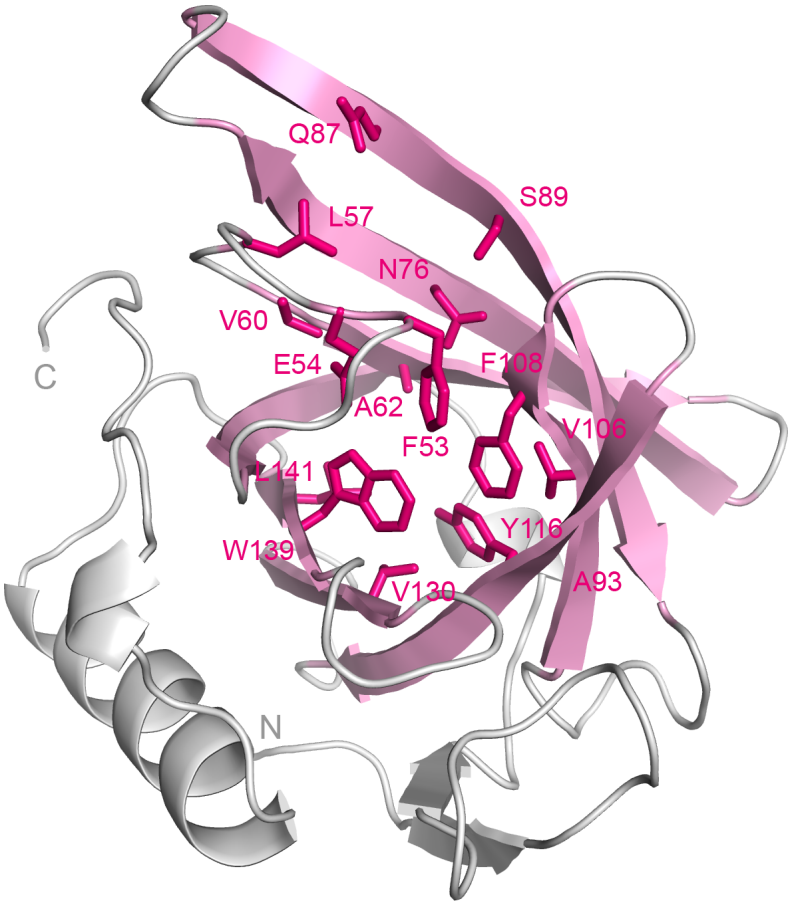



**Abbildung 10:** Darstellung der Mutagenese-Strategie für eine Zufallsbibliothek des Bakteriellen Lipocanins (Blc) aus *E. coli* anhand der Kristallstruktur (PDB ID: 1QWD). Für die Zufallsmutagenese ausgewählte Aminosäuren im *β-Barrel* (pink) sind als Seitenketten unter Angabe der Aminosäureposition eingeblendet. Die Reste zeigen ins Innere der Bindungstasche und bilden den größten Teil ihrer Oberfläche.

Dementsprechend wurde die Kristallstruktur des Blc (PDB ID: 1QWD; Campanacci *et al.*, 2004) als Ausgangspunkt herangezogen und insgesamt 16 Aminosäurepositionen für eine konzertierte Randomisierung ausgewählt (Abbildung 10). Die Seitenketten dieser Aminosäuren bilden dabei über 90 % der molekularen Oberfläche der Bindungstasche und erscheinen dabei nicht essentiell für die Stabilisierung des *β-Barrels*. Für die ortsgerichtete Mutagenese aller 16 Positionen wurde das Zufallscodon NNS ausgewählt (Tabelle 6). Diese Basenzusammensetzung führt dazu, dass an den entsprechenden Codons im randomisierten Gen jeweils eine der 20 proteinogenen Aminosäuren möglich ist, jedoch die Stop-Codons *ochre* (TAA) und *opal* (TGA) vermieden werden. Der Einbau von *amber*-Stop-Codons (TAG) ist bei diesem Zufallscodon zwar weiterhin möglich, kann allerdings durch den Einsatz geeigneter *E. coli* Suppressor-Stämme kompensiert werden, so dass entsprechende Varianten dann ebenfalls zu der Protein-Bibliothek beitragen können.

**Tabelle 6:** Randomisierte Aminosäurepositionen in der Blc-Zufallsbibliothek. Nomenklatur der Zufallstripletts nach NC-IUB (1985); Xaa steht für alle 20 proteinogenen Aminosäuren.

| Position | Zufallstriplett | Aminosäuren |
|---|---|---|
| Phe53 | NNS | Xaa |
| Glu54 | NNS | Xaa |
| Leu57 | NNS | Xaa |
| Val60 | NNS | Xaa |
| Ala62 | NNS | Xaa |
| Asn76 | NNS | Xaa |
| Gly78 | NNS | Xaa |
| Gln87 | NNS | Xaa |
| Ser89 | NNS | Xaa |
| Ala93 | NNS | Xaa |
| Val106 | NNS | Xaa |
| Phe108 | NNS | Xaa |
| Tyr116 | NNS | Xaa |
| Val130 | NNS | Xaa |
| Trp139 | NNS | Xaa |
| Leu141 | NNS | Xaa |

### 3.1.2 Vorbereitung eines Expressionsvektors

Nachdem die zu randomisierenden Positionen festlagen, bestand der nächste Schritt darin, auf dem Expressionsvektor pBlc2 (siehe Abschnitt 1.1.2, Abbildung 3) eine Gen-Kassette mit geeigneten flankierenden Schnittstellen zu konstruieren. Dies war notwendig, um das mittels PCR erzeugte, randomisierte Fragment des Blc-Gens effizient klonieren zu können. Die Anforderungen an eine solche Gen-Kassette waren zweierlei:

1. Sie musste den gesamten von Mutationen betroffenen Genabschnitt überspannen, um die konzertierte Mutagenese aller ausgesuchten Reste zu erlauben.

2. Der entsprechende Bereich musste durch zwei verschiedene flankierende Restriktionsschnittstellen eingefasst werden, um eine einfache Insertion des randomisierten Gen-Fragmentes zu erlauben. Dabei war besonders wichtig, die 5'- und 3'-flankierenden, nicht randomisierten Bereiche des Blc auf ein Minimum zu beschränken, um eine möglichst

kleine Genkassette zu erzielen und eine kompliziertere PCR-Synthesestrategie zu vermeiden.

Der zu mutierende Bereich des Blc-Gens auf Vektor pBlc2 umfasste den DNA-Sequenzbereich zwischen Position 304 und 570 (Abbildung 17, S. 97). Da die unmittelbar angrenzenden Bereiche keine geeigneten, natürlich vorkommenden Restriktionsschnittstellen enthielten, war es notwendig, entsprechende Schnittstellen einzuführen. Da sich bei der Herstellung anderer Lipocalin-Bibliotheken – insbesondere bei der bereits erwähnten BBP-Bibliothek (Beste, 1998) – der Einsatz der Typ IIa Restriktionsendonuklease *Bst*XI bewährt hatte, sollte dieses Restriktionsenzym auch für die Konstruktion der Blc-Bibliothek eingesetzt werden. Als Alternative wurde außerdem das Restriktionsenzym *Bst*EII in Betracht gezogen.

Eine Besonderheit beider Enzyme ist ihre diskontinuierliche Erkennungssequenz, d. h. diese Enzyme erkennen ihre Substrat-Sequenz anhand zweier zueinander palindromischer Nukleotidfolgen von je 3 bp, welche durch eine zentrale Sequenz beliebiger Nukleotidabfolge unterbrochen werden. Das Enzym *Bst*XI spaltet DNA an definierten Positionen innerhalb dieser 6 bp langen Sequenz, während der entsprechende Bereich bei *Bst*EII aus nur einem Nukleotid besteht und die Hydrolyse der DNA bei diesem Enzym innerhalb der eigentlichen Erkennungssequenz stattfindet (Abbildung 11). Diese Enzyme ermöglichen also durch einen planmäßigen Unterschied im variablen Sequenzbereich die Erzeugung von DNA-Fragmenten mit zwei unterschiedlichen und nicht selbstkompatiblen überhängenden Enden, die in einen Vektor inseriert werden können.

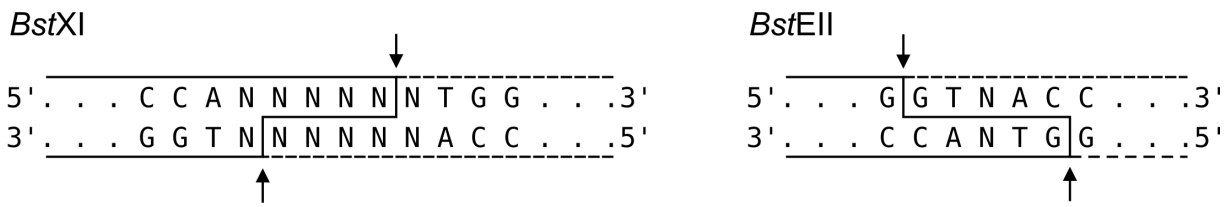



**Abbildung 11:** DNA-Hydrolyse durch die Restriktionsendonukleasen *Bst*XI und *Bst*EII. Dargestellt ist jeweils die doppelsträngige Erkennungssequenz der beiden Enzyme. N bezeichnet jeweils eine beliebige der vier Nukleotidbasen (A, T, C, G). Die Spaltstellen in Strang und Gegenstrang sind durch Pfeile markiert. Die dabei entstehenden Überhänge der DNA-Enden sind mit durchgezogener bzw. gestrichelter Linie angedeutet.

Da es nicht möglich war, die gewünschten Schnittstellen an geeigneter Position durch stille Mutationen künstlich zu erzeugen, mussten dabei zwangläufig Aminosäuresubstitutionen in Kauf genommen werden.

Um die Faltung und Stabilität des Proteins durch diese Veränderung nicht negativ zu beeinflussen, wurde versucht, möglichst wenige Aminosäuren zu mutieren und dabei solche Aminosäuren auszuwählen, die sich an der Oberfläche des Proteins befinden und dem Lösungsmittel exponiert sind, da dort die Seitenkette nicht wesentlich zur Stabilisierung der Proteinfaltung beitragen sollte.

In Folge dieser Überlegungen wurden insgesamt drei Gen-Kassetten konzipiert, wobei in zwei Fällen flankierende *Bst*XI-Schnittstellen und in einem Fall *Bst*EII-Schnittstellen eingeführt wurden (Abbildung 12; pBlc3, pBlc4, pBlc6). Dies führte zu zwei bzw. drei Aminosäuresubstitutionen im Blc. Die entsprechenden Varianten wurden entsprechend dem Vektor, auf dem das jeweilige Protein kodiert ist, als Blc#3 (K37N, R38H, D149V), Blc#4 (L40P, D149V) und Blc#6 (G41V, T144S) bezeichnet.

Die Vektoren pBlc3, pBlc4 und pBlc6 wurden durch ortsgerichtete Mutagenese nach Kunkel konstruiert (Abschnitt 2.2.6). Dazu wurden für die Hybridisierung mit der parentalen Einzelstrang-DNA drei Oligodesoxynukleotid-Paare eingesetzt (BLC_K3/BLC_K4, BLC_K2/BLC_K2 und BLC_K5/BLC_K6; Abbildung 12). Nach der Mutagenese wurden die erhaltenen Plasmide durch Restriktionsverdau mit *Bst*XI bzw. *Bst*EII und DNA-Sequenzierung überprüft.

**pBlc2:**

```
                    BstXI                                   BstXI
    AAATAATTTCGACGCCAAACGTTATCTCGGTACCTGGTATGAG.....TCCCGCACGCCAACCATTTCTGACGAAGTGAAACAGGAGA
240 +---------+---------+---------+---------+--.....---------+---------+---------+---------+ 610
    TTTATTAAAGCTGCGGTTTGCAATAGAGCCATGGACCATACTC.....AGGGCGTGCGGTTGGTAAAGACTGCTTCACTTTGTCCTCT
     BLC_K3 AGCTGCGGTTGGTAATAGAACCATGGACCA          BLC_K4 GCGGTTGGTAAAGACACCTTCACTTTGTCCTC

     AsnAsnPheAspAlaLysArgTyrLeuGlyThrTrpTyrGlu.....SerArgThrProThrIleSerAspGluValLysGlnGlu
               35    AsnHis     40              45              145         Val150
```

**pBlc4:**

```
                         BstXI                                   BstXI
    AAATAATTTCGACGCCAAACGTTATCTCGGTACCTGGTATGAG.....TCCCGCACGCCAACCATTTCTGACGAAGTGAAACAGGAGA
240 +---------+---------+---------+---------+--.....---------+---------+---------+---------+ 610
    TTTATTAAAGCTGCGGTTTGCAATAGAGCCATGGACCATACTC.....AGGGCGTGCGGTTGGTAAAGACTGCTTCACTTTGTCCTCT
         BLC_K2  CGGTTTGCAATAGGTCCATGGACCATACTC      BLC_K4 GCGGTTGGTAAAGACACCTTCACTTTGTCCTC

     AsnAsnPheAspAlaLysArgTyrLeuGlyThrTrpTyrGlu.....SerArgThrProThrIleSerAspGluValLysGlnGlu
               35            Pro              45              145         Val150
```

**pBlc6:**

```
                    BstEII                                  BstEII
    GACGCCAAACGTTATCTCGGTACCTGGTATGAGATTGCCCGTT.....GTGGATACTCTCCCGCACGCCAACCATTTCTGACGAAGTG
250 +---------+---------+---------+---------+--.....---------+---------+---------+---------+ 600
    CTGCGGTTTGCAATAGAGCCATGGACCATACTCTAACGGGCAA.....CACCTATGAGAGGGCGTGCGGTTGGTAAAGACTGCTTCAC
       CGGTTTGCAATAGACCAATGGACCATACTC BLC_K5            TATGAGAGGGCCAGTGGTTGGTAAAGAC BLC_K6

    AspAlaLysArgTyrLeuGlyThrTrpTyrGluIleAlaArg.......TrpIleLeuSerArgThrProThrIleSerAspGluVal
     35              40Val          45                  140         Ser145            150
```

**Blc#2** **Blc#4** **Blc#6**

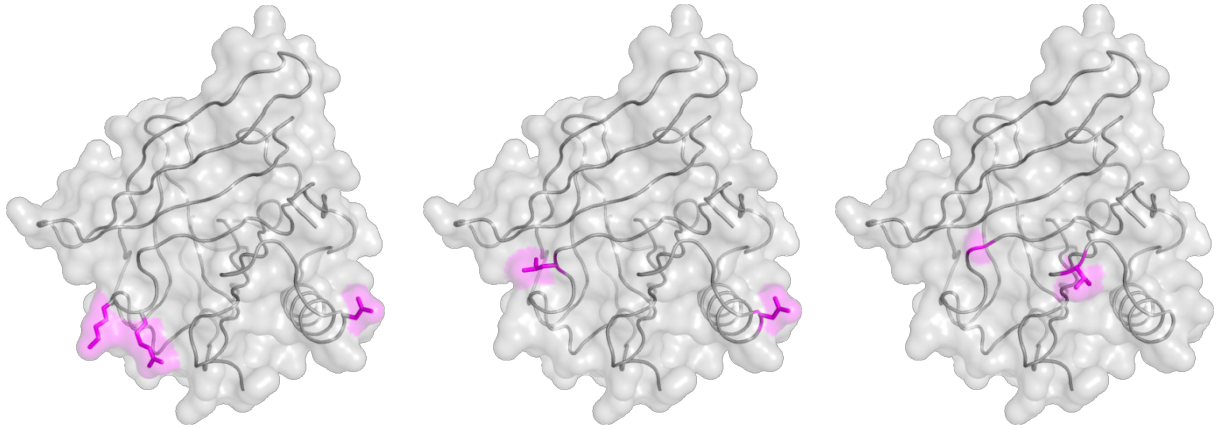


**Abbildung 12:** Konstruktion unterschiedlicher Blc-Genkassetten durch ortsgerichtete Mutagenese. pBlc3, pBlc4, pBlc6: DNA-Sequenzabschnitte des Ausgangsvektors pBlc2 mit Oligodesoxynukleotiden (grün) für die Mutagenese nach Kunkel. Die kodierten Aminosäuren sind kursiv dargestellt. Positionsangaben entsprechen der Zählweise auf pBlc2. Mutierte Positionen und ggf. resultierende Aminosäuresaustausche sind rot gekennzeichnet. Blc#3, Blc#4, Blc#6: Räumliche Darstellung der ausgetauschten Aminosäuren zur Einführung der Restriktionsschnittstellen anhand von Blc (PDB ID: 1QWD) mit angedeuteter Molekülobefläche (pink).

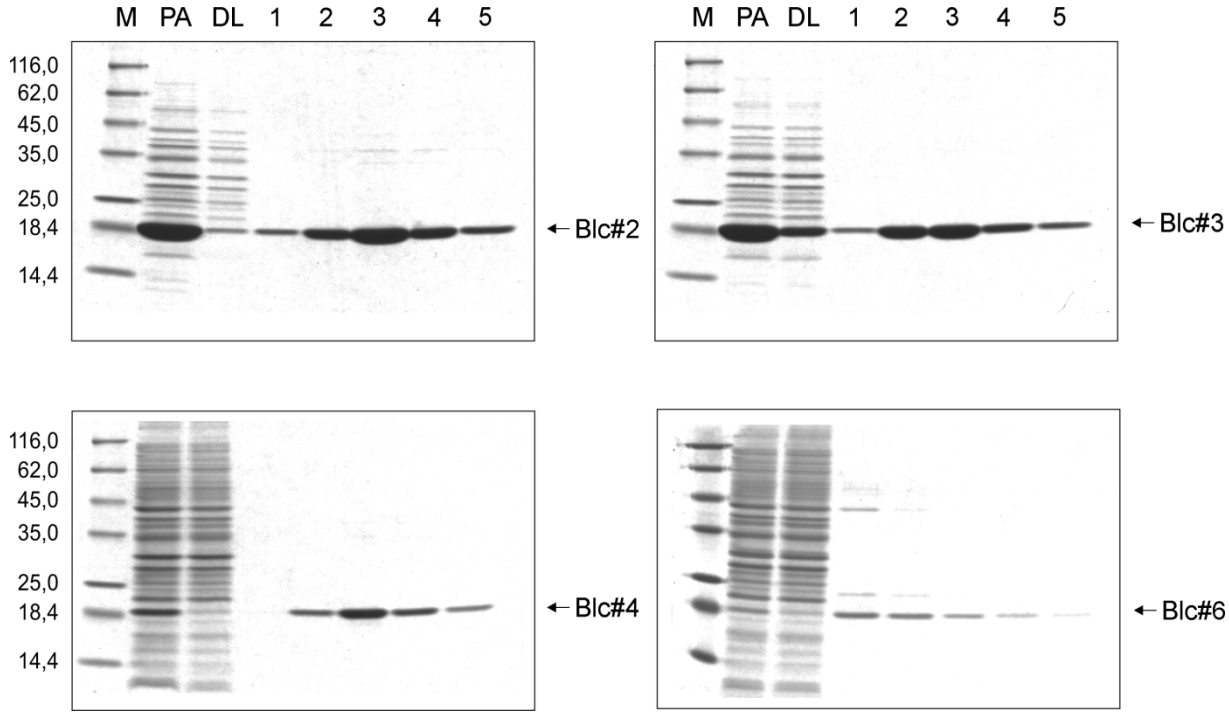



**Abbildung 13:** SDS-PAGE der bakteriell produzierten und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten Blc-Varianten mit den optimierten Klonierungskassetten. Aufgetragen wurden neben einem Protein-Größenstandard (M) jeweils ein Aliquot des *E. coli* Periplasmaextraktes (PE), des Säulendurchlaufes (DL) sowie fünf Elutionsfraktionen (1-5).

Da über die thermische Stabilität des Wildtyp-Blc keine Informationen zur Verfügung standen und unklar war, welchen Einfluss die eingeführten Aminosäuresubstitutionen auf die Stabilität der jeweiligen Variante haben, erschien es notwendig, Faltung und thermische Stabilität dieser Varianten zu untersuchen. Dazu wurden das Wildtyp-Blc (Blc#2) und die davon abgeleiteten Mutanten im 2 L-Maßstab in *E. coli* JM83 produziert (Abschnitt 2.3.1.1) und mittels SA-Chromatographie gereinigt (Abschnitt 2.3.4.2). Die Analyse der erhaltenen Fraktionen durch SDS-PAGE zeigte, dass alle vier Blc-Varianten in *E. coli* in nachweisbaren Mengen produziert wurden. Die Ausbeute an Blc#3 (2,9 mg) bezogen auf einen Liter Kulturmedium war in etwa vergleichbar mit der des Blc#2 (3,5 mg), wohingegen die Ausbeuten an Blc#4 und Blc#6 deutlich reduziert waren (1,5 mg bzw. 0,5 mg). Außerdem wurde bei diesen beiden Varianten eine verstärkte Lyse der Zellen während der Protein-Produktion beobachtet, was sich in einer deutlich schlechteren Qualität des Periplasmaextraktes äußerte (Abbildung 13).

Die erheblich reduzierte Ausbeute an Blc#6 war eine ungünstige Ausgangssituation für das funktionelle *Protein-Engineering*. Gerade für *In-Vivo*-Selektionsexperimente auf enzymatische Aktivität ist eine möglichst hohe Protein-Dosis in der einzelnen Zelle wünschenswert, um ggf. niedrige $k_{cat}$-Werte zu kompensieren (Martinez *et al.*, 1996). Zudem war zu

befürchten, dass die Protein-Ausbeute durch die konzertierte Mutagenese von 16 Aminosäurepositionen weiter abfällt. Aus diesen Gründen wurde die Variante Blc#6 von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Um eine Aussage über etwaige strukturelle Veränderungen der Varianten Blc#3 und Blc#4 im Vergleich zur Ausgangsvariante Blc#2 treffen zu können, wurden CD-Spektren der Proteine im Fern-UV zwischen 190 nm und 240 nm aufgenommen (Abbildung 14). In diesem Wellenlängenbereich werden die spektralen Eigenschaften eines Proteins vorwiegend durch dessen Sekundärstrukturelemente bestimmt (Johnson, 1988).

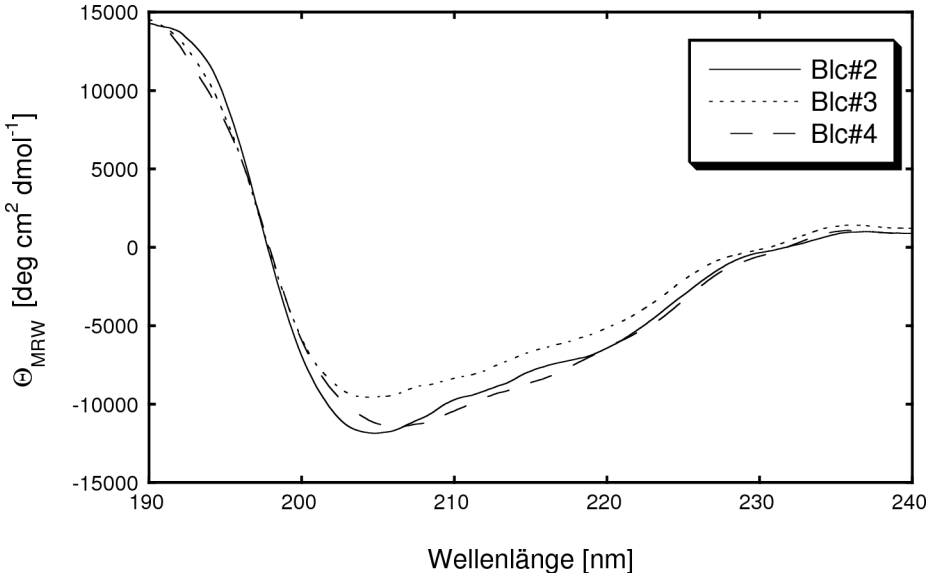



**Abbildung 14:** CD-Spektren des Bakteriellen Lipocalins aus *E. coli* (hier Blc#2) und seiner Varianten Blc#3 und Blc#4. Die CD-Spektren wurden bei RT in einer Quarzküvette mit 0,1 mm Schichtdicke mit Hilfe eines Jasco J-810 Spektralpolarimeters durch Akkumulation von 10 Einzelspektren gemessen. Die Proteinlösungen lagen hierzu bei einer Konzentration von 100 bis 350 µg/mL in 20 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,5 vor. Die gemessene Elliptizität $\Phi$ wurde nach Gleichung (28) in die molare Elliptizität pro Aminosäure $\Phi_{MRW}$ umgerechnet (Abschnitt 2.4.2).

Der Vergleich der CD-Spektren für die verschiedenen Blc-Varianten zeigte keine signifikanten Unterschiede zum rekombinanten Wildtyp-Blc. Im Einklang mit der bekannten Kristallstruktur des Bakteriellen Lipocalins aus *E. coli* (Schiefner *et al.*, 2010) entsprachen die Spektren dem eines Proteins mit überwiegend β-Faltblatt-Struktur. Ein geringer α-helikaler Anteil manifestierte sich durch das leicht verbreiterte Minimum bei etwa 210 nm und ein Maximum bei etwa 195 nm. Die Messungen ließen somit vermuten, dass das *β-Barrel* in Blc#3 und Blc#4 erhalten blieb und deren drei bzw. zwei Aminosäuresubstitutionen offenbar gut von der Proteinarchitektur toleriert wurden.

Weiterhin interessierte die thermodynamische Faltungsstabilität der Blc-Varianten, die ebenfalls mittels CD-spektroskopischen Messungen untersucht wurde. Dazu wurde der thermisch verursachte Übergang vom nativen Protein zum entfalteten Zustand beobachtet, indem der Verlust an Sekundärstuktur als Änderung der Elliptizität im Fern-UV bei 207 nm verfolgt wurde. Durch kontinuierliches Erhitzen der Proben bei linearem Temperaturprofil wurden Denaturierungskurven aufgezeichnet, die nach der Methode von Cohen & Pielak (1994) ausgewertet wurden (Abschnitt 2.4.2).

Die Übergangskurven von Blc#2, Blc#3 und Blc#4 sind in Abbildung 15 gezeigt. Das „Wildtyp"-Protein Blc#2 und die Variante Blc#3 zeigten typische Entfaltungsprofile mit zunächst schwach linear zunehmender Elliptizität bei steigender Temperatur. Bei ca. 47 °C (320 K) bzw. 42 °C (315 K) nahm das CD-Signal sprunghaft zu und blieb ab einer Temperatur von etwa 52 °C (325 K) annähernd konstant. Offenbar zeigten beide Proteine einen einstufigen Übergang mit hoch kooperativem Denaturierungsverhalten. Im Unterschied dazu wies Blc#4 eine stark reduzierte Kooperativität auf (vgl. Abbildung 15C). Der Entfaltungsübergang dieser Variante schien zweistufig zu sein.

Die Denaturierungskurven wurden gemäß dem Zweizustands-Modell (Abschnitt 2.4.2) angepaßt und so die Schmelztemperatur $T_m$ und die freie Enthalpie der Denaturierung $\Delta G_U^0$, bezogen auf Standardbedingungen, bestimmt (Tabelle 7). Aufgrund des komplexen Entfaltungsübergangs von Blc#4 konnten die Rohdaten in diesem Fall nicht befriedigend modelliert werden. Deswegen wurde diese Variante von der weiteren Datenanalyse ausgeschlossen. Für Blc#2 und Blc#3 wurde zusätzlich aus den ermittelten Parametern der temperaturabhängige Anteil an denaturiertem Protein *f(u)* bestimmt, um die Denaturierungskurven der beiden Proteine unter normierten Bedingungen vergleichen zu können (Abbildung 15D).

Bei der thermischen Denaturierung zeigte das Blc#2 (Wildtyp) eine Schmelztemperatur $T_m$ von 49,2 °C. Die freie Enthalpie der Entfaltungsreaktion wurde für dieses Protein zu 63,0 kJ mol$^{-1}$ bestimmt. Die Variante Blc#3 zeigte dagegen einen um etwa 5 C° reduzierten Schmelzpunkt von 44,4 °C und eine geringfügig reduzierte Kooperativität (vgl. $\Delta H_m$), was sich insgesamt in einer niedrigeren freien Energie der Entfaltung von 44,6 kJ mol$^{-1}$ äußerte.

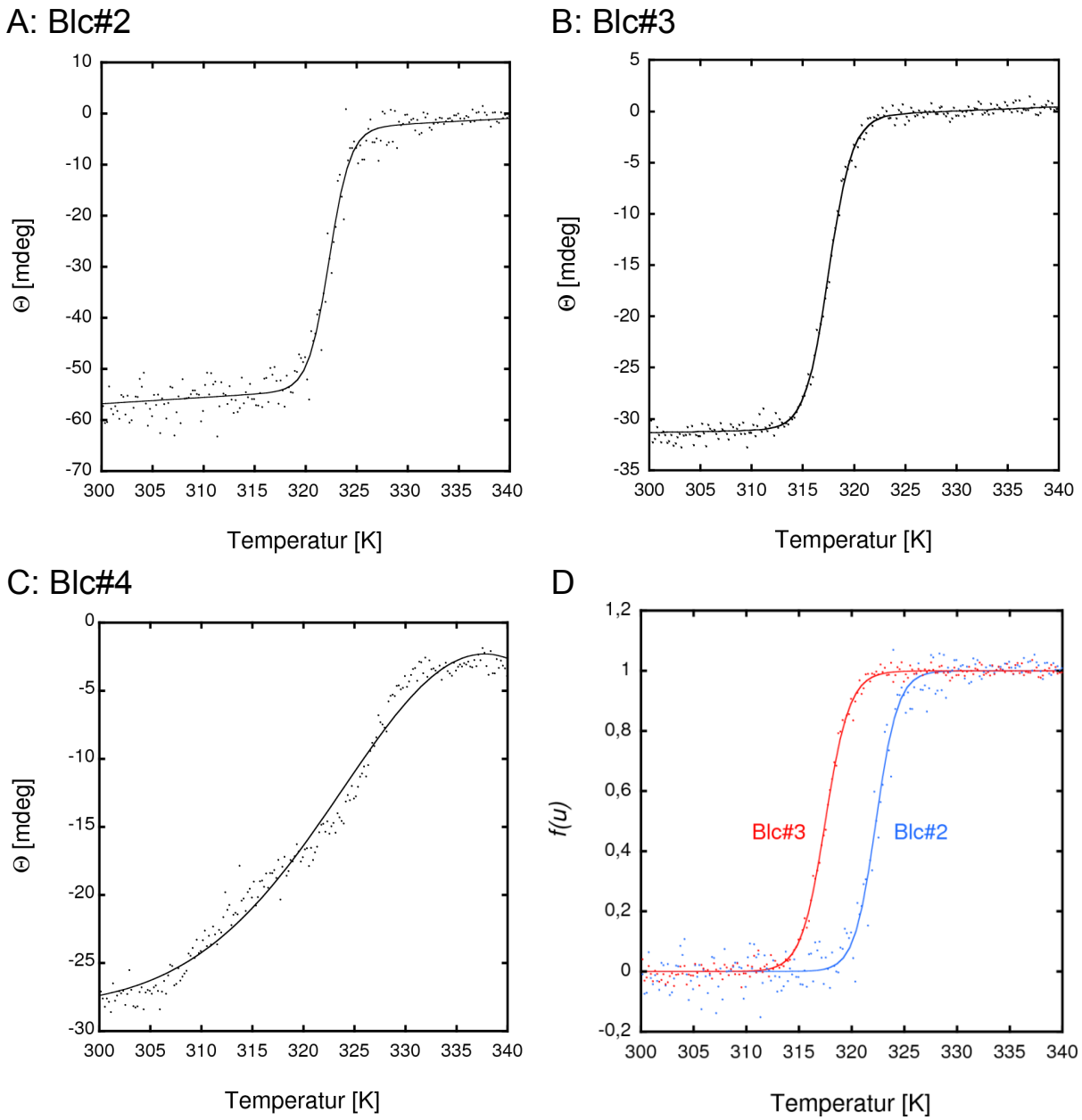



**Abbildung 15:** Thermische Denaturierungsstudien mit Blc#2 und seinen Varianten Blc#3 und Blc#4. Die gereinigten Proteine in 20 mM Na-Phosphat, 30 mM $K_2SO_4$, pH 7,5 wurden in einem Jasco J-810 Spektralpolarimeter kontrolliert erhitzt und die Elliptizität bei 207 nm in Abhängigkeit von der Temperatur aufgezeichnet. Die gemessenen Elliptizitäten wurden gegen die Temperatur aufgetragen und die Denaturierungskurve nach dem Zweizustands-Modell in Gleichung **(28)** angepasst. Mit Hilfe der so ermittelten Parameter wurde gemäß Gleichung (23) der apparente Anteil des ungefalteten Proteins *f(u)* für Blc2 und Blc3 bestimmt und als Überlagerung der normierten Entfaltungsdaten dargestellt (D). Die Kurven wurden schließlich gemäß Gleichung (29) angepasst.

**Tabelle 7:** Thermodynamische Parameter für die thermische Denaturierung der Lipocaline Wildtyp-Blc (Blc#2) und Blc#3.

| **Blc-Variante** | $T_m$ **[°C]** | $\Delta H_m$ **[kJ mol$^{-1}$]** | $\Delta G_U^0$ **[kJ mol$^{-1}$]** |
|---|---|---|---|
| Blc#2 | 49,17 ± 0,07 | 839,5 ± 48,6 | 63,0 ± 3,7 |
| Blc#3 | 44,36 ± 0,03 | 731,1 ± 16,6 | 44,6 ± 1,3 |

Weiterhin ist erwähnenswert, dass bei allen untersuchten Blc-Varianten im Verlauf der thermischen Denaturierung eine Aggregierung des Proteins beobachtet wurde. Dies konnte auch durch Reduzierung der maximalen Denaturierungstemperatur auf 60 °C nicht verhindert werden. Aus diesem Grund war bei diesen Experimenten eine Rückfaltung der Protein-Proben durch kontrollierte Verringerung der Temperatur nicht möglich. Insgesamt kam trotz der um etwa 5 °C reduzierten Schmelztempertur des Blc#3 nur diese Variante als Grundlage für die Konstuktion einer Zufallsbibliothek des Bakteriellen Lipocalins in Frage.

### 3.1.3 Konzertierte Mutagenese der ausgewählten Aminosäurepositionen

Nachdem die zu randomisierenden Positionen ausgewählt und eine geeignete Genkassette für die Blc-Bibliothek konstruiert worden war, bestand der nächste Schritt darin, eine robuste Strategie zur *In-Vitro*-Synthese des entsprechenden Blc-Genabschittes zu etablieren.

Da es bislang nicht möglich ist, komplette Gene mit mehreren hundert Basen durch automatisierte Festphasensynthese direkt zu erzeugen, müssen synthetische Gene aus mehreren kurzen DNA-Fragmenten zusammengesetzt werden. Die am meisten verbreitete Methode, um dies zu erreichen, wird als „*PCR Splicing by Overlap Extension*“ bezeichnet (Review siehe Aiyar *et al.*, 1996). Frühe Beispiele dafür finden sich bereits Anfang der 90er Jahre (Essen & Skerra, 1994). Dabei werden mehrere Oligodesoxynukleotide mit einer Länge von typischerweise 50-80 Basen eingesetzt, die insgesamt den gewünschten Genabschnitt überspannen und jeweils paarweise überlappende 5'- bzw. 3'-Enden aufweisen. Durch die Hybridisierung dieser Oligodesoxynukleotide entsteht ein chimärer DNA-Strang mit teilweise einzelsträngigen Abschnitten, die formal – im Verlauf mehrerer Schritte – durch eine Polymerase-Reaktion aufgefüllt werden. Dieser Prozess wird durch PCR realisiert, wobei es neben der reinen Assemblierung des Genabschnittes auch zu einer Amplifizierung des „Endproduktes“ kommt. Im abgewandelter Form wurde diese Methode bereits sehr erfolgreich für die Konstruktion einer BBP-Bibliothek (Abschnitt 1.1.1; Beste, 1998) eingesetzt und wird deshalb auch in dieser Arbeit angewendet.

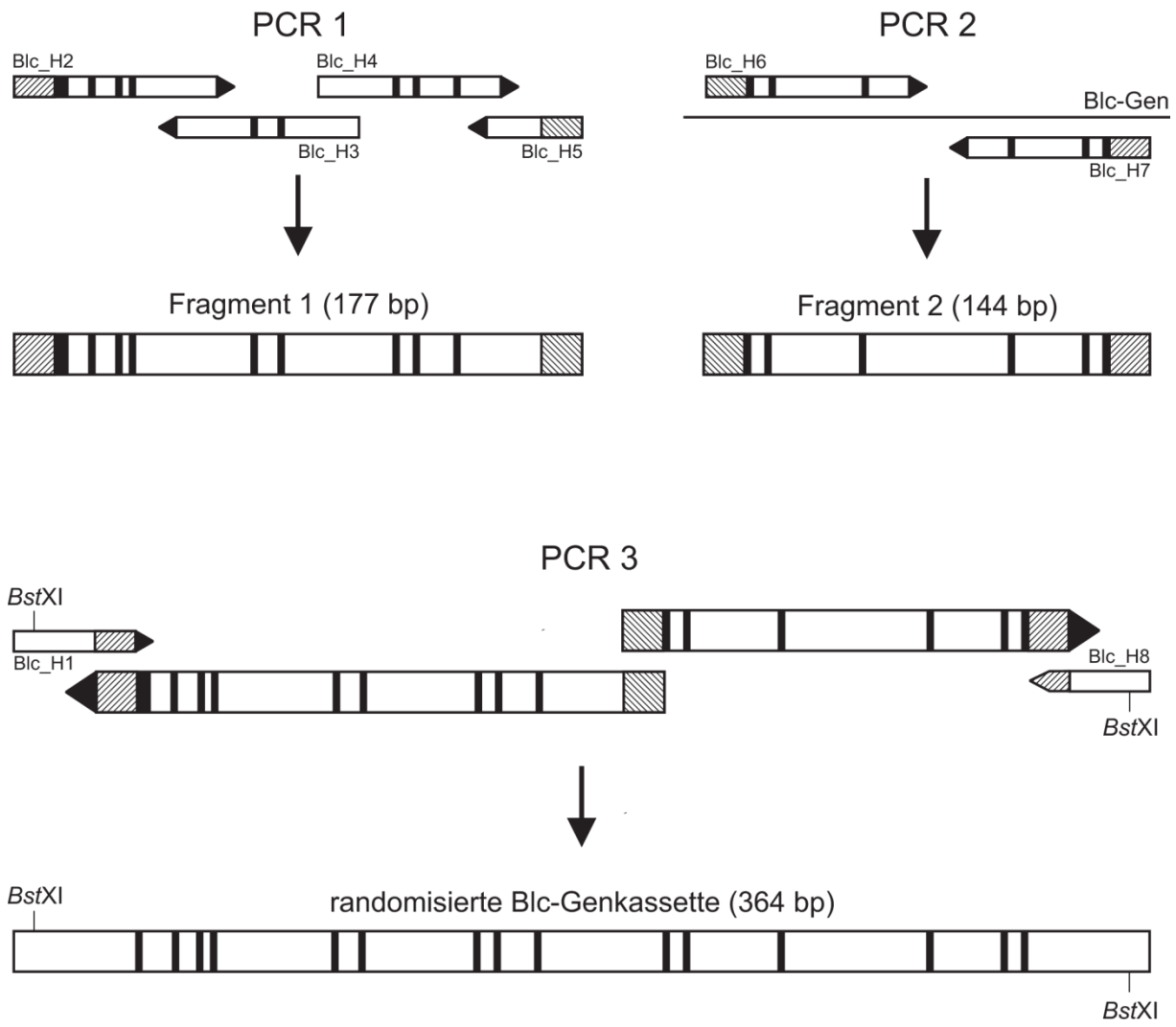



**Abbildung 16:** Schematische Darstellung der PCR-Strategie zur konzertierten Mutagenese des Blc-Strukturgens. Dargestellt sind die Oligodesoxynukleotide sowie die in drei PCR-Reaktionen erzeugten DNA-Produkte. Randomisierte Positionen sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Sequenzbereiche, deren Überlappung in PCR 3 die Assemblierung des gesamten Genabschnitts bewirkt, sind schraffiert.

Zunächst wurden insgesamt sechs Oligodesoxynukleotide geplant, deren Sequenz alle 16 Zufallspositionen der Blc-Bibliothek mit NNS-Codons abdeckten (siehe Abbildung 16). Vier der Oligodesoxynukleotide (BLC_H2, BLC_H3, BLC_H4 und BLC_H5) wurden so konzipiert, dass sie untereinander partiell hybridisieren können und somit in einer PCR ohne Matrizen-DNA zu einem ersten Genfragment (Fragment 1; Abbildung 16) von 177 bp führen, welches 10 der 16 Zufallspositionen enthält. In einer zweiten (konventionellen) PCR mit pBlc3 als DNA-Matrize kamen zwei der *Primer* (BLC_H6 und BLC_H7) zum Einsatz und führten zu einem zweiten Fragment von 144 bp Länge, das die verbleibenden 6 Zufallspositionen abdeckt (Fragment 2; Abbildung 16). Aufgrund der teilweisen Komplementarität der endständigen *Primer* (BLC_H5 und BLC_H6; siehe Abbildung 17) überlappten sich auch die

Sequenzen der entstandenen doppelstängigen DNA-Fragmente, was in einer dritten PCR zur Assemblierung der Genkassette genutzt wurde. Dazu wurden zwei weitere flankierende *Primer* geplant (BLC_H1 und BLC_H8), die mit den beiden andren endständigen Primern überlappten und entsprechende *Bst*XI-Schnittstellen trugen. Diese waren mit pBlc3 kompatibel, so dass die randomisierte Genkassette nach Synthese und Restriktionsverdau in entsprechend vorbereitete Plasmid-DNA inseriert werden konnte.

```
                                BstXI
                BLC_H1  GACGCCAACCATTATCTTGGTACCTGGTATGAGATTGCCCGTTTTGATCACCGC
                                                        BLC_H2  GCCCGTTTTGATCACCGCNNSNNSCGTGGANNSGAAAAANNSACCNNSACATAC
     TGACCGTAGTAAATAATTTCGACGCCAACCATTATCTTGGTACCTGGTATGAGATTGCCCGTTTTGATCACCGCTTTGAACGTGGACTGGAAAAAGTCACCGCAACATAC
 230 +---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+--------- 339
     ACTGGCATCATTTATTAAAGCTGCGGTTGGTAATAGAACCATGGACCATACTCTAACGGGCAAAACTAGTGGCGAAACTTGCACCTGACCTTTTTCAGTGGCGTTGTATG

       ThrValValAsnAsnPheAspAlaAsnHisTyrLeuGlyThrTrpTyrGluIleAlaArgPheAspHisArgPheGluArgGlyLeuGluLysValThrAlaThrTyr
            30             35  (LysArg)   40             45             50             55             60

                                                                                                          MluI
                                                                                                          ACGCG
     AGCCTGCGTGATGACGG                  BLC_H4  TATAACCCTGACAGAGGAATGTGGNNSCAGNNSGAAGGGAAANNSTACTTTACCGGCGCACC
     AGCCTGCGTGATGACGGCGGCCTGAATGTCATTAATAAAGGCTATAACCCTGACAGAGGAATGTGGCAGCAGAGTGAAGGGAAAGCGTACTTTACCGGCGCACCAACTCG
 340 +---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+--------- 449
     TCGGACGCACTACTGCCGCCGGACTTACAGTAATTATTTCCGATATTGGGACTGTCTCCTTACACCGTCGTCTCACTTCCCTTTCGCATGAAATGGCCGCGTGGTTGAGC
18/12 TCGGACGCACTACTGCCGCCGGACTTACAGTAANNSTTTNNSATATTGGGACTGTCTCCT  BLC_H3                  ATGAAATGGCCGCGTGGTAGCGC

     SerLeuArgAspAspGlyGlyLeuAsnValIleAsnLysGlyTyrAsnProAspArgGlyMetTrpGlnGlnSerGluGlyLysAlaTyrPheThrGlyAlaProThrArg
      65             70             75             80             85             90             95            100


     TGCTGCGCTGAAANNSTCANNSTTTGGTCCTTTCTATGGCGGTNNSAACGTTATTGCACTCGATC  BLC_H6
     CGCTGCGCTGAAAGTGTCATTCTTTGGTCCTTTCTATGGCGGTTATAACGTTATTGCACTCGATCGGGAATACCGCCATGCGCTGGTTAGCGGGCCGGACCGCGACTACC
 450 +---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+--------- 559
     GCGACGCGACTTTCACAGTAAGAAACCAGGAAAGATACCGCCAATATTGCAATAACGTGAGCTAGCCCTTATGGCGGTACGCGACCAATCGCCCGGCCTGGCGCTGATGG
     ACGACGCGACTTT  BLC_H5                                                  ATGGCGGTACGCGACNNSTCGCCCGGCCTGGCGCTGATGG

      AlaAlaLeuLysValSerPhePheGlyProPheTyrGlyGlyTyrAsnValIleAlaLeuAspArgGluTyrArgHisAlaLeuValSerGlyProAspArgAspTyrLeu
                105            110            115            120            125            130            135


                                BstXI
     TGTGGATACTCTCCCGCACGCCAACCATTTCTGTGGAAGTGAAACAGGAGATGCTGGCAGTCGCGACCCGGGAAGGGTTTGATGTCAGTAAATTTATTTGG
 560 +---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 660
     ACACCTATGAGAGGGCGTGCGGTTGGTAAAGACACCTTCACTTTGTCCTCTACGACCGTCAGCGCTGGGCCCTTCCCAAACTACAGTCATTTAAATAAACC
     ACNNSTATNNSAGGGCGTGCGGTTGGTAA  BLC_H7
        18/11   AGGGCGTGCGGTTGGTAAAGACACCTTCACTTT  BLC_H8

       TrpIleLeuSerArgThrProThrIleSerValGluValLysGlnGluMetLeuAlaValAlaThrArgGluGlyPheAspValSerLysPheIleTrp
          140            145        (Asp)            155            160            165            170
```

**Abbildung 17:** Sequenzschema der Blc-Zufallsbibliothek. Die relevante DNA-Sequenz des Bakteriellen Lipocalins (Blc) auf dem Vektor pBlc3 ist als Strang und Gegenstrang abgebildet. Die kodierte Aminosäuresequenz ist darunter kursiv dargestellt. Die Oligodesoxynukleotide für die konzertierte Mutagenese des Blc-Gens sind in Blau, die zu mutierenden Codons rot hervorgehoben. Flankierende *Primer* für die Assemblierung der Gen-Kassette und mit den *Bst*XI-Restriktionsschnittstellen (unterstrichen) sind orange dargestellt. Mutationen, die auf pBlc2 für die Konstruktion von pBlc3 eingeführt wurden, sind hellblau gekennzeichnet. Bei Mutationen, die zu Aminosäure-Substitutionen des Wildtyp-Proteins (Blc2) geführt haben, sind die entsprechenden Wildtyp-Aminosäuren in Klammern angegeben. Stille Mutationen im Oligodesoxynukleotid BLC_H6, die zur Einführung einer singulären, diagnostischen *Mlu*I-Schnittstelle geplant wurden, sind grün eingefärbt.

### 3.1.4 Optimierung enzymatischer Schritte zur Erzeugung der Plasmid-Bibliothek

Nachdem eine Strategie zur konzertierten Mutagenese und Assemblierung der Blc-Genkassette entworfen worden war, bestand die Aufgabe darin, die enzymatischen Reaktionsschritte, die schließlich zur rekombinanten Plasmid-Bibliothek führen sollten, zu optimieren.

Enzymatische Erzeugung der DNA-Genkassette

Für die Durchführung der Assemblierungs-PCR wurden die Oligodesoxynukleotide BLC_H2, BLC_H3, BLC_H4 sowie BLC_H5 als rohes Syntheseprodukt bezogen und zunächst durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese gereinigt (Abschnitt 2.2.4.3). Dadurch sollten vor allem verkürzte Nebenprodukte der Oligodesoxynukleotid-Synthese möglichst vollständig abgetrennt werden, da die Kopplungseffizienz der Phosphoramidite bei der Festphasensynthese bei nur 98-99 % liegt. Der Syntheseansatz für ein Oligodesoxynukleotid mit 60 Nukleotiden weist also rechnerisch etwa 40 % unvollständiger Nebenprodukte auf, was insbesondere bei der Konstruktion hochkomplexer DNA-Bibliotheken aufgrund der resultierenden Verschiebungen im Leserahmen inakzeptabel ist.

Um das erste randomisierte Fragment zu erzeugen (Fragment 1 in Abbildung 16), wurde eine PCR mit den vier jeweils paarweise überlappenden Oligodesoxynukleotiden BLC_H2, BLC_H3, BLC_H4 und BLC_H5 durchgeführt (Abschnitt 2.2.5.4). Bei dieser Art der Reaktion wird keine DNA-Matrize eingesetzt, sondern es kommt im Verlauf der frühen Amplifikationsphase durch sukzessive Kombination der unterschiedlichen Primerpaare bzw. der bereits entstandenen Zwischenprodukte zur allmählichen Assemblierung des vollständigen Fragmentes, welches in späteren Amplifikationsrunden hauptsächlich durch die flankierenden Primer vermehrt wird. Bei dieser Reaktion ist es absolut notwendig, die inneren Oligodesoxynukleotide (hier BLC_H3 und BLC_H4) in geringerer Konzentration als die flankierenden (BLC_H2 und BLC_H5) einzusetzen, weil es andernfalls zu einem uneinheitlichen Reaktionsprodukt kommt. Daher wurden die Primer BLC_H3 und BLC_H4 in zehnfach reduzierter Konzentration (50 nM) eingesetzt. Zusätzliche Experimente zeigten, dass noch geringere Konzentrationen zu einer Abnahme an PCR-Produkt führten und deswegen nicht vorteilhaft waren.

Da Versuche unter ansonsten standardisierten Reaktionsbedingungen und einer Hybridisierungstemperatur von 55 °C nur geringe Ausbeuten an Reaktionsprodukt brachten, wurde eine Gradienten-PCR über einen Temperaturbereich von 55-65 °C durchgeführt. Interessanterweise zeigte sich dabei, dass es nur bei einer Anlagerungstemperatur von etwa 57 °C zur

effizienten Assemblierung von Fragment 1 kam (Abbildung 18). Im Agarosegel äußerte sich dies durch eine dominante DNA-Bande bei ca. 200 bp, wobei bloß ein geringer Anteil unspezifischer (höhermolekularer) Reaktionsprodukte zu beobachten war.

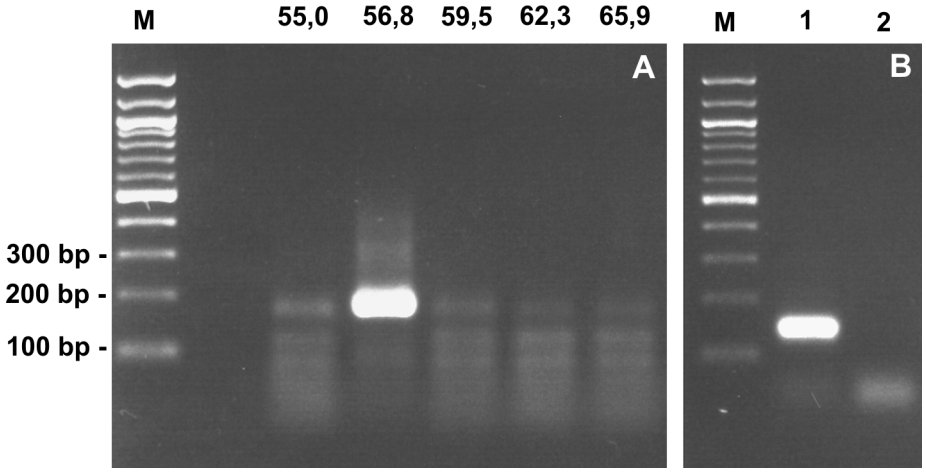



**Abbildung 18:** PCR zur Erzeugung randomisierter DNA-Fragmente des Blc. A: Gradienten-PCR mit den Primern BLC_H2 bis BLC_H5. Fünf identische PCR-Ansätze wurden bei Anlagerungstemperaturen von 55 bis 65 °C amplifiziert und identische Volumina im 1%igen Agarosegel analysiert. B: PCR mit den Primern BLC_H6 und BLC_H7 sowie pBlc3 als DNA-Matrize: (1) PCR-Reaktion; (2) Negativ-Kontrolle ohne Matrizen-DNA im Reaktionsansatz. Die Größen relevanter Banden des DNA-Größenstands (M) sind am linken Rand angegeben.

Zur Erzeugung von Fragment 2 wurde eine PCR mit den Oligodesoxynukleotiden BLC_H6 und BLC_H7 sowie Plasmid-DNA von pBlc3 als Matrize durchgeführt. Aufgrund der Länge der beiden Primer wurde eine relative hohe Anlagerungstemperatur von 65 °C gewählt. Mit diesen Reaktionsbedingungen wurde auf Anhieb ein brauchbares Ergebnis erzielt. Die Analyse des erhaltenen Reaktionsproduktes durch Agarose-Gelelektrophorese zeigte eine scharf definierte Bande bei der erwarteten Größe von etwa 150 bp.

Die so erzeugten Fragmente 1 und 2 wurden durch präparative Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Gelextraktion isoliert (Abschnitt 2.2.4.2) und zusammen mit den Primern BLC_H1 und BLC_H2 als Matrizen in einer weitern PCR eingesetzt (Abbildung 19). Die Konzentration der beiden Fragmente wurde dazu im Reaktionsansatz auf etwa 0,5 fM eingestellt. Reaktionen wurde bei unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen durchgeführt, wobei sich eine Tendenz erhöhter Reaktionsspezifität bei 65 °C zeigte. Bei dieser Temperatur wurde ein gut definiertes Hauptprodukt mit einer Größe von etwa 360 bp erhalten, das der vollständig randomisierten Blc-Genkassette entsprach und nur von einem geringen Anteil höhermolekularer Nebenprodukte begleitet wurde. Die Ausbeute eines 50 µL Reaktionsansatzes betrug dabei typischerweise etwa 5 µg ungereinigtes PCR-Produkt.

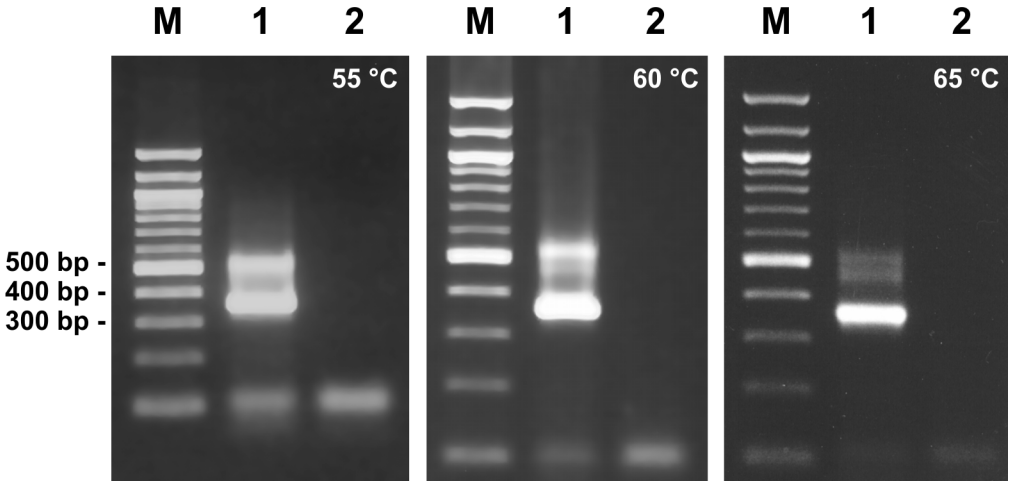



**Abbildung 19:** PCR zur Erzeugung einer an 16 Aminosäurepositionen randomisierten Blc-Genkassette. Für die Reaktion wurden die *Primer* BLC_H1 und BLC_H8 sowie die Blc-Fragmente 1 und 2 eingesetzt (siehe Abbildung 18). Die Reaktionen wurden bei unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen von 55, 60 und 65 °C durchgeführt und im 1%igen Agarosegel analysiert. Die Größen relevanter Banden des DNA-Größenstands (M) sind angegeben.

Restriktionsverdau mit *Bst*XI

Gängige Standardprotokolle sind für die Herstellung hochkomplexer DNA-Bibliotheken nur bedingt brauchbar, weil u. a. die enzymatische Effizienz kommerziell erhältlicher Restriktionsendonukleasen ungünstig definiert ist. So gibt einer der führenden Hersteller von Restriktionsendonukleasen folgende Definition für die Einheit (*Unit*) der enzymatischen Aktivität an: „*By definition, 1 unit of restriction enzyme will completely digest 1 µg of substrate DNA in a 50 µL reaction in 60 minutes*". Diese Definition ist für die exakte Planung von präparativen Reaktionsansätzen wenig geeignet, da in der Praxis die Molmasse – unter Berücksichtigung der Zahl der Schnittstellen – erheblich variieren kann. Wie bei jeder enzymatisch katalysierten Reaktion spielt zudem auch die Substratkonzentration für die Reaktionsgeschwindigkeit eine Rolle, und schließlich ist die Inaktivierungskinetik des Enzyms zu berücksichtigen.

Bei der Präparation von DNA-Fragmenten für die Blc-Bibliothek war es deswegen notwendig, die Reaktionsparameter für den Verdau mit dem Enzym *Bst*XI optimal einzustellen. Die Konzentration des Restriktionsenzyms wurde auf das notwendige Minimum reduziert, um möglichst ökonomisch zu arbeiten und unspezifische Spaltungsaktivität zu vermeiden. (Star Activity; Nasri & Thomas, 1986). Weiterhin galt es, die ausreichende Inkubationszeit für die Reaktion zu ermitteln und ein sinnvolles Reaktionsvolumen zu wählen, um anschließend

die Reinigung der Reaktionsprodukte durch Agarose-Gelelektrophorese zu gewährleisten (Abschnitt 2.2.4.2).

Im Verlauf wiederholter Reaktionen mit der Restriktionsendonuklease *Bst*XI stellte sich sich heraus, dass dieses Enzym eine erstaunlich hohe Aktivität aufweist. Weniger als 3 U dieses Enzyms reichen aus, um 1 µg Plasmid-DNA des Vektors pBlc9 (Abbildung 22, S. 110) in 10 µL Reaktionsvolumen bei 50 °C in 20 min vollständig zu verdauen. Ausgehend von diesem Befund wurde eine allgemeine Reaktionsvorschrift für Plasmid-DNA oder PCR-Fragmente von etwa 360 bp mit je zwei *Bst*XI-Schnittstellen entwickelt (Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Reaktionsbedingungen für den effizienten Verdau von DNA mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI.

| | **Enzym** | **DNA-Konzentration** | **Reaktionsvolumen** |
|---|---|---|---|
| Plasmid-DNA | 3 U / µg DNA | 0,1 µg/µl | ≥ 1 mL |
| PCR-Fragment | 5 U / µg DNA | 0,1 µg/µl | ≥ 0,5 mL |

Trotz der hohen Aktivität der Endonuklease ist diese allgemeine Vorschrift verhältnismäßig konservativ formuliert, damit auch in ungünstigen Fällen ein quantitativer Umsatz erzielt werden kann. Dabei ist zu beachten, dass *Bst*XI-Schnittstellen mit anderen Nukleotidsequenzen im Zentrum der Substratsequenz mitunter weniger effizient hydrolysiert werden. Als günstige DNA-Konzentration hat sich ein Wert von 0,1 µg/µl erwiesen, womit auch das Reaktionsvolumen festgelegt wird.

### 3.1.5 Optimierung der Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Ein entscheidender Schritt bei der Erzeugung einer genetischen Protein-Bibliothek besteht in der effizienten Transformation des Wirtsorganismus mit der erzeugten Plasmid-Bibliothek. Neben der Qualität der präparierten DNA (Abschnitt 3.1.4) und der Ligierung (Abschnitt 2.2.5.2) hat dieser Arbeitsschritt unmittelbaren Einfluss auf die praktisch erreichbare Komplexität der geplanten Bibliothek und entscheidet deswegen oftmals über den Erfolg des anschließenden Selektionsexperiments.

Die effizienteste derzeit zur Verfügung stehende Methode, um *E. coli* zu transformieren, ist die sogenannte Elektroporation (Dower *et al.*, 1988). Dabei wird eine Spension hoher Zelldichte mit Plasmid-DNA gemischt und anschließend einer kurzen Hochspannungsentladung ausgesetzt. Die tatsächlichen Mechanismen, die dabei zur Transformation der Bakterienzelle führen, sind bis heute unbekannt. Man vermutet aber, dass das starke elektrische Feld

kurzzeitig „Poren“ in der bakteriellen Zellwand erzeugt, durch welche DNA effizient in das Bakterium eindringen kann (Neumann & Rosenheck, 1972; Zimmermann *et al.*, 1974).

Typische Kenngröße eines Transformationsexperimentes ist im Allgemeinen die Transformationseffizienz, die als Anzahl transformierter Zellen pro Mikrogramm eingesetzter DNA angegeben wird. Je nach den experimentellen Umständen liegen die Werte zwischen $10^8$ bis $10^{10}$. Sie sind (meistens) ausgehend von einer Stichprobe extrapolierte Werte und können insofern irreführend sein, als sie keinerlei Information darüber enthalten, wie viel DNA für eine einzelne Transformation ursprünglich eingesetzt wurde. Prinzipiell ist es nämlich schon möglich, eine ähnlich hohe Transformationseffizienz wie bei der Elekroporation auch mit chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen zu erreichen (siehe z. B. Inoue *et al.*, 1990). Da allerdings keine dieser Methoden linear skaliert sondern grundsätzlich durch die Anzahl verfügbarer Bakterien limitiert ist, zeigt die Transformation von Bakterien typischerweise ein Sättigungsverhalten. Gerade deshalb ist die Elektroporation die Methode der Wahl, wenn es um die Herstellung großer Bibliotheken geht, weil dabei mit sehr hohen Zellzahlen und -dichten gearbeitet wird.

Obwohl grundsätzlich naheliegend, war eine weitere Erhöhung der Zelldichte im Elektroporationsansatz gegenüber der Vorschrift von Hengen (1996) nicht praktikabel, weil das dafür notwendige Kulturvolumen schnell eine nicht mehr handhabbare Größe erreicht und die steigende Viskosität der resultierenden Bakterien-Suspension ein sorgfältiges Resuspendieren erschwert oder unmöglich macht (Abschnitt 2.2.2.2). Insofern musste das Augenmerk auf die Verbesserung anderer experimenteller Parameter gerichtet werden. Es ist gängige Praxis, elektrokompetente *E. coli* Zellen nach ihrer Herstellung in flüssigem Stickstoff einzufrieren, um sie für die spätere Verwendung zu konservieren. Versuche im Rahmen dieser Arbeit zeigten allerdings, dass bei dieser Prozedur 20-50 % der Zellen abgetötet werden, was die erreichbare Diversität einer Bibliothek im schlimmsten Fall um die Hälfte reduziert. Es erschien daher angebracht, die Zellen direkt nach der Herstellung für die Transformation mit der Plasmid-Bibliothek einzusetzen. Tatsächlich konnten auf diese Weise und unter Beachtung der weiter unten gemachten Erfahrungen sehr gute Ergebnisse erzielt werden, so dass die Transformationseffizient in der Regel zwischen $1 \cdot 10^9$ und $5 \cdot 10^9$ cfu/µg Plasmid-DNA lag.

Technisch betrachtet handelt es sich bei der Elektroporation um die Entladung eines Kondensators mit der Kapazität $C$ und der Ladespannung $V_0$ über eine Probe, die in dem geschlossenen Stromkreis einen Wiederstand $R$ hat. Moderne Elekroporationsgeräte,

sogenannte MicroPulser, erlauben dabei die Einstellung der Kondensatorspannung und können mit Einweg-Küvetten unterschiedlicher Volumina bestückt werden, in denen sich die Probe zwischen zwei Aluminium-Elektroden mit einem festen Abstand befindet. Für die Spannung $V_t$, die dabei am Wiederstand $R$ der Probe abfällt gilt zu jedem Zeitpunkt $t$:

$$V_t = V_0 \cdot e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)} \tag{33}$$

mit

$$\tau = R \cdot C \tag{34}$$

Aus Gleichung (33) wird ersichtlich, dass τ eine Zeitkonstante darstellt, die angibt, in welcher Zeit die Spannung $V_0$ auf den Wert 1/e (ca. 37 %) abgesunken ist. τ ist damit ein geeigneter Kennwert, um die Pulslänge eeiner Elektroporation zu beschreiben und wird deswegen von vielen käuflichen MicoPulsern gemessen und angezeigt. Über diesen Wert kann direkt ein Rückschluss auf die Leitfähigkeit (1/R) der Probe und damit über deren Qualität gemacht werden. In Verlauf zahlreicher durchgeführter Elektroporationen hat sich ergeben, dass bei den üblichen Ansätzen (Abschnitt 2.2.2.2) ein Wert unter 5 ms i. d. R. mit niedriger Transformationseffizienz einhergeht und offenbar mit einer erhöhten Leitfähigkeit der Zell/DNA-Suspension zusammenhängt. Die Qualität eines Elektroporationsansatzes wird demnach wesentlich von der Leitfähigkeit seiner Komponenten bestimmt. Es galt also, die Bakterien-Suspension und die wässrige Lösung mit der ligierten Plasmid-DNA in Hinblick auf ihre Leitfähigkeit zu optimieren. Auf der Grundlage dieser Überlegungen wurden zwei wesentliche Änderungen im gängigen Standardprotokoll (Tung & Chow, 1995; Hengen, 1996) vorgenommen.

1. Die Zellen wurden nicht wie sonst üblich, in 1 % Glycerin gewaschen und schließlich in einem geringen Volumen der gleichen Lösung suspendiert, sondern für diese Schritte wurde reines, doppelt destilliertes Wasser verwendet. Glycerin dient in den klassischen Protokollen ausschließlich dem Schutz der Zellen während des Einfrierens (Farrant, 1980) und verhindert vor allem intrazelluläre Eiskristallbildung. Da das Einfrieren der Zellen vermieden wurde (siehe oben), erschien der Zusatz von Glycerin nicht erforderlich.

2. In bestimmten Fällen wurde die Lösung der zu transformierenden Plasmid-DNA vor der Transformation auf Dialysemembranen ausgiebig gegen *dd*$H_2$0 dialysiert (Abschnitt 2.2.2.2). Diese Vorgehensweise wurde durch die Beobachtung angeregt, dass die

DNA-Lösungen oft eine unerwünscht hohe Leitfähigkeit haben. Dies ist vermutlich auf Verunreinigungen mit $NH_4$-Acetat zurückzuführen, welches in hoher Konzentration für die DNA-Fällung aus Ligierungsansätzen verwendet wird (vgl. Abschnitt 2.2.5.2), und offenbar nicht immer vollständig entfernt werden kann.

Insbesondere die erste Maßnahme führte mit dem *E. coli* Stamm XL1-Blue (Bullock *et al.*, 1987) zu ausgezeichneten Ergebnissen und wurde deshalb für die Herstellung der Blc-Bibliothek angewendet (siehe Abschnitt 3.1.8). Offenbar wird der osmotische Stress, der von reinem Wasser ausgeht, von den Zellen zumindest für den relativ kurzen Zeitraum der Vorbereitung und Elektroporation gut toleriert. Dies gilt aber nicht für alle *E. coli* Stämme. Insbesondere bei den Stämmen R875, R879 und X82 führte diese Vorgehensweise zu einer teilweisen Lyse der Zellen, was bei der Elektroporation zu einem Kurzschluss führte. Die Anwendbarkeit der beschriebenen Methodik musste also im Einzelfall durch Vorexperimente geprüft werden.

### 3.1.6 Konstruktion eines Expressionsvektors für *In-Vivo*-Selektionsexperimente

Eine frisch transformierte DNA-Bibliothek weisst nach einer Regenerationsphase der *E. coli* Zellen bei 37 °C (siehe Abschnitt 2.2.2.2) vermutlich die höchste praktisch nutzbare Diversität auf. Diese Phase benötigen Zellen in der Regel, um nach der Transformation ihren Stoffwechsel in Gang zu bringen und die durch das Plasmid vermittelte Antibiotika-Resistenz zu exprimieren (Sambrook & Russell, 2001). Während dieses Zeitraums von typischerweise 45-60 min findet in der Regel noch keine Zellteilung statt und die Diversität der transfizierten DNA-Bibliothek bleibt auf der Ebene einzelner Zellen voll erhalten. Im Verlauf einer anschließenden Wachstumsphase, z. B. um die Plasmid-DNA zu amplifizieren, kommt es allerdings zu Selektionsvorteilen einzelner Varianten. Damit wird zwar nicht unbedingt die Diversität reduziert, wohl aber die Zusammensetzung der Bibliothek verzerrt. Dieser Effekt ist bei der wiederholten Vermehrung bzw. Vitalisierung einer solchen Zellbibliothek zu beachten.

Meist ist es notwendig, eine solche frisch erzeugte Bibliothek in Form von Plasmid-DNA zu konservieren, um später geeignete *E. coli* Stämme für *In-Vivo*-Selektionsexperimente nach Bedarf transformieren zu können. Aus statistischen Gründen ist es bei einer hohen Diversität der Primärbibliothek allerdings experimentell sehr aufwendig, wenn nicht sogar unmöglich, diese Diversität vollständig zu bewahren. Für ein Folgeexperiment müssten z. B. etwa $24 \cdot 10^9$ Transformationsereignisse erzielt werden, um mit 95 % Wahrscheinlichkeit eine Primärkomplexität von $1 \cdot 10^9$ Varianten zu erhalten (Schreiber, 1988).

Aus den genannten Gründen wurde schon mit der frisch hergestellten Blc-Bibliothek ein erstes Selektionsexperiment angestrebt. Dazu sollte eine Lipocalinvariante auf Hydrolyse des Antibiotikums Ampicillin selektiert werden. Diese Strategie bot sich an, weil *E. coli* XL1-Blue für dieses Selektionsexperiment geeignet ist und aufgrund seiner ausgezeichneten Transformierbarkeit auch für die Erzeugung der initialen Bibliothek eingesetzt werden sollte.

Allerdings war der Vektor pBlc3 für dieses Experiment nicht brauchbar, da er u. a. die β-Lactamase als Ampicillin-Resistenzmarker trägt. Deswegen sollte das β-Lactamase-Gen gegen die Chloramphenicol-Resistenz ausgetauscht werden. Um dies zu bewerkstelligen, wurde pBlc3 mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Hin*dIII verdaut und das isolierte 592 bp-Fragment (blc-Gen) auf dem Vektor pApoD5 kloniert, der mit denselben Enzymen geschnitten worden war (Abbildung 20). Der so erhaltene Vektor pBlc7 war somit im Wesentlichen identisch mit pBlc3, kodierte aber für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (cat).

Mit diesem Vektor wurde Blc testhalber im 2 L-Maßstab produziert. Auch hier erfolgte die Sekretion in das Periplasma von *E. coli* JM83, wie unter Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Die periplasmatische Proteinfraktion wurde durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt (Abschnitt 2.3.4.2). Mit etwa 4 mg lag die Ausbeute an gereinigtem Lipocalin sogar höher als unter Einsatz der Vektoren pBlc2 und pBlc3 (vgl. Abschnitt 3.1.2). Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigte zudem eine hohe Reinheit des rekombinanten Proteins.

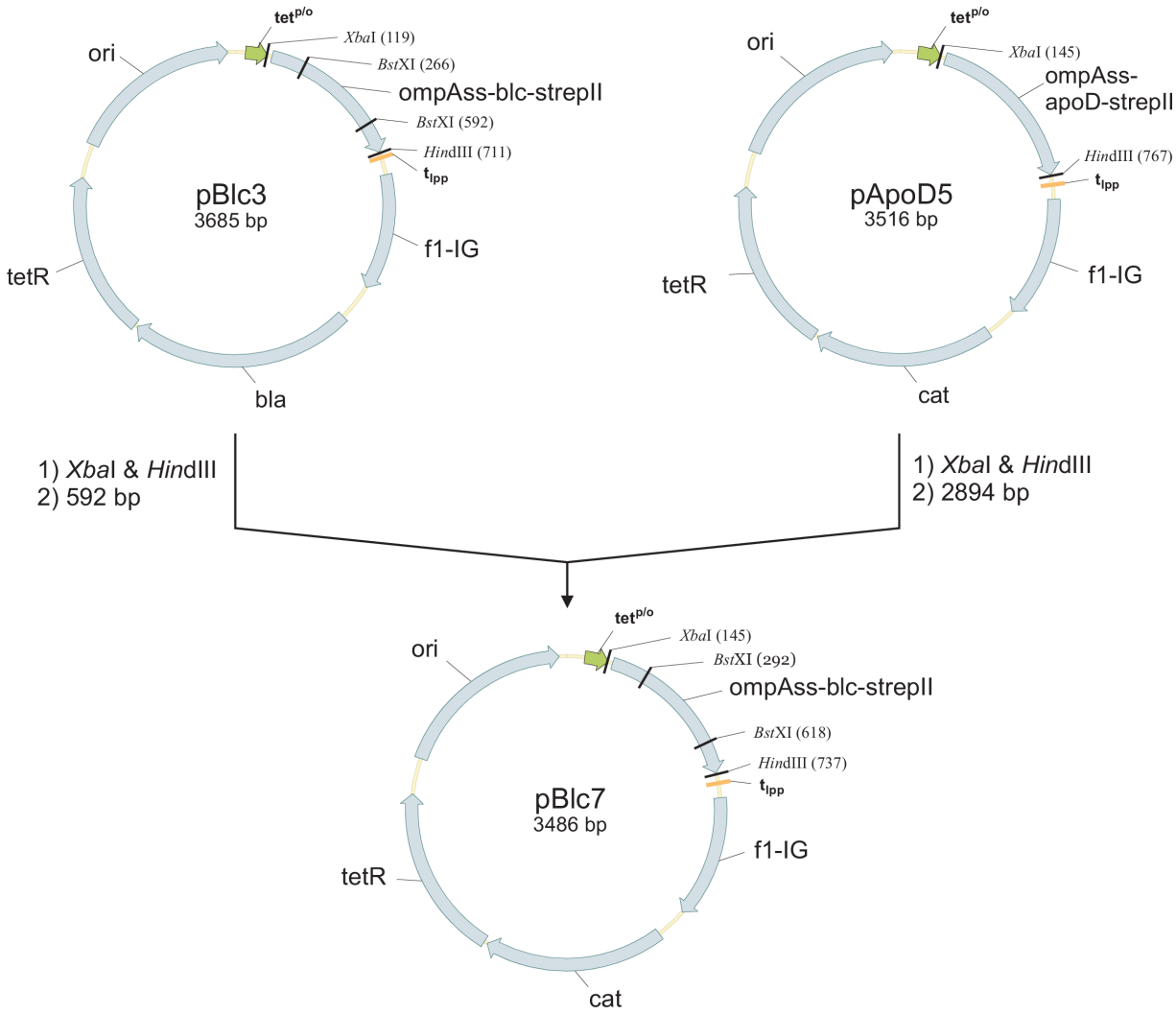



**Abbildung 20:** Konstruktionsschema für den Expressionsvektor pBlc7. Ausgangspunkt waren die Plasmide pBlc3 und pApoD5. Bei beiden Vekoren ist das Strukturgen eines Lipocalins, Blc#3 bzw. ApoD, N-terminal mit der OmpA-Signalsequenz (ompAss) und C-terminal mit dem *Strep*-tag II (strepII) fusioniert. Die Transkription dieser Gene wird durch den Tetracyclin-Promotor/Operator ($tet^{p/o}$) reguliert. Weiterhin tragen beide Vekoren die intergene Region des filamentösen Phagen f1 (f1-IG), einen Resistenzmarker bla bzw. cat (siehe unten), das Tet-Repressorgen (tetR) sowie den ColEI-Replikationsursprung (ori). Durch Rekombination der isolierten *Xba*I/*Hin*dIII-Fragmente wurde im Wesentlichen das β-Lactamase-Resistenzgen (bla) auf pBlc3 gegen die Chloramphenicol-Acetyltransferase (cat) ausgetauscht.

### 3.1.7 Verbesserung des Expressionssystems in Hinblick auf verringerte Cytotoxizität

Prinzipiell erfüllte der Vektor pBlc7 alle Anforderungen, die im Vorfeld für *In-Vivo*-Selektionsexperimente gestellt worden waren. Er war für die periplasmatische Produktion des Blc#3 ausgelegt, dessen DNA-Sequenz eine gezielt eingeführte *Bst*XI-Kassette zur effizienten Klonierung der Blc-Zufallsbibliothek trug. Auch auf diesem Vektor steht das Blc#3-Gen unter der Transkriptionskontrolle des Tet-Promotor/Operator-Systems (Skerra, 1994b). Als

Resistenzmarker trägt dieser Vektor die Chloramphenicol-Acetyltransferase (cat) und war somit für ein erstes Selektionsexperiment mit Ampicillin als Substrat einsatzbereit.

Um günstige Selektionsbedingungen zu finden, wurden verschiedene Wachstumsversuche durchgeführt. Dazu wurde *E. coli* XL1-Blue mit pBlc7 transformiert und auf LB/Cam-Agarplatten kultiviert, die zur Induktion der Genexpression Anhydrotetracyclin (aTc) in unterschiedlichen Konzentrationen enthielten (Abbildung 21). Nach Inkubation für etwa 16 h bei 37 °C wurde beobachtet, dass bei einer aTc-Konzentration von 200 µg/L das Zellwachstum fast vollständig unterdrückt wurde. Die Reduzierung der Konzentration auf 25 µg/L verbesserte zwar das Wachstum der Zellen, die Anzahl an Kolonien war auf diesem Medium aber dennoch um etwa 90 % gegenüber aTc-freiem Medium reduziert. Dieses Resultat ließ sich auch durch eine Reduzierung der Inkubationstemperatur auf 30 °C nicht wesentlich verbessern.

Diese Beobachtung ließ den Schluss zu, dass hauptsächlich die antibiotische Eigenschaft des aTc – trotz der vergleichsweise geringen Dosierung – Ursache für die stark reduzierte Vitalität der Bakterienzellen war. Eine Toxizität durch Überexpression des Blc#3 war hingegen weniger wahrscheinlich, da bei dessen präparativen Produktion in *E. coli* keine Anzeichen einer reduzierten Vitalität oder gar einer Toxizität beobachtet werden konnten (vgl. Abschnitt 3.1.2). Auch eine niedrigere Inkubationstemperatur verbesserte die Situation nicht (siehe oben).

Es war deshalb zu befürchten, dass die Verwendung des auch antibiotisch wirksamen Induktors aTc (Oliva *et al.*, 1992) unter ungünstigeren Wachstumsbedingungen, z. B. bei der Verwendung von Minimalmedium im Rahmen von Selektionsexperimenten, das Zellwachstum noch weiter reduziert. Aus diesem Grund erschien es notwendig, den Tetracyclin-Promotor durch ein alternatives System zu ersetzen, das durch eine physiologisch mehr inerte Substanz induziert werden kann. In dieser Hinsicht bot sich das Lactose (lac)-Promotor/Operator-System an (Jacob & Monod, 1961), da der gängige Induktor Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) auch bei relativ hohen Konzentrationen von über 1 mM keinen negativen Einfluss auf das Zellwachstum hat und von den Zellen auch nicht metabolisiert wird.

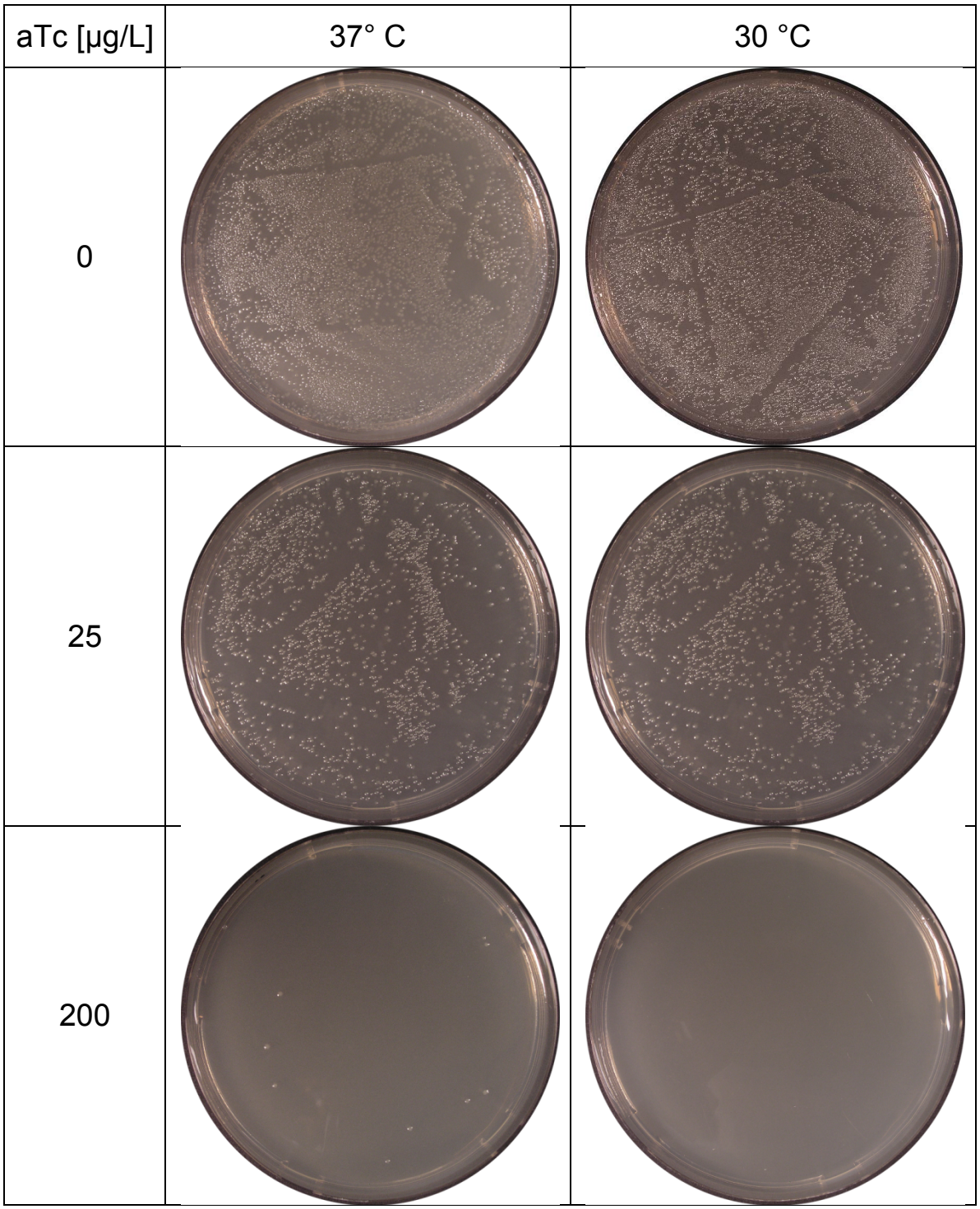



**Abbildung 21:** Wachstum transformierter *E. coli* XL1-Blue auf LB-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an Anhydrotetracyclin (aTc). Chemisch kompetente Zellen wurden mit pBlc7 transformiert und gleiche Volumina des Transformationsansatzes auf LB/Cam-Agarplatten mit den angegebenen Konzentrationen an aTc als Induktor ausplattiert. Die Platten wurden anschließend für etwa 16 h bei 37 °C bzw. 30 °C kultiviert.

Um den Expressionsvektor pBlc7 entsprechend zu modifizieren, wurde eine mehrstufige Strategie verfolgt (Abbildung 22). Zunächst wurde das generische Expressionsplasmid

pASK40 (Skerra, 1989) mit den Restriktionsenzymen *Pag*I und *Xba*I geschnitten und das DNA-Fragment isoliert, welches neben dem ColEI-Replikationsursprung für den lac-Repressor (lacI) sowie die lac-Promotor/Operator-Region kodiert. Analog wurde pBlc7 mit diesen Enzymen verdaut und das DNA-Fragment isoliert, welches das blc-Gen einschließlich der OmpA-Signalsequenz, die intergene Region des Phagen f1 (f1-IG), die Chloramphenicol-Resistenz (cat) sowie den tet-Repressor (tetR) umfasst. Die Ligierung dieser beiden Fragmente führte zu dem Zwischenkonstrukt pBlc8. Wie sich herausstellte, trägt das lacI-Gen drei *Bst*XI-Restriktionsschnittstellen, die mit der Klonierungsstrategie zur Erzeugung der Blc-Bibliothek in Konflikt standen (vgl. Abschnitt 3.1.2) und deswegen durch Einführung stiller Mutationen eliminiert werden mussten. Dazu wurde pBlc8 einer Kunkel-Mutagenese (Abschnitt 2.2.6) mit den Oligodesoxynukleotiden BLC_K7, BLC_K8, und BLC_K9 unterworfen. Die erfolgreiche Mutagenese konnte durch einen Restriktionsverdau mit *Bst*XI bestätigt werden, und der erhaltene Vektor bekam die Bezeichnung pBlc9.

Um das Wachstumsverhalten von *E. coli* XL1-Blue mit diesem neuen Vektor zu untersuchen, wurden die Zellen mit pBlc9 transformiert und vergleichbare Wachstumsversuche wie mit pBlc7 durchgeführt (Abbildung 23). Dazu wurden die Zellen auf LB/Cam-Agarplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen des Induktors IPTG ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Es zeigte sich, dass es mit dem neuen Vektor unter induzierten Bedingungen zu keiner signifikanten Reduzierung der Zellanzahl kam. Allerdings wurde beobachtet, dass mit zunehmender IPTG-Konzentration ein verlangsamtes Zellwachstum einherging, was sich hauptsächlich durch kleinere Kolonien bei identischen Inkubationszeiten äußerte. Diese Beobachtung wurde auch bei Wachstumsversuchen mit reduzierter Inkubationstemperatur (30 °C) sowie mit anderen *E. coli* Stämmen (DH5α, TG1/$F^-$) gemacht. Einige Stämme, wie z. B. R875, zeigten bei 37 °C nur äußerst geringe Wachstumsaktivität, so dass es insgesamt vorteilhaft erschien, Selektionsexperimente grundsätzlich bei einer niedrigeren Temperatur von 30 °C durchzuführen. Vermutlich wirkt die stark erhöhte Überexpression des Blc#3 negativ auf das Zellwachstum. Allerdings kam es bei diesen Versuchen nicht zu grundlegenden Toxizitätseffekten im Sinne reduzierter Zellzahlen, wie mit pBlc7 beobachtet wurde. pBlc9 erschien somit für die geplanten *In-Vivo*-Selektionsexperimente bestens geeignet.

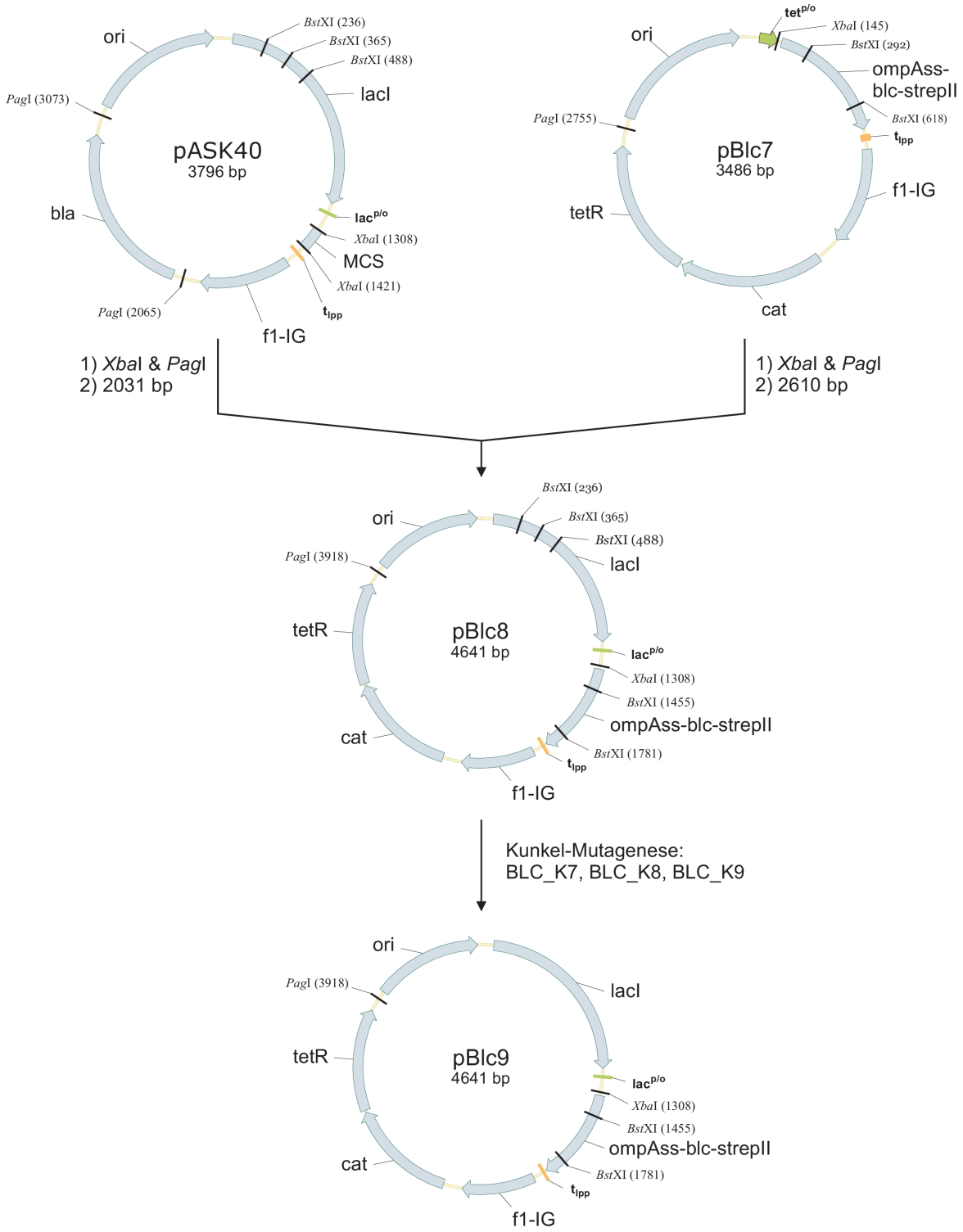



**Abbildung 22:** Klonierungsschema für den Expressionsvektor pBlc9. Genetische Elemente: MCS, *Multiple Cloning Site*; $lac^{p/o}$, Lactose-Promotor/Operator; lacI, Lactose-Repressorgen; bla, β-Lactamase Resistenzgen; cat, Chloramphenicol-Acetyltransferase-Resistenzgen; f1-IG, intergene Region des Phagen f1; ori, ColEI-Replikationsursprung. Durch Ligierung der isolierten *Xba*I/*Pag*I-Restriktionsfragmente von pASK40 und pBlc7 wurde im Wesentlichen $tet^{p/o}$ gegen $lac^{p/o}$ und dessen Repressor lacI ausgetauscht (pBlc8). Durch ortsgerichtete Mutagenese mit den Oligodesoxynukleotiden BLC_K7, BLC_K8 und BLC_K9 wurden anschließend die *Bst*XI-Schnittstellen im lacI-Gen auf pBlc8 entfernt.

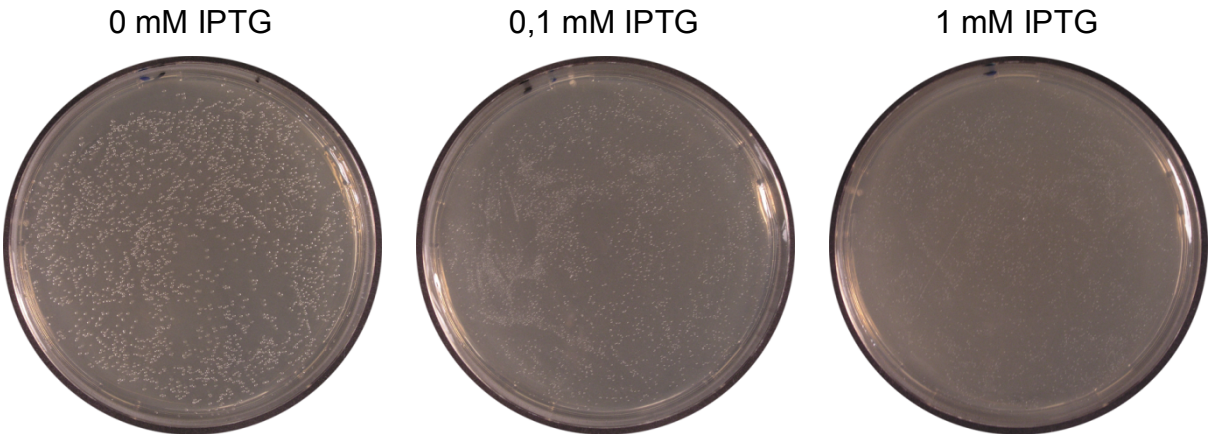



**Abbildung 23:** Wachstum transformierter *E. coli* XL1-Blue-Zellen auf LB-Medium mit unterschiedlicher Konzentration an IPTG. Chemisch kompetente Zellen wurden mit pBlc9 transformiert und gleiche Volumina auf LB/Cam-Agarplatten mit den angegebenen Konzentrationen an IPTG als Induktor ausplattiert und über Nacht (ca. 16 h) bei 37 °C inkubiert.

### 3.1.8 Herstellung der Expressionsbibliothek für Blc-Varianten

Für die Herstellung einer Lipocalin-Zufallsbibliothek auf der Basis des Bakteriellen Lipocalins aus *E. coli* (Blc) wurden 70 µg Plasmid-DNA des Vektors pBlc9 (Abbildung 22) und etwa 48 µg randomisiertes PCR-Produkt (siehe Abschnitt 3.1.4) mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI entsprechend den Angaben in Abschnitt 3.1.4 verdaut. Nach Isolierung der erwünschten Fragmente (Abschnitt 2.2.4.4) wurden 48 µg des Vektorfragmentes und 5 µg des Blc-Fragmentes erhalten. Die anschließende Ligierungsreaktion wurde mit 45 µg Vektorfragment und 5 µg Blc-Fragment – entsprechend einem etwa äquimolarem Verhältnis der beiden Fragmente – für 48 h bei 22 °C durchgeführt. Nach Ethanol-Fällung wurden frisch hergestellte elektrokompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen (Abschnitt 3.1.5) in insgesamt 18 Ansätzen transformiert.

Um eine ausreichende Zellzahl für erste Selektionsexperimente wie auch die Konservierung der Bibliothek als Plasmid-DNA zu vermehren, wurde der Transformationsansatz nach einer einstündigen Inkubationsphase bei 37 °C, in 2 L LB/Cam-Medium (inkl. 1 % Glucose) überführt und über Nacht bei 37 °C, 180 UPM inkubiert. Die Diversität der erhaltenen Bibliothek wurde abgeschätzt, indem 1 h nach der Transformation Verdünnungsreihen auf LB/Cam-Agar-Platten in dreifacher Ausführung ausplattiert wurden. Die Auszählung der angewachsenen Kolonien führte zu einer kalkulatorischen Diversität von $3{,}5 \pm 1{,}4 \cdot 10^{10}$.

Die erhaltene Plasmid-DNA wurde unter Verwendung der beiden Primer FS-18 und GB-8 als Pool/Mischung sequenziert, um den Erfolg der Randomisierung zu überprüfen. Die erhaltenen

Elektropherogramme waren mit der Sequenz des Blc#3 identisch und zeigten an den randomisierten Positionen eine deutliche, wenn auch quantitativ unterschiedlich starke Überlagerung der Signalspuren für die eingesetzte Mischung der vier Nukleotide (Abbildung 24). Es war auffällig, dass an einigen randomisieren Stellen die Signale für bestimmte Nukleotide völlig fehlten. Das betraf z. B. die Positionen 1520 und 1521 an denen offenbar fast auschließlich die Nukleotide Adenin und Cytidin in die DNA eingebaut worden waren, anstatt den gleichmäßigen Einbau aller vier Nukleotide zu erreichen. Das deutete bereits auf eine statistisch ungleichmäßige Verteilung der prinzipiell möglichen Aminosäuren an den betroffenen Codons hin.

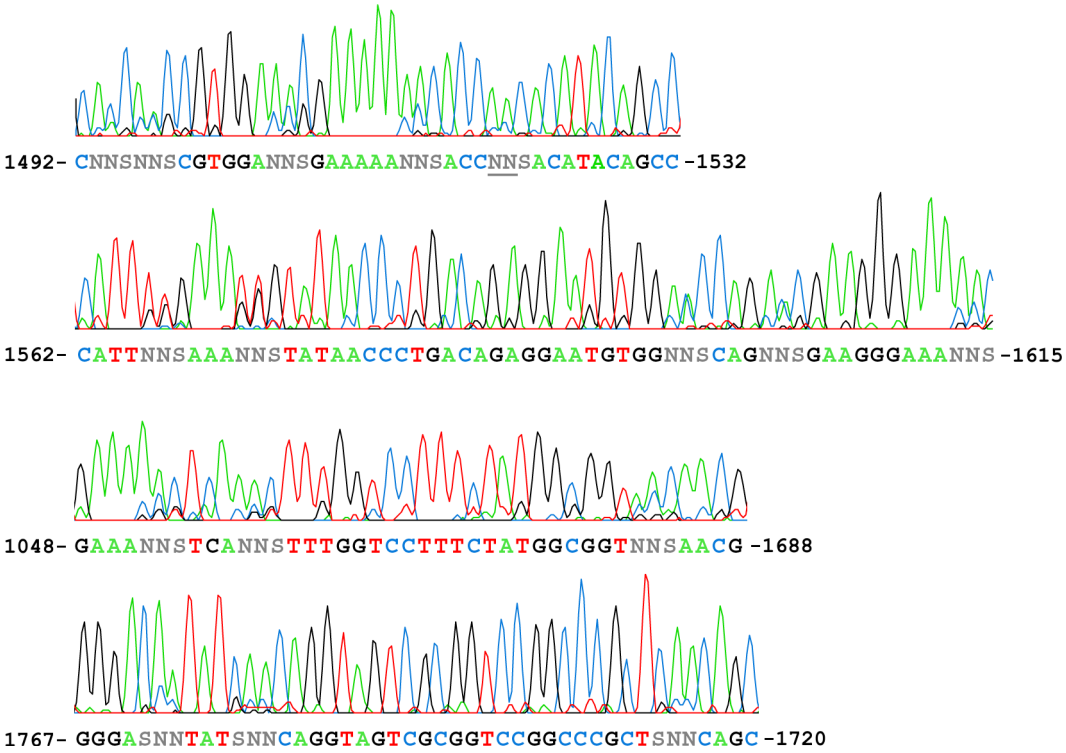



**Abbildung 24:** Sequenzier-Elektropherogramm der Blc-Plasmidbibliothek mit abgeleiteter DNA-Sequenz. Die vier dargestellten Sequenzabschnitte umfassen alle 16 randomisierten Positionen. Das erste und letzte Nukleotid ist jeweils entsprechend der Zählweise für den Vektor pBlc9 nummeriert. Die Zufallscodons sind in grau dargestellt. Die unterste Spur (Basen 1767-1720) resultiert aus der Sequenzierung des nicht-kodierenden Stranges und ist deswegen in absteigender Zählweise angegeben. Die Sequenzpositionen 1520 und 1521 sind unterschrichen (siehe Text).

Um die Qualität der erzeugten Blc-Bibliothek besser beurteilen zu können, wurde von zehn zufällig ausgewählten Kolonien Plasmid-DNA präpariert und in je zwei getrennten Ansätzen mit den Restriktionsenzymen *Bst*XI und *Mlu*I verdaut. Das Restriktionsmuster aller zehn Klone bestätigte die Anwesenheit der randomisierten Blc Gen-Kassette (*Bst*XI). Zusätzlich

wurden alle zehn Klone unter Verwendung der *Primer* FS-18 und GB-8 individuell sequenziert (Abschnitt 2.2.7). Das Sequenz-*Alignment* dieser Klone ist in Abbildung 25 dargestellt. Es zeigt, dass acht Klone einen durchgehenden Leserahmen aufweisen und daher als funktionelle Varianten betrachtet werden konnten. Zwei Klone tragen eine *Frameshift*-Muation wodurch ihr offener Leserahmen frühzeitig durch ein Stop-Codon beendet wird. Klon 4 zeigt an späterer Stelle in der Blc-Genkassette eine einfache Insertion. Zudem enthalten die Sequenzen insgesamt sieben zufällig aufgetretene Mutationen außerhalb der randomisierten Positionen, von denen vier zu einem Aminosäureaustausch führten.

```
                    300                                       350                                       400
                     .                                         .                                         .
Blc  GCCCGTTTTGATCACCGCTTTGAACGTGGACTGGAAAAAGTCACCGCAACATACAGCCTGCGTGATGACGGCGGCCTGAATGTCATTAATAAAGGCTATAACCCTGACAGAGGAATGTGGCAGCAGAGTGAAGGGAAAGCGTAC
     AlaArgPheAspHisArgPheGluArgGlyLeuGluLysValThrAlaThrTyrSerLeuArgAspAspGlyGlyLeuAsnValIleAsnLysGlyTyrAsnProAspArgGlyMetTrpGlnGlnSerGluGlyLysAlaTyr

1    ..................AACACG......AAG......GCC...ACG.....................................TTC...GTG.......................AAC...AAC.........CCC...
     ..................AsnThr......Lys......Ala...Thr.....................................Phe...Val.......................Asn...Asn.........Pro...
2    ..................ACCAAC......AAC......ATC...AAC.....................................GTG...TTG.......................CAC...AAC.........AAG...
     ..................ThrAsn......Lys......Ile...Asn.....................................Val...Leu.......................His...Asn.........Lys...
3    ..................AACAAC......AAC......AAC...GAC.....................................TGG...TTG.......................CAG...AAG.........CAC...
     ..................AsnAsn......Asn......Asn...Asp.....................................Trp...Leu.......................Gln...Lys.........His...
4    ......TT-GATCACCGCAACTAC......AAG......AAG...CAG.....................................GTG...TTG.......................ACC...AAC.......T..AAC...
     ......Le-uIleThrAlaThrThrValGluArgLysLysArgProArgHisThrAlaCysValMetThrAlaAlaEnd
5    ............-ACCGCACCCAC......AAC......AAC...AAC.....................................CTG...TGG.......................CAG...AAC.G.......CGG...
     ............-ThrAlaProThrValGluThrLysLysThrProThrHisThrAlaCysValMetThrAlaAlaEnd
6    ..T...............CGCAAC......ACC......AAC...AAC.....................................TTG...TTG.......................AGG...AAC.........AAC...
     ..................ArgAsn......Thr......Asn...Asn.....................................Leu...Leu.......................Arg...Asn.........Asn...
7    ..................ACCACC......AAC......CAC...CAC.....................................GTG...TTG.......................ACG...AAC.........AAC...
     ..................ThrThr......Asn......His...His.....................................Val...Leu.......................Thr...Asn.........Asn...
8    ..................ACCAAC......AGC......AGC...AAG.....................................GTG...TTG.......................AAC...AAC.........AAC...
     ..................ThrThr......Ser......Ser...Lys.....................................Leu...Ala.......................Ala...Asn.........Glu...
9    ..................AACAAG......ACC......GCC...AAC.....................................GTG...TTG.............C.........AAC...AAC.........AAC...
     ..................AsnLys......Thr......Ala...Asn.....................................Val...Leu............Thr.........Asn...Asn.........Asn...
10   ..................CCCAAG......AAG......AAC...AAC.....................................TTC...CGG.......................ACG...ATG.........AAG...
     ..................ProLys......Lys......Asn...Asn.....................................Phe...Arg.......................Thr...Met.........Lys...

                         450                                       500                                       550
                          .                                         .                                         .
Blc  TTTACCGGCGCACCAACTCGCGCTGCGCTGAAAGTGTCATTCTTTGGTCCTTTCTATGGCGGTTATAACGTTATTGCACTCGATCGGGAATACCGCCATGCGCTGGTTAGCGGGCCGGACCGCGACTACCTGTGGATACTCTCC
     PheThrGlyAlaProThrArgAlaAlaLeuLysValSerPhePheGlyProPheTyrGlyGlyTyrAsnValIleAlaLeuAspArgGluTyrArgHisAlaLeuValSerGlyProAspArgAspTyrLeuTrpIleLeuSer

1    ...............ACGCGT............CAC...GCG.....................AAC.....................................GGG.......................GCG...TCG...
     ................................His...Ala.....................Asn.....................................Gly.......................Ala...Ser...
2    ...............ACGCGT............ACC...AAC.....................CAC.....................................GTG.............A.........TTG...TTG...
     ................................Thr...Asn.....................His.....................................Val............His.........Leu...Leu...
3    ...............ACGCGT............AAC...AAC.....................GAC.....................................TTG.......................CCG...TTG...
     ................................Asn...Asn.....................Asp.....................................Val.......................Pro...Leu...
4    ...............ACGCGT............TGC...AGC.....................TAA.....................................GTG.......................GGT...ATT...

5    ...............ACGCGT............ACC...AAG.....................AAC.....................................GGT .......................TGG...GCG...

6    ...............ACGCGT............CGC...AAC.....................AAC.....................................GGG.......................CTG...GGG...
     ................................Arg...Asn.....................Asn.....................................Gly.......................Leu...Gly...
7    ...............ACGCGT............CAG...AGC.....................AAG.....................................TTG.......................TCG...GTC...
     ................................Gln...Ser.....................Lys.....................................Leu.......................Ser...Val...
8    ...............ACGCGT............CCC...AAC.....................CAC.....................................TTG..........G............CTG...GTG...
     ................................Pro...Asn.....................His.....................................Leu.........Gly............Leu...Val...
9    ...............ACGCGT............GGC...AAC.....................ACG.....................................GTG.................C....TTG...TTG...
     ................................Gly...Asn.....................Thr.....................................Val................Ser...Leu...Leu...
10   ...............ACGCGT............CCG...AAG.....................AAC.....................................TGG.......................ATG...TTG...
     ................................Pro...Lys.....................Asn.....................................Trp.......................Met...Leu...
```

**Abbildung 25:** Sequenz-*Alignment* von zehn Klonen (1-10) der Blc-Zufallsbibliothek. Dargestellt ist der relevante Bereich der Wildtyp DNA-Sequenz mit abgeleiteter Aminosäure-Sequenz darunter (kursiv). Randomisierte Codons sind in Rot dargestellt. Punkte symbolisieren Sequenzidentität, Deletionen sind mit einem waagerechen Strich gekennzeichnet. Die Insertion bei Klon 4 ist invers dargestellt. Punktmutatio-

Bei der statistischen Auswertung der erzielten Mutationen wurde unterschieden, ob die eingesetzten degenerierten Oligodesoxynukleotide den kodierenden bzw. den nicht-kodierenden Strang repräsentierten (vgl. Abbildung 16, S. 95). Dabei zeigte sich, dass an den N-Positionen die Nukleotide A und C im kodierenden bzw. T und G im Gegenstrang mit mehr als 80 % stark überrepräsentiert waren (Abbildung 26). Ein vergleichbares statistisches Ungleichgewicht konnte auch an den S-Positionen festgestellt werden. Hier dominierten die Nukleotide C (kodierender Strang) und G (nicht-kodierender Strang) mit 75 % bzw. 88 %. Diese unausgewogene Verteilung der Nukleotide an den randomisierten Positionen ist höchstwahrscheinlich direkt auf die eingesetzten Oligodesoxynukleotide zurückzuführen und möglicherweise ein Resultat ungünstiger Reaktionsbedingungen bei der Synthese der Oligodesoxynukleotide (siehe Abschnitt 4.1.1).

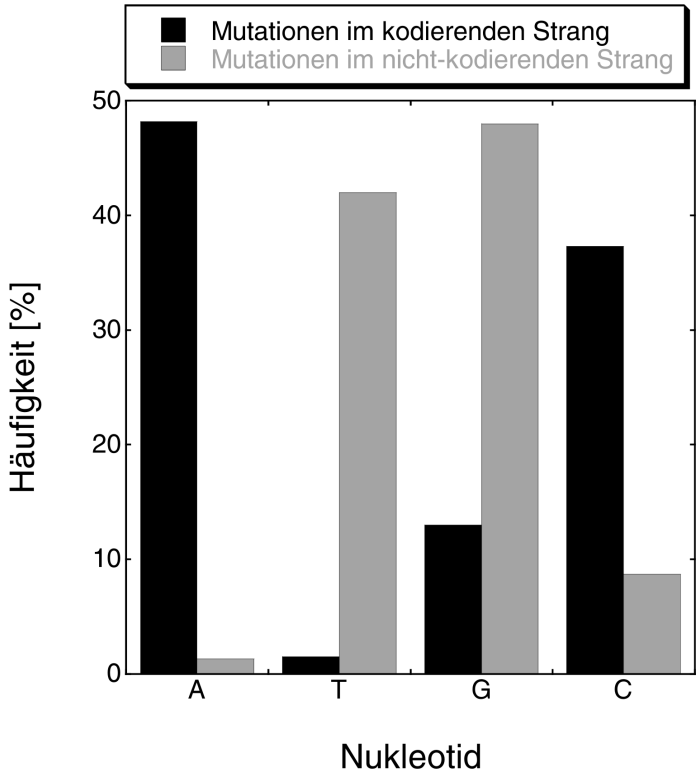



**Abbildung 26:** Statistische Auswertung der Nukleotid-Substitutionen an den 32 N-Positionen der Blc-Bibliothek, angegeben als relative Häufigkeit der vier Nukleotide. Die Daten wurden aus der Sequenzierung von 10 zufällig ausgewählten Klonen extrahiert. Bei der Auswertung wurde unterschieden, ob die Primärmutation im kodierenden (schwarze Balken) oder nicht-kodierenden (graue Balken) Strang eingeführt wurde.

Erwartungsgemäß führte diese ungleichmäßige Verteilung der Nukleotide auch zu einer Verzerrung auf Aminosäureebene (Abbildung 27). So zeigte die Auswertung der abgeleiteteten Aminosäuresubstitutionen an den 16 randomiserten Positionen eine überdurchschnittliche

Häufigkeit für die Aminosäuren Asn, Lys und Thr bzw. Leu, Trp und Val, abhängig davon, ob die Primärmutation im kodierenden oder nicht-kodierenden Strang synthetisch eingeführt wurde, Die Statistik wurde dabei eindeutig von den Aminosäuren Asn, Leu, Thr und Trp dominiert, wohingegen die Aminosäuren Asp und Glu unterrepräsentiert waren.

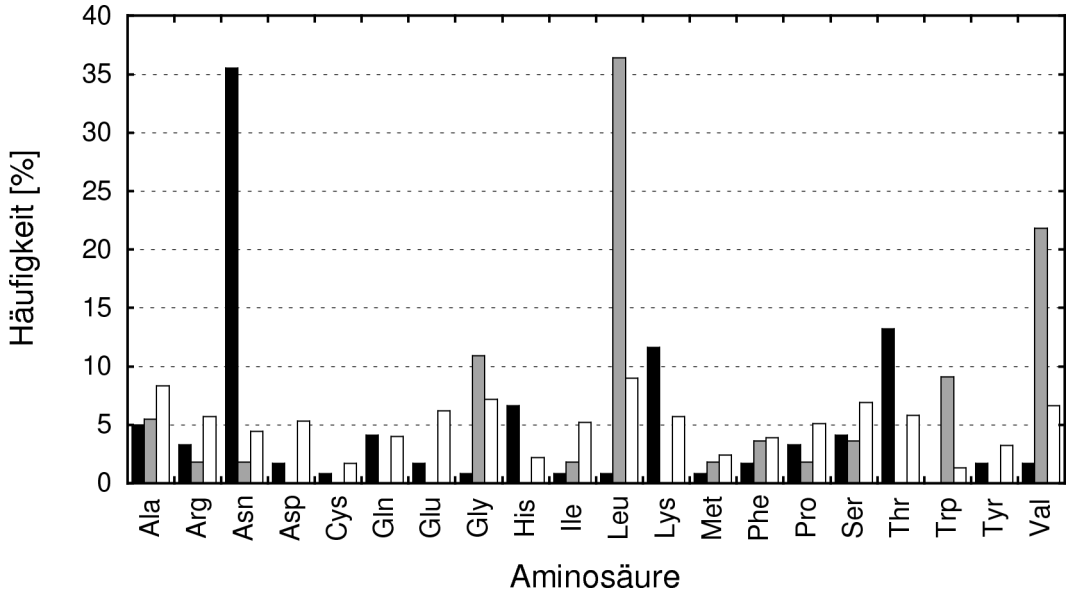



**Abbildung 27:** Aminosäure-Verteilung an randomisierten Positionen der neu hergestellten Blc-Bibliothek. Die randomisierten Positionen von 10 zufällig ausgewählten und sequenzierten Klonen wurden in ihre entsprechenden Aminosäuren translatiert und als relative Häufigkeit aufgetragen. Dabei wurde unterschieden, ob die Primärmutation im kodierenden (schwarze Balken) oder nicht-kodierenden Strang (graue Balken) eingeführt wurde. Als Vergleich sind die durchschnittlichen Häufigkeiten der proteinogenen Aminosäuren nach Creighton (1992) angegeben (weiße Balken).

## 3.2 Herstellung einer Zufallsbibliothek auf der Basis des Bilin-Bindungsproteins

Das Konzept einer Anticalin-Bibliothek auf der Basis des Bilin-Bindungsproteins (BBP) (Beste, 1998) hatte sich in verschiedenen Selektionsstudien bewährt. Aufgrund dieser positiven Erfahrungen bei der Selektion von Anticalinen gegen organische Moleküle (vgl. Abschnitt 1.1.1), wurden auch mit dieser Bibliothek Selektionsexperimente durchgeführt. Da es bislang kein Plasmid gab, das einerseits für die periplasmatische Produktion des BBP geeignet war und andererseits die in den Vorversuchen abgeleiteten Anforderungen, nämlich Cloramphenicol-Resistenz und lac-Expressionssystem, erfüllte, war es notwendig, ein entsprechendes Expressionsplasmid zu konstruieren.

Ausgangspunkt dafür war pBlc9 (Abbildung 22), das bereits den gestellten Anforderungen bestens genügte (Abschnitt 3.1.6). Dieser Vektor war allerdings für die Produktion des Bakteriellen Lipocalins konzipiert und trug als Relikt seines Vorgänger-Vekors pBlc7 noch das Tetracyclin-Repressorgen (tetR). Dieses genetische Element war im Zusammenhang mit dem $lac^{p/o}$-basierten Expressionssystem funktionslos und wurde deswegen durch ortsgerichtete Mutagenese entfernt, um ungünstige Effekte des konstitutiv exprimierten Repressors auszuschließen. Dazu wurde eine Kunkel-Mutagenese (Abschnitt 2.2.6) unter Verwendung des Oligodesoxynukleotids remove_tetR durchgeführt. Die erfolgreiche Entfernung des Gens wurde durch analytischen Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA bestätigt, und der so konstruierte Vektor wurde als pBlc10 bezeichnet.

Um diesen Vektor anschließend für die Klonierung einer randomisierten Genkassette vorzubereiten, wurde das *Xba*I/*Hin*dIII-Restriktionsfragment (592 bp) mit dem korrespondierenden Fragment aus pBBP21 ersetzt (Abbildung 28), wobei das Blc-Strukturgen durch eine Variante des BBP-Stukturgens ausgetauscht wurde. Diese Variante unterscheidet sich vom Wildtyp-BBP durch insgesamt vier Mutationen (Beste *et al.*, 1999). N1D und K87S wurden eingeführt, um die Bildung von Protein-Dimeren zu unterbinden und die Protein-Stabilität zu erhöhen. Die beiden anderen Mutationen, N21Q und K135M, waren notwendig, um eine geeignete *Bst*XI-Genkassette zu erzeugen, und so eine effiziente Klonierung des randomisierten BBP-Genfragments zu erlauben. Der neue Vektor wurde als pBlc10-BBP bezeichnet.

Die nachfolgende Randomisierung der 16 Aminosäurepositionen im BBP-Gen (siehe Abbildung 2) erfolgte nach Strategie von Beste (1998; 1999), und ähnelt der in Abschnitt 3.1.3 beschriebenen Strategie zur Randomisiereung des Bakteriellen Lipocalins.

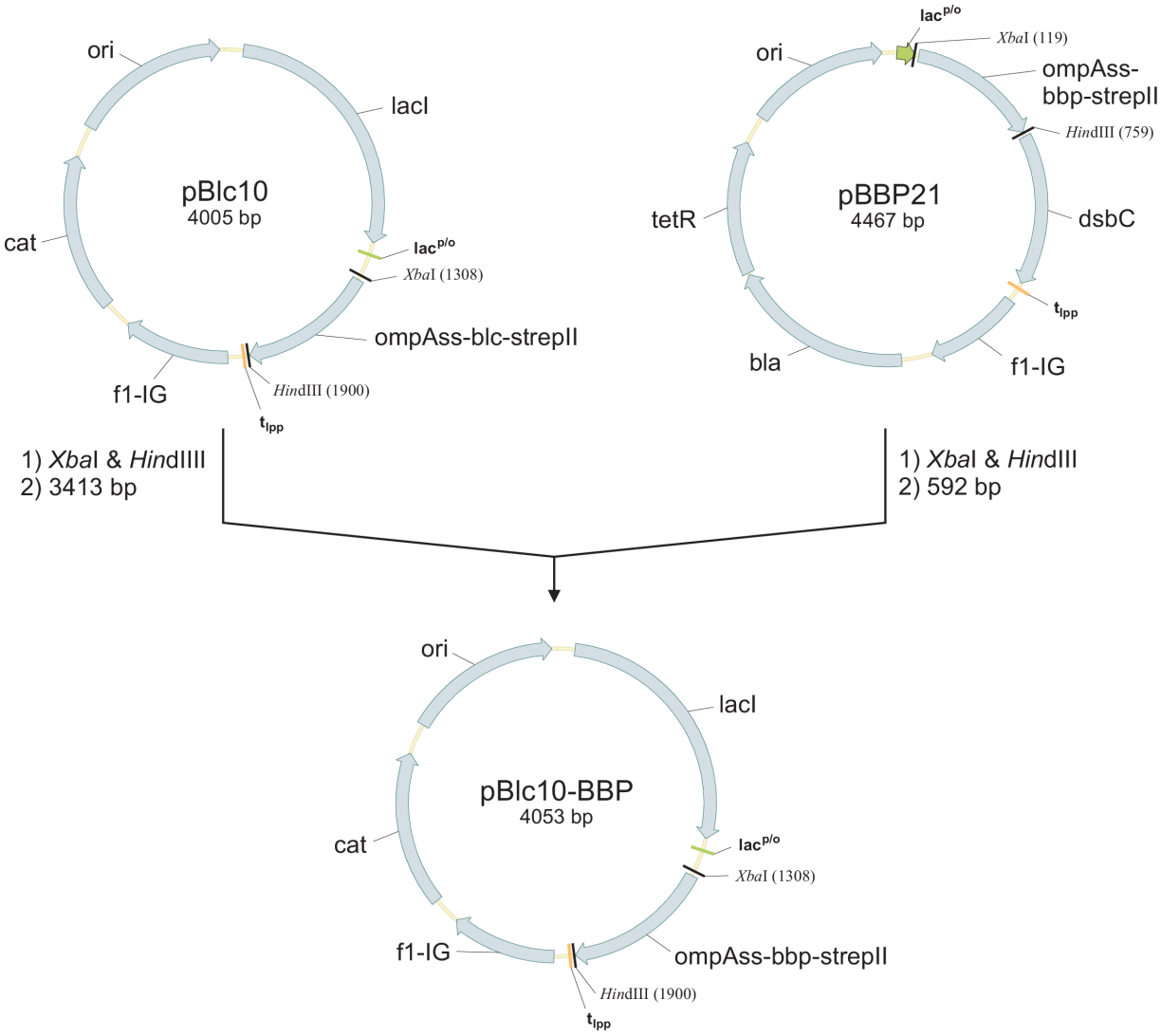



**Abbildung 28:** Klonierungsschema für den Vektor pBlc10-BBP. Als Empfängervektor diente pBlc10, der für das Blc kodiert. Das Lipocalin ist N-terminal mit der OmpA-Signalsequenz (ompAss) und C-terminal mit dem *Strep-tag* II fusioniert. Die *Xba*I/*Hin*dIII-Genkassette dieses Vektors wurde durch das entsprechende Fragment des Vektors pBBP21 ausgetauscht, das analog für das BBP kodiert. Auf pBlc10-BBP steht das BBP-Strukturgen somit unter der Kontrolle des Lactose-Promotor/Operators. Weiterhin kodiert dieser Vektor für den Lactose-Repressor (lacI), das Chloramphenicol-Resistenzgen (cat) und trägt die Intergene Region des filamentösen Phagen f1 (f1-IG) sowie den ColEI-Replikationsursprung (ori).

Zunächst wurden in zwei unterschiedichen PCR-Ansätzen unter Verwendung der degenerierten Oligodesoxynukleotide GB-3 und FS-15 bzw. GB-11 und GB-4 mit Plasmid-DNA des Vektors pBBP20 als Matrize zwei DNA-Fragmente von 159 und 164 pb Länge generiert. Diese beiden Fragmente tragen insgesamt alle 16 randomisierten Positionen des BBP. Sie wurden nach Reinigung durch Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion (Abschnitt 2.2.4.2) in einer dritten PCR zusammen mit den beiden flankierenden Primern GB-1 und GB-2 und FS-18 eingesetzt, um eine Gen-Kassette mit *Bst*XI-Schnittstellen an beiden

Enden zu assemblieren (vgl. Abbildung 16). Für die Herstellung der BBP-Zufallsbibliothek wurden etwa 40 µg Plasmid-DNA des Vektors pBlc10-BBP und etwa 22 µg randomisiertes PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI entsprechend den Angaben in Abschnitt 3.1.4 verdaut. Nach Auftrennung der Reaktionsprodukte durch Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung der Fragmente durch Gelextraktion (Abschnitt 2.2.4.4) wurden 12 µg des Vektorfragmentes und 1,8 µg des randomisierten BBP-Fragmentes erhalten. Die Ligierungsreaktion wurde ü. N. bei 22 °C durchgeführt (Abschnitt 3.1.4). Nach der Liegierung wurden frisch hergestellte elektrokompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen (Abschnitt 3.1.5) in insggesamt 10 Elektroporationen transformiert.

Zur Amplifizierung und Konservierung der Bibliothek als Plasmid-DNA wurde der Transformationsansatz nach einer initial einstündigen Inkubationsphase bei 37 °C in 500 mL LB/Cam-Medium (inkl. 1 % Glucose) überführt und über Nacht weiter kultiviert. Die Zellen wurden anschießend für die Plasmid-Midipräparation eingesetzt.

Die Komplexität der erhaltenen Bibliothek wurde bestimmt, indem 1 h nach der Transformation eine Verdünnungsreihe auf LB/Cam-Agar-Platten angelegt wurden. Die Auszählung der Kolonien führte zu einer kalkulatorischen Diversität von $2{,}8 \cdot 10^9$ Varianten.

## 3.3 Strategien zur *In-Vivo*-Selektion von Proteinen mit enzymatischer Aktivität

### 3.3.1 Geeignete Enzym-Modellsubstrate für *In-Vivo*-Selektionsexperimente

Angesichts der herausfordernden Zielsetzung erschien es notwendig, unterschiedliche Substrate für mehrere Selektionsstrategien auszusuchen, um so die Erfolgswahrscheinlichkeit für ein „*Proof of Principle*“ insgeasmt zu erhöhen. Es wurde deswegen angestrebt, ein strukturell möglichst vielseitiges Repertoire an Enzym-Substraten zu identifizieren, das für Screening auf neuartige *In-Vivo*-Biokatalysatoren geeignet ist. An potenzielle Substrate wurden dabei einige grundlegende Anforderungen gestellt:

1. Das an sich inerte Substrat sollte möglichst nach einer einstufigen (bio)chemischen Reaktion eine für den Metabolismus einer angestrebten Mutante von *E. coli* essentielles Substrat oder einen Kofaktor liefern, so dass das Vorliegen eines katalytisch aktiven Anticalins zur Komplementierung des Gendefektes *in vivo* führt.

2. Die zu katalysierende Reaktion sollte mechanistisch betrachtet möglich einfach sein und *a priori* nicht von Kofaktoren abhängen. In Frage kamen deswegen in erster Linie Substrate, die durch eine einfache Hydrolyse-Reaktion den fehlenden Metaboliten freisetzen.
3. Die Substanzen sollten nach Möglichkeit kommerziell und in hoher Reinheit erhältlich sein. Zwar bestand grundsätzlich die Möglichkeit, spezielle Substrate bei Bedarf selbst zu synthetisieren, aufgrund der Mehrzahl angestrebter Substrate und des erheblichen Arbeitsaufwandes sollte dies jedoch vermieden werden.

Substrate als Kohlenstoffquellen

Heterotrophe Bakterien wie *E. coli* sind grundsätzlich auf eine ausreichende Zufuhr von organischen Kohlenstoffverbindungen angewiesen, da sie, anders als autotrophe Organismen, anorganisch gebundenen Kohlenstoff nicht verwerten können. Diese Nährstoffe werden unter anderem für den Aufbau von Zellmasse benötigt und von den Bakterien mengenmäßig am stärksten verstoffwechselt. Dies bietet eine gute Ausgangssituation, um stringente *In-Vivo*-Selektionsstrategien zu etablieren, indem die Kohlenstoffquelle in einem Selektionsmedium durch ein physiologisch selbst nicht verwertbares Derivat ersetzt wird. Wegen des hohen Kohlenstoffbedarfs, der für das subtanzielle Wachstum von *E. coli* notwendig ist, muss das Selektionsmedium mit relativ hohen Konzentrationen des entsprechenden Substrates versetzt werden. Als Orientierung diente dabei die sonst für Minimalmedien gängigen Konzentrationen an Glucose, Glycerin oder anderen C-Quellen von etwa 20 mM (vgl. Abschnitt 2.1.9). Das setzte voraus, dass das Substrat in Minimalmedium bei pH 7,5 eine ausreichend hohe Löslichkeit und Stabilität besitzt und auch bei höhreren Konzentrationen nicht nennenswert spontan hydrolysiert. Eine hohe notwendige Substratkonzentration stellt generell günstige Ausgangsbedingungen für *In-Vivo*-Selektionsexperimente dar, denn so kann selbst bei primitiven Biokatalysatoren mit hohen $K_m$-Werten Substratsättigung erreicht und relevante Umsatzraten im Prinzip erzielt werden.

Für diese Selektionsstrategie wurde die Verbindung o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid ausgewählt (oNPG; Abbildung 28). Dieses Substrat setzt *E. coli lacZ*$^-$-Stämme ohne funktionelle β-Galactosidase für Selektionsexperimente voraus, denn dieses Enzym setzt die Galactose für die Verstoffwechslung in der Glycolyse durch Hydrolyse frei. Dieser Genotyp wird bei vielen gängigen *E. coli* K12 Laborstämmen, wie z. B. JM83 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), XL1-Blue (Bullock *et al.*, 1987) oder DH5α (Woodcock *et al.*, 1989) angetroffen.

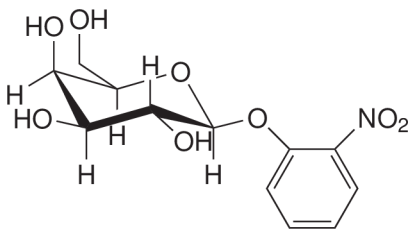



**Abbildung 29:** Strukturformel von o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid (oNPG; Molmasse: 301,3).

Substrate als Phosphorquellen

Phosphorverbindungen sind für alle Lebewesen essentiell und wesentlich am Aufbau von Nukleinsäuren in der Erbsubstanz und Phospholipiden in der Zellmembran beteiligt. Deswegen wird es vom Organismus in nennenswerten Mengen benötigt und zählt zu den sogenannten Makronährstoffen. Phosphor kommt in der Natur fast ausschließlich in Form von Phosphaten vor. Während freies anorganisches Phosphat von Mikroorganismen üblicherweise direkt aufgenommen und verstoffwechselt wird, muss organisch gebundenes Phosphat durch endogene Phosphatasen zunächst mobilisiert werden.

Für *In-Vivo*-Selektionsexperimente kommen organische Phosphatverbindungen in Frage, die bei ihrer Hydrolyse Phosphat freisetzten. Außerdem müssen Phosphat-auxotrophe *E. coli* Stämme eingesetzt werden, die das entsprechende Substrat *per se* nicht verwerten können. Die Alkalische Phosphatase (PhoA; siehe auch Abschnitt 1.2) von *E. coli* ist sehr gut untersucht. Bei *phoA*$^-$-Stämmen ist dieses Enzym inaktiviert, so dass organisch gebundenes Phosphat nicht verwertet werden kann. Für die Selektionsexperimente bot sich in diesem Fall p-Nitrophenylphosphat an (pNPP; Abbildung 30).

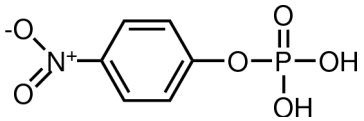



**Abbildung 30:** Strukturformeln von p-Nitrophenylphosphat (pNPP; Molmasse: 219,1).

Substrate als Aminosäure-Derivate

Aminosäure-Derivate stellen vielversprechende Substrate für *In-Vivo*-Selektionsexperimente dar. Die Biosynthesewege der Aminosäuren sind in der Vergangenheit sehr intensiv untersucht worden (Neidhardt & Curtiss, 1996). Deswegen sind auxotrophe *E. coli* Stämme für fast alle Aminosäuren in öffentlichen Stammsammlungen erhältlich. Bedingt durch die große Bedeutung von Aminosäuren und Peptiden als Reagenzien in den Biowissenschaften steht heute eine Vielfalt an Aminösäurederivaten kommerziell zur Verfügung.

Für diese Arbeit wurden die Prolin-Derivate N-Benzyloxycarbonyl-L-prolin (Z-Pro-OH), N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-prolin (Fmoc-Pro-OH) sowie L-Prolin-p-nitrobenzylester (H-Pro-pNB) ausgewählt (Abbildung 31), die jeweils durch Hydolyse einer Ester- oder Urethanfunktion die Aminosäure freisetzen. Die Löslichkeit dieser Verbindungen in Wasser ist gegenüber freiem L-Prolin stark reduziert. Deshalb wurde ausgehend von einer 100 mM Stammlöung in DMF zunächst die Löslichkeit dieser Prolin-Derivate in Wasser untersucht (Tabelle 9). Dabei zeigte sich, dass die Löslichkeit von Fmoc-Pro-OH am niedrigsten ist und bei etwa 0,1 mM liegt. Mit den anderen beiden Substraten ließen sich 1 mM Stammlösungen herstellen.

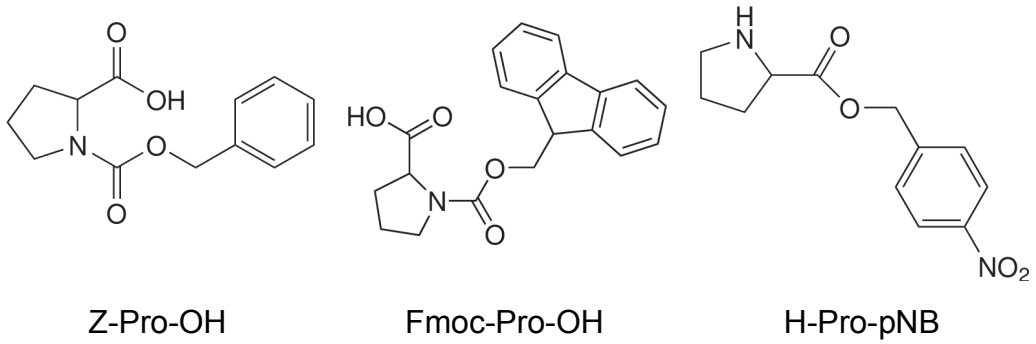



**Abbildung 31:** Strukturformeln der Prolin-Derivate N-Benzyloxycarbonyl-L-prolin (Z-Pro-OH; Molmasse: 249,3), N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-prolin (Fmoc-Pro-OH; Molmasse: 337,1) und L-Prolin-p-nitrobenzylester (H-Pro-pNB; Molmasse: 250,1).

Um ihre Eignung für *In-Vivo*-Selektionsexperimente zu testen, wurden außerdem Wachstumsexperimente mit *E. coli* JM83 in Abwesenheit eines Biokatalysators durchgeführt. Dazu wurden kompetente Zellen dieses Stammes mit Plasmid-DNA der Vektoren pBlc9 bzw. pBlc10-BBP transformiert und auf M9-Minimalmedium ausplattiert, wobei jeweils eines der Prolinderivate in einer Konzentration von 10 µM zugegeben wurde. Die Agarplatten wurden bei 30 °C inkubiert und das Wachstum der Zellen nach 24 h visuell beurteilt (Tabelle 9). Auf den Nährmedien mit Fmoc-Pro-OH und Z-Pro-OH konnte kein Wachstum festgestellt werden. Auf den mit H-Pro-pNB supplementierten Platten wurde nach der angegebenen Inkubationsphase ein dünner Zellrasen beobachtet. Das Wachstum der Zellen war unter diesen Bedingungen zwar deutlich langsamer als auf Prolin-haltigem Medium, visuell aber klar erkennbar. Offenbar ist die Stabilität dieser Verbindung gegen Hydrolyse in wässigem Milleu nicht ausreichend, um eine stringente Selektionssituation zu schaffen.

**Tabelle 9:** Löslichkeit verschiedener Prolinderivate in Wasser und basales Wachstum von *E. coli* JM83 auf supplementiertem Minimalmedium. Das Wachstum wurde nach 24 h bei 30°C bewertet: (-) kein Wachstum erkennbar; (+) Wachstum erkennbar, aber deutlich verlangsamt.

| **Prolin-Derivat** | **Löslichkeit in $H_20$** | **Wachstum bei 10µM** |
|---|---|---|
| Fmoc-Pro-OH | ≤ 0,1 mM | - |
| Z-Pro-OH | ≤ 1 mM | - |
| H-Pro-pNB | ≤ 1 mM | + |

Substrate als Vitamin-Derivate

Der Einsatz von Vitamin-Derivaten als Substrat für *In-Vivo*-Selektionsexperimente wurde bereits von Lesley *et al.* (1993) beschrieben. Die Autoren verwendeten D-Biotinoyl-4-nitrophenylester (BNP) für diesen Zweck. Der Reiz derartiger Substrate liegt in der sehr geringen wirksamen Dosis von Vitaminen und ihren Vorstufen, so dass bereits schwache Enzymaktivitäten wirksam sein sollten. Dies gilt im Prinzip auch für andere Vitamine, die sich durch enzymatische Hydrolyse eines Derivates freisetzen lassen.

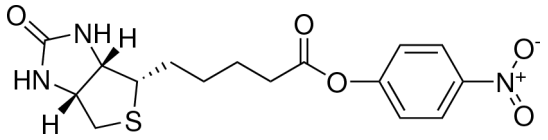



**Abbildung 32:** Strukturformel von D-Biotin-p-Nitrophenylester (BNP; Molmasse: 365,4).

Für diese Arbeit wurde das kommerziell erhältliche BNP als Substrat gewählt (Abbildung 32). Diese Substanz wird u. a. zur Biotinylierung von Proteinen eingesetzt und zeigt dabei gegenüber analogen NHS-Estern eine deutlich höhere Spezifität für freie Amino-Gruppen und höhere Stabilität in wässriger Lösung (Miller *et al.*, 1997).

Substrate für die Nukleinsäurebiosynthese

Die Synthese von Uridinmonophosphat (UMP) ist für alle Lebewesen essentiell, da UMP ein Edukt der RNA-Synthese und damit unabdingbar für die Genexpression ist. Ein wichtiges Zwischenprodukt der UMP-Biosynthese ist Orotat, das in einem weiteren Schritt zur Orotidin umgesetzt wird und schließlich durch Decarboxylierung zu UMP führt (Abbildung 33). Ein Defekt bei einem der beteiligten Enzyme, der Orotat-Phosphoribosyltransferase (OPRTase) oder der Orotidin-Decarboxylase (ODCase), führt in *E. coli* zu einer Uridin-Auxotrophie, in deren Verlauf es zu einer Akkumulation von Orotat im Cytosol der Zelle kommt. Diese

Gegebenheit wurde von Smiley & Benkovic (1994) ausgenützt, um die Effektivität eines *In-Vivo*-Selektionssystems zu demonstrieren. Dabei führte die periplasmatische Überexpression eines katalytischen Antikörpers mit ODCase-Aktivität zu einer Wiederherstellung des Wachstums von Uridin-auxotrophen *E. coli* Zellen. Das bei dieser eigentlich unphysiologischen Reaktion entstandene Uracil kann durch eine endogene Uracil-Phosphoribosyltransferase (Uracil PRTase), ein Enzym des sogenannten *Salvage Pathway* (Neuhard & Nygaard, 1987), schließich zu UMP umgesetzt werden.

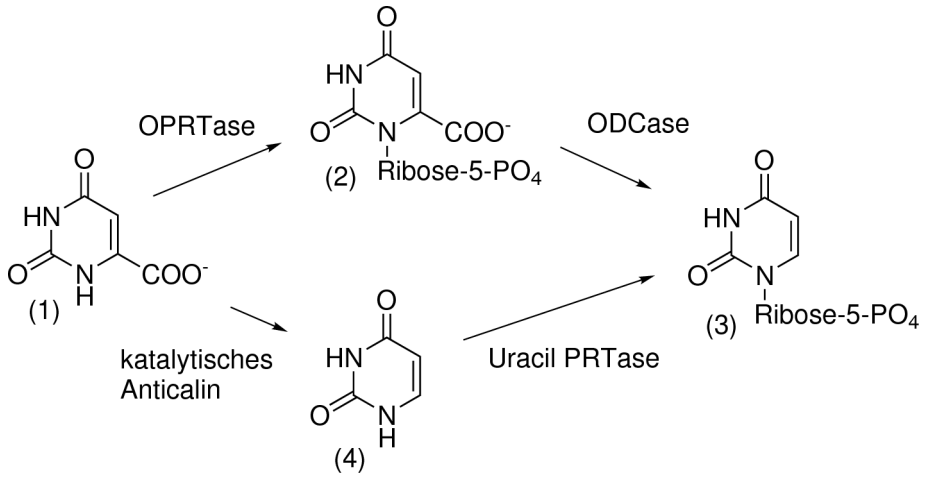



**Abbildung 33:** Ausschnitt aus dem Biosyntheseweg von Uridinmonophosphat (UMP, 3) über Orotidin (2) und mögliche Komplementierung durch ein katalytisches Anticalin. Der natürliche Stoffwechselweg wird durch die Enzyme Orotat-Phosphoribosyltransferase (OPRTase) und Orotidin-Decarboxylase (ODCase) katalysiert. In Abwesenheit eines dieser Enzyme könnte dieser Weg umgangen werden, indem ein entsprechendes katalytisches Anticalin Orotat (1) decarboxyliert. Das dabei entstandene Uracil (4) wird durch die natürlich vorkommende Uracil-Phosphoribosyltransverase (Uracil PRTase) zu Uridinmonophosphat (3) umgesetzt.

Dieses Konzept sollte auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt werden. Die zitierte Studie ließ allerdings offen, ob und ggf. wie cytosolisch akkumulierendes Orotat in das Periplasma von *E. coli* gelangt, wo durch die Aktivität des heterolog exprimierten katalytischen Antikörpers eine Decarboxylierung stattfinden konnte. Deswegen entschied man sich in der vorliegenden Studie dafür, das Selektionsmedium zusätzlich mit Orotat zu versehen, um eine möglichst hohe periplasmatische Konzentration dieses Substrates zu erreichen.

Antibiotika und chromogene Substrate

Die Verbindungen Ampicillin (Amp), 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) und 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (BCIG) unterscheiden sich von allen bisher

behandelten Substraten dahingehend, dass sie keinen unterbrochenen Stoffwechselweg komplementieren, um das bakterielle Wachstum wiederherzustellen. Die Strukturformeln dieser Reagenzien sind in Abbildung 34 dargestellt.

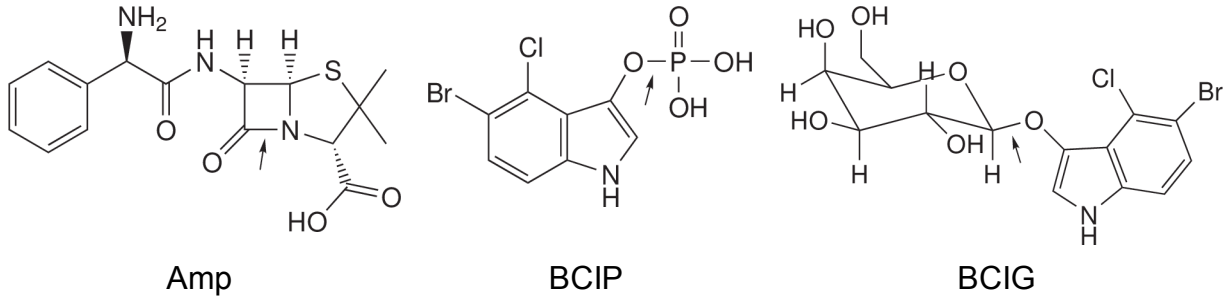



**Abbildung 34:** Strukturformel des Antibiotikums Ampicillin (Amp; Molmasse: 349,4), sowie der chromogenen Substrate 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP; Molmasse: 326,47) und 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (BCIG; Molmasse: 408,6). Die bei der natürlichen Katalyse hydrolysierte Bindung ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Verwendung des Antibiotikums Amp zielte darauf ab, Lipocalin-Varianten zu selektieren, die dieses toxische Substrat hydrolysieren und ihren Wirtszellen somit eine erhöhte Amp-Toleranz vermitteln. Obwohl Amp aufgrund seiner hohen chemischen Stabilität kaum als besonders gutes Substrat für *In-Vivo*-Selektionsexperimente angesehen werden kann, waren entsprechende Experimente aus einem anderen Grund sehr attraktiv: Sie können weitgehend unabhängig vom genetischen Hintergrund des *E. coli* Wirtsstammes durchgeführt werden. Damit ist es grundsätzlich möglich, eine frisch hergestellte Lipocalin-Bibliothek in einem beliebigen Stamm nach der Transformation direkt einzusetzen und damit die volle Diversität der Bibliothek einer Selektion zu unterziehen. Im Zuge der Konservierung einer Lipocalin-Bibliothek als Plasmid-DNA und insbesondere durch die Notwendigkeit der Transformation geeigneter auxotropher *E. coli* Stämme (siehe Abschnitt 3.3.2) kommt es ansonsten immer zu einer Reduzierung der ursprünglichen Diversität (Abschnitt 3.1.5).

Um eine optimale Amp-Konzentration für Selektionsexperimente zu bestimmen zu bestimmen wurde in einem Wachstumsversuch mit *E. coli* XL1-Blue die inhibitorische Schwelle bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit pBlc7 transformiert, auf einer LB-Agar Platte mit Cam sowie einem linearen Amp-Konzentrationsgradienten ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Bis zu einer Antibiotika-Konzentration von etwa 4 µg/mL wurde Koloniebildung beobachtet, welches bei zunehmender Amp-Konzentration abrupt aufhörte (Abbildung 35). Eine Konzentration von 10 µg/mL erwies sich somit für Selektionsexperimente gut geeignet. Diese

Konzentration war immerhin 10-fach niedriger, als die sonst im Labor gängige Konzentration von 100 µg/mL (Sambrook *et al.*, 1989).

**Abbildung 35:** Ermittlung der inhibitorischen Ampicillin-Konzentration für *E. coli* XL1-Blue. Die Zellen wurden mit pBlc7 transformiert und auf LB-Agar (30 µg/mL Cam, 200 ng/mL aTc) ausplattiert, in dem ein linearer Ampicillin-Gradient erzeugt worden war (schwarzer Balken). Die Aufnahme zeigt die Platte nach 36 h Inkubation bei 37 °C.

Die Verbindung BCIP und BCIG sind gängige Reagenzien, um im Labor die Aktivität von Phosphatasen bzw. β-Galactosidase nachzuweisen (Sambrook & Russell, 2001). Die Hydrolyse dieser Verbindungen führt über ein Intermediat und Oxidation (z. B. Luftsauerstoff) zu einem Indigofarbstoff, der Kolonien mit der entsprechenden Aktivität eine typische Blaufärbung verleiht und sie somit identifizierbar macht (Winnacker, 1990).

In dieser Studie wurde BCIP und BCIG kombiniert eingesetzt, um in einem *In-Vivo*-Experiment die native Blc-Bibliothek auf hydrolytische Aktivität gleichzeitig gegenüber beiden Substanzen zu durchmustern (Screening).

### 3.3.2 Auswahl geeigneter *E. coli* Stämme für die *In-Vivo*-Selektion

Das Konzept der bakteriellen *In-Vivo*-Selektion basiert hauptsächlich auf dem Einsatz auxotropher *E. coli* Stämme. Die Auswahl geeigneter Stämme ging Hand in Hand mit der Verfügbarkeit geeigneter Enzym-Substrate, wie im vorherigen Abschnitt erläutert. Die für

diese Arbeit ausgewählten Stämme sind zusammen mit ihren wesentlichen genetischen Eigenschaften in Tabelle 10 aufgeführt.

Grundsätzlich waren etablierte *E. coli*-Laborstämme als Wirtsorganismen für die *In-Vivo*-Experimente besonders attraktiv, denn diese Stämme sind auch für molekularbiologische Arbeiten gut geeignet. Sie lassen sich in der Regel sehr effizient transformieren und erweisen sich im Laboralltag meist als robust. Einige dieser Stämme zeichnen sich durch einen zusätzlichen Genotyp aus, der die intrazelluläre Stabilität episomaler genetischer Elemente erhöht (z. B. *recA1*, *endA1*). Meist ist auch das wirtseigene Restriktionssystem ausgeschaltet (z. B. *hsdR17*), was die Klonierung nicht methylierter DNA, wie sie z. B. bei PCR-Fragmenten vorliegt, deutlich effizienter macht (Sambrook & Russell, 2001).

Einige Stämme mit speziellen Stoffwechseldefekten wurden von dem *E. coli* Genetic Stock Center (CGSC) der Yale Universität bezogen (Abschnitt 2.1.1). Diese wurden in Vorexperimenten auf ihre Eignung für die *In-Vivo*-Selektionsexperimente getestet. Dafür wurde zunächst die Transformierbarkeit der einzelnen Stämme überprüft, indem 100 µL frisch hergestellter elektrokompetenter Zellen (Abschnitt 2.2.2.2 und 3.1.5) mit 1 µg Plasmid-DNA des Vektors pBlc9 transformiert (Abschnitt 3.1.6) und in verschiedenen Vedünnungsstufen auf Chlorampenicol-haltigem LB-Agar ausplattiert wurde. Die Anzahl transformierter Zellen wurde dann durch Auszählen einer geeigneten Verdünnungsstufe abgeschätzt. Es zeigte sich bei diesen Versuchen, dass die auxotrophen *E. coli* Stämme der CGSC deutlich schlechter transformierbar waren als die in der Molekulatbiologie gebräuchlichen *E. coli* Laborstämme wie z. B. DH5α (Dower *et al.*, 1988).

**Tabelle 10:** *E. coli* Stämme für *In-Vivo*-Selektionsexperimente.

| ***E. coli* Stamm** | **CGSC Nr.** [a] | **Relevanter Genotyp** | **Stoffwechseldefekt** | **Referenz** | **Transformier-barkeit**[b] **[cfu/µg]** |
|---|---|---|---|---|---|
| DB6656 | 6868 | *pyrF79::Mu, hsdR27* | Orotidin-5'-Phosphat - Decarboxylase | (Bach *et al.*, 1979) | $3{,}4 \cdot 10^8$ |
| X82 | 5889 | *pyrF287* | Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase | - | $8{,}9 \cdot 10^7$ |
| DH5α | - | *Δ(lacZYA-argF)U169, endA1, recA1, hsdR17* | β-Galactosidase | (Woodcock *et al.*, 1989) | $1{,}0 \cdot 10^9$ |
| DH5α | | *ΔphoA8, endA1, recA1, hsdR17* | Alkalische Phosphatase | (Woodcock *et al.*, 1989; Rodriguez-Quinones & Benedi, 1993) | $1{,}0 \cdot 10^9$ |
| JM83 | - | *proBA* | Glutamat-5-Kinase, Glutamat-5-Semialdehyd-Dehydrogenase (Prolin Biosynthese | (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) | $2{,}3 \cdot 10^9$ |
| R875 | 6954 | *bioB17* | Biotin Synthase | (Cleary & Campbell, 1972) | $9{,}0 \cdot 10^6$ |
| R879 | 6952 | *bioA24* | DAPA Aminotransferase | (Cleary & Campbell, 1972) | $3{,}4 \cdot 10^8$ |
| XL1-Blue | - | *endA1, recA1, hsdR17* | - | (Bullock *et al.*, 1987) | $8{,}4 \cdot 10^8$ |

[a] Datenbank-Nummern von Stämmen des *E. coli* Genetic Stock Center (CGSC; Yale Universität)

[b] Bei Elektroporation mit 1µg Plasmid-DNA (Abschnitt 2.2.2.2)

So wurden bei den Stämmen der CGSC etwa $1 \cdot 10^7$ bis $5 \cdot 10^8$ transformierte Zellen pro µg DNA erhalten, während es bei den Stämmen DH5α, XL1-Blue und JM83 deutlich über $1 \cdot 10^9$ Zellen waren. Besonders negativ verhielt sich der Stamm R875 mit lediglich $9 \cdot 10^6$ transformierten Zellen. Für das Screening der hochkomplexen Lipocalin-Bibliotheken war dies nicht ausreichend, so dass Selektionsexperimente mit diesem Stamm nicht durchgeführt wurden. Für die Selektionsexperimente mit D-Biotin-p-nitrophenylester (BNP) konnte allerdings auf den alternativen Stamm R879 ausgewichen werden, dessen Transformationseffizienz fast 40-fach höher ausfiel. Ebenfalls am unteren Ende der Skala befand sich X82 mit $8{,}9 \cdot 10^7$ cfu/µg, der für Selektionsexperimente mit Orotsäure vorgesehen war. Obwohl in diesem Fall DB6656 als alternativer Stamm mit höherer Transformationseffizienz zur Verfügung stand, war dessen Eignung für genetische Selektionsexperimente in Frage gestellt. Bei diesem Stamm ist das Gen *pyrF* für die Orotidin-5'-phosphat-decarboxylase (vgl. Abschnitt 3.3.1) nämlich durch Insertion eines Prophagen inaktiviert (Genotyp: *pyrF79::Mu*), so dass seine genetische Stabilität als niedrig eingeschätzt wurde.

Als weiteres Auswahlkriterium wurde das Wachstum der Stämme auf nicht supplementiertem Minimalmedium validiert. Das Ziel dieser Experimente lag darin, den beschriebenen Phänotyp zu bestätigen, das basale Wachstumsverhalten der einzelnen Stämme unter limitierenden Wachstumsbedingungen zu bewerten und ihre genetische Stabilität zu testen. In der Regel wurden die Zellen dazu, wie oben beschrieben, mit pBlc9 transformiert, auf Selektionsmedium ohne Substrat ausplattiert und für einige Tage bei 30 °C inkubiert. Erstaunlicherweise verhielten sich bei diesem Test alle Stämme vielversprechend, da allenfals mikroskopisch wahrnehmbares Hintergrundwachstum zu verzeichnen war und der beschriebene Phänotyp bei allen Stämmen bestätigt werden konnte. Revertanten wurden bei diesen Experimenten in der Regel nicht beobachtet; jedoch zeigte der *phoA*$^-$ Stamm E15 auf phosphathaltigem Tris-Minimalmedium eine erstaunlich hohe Frequenz zur Rückmutation, die anhand der Farbänderung von biokatalytisch hydrolysietem BCIP nachgewiesen wurde (Abbildung 36). Deswegen war dieser Stamm für Selektionsversuche ungeeignet. Als Alternative für E15 wurde der Stamm DH5α untersucht. Dieser Stamm hat eine relativ lange Tradition im molekularbiologischen Labor (Woodcock *et al.*, 1989), wurde allerdings erst relativ spät als *phoA*$^-$ klassifiziert (Rodriguez-Quinones & Benedi, 1993). Dieser Phänotyp konnte auch hier bestätigt werden (siehe Abbildung 36A). Revertanten wie bei E15 wurden mit diesem Stamm nicht beobachtet.

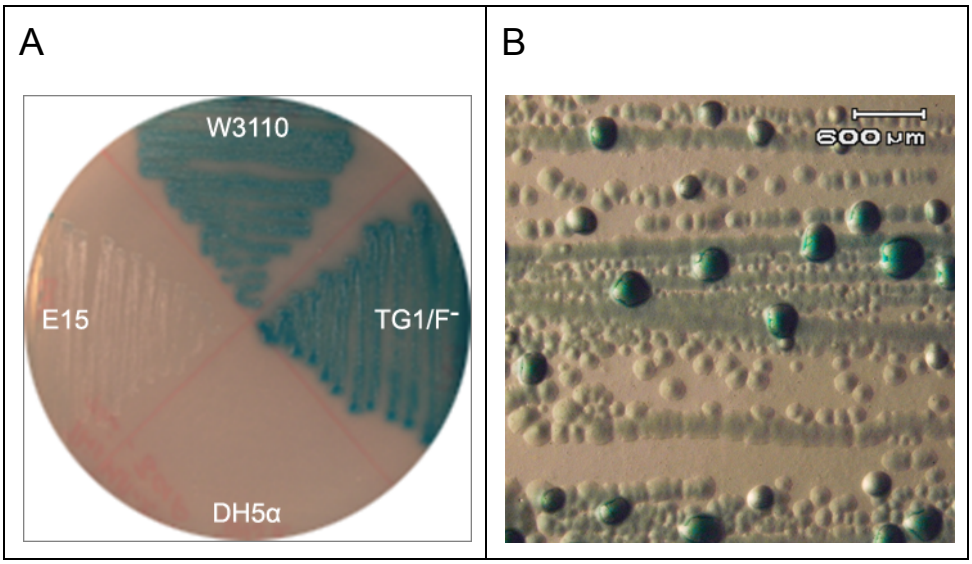



**Abbildung 36:** Phosphatase Aktivität der *E. coli* Stämme E15 und DH5α. A: Die *E. coli* Stämme DH5α, E15, W3110 und TG1/F$^-$ wurden auf BCIP-haltigem Tris-Minimalmedium mit einer Phosphatkonzentration von 0,1 mM) ausplattiert und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die *phoA*$^+$ Stämme W3110 und TG1/F$^-$ setzten das chromogene Substrat BCIP um, deutlich erkennbar an der starken Blaufärbung. Die *phoA*$^-$-Stämme E15 und DH5α zeigen diese Färbung nicht. Das Wachstum von DH5α ist auf Minimalmedium relativ langsam und hier nur schlecht zu erkennen. B: In der mikroskopischen Ansicht sind im E15-Ausstrich einige spontane *phoA*$^+$-Revertanten zu beobachten (Pfeile), die sich durch schnelleres Wachstum und den Umsatz des chromogenen Substrates auszeichnen (Blaufärbung).

### 3.3.3 Optimierung geeigneter Minimalmedien

Die Auswahl geeigneter Nährmedien für die geplanten *In-Vivo*-Selektionsexperimente war von grundlegender Bedeutung. Da das Selektionsprinzip auf der Komplementierung von Stoffwechseldefekten in auxotrophen *E. coli* Stämmen beruhte, waren prinzipiell nur definierte Kulturmedien geeignet, deren Zusammensetzung an die jeweilige Fragestellung gut angepasst werden konnte. Die klassischen Komplex- bzw. Vollmedien, wie z. B. das bekannte Luria-Bertani (LB) Medium (Bertani, 1951), kamen deswegen nur für die Selektion auf Ampicillin-Resistenz und das Screening auf BCIP-Hydrolyse in Frage. Am besten wurden die geforderten Voraussetzungen von solchen Minimalmedien erfüllt, die den Bakterien alle essentiellen Nährstoffe zur Verfügung stellen. Das beinhaltet in der Regel eine organische Kohlenstoffquelle (z. B. Glucose), sowie meist anorganische Quellen für Stickstoff, Phosphat und Ionen wie Magnesium und Calcium. Autotrophe *E. coli* Stämme können in diesen Medien gut wachsen sofern ihr Phänotyp komplementiert wird, wenngleich langsamer als in Vollmedien.

Ein gängiges Minimalmedium für mikrobiologische Selektionsversuche ist das sogenannte M9-Medium (Sambrook & Russell, 2001). Dieses Medium war mit den meisten hier ausgewählten Enzym-Substraten gut kompatibel. Für Experimente mit Vitamin- und Aminosäurederivaten konnte es ohne Modifikationen direkt eingesetzt werden. Für Selektionen mit o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid konnte die C-Quelle einfach dadurch ersetzt werden.

Aufgrund des hohen Phosphatgehaltes des M9-Mediums waren allerdings Selektionsexperimente mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat nicht möglich. Beim M9-Medium (Abschnitt 2.1.10) dient Phosphat nicht nur als essentieller Nährstoff für das Zellwachstum, sondern auch zur pH-Pufferung (Studier, 2005). Dies ist ein wichtiger Aspekt bei der Formulierung von Minimalmedien, da ein konstanter pH-Wert von etwa 7 für das ungehinderte Wachstum von *E. coli* wichtig ist. Durch die Stoffwechselaktivität der Bakterien kommt es andernfalls schnell zu einem Abfall des pH-Wertes (Sole *et al.*, 2000) und damit langfristig zur Stagnation des Zellwachstums. Aus diesen Gründen war es bei Experimenten mit p-Nitrophenylphosphat nicht möglich, die Phosphatsalze im M9-Medium einfach durch das Substrat zu ersetzen, sondern ein alternatives, phosphatfreies Medium für diese Selektionsexperimente musste gefunden werden.

Als potentiell geeignet erschienen Tris-gepufferte Medien, die sich in verschiedenen Studien zur Untersuchung des Phosphat-Stoffwechsels von *E. coli* etabliert haben. Die vorliegende Arbeit orientierte sich dabei an der Vorschrift von Norte *et al.* (2003), wobei die Konzentrationen der einzelnen Komponenten geringfügig geändert wurden, um etwa vergleichbare Bedingungen mit M9-Medium zu schaffen. Bei ersten Kultivierungsversuchen unter Selektionsbedingungen mit diesen Medien und dem PhoA-defizienten *E. coli* Stämmen DH5α (Rodriguez-Quinones & Benedi, 1993) und E15 (Hayashi *et al.*, 1964) zeigte sich, dass Tris-Minimalmedium (Abschnitt 2.1.10) von den Zellen sehr gut toleriert wird und stringente Selektionsbedingungen ermöglicht. Dies manifestierte sich vor allem durch ein sehr niedriges, allenfalls mikroskopisch nachweisbares Hintergrundwachstum.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt bei der Auswahl geeigneter Kulturmedien bestand in der Wahl zwischen Flüssigkultur und Festmedien (Agar-Platten). Für die Flüssigkultur sprach vor allem die ausgesprochen einfache Handhabung, insbesondere die Möglichkeit, durch einfaches Überimpfen mehrere aufeinanderfolgende Wachstums- bzw. Selektionszyklen ohne Unterbrechung durchführen zu können. Außerdem sind Flüssigkulturen grundsätzlich bis zu

relativ großen Volumina von etwa 2 L problemlos skalierbar und stellen damit kaum eine Begrenzung für die zu selektierende *E. coli* Zellpopulation dar.

Demgegenüber erschienen die Eigenschaften von Agar-Platten für die geplanten Vorhaben zunächst ungünstig: Die Herstellung großer Mengen von Agar-Platten mit speziellen Medien ist mit deutlich höherem Aufwand verbunden als die Handhabung von Flüssigmedien. Außerdem ist die Gefahr der Kontamination mit Luftkeimen – auch unter Reinluft-Bedingungen – durch die großen offenen Oberflächen deutlich erhöht. Gerade in Hinblick auf die arbeits- und zeitintensiven Vorbereitungen im Vorfeld der eigentlichen Selektionsexperimente – einschließlich Klonierung der Plasmid-Bibliothek und Transformation der Zellen – war dies ein wichtiger Aspekt.

Obwohl in Vorexperimenten mit relativ kleinen Zellzahlen und Kulturvolumina gute Erfahrungen mit Flüssigkulturen gesammelt werden konnten, führten bereits die ersten Selektionsexperimente mit der Blc-Bibliothek zu unerwarteten Befunden (Abschnitt 3.3.4). Es zeigte sich nämlich, dass Selektionsexperimente in Flüssigkultur dazu neigten, innerhalb weniger Tage – mitunter sogar schon nach einer Inkubation über Nacht – zu einer dichten Kultur anzuwachsen, obwohl deutlich längere Wachstumszyklen zu erwarten waren. Vermutlich setzen sich einzelne Revertanten, die aufgrund natürlicher Mutationsereignisse spontan entstehen können, innerhalb kurzer Zeit in der Kultur durch. Dies führte zu einem Verlust an experimenteller Kontrolle und machte im schlimmsten Fall die Selektion bzw. die erfolgreiche Anreicherung potenziell interessanter Kandidaten zunichte.

Dieses Verhalten war beim Einsatz von Agar-Platten weniger gravierend. Während der Selektionsphase entstehende Kolonien konnten hier eindeutig identifiziert und deren Wachstum im Verlauf der Selektionsphase beobachtet werden. Außerdem waren diese Kolonien – unter denen schließlich auch Varianten mit einem katalytisch aktiven Anticalin zu erwarten waren – gut isolierbar und der weiteren Analyse zugänglich.

Deshalb wurden für die *In-Vivo*-Selektionsexperimente haupsächlich Agar-Platten (14 cm) verwendet, deren Minimalmedien mit den entsprechenden Substraten supplementiert waren.

### 3.3.4 Selektionsexperimente aus naiven Lipocalin-Bibliotheken

Nach der erfolgreichen Herstellung einer hochkomplexen Lipocalin-Bibliothek auf der Basis des Bakteriellen Lipocalins (Blc; Abschnitt 3.1.8) wurden mehrere Selektionsexperimente *in vivo* durchgeführt, wobei die im Vorfeld ausgearbeiteten Selektionsstrategien angewendet

wurden. Dazu wurden zunächst kompetente Zellen des entsprechenden *E. coli* Stammes mit Plasmid-DNA der Lipocalin-Bibliothek durch Elektroporation transformiert (Abschnitt 2.2.2.2 und 3.1.5). Die Zellen wurden dann auf Selektionsmedium ausplattiert, welches ein geeignetes Substrat enthielt und für bis zu 10 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 11 dargestellt.

Das erste Selektionsexperiment unter direkter Verwendung der frisch hergestellten Lipocalin-Bibliothek wurde – in Abweichung von dieser generellen Vorgehensweise – mit LB-Flüssigmedium und Ampicillin (Amp) als Substrat durchgeführt. Die Selektion war somit auf Lipocalin-Varianten gerichtet, die dieses Antibiotikum zu hydrolysieren vermögen. Für dieses Experiment wurde 1 Liter Selektionsmedium (LB, 30 µg/mL Cam, 0,1 mM IPTG, 10 µg/mL Amp) mit der Bakteriensuspension aus 18 Elektroporationsansätzen (Abschnitt 3.1.8) im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37 °C. Unerwartet erreichte diese Kultur bereits nach weniger als 48 h die stationäre Phase und hatte zu diesem Zeitpunkt eine $OD_{550}$ = 1,850. Aus dieser Kultur wurden durch Ausplattieren auf LB-Medium mit 100 µg/mL Amp Kolonien mit offensichtlicher Amp-Resistenz erhalten.

Dies war ein deutliches Indiz für eine Kontamination mit β-Lactamase-exprimierenden Zellen. Daher wurde ein neues Selektionsexperiment auf Agar-Medium durchgeführt. Im Unterschied zum primären Selektionsexperiment mit der frisch transformierten Bakterienkultur wurde dazu *E. coli* DH5α mit Plasmid-DNA transformiert, das aus dieser Baterienkultur isoliert worden war (vgl. Abschnitt 3.1.8). Nach dreitägiger Inkubation auf Amp-Selektionsmedium waren 7 Kolonien erkennbar. Von diesen Klonen wurde Plasmid-DNA präpariert, und jeweils durch Restriktionsverdau mit dem Enzympaar *Hin*dIII/*Xba*I bzw. mit *Bst*XI analysiert. Nur ein Klon (Nr. 6) zeigte in beiden Fäällen das erwartete Restriktionsmuster, ein anderer Klon (Nr. 7) zeigte zumindest mit *Bst*XI das korrekte Muster. Bei allen anderen Klonen wurden ein oder zwei weitere Banden beobachtet, was auf die Anwesenheit zusätzlicher unbekannter genetischer Elemente schließen ließ.

**Tabelle 11:** *In-Vivo*-Selektionen auf Agar-Medien mit einer Lipocalin-Bibliothek auf der Grundlage des Bakteriellen Lipocalins aus *E. coli*. Die Inkubation fand bei 30 °C für bis zu 10 Tagen statt.

| ***E. coli*** | **Substrat (Konzentration)** | **Medium** | **Transformierte Zellen** | **Selektierte Kolonien** |
|---|---|---|---|---|
| DH5α | Ampicillin (20 µg/mL) | LB | $4 \cdot 10^9$ | 7 |
| DH5α | BCIP/BCIG (40 µg/mL) | LB | $4{,}9 \cdot 10^9$ | 1 |
| DH5α | oNPG (0,2 % w/v) | M9 | $1{,}3 \cdot 10^9$ | 0 |
| DH5α | pNPP (0,1 mM) | Tris-MM | $8{,}2 \cdot 10^9$ | > 100 |
| JM83 | Z-Pro-OH (10 µM) | M9 | $1{,}0 \cdot 10^9$ | > 100 |
| JM83 | Fmoc-Pro-OH(10 µM) | M9 | $1{,}5 \cdot 10^9$ | > 100 |
| R879 | BNP (1 nM) | M9 | $3{,}4 \cdot 10^8$ | Zellrasen |
| X82 | Orotat (10 µM) | M9 | $7{,}2 \cdot 10^7$ | 0 |

Um insbesondere bei den Klonen Nr. 6 und 7, die vermutlich für eine intakte Lipocalinvariante kodierten, die Kopplung des selektierten Phänotyps mit der jeweils isolierten DNA zu untersuchen, wurden damit frische DH5α Zellen transformiert, auf Selektionsmedium auszuplattiert und bebrütet. Zellwachstum ließ sich in diesem Experiment nur mit Plasmid-DNA der Klone 1-5 erzielen, während bei den Klonen Nr. 6 und 7 kein Wachstum reproduziert werden konnte. Bei den Klonen 1-5 wurde offenbar durch genetische Rekombination der Plasmid-DNA ein β-Lactamase Gen rekrutiert bzw. aktiviert, so dass von einer weiteren Untersuchung abgesehen wurde.

Im zweiten *In-Vivo*-Experiment wurden mit der Lipocalin-Bibliothek transformierte DH5α-Zellen auf LB-Agar ausplattiert, das die beiden chromogenen Substrate BCIP und BCIG enthielt (siehe Abschnitt 3.3.1). Bereits nach einem Tag Inkubation bei 30 °C konnte ein schwach sichtbares Farbsignal auf einer Agar-Platte mit Zellrasen ausgemacht werden. Der farbige Bereich wurde mit einer Impföse großzügig von der Oberfläche des Kulturmediums abgenommen und auf einer frischen substrathaltigen Platte ausplattiert. Die sekundäre Kultur wurde bei 30 °C inkubiert, bis sich gut sichtbare Kolonien entwickelt hatten. Eine erneute Blaufärbung konnte unter diesen Kolonien nicht festgestellt werden, weswegen die isolierte Probe nicht weiter untersucht wurde. Weitere Farbsignale wurden bei dem primären Screening-Experiment auch nach mehrtätiger Inkubation nicht beobachtet.

Für die Selektion mit dem Substrat p-Nitrophenylphosphat (pNPP; s. Abschnitt 3.3.1) wurden bei der Elektroporation von *E. coli* DH5α mit der Plasmid-Bibliothek $8 \cdot 10^9$ Zellen

transformiert. Die Zellen wurden anschließend auf Phosphat-freiem Tris-Minimalmedium (Tris-MM) mit 0,1 mM pNPP ausplattiert. Nach einer Inkubationsdauer von drei Tagen wurde die Bildung erster Kolonien beobachtet (Abbildung 37). Um falsch positive Revertanten mit „natürlicher“ Phosphatase-Aktivität von eventuellen enzymatischen Lipocalin-Varianten unterscheiden zu können, wurde ein differenzielles Screening mit dem chromogenen Phosphatase-Substrates BCIP durchgeführt. Dieser einfache Test bot sich hier an, weil ein vorangegangenes Screening-Experiment (siehe oben) bereits gezeigt hatte, dass in der verwendeten Lipocalin-Bibliothek sehr wahrscheinlich keine Varianten vertreten waren, welche die Hydrolyse von BCIP nennenswert katalysieren. Insgesammt wurden 147 Kolonien von den pNPP-haltigen Selektionsplatten zufällig ausgewählt und sowohl auf frisches Selektionsmedium als auch auf Tris-MM übertragen, welches 40 µg/mL BCIP enthielt.

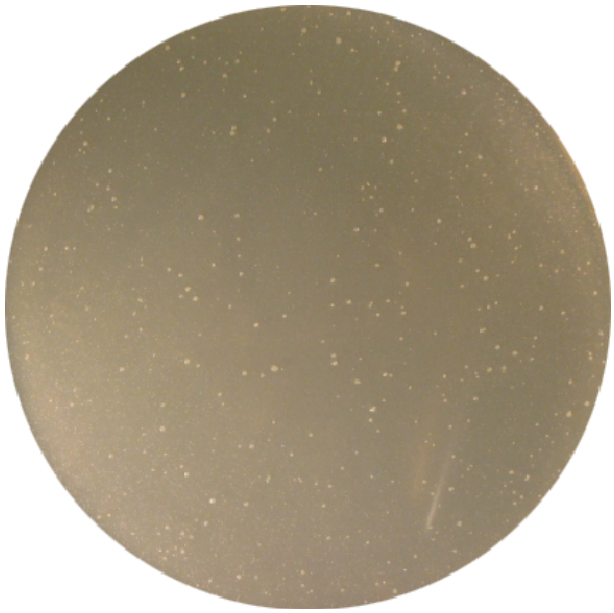


**Abbildung 37:** Selektion der Blc-Bibliothek auf Tris-Minimalmedium mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat auf potenzielle Lipocalin-Varianten mit enzymatischer Aktivität. Nach dreitägiger Inkubation haben sich vereinzelte Kolonien unterschiedlicher Göße gebildet.

Tatsächlich konnten 14 Kolonien identifiziert werden, die auf BCIP-haltigem Medium keine signifikante Blaufärbung zeigten, und deren Phänotyp offenbar nicht im Zuge einer spontanen Reversion durch die Aktivität einer Alkalischen Phosphatase ausgeprägt wurde. Die Plasmid-DNA von sechs dieser Klone zeigte in einem Restriktionsverdau mit den Enzymen *Hin*dIII/*Xba*I bwz. *Bst*XI das erwartete Restriktionsmuster und bestätigte somit die Päsenz einer intakten Lipocalin-Genkassette. Da der Phänotyp dieser Klone nach Retransformation von DH5α mit der Plasmid-DNA auf Selektionsmedium bestätigt werden konnte, wurde die

DNA von vier Klonen sequenziert (Abschnitt 2.2.7). Die Sequenz aller Klone war von Frameshift-Mutationen geprägt, insbesondere *Ochre*- oder *Opal*-Stopcodons in der abgeleiteten Aminosäuresequenz führten. Die kodierten Proteine stellten somit nicht funktionelle Anticaline dar. Die Ursache für den ausgelösten Phänotyp blieb unklar.

Die Selektionsexperimente mit den Prolin-Derivaten Z-Pro-OH und Fmoc-Pro-OH als Substrate führten nach mehrtägiger Inkubation zu einem einheitlichen Bild mit einer Vielzahl sichtbarer Kolonien unterschiedlicher Größe und Morphologie (Abbildung 38). Da nicht alle Kolonien einzeln analysiert werden konnten, wurde die Zellmasse von der Oberfläche der Agar-Platte geschabt, vereinigt und Plasmid-DNA isoliert (Abschnitt 2.2.3.2). Der Selektionsstamm JM83 wurde anschließend mit dieser DNA frisch transformiert und auf Selektionsmedium ausplattiert. Leider konnte auch nach mehrtägiger Inkubation kein Wachstum beobachtet werden, was auf die enzymatische Aktivität einer Lipocalin-Variante hingedeutet hätte.

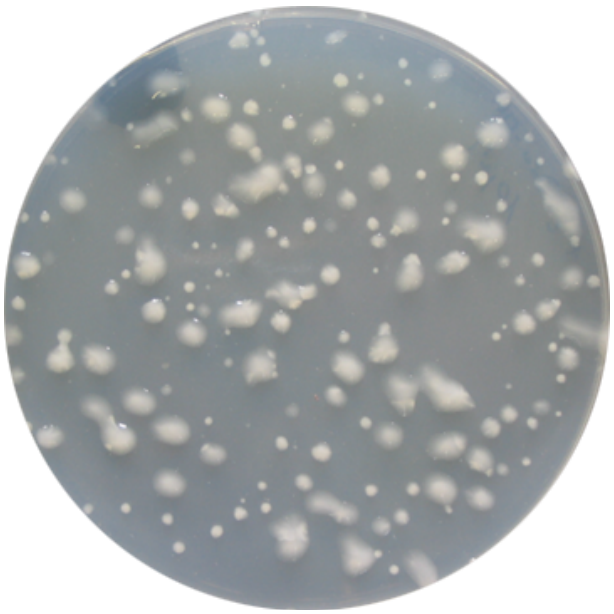


**Abbildung 38:** Selektion der Blc-Bibliothek auf M9 Minimalmedium mit Fmoc-Pro-OH als Substrat für potenzielle Lipocalin-Varianten mit enzymatischer Aktivität.

Bei einem weiteren Selektionsexperiment auf esterolytische Aktivität mit *E. coli* R879 und D-Biotin-p-Nitrophenylester (BNP) als Substrat wurde im Verlauf der Inkubation auf Agar-Platten bereits nach ein bis zwei Tagen ein basales Wachstum der Zellen beobachtet (Abbildung 39). Die Selektion einzelner Kolonien war unter diesen Bedingungen nicht möglich und eine effektive Selektion konnte somit nicht gewährleistet werden und

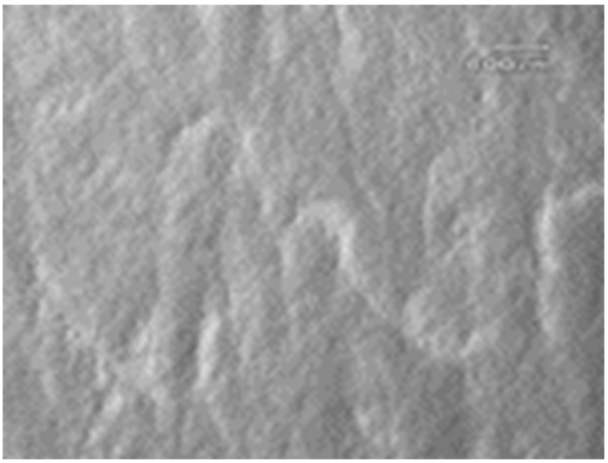


**Abbildung 39:** Basales Zellwachstum von *E. coli* R879 in einem *In-Vivo*-Selektionsexperiment mit BNP als Substrat für potenzielle Lipocalin-Varianten mit enzymatischer Aktivität.

Bei weiteren Selektionsexperimenten schließlich mit Orotat und oNPG als Substrat konnten im Verlauf der mehrtägigen Inkubationsphase keinerlei Kolonien beobachtet werden. Der *E. coli* Stamm X82 ließ sich bei dieser Selektion mit Orotat nur schlecht transformieren (Tabelle 11).

**Tabelle 12:** *In-Vivo*-Selektionen auf Agar-Medien mit einer Lipocalin-Bibliothek auf der Basis des Bilin-Bindungsproteins (siehe Abschnitt 3.2). Inkubation bei 22 °C bis zu 6 Wochen. Die Anzahl der dabei initial beobachteten Kolonien ist jeweils angegeben.

| ***E. coli*** | **Substrat (Konzentration)** | **Medium** | **Transformierte Zellen** | **Selektierte Kolonien** |
|---|---|---|---|---|
| R879 | BNP (10 pM) | M9 | $1{,}6 \cdot 10^8$ | Zellrasen |
| X82 | Orotat (10 µM) | M9 | $2{,}4 \cdot 10^7$ | 0 |
| JM83 | Z-Pro-OH (10 µM) | M9 | $1{,}0 \cdot 10^9$ | ~ 30 |
| JM83 | Fmoc-Pro-OH(10 µM) | M9 | $1{,}5 \cdot 10^9$ | ~ 50 |
| DH5α | oNPG (0,2 % w/v) | M9 | $1{,}3 \cdot 10^9$ | 0 |
| DH5α | pNPP (0,1 mM) | Tris-MM | $3{,}0 \cdot 10^9$ | > 100 |

Nachdem Selektionsexperimente auf der Grundlage der Blc-Bibliothek nicht erfolgreich waren, wurde eine weitere Lipocalin-Bibliothek auf der Basis des Bilin-Bindungsproteins hergestellt (Abschnitt 3.2). Die Bibliothek wurde ebenfalls, wie oben beschrieben, in verschiedenen *In-Vivo*-Selektionsexperimenten eingesetzt (Tabelle 12). Auch bei diesen Experimenten wurde mit den Substraten Z-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH und p-Nitrophenylphosphat initial die Bildung von Kolonien beobachtet. Allerdings konnte auch in diesen Fällen

bei der anschließenden Analsyse dieser Kolonien kein Anticalin mit enzymatsicher Aktivität isoliert werden.

### 3.3.5 Versuche zur Evolution durch wiederholte Zyklen von Selektion und Zufallsmutagenese

Wenngleich die Selektionsexperimente mit den nativen Lipocalin-Bibliotheken nicht zur Isolierung eines katalytisch aktiven Anticalins geführt hatten, konnten dennoch einige grundlegende Erkenntnisse gewonnen werden:

1. Abhängig vom jeweils eingesetzten *E. coli* Stamm wurde mitunter eine deutliche, wenn auch unterschiedlich starke Tendenz zu wenigen spontan auftretenden, falsch positiven Kolonien beobachtet. Die Ursache dafür mag im Einzelfall unterschiedlich sein, trotzdem wurde dadurch bestätigt, dass Selektionsprozesse unter definierten Bedingungen im Prinzip sehr effektiv sein können.
2. Sichtbare Einzelkolonien entstanden mitunter noch nach einer Inkubationsphase von über drei Wochen, was eindrucksvoll demonstriert, dass die Zellen unter Selektionsbedingungen auch nach langer Inkubationsphase ihre Vitalität nicht oder zumindest nicht vollständig einbüßen, also sehr lange Selektionsperioden auf festen Nährböden möglich sind.

Diese Erfahrungen führten zu der Schlußfolgerung, dass die ausbleibende Isolierung eines katalytischen aktiven Anticalins nicht an einer grundsätzlichen Unzulänglichkeit der etablierten Selektionsstrategien lag, sondern eher auf die unzulänglichen Eigenschaften der verwendeten Lipocalin-Bibliotheken zurückzuführen war. Aufgrund der verfügbaren Datenlage war anzunehmen, dass unter den Vertretern der erzeugten Bibliotheken bestenfalls sehr schwach ausgeprägte katalytische Aktivitäten vorhanden waren, die in den Selektionsexperimenten zu keinem visuell erkennbaren Phänotyp führte.

Daher wurden mit den drei vielversprechendsten Stategien weitere Selektionsexperimente durchgeführt. Dabei wurde versucht, in jeweils fünf aufeinanderfolgenden Selektionszyklen eine allmähliche Anreicherung katalytischer Varianten zu erreichen, indem durch Zufallsmutagense der isolierten Gesamt-DNA nach jeder Selektionsrunde erneut genetische Variabilität erzeugt wurde. Dadurch sollten auch Aminosäurepositionen außerhalb der ursprünglich randomisierten Positionen in den Lipocalin-Bibliotheken adressiert werden, um im Verlauf mehrer Selektionsrunden einen evolutiven Reifungseffekt zu erzielen und evtl. Varianten mit ausreichender katalytischer Aktivität nachweisen zu können.

Die Selektionsstrategien mit den Prolin-Derivaten Z-Pro-OH und Fmoc-Pro-OH sowie Orotsäure und oNPG erschienen für diese Experimente am besten geeignet, weil bei den vorangegangenen Selektionsexperimenten mit diesen Substraten insgesamt das niedrigste Hintergrundwachstum festgestellt worden war (Abschnitt 3.3.4). Außerdem ließen sich die dafür geeigneten *E. coli* Stämme JM83, X82 und DH5α effizient transformieren und hatten sich als genetisch relativ stabil erwiesen.

Bei diesen Experimenten wurden zunächst die entsprechenden *E. coli* Stämme durch Elektroporation (Abschnitt 2.2.2.2 und 3.1.5) mit Plasmid-DNA der beiden Lipocalin-Bibliotheken, basierend auf dem Bakteriellen Lipocalin (Blc; Abschnitt 3.1.8) und dem Bilin-Bindungsprotein (BBP; Abschnitt 3.2), transformiert. Es wurden jeweils fünf Elektoporationen durchgeführt, wobei für jeden Ansatz 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt wurde. Die Zellen wurden dann auf fünf Agar-Platten (14 cm) mit entsprechendem Selektionsmedium (Tabelle 13) ausplattiert und für fünf Tage bei 25 °C inkubiert.

**Tabelle 13**: Selektionsstrategien für die Durchführung aufeinanderfolgender Selektionszyklen auf Kulturplatten. Angegeben ist der verwendete *E. coli* Stamm, das eingesetzte Substrat sowie dessen Konzentration im Kulturmedium. Die Prolin-Derivate Z-Pro-OH und Fmoc-Pro-OH wurden kombiniert eingesetzt. Außerdem sind verwendete Additive im M9-Medium angegeben (vgl. Abschnitt 2.1.9). Abkürzungen: Glc = Glucose; Cam = Chloramphenicol; Thi = Thiamin; CAA, *Casamino Acids*; IPTG, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid.

| ***E. coli*** | **Substrat (Konz. in mM)** | **M9-Medium** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Glc** | **Cam** | **Thi** | **CAA** | **IPTG** |
| JM83 | Z-Pro-OH (0,1), Fmoc-Pro-OH (0,1) | ✓ | ✓ | ✓ | | ✓ |
| X82 | Orotsäure (0,5) | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| DH5α | oPNG (3,3) | | ✓ | ✓ | | ✓ |

Für den zweiten Selektionszyklus wurden die Zellen mit einem Zellspatel von den Platten abgelöst und mit der erhaltenen Zellmasse eine Plasmid-Midipräparation durchgeführt (Abbildung 40A; Abschnitt 2.2.3.2). Die Plasmid-DNA wurde anschließend als Matrizen-DNA für eine Zufallsmutagenese durch *Error-Prone* PCR eingesetzt (Abbildung 40B; Abschnitt 2.2.5.4). Dafür wurden die beiden Primerpaare BLC_H1/BLC_H8 und GB-1/GB-2 verwendet und eine Anlagerungstemperatur von 60 °C (Blc) bzw. 55 °C (BBP) gewählt. Der Reaktionsansatz wurde im Agarosegel aufgetrennt, das gewünschte Reaktionsprodukt durch Gelextraktion isoliert und anschließend unter Verwendung der oben genannten Primer in vier Standard-PCR Reaktionen amplifiziert, um genügend Material für die Herstellung von

DNA-Bibliotheken zu erzeugen (Abbildung 40C). Das Reaktionsprodukt wurde durch Agarose-Gelelekrophorese und Gelextraktion gereinigt, anschließend mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI verdaut und erneut gereinigt (Abbildung 40C; Abschnitt 2.2.5.1 und 3.1.4).

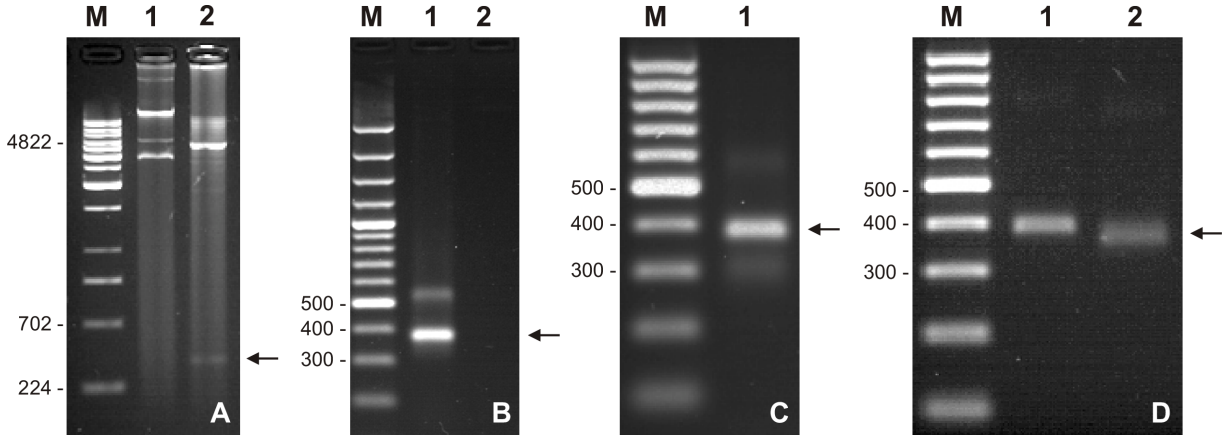



**Abbildung 40:** Präparation von *Bst*XI-Genfragementen nach einer *In-Vivo*-Selektion mit einer Lipocalin-Bibliothek für den Einsatz in einem neuen Selektionszyklus. A: Isolierung von Plasmid-DNA aus Zellen, die auf Agar-Medium einer *In-Vivo*-Selektion unterzogen worden sind: (1) Plasmid-Midipräparation; (2) Analyse der isolierten DNA durch Restriktionsverdau mit *Bst*XI. Die *Bst*XI-Kassette des rekombinanten Lipocalin-Gens ist durch Pfeil markiert. B: Zufallsmutagenese mit isolierter Plasmid-DNA: (1) *Error-Prone* PCR unter Verwendung der dNTP Analoga dPTP und 8-oxo-dGTP; (2) negativ Kontrolle ohne Plasmid-DNA als Matrizen-DNA. C: Vermehrung des mutierten DNA-Fragmentes durch PCR. D: Vorbereitung der amplifizierten DNA zur Klonierung auf dem Expressionsvektor pBlc9: (1) Isolierung der relevanten DNA Bande (ca. 390 bp) durch Gelextraktion; (2) Dieselbe DNA nach Restriktionsverdau mit *Bst*XI und Reinigung durch Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion (ca. 370 bp). M: DNA Größenstandard; die Größe relevanter DNA-Banden ist jeweils links in bp angegeben.

Die so erzeugten Genfragmente wurden anschließend für die Ligierung mit entsprechend vorbereiteter Plasmid-DNA der Vektoren pBlc9 bzw. pBlc10-BBP eingesetzt. Typischerweise wurde etwa 1 µg PCR-Fragment mit 10 µg des Vektor-Fragments ligiert. Nach der Ethanol-Fällung der Reaktionsansatzes (Abschnitt 2.2.4.4) wurde die Plasmid-Bibliothek für die Transformation des entsprechenden *E. coli* Stammes eingesetzt (siehe oben) und anschließend durch direktes Ausplattieren der transformierten Zellen auf frischem Selektionsmedium ein neuer Zyklus gestartet.

Die bei den einzelnen Transformationsexperimenten erreichten Komplexitäten sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Im ersten Zyklus (ohne *Error-Prone* PCR) bewegte sich die Anzahl tansformierter Zellen in einem Bereich zwischen 1 und $3 \cdot 10^9$ *cfu* und war damit angesichts der nur fünf jeweils durchgeführten Elektroporationen recht hoch (siehe oben). Bedingt

durch den Einsatz von Ligierungsansätzen – im Gegensatz zu intakter Plasmid-DNA im ersten Zyklus – sank in den anschließenden Selektionsrunden die Anzahl jeweils erhaltener Transformanden um etwa den Faktor 10, bewegte sich aber auf einem immer noch akzeptablen Niveau von ca. 1 bis $3 \cdot 10^8$ *cfu*.

**Tabelle 14:** *In-Vivo*-Selektion auf enzymatische Aktivität in Lipocalin-Bibliotheken, basiend auf dem Bakteriellen Lipocalin (Blc) bzw. dem Bilin-Bindungsprotein (BBP). Für jeden Selektionszyklus sind die ungefähre Anzahl transformierter *E. coli* Zellen (cfu) sowie die Anzahl selektierter Kolonien angegeben.

| **Selektionsrunde** | | **1** | | **2** | | **3** | | **4** | | **5** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Bibliothek** | | **Blc** | **BBP** | **Blc** | **BBP** | **Blc** | **BBP** | **Blc** | **BBP** | **Blc** | **BBP** |
| **$10^9$ cfu** | **oPNG** | 2,6 | 2,7 | 0,14 | 0,16 | 0,11 | 0,076 | 0,14 | 0,17 | 0,10 | 1,2 |
| | **Orotat** | 2,7 | 2,7 | 0,18 | 0,28 | 0,11 | 0,14 | 0,085 | 0,14 | 0,34 | 0,33 |
| | **Pro-Derivate** | 1,9 | 1,1 | 0,094 | 0,22 | 0,16 | 0,27 | 0,37 | 0,26 | 0,16 | 0,18 |
| **Selektierte Kolonien** | **oNPG** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 60 |
| | **Orotat** | 76 | 63 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | **Pro-Derivate** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |

Im Verlauf dieser Selektionen wurde mit allen drei Substraten mitunter die Bildung von Kolonien beobachtet (Tabelle 14), bei der Selektion mit oNPG als Substrat erstaunlicherweise erst in der letzten Selektionsrunde. Kulturplatten, auf denen sich während einer Inkubationsphase Kolonien entwickelten, wurden ggf. weiter bebrütet, bis die Kolonien einen Durchmesser von mindestens 0,5 mm erreicht hatten, um sie dann auf frisches Selektionsmedium zu übertragen. Diese Platten wurden für mehrere Tage bei 25 °C inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von bis zu mehreren Millimetern erreicht hatten. Das diente einerseits der Bestätigung des Phänotyps auf frischem Medium und andererseits der Vermehrung der selektierten Klone. Anschließend wurden die Kolonien von den Kulturplatten abgelöst und vereinigt, um davon Plasmid-DNA zu präparieren (Abschnitt 2.2.3.1).

Die so gewonnene DNA wurde dann für die erneute Transformation des für die jeweilige Selektion verwendeten *E. coli* Stammes eingesetzt, die Zellen wiederum auf Selektionsmedium ausplattiert und anschließend die Kulturplatten bis zu zwei Wochen bei 25 °C inkubiert. Dieser Schritt sollte zeigen, ob der ursprünglich beobachtete Phänotyp – also Wachstum unter Selektionsbedingungen – mit der isolierten Plasmid-DNA gekoppelt ist und somit möglicherweise durch die Aktivität einer Lipocalin-Variante vermittelt wird. Leider konnte dieser

Zusammenhang bei keiner der untersuchten Kolonien eindeutig nachgewiesen werden. Aufgrund dieser wenig ermutigenden Befunde wurden die Selektionsversuche damit eingestellt.

## 3.4 Biochemische Charakterisierung des Anticalins DigA16(H86N) mit Bindungsaktivität für Digoxigenin

### 3.4.1 Bakterielle Produktion und Reinigung von DigA16(H86N)

Für die umfassende biophysikalische Charakterisierung des Anticalins DigA16(H86N) wurde das Protein im *E. coli* hergestellt (Abschnitt 2.3.1.1). Die bakterielle Produktion erfolgte dabei mit Hilfe des Expressionsplasmids pBBP21-DigA16(H86N). Dieser Vektor ist identisch mit pBBP21-DigA16 (vgl. Schlehuber & Skerra, 2001), kodiert allerdings für das hinsichtlich der Ligandenaffinität verbesserte Anticalin DigA16(H86N), welches N-terminal mit der bakteriellen OmpA-Signalsequenz und C-terminal mit dem *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel fusioniert ist. Die Expression des Strukturgens steht dabei unter der Kontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators. Das künstliche Operon trägt auf einem zweiten Cistron zusätzlich das Gen für die *E. coli*-eigene Protein-Disulfidisomerase DsbC, deren Überexpression den Anteil an nativ gefaltetem rekombinantem Protein günstig beeinflussen kann (Schmidt *et al.*, 1998).

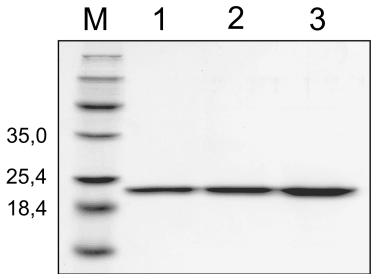



**Abbildung 41:** SDS-PAGE-Analyse des in *E. coli* produzierten und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten Anticalins DigA16(H86N). M: Protein Größenstandard (kDa); 1-3: Proben aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten zur Produktion und Reinigung des Anticalins DigA16(H86N).

Die bakterielle Produktion von DigA16(H86N) erfolgte im 2 L-Maßstab durch Sekretion in das Periplasma von *E. coli,* wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Anschließend wurde der Periplasmaextrakt einer Streptavidin-Affinitätschromatographie unterzogen, wobei das Anticalin mit D-Desthiobiotin spezifisch von der Säule eluiert wurde (Abschnitt 2.3.4.2). Die Ausbeute an Protein betrug 590 ± 120 µg (n = 3) bei einer durchschnittlichen Zelldichte von $OD_{550} \approx 1{,}4$ zum Zeitpunkt der Zellernte. Die Analyse des gereinigen Proteins durch SDS-PAGE zeigte, dass die Elutionsfraktionen augenscheinlich frei von Verunreinigungen waren (Abbildung 41). Vor dem Einsatz dieses Proteins in Bindungsexperimenten wurden die erhaltenen Fraktionen vereinigt und aufkonzentiert. Anschließend wurde eine Gelpermeations-Chromatographie durchgeführt um eventuelle Aggregate abzutrennen (Abschnitt 2.3.4.3).

### 3.4.2 Untersuchung der Liganden-Bindungseigenschaften von DigA16(H86N)

Die Bindungseigenschaften des Anticalins DigA16(H86N) gegenüber verschiedenen Digitalis-Steroiden war bereits zuvor durch Fluoreszenztitration (FT) untersucht worden (Peim, 2003). Dabei wurde für diese Variante eine sehr hohe Affinität für Digoxigenin (DIG) und Digitoxigenin (DTX) gemessen; die Affinität gegenüber DTX lag sogar im picomolaren Bereich. Im Verlauf dieser Experimente zeigte sich jedoch auch, dass eine hinreichend genaue Bestimmung der Affinitäten unter den etablierten Standardbedingungen schwierig war. Deswegen erschienen methodische Anpassungen notwendig, um eine möglichst exakte Bestimmung der Bindungskonstanten zu gewährleisten. Dazu zählte vor allem eine Reduzierung der Proteinkonzentration von dem zuvor gebräuchlichen Wert 1 µM auf 0,1 µM. Dies führt zu einer günstigeren Geometrie der resultierenden Messkurve im Bereich des Äquivalenzpunktes und damit höherer Genauigkeit der zu ermittelnden Dissoziationskonstante durch nicht lineare Regression anhand des Massenwirkungsgesetzes. Allerdings sind damit auch ein wesentlich niedrigeres Meßsignal sowie eine erhöhte Adsoptionstendenz der sehr verdünnten Proteinlösung verbunden, was eine Optimierung der experimentellen Vorgehensweise erforderte.

So wurde bei den hier durchgeführten Messungen eine kontinuierliche Abnahme der Fluoreszenz während der Titrationsexperimente beobachtet, die nicht mit dem FluoreszenzQuenching durch Ligandenbindung zu erklären war. Über einen typischen Messzeitraum von 20 min wurde reproduzierbar ein Absinken der Fluoreszenz einer nicht titrierten Protein-Probe um etwa 7 % verzeichnet. Um die Messdaten von diesem Effekt zu bereinigen, wurden Kontollexperimente ohne Zugabe von Ligand bei ansonsten identischen Bedingungen und exakter Einhaltung des zeitlichen Ablaufs durchgeführt (Abbildung 42). Die Datensätze wurden daraufhin zur Korrektur der Titrationskurven eingesetzt und die Auswertung der korrigierten Daten durch nicht-lineare Regression durchgeführt (Abschnitt 2.4.1). Auf diese Weise wurden für DigA16(H86N) mit den beiden Liganden DIG und DTX Dissoziationskonstanten von 1,22 ± 0,08 nM bzw. 0,565 ± 0,119 nM auf recht präzise Weise ermittelt (Abbildung 42B). Das maximale Fluoreszenz-Quenching lag mit beiden Liganden bei etwa 50 %.

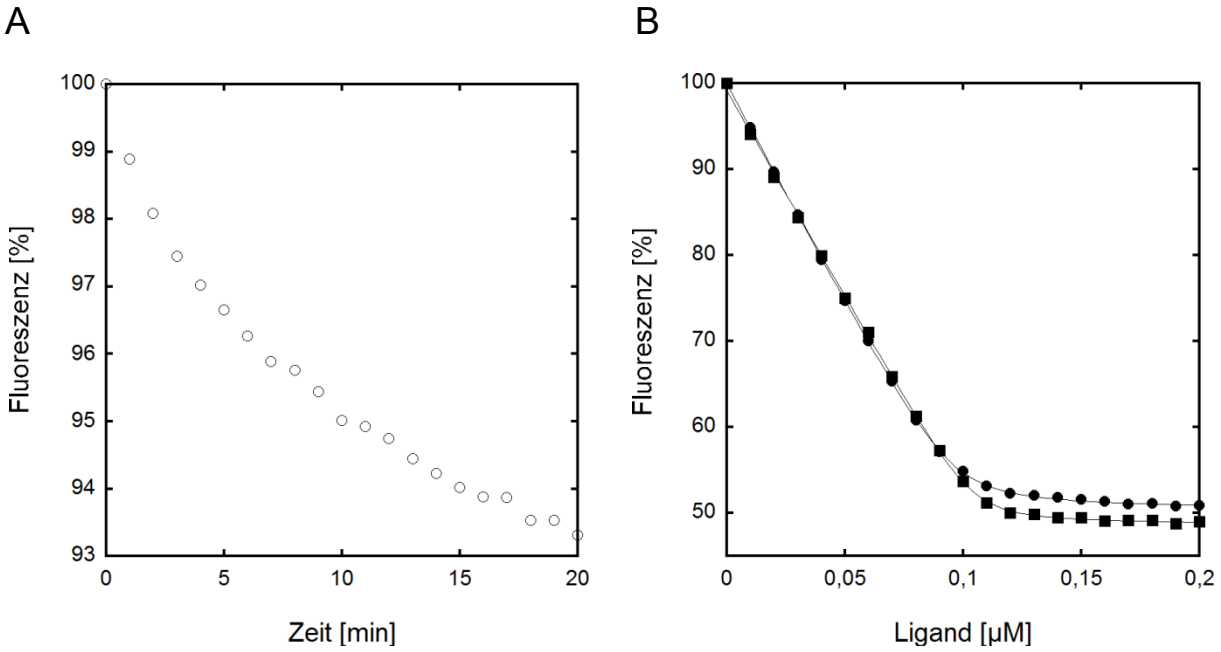



**Abbildung 42:** Untersuchung der Ligandenbindungseigenschaften des Anticalins DigA16(H86N) durch Fluoreszenztitration. A: Zeitlicher Fluoreszenzabfall einer 0,1 µM Lösung des Anticalins in PBS. Die Messung wurde an einem Fluoromax-3 Fluoreszenzspektrometer durchgeführt ($\lambda_{ex}$ = 284 nm, $\lambda_{em}$ = 350 nm), indem in Abständen von einer Minute die Fluoreszenz der Probe automatisiert aufgezeichnet wurde. Zwischen den Messungen war der Stahlengang des Anregungslichtes blockiert, um lichtinduzierte Quenchingeffekte zu minimieren. Die Daten wurden auf eine Anfangsfluoreszenz von 100 % normiert und gegen die Zeit aufgetragen. B: Fluoreszenztitration des Anticalins DigA16(N86N) mit den Digitalis-Steroiden Digoxigenin (●) und Digitoxigenin (■). Die experimentellen Parameter waren identisch mit A. Die Rohdaten wurden um den zeitabhängigen prozentualen Anteil des Hintergrund-Fluoreszenzabfalls (siehe A) korrigiert und anschließend auf 100 % Anfangsfluorezenz normiert. Die Kurven wurden entsprechend dem Massenwirkungsgesetz (Abschnitt 2.4.1) durch nicht-lineare Regression angepasst.

Um auch Informationen über die Kinetik der Digoxigenin-Bindung zu erhalten, wurden mit dem Anticalin DigA16(H86N) Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) Messungen an einem Biacore 2000 Gerät durchgeführt (Abschnitt 2.4.3). Dafür wurden die zwei Flusszellen eines Sensorchips durch EDC/NHS-Kopplung mit dem Trägerprotein RNase A bzw. Digoxigenin-gekoppelter RNase A funktionalisiert und das Anticalin in unterschiedlichen Konzentrationen appliziert. Das Differenzsignal der beiden Flusszellen wurde aufgezeichnet und graphisch über der Zeit aufgetragen (Abbildung 43). Die Korrektur und Auswertung der Daten erfolgte mit der Gerätesoftware wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben. Dabei zeigte sich, dass die Kinetik der Liganden-Assoziation relativ langsam verläuft ($k_{on}$ = 2,24 ± 0,004 · $10^4$ $M^{-1}$ $s^{-1}$) und die Halbwertszeit der Dissoziation mit $\tau$ = 3,8 h erstaunlich hoch ist ($k_{off}$ = 5,11 ± 0,74 · $10^{-5}$ $s^{-1}$), woraus eine verhältnismäßig niedrige Dissoziationskonstante von 2,3 nM resultiert. Dieser

Wert steht in guter Übereinstimmung mit dem Ergebnis, das auch für den freien Liganden DIG durch Fluoreszenztitration ermittelt wurde (siehe oben).

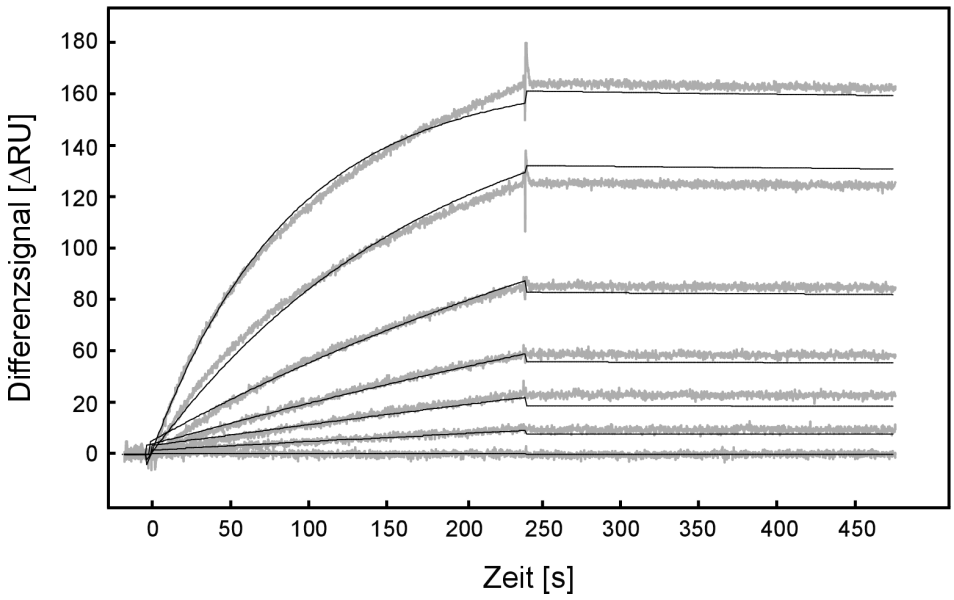



**Abbildung 43:** Echtzeitanalyse der Digoxigenin-Bindung des Anticalins DigA16(H86N) durch SPR-Messung an einem Biacore-Gerät. Die Trägeroberfläche beider Kanäle eines SPR Sensorchips CMD 200m wurden durch Aminkopplung mit Digoxigenin-gekoppelter RNase A bzw. freier RNase A im Referenzkanal funktionalisiert. Anschließend wurde nacheinander je 100 µl des Anticalins in unterschiedlichen Konzentrationen appliziert (0, 5, 10, 25, 50, 100, 250 und 500 nM). Nach jedem Messzyklus wurde die Oberfläche mit 10 mM Glycin/HCl pH 2,0 regeneriert. Das jeweilige Sensorgram wurde einer doppelten Hintergrund-Korrektur unterzogen (Myszka, 1999) und die Daten durch globale nicht-lineare Regression entsprechend einem 1:1 Langmuir-Bindungsmodell ausgewertet (Abschnitt 2.4.3).

Die Thermodynamik der DigA16(H86N)•DIG-Wechselwirkung wurde mit einem Isothermal-Titrationskalorimeter untersucht (Abschnitt 2.4.4). Dazu wurde die Wärmetönung der Bindungsreaktion bei schrittweiser Zugabe einer Lösung von DIG gemessen und gegen das Anticalin:Ligand-Verhältnis graphisch aufgetragen. Diese Messung ergab, dass die Liganden-bindung von DigA16(H86N) enthalpiegetrieben ist (Abbildung 44) und mit einem stark exothermen Effekt (-15,0 kcal/mol) bei einer negativen Änderung der Entropie einhergeht (-14,2 cal $K^{-1}$ $mol^{-1}$). Die Auswertung des Datensatzes ergab eine Stöchiometrie von 0,8 Bindungsstellen pro Molekül und eine Assoziationskonstante von $7{,}69 \pm 0{,}83 \cdot 10^{-7}$ $M^{-1}$. Die entsprechende Dissoziationskonstante von etwa 14 nM lag damit deutlich über den Werten, die durch FT und SPR ermittelt wurden (siehe oben).

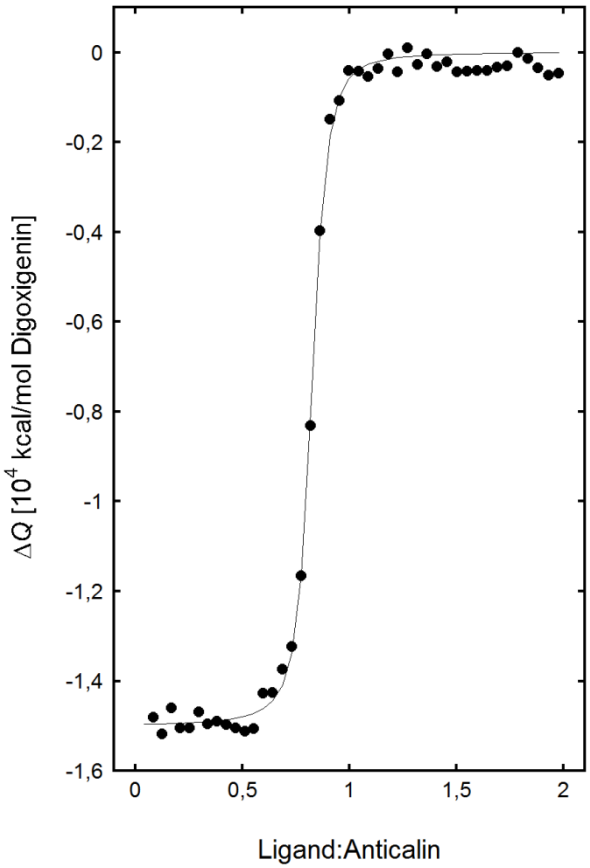



**Abbildung 44:** Isotherme Titrationskalorimetrie des Anticalins DigA16(H86N) mit Digoxigenin. Die Messzelle des Kalorimeters wurde mit einer 8,5 µM Lösung DigA16(H86N) in PBS, 3 % (v/v) DMF beladen. Die Messung wurde bei 25 °C durchgeführt, indem schrittweise eine 100 µM Lösung Digoxigenin in PBS, 3 % (v/v) DMF zugegeben wurde. DMF diente dabei als Lösungsmittel für das Steroid. Die Modellierung der Daten erfolgte gemäß dem standard 1:1-Bindungsmodell der Gerätesoftware.

## 3.5 Fusionsproteine aus dem Anticalin DigA16(H86N) und der β-Lactamase AmpC aus *Enterobacter cloacae*

Mit dem optimierten Anticalin DigA16(H86N) stand erstmals ein künstliches Bindeprotein zur Verfügung, das aufgrund seiner ausgezeichneten physikalisch-chemischen Eigenschaften in Konkurrenz zu kommerziell erhältlichen Anti-DIG-Antikörpern treten konnte. Besonders interessant erschien daher die Konstruktion von Fusionsproteinen aus diesem Anticalin und geeigneten Reporter-Enzymen, um gängige käufliche Reagenzien mit vergleichbaren Eigenschaften – meist Antikörper-Konjugate – ersetzen zu können.

Ein solches Fusionsprotein wurde zunächst im Rahmen einer Bachelor-Arbeit am Lehrstuhl für Biologische Chemie konstruiert (Voreck, 2007). Der entsprechende Expressionsvektor pBBP64 basiert auf pBBP21 (Beste *et al.*, 1999) und kodiert für ein Fusionsprotein bestehend

aus DigA16(H86N), dessen C-Terminus mittels einer Linker-Sequenz von fünf Aminosäuren (GlyGlyGlySerAla) mit dem Strukturgen der β-Lactamase AmpC aus *Enterobacter cloacae* WS1293 fusioniert ist. Der C-Terminus der β-Lactamase ist seinerseits mit dem *Strep*-tag II gekoppelt (Abbildung 45). Dieses Fusionsprotein wird im Folgenden als DigA16(H86N)-AmpC bezeichnet.

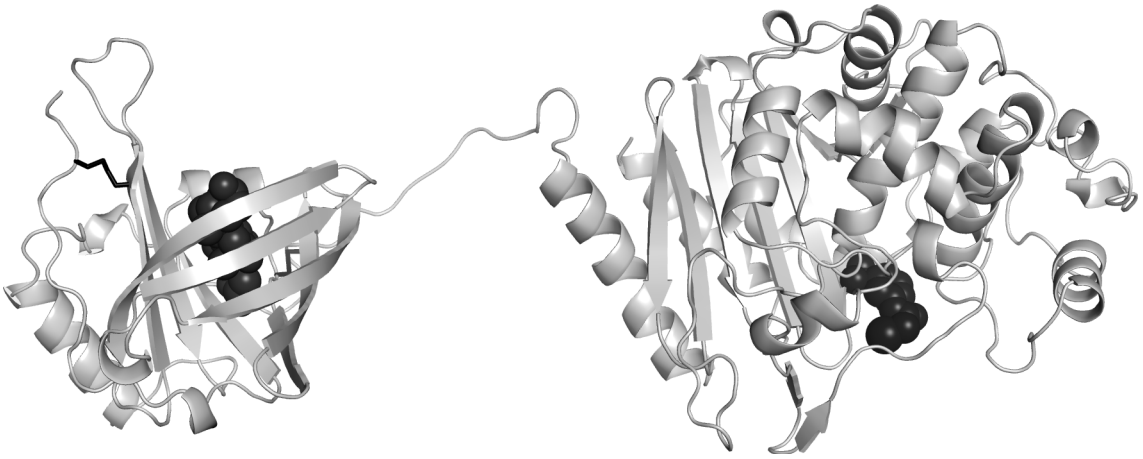


**Abbildung 45:** Strukturmodell des Fusionsproteins DigA16(H86N)-AmpC, basierend auf den Kristallstrukturen des Anticalins DigA16 (PDB ID: 1LKE) und der AmpC β-Lactamase aus *Enterobacter cloacae* 908R (PDB ID: 1S6R). Die beiden Disulfidbindungen des Anticalins sind schwarz hervorgehoben. Der Ligand Digoxigenin sowie das kovalent gebundene Übergangszustandsanalogon 4-Iodo-acetamidophenylboronsäure sind als Kalottenmodell dargestellt.

DigA16(H86N)-AmpC konnte zwar in *E. coli* überproduziert werden, es zeigte sich allerdings, dass eine effiziente Reinigung des rekombinanten Proteins mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie nicht möglich war. Offenbar lag das Affinitätsanhängsel in diesem Fusionsprotein in einer sterisch nicht zugänglichen Konformation vor.

### 3.5.1 Entwicklung des Expressionsvektors

Um dieses Problem zu lösen, waren grundsätzlich zwei unterschiedliche Strategien denkbar: Die Verlagerung des *Strep*-tag II innerhalb des Fusionsproteins, z. B. an dessen N-Terminus, oder ein Austausch des *Strep*-tag II gegen ein alternatives Affinitätsanhängsel, wie z. B. das $His_6$-tag. Letztere Alternative erschien insbesondere in Hinblick auf eine geplante Produktion des Proteins im Fermentations-Maßstab attraktiv, wenn größere Volumina periplasmatischen Rohextraktes einer chromatographischen Reinigung unterzogen werden müssen und hohe Ausbeuten an Protein zu erwarten sind. Unter diesen Umständen bietet die Metallchelat-Chromatographie Vorteile.

Für die Konstruktion eines entsprechenden Expressionsplasmids, das für ein Fusionsprotein mit dem C-terminalem *His*$_6$-tag kodiert, wurde der Sequenzabschnitt für das DigA16(H86N)-AmpC Fusionsprotein zunächst durch PCR mit *Pfu* DNA-Polymerase amplifiziert. Dazu wurden pBBP64 als Matrizen-DNA sowie die Primer D20 und ampC2 eingesetzt. Das Reaktionsprodukt wurde einem Restriktionsverdau mit *Xba*I unterzogen und anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt (Abschnitt 2.2.4.2). Weiterhin wurde pASK75-his, ein Derivat des generischen Experessionsvektors pASK75 (Skerra, 1994b), mit den Enzymen *Xba*I und *Eco*47III geschnitten, der Reaktionsansatz durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das Vektor-Fragment isoliert. Die beiden so hergestellten Fragmente wurden in einer Ligierungsreaktion verknüpft und der entstandene Vektor pBBP65 durch Restriktionsverdau und Sequenzierung des klonierten Genabschnittes überprüft. Auf diesem Vektor ist das Fusionsprotein N-terminal mit der OmpA-Signalsequenz und C-terminal mit dem *His*$_6$-tag fusioniert. Anders als pBBP64 kodiert dieser Vektor nicht für ein dicistronisches Operon mit dem *dsbC*-Gen (vgl. Abbildung 46). Das Fusionsprotein mit N-terminalem His$_6$-*tag* wurde als DigA16(H86N)-AmpC2 bezeichnet.

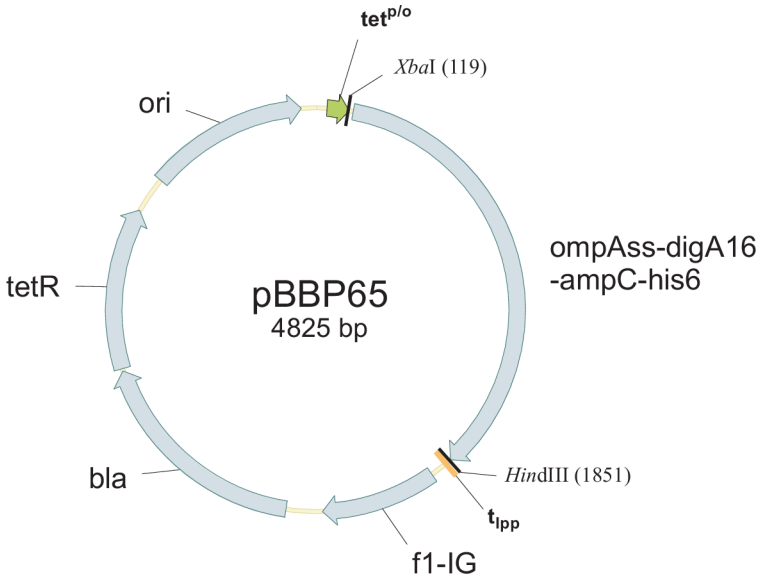



**Abbildung 46:** Schematische Darstellung des Expressionsvektors pBBP65. Der Vektor kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus dem Anticalin DigA16(H86N) und der AmpC β-Lactamase aus *Enterobacter cloacae*. N-terminal ist die OmpA-Signalsequenz vorangestellt, um den Export des Proteins in das Periplasma von *E. coli* zu erreichen. C-terminal trägt das Fusionsprotein das *His*$_6$-tag, um die Reinigung mittels IMAC zu ermöglichen. Das Fusionsprotein steht unter der Kontrolle der tet-Promotors. Weitere genetische Elemente sind der ColEI-Replikationsursprung (ori), das Ampicilin-Resistenzgen (bla) sowie die intergene Region des Phagen f1 (f1-IG). Außerdem sind die diagnostisch relevanten Schnittstellen *Xba*I und *Hin*dIII eingezeichnet.

### 3.5.2 Heterologe Produktion und Reinigung des Fusionsproteins DigA16(H86N)-AmpC2

Das Fusionsprotein DigA16(H86N)-AmpC2 mit dem C-terminalen *His*$_6$-tag wurde zunächst im 2 L-Maßstab in *E. coli* JM83 produziert (Abschnitt 2.3.1.1). Da die erzielte Ausbeute an Protein von etwa 0,8 mg für eine umfangreiche biochemische Charakterisierung nicht ausreichend war, wurde das Fusionsprotein anschließend im 8 L-Laborfermenter produziert (Abschnitt 2.3.1.2). Dafür kam erstmals der neuartige *E. coli* Stamm JM83(Δ*skp*::*proBA*$^+$) zum Einsatz. Dieser Stamm ist von *E. coli* JM83 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) abgeleitet, welcher sich für die gentechnische Sekretion rekombinanter Proteine im Schüttelkolben sehr bewährt hat (Skerra, 1989). Durch den Einsatz einer auf induzierter homologer Rekombination basierenden Methode zur Gen-Inaktivierung (Datsenko & Wanner, 2000) wurde im Parentalstamm JM83 das *skp*-Gen (Holck & Kleppe, 1988) durch eine Kopie des *E. coli* eigenen *proBA*-Operons ersetzt. Diese Manipulation führte zur Komplementierung der Prolin Auxotrophie von *E. coli* JM83. Der resultierende Stamm ist somit im Gegensatz zu seinem Vorgänger JM83 auch ohne spezielle Vektoren (vgl. Fiedler & Skerra, 2001a) für die Protein-Produktion im Laborfermenter mit synthetischen Glucose-Minimalmedien geeignet.

Während der Wachstumsphase des Fermentationsexperiments zeigte sich dieser Stamm sehr vital und tolerierte das Minimalmedium bestens. Im Verlauf der Induktionsphase – also nach Zugabe von Anhydrotetracyclin zur Einleitung der Genexpression – wurden allerdings Anzeichen verstärkter Zelllyse beobachtet. Daher wurde die Induktionszeit von den sonst üblichen 2,5 Stunden auf 2 Stunden verkürzt.

Nach Dialyse des periplasmatischen Rohextrakts wurde das Fusionsprotein durch IMAC gereinigt (Abschnitt 2.3.4.1). Dabei zeigte sich zunächst, dass das Fusionsprotein schon bei einer relativ geringen Imidazol-Konzentration von etwa 50 mM von der Säule eluierte und damit zunächst nur unzureichend von unspezifisch gebundenem Wirtsprotein getrennt wurde. Es erwies sich daraufhin als zweckmäßig, einen möglichst flachen Imidazol-Gradienten von 0-100 mM zu verwenden. Auf diese Weise konnte eine befriedigende Trennung des Fusionsproteins erreicht werden (Abbildung 47A).

Die Analyse der Hauptelutionsfraktion durch SDS-PAGE bestätigte, dass die Probe aus einem Hauptprodukt mit einer apparenten Molekülmasse von etwa 60 kDa bestand, welches dem Fusionsprotein DigA16(H86N)-AmpC2 mit einem kalkulatorischem Molekulargewicht von 60,2 kDa zugeordnet werden konnte (Abbildung 47B). Daneben trat eine schwach ausgeprägte Bande mit einer Molmasse von etwa 42 kDa auf, bei der es sich vermutlich um ein

proteolytisches Abbauprodukt des Fusionsproteins handelte. Durch anschließende Gelfiltration konnte diese „Kontamination“ abgetrennt werden, was zu augenscheinlich reinem Fusionsprotein führte.

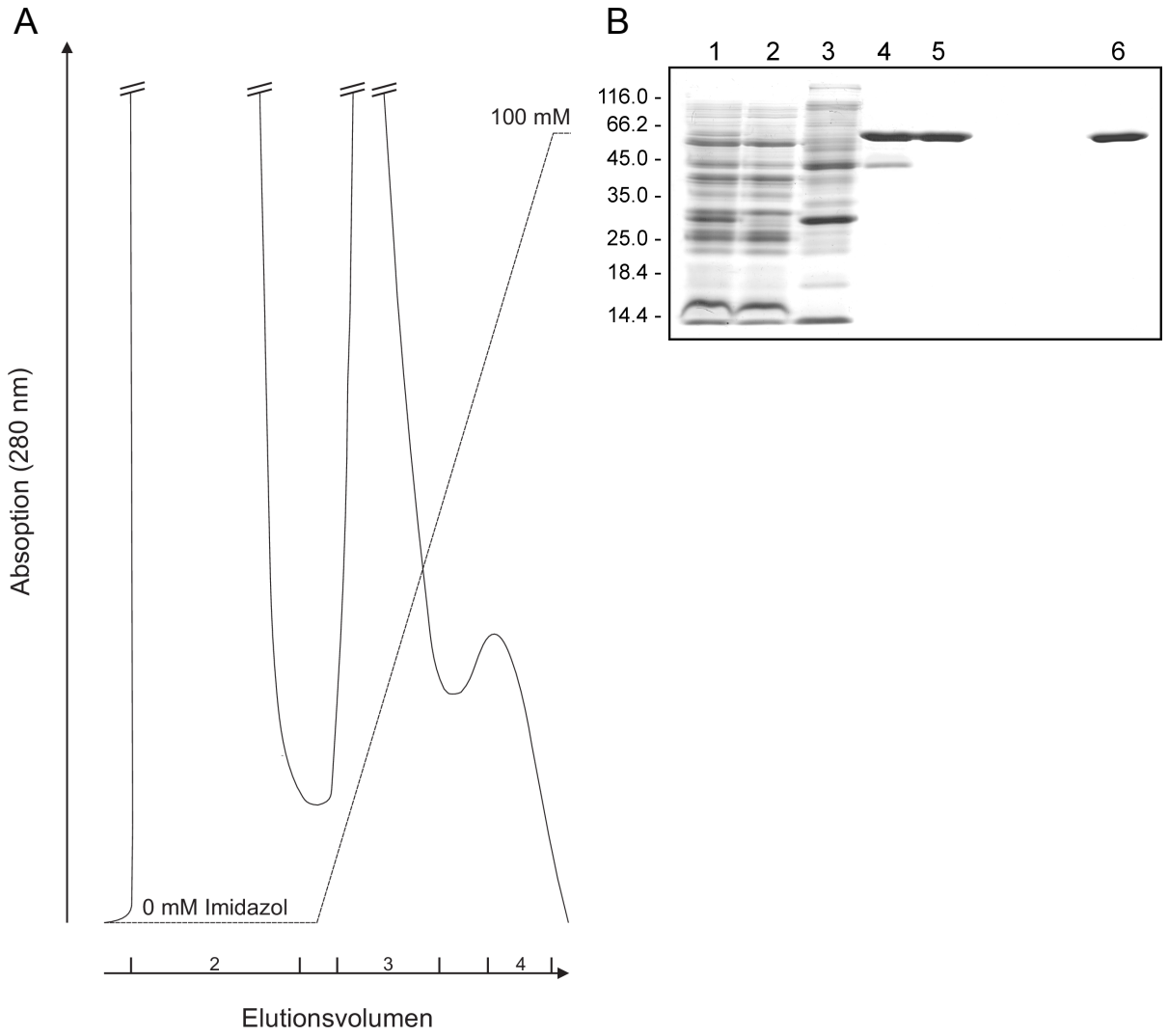



**Abbildung 47:** Reinigung des Fusionsproteins DigA16(H86N)-AmpC2. A: Isolierung des Fusionsproteins durch IMAC. Die gesammelten Elutionsfraktionen sind gekennzeichnet und wurden für die SDS-PAGE eingesetzt. B: Analyse des gereinigten Fusionsproteins durch SDS-PAGE. Aufgetragen wurden reduzierte Proben des periplasmatischen Zellextraktes (1), des nicht an die Säule gebundenem Proteins (2), sowie die Elutionsfraktionen mit „unspezifisch“ an das Säulenmaterial gebundenem Wirtsprotein (3) und dem rekombinantem Fusionsprotein (4). Außerdem wurden Proben des gelfiltrieten DigA16(H86N)-AmpC2 im reduzierten (5) und nicht-reduzierten Zustand (6) aufgetragen. Die geringfügig beschleunigte Mobilität im nicht-reduzierten Zustand ist auf die zwei Disulfidbrücken des Anticalins zurückzuführen, die dem denaturierten Protein zumindest teilweise eine kompaktere Form verleihen.

Das so gereinigte Fusionsprotein wurde abschließend durch analytische Größenausschlusschromatographie analysiert (Abbildung 48). Es eluierte als monodisperse Spezies bei einem

Elutionsvolumen von 9,1 mL, entsprechend einer apparenten Molmasse von etwa 52 kDa. Dieser Wert stimmt mit dem berechneten Molekulargewicht von ca. 60 kDa relativ gut überein und bestätigte, dass dieses Fusionsprotein in Lösung als Monomer vorliegt.

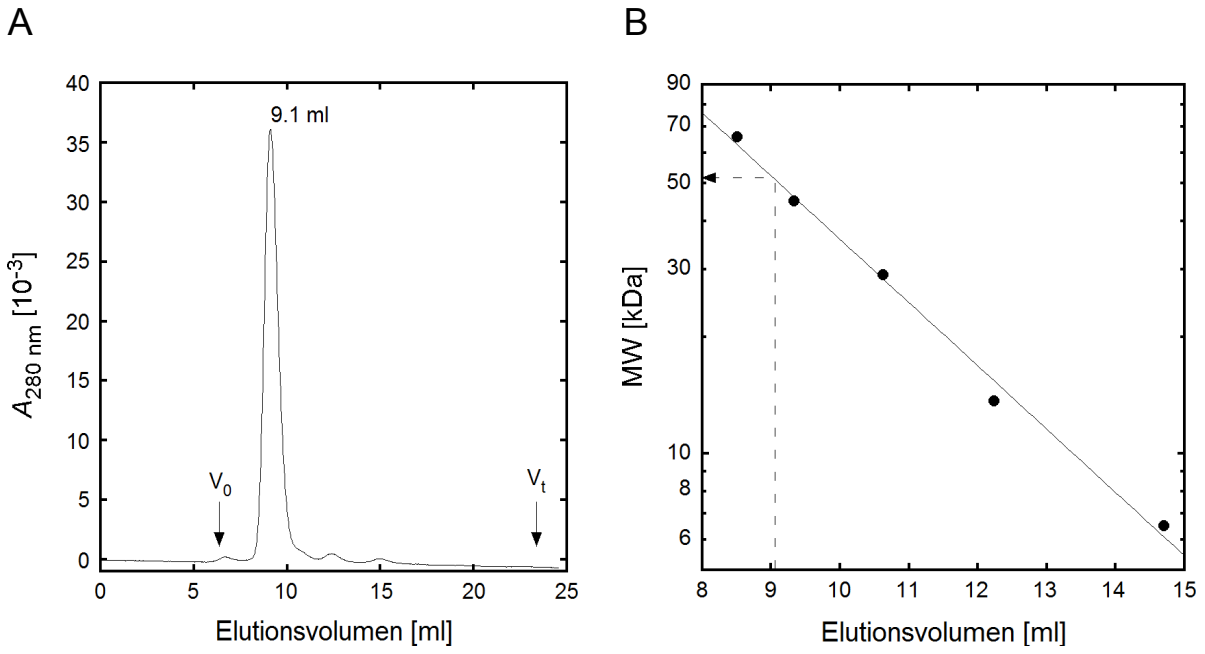



**Abbildung 48:** Analytische Größenausschlußchromatographie des gereinigten Fusionsproteins DigA16(H86N)-AmpC mit PBS als Laufpuffer. A: Elutionsprofil; $V_0$ und $V_t$ bezeichnen das Ausschluss- bzw. Bettvolumen der verwendeten Superdex 75 HR 10/30 Säule. B: halblogarithmische Auftragung der Marker-Proteine Aprotinin (6,5 kDa), RNase A (13,7 kDa), Carboanhydrase (29,0 kDa), Ovalbumin (43,0 kDa) und Rinderserumalbumin (66,0 kDa). Die experimentell ermittelte Molmasse von DigA16(H86N)-AmpC2 ist durch den gestrichelten Pfeil gekennzeichnet.

### 3.5.3 Biochemische und funktionelle Charakterisierung des Fusionsproteins DigA16(H86N)-AmpC2

Um die katalytische Aktivität der β-Lactamase als Teil des Fusionsproteins DigA16(H86N)-AmpC2 zu untersuchen, wurde das kommerziell erhältliche Cephalosporin-Derivat CENTA (Jones *et al.*, 1982b) als Substrat verwendet (Abbildung 49). Gegenüber dem in der Vergangenheit häufig eingesetzten, aber kommerziell kaum erhältlichen Substrat Nitrocefin (O'Callaghan *et al.*, 1972b) hat es vor allem den Vorteil einer verbesserten Löslichkeit in wässrigen Puffern. Da dieses Substrat bisher relativ wenig Beachtung gefunden hatte und keine eindeutigen Literaturangaben zum Absorptionskoeffizienten des Hydrolyse-Produktes verfügbar waren, wurde dieser hier experimentell bestimmt. Dazu wurde 1 mL einer 50 µM

Lösung von CENTA in PBS mit DigA16(H86N)-AmpC2 (1 nM) bis zur Konstanz des Absorptionssignals bei 405 nm inkubiert (ca. 1 h). Aus dem Absorptionsspektrum dieses Reaktionsansatzes wurde anschließend der molare Absorptionskoeffizient bei einer Wellenlänge von 405 nm zu 9180 $M^{-1}$ $cm^{-1}$ ermittelt (Abbildung 49B).

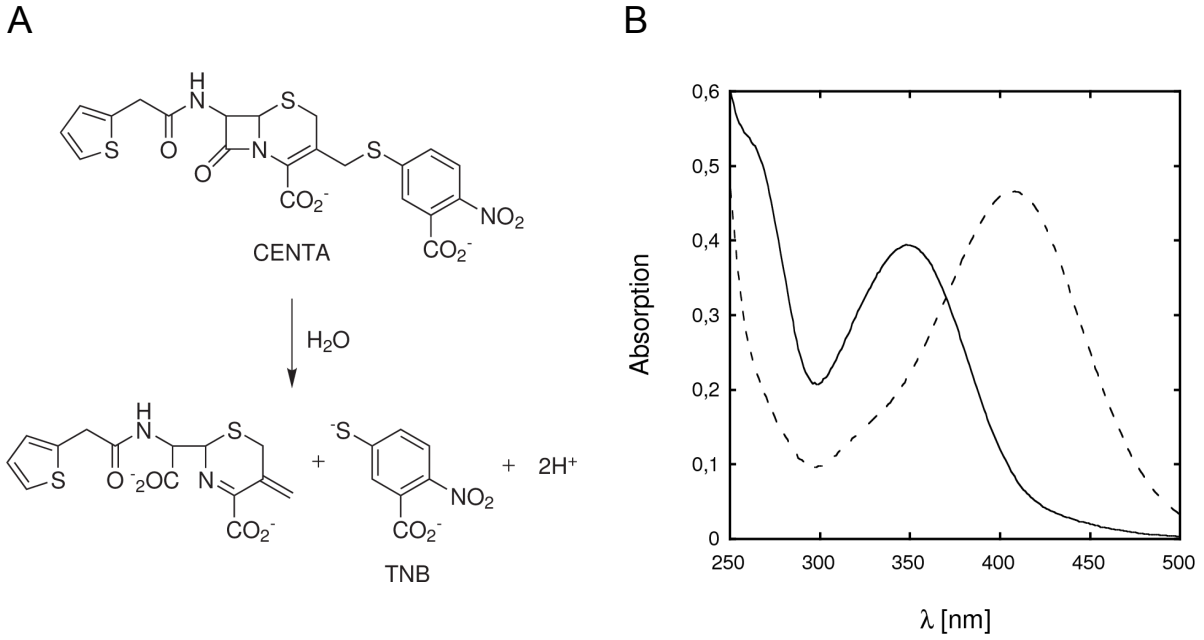



**Abbildung 49:** Das chromogene β-Lactamase Substrat CENTA (Molmasse: 535,6). A: Reaktionsschema für die Hydrolyse von CENTA. Durch Öffnung des β-Lactam Ringes und die damit einhergehende Umlagerung des π-Elektronensystems kommt es zur Freisetzung der chromogenen Abgangsgruppe (O'Callaghan *et al.*, 1972a) 3-Carboxyl-4-nitrothiophenol (TNB). B: Absorptionsspektrum von CENTA vor (durchgezogen) und nach der vollständigen enzymatischen Hydrolyse (gestrichelt) einer 50 µM Lösung in PBS. Es kommt durch die Abspaltung von TNB zu einer Verschiebung des Absoptionsmaximums von 340 nm nach etwa 405 nm ($\varepsilon_{405}$ = 9180 $M^{-1}$ $cm^{-1}$).

Zum Vergleich wurden neben DigA16(H86N)-AmpC2 auch die enzymatischen Eigenschaften des analogen Fusionsproteins DigA16(H86N)-TEM1 untersucht, das aus früheren Studien stammte (siehe Abschnitt 1.2). In diesem Fusionsprotein ist das Anticalin C-terminal mit der TEM-1 β-Lactamase von Transposon Tn3 aus *E. coli* (Heffron *et al.*, 1975) fusioniert. Für die Bestimmung der enzymatischen Parameter wurden zunächst mehrere Reaktionen mit unterschiedlicher Substratkonzentration (CENTA) angesetzt (vgl. Abschnitt 2.3.9). Die Auswertung der Rohdaten erfolgte unter Annahme des Michaelis-Menten-Modells, wie in Abschnitt 2.3.9 beschrieben.

Beide Fusionsproteine zeigten eine Enzymkinetik mit typischem Sättigungsverhalten bei steigender Substratkonzentration (Abbildung 50A). Die kinetischen Parameter für die enzymatische Hydrolyse von CENTA lagen bei beiden Fusionsproteinen im Bereich publizierter Werte für die Enzyme alleine (Tabelle 15). Die Wechselzahl ($k_{cat}$) der β-Lactamase AmpC2 im Fusionsprotein lag bei rund 490 $s^{-1}$ und war damit etwa 18-mal höher als die Aktivität des analogen Fusionsproteins mit dem Enzym TEM-1 ($k_{cat}$ = 27 $s^{-1}$).

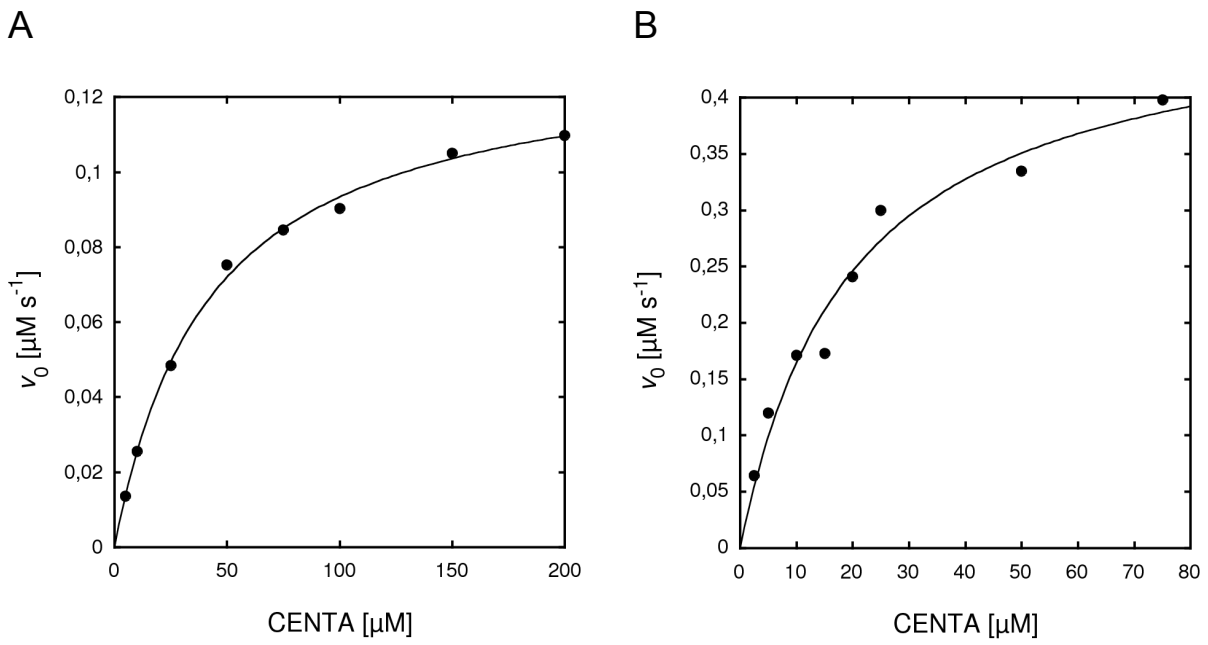



**Abbildung 50:** Michaelis-Menten-Kinetik zweier Fusionsproteine bestehend aus dem Anticalin DigA16(H86N) und entweder β-Lactamase TEM-1 (A) oder AmpC2 (B). Als Substrat wurde CENTA in PBS eingesetzt. Die Hydrolyse dieses Substrates wurde als Änderung der Absorption bei 405 nm aufgezeichnet und die ermittelte Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion ($v_0$) gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die Auswertung der Daten erfolgte gemäß Abschnitt 2.3.9. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Achsen.

**Tabelle 15:** Kinetische Parameter der β-Lactamasen TEM-1 und AmpC als Bestandteil ihrer Fusionsproteine mit dem Anticalin DigA16(H86N). Als Substrat wurde das chromogene Cephalosporin-Derivat CENTA verwendet.

| **Enzym** | $K_m$ **[µM]** | $k_{cat}$ **[$s^{-1}$]** | $k_{cat}/K_m$ **[$\mu M^{-1}$ $s^{-1}$]** |
|---|---|---|---|
| DigA16(H86N)-AmpC2 | 19,8 ± 4,0 | 489 ± 40 | 24,8 ± 7,0 |
| DigA16(H86N)-TEM1 | 42,1 ± 2,6 | 26,6 ± 0,58 | 0,63 ± 0,052 |
| AmpC (*Enterobacter cloacae* 908R)[a] | 10 | 110 | 11 |
| TEM-1 (*E. coli*)[a] | 70 | 110 | 1,6 |

[a] publizierte Werte mit CENTA als Substrat (Bebrone *et al.*, 2001)

Aufgrund der ähnlichen Michaelis-Konstanten ($K_m$) beider Fusionsproteine resultierte insgesamt eine fast 40-fach höhere enzymatische Effizienz ($k_{cat}/K_m$) der β-Lactamase aus *E. cloacae* in DigA16(H86N)-AmpC2. Offenbar ist die enzymatische Aktivität von AmpC vollständig erhalten und wird nicht durch die Fusion mit dem Anticalin beeinträchtigt, während die Aktivität von TEM-1 im Vergleich mit publizierten Werten reduziert ist.

Die Liganden-Bindungsaffinität des Fusionsproteins DigA16(H86N)-AmpC2 in Lösung wurde durch Fluoreszenztitration mit Digoxigenin (DIG) untersucht (Abschnitt 2.4.1), ähnlich wie für das unfusionierte Anticalin. Die Fluoreszenzintensität der Proteinlösung ($\lambda_{ex}$ = 295 nm; $\lambda_{em}$ = 345 nm) wurde in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration aufgetragen und die Kurve durch nicht-lineare Regression anpasst (Abbildung 51). Bei diesem Experiment wurde eine Dissoziationskonstante $K_d$ von 13,5 ± 2,9 nM ermittelt. Dieser Wert ist etwa 11-fach höher als der für das isolierte Anticalin DigA16(H86N) gemessene Wert. Obwohl die Fusion mit der β-Lactamase offensichtlich die Bindungsaktivität des Anticalins negativ beeinflusst, ist die Affinität dieses Fusionsproteins immer noch signifikant höher als die des Vorgänger-Anticalins DigA16 (30,2 nM; Schlehuber *et al.*, 2000). Weiterhin wurde bei diesem Experiment eine deutlich reduzierte maximale Fluoreszenzlöschung von 22 % gegenüber 45 % für das isolierte Anticalin DigA16(H86N) beobachtet (vgl. Abbildung 42). Dies ist hauptsächlich auf den Fluoreszenzbeitrag der β-Lactamase als Fusionspartner zurückzuführen, der durch die Ligandenbindung nur unwesentlich beeinflusst wird.

Um die bifunktionellen Eigenschaften des Fusionsproteins DigA16(H86N)-AmpC2 zu untersuchen wurden in ELISA-Experimenten durchgeführt. Dazu wurde eine ELISA-Platte mit DIG-markiertem BSA beschichtet und nach Inkubation mit dem Fusionsprotein dessen katalytische Aktivität anhand der Farbänderung von CENTA quantifiziert (siehe oben). Die resultierende Bindungsisotherme zeigt ein typisches Sättigungsverhalten bei steigender Proteinkonzentration (Abbildung 51B). Die Auswertung der Daten durch nicht-lineare Regression (Abschnitt 2.3.8.1) führte zu einer apparenten Dissoziationskonstante ($K_d$) von 14,6 ± 1,1 nM gegenüber der DIG-Gruppe, was gut mit dem durch Fluoreszenztitration ermittelten Wert übereinstimmt.

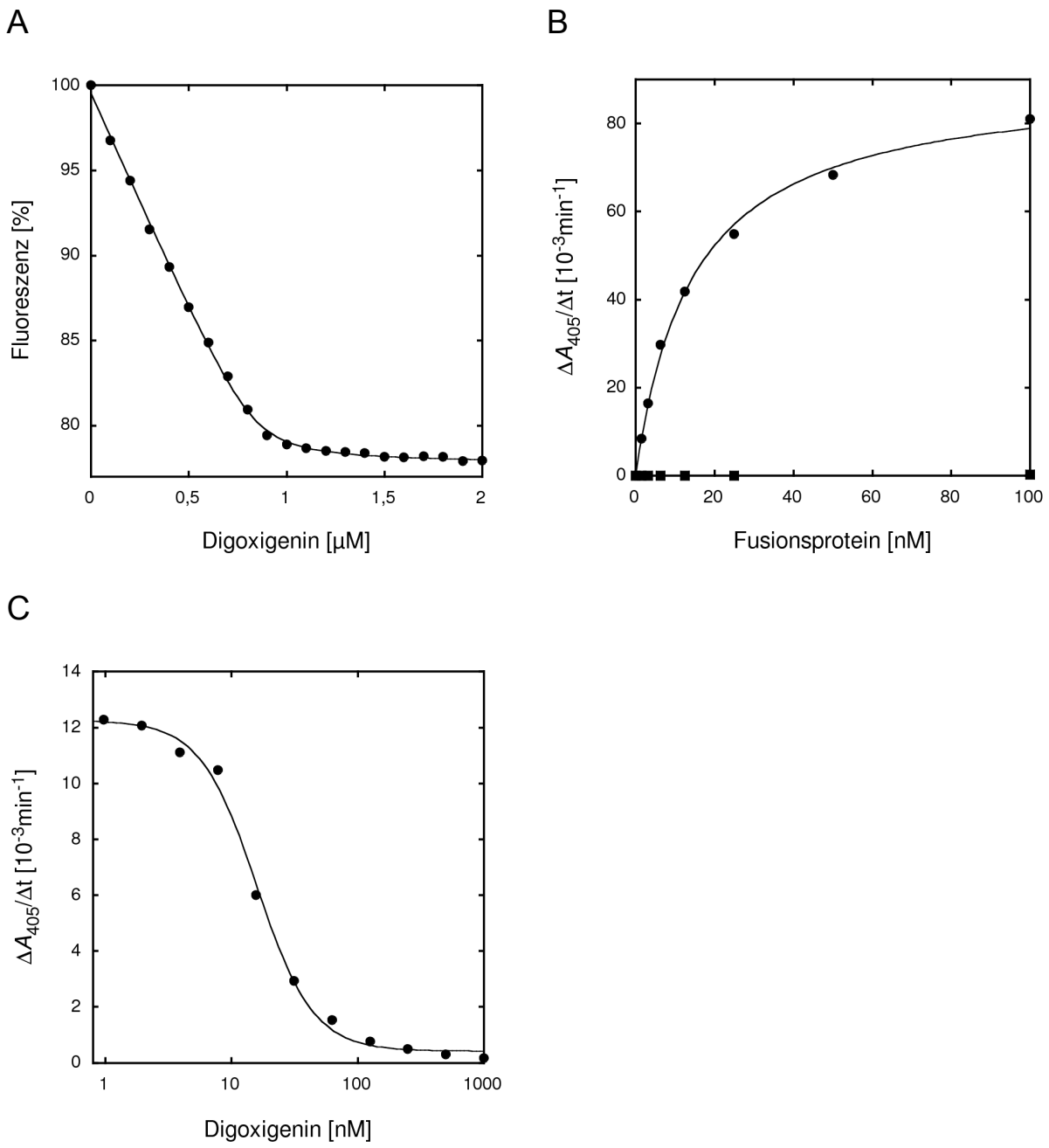



**Abbildung 51:** Bindungsstudien mit DigA16(H86N)-AmpC2. A: Fluoreszenztitration mit Digoxigenin (DIG) als Ligand. Eine 1 µM Lösung des Fusionsproteins wurde mit DIG titriert und die Abnahme der Proteinfluoreszenz aufgezeichnet. Die Daten wurden auf einen Anfangswert von 100 % normiert durch nicht-lineare Regression angepasst (Abschnitt 2.4.1). B: ELISA. Eine Mikrotiterplatte wurde mit DIG-markiertem BSA beschichtet und anschließend durch BSA abgesättigt. Dann wurde eine Verdünnungsreihe mit gereinigtem DigA16(H86N)-AmpC2 zupipettiert und nach dem Waschen das gebundene Fusionsprotein durch enzymkatalysierte Hydrolyse von CENTA nachgewiesen. Die gemessene Aktivität des Reporter-Enzyms ($\Delta A_{405}/\Delta t$) wurde gegen die jeweils zur Inkubation eingesetzte Konzentration aufgetragen und gemäß Abschnitt 2.3.8.1 ausgewertet. C: Kompetitiver ELISA. Nach Vorbehandlung der Mikrotiterplatte (siehe B) wurde eine Verdünnungsreihe mit DIG hergestellt und mit einem Aliquot des Fusionsproteins versetzt (Endkonzentration 10 nM). Die Enzymaktivität wurde gegen die DIG Konzentration aufgetragen und die Daten entsprechend Abschnitt 2.3.8.2 ausgewertet.

Um die Spezifität der Ligandenbindung zu demonstrieren, wurde zudem ein kompetitiver ELISA mit freiem DIG durchgeführt. Es resultierte eine typische Dosis-Wirkungs-Beziehung mit sigmoidalem Verlauf. Die Auswertung der Daten durch nicht-lineare Regression zeigte, dass freies DIG die Bindung von DigA16(H86N)-AmpC2 an DIG-BSA hochspezifisch mit einer $IC_{50}$ von 15,8 ± 0,9 nM inhibiert.

## 3.6 Fusionsproteine aus dem Anticalin DigA16(H86N) und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase gehört zu den verbreitetsten Reporter-Enzymen im Bereich der biochemischen Forschung (Khatkhatay & Desai, 1999). Das liegt an der guten Verfügbarkeit dieses Enzyms, seiner ausgeprägten Stabilität und hohen enzymatischen Aktivität, aber sicherlich auch an der Vielfalt kommerziell erhältlicher Substrate für unterschiedliche experimentelle Anwendungen. Aus diesem Grund war es attraktiv, auch Fusionsproteine bestehend aus der Alkalischen Phosphatase und dem Anticalin DigA16(H86N) zu konstruieren. Auf lange Sicht sollte man damit äquivalente Antikörper-Konjugate aus kommerziellen Quellen günstig ersetzen können.

In vorangehenden Arbeiten waren bereits verschiedene Konstrukte realisiert worden, bei denen Varianten der Alkalischen Phosphatase aus *E. coli* C-terminal mit dem Anticalin DigA16(H86N) fusioniert waren (Tabelle 16; siehe auch Abschnitt 1.2). Diese Fusionsproteine standen in Form der Vektoren pBBP27-DigA16(H86N), pBBP27(D101S)-DigA16(H86N) und pBBP54-DigA16(H86N) für die gentechnische Produktion in *E. coli* zur Verfügung (Abschnitt 2.1.2). Am C-Terminus diente jeweils das *Strep*-tag II zur Einschritt-Reinigung durch Streptavidin-Affinitätschromatographie (Abschnitt 2.3.4.2).

**Tabelle 16:** Expressionsvekoren für unterschiedliche Fusionsproteine aus Varianten der Alkalischen Phosphatase (PhoA) und dem Anticalin DigA16(H86N).

| Vektor | Enzym |
|---|---|
| pBBP27-DigA16(H86N) | Wildtyp-PhoA |
| pBBP27(D101S)-DigA16(H86N) | PhoA(D101S) |
| pBBP54-DigA16(H86N) | PhoA(D153G/D330N) |

### 3.6.1 Bakterielle Produktion und Reinigung der Fusionsproteine

Die gentechnische Herstellung der Proteine im 2 L-Schüttelkolben ergab nach der Streptavidin-Affinitätschromatographie relativ geringe Ausbeuten von typischerweise 0,15-0,20 mg. Damit war der experimentelle Bedarf nur schwer zu decken. Deshalb wurden alle drei Fusionsproteine im 4 L-Fermenter produziert (Abschnitt 2.3.1.2), wozu erneut der *E. coli* Stamm JM83(Δ*skp*::*proBA*$^+$) eingesetzt wurde (vgl. Abschnitt 4.3). Wie erwartet, verhielt sich dieser Stamm während der Fermentation sehr robust und zeichnete sich durch eine hohe Wachstumsrate aus; allerdings wurden auch bei diesem Experiment etwa eine Stunde nach Induktion der Genexpression durch Zugabe von Anhydrotetracyclin Anzeichen frühzeitiger Zelllyse beobachtet. Die Induktionszeit wurde daher auf zwei Stunden verkürzt.

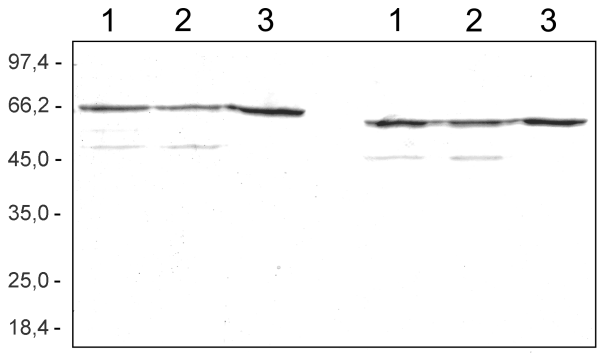



**Abbildung 52:** SDS-PAGE-Analyse der mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten PhoA-DigA16(H86N)-Fusionsproteine. (1) PhoA-DigA16(H86N); (2) PhoA(D101S)-DigA16(H68N); (3) PhoA(D153G/D330N)-DigA16(H86N). Die Proben wurden jeweils unter reduzierten (links) und nicht-reduzierten (rechts) Bedingungen aufgetragen. Die geringfügig erhöhte Mobilität der nicht-reduzierten Proben ist auf die Anwesenheit von insgesamt vier Disulfidbrücken im Monomer zurückzuführen.

Die Reinigung der Fusionsproteine aus den periplasmatischen Zellextrakten erfolgte durch Streptavidin-Affinitätschromatographie mit Hilfe des *Strep*-tag II am Carboxy-Terminus der rekombinanten Proteine (vgl. Abbildung 5). Zusätzlich wurde eine Gelfiltration an einer Superdex 200 prep grade Säule durchgeführt (Abschnitt 2.3.4.3). Die so gereinigten Fusionsproteine wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 52). Es konnte in allen drei Fällen eine prominente Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 68 kDa beobachtet werden, was mit der theoretisch errechneten Größe von 68,2 kDa sehr gut übereinstimmte. Im Vergleich war die Mobilität der drei Fusionsproteine quasi identisch, und jeweils im nicht-reduzierten Zustand leicht erhöht, was auf die kompaktere Form der Polypeptidkette bei Anwesenheit der insgesamt vier Disulfidbrücken zurückzuführen ist (vgl.

Schmidt & Skerra, 1994). Des Weiteren deutete das Vorliegen einer einzelnen Hauptbande unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf die Abwesenheit potentieller nicht nativer Disulfidisomere hin. Bei allen drei Fusionsproteinen wurden darüber hinaus Spuren einer zweiten Bande mit einer Größe von etwa 54 kDa beobachtet.

Bei dieser Verunreinigung handelte es sich vermutlich um ein proteolytisches Abbauprodukt. Diese Beobachtung wurde bereits an einem analogen Fusionsprotein aus dem Vorgänger-Anticalin DigA16 und der Wildtyp-PhoA aus *E. coli* gemacht (Schlehuber *et al.*, 2000). Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei diesem Abbauprodukt um ein N-terminales Fragment des Fusionsproteins, das im Wesentlichen die PhoA-Domäne umfasst. Durch Westernblot-Experimente konnte nämlich gezeigt werden, dass dieses Fragment offenbar kein *Strep*-tag enthält (Smejkal, 2005). Somit liegt die Vermutung nahe, dass es im Periplasma von *E. coli* während der Protein-Produktion teilweise zur Bildung eines heterodimeren Fusionsproteins kommt, das aus einem vollständigen Monomer mit C-terminalem *Strep*-tag II sowie dem beobachteten Abbauprodukt besteht. Dessen Abtrennung von dem intakten Homodimer is durch Streptavidin-Affinitätschromatographie nicht möglich.

### 3.6.2 Biochemische und funktionelle Charakterisierung

Die katalytischen Aktivitäten der drei Varianten der Alkalischen Phosphatasen (PhoA; siehe Abschnitt 1.2) als Teil ihrer Fusionsproteine mit DigA16(H86N) wurden mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat untersucht (Abbildung 53). Die enzymatischen Reaktionen wurden durchgeführt wie in Abschnitt 2.3.9 beschrieben, wobei 1 M Tris/HCl pH 8,0, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $ZnSO_4$ als Reaktionspuffer verwendet wurde. In diesem Puffer dient Tris neben seiner Funktion als Puffersubstanz auch als Phosphat-Akzeptor zur Beschleunigung der Phosphorylgruppen-Transferreaktion (Coleman, 1992); die essenziellen Metall-Kofaktoren der PhoA, $Mg^{2+}$ und $Zn^{2+}$ (Coleman, 1992) sind ebenfalls enthalten. Der Verlauf der Reaktion wurde als Absorptionsänderung photometrisch bei 405 nm aufgezeichnet, wobei ein molarer Absorptionskoeffizient von $18{,}8 \cdot 10^3$ $M^{-1}$ $cm^{-1}$ für das Reaktionsprodukt p-Nitrophenolat für die Auswertung der Daten angenommen wurde.

Die Enzymkinetiken aller drei Fusionsproteine zeigte ein typisches Sättigungsverhalten bei zunehmender Substratkonzentration (Abbildung 53A und B) und konnten durch nicht-lineare Regression entsprechend dem Michaelis-Menten-Modell ausgewertet werden (Abschnitt 2.3.9). Die ermittelten katalytischen Parameter für die Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Bei pH 8,0 war die katalytische

Aktivität ($k_{cat}$) der beiden PhoA-Mutanten D101S und D153G/D330N gegenüber dem Wildtyp-Enzym um etwa den Faktor 11 bzw. 7 erhöht. Die ebenfalls deutlich niedrigeren $K_m$-Werte dieser beiden Varianten resultieren in einer beträchtlichen Erhöhung der katalytischen Effizienz, die bei der Einzelmutante etwa 30-fach und bei der Doppelmutante 11-fach so hoch ist wie bei der Wildtyp-PhoA.

**Tabelle 17:** Katalytische Parameter der PhoA-DigA16(H86N) Fusionsproteine.

| **Fusionsprotein** | $K_m$ [µM] | $k_{cat}$ [$s^{-1}$] | $k_{cat}/K_m$ [$s^{-1}µM^{-1}$] |
|---|---|---|---|
| PhoA-DigA16(H86N) | 237,0 ± 16,4 | 25,2 ± 0,59 | 0,106 ± 0,098 |
| PhoA(D101S)-DigA16(H86N) | 87,1 ± 5,5 | 271,5 ± 5,2 | 3,12 ± 0,26 |
| PhoA(D153G/D330N)-DigA16(H86N) | 146,6 ± 17,3 | 170,7 ± 7,7 | 1,16 ± 0,19 |

Um die pH-Abhängigkeit der PhoA-Aktivität zu studieren, wurden Reaktionen unter Substratsättigung mit 5 mM p-Nitrophenylphosphat durchgeführt. Die experimentelle Vorgehensweise war wie oben beschrieben. Nach dem Start der Reaktion wurde der Verlauf der Reaktion photometrisch bei 405 nm aufgezeichnet und die Anfangsgeschwindigkeit bestimmt (Abschnitt 2.3.9). Die erhaltenen $k_{cat}$-Werte wurde anschließend gegen den pH-Wert graphisch aufgetragen (Abbildung 53C). Während bei PhoA-DigA16(H86N) mit steigendem pH-Wert eine geringfügige Abnahme der Aktivität zu verzeichnen war, konnte bei den beiden PhoA-Mutanten D101S und D153G/D330N eine starke Zunahme der Aktivität beobachtet werden, wobei die Doppelmutante interessanterweise bei einem pH oberhalb 8,5 eine höhere Aktivität zeigte als D101S. Bei beiden PhoA-Mutanten wurde die höchste Aktivität bei pH 10 gemessen, wobei das Maximum noch nicht erreicht war. Sie lag um den Faktor 21 (D101S) bzw. 39 (D153G/D330N) höher als bei der Wildtyp-PhoA. Für analytische Zwecke erschienen demnach Pufferbedingungen bei pH 10 am geeignesten, um z. B. eine möglichst starke Signalamplifizierung bei Nachweisreaktionen zu erreichen, auch wenn in diesem Bereich teilweise bereits mit Denaturierung der anderen Proteinkomponenten zu rechnen ist.

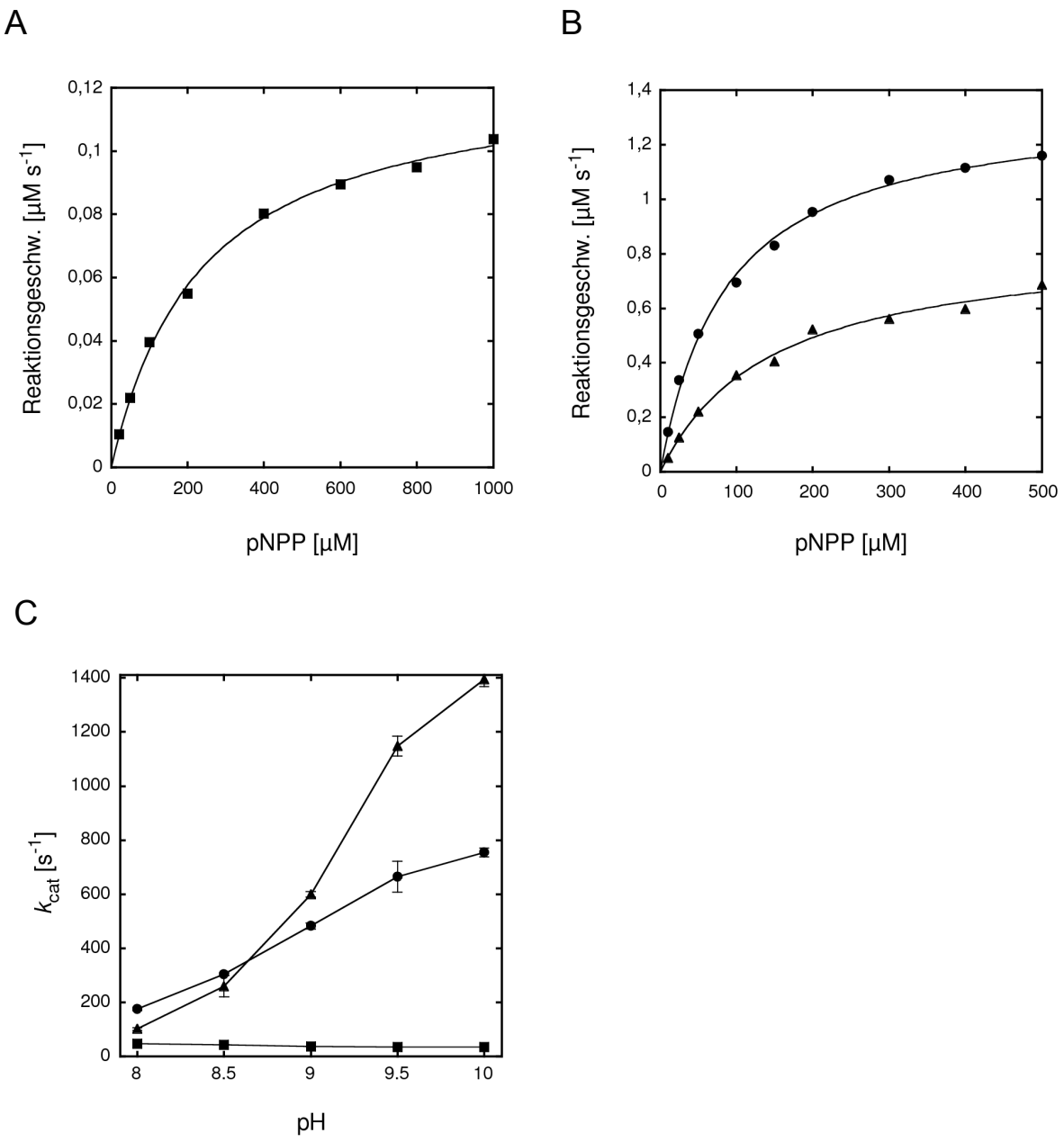



**Abbildung 53:** Enzymatische Aktivität verschiedener PhoA-Varianten als Fusionsproteine mit dem Anticalin DigA16(H86N): A und B, Michaelis-Menten-Kinetik (Anfangsgeschwindigkeiten) mit p-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat. Als Reaktionspuffer wurde 1 M Tris/HCl pH 8,0, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $ZnSO_4$ verwendet. In A wurde das Fusionsprotein PhoA-DigA16(H86N) eingesetzt (■), in B die analogen Fusionsproteine mit den Mutanten der Alkalischen Phosphatase PhoA(D101S) (●) bzw. PhoA(D153G/D330N (▲). C: pH-Aktivitätsprofil der Fusionsproteine. Die enzymatische Aktivität ($k_{cat}$) wurde als Anfangsgeschwindigkeit unter Substratsättigung (5 mM pNPP) in Tris-Puffer (siehe oben) bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus jeweils drei unabhängigen Messungen dar. Die Zuordnung der Symbole ist identisch mit den Angaben zu A und B.

Analog zu den Bindungsstudien mit dem Fusionsprotein DigA16(H86N)-AmpC2 (Abschnitt 3.5.3) wurden mit den PhoA-DigA16(H86N)-Varianten ELISA-Experimente durchgeführt, um die bifunktionellen Eigenschaften der drei Proteine zu charakterisieren und den Einfluß des pH-Wertes auf die Signalstärke unter Anwendungsbedingungen zu erfassen (Abbildung 54). Dazu wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit BSA bzw. DIG-BSA beschichtet, geblockt und direkt mit einer Verdünnungsreihe des jeweiligen Fusionsproteins inkubiert. Der Nachweis an gebundenem Fusionsprotein geschah dann indirekt durch Applizieren unterschiedlich gepufferter Lösungen von p-Nitrophenylphosphat.

Die erhaltenen Bindungsisothermen weisen ein typisches Sättigungsverhalten auf und bestätigten damit die Bindungsaktivität des Anticalins DigA16(H86N) als Fusionspartner der drei unterschiedlichen PhoA-Varianten. Insgesamt waren die gemessenen Affinitäten weitgehend unabhängig von der jeweils fusionierten PhoA-Variante und dem pH-Wert der anschließend applizierten Reaktionslösung. Die ermittelten Bindungskonstanten lagen zwischen 80 bis 122 nM (Tabelle 18) und waren damit allerdings 66- bis 100-mal höher als für das Anticalin allein und bis zu 9-mal höher als für das analoge Fusionsprotein mit der β-Lactamase AmpC (vgl. Abschnitte 3.4.2 und 3.5.3).

Die beobachteten Signalstärken ($V_{max}$) reflektierten dagegen im Wesentlichen die zuvor gemessenen pH-abhängigen katalytischen Aktivitäten der drei PhoA-Varianten (vgl. Abbildung 53C). So zeigte PhoA-DigA16(H86N) bei pH 9 und pH 10 ein reduziertes ELISA-Signal gegenüber pH 8. Den generell höheren Aktivitäten der beiden anderen Varianten PhoA(D101S) und PhoA(D153G/D330N) entsprechend, nahm bei diesen Fusionsproteinen auwiederum das ELISA-Signal mit steigendem pH-Wert des Reaktionspuffers zu. Durch den Einsatz der PhoA-Doppelmutante bei pH 10 konnte insgesammt eine 13-fache Signalverstärkung gegenüber der Wildtyp-PhoA bei pH 8 erzielt werden.

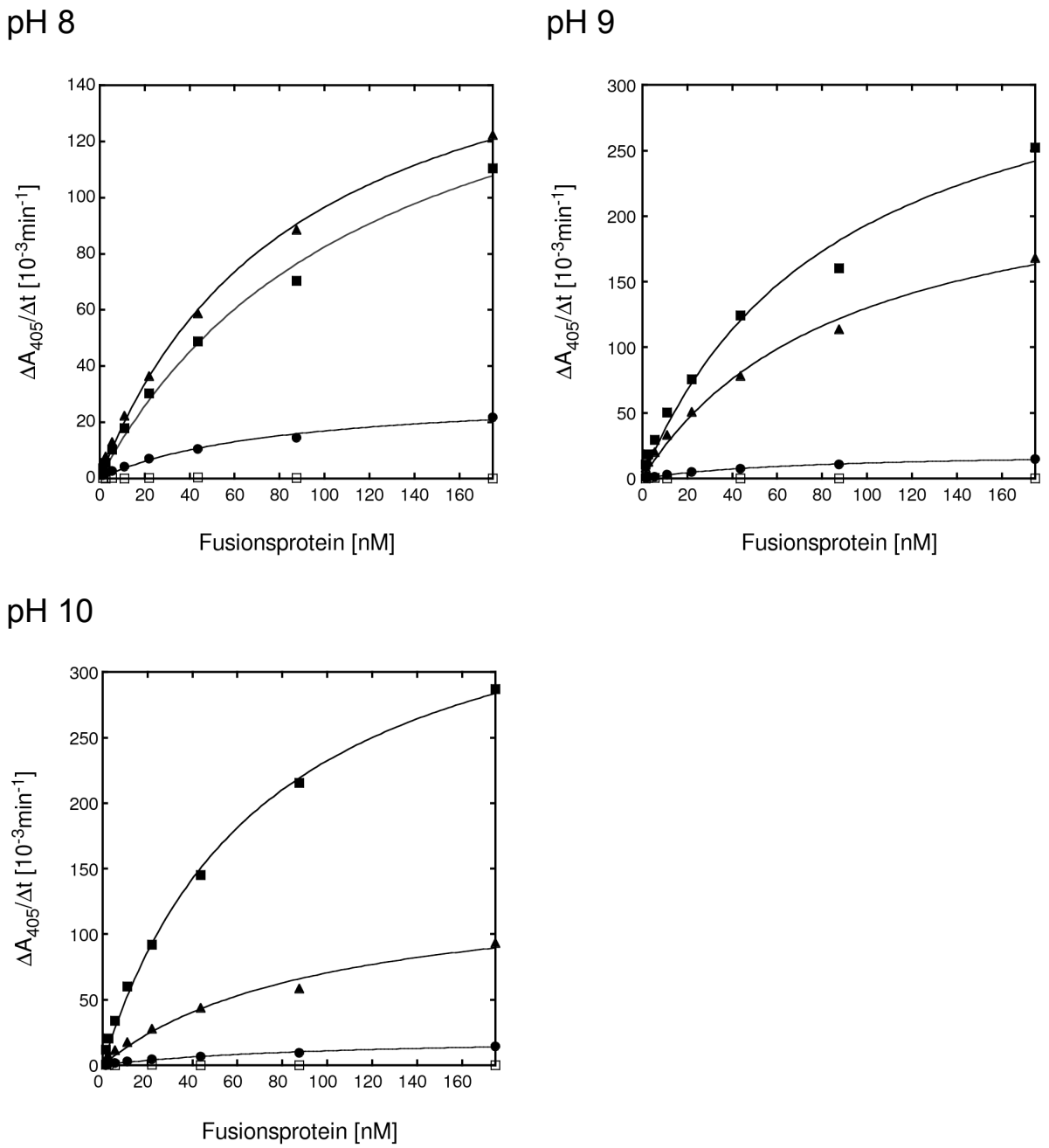



**Abbildung 54:** ELISA zum Nachweis der bifunktionellen Aktivität der PhoA-DigA16(H86N) Fusionsproteine. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit DIG-BSA beschichtet, mit BSA blockiert und anschließend mit einer Verdünnungsreihe des gereinigten rekombinanten Fusionsproteins bestehend aus einer PhoA-Variante und DigA16(H86N) inkubiert: (●) Wildtyp-PhoA, (▲) PhoA(S101S), (■) PhoA(D153G/D330N). Reaktionslösung: 5 mg/mL 4-Nitrophenylphosphat in 1 M Tris-Puffer (siehe Abschnitt 2.3.8), mit HCl auf pH 8, 9 oder 10 eingestellt. Als Negativkontrolle wurden die Vertiefungen einer Spalte mit BSA beschichtet (□) und ansonsten identisch bedandelt.

**Tabelle 18:** ELISA-Parameter der PhoA-DigA16(H86N)-Varianten bei unterschiedlichen pH-Werten des verwendeten Reaktionspuffers. $V_{max}$ ist angegeben als $\Delta A_{405nm}/\Delta t$ [$10^{-3}$ $min^{-1}$].

| **PhoA** | **Wildtyp** | | | **D101S** | | | **D153G/D330N** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **pH** | **8,0** | **9,0** | **10,0** | **8,0** | **9,0** | **10,0** | **8,0** | **9,0** | **10,0** |
| ***K*$_d$ [nM]** | 80,4 | 75,0 | 100,6 | 88,4 | 90,5 | 98,2 | 122,6 | 87,9 | 73,2 |
| **$V_{max}$** | 30,5 | 20,5 | 22,0 | 182,0 | 247,7 | 139,8 | 183,5 | 363,5 | 402,4 |

# 4 Diskussion

## 4.1 Strategien zum evolutiven *De-Novo*-Design katalytischer Proteine

### 4.1.1 Konstruktion hochkomplexer Lipocalin-Zufallsbibliotheken

Bei der Konstruktion der Lipocalin-Bibliotheken, basierend auf dem Bilin-Bindungsprotein (BBP) wie auch dem Bakteriellen Lipocalin (Blc), lag ein wesentlicher Schwerpunkt darauf, Bibliotheken mit möglichst hohen Komplexitäten zu erzeugen. Von der systematischen Auswertung publizierter *Phage Display* Experimente ist bekannt, dass ein Zusammenhang zwischen der Komplexität der eingesetzten Phagen-Bibliothek und der Affinität daraus selektierbarer Bindeproteine besteht (Perelson & Oster, 1979; Ling, 2003). Dieser Zusammenhang ist vermutlich auch für die *In-Vivo*-Selektion katalytisch aktiver Proteine von Bedeutung, da es sich bei der enzymatischen Stabilisierung eines Übergangszustandes im Prinzip ebenfalls um ein Bindungsereignis handelt, wenngleich die entsprechende Molekülstruktur weniger gut definierbar ist als konventionelle Haptene, wie sie für das *Phage Display* mit Erfolg eingesetzt worden sind. Bedenkt man weiterhin den zentralen Zusammenhang zwischen enzymatischer Effizienz und der Affinität eines natürlichen Enzyms zum Übergangszustand seines Substrates (siehe Abschitt 1.3.2), so wird die Wichtigkeit einer hohen Komplexität der Zufallsbibliothek besonders deutlich.

Da bei der Herstellung hochkomplexer DNA-Bibliotheken die Transformation des Wirtsorganismus *E. coli* eine Schlüsselrolle einnimmt (Winter *et al.*, 1994), wurde in dieser Arbeit besonderes Augenmerk auf die Optimierung des Transformationsprotokolls gerichtet, wobei sich zur Erzeugung von über $10^9$ transformierten *E. coli* Zellen pro µg Plasmid-DNA grundsätzlich nur die leistungsfähige Methode der Elektroporation als geeignet erwies (Dower *et al.*, 1988). Im Vergleich zur klassischen Methodenvorschrift stellte sich dabei heraus, dass doppelt destilliertes Wasser für das Waschen und Resuspendieren der Zellen besonders wirksam sein kann, um eine hohe Transformationseffizienz zu erzielen. Interessanterweise empfehlen einige ältere Studien eine andere Vorgehensweise und schlagen vor, die Zellsuspension mit geringen Mengen an Wachstumsmedium zu versetzten (Tung & Chow, 1995), um die Transformationseffizienz zu erhöhen. Sofern eine Lagerung der kompetenten Zellen angestrebt wird, mag dieses Vorgehen günstig sein, um eine bestmögliche Konservierung der Zellen zu gewährleisten. Um höchste Effizienz zu erzielen, ist diese Methode allerdings kaum geeignet, da durch die Zugabe von Kulturmedium zur Zellsuspension deren elektrische

Leitfähigkeit erheblich erhöht wird, was sich ungünstig auf den Elektroporationsprozess auswirkt (siehe Abschnitt 3.1.5). Immerhin bewertet zumindest eine jüngere Studie die konsequente Verwendung hochreinen Wassers als vorteilhaft (Wang *et al.*, 2007) und bestätigt somit die Ergebnisse der vorliegenden Studie.

Eine weitere Verbesserung wurde erreicht, indem direkt für die Transformation frisch hergestellte kompetente *E. coli* Zellen eingesetzt wurden. Diese Vorgehensweise ist vermutlich deswegen effektiv, weil dadurch die größtmögliche Vitalität der kompetenten Zellen ausgenutzt und eine Reduzierung lebender Zellen durch den sonst üblichen Einfrier- und Lagerungsprozess vermieden wird.

Die konsequente Umsetzung dieser Verbesserungen führte zu einer Lipocalin-Bibliothek auf der Basis des Blc mit einer Komplexität von über $10^{10}$ Anticalin-Varianten, einer Größe, die angesichts der begrenzten Gesamtzahl an Phagemiden, die sich handhaben lässt, als experimentelles Limit für Phagemid-Bibliotheken angesehen wird (Hoogenboom, 2005) und somit eine ausgezeichnete Ausgangssituation für Selektionsexperimente darstellte.

Leider zeigte die DNA-Sequenzanalyse dieser Bibliothek eine deutliche Verzerrung der Nukleotidverteilung zugunsten von Adenosin. Sehr wahrscheinlich ist das auf die unterschiedliche Kopplungseffizienz der vier Nukleosid-Phosphoramidite bei der Festphasensynthese der verwendeten Oligodesoxynukleotide zurückzuführen (Palfrey *et al.*, 2000). Dieses Verhalten kann unter Umständen durch den Einsatz eines angepassten Verhältnisses der aktivierten DNA-Bausteine methodisch kompensiert werden (Ho *et al.*, 1996), setzt allerdings frische und qualitativ hochwertige Reagenzien voraus. Dies ist bei kommerziellen Oligodesoxynukleotiden nicht unbedingt garantiert. Die Erfahrungen aus dem Laboralltag haben gezeigt, dass weitgehend unabhängig vom Hersteller die Qualität degenerierter Oligodesoxynukleotide (mit gemischten Basen) erheblichen Schwankungen unterworfen ist. Die Vermutung liegt deswegen nahe, dass die überdurchschnittlich starke Verzerrung der Nukleotid-Verteilung in den hier durchgeführten Experimenten nicht alleine durch die unterschiedlich gute chemische Kopplungseffizienz erklärt werden kann sondern auch auf eine mangelhafte Qualität der verwendeten Reagenzien zurückzuführen ist.

Um diese Problematik zu umgehen, sind alternative Synthesemethoden für degenerierte Oligodesoxynukleotide auf der Basis von Trinukleotiden beschrieben worden, die u. a. den oben diskutierten Nachteil der konventionellen Synthese vermeiden (Virnekas *et al.*, 1994; Van den Brulle *et al.*, 2008). Diese Methoden sind aber derzeit noch mit einem relativ hohen

finanziellen Aufwand verbunden und deswegen vom ökonomischen Standpunkt aus weniger attraktiv.

### 4.1.2 Etablierung potentiell geeigneter *In-Vivo*-Selektionsbedingungen

Die Etablierung geeigneter Wachstumsbedingungen für *In-Vivo*-Selektionsexperimente auf neue enzymatische Aktivitäten war ein fundamentaler Aspekt dieser Arbeit. Dazu gehörte es vor allem, geeignete Substrate zu identifizierten, die als physiologisch inerte Vorstufen bestimmter Wachstumsfaktoren stringente Selektionsstrategien mit auxotrophen *E. coli* Stämmen erlauben. Leider gab die wissenschaftliche Literatur zu diesem Thema nur relativ wenig Anhaltspunkte, da verwandte Studien aus dem Bereich des *Enzyme Engineering* i. d. R. sehr spezielle Reaktionsmechnismen behandeln und sich nicht mit dem *De-Novo*-Design enzymatischer Eigenschaften in Strukturproteinen beschäftigen. So war lediglich die von Schulz *et al.* (1993) vorgeschlagene Verwendung von Estern bestimmter Vitamine, wie z. B. des Biotins, als Orientierungsmöglichkeit vorhanden. Diese Strategie erwies sich im Verlauf dieser Arbeit allerdings als völlig unbrauchbar. Offenbar sind zumindest die p-Nitrophenylester dieser Substanzen relativ instabil und neigen zur spontanen Hydrolyse, so dass unter den entsprechenden Bedingungen eine nahezu vollständige Wiederherstellung des Zellwachstums auxotropher *E. coli* Stämme zu beobachten war. Dieser Effekt konnte zwar eingeschränkt werden, indem die Substratkonzentration um mehrere Größenordnungen gegenüber den Literaturangaben reduziert wurde, es erschien allerdings äußerst unwahrscheinlich, ob unter solchen Bedingungen effiziente *In-Vivo*-Selektionsexperimente durchgeführt werden können, da dies besonders niedrige $K_m$-Werte erfordert.

Zudem konnte nicht ohne Weiteres differenziert werden, ob das beobachtete Zellwachstum ausschließlich auf einer spontanen Hydrolyse des Substrates beruht oder auch durch die Aktivität endogener Esterasen verursacht wird. Enzyme mit entsprechender Aktivität konnten sowohl im Cytosol als auch im Periplasma von *E. coli* nachgewiesen werden (Pacaud, 1982). Sie katalysieren aufgrund ihrer relativ geringen Substratspezifität mit hoher Wahrscheinlichkeit die Umsetzung entsprechender Ester. Da ähnliche Effekte auch mit verwandten Substraten, wie z. B. L-Prolin-p-nitrobenzylester, beobachtet wurden, erhärtete sich insgesamt die Vermutung, dass vor allem ein hoher Aktivierungsgrad der chemischen Esterbindung kombiniert mit einer hohen physiologischen Wirksamkeit des freigesetzten Wachstumsfaktors für *In-Vivo*-Selektionsexperimente ungünstig ist.

Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen konnten mit stabileren Substraten, wie z. B. den Prolin-Derivaten Z-Pro-OH und Fmoc-Pro-OH sowie o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid und nicht zuletzt Orotat, sehr stringente *In-Vivo*-Selektionsexperimente mit praktisch vernachlässigbarem Hintergrundwachstum realisiert werden. Dabei war die Substratkonzentration hauptsächlich durch die Löslichkeit der jeweiligen Substanz in wässrigem Medium beschränkt und konnte so bis in den millimolaren Bereich gesteigert werden. Dies stellte eine gute Voraussetzung für derlei Selektionsexperimente dar, weil bekannt ist, dass *in vivo* nicht nur die enzymatische Effizienz und damit einhergehend der $K_m$-Wert ausschlaggebend ist, sondern häufig auch die Verfügbarkeit des Substrates in der Zelle, die ihrerseits von der Konzentration im Kulturmedium abhängt (Martinez *et al.*, 1999).

Prinzipiell konnten mit den etablierten Selektionssystemen ohne weiteres bis zu $10^{10}$ *E. coli* Zellen auf nur wenigen Agrar-Platten einer *In-Vivo*-Selektion unterzogen werden, eine Größenordnung, die auch als praktisch erzielbares Limit für *Phage-Display* Experimente angesehen wird (Skerra, 2003). Insofern konnte bestätigt werden, dass *In-Vivo*-Experimente im Prinzip als effiziente Selektionsmethoden dienen können.

Im Verlauf dieser Arbeit musste allerdings festgestellt werden, dass die Retransformation der für die Selektion geeigneten *E. coli* Stämme mit Plasmid-DNA aus den beiden hochkomplexen initialen Lipocalin-Bibliotheken ein Problem bereitet. Bei einer primären Komplexität von etwa $3 \cdot 10^{10}$ ist es aus statistischen Gründen notwendig, etwa $9 \cdot 10^{10}$ Zellen zu transformieren, um 95 % der ursprünglichen Komplexität abzubilden (Patrick *et al.*, 2003). Zwar ist diese Größenordnung unter Einsatz der leistungsfähigen Transformationsmethode der Elekroporation grundsätzlich realisierbar (siehe Abschnitt 2.2.2.2 und 3.1.5), experimentell allerdings mit erheblichem Aufwand verbunden. So konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit dieser Schwellenwert letztlich für keines der durchgeführten Selektionsexperimente erreicht werden. Dies lag vor allem daran, dass einige der auxotrophen Stämme nur mit mäßiger Effizienz transformierbar waren; mit $10^8$-$10^9$ transformierten Zellen wurde daher lediglich ein Bruchteil der ursprünglichen Bibliothek abgebildet.

Von dieser Limitierung waren insbesondere die Stämme des *E. coli Genetic Stock Center* betroffen, die ursprünglich in den 80iger Jahren im Rahmen von Stoffwechselstudien hergestellt worden waren (vgl. Literaturangaben in Abschnitt 2.1.1). Diese Stämme sind typischerweise durch klassische chemische Mutagenese erzeugt und auf bestimmte Stoffwechseldefekte hin selektiert worden. So ist es denkbar, dass bei dieser unspezifischen Mutagenese auch andere als die untersuchten genetischen Defekte aufgetreten sind, was zu

einer verminderten Transformierbarkeit geführt haben könnte. Zumindest sind diese Stämme nicht auf hohe Transformierbarkeit selektiert worden, denn es war auffällig, dass diese auxotrophen *E. coli* Stämme den für Klonierungsarbeiten etablierten Laborstämmen, wie z. B. XL1-Blue, DH5α und JM83, in dieser Hinsicht stets deutlich unterlegen waren.

Rückblickend muss festgestellt werden, dass die limitierende Transformierbarkeit einiger der *E. coli* Stämme eine gravierende Beschränkung für die Selektionsexperimente darstellte. Trotz aller Bemühungen bei der Konstruktion der Lipocalin-Bibliotheken wurde der experimentell durchmusterte Sequenzraum damit nämlich empfindlich beschränkt, mit allen dadurch zu erwartenden Nachteilen (siehe Abschnitt 2.2.2.2). Um diese Problematik zu vermeiden, wäre es denkbar, die Plasmid-Bibliothek in künstlichen Phagenpartikeln, sogenannten Phagemiden zu verpacken und für die Infektion von *E. coli* einzusetzen. Im Gegensatz zur künstlichen Transformation gilt die Phagen-Infektion nämlich als äußerst effizienter Prozess. Die Herstellung entsprechender Phagemide ist seit langem methodisch etabliert und wird z. B. routinemäßig für das *Phage-Display* angewendet (Smith, 1985; McCafferty *et al.*, 1990). Immerhin wurde diese Methodik bereits von Smiley & Benkovic (1994) im Zusammenhang mit *In-Vivo*-Selektionsexperimenten erfolgreich angewandt (siehe Abschnitt 3.3.2) und könnte durchaus eine attraktive Alternative zur klassischen Transformation darstellen. Für eine effiziente Infektion muss der verwendete *E. coli* Stamm allerdings ein F-Plasmid tragen, eine Voraussetzung, die ggf. durch bakterielle Konjugation geschaffen werden muß.

Leider standen während der experimentellen Phase dieser Arbeit die Stämme der *Keio Collection* (Baba *et al.*, 2006) noch nicht zur Verfügung. Diese Stammsammlung umfasst etwa 8000 indiviuell hergestellte *E. coli Knock-Out*-Mutanten, bei denen jeweils ein Gen des Ausgangsstammes *E. coli* K-12 BW25113 präzise deletiert worden ist (Datsenko & Wanner, 2000). Dabei wurden alle bekannten nicht essentiellen Gene berücksichtigt. Die Stämme dieser Sammlung sind vor Kurzem vom *E. coli Genetic Stock Center* aufgenommen worden und damit öffentlich verfügbar (http://cgsc.biology.yale.edu/Person.php?ID=99553). Es bleibt abzuwarten, wie es um die Transformierbarkeit dieser Stämme bestellt ist und wie gut sie für Selektionsexperimente geeignet sind. Jedenfalls bietet diese Stammsammlung eine attraktive Grundlage für weitere *In-Vivo*-Studien.

Bei fast allen *In-Vivo*-Selektionsexperimenten konnte eine bestimmte Rate spontan entstehender falsch positiver *E. coli*-Kolonien beobachtet werden. In einigen Fällen war dieses Verhalten nicht unerwartet, da bei klassischen Mutationsverfahren, wie z. B. Punktmutagenese, *Frameshift*-Mutagenese (Deletionen) oder inserierten Phagen, mit

spontanen Reversionsraten von durchschnittlich etwa $10^{-8}$ pro Gen (bzw. Locus) und Generation zu rechen ist (Knippers, 2006).

Die offenbar sehr hohen Reversionsraten bei den Selektionsexperimenten mit Prolin-Derivaten und dem Laborstamm JM83 waren dagegen sehr überraschend, schließlich hat sich dieser alte Stamm (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) im Laboralltag als genetisch sehr stabil erwiesen. Es erscheint äußerst unwahrscheinlich, dass die hohe Frequenz an Revertanten durch eine spontane Komplementierung des in JM83 vollständig deletierten *proBA*-Operons (Mahan & Csonka, 1983; Deutch *et al.*, 1984) verursacht wird. Schließlich kodiert dieses Operon für die beiden Enzyme Glutamat-5-Kinase (*ProB*) und Glutamat-5-Semialdehyd-Dehydrogenase (*ProA*), die essentielle Funktionen in der Prolin-Biosynthese in *E. coli* übernehmen (Keseler *et al.*, 2009). Eine spontane Komplementierung dieses Stoffwechseldefektes ist deswegen kaum anzunehmen und bisher auch nicht beschieben worden.

Daneben ist das *proBA*-Operon ein typischer genetischer Marker vieler *E. coli*-Laborstämme und wird, wie z. B. in XL1-Blue, oft durch eine F'-Plasmid komplementiert, das eine Kopie des *proBA*-Operons trägt (siehe Abschnitt 2.1.1). Es ist somit denkbar, dass bei der Isolierung der Plasmid-DNA der Blc-Bibliothek aus XL1-Blue auch F'-Plasmid mit isoliert worden ist und bei der späteren Transformation für das Selektionsexperiment in JM83 eingeschleust wurde. Als zirkuläres Episom mit einer Molmasse von etwa 100 kDa wird dieses Plasmid von handelsüblichen Kits für die Plasmid-Isolierung gut erfasst, deren Ausschlussgrösse häufig mit etwa 150 kDa beziffert wird (siehe Herstellerangaben für das „QIAfilter Plasmid Midi Kit“; Abschnitt 2.1.6). Natürlich ist es genauso denkbar, dass durch Scheerkräfte während der Plasmid-Präparation DNA-Fragmente von F-Plasmiden entstehen. Vermutlich sind Plasmid-Präparationen von Klonierungs- und Expressionsvektoren regelmäßig mit geringen Mengen an F-Plasmid oder Fragmenten davon kontaminiert, was unter den sonst typischen experimentellen Bedingungen (insbesondere bei nachfolgendem Restriktionsverdau, Transformation und Antibiotika-Selektion) aber nicht direkt sichtbar wird oder stört, da einerseits die Konzentration an F-Plasmid aufgrund der niedrigen Kopienzahl von 1-3 Plasmiden pro Zelle sehr niedrig sein dürfte und es aufgrund der Molekülgröße nur sehr ineffizient durch Transformationsverfahren in *E. coli* eingeschleust werden kann (Sambrook & Russell, 2001). Die Transformaion von kleinern DNA-Fragmenten ist zwar effizienter, aber für eine stabile Komplementierung der Prolin-Auxotrophie müsste ein DNA-Fragment mit *proBA*-Gen anschließend durch homologe Rekombinantion ins Genom integriert werden. Offenbar sind

diese Nebeneffekte selten und kommen erst unter den hier optimierten, stringenten Transformations- und spezifischen Selektionsbedingungen zur Geltung.

## 4.2 Das Anticalin DigA16(H86N)

DigA16(H86N) ist eine optimierte Variante des Anticalins DigA16 (Schlehuber *et al.*, 2000), die ausgehend von Kristallstrukturen (Korndörfer *et al.*, 2003a) mit und ohne seinen Liganden Digoxigenin (DIG) durch rationales *Protein Engineering* erzeugt wurde. Detaillierte Bindungsstudien, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, ergaben, dass die Affinität von DigA16(H86N) zu DIG im Bereich von 1-3 nM liegt und damit gegenüber seinem Vorgänger DigA16 etwa 20-fach höher ist. Damit ist dieses Anticalin entsprechenden monoklonalen Antikörpern sowohl in Spezifität als auch Affinität ebenbürtig oder sogar überlegen. Für den bekannten Digitalis-spezifischen IgG Antikörper 26-10 wurde z. B. eine Bindungskonstante von 6,9 nM ermittelt (Hunter *et al.*, 1982). Aufgrund der für Immunglobuline typischen bivalenten Bindungseigenschaften ist bei Anwendungen an funktionalisierten Oberflächen die das Antigen/Hapten tragen, wie z. B. im ELISA, mit einer deutlich erhöhten apparenten Affinität aufgrund des Aviditätseffektes zu rechen. Tatsächlich zeigen die monovalenten Fragmente (Fab und scFv) dieses Antikörpers deutlich erhöhte Dissoziationskonstanten von 19 bzw. 320 nM gegenüber dem Digoxigenin-Glykosid Digoxin (Huston *et al.*, 1988). Dieser Vergleich zeigt das hohe Potenzial von Anticalinen als künstliche Bindeproteine mit reprogrammierten Bindungseigenschaften als praktisch nutzbare alternative Bindemoleküle für diagnostische oder therapeutische Anwendungen.

Interessanterweise bewegt sich die hier gemessene Assoziationskinetik der Ligandenbindung von DigA16(H86N) in einem ähnlichen Bereich ($k_{on} \approx 2 \cdot 10^4$ $M^{-1}$ $s^{-1}$), wie er auch für das Anticalin FluA und seinen Liganden Fluorescein gemessen wurde (Skerra, 2000). Dass diese Größenordnung keineswegs die obere Grenze für die Assoziation von Haptenen und Anticalinen darstellt, konnte unlängst an einem anderen Anticalin gezeigt werden. So weisen z. B. engineerte Varianten des NGAL (siehe Abschnitt 1.1) mit Bindungsaktivität zu Lanthanid-Chelat Komplexen eine Assoziationskonstante im Bereich von $10^6$ $M^{-1}$ $s^{-1}$ auf. Sie befinden sich damit an der Grenze zur Diffusionskontrolle, wie sie auch für Antikörper beobachtet wird (Foote & Eisen, 1995).

Im Fall des DigA16 könnte eine verlangsamte Assoziationskinetik dadurch erklärt werden, dass der Ligand außergewöhnlich tief in der Bindungstasche sitzt und einige Seitenketten im

Inneren der Kavität einer erheblichen Konformationsänderung unterliegen, die sogar mit einer lokalen Verlagerung des Peptidrückgrates einhergeht (Korndörfer *et al.*, 2003b). Wahrscheinlich ist diese Konformationsänderung auch in der optimierten Variante DigA16(H86N) noch nicht völlig eliminiert.

Im Gegensatz dazu verläuft die Dissoziationskinetik des DigA16(H86N)•DIG-Komplexes relativ langsam mit einer Halbwertszeit von etwa 3,8 h. Deswegen war es bei den Biacore-Messungen nicht möglich, die Oberfläche des funktionalisierten Sensorchips alleine durch Spülen mit Laufpuffer zu regenerieren, sondern es musste eine Regenerierung des Chips bei niedrigem pH nach jedem Messzyklus durchgeführt werden (Abschnitt 2.4.3). Insbesondere für den Einsatz als diagnostisches Reagenz stellt die langsame Dissoziationskinetik dieses Anticalins eine vorteilhafte Eigenschaft dar. So ist z. B. der Nachweis der DIG-Gruppe in ELISA- und Western-Blot-Experimenten bloß mit geringem Signalverlust durch die üblichen Waschschritte verbunden (vgl. Abschnitt 2.3.8). Die relativ langsame Assoziationskinetik des DigA16(H86N) ist dagegen kein Problem bei derartigen Experimenten, da sich innerhalb der üblichen Zeitspanne von etwa einer Stunde für die Inkubation von Antigen und Bindeprotein das thermodynamische Gleichgewcht der Bindungsreaktion einstellen kann.

Es überraschte nicht, dass die Dissoziationskonstante der Digoxigeninbindung, die hier auch durch Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) bestimmt wurde, deutlich über den Werten der Biacore-Messung und Fluoreszenztitration lag. Diesen Messungen zufolge liegt die Affinität des Anticalins mit einer niedrigen Dissoziationskonstante von etwa 1-2 nM nämlich außerhalb der Spanne von $10^3$-$10^8$ $M^{-1}$, in der verlässliche Bindungskonstanten aus ITC-Messungen abgeleitet werden können (Sigurskjold, 2000). Tatsächlich lag der gängige Richtwert c, definiert als das Produkt der Proteinkonzentration in der Kalorimeterzelle und der Bindungskonstante $K_A$, etwa 8,5-mal höher als der empfohlene Schwellenwert von 1000 (Wiseman *et al.*, 1989). Die abgeleitete Dissoziationskonstante ist demnach mit Vorsicht zu interpretieren und hat nur beschränke Aussagekraft. Davon abgesehen zeigten die ITC-Messungen, dass die Liganden-bindung nahezu völlständig Enthalpie getrieben ist und die thermodynamischen Parameter vergleichbar sind mit denen des Fluorescein bindenden Anticalins FluA(R95K) (Mills *et al.*, 2009). NMR-Studien ergaben in diesem Fall, dass die Ligandenbindung mit einer Stabilisierung des Proteingerüstes einhergeht, so dass ein ähnlicher Effekt auch bei DigA16(H86N) denkbar ist.

Im Verlauf der *Steady-State* Fluoreszenztitrationen des Anticalins DigA16(H86N) mit den Liganden Digoxigenin und Digitoxigenin (siehe Abschnitt 2.4.1) wurde beobachtet, dass es

über den Beobachtungszeitraum von 20-30 min zu einem erheblichen Abfall der Proteinfluoreszenz um bis zu 8 % kam. Dieser Effekt blieb auch nach einer Erhöhung der Proteinkonzentration oder Zugabe von RNase A als Stabilisatorprotein zum Titrationsansatz erhalten. Dieser Fluoreszenzabfall führte bei der Modellierung der erhaltenen Datensätze zu einem systematischen Trend in der Residualverteilung, was im allgemeinen als Indiz für die Unzulänglichkeit des zugrundeliegenden biophysikalischen Modells angesehen wird (Precht & Kraft, 1993). Als Ursache für diese Beobachtung kamen prinzipiell zwei physikalische Phänomene in Frage: erstens eine lichtinduzierte Denaturierung des Proteins (*Photobleaching*) und zweitens die Adsorption von Protein an den Wänden der eingesetzten Quarzküvette. Der Einfluss von *Photobleaching* bei der Tyr/Trp-Fluoreszenz von Proteinen ist ein bisher wenig untersuchtes Phänomen und kann bei modernen Fluoreszenzspektrometern durch Unterbrechung des Strahlengangs während der Inkubationsphasen weitestgehend vermieden werden. Die Adsorption von Proteinen an Glasoberflächen ist dagegen ein bekannter Effekt, der mitunter erhebliche Ausmaße annehmen kann (Buijs & Hlady, 1997), so dass mehrere Prozent des Proteingehalts einer wässrigen Lösung davon betroffen sein können.

Da es nicht möglich war, diese beiden Effekte in einem mathematischen Modell getrennt von der Ligenden-Bindungsreaktion zu behandeln, wurden die Daten aus den Fluoreszenztitrationen mit DigA16(H86N) einer „globalen“ Korrektur unterzogen (siehe Abschnitt 2.4.1). Die resultierenden Anpassungskurven wiesen dabei eine wesentlich gleichmäßigere Verteilung der Residualwerte sowie eine höhere Bestimmtheit der Regression auf, was für eine bessere Güte der so korrigierten Daten sprach.

## 4.3 Fusionsproteine des DigA16(H86N) mit bakteriellen β-Lactamasen

Digoxigenin (DIG) ist eine der wichtigsten nicht-radioaktiven Sonden für molekularbiologische und biochemische Anwendungen (Holtke *et al.*, 1995). Es wird z. B. eingesetzt, um Nukleinsäuren oder Proteine zu markieren und mit spezifischen Reagenzien nachweisen zu können. Diese sogenannte DIG-Technologie (Kessler, 1991) basiert historisch bedingt auf der Verfügbarkeit entsprechender (polyklonaler) Antikörper mit Affinität gegenüber DIG und deren Konjugaten mit Reporter-Enzymen. Diese bifunktionellen Reagenzien werden bisher hauptsächlich durch chemische Kopplung der beiden Proteine hergestellt.

Mit dem Anticalin DigA16 (Schlehuber *et al.*, 2000) und insbesondere seiner verbesserten Variante DigA16(H86N) standen erstmals künstliche, durch *Protein Engineering* geschaffene

Alternativen zu anti-DIG Antikörpern zur Verfügung, die es erlaubten, neuartige Reagenzien für diagnostische Zwecke zu konstruieren. Denn aufgrund ihrer geringen Größe und monomeren Natur bieten diese Anticaline wesentliche Vorteile gegenüber Antikörpern oder rekombinanten Antikörperfragmenten. So können Anticaline z. B. sehr einfach durch genetische Fusionierung mit Reporter-Enzymen kombiniert werden, ohne dabei die Nachteile chemischer Kopplungsverfahren in Kauf zu nehmen. Bei diesen Verfahren wird nämlich häufig eine teilweise Denaturierung des Proteins beobachtet. Vor allem ist das Reaktionsprodukt inhomogen und muss weiteren Reinigungsschritten unterzogen werden (Siemers *et al.*, 1997).

Leider sind genetische Fusionsproteine häufig empfindlich gegenüber proteolytischem Abbau (Suzuki *et al.*, 1997; Griep *et al.*, 1999). Dafür wird in der Regel die Linker-Sequenz zwischen den beiden Fusionspartnern verantwortlich gemacht, die eingeführt wird, um ausreichende Flexibilität und uneingeschränkte Funktionalität der beiden Domänen zu gewährleisten. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass diese proteolytische Schwachstelle bei Fusionsproteinen eher durch den strukturellen Kontext der beiden Fusionspartner als durch die Primärstruktur des Linkers definiert ist (Hellebust *et al.*, 1989). Dies wurde auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet. So konnte durch den Einsatz der β-Lactamase AmpC aus *Enterobacter cloacae* (Joris *et al.*, 1985) als Reporter-Enzym die proteolytische Stabilität des entsprechenden DigA16(H86N)-Fusionsproteins gegenüber einem analogen Konstrukt mit der TEM-1 β-Lactamase aus *E. coli* (Heffron *et al.*, 1979) deutlich verbessert werden, was dessen Präparation in homogener Form in nur zwei Reinigunsschritten erlaubte.

Beide Enzyme sind Vertreter der Proteinfamilie der β-Lactamasen (Frère, 1995), allerdings beträgt ihre Sequenzidentität lediglich 3,7 %. Außerdem weisen beide Enzyme signifikante Unterschiede in ihren Tertiärstrukturen auf (siehe Abbildung 55) und werden deswegen auch in unterschiedliche Klassen eingruppiert (siehe auch Abschnitt 1.2). Interessanterweise ist die Geometrie ihrer katalytischen Zentren dennoch sehr ähnlich (Lobkovsky *et al.*, 1994). Offenbar ist bei diesen Vertretern der β-Lactamasen der zugrungeligende Reaktionsmechanismus evolutionär hoch konserviert. Bezogen auf ihre potenzielle Funktion als Reporter-Enzym in künstlichen Fusionsproteinen bilden diese β-Lactamasen bei qualitativ gleicher Funktionalität also sehr unterschiedliche strukturelle Ausgangssituationen. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass sich die resultierenden Fusionsproteine auch in ihrer proteolytischen Stabilität unterscheiden.

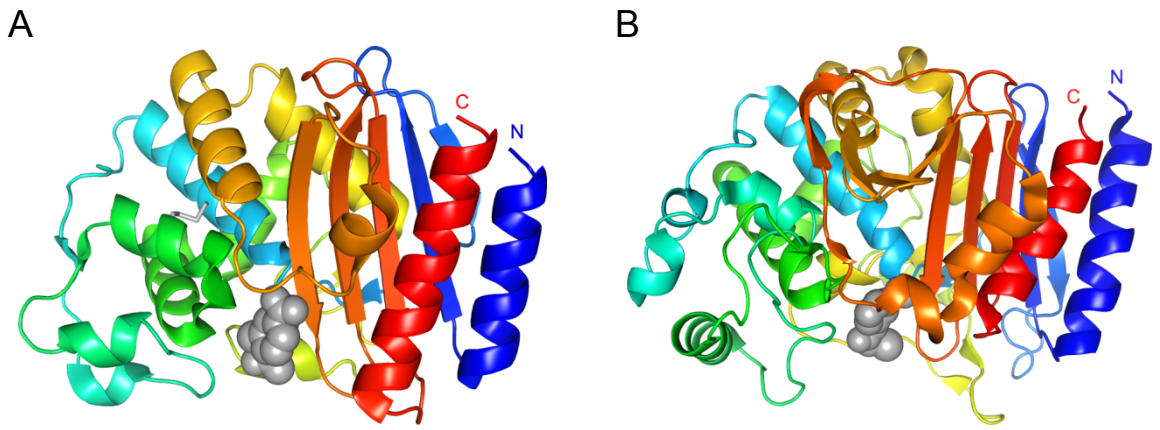



**Abbildung 55:** Strukturmodelle der beiden β-Lactamasen TEM-1 von Transposon Tn3 aus *E. coli* (A, PDB ID: 1ERM) und AmpC aus *Enterobacter cloacae* 908R (B, PDB ID: 1S6R). N- und C-Terminus sind jeweils blau bzw. rot gefärbt. Die Disulfidbrücke in TEM-1 ist grau gekennzeichnet. In beiden Struckturen ist ein Borsäure-Inhibitor im aktiven Zentrum gebunden (Kalottenmodell). Man beachte das zusätzliche β-Faltblatt nahe dem C-Terminus der AmpC-Struktur.

Die bakterielle Produktion der Fusionsproteine von DigA16(H86N) mit den beiden β-Lactamasen erfolgte durch Sekretion in das Periplasma von *E. coli* (Abschnitt 2.3.1). Deswegen sind höchstwahrscheinlich periplasmatische Proteasen für den teilweisen Abbau der Fusionsproteine verantwortlich. Es wurde z. B. beschrieben, dass die Proteasen DegP (Strauch *et al.*, 1989) und „Protease III“ (Finch *et al.*, 1986) Fusionsproteine, die aus ansonsten stabilen Einheiten bestehen, relativ ortsspezifisch hydrolysieren können und so definierte Protein-Fragmente erzeugen (Strauch & Beckwith, 1988; Baneyx & Georgiou, 1989). Beide spielen offenbar eine wichtige Rolle beim Abbau von fehlgefalteten Proteinen im Periplasma von *E. coli*.

Obwohl künstliche Linker-Sequenzen nicht durch natürliche Evolution gegenüber endogenen Proteasen stabilisiert worden sind, erscheint es trotzdem fragwürdig, ob diese Peptidsequenzen gute Substrate für die oben genannten Proteasen sind. Denn Linker-Sequenzen können auf der Basis struktureller Daten optimiert und zumindest bekannte Protease-Schnittstellen dabei leicht vermieden werden (Crasto & Feng, 2000). Die Protease-Schnittstellen in Fusionsproteinen sind bisher kaum untersucht worden. Zumindest eine Studie konnte aber zeigen, dass die Proteolyse nicht direkt in der Linker-Sequenz sondern in den flankierenden Regionen der beiden fusionierten Proteine stattfindet (Baneyx & Georgiou, 1989).

Eine ähnliche Beobachtung wurde auch an Fusionsproteinen des IN-1 Fab-Antikörperfragmentes mit der β-Lactamase TEM-1 gemacht (Fiedler *et al.*, 2002). Die massenspektrometrische Analyse der isolierten proteolytischen Abbauprodukte zeigte dabei, dass die

Schnittstelle im N-terminalen Bereich der β-Lactamase TEM-1 lokalisiert war, welche in diesem Fusionsprotein über einen Linker mit dem C-Terminus der schweren Kette des Fab fusioniert war. Interessanterweise konnte die Degradation des Fusionsproteins nicht durch ortsgerichtete Mutagenese der relevanten Aminosäuren verhindert werden, sondern dies führte nur zu einer sukzessiven Verschiebung der Schnittstelle innerhalb des N-Terminus der β-Lactamase (Fiedler, 2002). Offenbar ist die Sequenzspezifität der verantwortlichen Protease relativ gering, und eher konformationelle Substrateigenschaften spielen eine Rolle. Es ist durchaus denkbar, dass der beobachtete Abbau von einer der oben genannten Proteasen verursacht wird. Diese Beobachtungen stehen auch in Einklang mit den Studien von Robinson & Sauer (1998), wonach die Linker-Sequenz einen signifikanten Einfluss auf die Faltungsstabilität der fusionierten Proteine haben kann und diese damit für einen proteolytischen Angriff anfällig machen könnte.

Anders als die β-Lactamase TEM-1 weist die β-Lactamase AmpC keine nativen Disulfidbrücken auf. Dies ist ein weiterer wesentlicher Vorteil dieses Enzyms, da dadurch die Bildung nicht nativer Disulfidisomere während der bakteriellen Produktion im oxidierenden Periplasma von *E. coli* von vornherein vermieden wird. Damit sind im Prinzip auch cytoplasmatische Expressionsstrategien in *E. coli*, vorausgesetzt, das fusionierte Anticalin ist ebenfalls frei von Disulfidbrücken (Skerra, 2008).

Zumindest mit CENTA als chromogenem Substrat zeigte die β-Lactamase AmpC eine deutlich höhere spezifische Aktivität als die β-Lactamase TEM-1 und erscheint deswegen insbesondere für diagnostische Zwecke vorteilhaft, wo i. d. R. ein großes Signal/Rausch-Verhältnis erwünscht ist.

Anticaline, die wie DigA16 auf dem Bilin Bindungsprotein (BBP) basieren, wurden in der Vergangenheit hauptsächlich durch Coexpression mit der Protein-Disulfidisomerase DsbC in *E. coli* produziert (Beste *et al.*, 1999; Schlehuber *et al.*, 2000). Dadurch wird die Ausbildung der beiden nativen Disulfidbindungen bei diesen Proteinen begünstigt (Schmidt *et al.*, 1998). Erstaunlicherweise war diese Vorgehensweise bei dem Fusionsprotein DigA16(H86N)-AmpC2 nicht notwendig. Die Produktion des Proteins mit dem Vektor pBBP65, der kein *dsbC*-Cistron kodiert, führte zu Proteinfraktionen, die sich sowohl in der Gelelekrophorese als auch bei Gelfiltrationsexperimenten homodispers verhielten und keine Anzeichen nicht-physiologischer Disulfidbindungen erkennen ließen.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der beiden unterschiedlichen Fusionspartner in DigA16(H86N)-AmpC2 erhalten ist und sich dieses Protein-Reagenz ausgezeichnet für den

sensitiven Nachweis digoxigenierter Proteine eignet. Zwar ist die Affinität des DigA16(H86N) zu Digoxigenin im Fusionsprotein um etwa den Faktor 10 gegenüber dem freien Anticalin reduziert. Ein ähnlicher Effekt wurde aber auch für chemische Konjugate, wie z. B. das von Siemers *et al.* (1997) beschriebene Fab:β-Lactamase Konjugat festgestellt. Die Affinität verringerte sich dabei um etwa den Faktor 2. Allerdings waren die enzymatischen Parameter des DigA16(H86N) Fusionsproteins in guter Übereinstimmung mit vergleichbaren Werten für die nahe verwandte β-Lactamase AmpC aus *Enterobacter cloacae* 908R (Bebrone *et al.*, 2001). Offenbar wird die enzymatische Aktivität dieser β-Lactamase im Fusionsprotein nicht negativ beeinflusst.

Aufgrund dieser Eigenschaften ist das Fusionsprotein DigA16(H86N)-AmpC2 prädestiniert für den diagnostischen Einsatz in immunchemischen Assays, wie z. B. ELISA, und stellt eine attraktive Alternative zu kommerziell erhältlichen anti-DIG Antikörper-Konjugaten dar.

Da sich die β-Lactamase AmpC im Verlauf dieser Arbeit insgesamt als stabiles Reporter-Enzym erwiesen hat, erscheint es vielversprechend, dieses Enzym auch als Effektor-Molekül in Fusionsproteinen mit tumorspezifischen Anticalinen (Schlehuber & Skerra, 2005; Hohlbaum & Skerra, 2007) einzusetzen. Eine Reihe durch β-Lactamase aktivierbarer Pro-Pharmaka – pharmakologisch inerte Verbindungen, die enzymatisch katalysiert in ein aktives Pharmakon überführt werden – sind bereits beschrieben worden (Shepherd *et al.*, 1991; Jungheim *et al.*, 1993; Hakimelahi *et al.*, 2002; Phelan *et al.*, 2009) so dass entsprechende Fusionsproteine sicherlich Alternativen zu traditionellen Reagenzien für die „*Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy*“ darstellen (siehe auch Abschnitt 1.2). Solche Fusionsproteine erlauben sowohl Tumor-Erkennung als auch Aktivierung des Pro-Pharmakon in einem außergewöhnlich kleinen Format, verglichen z. B. mit klassischen Antikörper/Enzym-Konjugaten. Sie versprechen daher verbesserte Eigenschaften wie z. B. schnellere Tumor-Penetration, kürzere Serum-Halbwertszeit und reduzierte Immunogenität (Yokota *et al.*, 1992).

## 4.4 Fusionsproteine des DigA16(H86N) mit der Alkalischen Phosphatase aus *E. coli*

Die Alkalische Phosphatase (PhoA) ist ein verbreitetes Reporter-Enzym für diagnostische Zwecke in Forschung und Entwicklung. Für kommerzielle Zwecke wird hauptsächlich die PhoA aus Kälberdarm eingesetzt, da sie deutlich höhere Aktivität als z. B. die PhoA aus *E. coli* aufweist (Muller *et al.*, 2001). Allerdings sind einige Mutanten der bakteriellen PhoA

beschrieben worden, die eine stark erhöhte enzymatische Aktivität zeigen und deshalb attraktive Kandidaten als Reporter-Enzyme in bifunktionellen Fusionsproteinen darstellen (siehe auch Abschnitt 1.2).

Deshalb wurden in dieser Arbeit neben der Wildtyp-PhoA aus *E. coli* auch deren Varianten D101S (Mandecki *et al.*, 1991) und D153G/D330N (Muller *et al.*, 2001) C-terminal mit dem Anticalin DigA16(H86N) fusioniert und in *E. coli* produziert. Bei allen drei Varianten des Fusionsproteins war wiederum eine proteolytische Fragmentierung zu beobachten (Abschnitt 3.6.1). Die störenden Proteinfragmente konnten auch durch Streptavidin-Affinitätschromatographie und anschließende Gelfiltration nicht vollständig abgetrennt werden. Diese Beobachtung ist bereits für analoge Fusionsproteine mit dem Vorgänger-Anticalin DigA16 beschrieben worden (Schlehuber *et al.*, 2000). Bei der im Polyacrylamidgel sichtbaren Abbaubande handelt es sich höchstwahrscheinlich um einen Großteil der PhoA-Domäne. Aufgrund der intrinsischen Dimerisierung der PhoA kommt es offenbar im Periplasma von *E. coli* zur teilweisen Bildung eines Heterodimers mit dem intakten Fusionsprotein, das durch chromatographische Verfahren nicht ohne weiteres von dessen Homodimer abgetrennt werden kann. Durch den Einsatz eines PhoA-defizienten *E. coli* Stammes für die Produktion dieser Fusionsproteine konnte im Rahmen anderer Studien dagegen ausgeschlossen werden, dass es sich bei der zusätzlich beobachteten Bande um endogene PhoA handelt, die im Periplasma von *E. coli* ebenfalls mit dem monomeren Fusionsprotein assoziieren könnte (Smejkal, 2005).

Die proteolytische Spaltung von rekombinanten Fusionsproteinen ist offenbar ein häufiges Phänomen und wurde bereits in Abschnitt 4.3 ausführlich behandelt. Da ähnliche Beobachtungen auch bei verschiedenen scFv-Fusionsproteinen mit der PhoA beschrieben wurden (Suzuki *et al.*, 1997; Griep *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999), liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei möglicherweise um ein generelles Problem von PhoA-Fusionsproteinen handelt.

Im Gegensatz zu DigA16(H86N)-AmpC2 (Abschnitt 3.5) handelt es sich bei den PhoA-Fusionsproteinen aufgrund ihrer intrinsischen Dimerisierungseigenschaft um bivalente funktionelle Proteine. Ursprünglich erwartete man daher eine deutlich erhöhte apparente Affinität aufgrund des Aviditätseffektes, wie er auch von bivalenten IgG Antikörpern und deren $Fab_2$-Fragmenten bekannt ist. Dagegen wurde zumindest in ELISA-Experimenten bei allen drei PhoA-Varianten eine zwar vergleichbare aber gegenüber dem freien Anticalin deutlich reduzierte Bindungsaktivität beobachtet, die sogar deutlich unter der des monovalenten AmpC-Fusionsproteins lag. Obwohl es prinzipiell nicht ungewöhnlich ist, dass Bindeproteine durch Fusionierung mit einem anderen Protein an Affinität einbüßen, vor allem durch

sterische Effekte (vgl. Abschnitt 4.3), müssen in diesem Fall andere gravierende Ursachen hinzukommen. So wäre es z. B. denkbar, dass es zu einer (zufälligen) Oberflächeninteraktion der beiden Fusionspartner kommt, wodurch im Anticalin die Zugänglichkeit der Bindungstasche für den Liganden erschwert wird. Es ist auch denkbar, dass die gewählte Linker-Sequenz für die Fusionierung der beiden Proteine weniger geeignet ist und möglicherweise sogar deren Faltungsintegrität beeinflusst (Robinson & Sauer, 1998).

Im Gegensatz dazu zeigten die verschiedenen Varianten der Alkalischen Phosphatase als Fusionsprotein mit dem Anticalin DigA16(H86N) offenbar volle Aktivität hinsichtlich der katalytischen Konstanten, die im Bereich publizierter Werte für die freien Enzyme bzw. andere Fusionsproteine lagen (vgl. Tabelle 15). Die PhoA-Doppelmutante D153G/D330N erreichte unter optimalen Pufferbedingungen die höchste katalytische Aktivität ($k_{cat}$ = 1395 $s^{-1}$) und war bis zu 39-fach aktiver als das Wildtyp-Enzym. Damit ist dieses Fusionsprotein fast genauso aktiv wie die PhoA aus Kälberdarm (Weissig *et al.*, 1993), die bevorzugt für kommerzielle Antikörper-Konjugate eingesetzt wird.

Trotz der reduzierten DIG-Affinität des Fusionsproteins PhoA(D153G/D330N)-DigA16(H86N) hat sich dieses Konstrukt als nützliches Reagenz für Standardanwendungen, wie z. B. ELISA und *Western-Blotting* erwiesen, und stellt eine brauchbare Alternative zu käuflichen Antikörper-Konjugaten dar. Aufgrund der Vielzahl gut erhältlicher PhoA-Substrate kann es für die unterschiedlichsten Anwendungen in der biowissenschaftlichen Forschung eingesetzt werden und übertrifft in dieser Hinsicht sogar das ansonsten leistungsfähigere β-Lactamase Fusionsprotein DigA16(H86N)-AmpC2.

## 4.5 Ausblick

Die voliegende Arbeit hat gezeigt, dass es möglich ist, sehr große Protein-Bibliotheken mit mehr als $10^{10}$ Varianten einer *In-Vivo*-Selektion zu unterwerfen, vorausgesetzt, geeignete Substrate sind prinzipiell verfügbar und sämtliche Selektionsparameter werden im Vorfeld sorgfältig optimiert. Unterstützt durch die wenigen wissenschaftlichen Publikationen zu diesem Themengebiet bestätigen die gesammelten Erfahrungen aus dieser Studie allerdings, dass das *De-Novo*-Design künstlicher Enzyme ein sehr schwieriges Unterfangen ist. Es ist einleuchtend, dass der Erfolg eines solchen Vorhabens unmittelbar von der Qualität der eingesetzten Protein-Bibliotheken abhängt.

Ausschlaggebend ist die Präsenz von Vertretern mit einer notwendigen katalytischen Minimal-Aktivität, um den betroffenen Wirtszellen einen nachweisbaren Wachstumsvorteil zu verschaffen. Es ist deswegen essentiell, Wege zu finden, die katalytische Problemstellung aus struktureller Sicht so weit einzuengen, dass im durchmusterten Sequenzraum der Aminosäureseitenketten mit hoher Wahrscheinlichkeit die erwünschte enzymatische Aktivität zu finden ist. Die wissenschaftliche Literatur der letzten Jahre zu diesem Themengebiet gibt Anlass zu der Prognose, dass wesentliche Impulse in die Richtung struktureller Vorhersagen gehen werden (Review siehe Damborsky & Brezovsky, 2009; Siegel *et al.*, 2010). Durch die zunehmende strukturelle Information im Bereich der Anticalin-Technologie und den Einsatz moderner bioinformatischer Methoden werden neue Konzepte für das Design von Protein-Bibliotheken umgesetzt werden, die diese Voraussetzungen besser erfüllen und auf der Basis der u. a. hier etablierten Selektionsmethoden zu Prototyp-Enzymen führen können.

Die in dieser Studie daneben untersuchen Fusionsproteine aus dem Anticalin DigA16(H86N) und verschieden Reporter-Enzymen haben nicht zuletzt durch die sehr hohe Affinität dieses Anticalins einen Reifegrad erreicht, in dem sie ohne weiteres mit kommerziellen Antikörper-Reporterenzym-Konjugaten konkurrieren können. In dieser Hinsicht sticht vor allem das Fusionsprotein mit der β-Lactamase AmpC aus *Enterobacter cloacae* hervor, das kostengünstig im Labormaßstab produziert und in wenigen Schritten gereinigt werden kann. Die universelle Anwendbarkeit dieses neuartigen Reagens für diagnostische Zwecke ist damit hauptsächlich durch die Verfügbarkeit signalgebender Substrate beschränkt. Obwohl für die meisten Standardanwendungen entsprechende Substrate angeboten werden, so fehlt derzeit erstaunlicherweise ein kommerziell erhältliches Substrat für β-Lactamasen, das ein präzipitierendes Reaktionsprodukt liefert und daher in Western-Blot-Expereimenten eingesetzt werden kann.

# 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Selektionsbedingungen etabliert, um große Anticalin-Bibliotheken *in vivo* auf bestimmte enzymatische Aktivitäten zu selektieren. Das grundlegende Prinzip dieser Selektionen bestand in der Wiederherstellung des bakteriellen Wachstums durch Komplementierung eines unterbrochenen und für die Zelle essentiellen Stoffwechselweges. Dazu wurden unterschiedliche Wachstumsbedingungen erprobt, um in Verbindung mit ausgewählten auxotrophen *E. coli* Stämmen stringente Selektionsbedingungen zu erzeugen. Insgesamt wurden mehrere Substrate gefunden, mit denen Selektionsexperimente prinzipiell möglich waren. Darunter zählten unter anderem Esterverbindungen (p-Nitrophenylphosphat) und Aminosäure-Derivate wie z. B. Fmoc-L-Prolin. Geeignete auxotrophe *E. coli* Stämme konnten z. T. von öffentlichen Stammsammlungen bezogen werden.

Für die Selektionsexperimente wurde auf eine zuvor beschriebene genetische Bibliothek des Bilin-Bindungsproteins zurückgegriffen. Außerdem wurde eine speziell auf das vorliegende Vorhaben zugeschnittene neue Lipocalin-Bibliothek entworfen. Dazu wurden 16 Aminosäuren im Inneren der Bindungstasche des Bakteriellen Lipocalins aus *E. coli* (Blc) einer Zufallsmutagenese unterworfen. Die experimentelle Diversität dieser Blc-Bibliothek lag bei $3 \cdot 10^{10}$ Varianten. Mit beiden Bibliotheken wurden unter den zuvor etablierten Bedingungen Selektionsexperimente durchgeführt. Dazu wurden entweder die naiven Bibliotheken in einem einmaligen Selektionsprozess eingesetzt oder es wurden fünf aufeinanderfolgende Selektionszyklen durchgeführt. Im letzteren Fall wurde nach jedem Zyklus durch Zufallsmutagenese erneut Variabilität im Lipocalin-Gen erzeugt. Obwohl in mehreren Fällen das Wachstum vereinzelter Kolonien unter den Selektionsbedingungen beobachtet werden konnte, war es nicht möglich, den beobachteten Phänotyp mit dem jeweils kodierten Lipocalin in Zusammenhang zu bringen und eine Variante mit enzymatischer Aktivität zu isolieren. Offenbar war die kombinatorische Herausforderung zu hoch, um aus den Bibliotheken mit ihrer beschränkten Komplexität erfolgreich katalytisch aktive Vertreter zu isolieren. Allerdings bieten die hier sorgfältig optimierten Selektionsbedingungen eine gute Grundlage für zukünftige Experimente mit verbesserten Molekülbibliotheken.

Das durch *Protein Engineering* zuvor erzeugte Anticalin DigA16(H86N) ist eine verbesserte Variante des Vorgängers DigA16 mit Spezifität für das Digitalis-Steroid Digoxigenin (DIG). Es wurde auf Basis der Kristallstruktur durch die Aminosäuresubstitution H86N erzeugt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieses Anticalin einer umfangreichen

biophysikalischen Charakterisierung unterzogen. Diese Untersuchungen ergaben, dass in Abhängigkeit von der eingesetzten Messmethode die Bindungsaffinität gegenüber DIG im Bereich von 1-3 nM liegt und damit rund zehnmal höher ist als bei DigA16. Damit weist dieses Bindeprotein eine ähnlich hohe oder sogar höhere Affinität gegenüber DIG auf als die monovalenten Fab- oder scFv-Fragmente analoger Antikörper. Diese Eigenschaften waren eine ausgezeichnete Ausgangssituation für die Konstruktion kleiner, diagnostisch relevanter Fusionsproteine mit ausgewählten Reporter-Enzymen.

Aufgrund ihrer guten enzymatischen Eigenschaften wurden zwei β-Lactamasen, TEM-1 von Transposon Tn3 aus *E. coli* und AmpC aus *Enterobacter cloacae,* als Reporter-Enzyme auf genetischer Ebene mit DigA16(H86N) fusioniert. Während das TEM-1-Fusionsprotein nur mit geringer Ausbeute in *E. coli* produziert werden konnte, eine relativ starke Tendenz zu proteolytischer Fragmentierung zeigte und eine vergleichsweise geringe enzymatische Aktivität aufwies, zeigte das Fusionsprotein mit der β-Lactamase AmpC wesentlich bessere Eigenschaften. Dieses Fusionsprotein konnte in deutlich höherer Ausbeute im Periplasma von *E. coli* produziert und durch Metallchelatchromatographie und anschließende Gelfiltration bis zur Homogenität gereinigt werden. Die umfassende biochemische Charakterisierung zeigte, dass sowohl die Bindungseigenschaften des Anticalins als auch die enzymatische Aktivität der β-Lactamase im diesem Fusionsprotein nahezu vollständig erhalten waren. Die Fluoreszenztitration mit DIG als Ligand ergab eine $K_d$ von 13,5 nM, und die enzymatischen Parameter wurden zu $k_{cat}$ = 489 $s^{-1}$ und $K_m$ = 19,8 µM bestimmt. Weiterhin wurde das Fusionsprotein erfolgreich im ELISA eingesetzt, um die DIG-Gruppe im Einschritt-Verfahren nachzuweisen.

Weiterhin wurden Fusionsproteine aus dem Anticalin DigA16(H86N) und der Alkalischen Phosphatase (PhoA) aus *E. coli* sowie ihren Mutanten D101S und D153G/D330N produziert und gereinigt. Diese Fusionsproteine katalysierten die Hydrolyse von p-Nitrophenolat mit einem pH-Optimum bei pH 10. Unter diesen Bedingungen zeigte PhoA(D153G/D330N)-DigA16(H86N) die höchste enzymatische Aktivität aller hier untersuchten Fusionsproteine; unter optimalen Reaktionsbedingungen war dieses rund 40-mal aktiver als das Pendant mit der Wildtyp-PhoA und vergleichbar mit der hochaktiven Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm, die im kommerziell diagnostischen Bereich bevorzugt für die chemische Kopplung mit Antikörpern eingesetzt wird. Im ELISA zeigte insbesondere die Variante PhoA(D153G/D330N)-DigA16(H86N) eine ausgezeichnete Signalverstärkung und war für Bindungsstudien bestens geeignet, um mit Digoxigenin markierte biologische Makromoleküle im Einschritt-Verfahren nachzuweisen.

# 6 Literaturverzeichnis

Aiyar, A., Xiang, Y. & Leis, J. (1996) Site-directed mutagenesis using overlap extension PCR. *Methods Mol. Biol.* 57, 177-191.

Akanuma, S., Yamagishi, A., Tanaka, N. & Oshima, T. (1998) Serial increase in the thermal stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Bacillus subtilis* by experimental evolution. *Protein Sci.* 7, 698-705.

Altamirano, M.M., Blackburn, J.M., Aguayo, C. & Fersht, A.R. (2000) Directed evolution of new catalytic activity using the α/β-barrel scaffold. *Nature* 403, 617-622.

Altamirano, M.M., Blackburn, J.M., Aguayo, C. & Fersht, A.R. (2002) Retraction. Directed evolution of new catalytic activity using the α/β-barrel scaffold. *Nature* 417, 468.

Ambler, R.P. (1980) The structure of β-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 289, 321-331.

Arkin, M.R. & Wells, J.A. (1998) Probing the importance of second sphere residues in an esterolytic antibody by phage display. *J. Mol. Biol.* 284, 1083-1094.

Azoitei, M.L., Ban, Y.E., Julien, J.P., Bryson, S., Schroeter, A., Kalyuzhniy, O., Porter, J.R., Adachi, Y., Baker, D., Pai, E.F. & Schief, W.R. (2012) Computational design of high-affinity epitope scaffolds by backbone grafting of a linear epitope. *J. Mol. Biol.* 415, 175-192.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L. & Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2, 1-11.

Baca, M., Scanlan, T.S., Stephenson, R.C. & Wells, J.A. (1997) Phage display of a catalytic antibody to optimize affinity for transition-state analog binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10063-10068.

Bach, M.L., Lacroute, F. & Botstein, D. (1979) Evidence for transcriptional regulation of orotidine-5'-phosphate decarboxylase in yeast by hybridization of mRNA to the yeast structural gene cloned in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 386-390.

Baneyx, F. & Georgiou, G. (1989) Expression, purification, and enzymatic characterization of a protein A–β-lactamase hybrid protein. *Enzyme Microb. Technol.* 11, 559-567.

Bebrone, C., Moali, C., Mahy, F., Rival, S., Docquier, J.D., Rossolini, G.M., Fastrez, J., Pratt, R.F., Frere, J.M. & Galleni, M. (2001) CENTA as a chromogenic substrate for studying β-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1868-1871.

Becker, S., Schmoldt, H.U., Adams, T.M., Wilhelm, S. & Kolmar, H. (2004) Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 323-329.

Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. & Wheeler, D.L. (2008) GenBank. *Nucleic Acids Res.* 36, D25-30.

Benson, D.E., Wisz, M.S. & Hellinga, H.W. (2000) Rational design of nascent metalloenzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6292-6297.

Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. & Bourne, P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235-242.

Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62, 293-300.

Beste, G. (1998) Evolutives Design künstlicher Bindungsproteine auf Grundlage der β-Barrel-Proteinarchitektur der Lipocaline. Dissertation, Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Chemie, Darmstadt.

Beste, G., Schmidt, F.S., Stibora, T. & Skerra, A. (1999) Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1898-1903.

Bieniarz, C., Young, D.F. & Cornwell, M.J. (1992) Chromogenic redox assay for β-lactamases yielding water-insoluble products. I. Kinetic behavior and redox chemistry. *Anal. Biochem.* 207, 321-328.

Bishop, R.E. (2000) The bacterial lipocalins. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 73-83.

Bishop, R.E., Penfold, S.S., Frost, L.S., Holtje, J.V. & Weiner, J.H. (1995) Stationary phase expression of a novel *Escherichia coli* outer membrane lipoprotein and its relationship with mammalian apolipoprotein D. Implications for the origin of lipocalins. *J. Biol. Chem.* 270, 23097-23103.

Bolon, D.N. & Mayo, S.L. (2001) Enzyme-like proteins by computational design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 14274-14279.

Bolon, D.N., Voigt, C.A. & Mayo, S.L. (2002) *De novo* design of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 125-129.

Bornscheuer, U.T., Altenbuchner, J. & Meyer, H.H. (1998) Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of epothilones. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 554-559.

Breustedt, D.A. (2008) Funktionelle und strukturelle Charakterisierung humaner Vertreter der Lipocalin-Proteinfamilie. Dissertation, Technische Universität München, Lehrstuhl für Biologische Chemie, Freising.

Brumano, M.H., Rogana, E. & Swaisgood, H.E. (2000) Thermodynamics of unfolding of β-trypsin at pH 2.8. *Arch. Biochem. Biophys.* 382, 57-62.

Bryson, J.W., Betz, S.F., Lu, H.S., Suich, D.J., Zhou, H.X., O'Neil, K.T. & DeGrado, W.F. (1995) Protein design: a hierarchic approach. *Science* 270, 935-941.

Buchholz, F., Angrand, P.O. & Stewart, A.F. (1998) Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* 16, 657-662.

Buijs, J. & Hlady, V.V. (1997) Adsorption kinetics, conformation, and mobility of the growth hormone and lysozyme on solid surfaces, Studied with TIRF. *J. Colloid. Interface Sci.* 190, 171-181.

Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-378.

Butera, D., Skielka, K., McLane, M.A., Paquette-Straub, C., Ducancel, F. & da Silva, A.M.M. (2003) Cloning, expression, and characterization of a bi-functional disintegrin/alkaline phosphatase hybrid protein. *Protein Expr. Purif.* 31, 286-291.

Campanacci, V., Bishop, R.E., Blangy, S., Tegoni, M. & Cambillau, C. (2006) The membrane bound bacterial lipocalin Blc is a functional dimer with binding preference for lysophospholipids. *FEBS Lett.* 580, 4877-4883.

Campanacci, V., Nurizzo, D., Spinelli, S., Valencia, C., Tegoni, M. & Cambillau, C. (2004) The crystal structure of the *Escherichia coli* lipocalin Blc suggests a possible role in phospholipid binding. *FEBS Lett.* 562, 183-188.

Carrier, A., Ducancel, F., Settiawan, N.B., Cattolico, L., Maillere, B., Leonetti, M., Drevet, P., Menez, A. & Boulain, J.C. (1995) Recombinant antibody-alkaline phosphatase conjugates for diagnosis of human IgGs: application to anti-HBsAg detection. *J. Immunol. Methods* 181, 177-186.

Charbonnier, J.B., Gigant, B., Golinelli-Pimpaneau, B. & Knossow, M. (1997) Similarities of hydrolytic antibodies revealed by their X-ray structures: a review. *Biochimie* 79, 653-660.

Christensen, H., Martin, M.T. & Waley, S.G. (1990) β-lactamases as fully efficient enzymes. Determination of all the rate constants in the acyl-enzyme mechanism. *Biochem. J.* 266, 853-861.

Cleary, P.P. & Campbell, A. (1972) Deletion and complementation analysis of biotin gene cluster of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 112, 830-839.

Cohen, D.S. & Pielak, G.J. (1994) Stability of yeast iso-1-ferricytochrome c as a function of pH and temperature. *Protein Sci.* 3, 1253-1260.

Cohen, S.N., Chang, A.C. & Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110-2114.

Coleman, J.E. (1992) Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21, 441-483.

Consortium, U. (2010) The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010. *Nucleic Acids Res.* 38, D142-148.

Crasto, C.J. & Feng, J.A. (2000) LINKER: a program to generate linker sequences for fusion proteins. *Protein Eng.* 13, 309-312.

Creighton, T.E. (1992) Proteins: Structures and Molecular Properties. 2. Aufl., W. H. Freeman, New York, NY, USA.

Dalby, P.A. (2007) Engineering enzymes for biocatalysis. *Recent Pat. Biotechnol.* 1, 1-9.

Damborsky, J. & Brezovsky, J. (2009) Computational tools for designing and engineering biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 26-34.

Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6640-6645.

DeLano, W.L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.

Deutch, A.H., Rushlow, K.E. & Smith, C.J. (1984) Analysis of the *Escherichia coli proBA* locus by DNA and protein sequencing. *Nucleic. Acids Res.* 12, 6337-6355.

Devereux, J., Haeberli, P. & Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic. Acids. Res.* 12, 387-395.

Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16, 6127-6145.

Ducancel, F., Gillet, D., Carrier, A., Lajeunesse, E., Ménez, A. & Boulain, J.C. (1993) Recombinant colorimetric antibodies: construction and characterization of a bifunctional F(ab)2/alkaline phosphatase conjugate produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology (NY)* 11, 60160-60165.

Dwyer, M.A., Looger, L.L. & Hellinga, H.W. (2004) Computational design of a biologically active enzyme. *Science* 304, 1967-1971.

Dwyer, M.A., Looger, L.L. & Hellinga, H.W. (2008) Retraction. *Science* 319, 569.

Eichinger, A., Nasreen, A., Kim, H.J. & Skerra, A. (2007) Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D. *J. Biol. Chem.* 282, 31068-31075.

Emili, Q. & Cagney, G. (2000) Large-scale functional analysis using peptide or protein arrays. *Natue Biotech.* 18, 393-397.

Essen, L.O. & Skerra, A. (1994) The *de novo* design of an antibody combining site. Crystallographic analysis of the VL domain confirms the structural model. *J. Mol. Biol.* 238, 226-244.

Eyring, H. (1935) The activated complex in chemical reactions. *J. Chem. Phys.* 3, 107-115.

Farrant, J. (1980) General observations on cell preservation. In: Ashwood-Smith, M.J. & Farrant, J. (Hrsg.) Low temperature preservation in medicine and biology. 1. Aufl., Pitman Medical Ltd., Kent, England.

Fastrez, J. (1997) *In vivo* versus *in vitro* screening or selection for catalytic activity in enzymes and abzymes. *Mol. Biotechnol.* 7, 37-55.

Fernandes, P.B. (1998) Technological advances in high-throughput screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 597-603.

Fersht, A.R. (1998) Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. 1. Aufl., W. H. Freeman, New York, NY, USA.

Fiedler, M. (2002) Neutralisierung eines Inhibitors der neuronalen Regeneration im ZNS: Optimierung des anti-Nogo-A Antikörpers IN-1 durch Protein *Engineering*. Dissertation, Technische Universität München, Lehrstuhl für Biologsiche Chemie, Freising.

Fiedler, M., Horn, C., Bandtlow, C., Schwab, M.E. & Skerra, A. (2002) An engineered IN-1 F(ab) fragment with improved affinity for the Nogo-A axonal growth inhibitor permits immunochemical detection and shows enhanced neutralizing activity. *Protein Eng.* 15, 931-941.

Fiedler, M. & Skerra, A. (2001a) *pro*BA complementation of an auxotrophic *E. coli* strain improves plasmid stability and expression yield during fermenter production of a recombinant antibody fragment. *Gene* 274, 111-118.

Fiedler, M. & Skerra, A. (2001b) Purification and characterisation of His-tagged antibody fragments. In: Kontermann, R. & S., D. (Hrsg.) Antibody Engineering. 1. Aufl., Springer Verlag, Heidelberg.

Finch, P.W., Wilson, R.E., Brown, K., Hickson, I.D. & Emmerson, P.T. (1986) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli ptr* gene encoding protease III. *Nucleic. Acids Res.* 14, 7695-7703.

Finn, R.D., Tate, J., Mistry, J., Coggill, P.C., Sammut, S.J., Hotz, H.R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L. & Bateman, A. (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 36, D281-288.

Fling, S.P. & Gregerson, D.S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* 155, 83-88.

Foote, J. & Eisen, H.N. (1995) Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1254-1256.

Francisco, J.A., Campbell, R., Iverson, B.L. & Georgiou, G. (1993) Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10444-10448.

Frère, J.M. (1995) β-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol. Microbiol.* 16, 385-395.

Geisselsoder, J., Witney, F. & Yuckenberg, P. (1987) Efficient site-directed *in vitro* mutagenesis. *Biotechniques* 5, 786-791.

Gibson, T.J. (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome. PhD Thesis, Cambridge University, Cambridge, UK.

Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319-326.

Goetz, D.H., Holmes, M.A., Borregaard, N., Bluhm, M.E., Raymond, K.N. & Strong, R.K. (2002) The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol. Cell* 10, 1033-1043.

Griep, R.A., van Twisk, C., Kerschbaumer, R.J., Harper, K., Torrance, L., Himmler, G., van der Wolf, J.M. & Schots, A. (1999) pSKAP/S: an expression vector for the production of single-chain Fv alkaline phosphatase fusion proteins. *Protein. Expr. Purif.* 16, 63-69.

Hakimelahi, G.H., Shia, K.S., Pasdar, M., Hakimelahi, S., Khalafi-Nezhad, A., Soltani, M.N., Mei, N.W., Mei, H.C., Saboury, A.A., Rezaei-Tavirani, M. & Moosavi-Movahedi, A.A. (2002) Design, synthesis, and biological evaluation of a cephalosporin-monohydroguaiaretic acid prodrug activated by a monoclonal antibody–β-lactamase conjugate. *Bioorg. Med. Chem.* 10, 2927-2932.

Hayashi, S., Koch, J.P. & Lin, E.C. (1964) Active transport of L-α-glycerophosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 239, 3098-3105.

Heffron, F., McCarthy, B.J., Ohtsubo, H. & Ohtsubo, E. (1979) DNA sequence analysis of the transposon Tn3: three genes and three sites involved in transposition of Tn3. *Cell* 18, 1153-1163.

Heffron, F., Sublett, R., Hedges, R.W., Jacob, A. & Falkow, S. (1975) Origin of the TEM-beta-lactamase gene found on plasmids. *J. Bacteriol.* 122, 250-256.

Hellebust, H., Uhlen, M. & Enfors, S.O. (1989) Effect of protein fusion on the stability of proteolytically sensitive sites in recombinant DNA proteins. *J. Biotech.* 12, 275-284.

Hengen, P.N. (1996) Methods and reagents. Preparing ultra-competent *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* 21, 75-76.

Hermanson, G.T. (2008) Bioconjugate Techniques. 2. Aufl., Academic Press, San Diego, CA, USA.

Hilvert, D. (2000) Critical analysis of antibody catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 751-793.

Hilvert, D. (2005) Critical analysis of antibody catalysis. In: Keinan, E. (Hrsg.) Catalytic Antibodies. 1. Aufl., WILEY-VCH Verlag, Weinheim.

Ho, S.P., Britton, D.H., Stone, B.A., Behrens, D.L., Leffet, L.M., Hobbs, F.W., Miller, J.A. & Trainor, G.L. (1996) Potent antisense oligonucleotides to the human multidrug resistance-1 mRNA are rationally selected by mapping RNA-accessible sites with oligonucleotide libraries. *Nucleic Acids Res.* 24, 1901-1907.

Hohlbaum, A.M. & Skerra, A. (2007) Anticalins: the lipocalin family as a novel protein scaffold for the development of next-generation immunotherapies. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 3, 491-501.

Holck, A. & Kleppe, K. (1988) Cloning and sequencing of the gene for the DNA-binding 17 K protein of *Escherichia coli*. *Gene* 67, 117-124.

Holtke, H.J., Ankenbauer, W., Muhlegger, K., Rein, R., Sagner, G., Seibl, R. & Walter, T. (1995) The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids - an overview. *Cell. Mol. Biol.* 41, 883-905.

Holtz, K.M. & Kantrowitz, E.R. (1999) The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis. *FEBS Lett.* 462, 7-11.

Hoogenboom, H.R. (2005) Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* 23, 1105-1116.

Huang, M. & Pittard, J. (1967) Genetic analysis of mutant strains of *Escherichia coli* requiring p-aminobenzoic acid for growth. *J. Bacteriol.* 93, 1938-1942.

Huber, R., Schneider, M., Mayr, I., Muller, R., Deutzmann, R., Suter, F., Zuber, H., Falk, H. & Kayser, H. (1987) Molecular structure of the bilin binding protein (BBP) from *Pieris brassicae* after refinement at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 198, 499-513.

Hunter, M.M., Margolies, M.N., Ju, A. & Haber, E. (1982) High-affinity monoclonal antibodies to the cardiac glycoside, digoxin. *J. Immunol.* 129, 1165-1172.

Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Bruccoleri, R.E., Haber, E. & Crea, R. (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5879-5883.

Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.

Jacob, F. & Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3, 318-356.

Janda, K.D., Shevlin, C.G. & Lerner, R.A. (1993) Antibody catalysis of a disfavored chemical transformation. *Science* 259, 490-493.

Jencks, W.P. (1969) Catalysis in chemistry and enzymology. 1. Aufl., McGraw-Hill, New York, NY, USA.

Jiang, L., Althoff, E.A., Clemente, F.R., Doyle, L., Rothlisberger, D., Zanghellini, A., Gallaher, J.L., Betker, J.L., Tanaka, F., Barbas, C.F., 3rd, Hilvert, D., Houk, K.N., Stoddard, B.L. & Baker, D. (2008) *De novo* computational design of retro-aldol enzymes. *Science* 319, 1387-1391.

Johnson, W.C., Jr. (1988) Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17, 145-166.

Jones, R.N., Wilson, H.W. & Novick, W.J., Jr. (1982a) *In vitro* evaluation of pyridine-2-azo-p-dimethylaniline cephalosporin, a new diagnostic chromogenic reagent, and comparison with nitrocefin, cephacetrile, and other β-lactam compounds. *J. Clin. Microbiol.* 15, 677-683.

Jones, R.N., Wilson, H.W., Novick, W.J., Jr., Barry, A.L. & Thornsberry, C. (1982b) *In vitro* evaluation of CENTA, a new β-lactamase-susceptible chromogenic cephalosporin reagent. *J. Clin. Microbiol.* 15, 954-958.

Joris, B., De Meester, F., Galleni, M., Reckinger, G., Coyette, J., Frere, J.M. & Van Beeumen, J. (1985) The β-lactamase of Enterobacter cloacae P99. Chemical properties, N-terminal sequence and interaction with 6β-halogenopenicillanates. *Biochem. J.* 228, 241-248.

Jungheim, L.N., Shepherd, T.A. & Kling, J.K. (1993) Synthesis of a cephalosporin-doxorubicin antitumor prodrug: a substrate for an antibody-targeted enzyme. *Heterocycles* 35, 339-348.

Kaplan, J. & DeGrado, W.F. (2004) *De novo* design of catalytic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 11566-11570.

Karanicolas, J., Corn, J.E., Chen, I., Joachimiak, L.A., Dym, O., Peck, S.H., Albeck, S., Unger, T., Hu, W., Liu, G., Delbecq, S., Montelione, G.T., Spiegel, C.P., Liu, D.R. & Baker, D. (2011) A *de novo* protein binding pair by computational design and directed evolution. *Mol. Cell.* 42, 250-260.

Karlsson, R., Michaelsson, A. & Mattsson, L. (1991) Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J. Immunol. Methods* 145, 229-240.

Kerr, D.E., Vrudhula, V.M., Svensson, H.P. & Siemers, N.O. (1999) Comparison of recombinant and synthetically formed monoclonal antibody–β-lactamase conjugates for anticancer prodrug activation. *Bioconjug. Chem.* 10, 1084-1089.

Keseler, I.M., Bonavides-Martinez, C., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Gunsalus, R.P., Johnson, D.A., Krummenacker, M., Nolan, L.M., Paley, S., Paulsen, I.T., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Shearer, A.G. & Karp, P.D. (2009) EcoCyc: a comprehensive view of *Escherichia coli* biology. *Nucleic Acids Res.* 37, D464-470.

Kessler, C. (1991) The digoxigenin:anti-digoxigenin (DIG) technology – a survey on the concept and realization of a novel bioanalytical indicator system. *Mol. Cell. Probes* 5, 161-205.

Khatkhatay, M.I. & Desai, M. (1999) A comparison of performances of four enzymes used in ELISA with special reference to β-lactamase. *J. Immunoassay* 20, 151-183.

Kim, E.E. & Wyckoff, H.W. (1991) Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. *J. Mol. Biol.* 218, 449-464.

Kim, H.J., Eichinger, A. & Skerra, A. (2009) High-affinity recognition of lanthanide(III) chelate complexes by a reprogrammed human lipocalin 2. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 3565-3576.

Knippers, R. (2006) Molekulare Genetik. 9. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart.

Korndörfer, I.P., Beste, G. & Skerra, A. (2003a) Crystallographic analysis of an "anticalin" with tailored specificity for fluorescein reveals high structural plasticity of the lipocalin loop region. *Proteins* 53, 121-129.

Korndörfer, I.P., Schlehuber, S. & Skerra, A. (2003b) Structural mechanism of specific ligand recognition by a lipocalin tailored for the complexation of digoxigenin. *J. Mol. Biol.* 330, 385-396.

Kumamaru, T., Suenaga, H., Mitsuoka, M., Watanabe, T. & Furukawa, K. (1998) Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase. *Nat. Biotechnol.* 16, 663-666.

Kunkel, T.A., Roberts, J.D. & Zakour, R.A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* 154, 367-382.

Kurz, J.L. (1963) Transition state characterization for catalyzed reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 987–991.

Labrou, N.E. (2010) Random mutagenesis methods for *in vitro* directed enzyme evolution. *Curr. Protein Pept. Sci.* 11, 91-100.

Lesley, S.A., Patten, P.A. & Schultz, P.G. (1993) A genetic approach to the generation of antibodies with enhanced catalytic activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1160-1165.

Lindbladh, C., Persson, M., Bulow, L., Stahl, S. & Mosbach, K. (1987) The design of a simple competitive ELISA using human proinsulin-alkaline phosphatase conjugates prepared by gene fusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149, 607-614.

Ling, M.M. (2003) Large antibody display libraries for isolation of high-affinity antibodies. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 6, 421-432.

Lobkovsky, E., Billings, E.M., Moews, P.C., Rahil, J., Pratt, R.F. & Knox, J.R. (1994) Crystallographic structure of a phosphonate derivative of the *Enterobacter cloacae* P99 cephalosporinase: mechanistic interpretation of a β-lactamase transition-state analog. *Biochemistry* 33, 6762-6772.

Löfblom, J. (2011) Bacterial display in combinatorial protein engineering. *Biotechnol J.* 6, 1115-11129.

Lumry, R. & Biltonen, R. (1966) Validity of the "two-state" hypothesis for conformational transitions of proteins. *Biopolymers* 4, 917-944.

Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W., Short, J.M., Sorge, J.A. & Mathur, E.J. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108, 1-6.

MacBeath, G., Kast, P. & Hilvert, D. (1998) Redesigning enzyme topology by directed evolution. *Science* 279, 1958-1961.

Mahan, M.J. & Csonka, L.N. (1983) Genetic analysis of the *proBA* genes of *Salmonella typhimurium*: physical and genetic analyses of the cloned $proB^{+}A^{+}$ genes of *Escherichia*

*coli* and of a mutant allele that confers proline overproduction and enhanced osmotolerance. *J. Bacteriol.* 156, 1249-1262.

Mandecki, W., Shallcross, M.A., Sowadski, J. & Tomazic-Allen, S. (1991) Mutagenesis of conserved residues within the active site of *Escherichia coli* alkaline phosphatase yields enzymes with increased $k_{cat}$. *Protein Eng.* 4, 801-804.

Martineau, P., Jones, P. & Winter, G. (1998) Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 280, 117-127.

Martinez, M.B., Flickinger, M.C. & Nelsestuen, G.L. (1996) Accurate kinetic modeling of alkaline phosphatase in the *Escherichia coli* periplasm: implications for enzyme properties and substrate diffusion. *Biochemistry* 35, 1179-1186.

Martinez, M.B., Flickinger, M.C. & Nelsestuen, G.L. (1999) Steady-state enzyme kinetics in the *Escherichia coli* periplasm: a model of a whole cell biocatalyst. *J. Biotechnol.* 71, 59-66.

Matthew, M. & Hedges, R.W. (1976) Analytical isoelectric focusing of R factor-determined β-lactamases: correlation with plasmid compatibility. *J. Bacteriol.* 125, 713-718.

McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. & Chiswell, D.J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554.

McDonagh, C.F., Beam, K.S., Wu, G.J., Chen, J.H., Chace, D.F., Senter, P.D. & Francisco, J.A. (2003) Improved yield and stability of L49-sFv–β-lactamase, a single-chain antibody fusion protein for anticancer prodrug activation, by protein engineering. *Bioconjug. Chem.* 14, 860-869.

Melton, R.G. & Sherwood, R.F. (1996) Antibody-enzyme conjugates for cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 153-165.

Miller, B.T., Collins, T.J., Rogers, M.E. & Kurosky, A. (1997) Peptide biotinylation with amine-reactive esters: differential side chain reactivity. *Peptides* 18, 1585-1595.

Mills, J.L., Liu, G., Skerra, A. & Szyperski, T. (2009) NMR structure and dynamics of the engineered fluorescein-binding lipocalin FluA reveal rigidification of β-barrel and variable loops upon enthalpy-driven ligand binding. *Biochemistry* 48, 7411-7419.

Muller, B.H., Chevrier, D., Boulain, J.C. & Guesdon, J.L. (1999) Recombinant single-chain Fv antibody fragment-alkaline phosphatase conjugate for one-step immunodetection in molecular hybridization. *J. Immunol. Methods* 227, 177-185.

Muller, B.H., Lamoure, C., Le Du, M.H., Cattolico, L., Lajeunesse, E., Lemaître, F., Pearson, A., Ducancel, F., Ménez, A. & Boulain, J.C. (2001) Improving *Escherichia coli* alkaline phosphatase efficacy by additional mutations inside and outside the catalytic pocket. *Chembiochem* 2, 517-523.

Müller, H.N. & Skerra, A. (1993) Functional expression of the uncomplexed serum retinol-binding protein in *Escherichia coli*. Ligand binding and reversible unfolding characteristics. *J. Mol. Biol.* 230, 725-732.

Murphy, J.E. & Kantrowitz, E.R. (1994) Why are mammalian alkaline phosphatases much more active than bacterial alkaline phosphatases? *Mol. Microbiol.* 12, 351-357.

Myszka, D.G. (1999) Improving biosensor analysis. *J. Mol. Recognit.* 12, 279-284.

Nasri, M. & Thomas, D. (1986) Relaxation of recognition sequence of specific endonuclease *Hin*dIII. *Nucleic Acids Res.* 14, 811-821.

Neidhardt, F.C. & Curtiss, R. (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2. Aufl., ASM Press, Washington D.C., DC, USA.

Neuhard, J. & Nygaard, P. (1987) Purines and pyrimidines. In: Neidhardt, F.C. (Hrsg.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. 1. Aufl., ASM Press, Washington, DC, USA.

Neumann, E. & Rosenheck, K. (1972) Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membr. Biol.* 10, 279-290.

Norte, V.A., Stapleton, M.R. & Green, J. (2003) PhoP-responsive expression of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium *slyA* gene. *J. Bacteriol.* 185, 3508-3514.

O'Callaghan, C.H., Kirby, S.M., Morris, A., Waller, R.E. & Duncombe, R.E. (1972a) Correlation between hydrolysis of the -lactam bond of the cephalosporin nucleus and expulsion of the 3-substituent. *J. Bacteriol.* 110, 988-991.

O'Callaghan, C.H., Morris, A., Kirby, S.M. & Shingler, A.H. (1972b) Novel method for detection of β-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1, 283-288.

O'Shannessy, D.J., Brigham-Burke, M. & Peck, K. (1992) Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector. *Anal. Biochem.* 205, 132-136.

Oliva, B., Gordon, G., McNicholas, P., Ellestad, G. & Chopra, I. (1992) Evidence that tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome cause lysis of *Escherichia col*i. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 913-919.

Pacaud, M. (1982) Identification and localization of two membrane-bound esterases from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 149, 6-14.

Palfrey, D., Picardo, M. & Hine, A.V. (2000) A new randomization assay reveals unexpected elements of sequence bias in model 'randomized' gene libraries: implications for biopanning. *Gene* 251, 91-99.

Pande, J., Szewczyk, M.M. & Grover, A.K. (2010) Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnol Adv.* 28, 849-858.

Patrick, W.M., Firth, A.E. & Blackburn, J.M. (2003) User-friendly algorithms for estimating completeness and diversity in randomized protein-encoding libraries. *Protein Eng.* 16, 451-457.

Pauling, L. (1948) Chemical achievement and hope for the future. *Am. Sci.* 36, 51-58.

Peim, A. (2003) Protein Engineering am Anticalin DigA16: Steigerung der Affinität zu Digoxigenin mittels ortsgerichteter Mutagenese. BSc-Arbeit, Technische Universität München, Lehrstuhl für Biologische Chemie, Freising.

Perelson, A.S. & Oster, G.F. (1979) Theoretical studies of clonal selection: minimal antibody repertoire size and reliability of self-non-self discrimination. *J. Theor. Biol.* 81, 645-670.

Phelan, R.M., Ostermeier, M. & Townsend, C.A. (2009) Design and synthesis of a β-lactamase activated 5-fluorouracil prodrug. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 1261-1263.

Pinto, A.L., Hellinga, H.W. & Caradonna, J.P. (1997) Construction of a catalytically active iron superoxide dismutase by rational protein design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5562-5567.

Pittard, J. & Wallace, B.J. (1966) Distribution and function of genes concerned with aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 91, 1494-1508.

Pollack, S.J., Jacobs, J.W. & Schultz, P.G. (1986) Selective chemical catalysis by an antibody. *Science* 234, 1570-1573.

Precht, M. & Kraft, R. (1993) Bio-Statistik 2. 5. Aufl., Oldenbourg Wissenschaftsverlag, München.

Radzicka, A. & Wolfenden, R. (1995) A proficient enzyme. *Science* 267, 90-93.

Reetz, M.T., Zonta, A., Schimossek, K., Liebeton, K. & Jaeger, K.E. (1998) Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by *in vitro* evolution. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36, 2830-2832.

Robinson, C.R. & Sauer, R.T. (1998) Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5929-5934.

Rodriguez-Quinones, F. & Benedi, V. (1993) *Escherichia coli* strain DH5α is a suitable host for the study of *phoA* insertions. *Focus Journal (Invitrogen)* 15, 110-112.

Rothe, C., Urlinger, S., Lohning, C., Prassler, J., Stark, Y., Jager, U., Hubner, B., Bardroff, M., Pradel, I., Boss, M., Bittlingmaier, R., Bataa, T., Frisch, C., Brocks, B., Honegger, A. & Urban, M. (2008) The human combinatorial antibody library HuCAL GOLD combines diversification of all six CDRs according to the natural immune system with a novel display method for efficient selection of high-affinity antibodies. *J. Mol. Biol.* 376, 1182-1200.

Rukavishnikov, A., Gee, K.R., Johnson, I. & Corry, S. (2011) Fluorogenic cephalosporin substrates for β-lactamase TEM-1. *Anal. Biochem.* 419, 9-16.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning – A laboratory manual. 3. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

Schenborn, E. & Groskreutz, D. (1999) Reporter gene vectors and assays. *Mol. Biotechnol.* 13, 29-44.

Schiefner, A., Chatwell, L., Breustedt, D.A. & Skerra, A. (2010) Structural and biochemical analyses reveal a monomeric state of the bacterial lipocalin Blc. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 1308-1315.

Schlehuber, S., Beste, G. & Skerra, A. (2000) A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin. *J. Mol. Biol.* 297, 1105-1120.

Schlehuber, S. & Skerra, A. (2001) Duocalins: engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. *Biol. Chem.* 382, 1335-1342.

Schlehuber, S. & Skerra, A. (2005) Lipocalins in drug discovery: from natural ligand-binding proteins to "anticalins". *Drug Discov Today* 10, 23-33.

Schmidt, A.M., Bloss, I. & Skerra, A. (1998) Improved folding of apo-retinol-binding protein in the periplasm of *Escherichia coli*: positive influences of *dsb*C coexpression and of an amino acid exchange in the vitamin A binding site. *Protein Eng.* 11, 601-607.

Schmidt, F.S. (1995) Das Bilin-Bindungsprotein aus *Pieris brassicae* – die β-Barrel Protein-architektur als Grundlage für die evolutive Generierung von Rezeptormolekülen mit neuen Bindungseigenschaften. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie, Frankfurt am Main.

Schmidt, F.S. & Skerra, A. (1994) The bilin-binding protein of Pieris brassicae. cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein. *Eur. J. Biochem.* 219, 855-863.

Schmidt, T.G. & Skerra, A. (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein. Eng.* 6, 109-122.

Schmidt, T.G. & Skerra, A. (2007) The *Strep*-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* 2, 1528-1535.

Schönfeld, D., Matschiner, G., Chatwell, L., Trentmann, S., Gille, H., Hülsmeyer, M., Brown, N., Kaye, P.M., Schlehuber, S., Hohlbaum, A.M. & Skerra, A. (2009) An engineered lipocalin specific for CTLA-4 reveals a combining site with structural and conformational features similar to antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 8198-8203.

Schreiber, G. (1988) Ein kombinatorisches Problem aus der Genetik. *BioEngineering* 88, 32-35.

Shepherd, T.A., Jungheim, L.N., Meyer, D.L. & Starling, J.J. (1991) A novel targeted delivery system utilizing a cephalosporin-oncolytic prodrug activated conjugate for the treatment of cancer. *Bioorg. Medicinal Cem. Lett.* 1, 21-26.

Siegel, J.B., Zanghellini, A., Lovick, H.M., Kiss, G., Lambert, A.R., St Clair, J.L., Gallaher, J.L., Hilvert, D., Gelb, M.H., Stoddard, B.L., Houk, K.N., Michael, F.E. & Baker, D. (2010) Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction. *Science* 329, 309-313.

Siemers, N.O., Kerr, D.E., Yarnold, S., Stebbins, M.R., Vrudhula, V.M., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E. & Senter, P.D. (1997) Construction, expression, and activities of L49-sFv-β-lactamase, a single-chain antibody fusion protein for anticancer prodrug activation. *Bioconjug. Chem.* 8, 510-519.

Sigurskjold, B.W. (2000) Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry. *Anal. Biochem.* 277, 260-266.

Skerra, A. (1989) Funktionelle Expression Antigen bindender Immunglobulinfragmente in *Escherichia coli*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, Fakultät für Chemie und Pharmazie, München.

Skerra, A. (1992) Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity. *Nucleic Acids Res.* 20, 3551-3554.

Skerra, A. (1994a) A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. *Gene* 141, 79-84.

Skerra, A. (1994b) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151, 131-135.

Skerra, A. (2000) Lipocalins as a scaffold. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 337-350.

Skerra, A. (2003) Imitating the humoral immune response. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 683-693.

Skerra, A. (2007) Anticalins as alternative binding proteins for therapeutic use. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9, 336-344.

Skerra, A. (2008) Alternative binding proteins: Anticalins – harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J.* 275, 2677-2683.

Skerra, A. & Schmidt, T.G. (2000) Use of the *Strep*-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* 326, 271-304.

Smejkal, B. (2005) Optimierung eines funktionellen Fusionsproteins aus dem Anticalin DigA16 und der Alkalischen Phosphatase. BSc-Arbeit, Technische Universität München, Lehrstuhl für Biologische Chemie, Freising.

Smiley, J.A. & Benkovic, S.J. (1994) Selection of catalytic antibodies for a biosynthetic reaction from a combinatorial cDNA library by complementation of an auxotrophic *Escherichia coli*: antibodies for orotate decarboxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8319-8323.

Smith, G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.

Sole, M., Rius, N. & Loren, J.G. (2000) Rapid extracellular acidification induced by glucose metabolism in non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Int. Microbiol.* 3, 39-43.

Strauch, K.L. & Beckwith, J. (1988) An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1576-1580.

Strauch, K.L., Johnson, K. & Beckwith, J. (1989) Characterization of *degP*, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *J. Bacteriol.* 171, 2689-2696.

Studier, F.W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein. Expr. Purif.* 41, 207-234.

Sutcliffe, J.G. (1978) Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3737-3741.

Suter, F., Kayser, H. & Zuber, H. (1988) The complete amino-acid sequence of the bilin-binding protein from *Pieris brassicae* and its similarity to a family of serum transport proteins like the retinol-binding proteins. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 369, 497-505.

Suzuki, C., Ueda, H., Suzuki, E. & Nagamune, T. (1997) Construction, bacterial expression and characterization of hapten-specific single-chain Fv and alkaline phosphatase fusion protein. *J. Biochem. (Tokyo)* 122, 322-329.

Suzuki, C., Ueda, H., Tsumoto, K., Mahoney, W.C., Kumagai, I. & Nagamune, T. (1999) Open sandwich ELISA with $V_H$-/$V_L$-alkaline phosphatase fusion proteins. *J. Immunol. Methods* 224, 171-184.

Tanaka, F. (2002) Catalytic antibodies as designer proteases and esterases. *Chem. Rev.* 102, 4885-4906.

Taylor, S.V., Kast, P. & Hilvert, D. (2001a) Investigating and engineering enzymes by genetic selection. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40, 3310-3335.

Taylor, S.V., Walter, K.U., Kast, P. & Hilvert, D. (2001b) Searching sequence space for protein catalysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10596-10601.

Tramontano, A., Janda, K.D. & Lerner, R.A. (1986) Chemical reactivity at an antibody binding site elicited by mechanistic design of a synthetic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6736-6740.

Tung, W.L. & Chow, K.C. (1995) A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet.* 11, 128-129.

Van den Brulle, J., Fischer, 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, 340-343.

Vieira, J. & Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 153, 3-11.

Virnekas, B., Ge, L., Plückthun, A., Schneider, K.C., Wellnhofer, G. & Moroney, S.E. (1994) Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 22, 5600-5607.

Vogt, M. & Skerra, A. (2001) Bacterially produced apolipoprotein D binds progesterone and arachidonic acid, but not bilirubin or E-3M2H. *J. Mol. Recognit.* 14, 79-86.

Vogt, M. & Skerra, A. (2004) Construction of an artificial receptor protein ("anticalin") based on the human apolipoprotein D. *Chembiochem* 5, 191-199.

Vopel, S., Mühlbach, H. & Skerra, A. (2005) Rational engineering of a fluorescein-binding anticalin for improved ligand affinity. *Biol. Chem.* 386, 1097-1104.

Voreck, A. (2007) Produktion und Charakterisierung von Fusionsproteinen aus einem Digoxigenin-bindenden Anticalin und der Esterase 2 aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* sowie der AmpC β-Lactamase aus *Enterobacter cloacae*. BSc., Technische Universität München, Lehrstuhl für Biologische Chemie, Freising.

Voss, S. & Skerra, A. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the *Strep*-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* 10, 975-982.

Wang, C.L., Huang, M., Wesson, C.A., Birdsell, D.C. & Trumble, W.R. (1994) A single Fc binding domain–alkaline phosphatase gene fusion expresses a protein with both IgG binding ability and alkaline phosphatase enzymatic activity. *Protein. Eng.* 7, 715-722.

Wang, S.L., Luo, Y.F., Yi, X., Yu, W.W., Xu, Z.W., Ma, X.Q., He, J.G. & Liu, Q.Y. (2007) A highly efficient and highly reliable protocol for transformation of *Escherichia coli* by electroporation. *J. Rapid. Methods Autom. Microbiol.* 15, 253-258.

Weissig, H., Schildge, A., Hoylaerts, M.F., Iqbal, M. & Millan, J.L. (1993) Cloning and expression of the bovine intestinal alkaline phosphatase gene: biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Biochem. J.* 290, 503-508.

Wentworth, P., Datta, A., Blakey, D., Boyle, T., Partridge, L.J. & Blackburn, G.M. (1996) Toward antibody-directed "abzyme" prodrug therapy, ADAPT: carbamate prodrug activation by a catalytic antibody and its *in vitro* application to human tumor cell killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 799-803.

Wentworth, P., Datta, A., Smith, S., Marshall, A., Partridge, L.J. & Blackburn, G.M. (1997) Antibody catalysis of $B_{Ac}2$ aryl carbamate ester hydrolysis: A highly disfavored chemical process. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 5275-5275.

Wierenga, R.K. (2001) The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett.* 492, 193-198.

Winnacker, E.-L. (1990) Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie. 3. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim.

Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. & Hoogenboom, H.R. (1994) Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433-455.

Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F. & Lin, L.N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179, 131-137.

Wolfenden, R. (1969) Transition state analogues for enzyme catalysis. *Nature* 223, 704-705.

Wolfenden, R., Lu, X.D. & Young, G. (1998) Spontaneous hydrolysis of glycosides. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 6814-6815.

Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. & Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* 17, 3469-3478.

Wu, H.C. (1996) Biosynthesis of lipoproteins. In: Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Rezniko, W.S., Riley, M., Schaechter, M. & Umbarger, H.E. (Hrsg.) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2. Aufl., ASM Press, Washington, DC, USA.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

Yano, T., Oue, S. & Kagamiyama, H. (1998) Directed evolution of an aspartate aminotransferase with new substrate specificities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5511-5515.

Yokota, T., Milenic, D.E., Whitlow, M. & Schlom, J. (1992) Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res.* 52, 3402-3408.

Zaccolo, M., Williams, 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, 589-603.

Zimmermann, U., Pilwat, G. & Riemann, F. (1974) Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys. J.* 14, 881-899.

Zlokarnik, G., Negulescu, P.A., Knapp, T.E., Mere, L., Burres, N., Feng, L., Whitney, M., Roemer, K. & Tsien, R.Y. (1998) Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with β-lactamase as reporter. *Science* 279, 84-88.

# 7 Abkürzungen

| | |
|---|---|
| A | Absorption |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| Amp | Ampicillin |
| BBP | Bilin-Bindungsprotein |
| Blc | Bakterielles-Lipocalin |
| bp | Basenpaare |
| BSA | *Bovine Serum Albumin* (Rinder-Serumalbumin) |
| Cam | Chloramphenicol |
| *dd*$H_2O$ | doppelt destilliertes Wasser |
| DIG | Digoxigenin |
| DsbC | Bakterielle Disulfidisomerase C |
| dsDNA | Doppelstang DNA |
| DTX | Digitoxigenin |
| E | Extinktion |
| ELISA | *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* |
| F | Fluoreszenzintensität |
| Fab | Antigenbindendes Antikörper-Fragment |
| FT | Fluoreszenztitration |
| g | durchschnittliche Erdbeschleunigung |
| HPLC | *High Performance Liquid Chromatography* |
| kb | Kilobasenpaare |
| KbE | Kolonie bildende Einheit(en) |
| $K_d$ | Komplexdissoziationskonstante |
| kDa | Kilodalton |
| $\lambda_{em}$ | Emissionswellenlänge |

| | |
|---|---|
| $\lambda_{ex}$ | Anregungswellenlänge |
| min | Minute(n) |
| ms | Millisekunde(n) |
| MW | *molecular weight* (Molekülmasse) |
| MWG | Massenwirkungsgesetz |
| $OD_{xxx}$ | Optische Dichte bei xxx nm |
| OmpA | *Outer membrane protein A* |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PCR | *Polymerase Chain Reaction* |
| PDB | *Protein Data Bank* |
| *pfu* | *plaque forming units* |
| *Pfu* | *Pyrococcus furiosus* |
| PhoA | Alkalische Phosphatase |
| $Q_{max}$ | maximale Fluoreszenzlöschung |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde(n) |
| scFv | *single chain variable antibody fragment* |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| ssDNA | *single stranded DNA* (Einzelstrang DNA) |
| *Taq* | *Thermus aquaticus* |
| U | *unit*; Einheit der enzymatischen Aktivität |
| ü. N. | über Nacht |
| UPM | Umdrehungen pro Minute |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| Vol. | Volumenteil(e) |
| w/v | *weight per volume* (Masse pro Volumen) |

# Danksagung

Ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Arne Skerra, der mir unter anderem die Bearbeitung des spannenden Projektes zur *In-Vivo*-Selektion ermöglicht hat. Vielen Dank für Ihre Geduld, Ihre stete Unterstützung und die vielen wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen!

Ich danke auch meinen Kollegen vom Lehrstuhl für Biologische Chemie für ihre Kollegialität und die gegenseitige Hilfe im Laboralltag. Ich denke gerne an unsere gemeinsame Zeit im Labor zurück!

Außerdem möchte ich meiner Familie und meinen Eltern für ihre ausdauernde Unterstützung im privaten Umfeld danken. Gerade in der Endphase dieser Arbeit musstet ihr mich so oft entbehren!